

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Escherichia coli'DE AŞIRI İFADE EDİLEN GENLERİN
BOR TOLERANSINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE
BORA BAĞLI GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

DOKTORA TEZİ

ESRA DİBEK

NİSAN 2020

MUĞLA

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli*'DE AŞIRI İFADE EDİLEN GENLERİN
BOR TOLERANSINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE
BORA BAĞLI GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ**

DOKTORA TEZİ

ESRA DİBEK

NİSAN 2020

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ESRA DİBEK tarafından hazırlanan *Escherichia coli*'DE AŞIRI İFADE EDİLEN GENLERİN BOR TOLERANSINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE BORA BAĞLI GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ tezinin, tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Doç. Dr. Bekir ÇÖL (Jüri Başkanı, Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

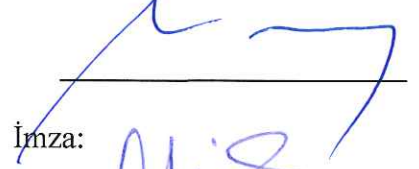
İmza:



Dr. Öğr. Üyesi Köksal KÜÇÜKAKYÜZ (Üye)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

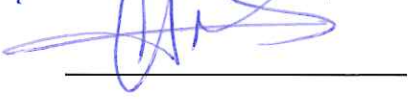
İmza:



Doç. Dr. Gürler AKPINAR (Üye)

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli

İmza:



Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN (Üye)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Prof. Dr. Murat KASAP (Üye)

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli

İmza:

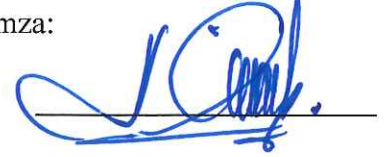


BÖLÜM BAŞKANLIĞI VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 30/04/2020

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin Muğla BAP 18/005 projesi, Tübitak 114Z987 ve 119Z080 çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

ESRA DİBEK

30/04/2020

Esra DibeK

ÖZET

***Escherichia coli*'DE AŞIRI İFADE EDİLEN GENLERİN BOR TOLERANSINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE BORA BAĞLI GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ**

ESRA DİBEK

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Nisan 2020, 286 sayfa

Bor, birçok açıdan stratejik ve enigmatik bir elementtir. Borik asit ve bor bileşiklerinin birçoğu çeşitli bakteri hücrelerini öldürmekte veya üremesini inhibe etmektedir. Ancak bunu, hücredeki hangi molekülleri etkileyerek yaptıkları ve bu bileşiklere karşı kullanılan hücresel cevap mekanizmaları yeterince bilinmemektedir. Bundan dolayı, uygun model organizmalar kullanılarak, bor ile ilgili biyomoleküller, özellikle genler, proteinler ve metabolitler bulunmalıdır. Bu hedeflere ulaşabilmek için bu tez çalışmasında, genomik, proteomik, metabolomik ve gen ekspresyon analizlerini içeren yaklaşımlar kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının ilk basamağında genomik yaklaşımı esas alınmıştır. *Escherichia coli* ASKA klon setinde yer alan 4123 adet suş, artan borik asit ortamında, genom boyu tarama deneylerine tabii tutulmuştur. Plazmitlerdeki genlerin ekspresyonunu indüklemek için 100 µM ve 33 µM IPTG kullanılmıştır. Kontrol suşuna kıyasla göreceli olarak yüksek borik asit konsantrasyonlarında yaşayan suşlar seçilmiştir. 100 µM IPTG kullanılarak yapılan genom boyu taramalardan 17 adet suşun göreceli olarak yüksek borik asit ortamında üreme gösterdiği bulunmuş ve sonuçlar çeşitli ek tekniklerle onaylanmıştır. 33 µM IPTG kullanılarak yapılan taramalardan bulunan ve onaylanan suşlar ise 52 adet olup, bu suşların içerdikleri genlerin fazla ifadesiyle, göreceli olarak yüksek borik asit konsantrasyonlarında üreyebildikleri belirlenmiştir. Göreceli olarak yüksek bor toleransına sahip suşlar, *aceK*, *rfaQ*, *yjcF*, *yndE*, *bdm*, *yeeY*, *yddV*, *recQ*, *ygcU*, *ptsA*, *ydeE*, *lacI*, *lacA*, *cobT*, *gatD*, *paaE*, *ugpC*, *prfH*, *yaiB*, *nusB*, *cbpM*, *malI*, *ydhD*, *yeaC*, *yeeT*, *yfjL*, *hcaD*, *elaB*, *hypC*, *yfjU*, *yqeK*, *yhiJ*, *rep*, *thiC*, *yifB*, *aceA*, *sgbE*, *fre*, *ytfG*, *sgcQ*, *rpsJ*, *yhcE*, *yhdL*, *tnaC*, *ytfA*, *ulaB*, *yjgX*, *yjhX*, *sgcA*, *chpS*, *yceP*, *yjhD*, *yrbB*, *gatR*, *yoeF*, *arpB*, *hybF*, *ygeM*, *ymfP*, *yicR*, *hpt*, *frcC*, *menD*, *yadI*, *ydiA*, *yfcT*, *arsB*, *yeyQ* ve *yddK* genlerini taşımaktadır.

Çalışmanın ikinci basamağında, 4123 gen klonunu içeren, “ASKA klon genomik kütüphane havuzu” elde edilmiş ve yüksek borik asit içeren ortamlarda zenginleştirme yöntemiyle seleksiyon yapılmıştır. Ayrıca, ASKA klon genomik kütüphane havuzunun, ‘*in vitro*’ plazmid kütüphanesi oluşturulmuştur. Plazmitler

DH10b suşuna transforme edildikten sonra, yine zenginleştirme yöntemi ile seleksiyona tabii tutulmuş ve tolerant koloniler seçilmiştir. Her iki çalışmadan elde edilen tolerant klonların rekombinant plazmidlerinde yer alan genler Sanger sekanslama yöntemi ile belirlenmiş ve 9 adet gen bilgisine ulaşılmıştır. Bu genlerin isimleri *dtd*, *yedL*, *yjbO*, *elfC*, *yfjK*, *yfiC*, *sufD*, *yecF*, *idnR*'dir.

Üçüncü aşamada proteomik teknolojisine başvurulmuştur. 2-DE (iki boyutlu jel elektroforezi) analizleri için, göreceli olarak yüksek borik asit ortamında üreme gösteren AG1(pCA24N::*aceK*) ve AG1(pCA24N::*ptsA*) suşları seçilmiştir. Plazmitte ifade edilen genden dolayı borik asit stresi ile baş edebilen ve bu ortamda yaşayabilen klonların protein profilleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucu AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için up-regüle olduğu gözlenen 8 adet protein spotu, AG1(pCA24N::*ptsA*) suşu için ise up-regüle olan 7 protein spotu seçilmiştir. Borik asite cevap oluşturmada görevli olduğu düşünülen proteinleri içeren bu spotların MALDI-TOF-TOF analizi ile protein kimlikleri belirlenmiştir. AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun proteomik analizi sonucu, PykF, Pkg, EftS, OmpA, CysK, KduD, AtpA, PrpD proteinleri, AG1(pCA24N::*ptsA*) suşunun proteomik analizi sonucu, PykF, MalE, G3P1, AhpC, Alf, Mdh, KduI proteinleri belirlenmiştir.

Tezin dördüncü aşamasında daha önceki çalışmalardan elde edilen gen bilgileri değerlendirilerek, gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Seçilen genler üzerinde, gerçek-zamanlı PCR deneyleri yapılmış ve kontrol dahil 30 adet genin farklı borik asit konsantrasyonlarında göreceli mRNA seviyeleri ortaya çıkarılmıştır. Test edilen genlerden özellikle, *kduD*, *kduI*, *sodA*, *ompR*, *deoB*, *yoaC* ve *icd* genlerinin transkript seviyelerinin, borik asit stresine bağlı olarak, dramatik bir şekilde arttığı bulunmuştur.

Son olarak metabolomiks yaklaşımı kullanılarak, bor stresi ile ilgili metabolitlerin belirlenebilmesi için, NMR (nükleer manyetik rezonans) analizlerine başvurulmuştur. Borik asit içermeyen ve artan 3 farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılarak yetiştirilen AG1(pCA24N::*aceK*) ve *E. coli* DH10b suşlarından metabolit ekstraktları elde edilmiş ve ¹H-NMR deneyleri yapılmıştır. AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için borik asit ortamında Adenine, Galactarate, Gluconate, Glutamate, Guanidoacetate, Guanosine, Inosine, Lactulose, Oxypurinol, Putrescine, Pyroglutamate, Threonine, Uridine metabolitlerinin seviyeleri artmış, Erythritol ve Saccharopine metabolitlerinin seviyeleri azalmıştır. *E. coli* (DH10b) suşunun borik asit ortamında Oxypurinol, Uracil, Xanthine, Glucarate, Putrescine, Thymine, Galactonate, Hypoxanthine, Maleate, Adenosine, Pantothenate, 1,6-Anhydro-β-D-glucose, Galactarate, Nicotinate, Nicotinurate, Pyridoxine, Thymidine, Uridine, Xanthosine metabolitlerin seviyeleri artmıştır. Seviyeleri azalan metabolitler ise Inosine, Niacinamid, Saccharopine, Glycine ve Lactate'dır.

Bu tez çalışması, genomik, proteomik, metabolomik, moleküler genetik ve mikrobiyolojik yaklaşımları kullanarak, bor (tolerans)-bakteri ilişkisinde rol alan genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin belirlenebilmesi adına, değerli veriler üretmiş olan önemli ve kapsamlı bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Bor, Tolerans, *E. coli*, Gen, Genomik, Proteomik, Metabolomik

ABSTRACT

INVESTIGATING THE EFFECTS OF OVER EXPRESSED GENES ON BORON TOLERANCE IN *Escherichia coli* AND GENE EXPRESSION ANALYZES PERTAINING TO BORON

ESRA DİBEK

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bekir ÇÖL

April 2020, 286 pages

Boron (B) is a strategic and enigmatic element in many aspects. Boric acid and most boron compounds cause death or inhibit the growth of various bacterial cells. However, it is not well understood which biomolecules are targeted in the cell and response mechanisms are used against these boron compounds. Consequently, boron-related biomolecules, particularly genes, proteins and metabolites should be investigated using appropriate model organisms. Towards reaching these goals, the approaches of genomics, proteomics, metabolomics and gene expression analyzes were applied.

In the first part of this thesis, genomic approach was used and a number of 4123 strains of the ASKA clone set belonging to *Escherichia coli* were subjected to genome-wide screening experiments in the presence of increasing boric acid concentrations. In order to induce the expression of the genes contained in the plasmids, 100 μ M and 33 μ M IPTG were used. Comparing to the control, the strains surviving at relatively high boric acid concentrations were selected. As a result of genome-wide screens using 100 μ M IPTG, a number of 17 strains were found to grow in relatively higher levels of boric acid and the results were confirmed by various additional methods. The number of strains that were selected using 33 μ M IPTG was 52, which were shown to grow in the presence of relatively higher boric acid concentrations owing to the over-expressed genes that they contain. The strains that have relatively higher boron tolerance possess the following cloned genes: *aceK*, *rfaQ*, *yjcF*, *ymdE*, *bdm*, *yeeY*, *yddV*, *recQ*, *ygcU*, *ptsA*, *ydeE*, *lacI*, *lacA*, *cobT*, *gatD*, *paaE*, *ugpC*, *prfH*, *yaiB*, *nusB*, *cbpM*, *mall*, *ydhD*, *yeaC*, *yeeT*, *yjfL*, *hcaD*, *elaB*, *hypC*, *yjfU*, *yqeK*, *yhiJ*, *rep*, *thiC*, *yifB*, *aceA*, *sgbE*, *fre*, *ytfG*, *sgcQ*, *rpsJ*, *yhcE*, *yhdL*, *tnaC*, *ytfA*, *ulaB*, *yjgX*, *yjhX*, *sgcA*, *chpS*, *yceP*, *yjhD*, *yrbB*, *gatR*, *yoeF*, *arpB*, *hybF*, *ygeM*, *ympP*, *yicR*, *hpt*, *frlC*, *menD*, *yadI*, *ydiA*, *yfcT*, *arsB*, *yqiQ* ve *yddK*.

In the second part of the study, “ASKA clone genomic library pool” containing 4123 gene clones was generated and selection was carried out by the enrichment method under the conditions of high boric acid levels. In addition, the “*in vitro*” plasmid

library of the ASKA clone genomic library pool was obtained. After the plasmids were transformed into strain DH10b, the enrichment method was used again for selection and the tolerant colonies were chosen. The genes in the recombinant plasmids of the tolerant clones obtained from both studies were identified by the Sanger sequencing method. A number of 9 genes were found namely *dtd*, *yedL*, *yjbO*, *elfC*, *yjK*, *yfiC*, *sufD*, *yecF* and *idnR*.

In the third part, proteomic technology was applied. For 2-DE (two-dimensional gel electrophoresis), the strains AG1(pCA24N::*aceK*) and AG1(pCA24N::*ptsA*), which showed growth in the medium containing relatively high boric acid concentrations, were selected. Due to the gene(s) expressed in the plasmid(s), the clones could cope with boric acid stress and the protein profiles of them subjected to boric acid stress were compared. As a result of the study, 8 protein spots were observed to be up-regulated for the strain AG1(pCA24N::*aceK*) and for AG1(pCA24N::*ptsA*) strain, 7 up-regulated protein spots were selected. Identification of the proteins within the spots were determined by MALDI-TOF-TOF analysis. Proteomic analyzes of the strains AG1(pCA24N::*aceK*) and AG1(pCA24N::*ptsA*) revealed PykF, Pgg, EftS, OmpA, CysK, KduD, AtpA, PrpD proteins and PykF, MalE, G3P1, AhpC, Alf, Mdh, KduI proteins, respectively.

In the fourth part of the thesis, by evaluating the gene information obtained from previous studies, gene expression analyzes were conducted. Real-time PCR experiments were performed on selected genes and including the control, relative mRNA levels of 30 genes at different boric acid concentrations were revealed. Of the genes tested, in particular, the transcript levels of *kduD*, *kduI*, *sodA*, *ompR*, *deoB*, *yoaC* and *icd* genes were found to increase dramatically in response to boric acid stress.

At last, metabolomics approach was used and NMR (nuclear magnetic resonance) analyzes were used to search for boron stress related metabolites. Metabolite extracts were obtained from AG1(pCA24N::*aceK*) and *E. coli* DH10b strains exposed to none as well as 3 different boric acid concentration and ¹H-NMR experiments were performed. The results indicate that, for AG1(pCA24N::*aceK*), the levels of Adenine, Galactarate, Gluconate, Glutamate, Guanidoacetate, Guanosine, Inosine, Lactulose, Oxypurinol, Putrescine, Pyroglutamate, Threonine, Uridine metabolites increased, whereas Erythritol and Saccharopine levels decreased in the boric acid media. For *E. coli*(DH10b) however, the levels of Oxypurinol, Uracil, Xanthine, Glucarate, Putrescine, Thymine, Galactonate, Hypoxanthine, Maleate, Adenosine, Pantothenate, 1,6-Anhydro-β-D-glucose, Galactarate, Nicotinate, Nicotinurate, Pyridoxine, Thymidine, Uridine, Xanthosine metabolites increased and the levels of Inosine, Niacinamid, Saccharopine, Glycine ve Lactate decreased.

In conclusion, this thesis study is a significant and comprehensive study that has provided valuable information by identifying genes, proteins and metabolites involved in boron (tolerance)-bacterial relationship using genomics, proteomics, metabolomics, molecular genetics and microbiological approaches.

Keywords: Boron, Tolerance, *E. coli*, Genomics, Proteomics, Metabolomics

Sevgili aileme...



ÖNSÖZ

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimimde danışmanım olan, laboratuvar çalışmaları konusunda her türlü eğitimi veren, tez yazımı ve düzenlenmesinde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, azim ve özveri ile gece gündüz çalışmanın önemini her daim hissettiren, manen de her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca görüş ve tavsiyelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Köksal KÜÇÜKAKYÜZ'e teşekkür ederim. Proteomik deneylerinin analizlerinde laboratuvar imkanlarını sunan, deneysel alanlardaki bilgi ve tecrübelerini her zaman paylaşan değerli hocalarım, Sayın Doç. Dr. Gürler AKPINAR ve Sayın Prof. Dr. Murat KASAP'a teşekkür ederim. Metabolomik deneylerinin yapılmasında birlikte çalıştığımız, imkanlarını ve tecrübelerini her zaman paylaşan değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN'e teşekkür ederim. NMR deneylerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Young Kee CHAE'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim sırasında, aynı laboratuvarda, birlikte çalıştığımız laboratuvar çalışmalarının yapılmasında ve tez yazım sürecinde bana destek ve güç veren, arkadaşlığını her daim hissettiğim Dr. Merve SEZER KÜRKÇÜ'ye, laboratuvarda deneylerin yapılması, verilerin toplanması, düzenlenmesi konusunda çalışıp destek veren ve arkadaşlığı ile yanımda olan Anara BABAYEVA'ya, teşekkür ederim. Aynı laboratuvarda çalışmaktan keyif aldığım, beni her zaman destekleyen arkadaşım Begüm Hazar ÇİFTÇİ'ye ve yine laboratuvar arkadaşım olan Anı Altuğ CURNA'ya teşekkür ederim. Aynı zamanda şu anda ekibimizde bulunan, özverili bir şekilde çalışan Hatice ÖZTÜRKEL ve Kadriye Aslıhan ONAT'a ve geçmişte moleküler biyoloji-biyokimya laboratuvarında birlikte çalıştığımız tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim. Aynı laboratuvar alt yapısını

kullandığımız arkadaşım Dr. Müjgan KESİK OKTAY'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Lisans döneminden bu yana süren arkadaşlığımızda, beni her zaman destekleyen, yanımda olan, bana güç veren çok kıymetli arkadaşım Dr. Ezgin BÖLÜK'e ve yine çok değerli arkadaşım Sercan BÖYÜKALAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, bu uzun ve bazen zorlu olan eğitim hayatımı, maddi ve manevi destekleyen annem ve babam Zekiye-Hikmet DİBEK'e çok teşekkür ederim. Kardeşlerim Mehmet Ali, Maruf, abim Hasan, eşi Gönül ve yeğenim Zümrüt'e her daim yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını finansal olarak destekleyen, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) (114Z987, 118Z584 ve 119Z080 projeleri) ve Muğla SK Üniversitesi BAP (18/005 numaralı proje) birimine teşekkür ederim. Ayrıca 12 yıldır bir parçası olduğum üniversitem ve kurumum Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi'ne ve eğitimimde emeği geçen hocalarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
KISALTMALAR DİZİNİ	xxx
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	2
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.2.1. Bor kimyası	4
1.2.2. Kullanım alanları	5
1.2.4. Bor ve çevre (toprak, hava, su ve gıda)	6
1.2.5. Bor ve canlılar	7
1.2.6. Hücre içine taşınım.....	9
1.2.7. Bor toksisitesi	11
1.2.8. Bor içeren moleküller	12
1.2.9. Borik asit	14
1.2.10. ASKA klon seti.....	14
2. MALZEME VE YÖNTEM	20
2.1. <i>Escherichia coli</i> ASKA Klon Setinin Canlandırılması ve Stokların Alınması	20
2.2. Genom Boyunca Tarama Çalışmaları	21
2.3. ASKA Klon Seti Genom Boyu Kütüphane Havuzu ile Yapılan Çalışmalar.....	23
2.3.1. ASKA klon seti genom boyu kütüphane havuzunun oluşturulması	23
2.3.2. Genom boyu kütüphane havuzunun büyüme eğrisinin belirlenmesi ve zenginleştirme ile seleksiyon çalışmaları	25
2.4. DH10b ASKA Plazmid Havuzunun Elde Edilmesi (DH10b ASKA Pooled Library)	28
2.4.1. ASKA klon <i>in vitro</i> plazmid kütüphanesinin elde edilmesi.....	28
2.4.2. DH10b kompetant hücrelerin elde edilmesi	28

2.4.3. Isı şoku yöntemi ile transformasyon.....	29
2.4.4. DH10b ASKA kütüphane havuzu ile yapılan farklı seleksiyon çalışmaları.....	29
2.5. Klonların Farklı Tekniklerle Yüksek Borik Asit Konsantrasyonlarında Üreme Durumlarının Onaylanması	32
2.5.1. Bor tolerans nokta testi	32
2.5.2 MIC (Minimum Inhibition Concentration) testi.....	32
2.5.3. Çizgi ekim	33
2.6. Plazmidlerde Yer Alan İnsert Bölgelerinin Sekanlanması ve Biyoinformatik Analizleri	33
2.7. Seçilen Klonların Proteomik Analizleri	34
2.7.1. Protein izolasyonu ve saflaştırma işlemleri	34
2.7.2 Proteinlerin miktarının belirlenmesi	35
2.7.3. SDS-PAGE yöntemi ile proteinlerin kalitesinin analizi	35
2.7.4. Birinci boyutta ayırım.....	36
2.7.5. Proteinlerin ikinci boyutta ayrılması	37
2.7.6. Protein spotlarının kesimi, MALDI TOF-TOF analizi ve proteinlerin tanımlaması.....	39
2.8. Tespit Edilen Genlerin Real-Time PCR (qPCR) Deneyleeri ile Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	39
2.8.1. Primer dizaynı	39
2.8.2. Hücre yetiştirilmesi	39
2.8.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	40
2.8.4. Real-Time PCR deneyleeri.....	40
2.9. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) Metabolomik Analiz Yöntemleri.....	41
2.9.1. Metabolit ekstraksiyonu	41
2.9.2. Metabolit ekstraktlarının tek boyutlu (1D) proton (¹ H) NMR analizleri	42
2.9.3. NMR metabolomik verilerin çok değişkenli istatistiksel yöntemler ile analizi.....	43
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	44
3.1. ASKA Klon Seti ile Yapılan Genom Boyu Tarama ve Onaylama Çalışmaları	44
3.1.1. ASKA klon setinin canlandırılması ve stokların alınması.....	45
3.1.2. IPTG konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan optimizasyon deneyleerinden elde edilen sonuçlar.....	47

3.1.3. ASKA klonların bor tolerans değerlerinin belirlenmesi için yapılan optimizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar	49
3.1.4. 100 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-100) deneylerinin sonuçları.....	51
3.1.5. Bor tolerans nokta testi sonuçları	52
3.1.6. MIC sonuçları	54
3.1.7. 33 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-33) deneylerinin sonuçları.....	57
3.1.8. Bor tolerans nokta testi sonuçları	58
3.2. Genom Boyu Kütüphane Havuzu ile Yapılan Seleksiyon ve Optimizasyon Deneyleri.....	83
3.2.1. Genom boyu kütüphane havuzunun oluşturulması ve farklı borik asit konsantrasyonlarında büyüme eğrisinin belirlenmesi	83
3.2.2. Zenginleştirme ile seleksiyon çalışmaları.....	85
3.2.3. Bor tolerans nokta testi	86
3.2.4. DH10b - ASKA genom boyu kütüphane havuzunun gradient ekim, direkt ekim ve zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon sonuçları	87
3.2.5. Çizgi ekim yöntemi ile seleksiyon sonuçları.....	93
3.2.6. Bor tolerans nokta testi sonuçları	93
3.3. Seçilen Klonların Proteomik Analizleri	100
3.3.1. Protein izolasyonu ve miktarlarının belirlenmesi	100
3.3.2. SDS-PAGE yöntemi ile proteinlerin kalitesinin analizi	101
3.3.3. Proteinlerin birinci ve ikinci boyutta ayrımı.....	101
3.3.4. Protein spotlarının kesimi, MALDI TOF-TOF analizi ve proteinlerin tanımlaması.....	103
3.4. Aday Bor Genlerinin Artan Bor Konsantrasyonuna Bağlı Ekspresyon Analizleri (Real-Time PCR Deneyleri).....	107
3.4.1. Primer dizaynı	107
3.4.2. <i>E. coli</i> kontrol suşundan RNA izolasyonu ve cDNA eldesi.....	110
3.4.3. Real-Time PCR reaksiyonun gerçekleştirilmesi.....	111
3.4.4. Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	111
3.4.4.1. <i>yfeS</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	112
3.4.4.2. <i>ylaC</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	115
3.4.4.3. <i>torR</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	116
3.4.4.4. <i>garP</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	117
3.4.4.5. <i>dinJ</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	118

3.4.4.6. <i>aceF</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	119
3.4.4.7. <i>trmU</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	120
3.4.4.8. <i>cheZ</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	121
3.4.4.9. <i>glxK</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	122
3.4.4.10. <i>nohA</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	123
3.4.4.11. <i>trpR</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	124
3.4.4.12. <i>ygaV</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	125
3.4.4.13. <i>galS</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	126
3.4.4.14. <i>yoaC</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	127
3.4.4.15. <i>rcnB</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	128
3.4.4.16. <i>yddE</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	129
3.4.4.17. <i>aroK</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	130
3.4.4.18. <i>talB</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	131
3.4.4.19. <i>deoB</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	132
3.4.4.20. <i>icd</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	133
3.4.4.21. <i>kduD</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	134
3.4.4.22. <i>kduI</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	135
3.4.4.23. <i>sodA</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	136
3.4.4.24. <i>lamB</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	137
3.4.4.25. <i>gatY</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	138
3.4.4.26. <i>tdcE</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	139
3.4.4.27. <i>tufI</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	140
3.4.4.28. <i>aceE</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları	141
3.4.4.29. <i>ompR</i> geninin Real-Time PCR analizi sonuçları.....	142
3.5. Bor Stresi Altında <i>E. coli</i> (DH10b) Suşu ve <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) Suşlarının NMR Yaklaşımıyla Metabolomiks Analizi	143
3.5.1. MetaboAnalyst programı kullanılarak metabolitlerin analizleri ...	161
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	176
4.1. Genom Boyu Tarama Sonuçlarında Tespit Edilen Genler	179
4.1.1. <i>lacI</i> - DNA-binding transcriptional repressor LacI	179
4.1.2. <i>lacA</i> - galactoside O-acetyltransferase	180
4.1.3. <i>cobT</i> - nicotinate nucleotide dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	181
4.1.4. <i>gatD</i> - galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase.....	182

4.1.5. <i>aceK</i> - isocitrate dehydrogenase kinase/isocitrate dehydrogenase phosphatase.....	183
4.1.6. <i>rfaQ</i> - lipopolysaccharide core heptosyltransferase 3 (<i>waaQ</i>)	185
4.1.7. <i>yjcF</i> - pentapeptide repeat-containing protein YjcF.....	186
4.1.8. <i>ymdE</i> - putative uncharacterized protein YmdE.....	186
4.1.9. <i>bdm</i> - biofilm-dependent modulation protein.....	186
4.1.10. <i>yeeY</i> - putative DNA-binding transcriptional regulator YeeY	187
4.1.11. <i>yddV</i> - diguanylate cyclase DosC	187
4.1.12. <i>recQ</i> - ATP-dependent DNA helicase RecQ.....	188
4.1.13. <i>ygcU</i> - putative FAD-containing dehydrogenase	188
4.1.14. <i>ptsA</i> - putative PTS multiphosphoryl transfer protein PtsA	188
4.1.15. <i>ydeE</i> - dipeptide exporter.....	190
4.1.16. <i>paaE</i> - phenylacetyl-CoA 1,2-epoxidase reductase subunit.....	190
4.1.17. <i>ugpC</i> - sn-glycerol 3-phosphate ABC transporter ATP binding subunit	190
4.1.18. <i>prfH</i> - putative peptide chain release factor.....	191
4.1.19. <i>yaiB</i> - anti-adaptor protein for σ^S stabilization (<i>iraP</i>)	191
4.1.20. <i>nusB</i> - transcription antitermination protein NusB.....	192
4.1.21. <i>cbpM</i> - chaperone modulator CbpM.....	192
4.1.22. <i>mall</i> - DNA-binding transcriptional repressor MallI.....	193
4.1.23. <i>ydhD</i> (<i>grxD</i>) - glutaredoxin 4	193
4.1.24. <i>yeaC</i> - DUF1315 domain-containing protein YeaC.....	194
4.1.25. <i>yeeT</i> - CP4-44 prophage; DUF987 domain-containing protein YeeT	194
4.1.26. <i>yjlL</i> - CP4-57 prophage; anti-bacteriophage protein (AbpA).....	194
4.1.27. <i>hcaD</i> - putative 3-phenylpropionate/cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase subunit.....	194
4.1.28. <i>elaB</i> - tail-anchored inner membrane protein ElaB	195
4.1.29. <i>hypC</i> - hydrogenase 3 maturation protein HypC.....	195
4.1.30. <i>yjfU</i> - CP4-57 prophage; ArsC family protein YjfU	196
4.1.31. <i>yqeK</i> - protein YqeK.....	196
4.1.32. <i>yhiJ</i> - DUF4049 domain-containing protein YhiJ	196
4.1.33. <i>rep</i> - ATP-dependent DNA helicase Rep	196
4.1.34. <i>thiC</i> - phosphomethylpyrimidine synthase	198
4.1.35. <i>yifB</i> - putative magnesium chelatase YifB	198

4.1.36. <i>aceA</i> - isocitrate lyase	198
4.1.37. <i>sgbE</i> - L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase SgbE	199
4.1.38. <i>fre</i> - flavin reductase	200
4.1.39. <i>ytfG</i> - NAD(P)H:quinone oxidoreductase (<i>qorB</i>).....	200
4.1.40. <i>sgcQ</i> - putative nucleoside triphosphatase.....	201
4.1.41. <i>rpsJ</i> (<i>nusE</i>) - 30S ribosomal subunit protein S10.....	201
4.1.42. <i>yhcE</i> - putative uncharacterized protein YhcE	202
4.1.43. <i>yhdL</i> (<i>arfA</i>) - alternative ribosome-rescue factor A.....	202
4.1.44. <i>tnaC</i> - <i>tnaAB</i> operon leader peptide	203
4.1.45. <i>ytfA</i> - putative transcriptional regulator YtfA.....	203
4.1.46. <i>ulaB</i> - L-ascorbate specific PTS enzyme IIB component.....	203
4.1.47. <i>yjgX</i> - putative phosphoethanolamine transferase YjgX	204
4.1.48. <i>yjhX</i> - toxin of the TopAI-YjhQ toxin-antitoxin system, TopA inhibitor	204
4.1.49. <i>sgcA</i> - putative PTS enzyme IIA component SgcA.....	205
4.1.50. <i>chpS</i> - ChpS antitoxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system	205
4.1.51. <i>yceP</i> (<i>bssS</i>) - regulator of biofilm formation.....	206
4.1.52. <i>yjhD</i> - surface adhesin E-like protein	206
4.1.53. <i>yrbB</i> (<i>mIaB</i>) - intermembrane phospholipid transport system protein MlaB	206
4.1.54. <i>gatR</i> - DNA-binding transcriptional repressor GatR, N-terminal fragment.....	207
4.1.55. <i>yoeF</i> - putative uncharacterized protein YoeF	207
4.1.56. <i>arpB</i> - putative ankyrin repeat protein B, N-terminal fragment ..	207
4.1.57. <i>hybF</i> - hydrogenase maturation protein HybF.....	207
4.1.58. <i>ygeM</i> - hypothetical protein.....	208
4.1.59. <i>ympP</i> - conserved hypothetical protein	208
4.1.60. <i>yicR</i> - RadC-like JAB domain-containing protein YicR	208
4.1.61. <i>hpt</i> - hypoxanthine phosphoribosyltransferase	208
4.1.62. <i>friC</i> - fructoselysine 3-epimerase	208
4.1.63. <i>menD</i> - 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1- carboxylate synthase.....	209
4.1.64. <i>yadI</i> - putative PTS enzyme IIA component YadI	209
4.1.65. <i>ydiA</i> (<i>ppsR</i>) - phosphoenolpyruvate synthetase regulatory protein	209

4.1.66. <i>yfcT</i> - putative outer membrane usher protein YfcU	210
4.1.67. <i>arsB</i> - arsenite/antimonite: H ⁺ antiporter.....	210
4.1.68. <i>yeiQ</i> - putative dehydrogenase, NAD-dependent	211
4.1.69. <i>yddK</i> - leucine-rich repeat domain-containing protein YddK	211
4.2. Zenginleştirme ile Seleksiyon Sonucu Tespit Edilen Genler	211
4.2.1. <i>dtd</i> - D-aminoacyl-tRNA deacylase	211
4.2.2. <i>yedL</i> - putative acetyltransferase YedL	212
4.2.3. <i>yjbO</i> - phage shock protein G	212
4.2.4. <i>elfC</i> (<i>ycbS</i>) - putative fimbrial usher protein ElfC.....	212
4.2.5. <i>yfjK</i> - putative helicase YfjK	213
4.2.6. <i>yfiC</i> (<i>trmM</i>) - tRNA m ⁶ A ₃₇ methyltransferase.....	213
4.2.7. <i>sufD</i> - Fe-S cluster scaffold complex subunit SufD	213
4.2.8. <i>yecF</i> - DUF2594 domain-containing protein YecF.....	214
4.2.9. <i>idnR</i> - 5-ketogluconate DNA-binding transcriptional dual regulator	214
4.3. Proteomik Çalışmaları Sonucunda Tespit Edilen Proteinler ve Gen Bilgileri.....	214
4.3.1. <i>pykF</i> - Kpyk1- Piruvat kinaz I	215
4.3.2. <i>pgk</i> - P _{gk} - Fosfogliserat kinaz	216
4.3.3. <i>tsf</i> - EftS- Elongasyon faktör Ts	217
4.3.4. <i>ompA</i> - OmpA- Dış membran protein A	217
4.3.5. <i>cysK</i> - CysK- Sistein sentaz A.....	218
4.3.6. <i>kduD</i> - KduD 2-keto-3-deoxy-D-gluconate dehydrogenase.....	218
4.3.7. <i>atpA</i> - AtpA- ATP sentaz altünite alfa	219
4.3.8. <i>prpD</i> - PrpD- 2-metilsitrat dehidrat az	219
4.3.9. <i>malE</i> - MalE- Maltoz-bağlanma periplazmik protein.....	220
4.3.10. <i>gapA</i> - G3p1- Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz A	221
4.3.11. <i>ahpC</i> - AhpC- Alkil hidroperoksit reduktaz altünite C	221
4.3.12. <i>fbaA</i> - Alf- Fruktoz-bisfosfat aldolaz sınıf 2	222
4.3.13. <i>mdh</i> - Mdh- Malat dehidrogenaz	222
4.3.14. <i>kduI</i> - KduI- 5-keto 4-deoxyuronate isomerase	222
4.4. Real Time PCR Çalışmaları	223
4.5. NMR Çalışmaları Sonucu Tespit Edilen Metabolitler	226
4.6. Yorum.....	232
KAYNAKLAR	234

EK: Plazmidlerin Taşıdıkları Insert Sekansları	259
ÖZGEÇMİŞ.....	282



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uygun IPTG konsantrasyonunun bilgisinin tespit edilebilmesi için literatürden bilgiler.....	22
Çizelge 3.1. 90 mM borik asit içeren ortamda üreme gösteren klonların lokasyon ve gen isimleri.....	52
Çizelge 3.2. Bor tolerans nokta testi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	53
Çizelge 3.3. Tolerant klonların bor tolerans değerlerinin karşılaştırılması.....	56
Çizelge 3.4. GBT-33 sonucu seçilen tolerant klonların listesi.....	58
Çizelge 3.5. Bor tolerans nokta testi sonucu klonların üreme durumları.....	59
Çizelge 3.6. Bor tolerans nokta testi sonucu seçilen tolerant klonların listesi.....	62
Çizelge 3.7. Negatif kontrolün (Erlen) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları.....	85
Çizelge 3.8. ASKA genomik kütüphane havuzunun (Erlen) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları.....	85
Çizelge 3.9. Negatif kontrolün (tüp) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları.....	85
Çizelge 3.10. ASKA genomik kütüphane havuzunun (tüp) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları.....	85
Çizelge 3.11. Bor tolerans nokta testi sonuçları.....	86
Çizelge 3.12. Toleranslı klonların sekans analizleri sonuçları.....	87
Çizelge 3.13. Seleksiyon sonrası seçilen tolerant klonların bor tolerans nokta testi sonuçları.....	97
Çizelge 3.14. Direkt ekim ve zenginleştirme yöntemi sonucu seçilen tolerant klonların içerdiği plazmidlerin insert blast analizleri.....	99
Çizelge 3.15. Bradford sonucu elde edilen denklem kullanılarak hesaplanan protein miktarları.....	100
Çizelge 3.16. AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) şusundan elde edilen proteinlerin mascot protein tanımlama sonuçları.....	106
Çizelge 3.17. AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) şusundan elde edilen proteinlerin mascot protein tanımlama sonuçları.....	106
Çizelge 3.18. Keio koleksiyonu ile yapılan çalışmalardan seçilen genler için dizayn edilen primerler.....	108
Çizelge 3.19. Proteomik analizi sonucu seçilen proteinleri kodlayan genler için dizayn edilen primerler.....	109

Çizelge 3.20. ASKA ile yapılan çalışmalardan seçilen genler için dizayn edilen primerler	109
Çizelge 3.21. House-keeping geni ve <i>yfeS</i> geninin Real-Time PCR sonrası C_t (Cp) değerleri.....	113
Çizelge 3.22. <i>E. coli</i> (DH10b) kontrol suşunun metabolit ekstrakt miktarları	144
Çizelge 3.23. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunun metabolit ekstrakt miktarları	144
Çizelge 3.24. <i>E. coli</i> (DH10b) suşu için metabolit konsantrasyonları	147
Çizelge 3.25. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşu için metabolit konsantrasyonları	154
Çizelge 4.1. <i>E. coli</i> genomunda borik asit toleransı ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler proteinler ve metabolitlerin listesi.....	176
Çizelge 4.2. Çalışılan genlerin farklı bor konsantrasyonlarında göreceli mRNA seviyelerinin artış veya azalış katları	223
Çizelge 4.3. Çalışılan genlerin zamana bağlı bor ortamında göreceli mRNA seviyelerinin artış veya azalış katları	224
Çizelge 4.4. DH10b suşundaki metabolitlerin göreceli artış ve azalış oranları	227
Çizelge 4.5. AG1(pCA24N:: <i>acek</i>) suşundaki metabolitlerin göreceli artış ve azalış oranları	230
Çizelge 4.6. <i>aceK</i> ekspresyonunun borik asit stresi altında metabolit regülasyonu üzerine etkisi	231
Çizelge 4.7. Elde edilen genlerden bazılarının hücrede görev aldıkları yerler	233

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ASKA klon setinden 3 nolu petrinin görüntüsü ve bu petride yer alan klonların içerdiği genlerin isimlerini gösteren tablo	21
Şekil 2.2. Zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon deneyleri için stok alınması ve hücre pelleti elde edilmesi.....	24
Şekil 2.3. Zenginleştirme deneyleri için total stok mixinin hazırlanması.....	25
Şekil 2.4. Zenginleştirme deneyinin yapılmasının şematik gösterimi	27
Şekil 2.5. Seleksiyon deneylerinin yapılmasının şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.1. ASKA klon setine ait 57 adet petrinin fotoğrafları	45
Şekil 3.2. Mikroplakalarda alınan stoklara bir örnek.....	46
Şekil 3.3. Deep well platelerde alınan stoklara bir örnek	46
Şekil 3.4. 2 mL'lik ependorflarda alınan stoklara bir örnek	47
Şekil 3.5. IPTG içermeyen ve borik asit içermeyen (0)-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	48
Şekil 3.6. 50 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	48
Şekil 3.7. 100 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	48
Şekil 3.8. 250 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	48
Şekil 3.9. 500 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	49
Şekil 3.10. 48 numaralı plakadan rastgele seçilen klonlarının bor tolerans nokta testi sonuçları	50
Şekil 3.11. 9 numaralı plakada yer alan klonların OD ₆₀₀ değerleri.....	51
Şekil 3.12. 100 µM IPTG ve sırasıyla borik asit içermeyen, 80 ve 90 mM borik asit içeren besi ortamlarında 21 numaralı plakada yer alan klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	51
Şekil 3.13. MIC testi sonuçları.....	54

Şekil 3.14. 33 µM IPTG ve sırasıyla borik asit içermeyen-25-50-80-90 mM borik asit içeren besi ortamlarında 48 numaralı plakada yer alan klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları.....	57
Şekil 3.15. Bor tolerans nokta testi sonucu seçilen klonların tolerans seviyelerinin dağılımı.	62
Şekil 3.16. P4B8 (<i>yaiB</i>) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	64
Şekil 3.17. P4C4 (<i>lacI</i>) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçlarından elde edilen görüntüler	64
Şekil 3.18. P4H3 (<i>lacA</i>) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçlarından elde edilen görüntüler	65
Şekil 3.19. P10A11 (<i>cbpM</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	65
Şekil 3.20. P14F7 (<i>malI</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	66
Şekil 3.21. P21E7 (<i>yeaC</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	66
Şekil 3.22. P24H1 (<i>yjL</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	67
Şekil 3.23. P25H10 (<i>hcaD</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	67
Şekil 3.24. P32G3 (<i>yjU</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	68
Şekil 3.25. P32H9 (<i>yqeK</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	68
Şekil 3.26. P34D4 (<i>yhiJ</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	69
Şekil 3.27. P34D7 (<i>rep</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	69
Şekil 3.28. P34G8 (<i>aceK</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	70
Şekil 3.29. P36G9 (<i>yifB</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	70
Şekil 3.30. P36H4 (<i>rfaQ</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	71
Şekil 3.31. P37A8 (<i>yjcF</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	71
Şekil 3.32. P40F3 (<i>sgbE</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	72
Şekil 3.33. P42E5 (<i>ytfG</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	72

Şekil 3.34. P42E8 (<i>sgcQ</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	73
Şekil 3.35. P43C4 (<i>yhcE</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	73
Şekil 3.36. P45E11 (<i>ytfA</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	74
Şekil 3.37. P46B2 (<i>yjgX</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	74
Şekil 3.38. P46H2 (<i>sgcA</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	75
Şekil 3.39. P48B7 (<i>chpS</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	75
Şekil 3.40. P48F10 (<i>ymdE</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	76
Şekil 3.41. P48G2 (<i>bdm</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	76
Şekil 3.42. P48H4 (<i>yjhD</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	77
Şekil 3.43. P49C3 (<i>yoeF</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	77
Şekil 3.44. P49C11 (<i>arpB</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	78
Şekil 3.45. P50B12 (<i>ympP</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	78
Şekil 3.46. P52B3 (<i>yeeY</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	79
Şekil 3.47. P52H8 (<i>yddV</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	79
Şekil 3.48. P54H1 (<i>ygcU</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	80
Şekil 3.49. P54H12 (<i>ptsA</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	80
Şekil 3.50. P55H6 (<i>yadI</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	81
Şekil 3.51. P56A2 (<i>yfcT</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	81
Şekil 3.52. P56A6 (<i>arsB</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	82
Şekil 3.53. P56A7 (<i>yeiQ</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	82

Şekil 3.54. P56F4 (<i>ugpC</i>) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler.....	83
Şekil 3.55. Negatif kontrol (üstte) ve ASKA genomik kütüphane havuzunun farklı borik asit konsantrasyonlarında elde edilen büyüme eğrisi grafiği.....	84
Şekil 3.56. Bor tolerans nokta testi sonuçları.....	86
Şekil 3.57. ASKA kütüphanesinden elde edilen plazmid izolasyonunun agaroz jel görüntüsü.....	87
Şekil 3.58. Gradient ekimlerin sonuçları gösteren petri fotoğrafları	88
Şekil 3.59. Borik asit içeren besi ortamlarına yapılan direkt ekim sonuçlarını gösteren petri fotoğrafları	88
Şekil 3.60. 90 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	89
Şekil 3.61. 90 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	90
Şekil 3.62. 100 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	90
Şekil 3.63. 100 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	91
Şekil 3.64. 120 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	92
Şekil 3.65. 120 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları	92
Şekil 3.66. Çizgi ekim petri fotoğraflarından bazıları.....	93
Şekil 3.67. Bor tolerans nokta testi sonucu petri fotoğrafları	94
Şekil 3.68. Tolerant klonların içerdiği plazmidlerin agaroz jel görüntüsü	98
Şekil 3.69. Bradford sonucu elde edilen denklem ve grafik	100
Şekil 3.70. Sırasıyla 1-AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) ve 2-AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) suşlarından elde edilen protein özütlerinin SDS-PAGE sonuçları jel fotoğrafı.....	101
Şekil 3.71. AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunun sitoplazmik protein 2D profilleri.....	102
Şekil 3.72. AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) suşunun sitoplazmik protein 2D profilleri	103
Şekil 3.73. AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşuna ait regülasyon farklılıkları gösteren spotların seçimi	104
Şekil 3.74. AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) suşuna ait regülasyon farklılıkları gösteren spotların seçimi	105

Şekil 3.75. Zamana bağlı RNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü..	110
Şekil 3.76. Farklı borik asit konsantrasyonlarına bağlı RNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü	110
Şekil 3.77. 16S geni ve <i>yfeS</i> geninin bora bağlı ekspresyon seviyelerini gösteren grafikler	112
Şekil 3.78. Göreceli mRNA seviyelerinin hesaplanışını gösteren excel sayfasının şematik şekli.....	113
Şekil 3.79. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>yfeS</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki artışı gösteren grafik	114
Şekil 3.80. Borik asit içermeyen, 70 mM 10 dakika, 70 mM 30 dakika ve 70 mM 60 dakika bora maruz kalma sonucu <i>yfeS</i> geninin göreceli olarak mRNA seviyelerini gösteren grafik	114
Şekil 3.81. <i>ylaC</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.....	115
Şekil 3.82. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>torR</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	116
Şekil 3.83. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>garP</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	117
Şekil 3.84. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>dinJ</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	118
Şekil 3.85. Borik asit içermeyen, 50 mM borik ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>aceF</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	119
Şekil 3.86. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>trmU</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	120
Şekil 3.87. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>cheZ</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	121
Şekil 3.88. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>glxK</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	122
Şekil 3.89. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>nohA</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	123
Şekil 3.90. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>trpR</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.	124
Şekil 3.91. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>ygaV</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	125
Şekil 3.92. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>galS</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	126
Şekil 3.93. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>yocA</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	127
Şekil 3.94. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>rcnB</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	128

Şekil 3.95. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>yddE</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	129
Şekil 3.96. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>aroK</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	130
Şekil 3.97. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>talB</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.	131
Şekil 3.98. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>deoB</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	132
Şekil 3.99. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>icd</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	133
Şekil 3.100. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>kduD</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.....	134
Şekil 3.101. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>kduI</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	135
Şekil 3.102. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>sodA</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	136
Şekil 3.103. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>lamB</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	137
Şekil 3.104. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>gatY</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	138
Şekil 3.105. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>tdcE</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	139
Şekil 3.106. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>tufI</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	140
Şekil 3.107. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>aceE</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	141
Şekil 3.108. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda <i>ompR</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik	142
Şekil 3.109. <i>E. coli</i> DH10b kontrol şuşundan elde edilen metabolit ekstraktlarının ¹ H-NMR spektrumları	145
Şekil 3.110. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) şuşundan elde edilen metabolit ekstraktlarının ¹ H-NMR spektrumları	146
Şekil 3.111. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında 1,6Anhydro-β-D-glucose, 2-Hydroxyisobutyrate, 3-Methylxanthine metabolitlerinin seviyeleri	148
Şekil 3.112. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Acetamide ve Acetate metabolitlerinin seviyeleri	148
Şekil 3.113. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Adenosine ve Alanine metabolitlerinin seviyeleri	148
Şekil 3.114. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında ATP metabolitinin seviyeleri	149

Şekil 3.115. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Betaine metabolitinin seviyeleri	149
Şekil 3.116. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında cis-Aconitate, Creatine phosphate, Creatinine, Cytidine, Formate metabolitlerinin seviyeleri	149
Şekil 3.117. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Fumarate, Galactarate, Galactonate, Glucarate metabolitlerinin seviyeleri	150
Şekil 3.118. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glutamate ve Glycerol metabolitlerinin seviyeleri.....	150
Şekil 3.119. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glycine metabolitinin seviyeleri	150
Şekil 3.120. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Guanidoacetate, Hydroxyacetatone, Hypoxanthine ve Inosine metabolitlerinin seviyeleri	151
Şekil 3.121. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Isocitrate ve Lactate metabolitlerinin seviyeleri	151
Şekil 3.122. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Maleate ve N-Acetylornithine metabolitlerinin seviyeleri.....	151
Şekil 3.123. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Niacinamide, Nicotinate, Nicotinurate ve O-Phosphoethanolamine metabolitlerinin seviyeleri	152
Şekil 3.124. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Oxypurinol metabolitinin seviyeleri	152
Şekil 3.125. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Pantothenate, Putrescine, Pyrodoxine, Pyruvate ve Saccharopine metabolitlerinin seviyeleri	152
Şekil 3.126. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Succinate metabolitinin seviyeleri	153
Şekil 3.127. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Thymidine ve Thymine metabolitlerinin seviyeleri	153
Şekil 3.128. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uracil ve Uridine metabolitlerinin seviyeleri.....	153
Şekil 3.129. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Valine, Xanthine ve Xanthosine metabolitlerinin seviyeleri.....	153
Şekil 3.130. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında 2-Hydroxyisobutyrate ve 3-Methylxanthine metabolitlerinin seviyeleri.....	155
Şekil 3.131. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Acetamide ve Acetate metabolitlerinin seviyeleri	155

Şekil 3.132. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Adenine ve Adenosine metabolitlerinin seviyeleri	155
Şekil 3.133. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Alanine, AMP ve ATP metabolitlerinin seviyeleri	156
Şekil 3.134. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Betaine metabolitinin seviyeleri	156
Şekil 3.135. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında cis-Aconitate ve dTTP metabolitlerinin seviyeleri	156
Şekil 3.136. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Erythritol metabolitinin seviyeleri	156
Şekil 3.137. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Ethylene glycol ve Formate metabolitlerinin seviyeleri	157
Şekil 3.138. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Galactarate ve Gluconate metabolitlerinin seviyeleri	157
Şekil 3.139. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glutamate ve Glycerol metabolitlerinin seviyeleri.	157
Şekil 3.140. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glycine, Guanidoacetate, Isocitrate ve Lactulose metabolitlerinin seviyeleri.....	158
Şekil 3.141. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Guanosine, Inosine ve Isoleucine metabolitlerinin seviyeleri	158
Şekil 3.142. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Maleate, Methionine, N-Acetylcysteine ve N-Acetylglutamine metabolitlerinin seviyeleri	158
Şekil 3.143. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında N-Acetylmethionine, Niacinamide ve Nicotinate metabolitlerinin seviyeleri.....	159
Şekil 3.144. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Oxypurinol metabolitinin seviyeleri	159
Şekil 3.145. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Pantothenate, Pyridoxine, Pyruvate ve Riboflavin metabolitlerinin seviyeleri.....	159
Şekil 3.146. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Putrescine, Pyroglutamate ve Saccharopine metabolitlerinin seviyeleri.....	160

Şekil 3.147. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Threonine, Thymidine ve Thymine metabolitlerinin seviyeleri	160
Şekil 3.148. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uracil metabolitinin seviyeleri.....	160
Şekil 3.149. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uridine, Valine, Xanthine ve Xanthosine metabolitlerinin seviyeleri.....	161
Şekil 3.150. MetaboAnalyst programı ile yapılan normalizasyon sonuçları	162
Şekil 3.151. PCA ile her bir borik asit konsantrasyonunda yetiştirilen hücrelerden elde edilen metabolitlerin miktarlarının analizi	163
Şekil 3.152. PLS-DA analizi sonucu belirlenen DH10b suşundaki metabolitlerin skor grafiği.	163
Şekil 3.153. PLS-DA analizi sonucu belirlenen DH10b suşundaki değişim gösteren metabolitlerin artan bor konsantrasyonuna bağlı konsantrasyon değişiklikleri.....	164
Şekil 3.154. DH10b suşuna ait analizin cross validation değerlerini gösteren grafik	165
Şekil 3.155. Anova analizi sonucu DH10b suşuna ait grafik ve metabolitler.....	165
Şekil 3.156. Anova analizi sonucu DH10b'ye ait her bir metabolit için elde edilen grafikler	166
Şekil 3.157. <i>E. coli</i> AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşu için MetaboAnalyst programı ile yapılan normalizasyon sonuçları.....	169
Şekil 3.158. PCA ile her bir borik asit konsantrasyonunda AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşuna ait metabolitlerin analizi.....	170
Şekil 3.159. PLS-DA analizi sonucu belirlenen AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşundaki metabolitlerin skor grafiği.....	170
Şekil 3.160. PLS-DA analizi sonucu belirlenen AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşundaki metabolitlerin artan bor konsantrasyonuna bağlı konsantrasyon değişiklikleri.....	171
Şekil 3.161. AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşuna ait analizin cross validation değerlerini gösteren grafik.....	172
Şekil 3.162. Anova analizi sonucu elde edilen AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşu için grafik ve metabolitler.....	172
Şekil 3.163. Her bir metabolit için Anova analizi sonucu AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) suşu için elde edilen grafikler.....	173
Şekil 4.1. CobT aktivitesi sonucu üretilen alfa-ribazol-5'-P ve yer aldığı kobalamin metabolik yolağı.....	181
Şekil 4.2. S-Adenosil-Metiyonin (SAM, AdoMet) biyomolekülünün yapısı	182
Şekil 4.3. GatD enziminin aktivitesi sonucu L-galaktitol-1-fosfatın NAD ⁺ kullanılarak geri dönüşümlü olarak D-tagatoz-6-fosfat oluşumu	183

Şekil 4.4. Polisistronik <i>ace</i> operonu.....	184
Şekil 4.5. AceK ve Icd aktivitelerinin yer aldığı metabolik yolak.....	184
Şekil 4.6. Fosfotransferaz sistemi	189
Şekil 4.7. Arsenat iyonun detoksifikasyon reaksiyonu	196
Şekil 4.8. İzositratın, suksinat ve glioksilata geri dönüşümlü olarak katalizlenen reaksiyonu	199
Şekil 4.9. Ribozun küçük alt ünitesindeki <i>rpsJ</i> (<i>nusE</i>) geni kodladığı 30S ribozomal alt ünite protein S10'un yeri.....	202
Şekil 4.10. SgcA ve GatD aktivitelerinin galaktoz metabolizmasındaki yeri.....	205
Şekil 4.11. Borik asit ve arsenitin moleküler yapısı.	211
Şekil 4.12. Piruvat kinaz I enziminin görev aldığı metabolik yolak.....	215
Şekil 4.13. KduD ve KduI aktivitelerinin görev aldığı metabolik yolak.....	219
Şekil 4.14. Metil sitrat ve döngüsünde PrpD aktivitesinin rolü	220
Şekil 4.15. Hipoksantin molekülünün purin metabolizmasındaki yeri.....	228

KISALTMALAR DİZİNİ

2-DE	İki Boyutlu Jel Elektroforezi
2D PAGE	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Aa, aa	Aminoasit
APS	Amonyumpersülfat
B	Bor
BSA	Bovin Serum Albumin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate
Cm	Kloramfenikol
Cm ^R	Kloramfenikol dirençli
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
IEF	Izoelektrik Fokuslama
IPG strip	Immobilize edilmiş pH gradient strip
IPTG	Izopropil beta-D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria Bertani
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
M	Molar
mA	MiliAmper
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
Mw	Molekül ağırlığı
nm	Nanometre
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
nt	nükleotid

OD	Optikal Densite (Yoğunluk)
PBS	Fosfat Buffer Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pI	İzoelektrik nokta
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBP	TATA-bağlanma Protein
Tris	Tris-hidroksimetil-aminometan
Tris HCl	Tris-hidroksimetil-aminometan Hidroklorik asit
UV	Ultraviyole



1. GİRİŞ

Birçok endüstri alanında kullanılan bor, aynı zamanda biyolojik açıdan da önemli bir yarı metaldir. Bitkiler ve mikroorganizmalar dahil birçok canlı grubu için az miktarda esansiyel veya yararlı iken, göreceli olarak yüksek dozlarda zararlı etkilere sahiptir. Borun insan hücreleri için de önemli olabileceği düşünülmektedir. Ancak tam olarak esansiyel olup olmadığı, bir takım deneysel limitasyonlar yüzünden kanıtlanamamıştır. Geniş bir canlı yelpazesinde, biyolojik fenotip açısından role sahip olan bu elementin, detaylı biyokimyasal rolü tam olarak bilinmemektedir. Yani bor, çok çeşitli molekülleri oluşturabilen ve bir dizi önemli biyolojik fonksiyon ve etkileri olan, potansiyeli yüksek bir elementtir. Ülkemiz için önemli bir ekonomik değere sahip bu element, her açıdan detaylıca araştırılması gereken bir konudur.

Canlı mekanizmasının detaylı anlaşılabilmesi için, spesifik fenotip veya element ile ilgili biyomoleküller bulmak ve bunların nasıl bir hayatsal orkestra içinde, ne gibi spesifik işlevler üstlendiğini, bütüncül olarak irdelemek gereklidir. Bor-canlı ilişkisini bu açıdan araştırdığımızda, öncelikle uygun model organizma ile söz konusu biyomolekülleri (genler, proteinler, metabolitler vs) avlamak ve bilmek amaçlanmıştır.

Gen fonksiyonu bulmada, farklı bir yaklaşım olarak, bir genin bir vektöre klonlarak bakteriye gönderilmesi ve yabancı tip ile arasındaki fenotip farklılıklarının araştırılması çalışmaları göze çarpmaktadır. Geçmişte yapılan mikrobiyal genetik çalışmalarında, bir genin birçok fenotip için test edilmesi yaklaşımı esas alınmıştır. Ancak son yıllarda, genomik bilimlerin gelişmesiyle, bakteride bir fenotip için binlerce genin test edilmesi söz konusudur.

1.1. Amaç ve Kapsam

Bor, antimikrobiyal etkilere sahip bir elementtir ve farklı formları bulunmaktadır. Bunlardan en çok bilineni ve yaygın olanı borik asittir. Borik asit, bakterisidal ve bakteriyostatik etkilere sahiptir, ancak hücredeki spesifik hedefleri bilinmemektedir. Bor, spesifik biyomoleküller ile etkileşimlere girerek, bakteri hücrelerini etkilemekte, böylece kritik biyokimyasal ve hücreyel olayları sekteye uğratmakta ve değiştirmektedir. Antimikrobiyal bir molekülün doğrudan veya dolaylı olarak vurduğu veya etkilediği hedef moleküllerin tespiti, hem hücreyel cevabın moleküler detaylarını anlamak açısından, hem de yeni hedef molekül adaylarının bulunması bakımından son derece önemlidir.

Bu tez çalışması, model bir bakteride 4123 genin, bor toleransı fenotipi ile bağlantısını araştırmak için dizayn edilmiştir. Bunun için *Escherichia coli*'ye ait genlerin tekli klonlarını içeren, ASKA klon seti kullanılmıştır. Japon bilim adamları tarafından hazırlanan ASKA (A Complete Set of *Escherichia coli* K-12 ORF Archive) klon seti, *E. coli*(W3110) suşunun genomunda yer alan her bir genin tek tek bir vektöre klonlanması ile elde edilen 4123 adet klondan oluşmaktadır. Bu koleksiyon, çeşitli direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında, önemli ve güçlü bir genomik kaynak olarak kullanılmıştır. Bu tezin amacı, bu suşların, bora maruz bırakılmasının ardından, direnç mekanizmasında görev alan genlerin avlanmasıdır

Çalışmamızda kullanılan ASKA klon seti, 57 adet mikropilaka kuyucuklarında stoklanmış halde, saklanmaktadır. Bu çalışmada, bakteri suşuna yeni fonksiyon katan ("gain of function") genin bulunması, esas olarak alınmıştır. Tüm ASKA klon seti farklı borik asit konsantrasyonları içeren besi ortamlarında taranarak bor ile ilişkisi bulunan genler tespit edilmiştir. Tespit edilen genler bir dizi moleküler ve mikrobiyolojik yöntemler ile onaylanmıştır. Ayrıca, zenginleştirme yöntemi ile de seleksiyon ve onaylama çalışmaları yapılmıştır. Kısaca tez kapsamındaki birinci aşama, fonksiyonel genomiktir ve bu aşama içindeki teşebbüsler, hücreyel cevapta görev alabilecek genlerin veya hedeflerin avlanmasına imkan sağlamıştır.

Seleksiyon deneyleri sonucu, tolerant klonların bor tolerans seviyelerinin belirlenmesi ve onaylanması amacıyla, bor tolerans nokta testi yapılmıştır. Aday

klonların tolerans seviyeleri, yabancı tip ile karşılaştırılarak bora karşı gösterdikleri maksimum direnç seviyeleri belirlenmiştir.

Seçilen iki adet tolerant klonun detaylı analizleri için proteomik teknolojisine başvurulmuştur. Borik asit varlığı ve yokluğunda yapılan 2D Jel analizleri ve protein identifikasyonları sonucunda, ifadesi değişen bazı proteinler belirlenmiştir.

Tez kapsamında ayrıca yabancı tip bakteri suşuna borik asit verildiğinde, hücresel cevap sürecinde bor ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin mRNA seviyelerindeki değişim Real-Time PCR analizleri ile değerlendirilmiştir.

Son olarak, göreceli olarak yüksek bor içeren ortamda yaşayabilen bir klonun metabolit profilindeki değişimlerin belirlenmesi için NMR analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada, bir adet tolerant klonun yanında, yabancı tip *E. coli* suşu da farklı borik asit konsantrasyonları içeren ortamlarda yetiştirilerek, metabolit ekstraksiyonları yapılmış ve analiz edilmiştir. Böylelikle farklı borik asit konsantrasyonu içeren ortamlarda yetiştirilen, tolerant klon ile yabancı tip bakterinin bora bağlı metabolit profilleri belirlenmiştir.

1.2. Kaynak Özetleri

Bakteriler, dünyamızda ve insan hayatında, her an iç içe yaşadığımız, çevrelendiğimiz, birçok açıdan faydalı ve zararlı sonuçlara neden olan, etkileşimlere girdiğimiz, muazzam ve müstesna canlı gruplarıdır. Yerkürenin yaşam serüveninde, tahminen 3,8 milyar yıl önce ortaya çıkmış bu ilk yaşam formları, biz insanlar dahil, birçok biyolojik sistemlerin yok olmasından sonra bile, varlıklarını devam ettireceklerdir (Zyga, 2013). Tek hücreli, birkaç hücreli veya bazen topluluklar halinde bulunabilen, basit olarak da algılanabilen bu hücresel sistemler; zengin, esnek ve sofistike olmak üzere, birçok bildiğimiz ve henüz bilemediğimiz moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları, gelecek nesillere miras bırakarak var olmaktadır. Gerçekten de yeni anlayışa göre, insanoğlu esas itibari ile “bir bakteri dünyasının içerisinde” yaşamakta (Zyga, 2013) ve onların hem yararlı, hem de zaman zaman zararlı etkilerine, maruz ve matuf bir halde bulunmaktadır.

Bakterilerin, içimizde ve dışımızda, deri ve bağırsak mikrobiomların sağlık üzerindeki etkisi (Grice ve Segre, 2011, Bull ve Plummer, 2014), gıda teknolojisinde yoğurt, sirke, peynir ve benzeri ürünlerin üretilmesi, biyoteknoloji endüstrisinde kullanımlarından tutun da (Law ve Tamime, 2011, Hutkins, 2006), diğer sayısız birçok alanlara kadar, kuşkusuz önemli ve yararlı rolleri ve etkileri vardır.

Birçok anti-biyolojik etkiye sahip molekül vardır. Bunlardan bir tanesi, bor içeren bir molekül olan borik asittir. Bilindiği gibi bor, ülkemiz için stratejik öneme sahip olup, birçok açıdan kullanılan ekonomik değeri yüksek olan bir elementtir.

Bor bileşikleri temel olarak farklı alanlarda yer kabuğunun bir parçasıdır (Amoroso vd., 2013). Ülkemizde ve dünyanın çeşitli yerlerinde, bor içeren topraklar ve sular bulunur. Türkiye, Kaliforniya ve Arjantin'de bor işlenmekte olup endüstriyel alanlarda yaygın kullanımı söz konusudur (Helvacı vd., 2004; Flores vd., 2004). Bunun yanında canlılar için de önemi büyüktür. Toprakta bulunan bor, bitkilerin gelişiminde esansiyel olarak rol almaktadır (Warington, 1923). Suda ise, bazı balıkların embriyonik gelişimini teşvik etmektedir (Eckhert, 1998). İki yüz yılı aşkın süredir borik asit, dış medikal (özellikle antiseptik) ve iç medikal (özellikle yatıştırıcı (sedatif), kramp çözücü ve idrar sökücü (diüretik) gibi) kullanımlara sahiptir (Kliegel, 1972).

1.2.1. Bor kimyası

Bor, metalle ametal arası özelliğe sahip ve yarı iletken bir elementtir. Borun kimyası emsalsizdir ve bütün elementler arasında karbondan sonra en çok merak edilen ve en kompleks olan bir elementtir (Greenwood ve Earnshaw, 1984). Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81 g/mol olan, metalloid bir elementtir (Sezer vd., 2018). Periyodik cetvelin 3A grubunun ilk ve en hafif üyesidir (www.boren.gov.tr). Fizyolojik pH derecesine sahip çözeltilerde ve diğer biyomoleküllerle etkileşim içinde olmadığı zamanlarda bor, yüksüz borik asit ($B(OH)_3$) formunda bulunur. Fakat az da olsa borat anyonu ($B(OH)_4^-$) formunda bulunabilir. Borik asit, pK_a değeri 9.24 olan, zayıf bir Lewis asitidir ($B(OH)_3 + H_2O = B(OH)_4^- + H^+$) (Woods, 1994).

Borik asit ve borat her ikisi de membranlarda çözülebilir ve borun hareket etmesi sonucu çeşitli şekerler ile kompleks oluşturabilir, fakat bor özellikle, hidroksil grubu

içeren bileşenlerle bağ yapar. Örneğin, fosfoinositler, glikoproteinler ve glikolipitler (Brown vd., 2002) bunlardan bazılarıdır.

1.2.2. Kullanım alanları

Borat kullanımı son 130 yılda önemli derecede artmıştır. 200'ün üzerinde bor içeren mineral vardır. Ancak, sadece bazılarının endüstriyel alanda kullanımı söz konusudur. Türkiye'de Kırka (Helvaci vd., 2004), Kaliforniya'da Ölüm Vadisi, Arjantin'de Salta bölgelerinde (Flores vd., 2004) bor işlenmektedir. Ayrıca son zamanlarda ülkemizde bor çıkarılan daha fazla açık maden ve işleyen tesis kurulmuştur. Bandırma borik asit tesisleri ve Kütahya-Emet'teki tesisler oldukça büyük miktarlarda bor minerallerini işlemekte ve üreterek ihraç etmektedir. Kütahya Hisarcık, Kütahya Emet Espey, Bursa Kestelek, Balıkesir Bigadiç ve Eskişehir Kırka bölgelerindeki bor rezervleri, dünyada miktar ve kalite açısından en öndedir (Çöl B, bor madeni ziyaretleri). Elde edilen bor, birçok sektörde kullanılmaktadır.

Boratlar, bor elementinin ana doğal kaynağıdır. Bunlar borik asit tuzları, B_2O_3 içeren esterlerdir. Boratlar, zincirlerde, katmanlarda ve birçok izole gruplarda, polimerize gruplar oluştururlar. Çünkü trivalent bor iyonu üç oksijen atomuna stabil bir şekilde bağlanabilir (Amoroso vd., 2013).

200 yılı aşkın süredir borik asit, dış medikal (özellikle antiseptik) ve iç medikal (özellikle yatıştırıcı (sedatif), kramp çözücü ve idrar sökücü (diüretik) gibi) kullanımlara sahiptir. Fakat 80'lerden bu yana borun süregelen tedavilerde kullanımı ile ilgili eleştiriler, zararlar ve toksisitelerle ilgili tartışmalar artış göstermiştir. Dolayısıyla bor kullanımı, yavaş yavaş terapatik olarak daha aktif reçetelerle yer değiştirmiştir. Borun esas aktif komponent olarak kullanılması yerine, yardımcı bir reaktant olarak kullanılması gerektiği, çalışmalar sonucu önerilmiştir (Kliegel, 1972).

Boraks ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) en basit bor tuzlarından biridir. Bu molekül aynı zamanda çok geniş bir homeopatik, antiseptik ve bakterisit etkilere sahiptir. Ayrıca terapatik değeri fark edildiğinden beri kozmetik katkı maddesi ve banyo tuzu üretiminde kullanılmıştır. Alkaloidlerden ve pek çok azot kaynaklı olan borik asit tuzları, aynı zamanda medikal kullanımlara sahiptir. Örneğin, boratlardan, kolin borat, karaciğer hastalıkları ve tüberküloz için, procaine borat, lokal anestezi için, neomisin borat,

gözle ilgili aplikasyonlarda ve dodesilguanidin borat, fungusit olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda borik asit ve laktik asit veya trietanolamin bileşimleri doğum kontrolünde kullanılmıştır (Amoroso vd., 2013). Organik borat bileşiklerinin germisit ve fungusit etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu ailedeki bir başka bileşik, yatıştırıcı etkiye sahip olan fenil borik asittir (Kliegel, 1972). Bazı bor bileşiklerinin antibakteriyel özellikleri de gösterilmiştir (Benkovic vd., 2005).

Borun mineral ve kemik metabolizması üzerine etkileri en çok bilinen özelliklerinden biridir. Bor ile yapısal ve metabolik olarak, diğer önemli bileşikler ve elementler olan kalsiyum, vitamin D ya da magnezyum arasında bir ilgi vardır. Buna bağlı olarak kemik metabolizması üzerinde borun etkisi osteoporoz ve tedavisi açısından oldukça önemlidir (Amoroso vd., 2013).

Bor iki tane doğal, stabil izotopa sahiptir. Bunlar ¹⁰B ve ¹¹B olup, termal nötronları absorbe edici özellikleri oldukça yüksektir (Barth ve Joensuu, 2007). Bu, özellikle bazı tümörlerin tedavisinde oldukça önemlidir. BNCT (boron neutron capture therapy) beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Barth vd., 1999).

1.2.4. Bor ve çevre (toprak, hava, su ve gıda)

Bor bileşikleri temel olarak farklı lokasyonlarda toprağın bir parçasıdır. Yağmur, rüzgar ve diğer doğal olaylar, bu elementin hava ve suya yayılmasını kolaylaştırır. İnsan aktiviteleri (endüstri gibi) de bu kontaminasyona katkıda bulunur (anthropogenik kontaminasyon). Bor konsantrasyonu yer kabuğunda düşüktür, 10 mg/L'nin biraz üzerindedir. Toprak ve kayalardaki konsantrasyon ise 450 mg/L civarındadır ki bunlar temel olarak sodyum, kalsiyum, magnezyum tuzlarıdır. Bazı okyanus ve kıtasal suldaki bor konsantrasyonları sırasıyla 4.6 mg/L ve 0.1 mg/L'dir (Amoroso vd., 2013).

Volkanik aktiviteler borik asitin denizden uçuculuğu, maden faaliyetleri, cam ve seramik sanayi, tarımsal kimya uygulamaları, borik asit ve bor partiküllerinin (< 1-45 µm büyüklüğünde) atmosfere emilimine yol açabilmektedir (WHO, 2009).

Dünyada bor, esas olarak okyanuslarda bulunur. Ortalama konsantrasyonu 4.5 mg/L'dir (Weast vd., 1986). Yeraltı suyu bor konsantrasyon oranı ise, dünyanın her yerinde yaygın olarak <0.3 ila > 100 mg/L değerleri arasındadır (WHO, 2009).

Yüzey sularında bor konsantrasyonu yaklaşık olarak 0.5 mg/L'den azdır (Coughlin, 1998; Neal vd., 1998; Wyness vd., 2003). Bor, yersularında ilk olarak bor bileşiklerini içeren toprak ve kayalardan doğal süzülümün bir sonucu olarak var olmaktadır. Doğal sularda, bor esas olarak, toprak ve sedimentler tarafından adsorbe edilmiş borat iyonları ve nehir yataklarında ayrışmamış borik asit olarak bulunur. Bu adsorbsiyon-desorpsiyon işlemlerinin, suda borun kaderini etkileyen tek önemli mekanizma olduğu düşünülmüştür. Su pH'sı borun toprak ve sedimente adsorbsiyonunu direkt olarak etkiler, asıl adsorpsiyon pH aralığı 7.5 ile 9.0 arasında iken gerçekleşir (Keren vd., 1981; Keren ve Mezuman, 1981).

Bor bir grup besinde bulunur ve günlük bor alınımı, bor bakımından zengin besinlerin tüketim miktarına göre değişiklik gösterir. Ekmek ve hububat bor bakımından fakirdir. Sebzeler, meyveler ve fındık borca en zengin olan yiyeceklerdir (Vitamin ve Mineraller 2002, Birleşik Krallık Uzman Grup Raporu). Besinlerden günlük bor alınımına dair tahminler, yaşa ve cinsiyete göre yapılmış ve ortalama günlük alınımın, 0.75-2.33 mg/gün arasında değiştiği bildirilmiştir (WHO, 2009).

1.2.5. Bor ve canlılar

Borun bitkiler için esansiyel rolü 90 yıl önce tanımlanmıştır (Warington, 1923). Gün geçtikçe borun canlılardaki esansiyelliği üzerinde çalışmalar artmıştır. Bazı ökaryotlar için (Nielsen, 2000) ve heterosistoz syanobakteri ve yüksek düzeyde bor toleransı olan *Bacillus boroniphilus* gibi prokaryotlar (Bonilla vd., 1990; Ahmed vd., 2007c) için, esansiyel olduğunu iddia eden bilimsel çalışmalar vardır. Diğer önemli bulgular ise, siyanobakteri olan *Nostoc spongiaeforme* var. *tenue* ve *Streptomyces griseus* mikroorganizmalarının bor içeren antibiyotikler üretmesidir (Dembitsky vd., 2002). Azotobacter türlerinde bor, azotun fiksasyon mekanizmasını teşvik eder (Anderson ve Jordon, 1961) ve *Vibrio harveyi* gibi marin bakterilerde “quorum sensing” işleminde rol oynar (Chen vd., 2002). *Arthrobacter nicotinarans* türlerinde fenil borik asit katabolizması tanımlanmıştır (Negrete-Raymond vd., 2003). Bu, borun çoğunlukla ortoborik asit (B(OH)₃) olarak elimine edilmesiyle gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, bor elementinin göreceli olarak birçok çeşit canlı grubunda farklı işlev ve mekanizmalarda doğrudan ve dolaylı yer alabileceğine dair bazı literatür bilgileri mevcuttur.

Japonya'daki bir grup araştırmacı, Türkiye'den almış olduğu 20 adet topraktan 4 adeti üzerinde yapmış oldukları izolasyon çalışmaları sonucunda bazı bakteriler izole etmişlerdir. Örneğin bir tanesi *Bacillus boroniphilus sp. nov.* (Ahmed vd., 2007c) türü olarak tanımlanmıştır. Bu bakterinin büyümek için bora ihtiyaç duyduğu rapor edilmiştir ve 450 mM'dan fazla borik asite tolerans sağlayabildiği görülmüştür. *Gracilibacillus boraciitolerans sp.nov.* (Ahmed vd., 2007b) 450 mM'a kadar borik asite tolerans sağlayabilmektedir. *Chimaericella boritolerans sp. nov.* (Ahmed vd., 2007a) 300 mM'a kadar borik asite tolerans sağlayabilmekte, *Lysinibacillus boronitolerans* (Ahmed vd., 2007d) *L. parviboronicapes* (Miwa vd., 2009) sırasıyla 150 mM ve 50 mM'a kadar borik asite tolerans sağlayabilmektedir. Bir gram negatif bakteri olan *Variovorax boronicumulans sp. nov.*'in içerisinde boru biriktirebildiği belirtilmiştir (Miwa vd., 2007). Bu araştırmacılar ayrıca, borlu topraklar ve aktif sulu çamurdan 3 adet Actinobacteria türü izole etmiştir. Bunlardan ikisi Rhodococcus genusuna ait ve diğer de Microbacterium genusuna aittir. Actinobacter bütün topraklarda en bol bulunan (mikroflorada %90 ile temsil edilir) bakteri grubudur. Bazı bileşiklerin metabolizmalarının gerçekleşmesinde etkili olan çok fazla miktarda enzimlere sahiptir. Bunlar biyodegradasyon aktivitesi için oldukça önemli olmalarına rağmen, bu genusun Streptomyces veya bor bileşikleri üzerindeki etkisine yönelik kesin bir bilgi bulunmamaktadır (Amoroso vd., 2013).

Tarımda bor eksikliği, ürün gelişimini engelleyen ve genellikle kök uzamasını durduran, hücre büyümesini inhibe ederek yaprak genişlemesini azaltan, büyük bir problemdir (Marschner, 1995; Dell ve Huang, 1997). Son 10 yılda yapılan deneysel çalışmalar ile borun bitki hücre duvarının yapısı ve fonksiyonu için esansiyel olduğu gösterilmiştir (O'Neill vd., 2004). Burada bor, pektik polisakkaritlerinin krosslinkini, iki rhamnogalakturnan II (RG-II) arasında borat diol bağları yapmak sureti ile gerçekleştirmektedir (Ishii ve Matsunaga, 1996; Kobayashi vd., 1996; O'Neill vd., 1996). *Arabidopsis thaliana* bitkisi ve haploid *Nicotiana plumbaginifolia* organizmalarında gen mutantları kullanılarak yapılan çalışmalar, borat-RG-II molekülünün normal bitki gelişimi için esansiyel olduğu bilgisini desteklemektedir (O'Neill vd., 2001; Iwai vd., 2002). Ayrıca bor elementinin, membranlarda yapısal bir rol üstlenmesi gibi, diğer fonksiyonlarının da bulunabileceği öngörülmektedir (Brown vd., 2002; Goldbach ve Wimmer, 2007).

Borun, mikroorganizmalar ve bitkilerde esansiyel olmasının yanı sıra, hayvan hücrelerinde çoğalma ve gelişim için önemli olduğu düşünülmektedir, fakat bunun esas mekanizması bilinmemektedir. Borik asit, alabalıkta embriyonik gelişimi teşvik etmektedir (Eckhert, 1998) ve zebra balığında pre-blastula ayrılma safhası boyunca esansiyeldir (Rowe ve Eckhert, 1999). Kurbağalarda (*Xenopus*) bor eksikliği, normal oosit olgunlaşması, embriyonik gelişim ve morfogenezise zarar vermektedir (Fort, 2002). Ayrıca borik asidin anti-karsinojenik etkisi olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Epidemiyolojik bir taramada, borun diyet ile alınımı ile prostat kanseri riski arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Zhang vd., 2001). Bundan sonra yapılan bir çalışmada, borik asitin belli bir dozda prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Barranco ve Eckhert, 2004; Barranco vd., 2009). Borik asitin, farelerde LNCaP prostat tümörlerinin gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Raven, 1980; Gallardo-Williams vd., 2004).

1.2.6. Hücre içine taşınım

Moleküler ağırlığı ve borik asit tarafından yapılan hidrojen bağlarının sayısı göz önüne alındığında, borik asitin lipid ikili tabakadan geçirgenlik katsayısı (coefficient) teorik olarak hesaplanmış ve 8×10^{-6} cm/s olarak ifade edilmiştir (Raven, 1980). Göreceli olarak yüksek olan bu teorik değer, bazı araştırmacılar tarafından, borik asitin membrandan taşınma mekanizmasının sadece pasif difüzyon ile olduğu yorumuna neden olan bir dayanak olmuştur. Ancak, kabak bitkisinin plazma membran veziküllerinin ve karofit alg bitkisinin (*Chara corallina*) dev internodal hücrelerinin plazma membranlarının kullanılması ile elde edilen, deneysel olarak bulunan geçiş katsayıları, sözü edilen teorik değerden 10 kat daha az bir değerdir (Dordas ve Brown, 2000; Stangoulis vd., 2001). Bunun yanında, *A. thailana* bitkisini kullanan moleküler genetik deneyleri sonucunda iki tip bor taşıyıcısı (NIP5;1 ve BOR1) tanımlanmıştır (Takano vd., 2008). BOR1 homologları memeli hücrelerinde homeostazide gereklidir ve bitki ve mayalarda toksik konsantrasyonların tolere edilmesini sağlamaktadır. pH (5-6)'da ve biyomoleküler etkileşimlerin yokluğunda, bor çoğunlukla yüksüz ($B(OH)_3$) olarak bulunmaktadır (Takano vd., 2008). Ayrıca, BOR1, apoplazmada pH daha yüksek olduğunda (pH 7.5) bitki sitozolünde borata ($B(OH)_4^-$) dönüşen molekülleri dışarı atabilmektedir (Frommer ve von Wiren, 2002).

Majör İntresik Protein (MIP) familyasına ait bir proteini kodlayan NIP5;1 geni, *A. thailana* bitkisinin bor eksikliğine maruz bırakılan kök hücrelerinde, fazla ifadesinin tespit edilmesi ile ortaya çıkarılmıştır (Takano vd., 2006). MIP'ler, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda, su ve küçük yüksüz moleküller için kanal olarak işlev gören, integral membran proteinleridir (Maurel, 2007). Bu intrinsik proteinler (NIP), bitki MIP'lerinin alt grubuna dahildir ve su molekülünün yanı sıra, gliserol, üre, silisik asit (Si(OH)_4) ve laktik asit gibi küçük yüksüz moleküllerin taşınmasında görevlidir (Wallace vd., 2006). NIP5;1 geni *Xenopus laevis* oositlerinde, heterologus olarak ekspres edildiği zaman, suyun hücre içine alınmasında kayda değer bir artış, borun alınmasında ise 5-9 kat artış gözlenmiştir (Takano vd., 2006). Ayrıca bor eksikliği olan ortamlarda, kök elongasyon zonunda ve kök saçaklarında, NIP5;1 geninin ifadesinin önemli derecede arttığı görülmüş ve NIP5;1 proteinin plazma membranına lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer önemli bulgu ise, NIP5;1 geninin mutasyonu ile elde edilen bitkilerde, daha düşük biyokütle üretiminin olduğu, kök ve dal gelişiminde bor eksikliğine karşı duyarlılığın arttığı görülmüştür. NIP5;1 geni olmayan bitkilerin, köklerine boru almadığı görülmüştür (Takano vd., 2008).

Ayrıca, protein NIP5;1 konsantrasyon gradiyenti boyunca hücre içine asit transportunu kolaylaştırmanın yanında, plazma membranı boyunca yüksüz borik asit (B(OH)_3)'in pasif difüzyonunu da yapabildiği ifade edilmiştir (Frommer ve von Wiren, 2002). Böylece, NIP5;1 proteininin, borik asit kanalı olan bir majör plazma membran proteini olduğu ve toprakta, özellikle bor eksikliği olan durumlarda, borun kök hücrelerine alınmasında kritik öneme sahip olduğunu gösterilmiştir (Takano vd., 2008).

Bitkilerde bulunan Bor4 proteini, bir membran effluks proteinidir ve borun kökten dışarı pompalanmasını gerçekleştirmektedir (Miwa vd., 2007). Ayrıca, *bor4* geni pirinç bitkisine gönderilerek, bor toleransı yüksek bir transgenik bitki oluşturulmuştur (Kajikawa vd., 2011).

Saccharomyces cerevisiae'da Dur3 ve Pps1p (gliserol transportu ile aktive olan MIP ailesinin üyeleri) üre transport proteinlerinin mutasyonu sonucunda, hücre içine alınan bor miktarının azaldığı ve buna bağlı olarak 90 mM borik asite (toksik seviye) kadar toleransın arttığı saptanmıştır (Nozawa vd., 2006). Yapılan son çalışmalarda, borik asitin pasif difüzyonunun yanında, bir kanal boyunca membran transportu ve

en sonunda kök hücrelerine ulaştığı yayınlanmıştır (Takano vd., 2008). Mayada, bor effluks proteinlerinin bulunması ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Atr1 adı verilen majör bir bor effluks proteini tanımlanmıştır (Kaya vd., 2009).

İntraselüler bor miktarını düzenleyici mekanizmaların bakterilerde de var olabileceğine dair yorumlar mevcuttur, ancak bu konuda henüz hiçbir deneysel çalışma yapılmamıştır. Sadece, borun intraselüler seviyesinin çeşitli türler arasında çeşitlilik gösterebileceğine dair yorumlar vardır (Miwa ve Fujiwara, 2009). Bor1 proteinini kodlayan gen bakteri genomlarında taranmış ancak bir homolog bulunamamıştır.

Şu ana kadar bakteri dünyasında bor toleransı veya effluks işlevi ile ilgili hiçbir gen veya protein bilgisi ortaya çıkarılmamıştır.

1.2.7. Bor toksisitesi

Belli bir konsantrasyonun üzerinde borun, mikroorganizmalar, hayvanlar ve insanlar için toksik olduğu bilinmektedir. Bu etki, *Candida* ve *Saccharomyces* türlerinin neden olduğu vajinal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Swate ve Weed, 1974). Aynı zamanda bor, gıda koruyucu (Nielsen, 2004) ve insektisit (Habes vd., 2006) olarak da kullanılmaktadır. Borik asitle ilgili rapor edilen en düşük letal dozlar; oral alındığı zaman 640 mg/kg vücut ağırlığı, dermal alındığı zaman 8600 mg/kg, damar yolundan alındığı zaman 29 mg/kg, ölüm için ise total doz, erişkinler için 5-20 g, çocuklar için 5 g'ın altı olarak rapor edilmiştir (WHO, 2009).

Tarımda ise, borun eksiklik ve toksisiteye neden olduğu konsantrasyon değerlerinin birbirine çok yakın olduğu düşünülmektedir. Toksik seviyede bor içeren topraklardaki ürün kalitesinin azalması ve verim gibi konular besin üretiminde, özellikle çorak alanlarda, dünya genelinde önemli bir problem oluşturmaktadır (Nable vd., 1997). Tarımsal ürün üretimi sırasında bor toksisitesi ile baş etmek, eksikliği ile baş etmekten daha zordur, çünkü eksiklik, toprağı gübreleyerek çözülebilir. Ancak eksikliği ortadan kaldırmak için yapılabilecek bilinçsiz aşırı gübreleme toksisite problemlerine neden olabilir (Takano vd., 2008).

1.2.8. Bor içeren moleküller

Bor, tabiatı itibarıyla doğada tek başına yer almayıp, bileşikler halinde bulunur (Dembitsky vd., 2002). Bu moleküllerin bazıları hakkında bilgiler şu şekildedir. Boratlar, bor elementinin ana doğal kaynağıdır. Bunlar borik asit tuzları, B₂O₃ içeren esterlerdir (Amoroso vd., 2013). Doğal bor, en çok nemli alanlarda borosilikat olarak bulunmaktadır. Bu yapı değişik miktarlarda Fe, Al, Mg, Mn, Ca ve Na içermektedir. Buna örnek olarak turmalin ((Na,Ca)(Mg,Al)(Al,Fe,Mn)₆(BO₃)₃(Si₆O₁₈)(OH,F)₄) ve aksinit (axinite) (Ca₂(Fe,Mn)Al₂(BO₃(OH)Si₄O₁₂)) verilebilir (Flores vd., 2004).

Bazı bakteriler, bor içeren metabolitler sentezlemektedir. Bu antibiyotiklere Boromisin (Kohno vd., 1996), Borofisin (Arai vd., 2004), Aplazmomisin (Nakamura vd., 1977), Tartrolon (Irschik vd., 1995) örnek verilebilir. Boromisin (boromycine) ihtiva eden *Streptomyces antibioticus* türleri Ivory Coast'taki topraklardan izole edilmiştir. Bu bakteri, gram pozitif bakterilerin ve protozoanların gelişmelerini inhibe eden bor içeren antibiyotiği üretmektedir (patent US3864479). Gram pozitif bakterilerin ve protozoanların gelişmelerini inhibe eden bor makrolid antibiyotiğinin *Streptomyces antibioticus* tarafından doğal olarak sentezlendiği gösterilmiştir (patent US3864479 A, <http://www.google.pl/patents/US3864479>). Boromisin, parazit bir protozoan olan, Coccidiosis'e karşı tedavi amaçlı kullanılmış, ancak diğer gram negatif ve mantarlara karşı etkisi gösterilmemiştir. Ayrıca boromisinin hem klinik izolatlarda hem de in vitro kültür ortamlarında HIV1'i çok güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bulunmuştur (Kohno vd., 1996). Aynı zamanda tüm *Bacillus subtilis* hücrelerinde DNA ve RNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Pache ve Zahner, 1969).

Marin sedimentlerinden izole edilen *Streptomyces griseous* suşunun içinde bor içeren bir antibiyotik olan aplazmomisin (aplasmomycine) bulunmuştur (Amoroso vd., 2013). Bu suş, apoplazmomisin B ve C (Sato vd., 1978) adında iki komponent içermektedir. İkincisi aynı zamanda Kaliforniya'da marin kum sedimentlerinden izole edilen Actinobacter tarafından da üretilmektedir (Stout vd., 1991). Bir diğer antibiyotik tartrolon C, *Streptomyces* suşlarından da izole edilmiştir (Lewer vd., 2003). Tartrolonlar gram pozitif bakterilerdeki bazı spesifik enzimler ve membranlar üzerinde etkilidir. Gram negatif bakteriler, mantarlar ve mayalar duyarlı değildir,

fakat memeli hücreleri, özellikle tartrolon B ile güçlü bir şekilde inhibe edilmektedirler. Bu yapı ayrıca, *Staphylococcus aureus* hücre makromolekül sentezini inhibe etmektedir. Fakat *E. coli*'den izole edilen DNA ve RNA polimeraz üzerine etkili olmadıkları bildirilmiştir (Amoroso vd., 2013).

Günümüzde bor içeren bileşikler bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu nedenle Bortezomib (Velcade), Tavaborole (Kerydin), Benzaksoborol (AN2718) gibi ilaçlar sentetik olarak üretilmiştir. Bortezomib adı verilen bir ilaç, proteozomları inhibe ederek kanseri tedavi etmede kullanılmaktadır. Bortezomib hücreye verildiği zaman kanser hücreleri apoptoza uğramaktadır. Normal hücreler, proapoptotik etkilere karşı kanser hücrelerinden daha az hassastır (Smith vd., 2006). Tavaborole, Lösil-tRNA sentetazı inhibe ederek, protein sentezini bloke etmekte ve antifungal aktivite göstermektedir (Elewski vd., 2014). Tavaborole, *Trichophyton rubrum* veya *T. mentagrophytes* enfeksiyonuna bağlı olarak, tırnak yatağının mantar enfeksiyonu olan onikomikoz tedavisinde kullanılan, bor bazlı, topikal bir antifungal ilaçtır (Elewski vd., 2014). Benzaksoborol (AN2718), lösil- tRNA sentetazını inhibe eden, bor içeren yeni bir moleküldür. Benzaksoborol (AN2718), cilt ve tırnak enfeksiyonlarının potansiyel tedavisi için topikal bir anti-fungal ürün adaydır (Hu vd., 2013).

Dolayısıyla, Bor içeren moleküllerin medikal dahil birçok açıdan önemli biyoteknolojik ve ekonomik potansiyelleri aşikardır. Ancak bu moleküllerin hücreyi öldürürken veya üremesini inhibe ederken, bağlandığı veya etkilediği moleküler hedefler tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca, bor içeren bileşiklere karşı, canlı sistemlerin hücresel cevapları yeterince aydınlatılmamıştır. Bu yüzden, Bor bileşiklerinin bu açılardan potansiyelleri daha fazla araştırılmalıdır. Bunun için aday moleküller seçilmeli ve canlı sistemlerle etkileşimleri her açıdan irdelenmelidir. Bu kapsamda Epetraborole ve borik asitin bakteri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması iyi bir başlangıç olarak düşünülmüştür.

1.2.9. Borik asit

Bor, hücresel sistemlerde tek başına bulunmayıp, çoğunlukla borik asit formunda bulunur. Fizyolojik pH'da ve biyomoleküler etkileşimlerin yokluğunda, bor çoğunlukla, yüksüz (B(OH)₃) olarak bulunmaktadır (Takano vd., 2008).

Arabidopsis thailana bitkisini kullanan moleküler genetik deneyleri sonucunda iki tip bor taşıyıcısı (NIP5;1 ve BOR1) tanımlanmıştır (Takano vd., 2008). Daha sonra Bor1 takip edilerek, bitkide Bor4 effluks proteini bulunmuştur (Miwa, vd., 2007). Ayrıca daha önce, mayada yapılan çalışmalarda bor ile ilgili *bor1* ve *atr1* genleri bulunmuştur (Takano vd., 2007 ve Kaya vd., 2009).

Gün geçtikçe borik asitin canlılardaki esansiyelliği üzerinde çalışmalar artmıştır. Bazı ökaryotlar (Nielsen, 2000), heterosistoz syanobakteriler (Bonilla vd., 1990) ve *Bacillus boroniphilus* (Ahmed vd., 2007c) için esansiyel olduğu iddia edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, borik asitin anti-kanser etkisi olabileceği öne sürülmüştür. Epidemiyolojik bir taramada, borun diyet ile alınımı ile prostat kanseri riski arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Zhang vd., 2001). Bundan sonra yapılan bir çalışmada, borik asitin belli bir dozda prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını, inhibe ettiği rapor edilmiştir (Barranco ve Eckhert, 2004; Barranco vd., 2009). Borik asitin, farelerde LNCaP prostat tümörlerinin gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Raven, 1980; Gallardo-Williams vd., 2004).

Borik asitin birçok bakteriyi spesifik konsantrasyonlarda öldürdüğü bilinmektedir. Borik asit geniş spektrumlu bir antibiyotik ajandır. Ancak hücresel hedefleri net değildir.

1.2.10. ASKA klon seti

ASKA terimi İngilizce “A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive” (*E. coli* ORF (open reading frame)'larının arşivinin toplu bir seti) ifadesinin altı çizilen baş harflerinin kullanılmasıyla türetilmiş bir kısaltmadır. Bundan başka Japonların yukarıdaki uzun ifadeden neden ASKA'yı tercih ettiğini bilmiyoruz, ancak, ASKA'nın Japonya'da bir lokasyon ismi olduğu, bir şarkıcı ismi olduğu ve 16-18. yüzyıl arasını tanımlayan bir ifade olduğu dikkatimizi çekmiştir. Yani muhtemelen

hem koleksiyonu ifade eden, hem de kültürel olarak hatırlanması kolay bir isim, ASKA, tercih edilmiş olabilir.

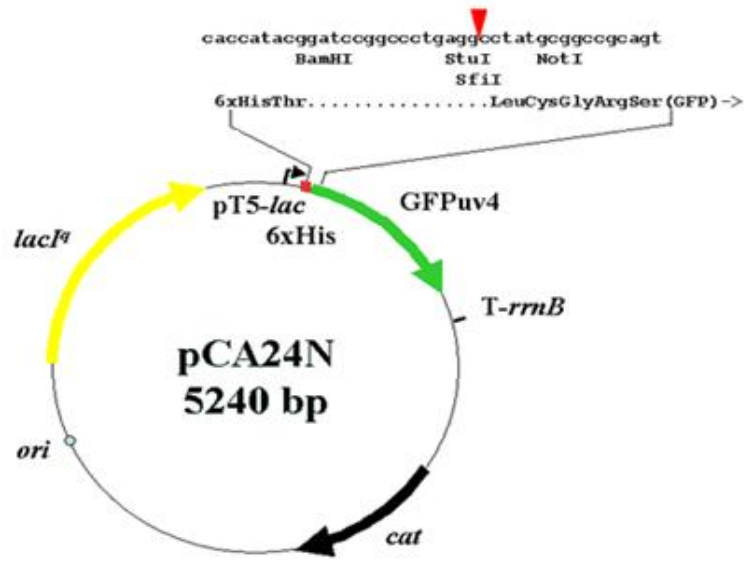
E. coli K12 suşu'nun genom sekans datası temel alınarak, fonksiyonel genomik analizler için, bireysel genleri kodlayan klonların bir seti oluşturulmuştur (Kitagawa vd., 2005). *E. coli*'de açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame) bulunan DNA bölgeleri, yani "kodlayan bölgeler ve potansiyel olarak kodlayan bölgeler", kısaca ORF olarak kısaltılmış ve hepsine birlikte "OM (ome)" eki getirilerek ORFom (ORFeome) denilmektedir. İşte ASKA, *E. coli* K12 suşunun ORFom'larının bir setidir. Başlama ve sonlanma kodonları hariç tahmin edilen ORF'ların herbiri PCR ile çoğaltılıp, multicopy plazmid vektörünün (pCA24N) içine klonlanmıştır. Her ürün, N-terminal ucunda Histidin-tag ve C-terminal ucunda GFP füzyonu içermektedir. Klonlanan genlerin ekspresyonu, IPTG tarafından aktive edilen, fakat normalde *cis* kısmında içerdiği LacI^q tarafından baskılanan, pT5-lac promotorü ile yönetilmektedir (Kitagawa vd., 2005). Bu şekilde, ASKA klon setinde, 4123 gen ayrı ayrı PCR ile çoğaltılmış ve pCA24N adı verilen plazmid vektörünün *StuI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerine klonlanarak, rekombinant plazmidler oluşturulmuştur (Şekil 1.1.). Kullanılan her iki primere *SfiI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi eklendiği için insert çıkarılmasında sadece *SfiI* enzimini kullanmak yeterlidir. Hücrelerin büyütülmesi için, kloromfenikol içeren Luria-Bertani (LB) besi ortamı kullanılmıştır. Klonlanan genlerin ekspresyonu için, 0.1 mM Isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) kullanılması önerilmiştir (Kitagawa vd., 2005). Klonlanan her bir genin doğru sekansa sahip olduğu, DNA sekanslama ile onaylandıktan sonra, 96 well'lik plakalara, her bir kuyucukta bir gen içeren rekombinant plazmid içeren *E. coli* AG1 suşunun içerisinde stok alınmıştır (Kitagawa, 2005). Bu çok değerli koleksiyon, çeşitli moleküler ve genomik çalışmalarda kullanılmak üzere, Japon bilim adamları tarafından, dünyanın kullanımına belli bir ücret karşılığında sunulmaktadır. Bor-gen ilişkisini tespit edebilmek amacıyla, genomik ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak, ASKA klon seti ile yapılan çalışmaların Bor-bakteri ilişkisine ışık tutması bu tez kapsamında planlanmıştır. 4123 genin her birinin aşırı ifade edilmesi ile bakterinin bor toleransında artış olup olmadığının taranması, yani genom boyunca tarama (genom-wide screening) ile başlayan çalışma, aday genlerin bulunması ve onaylanması ile devam etmiştir. Artan borik asit konsantrasyonlarına

sahip besi ortamlarında binlerce ekim yapılmış ve mümkün olan en üst seviyede, 4123 genin bor toleransı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Her bir *E. coli* geni daha önce de belirtildiği gibi, pCA24N plazmidine klonlanmış ve insertler sekanslama ile onaylanmıştır. pCA24N, yüksek kopya sayılı replikasyon orijinine sahip bir plazmid vektörüdür. Yani yüksek ihtimal, hücre başına 50'nin üzerinde plazmid vardır (bu sayı 100-200 arasına kadar ulaşabilir). Burada klonlanan her bir gen, T5 promotörü tarafından yönetilmektedir. Klonlanan genin önünde hem T5 promotör dizisi ve hem de Lac operatör dizisi bulunmaktadır. T5, bir kolifaj (coliphage)'dır yani *E. coli*'yi enfekte eden T5 virüsüdür, pT5 ise bunun güçlü bir promotörüdür. Ayrıca bu T5 promotörü *E. coli* RNA polimerazı tarafından da tanınıp kullanılmaktadır, yani "hibrit" bir promotördür (hem faj hem de konakçı bakteri enzimi tarafından tanınabilen/kullanılabilen bir promotör). T5 promotörü ile birlikte bulunan Lac operatör bölgesi negatif regülasyon ile gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olur. Lac represör proteini buraya bağlanarak RNA polimerazın promotora bağlanmasını önler. Araştırmacılar, sızma ekspresyonu (leaky expression) engellemek amacıyla, plazmid üzerine ayrıca *lacI^q* genini klonlamışlardır. Kendi promotörü olan bu gen, *LacI^q* proteini üretmekte ve pT5-LacO bölgesindeki operatör (*lacO*) dizisine bağlanarak, klonlanan genin ekspresyonunu engellemektedir. IPTG kullanılmasıyla bu negatif regülasyon ortadan kaldırılmakta ve RNA polimeraz, klonlanan genin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir. *LacI^q* ise bir mutasyon sonucu oluşturulmuş olup, yüksek miktarda Lac represör'ünün hücrede var olması demektir. Yani çok kopyalı plazmidde *lacO* (operatör) bölgesine bağlanabilecek yeterli miktarda Lac represör proteini bulunmaktadır. Teorik olarak, IPTG yokluğunda genin ekspresyonu, negatif regülasyondan dolayı, mümkün değildir. Ek olarak, genden sonra transkripsiyonun sonlanması için bir terminatör bölgesi, T-*rrnB*, plazmide entegre edilmiştir. Böylece, klonlanan genden sonra transkripsiyonun alttaki gen bölgesine devam etmesi önlenmiştir (Kitagawa, 2005).

pCA24N plazmidinin diğer bir özelliği N-terminal bölgesinde klonlanan gen ile aynı çerçevede (*in frame*) olan His-taq bölgesidir. Böylece ekspres edilen proteinin Ni-NTA kolumn ile göreceli olarak kolayca pürifikasyonuna olanak sağlanmıştır. Bir başka özellik, C-terminal ucuna aynı çerçevede eklenen GFP (green fluorescent

proteini)'yi kodlayan genin varlığıdır. Hücre içi lokasyon belirleme ve benzer çalışmalarda GFP ile klonlanan gen tarafından üretilen proteinin izlenilmesi amaçlanmıştır. Aslında ASKA-GFP plus bir set vardır ve GFP proteini kodlayan geni içermektedir. Ancak bu çalışmada GFP füzyonunun kullanılması uygun değildir, bu yüzden ASKA-GFP minus seti kullanılmıştır. Yani söz konusu bu tezin kullanacağı koleksiyonda sadece gen ve ucunda His-taq bölgesi vardır, GFP proteini yoktur. GFP-minus plazmidlerin nasıl oluşturulduğu, ilgili yayında detaylıca anlatılmıştır (Kitagawa, 2005). Son olarak seleksiyonu sağlamak için plazmid üzerine, kloramfenikol (Chloramphenicol) direncinden (Cm^R) sorumlu *cat* geni (chloramphenicol acetyltransferase) entegre edilmiştir. Bu yüzden çalışmalarda besi ortamlarıyla ilgili antibiyotik Cm (LB-cm veya LB-agar-cm) uygun konsantrasyonda eklenerek, plazmid bakteri hücresi içinde tutulmuştur.



Şekil 1.1. pCA24N plazmid. ASKA klonlarının oluşturulduğu plazmid şematik gösterimi

pCA24N plazmidinin içerisine klonlamanın detayları şu şekildedir:

Klonlanacak genin amplifikasyonunda kullanılan her iki primere, *SfiI* restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi eklenmiştir. Daha sonra plazmid *StuI* enzimi ile kesilmiştir. PCR ile üretilen gen, pCA24N vektörünün *StuI* bölgesine küt-uçlu olarak klonlanmış ve 8 rekombinant koloni seçilmiştir. 96 deep well plakalarına yerleştirilen klonlar, 1 mM IPTG içeren LB petrilere ekilerek klonlanmanın başarısı, büyüme ve

GFP fluorosan ışım miktarıyla belirlenmiştir. Ayrıca plazmidler izole edilmiş, *SfiI* yada *BglII* enzimleriyle kesilerek, agaroz jel elektroforez analizi sonucunda insert büyüklükleri onaylanmıştır. Ek olarak her bir insert sekanslanmıştır (Kitagawa, 2005).

Bu çalışmada kullanılacak klonlardaki rekombinant plazmidler GFP-minus, yani GFP proteini yoktur. GFP geninin plazmidten arındırılması için, *NotI* enzimi ile GFP geni kesilerek çıkartılmış ve rekombinant plazmidin kalan kısmı self ligasyonla birleştirilerek GFP minus plazmidler elde edilmiştir. Eğer insert (gen) *NotI* restriksiyon bölgesi taşıyorsa, kısmi *NotI* kesimi ile istenilen plazmid oluşturulmuştur (Kitagawa, 2005).

Yapılan literatür taramasında, ASKA klon setinin, ilaç hedef genlerinin araştırılmasında kullanıldığı görülmüştür. Örneğin, Triclosan ilacının hedeflediği genlerin test edilmesi amacıyla, ASKA Klon Seti kullanılmıştır. ASKA Klon seti suşları, triclosanın farklı konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında inkübe edilmiş ve triclosan varlığında üreme gösteren suşlar belirlenmiştir. Bu şekilde ASKA Klon setinin fonksiyonel genomik yaklaşımıyla kullanılmasıyla, triclosan ile ilgili genler tespit edilmiş ve onaylanmıştır. Burada tespit edilen hedef *fabI* genidir (Jo Yu vd., 2012). Bu çalışmada zenginleştirme (enrichment) yaklaşımı esas alınmış ve öldürücü dozda triclosan verilerek yaşayabilen suşlarda yer alan genler belirlenmiştir

ASKA klon setini kullanarak hücresel hedef tespit eden bir diğer örnek Xanthorizol ile yapılan çalışmadır. Xanthorizol zerdaçalın rizomundan izole edilen güçlü bir antimikrobiyal bileşiktir. Muhtemel hedefleri taramak için ASKA seti plazmid kütüphanesi havuzu oluşturulmuş ve zenginleştirme (enrichment) ile artan Xanthorizol konsantrasyonlarında klonlar seçilmiştir. DNA sekans analizi ile klonların içerdiği genler belirlenmiş ve dokuz farklı gen tespit edilmiştir. Bunlardan bir tanesi esansiyel olan *tadA* (tRNA-specific adenosine deaminase A) genidir. Bu çalışma ile antibiyotiğin *tadA* genini vurduğu (bağlandığı) ve bakteriyi bu şekilde öldürdüğü belirtilmiştir (Yogiara vd., 2015).

E. coli'de fosfomisin etkilediği genleri bulabilmek amacıyla da ASKA klon setine başvurulmuş ve genom boyu tarama çalışmaları yapılmıştır. Tüm ASKA klon kütüphanesi, LB broth ve kloramfenikol (50 µg/mL) besi ortamında IPTG içermeyen ve 100 µM IPTG içeren 96 well platalere ekim yapılmış ve 37°C'de gece boyu

inkübe edilmiştir. Her bir wellden 5 µl alınarak 32 µg/mL fosfomisin içeren besi ortamlarına nokta ekim yapılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra sadece bir adet klonun fosfomisin varlığında ürediği görülmüştür. Bu klonun, pCA24N::*murA* olduğu tespit edilmiştir (Couce vd., 2012).

Dolayısıyla bu tez çalışmasında, genomik yaklaşımla, binlerce *E. coli* geninin her birinin ayrı ayrı aşırı ifadesinin bor toleransı üzerinde etkisinin araştırması ile bu bakteride başta olmak üzere, bakteri veya belki de tüm canlı dünyasında, bor toleransı sağlayabilen genlerin taranması ve bulunması, oldukça olumlu ve iyimser bir beklenti olarak değerlendirilmiştir. İlerleyen bölümlerde bunu gerçekleştirmek için başvurulan strateji ve metodoloji, göreceli olarak daha detaylı bir şekilde ele alınarak sunulmaktadır.



2. MALZEME VE YÖNTEM

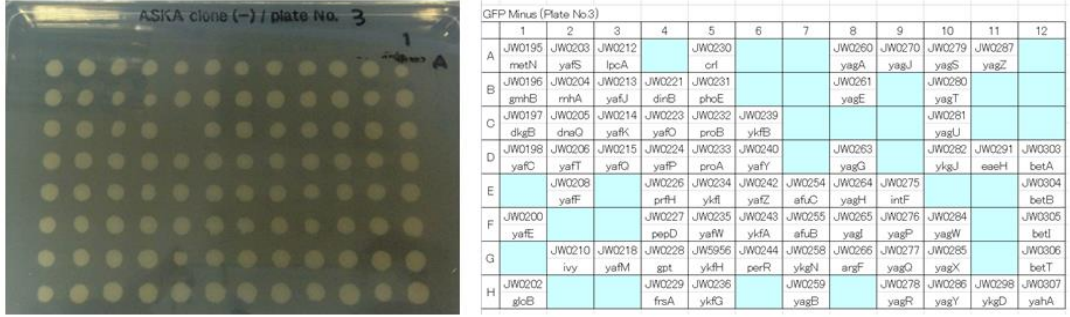
2.1. *Escherichia coli* ASKA Klon Setinin Canlandırılması ve Stokların Alınması

ASKA klon seti, Japonya’da Nara Bilim ve Teknoloji Enstitüsü, Keio Üniversitesi ve CREST JST (Japon Bilim ve Teknolojisi) ortak çalışmaları sonucu elde edilmiştir. Bu set, her petride, en fazla 96 adet bakteri suşu (klon) ekilmiş halde, 57 adet petriden oluşmaktadır. Bu klonların petrideki lokasyonlarını belirten bir tablo bulunmaktadır (Şekil 2.1.). Bu sette toplam, 4123 adet klon mevcuttur. Üç farklı stok alınmıştır. Bütün deneylerde, LB (Luria Bertani) besi ortamı kullanılmıştır. Çalışmalarda kolaylık olması açısından, yoğun kıvamda olan gliseroldan, %30’luk gliserol hazırlanmıştır. Son konsantrasyon %15 gliserol olacak şekilde LB besi ortamları hazırlanarak otoklavlanmıştır. Steril edilen ve biraz soğumaya bırakılan besi ortamlarına son konsantrasyon, 15 µg/mL olacak şekilde kloramfenikol antibiyotiği (stok konsantrasyonu 25 mg/mL) eklenmiştir. İlk stok alımında, hazırlanan besi ortamları, 400 µl’lik mikropalakaların her bir kuyucuğuna 200 µl olacak şekilde dağıtılmış ve 57 adet plaka için stok besi ortamları hazır hale getirilmiştir. Replikatör yardımıyla bütün koleksiyon sırasıyla mikropalakalara ekim yapılmış, 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her bir suşun üreme durumları kontrol edilmiş ve büyümenin az olduğu veya olmadığı görülen klonlar, ayrı ayrı tekrar ekim yapılmış, mikropalakalardaki lokasyonlarına yerleştirilerek stok mikropalakalar -80°C’de dondurulmuştur.

İkinci stok alımında, 96’lık “deep well” plakalar kullanılmış ve toplam 1 mL olacak şekilde besi ortamları hazırlanmıştır. Stok besi ortamlarının hazırlanması ilk yöntem ile aynı oranlarda gerçekleştirilmiştir. Replikatör yardımı ile her bir petriden deep well plakalara ekim yapılmıştır. 37°C’de bir gece aktiveştirmenin ardından stok dondurulmuştur.

Üçüncü stok alımında ise, 2 mL’lik ependorf tüpler kullanılmıştır. Burada yine toplam 1 mL olacak şekilde, aynı yöntem ile besi ortamları hazırlanmıştır. 4123 adet

klon için tek tek etiketler hazırlanmış ve kapaklarına isimleri yazılmıştır. 12 kanallı pipet yardımıyla ekimler yapılmış ve 37°C’de bir gece aktifleştirmenin ardından stok dondurulmuştur.



Şekil 2.1. ASKA klon setinden 3 nolu petrinin görüntüsü ve bu petride yer alan klonların içerdiği genlerin isimlerini gösteren tablo

2.2. Genom Boyunca Tarama Çalışmaları

Bu çalışmada temel yaklaşım olarak, bakteri suşuna yeni fonksiyon katan (“*gain of function*”) genin bulunması esas alınmıştır. Bu fonksiyon ise normalde bakterinin öldüğü veya büyümesinin inhibe edildiği bir bor konsantrasyonunda, aşırı ifade edilen (overexpression) genden dolayı, yaşamasıdır veya büyümesidir; yani normalden daha fazla veya göreceli olarak “ekstrem” bir bor tolerans değerine kavuşmasıdır.

İlk olarak, kullanılacak IPTG konsantrasyonlarının ve indüksiyon süresinin belirlenmesi gerekmektedir. IPTG konsantrasyonu önemlidir, çünkü bazı genlerin daha fazla ifade edildiği zaman bakteriye toksik etki gösterme ihtimalleri vardır. ASKA klon setini oluşturan yayında 0.1 mM ve 1 mM IPTG kullanıldığı belirtilmiştir. Diğer yayınlar tarandığında farklı IPTG konsantrasyon ve sürelerine rastlanmaktadır. Bu bilgilerden bazıları Çizelge 2.1.’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Uygun IPTG konsantrasyonunun bilgisinin tespit edilebilmesi için literatürden bilgiler

Yapılan çalışma amacı ve sonucu	Kullanılan IPTG konsantrasyonu ve süresi	Referans
ASKA klon setinin oluşturulması: IPTG toksisitesinin GFP içeren klonlarda tespit edilmesi	1 mM IPTG kullanılmıştır. LB-petirilerinde üreme izlendiği için, muhtemelen gece boyunca indüksiyon yapılmıştır. Sonuçta, çoğu klon için IPTG indüksiyonu toksiktir (%51 kötü derecede, %28 orta derecede, %21 hiç etkilenmemiştir. Sonuç: 1 mM IPTG çok fazladır ve bizim çalışmamıza uygun değildir.	Kitagawa vd., 2005
ASKA klon setindeki klonlardan protein pürifikasyonu için indüksiyon	0.1 mM IPTG (veya 1 mM) ve 2 saat süre ile kullanılmıştır. Sadece bazı klonlar test edilmiş ve fazla ekspresyon gösterilmiştir. Toksikite ile ilgili bir veri verilmemiştir	Kitagawa vd., 2005
Triclosan hedef genlerin overekspresyonlarının test edilmesi	1 mM IPTG kullanılmıştır. Sadece hedef genleri taşıyan klonlara MIC testi uygulanmış ve fazla ekspresyon tespit edilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.	Jo Yu vd., 2012
Antimikrobiyal etki gösteren Xanthorizol hedef genlerinin araştırılması	100 µM IPTG, 6 saat süre ile kullanılmıştır. <i>E. coli</i> W3110 <i>imp4213</i> suşunda MIC deneyleri yapılmış, fazla ekspresyon gösteren genler belirlenmiştir. ASKA seti plazmid kütüphanesi havuzu oluşturulmuş ve zenginleştirme (enrichment) yöntemi ile dirençli klonlar seçilmiştir. Sonuç: Çalışmamızda 100 µM IPTG başlangıçta denenmiştir.	Yogiara vd., 2015
Tüm ASKA klon seti, fosfomisin direnci için tek tek taramış ve sadece bir adet klonun fosfomisine direnç sağladığı görülmüştür. Bu klonun, pCA24N:: <i>murA</i> olduğu tespit edilmiştir.	100 µM IPTG kullanılmış ve gece boyunca indüksiyon yapılmıştır. İki farklı fosfomisin konsantrasyonu kullanılmıştır (0 ve 32 µg/mL (toksik doz)). Ayrıca bazı büyüme deneylerinde 0, 3.3, 10, 33.3 ve 100 µM IPTG kullanılmıştır. IPTG büyüme boyunca besi ortamında vardır. Sonuç: İkinci taramanın 33 µM IPTG kullanılarak yapılmasına karar verilmiştir.	Couce vd., 2012
Genom boyunca tarama yapılmıştır.	IPTG kullanılmamıştır. Amaç, bakteride glikojen metabolizması ile ilgili genleri tespit etmektir. IPTG kullanılmamasına rağmen, rekombinant plazmitten az miktarda hedef gen ekspresyonunun olduğu anlaşılmaktadır.	Eydallin vd., 2010
237 farklı toksin ortamında, Biolog PM plakaları kullanılarak direnç genleri araştırılmıştır.	50 µM IPTG kullanılmış ve saatlerce veya günlerce indüksiyon yapılmıştır. ASKA plazmidleri izole edildikten sonra DH5α suşuna transforme edilmiş ve burada daha sonra zenginleştirme yöntemi kullanılmıştır.	Soo vd., 2010
<i>E. coli</i> T7 fajının büyümesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi için genom boyu taramalarında ASKA klon setinin kullanılması.	0.1 mM IPTG konsantrasyonu seçilmiştir. Makalede bu IPTG konsantrasyonunda klonların %95'inin normal olarak büyüdüğü ifade edilmiştir.	Qimron vd., 2006
Esansiyel genlerin diğer bazı genlerin aşırı ifadesi ile komplementasyonu.	Taramalarda 50 µM IPTG kullanılmıştır.	Bergmiller vd., 2012
Minimal glukoz besi ortamında üreyemeyen şartlı oksotrofların (conditional auxotrop), ASKA plazmidleri ile komplementasyonu	ASKA plazmidleri komplementasyonunda çoğunlukla 50 µM IPTG kullanılmıştır. Ama bazı genler için bu oran 0.5 ve 1 mM IPTG olarak da denenmiştir.	Patrick vd., 2007

Literatür taraması sonucu farklı IPTG konsantrasyonları ile optimizasyon yapılmasına karar verilmiştir. Bor tolerans değerlerini ortalama olarak tespit etmek ve IPTG konsantrasyonuna karar verilmesi amacıyla, ASKA Klon platelerinden bir adet plaka (49 numaralı) seçilmiştir. Borik asit içermeyen ve 50 mM, 80 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 150 mM borik asit ve IPTG içermeyen ve 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM IPTG içeren LB-cm (30 µg/mL) besi ortamları hazırlanmıştır. 49 numaralı ASKA plaka stoktan LB-cm besi ortamına ekim yapılmıştır. 37°C’de gece boyu inkübasyonun ardından hazırlanan katı besi ortamlarına ekimler yapılmıştır. 3-4 gün boyunca 37°C’de inkübe edilen petrillerdeki üremeler gün gün takip edilmiştir.

2.3. ASKA Klon Seti Genom Boyu Kütüphane Havuzu ile Yapılan Çalışmalar

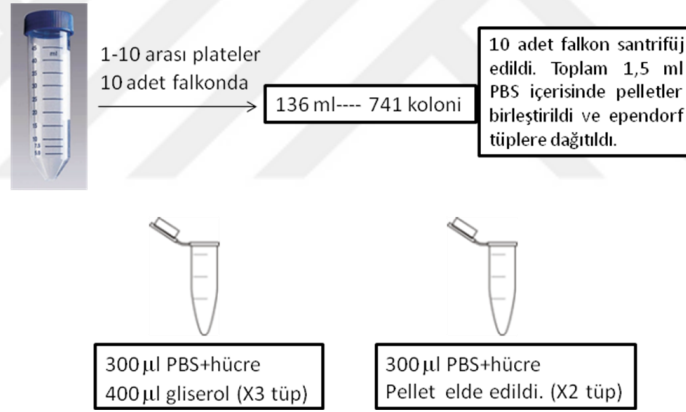
Diğer yaklaşım ise 4123 klonun bir havuz (pooling) içerisinde aynı tüpte birleştirilmesi ve zenginleştirme yöntemi ile yüksek borik asit konsantrasyonlarında üreyebilen klonların ayırt edilmesidir.

Stratejik olarak bu bölüme şu şekilde yaklaşılması uygun görülmüştür. Birincisi, bütün klonların bir araya getirilmesi ya da 10’lu gruplar haline getirilerek zenginleştirme deneyleri ile dirençten sorumlu genlerin tespit edilmesidir. Bu yaklaşıma genom boyunca tarama deneylerinden sonra başlanmıştır. Zaten her bir plakadaki klonlar, genom boyunca tarama deneyleri esnasında yetiştirildiği için bu bölümde arta kalan hücreler, büyüme eğrisi ve zenginleştirme deneyleri için stok haline getirilerek saklanmıştır.

2.3.1. ASKA klon seti genom boyu kütüphane havuzunun oluşturulması

Zenginleştirme deneylerinin yapılabilmesi için, öncelikle plakalardaki klonların (suşların) zaman içinde bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bunun için her bir plaka, genom boyunca tarama deneyleri için kullanıldıktan sonra, kalan hücreler (yaklaşık 200 µl), bir araya getirilmiştir. Literatürde her bir kuyucuktan 20-25 µl suşun birleştirildiği ve bir araya getirilerek oluşan süspansiyondan plazmid izole edildiği

belirtilmiştir (Bergmiller, 2012; Patrick vd., 2007). Bu çalışmada, mikropalakalarda yetiştirilen hücrelerin, OD₆₀₀ değerleri mikropalate reader ile ölçüldükten sonra üremeleri onaylanmış ve hücrelerin tamamı bir araya getirilmiştir. Mikropalakalarda yer alan her bir kuyucuktan her bir “havuz” için, ~200 µl alınıp, 96 kuyucuktan gelen hücreler birleştirilmiştir. Genom boyu tarama deneylerinde, 10 adet mikropalaka ile birlikte çalışıldığı için stoklar (örn; Plate 1-10 arası) 10’lu şekilde alınmıştır. Mikropalakalardaki hücreler, yeterli sayıda falkonda birleştirilmiş, soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra pellet elde edilmiştir. Pelletler, toplam 1.5 mL steril PBS içerisinde çözülmüştür. Elde edilen hücre süspansiyonu, 300 µl şeklinde ependorf tüplere aktarılmış, son konsatrasyonu %15 gliserol içerecek şekilde 3 adet stok alınmış ve dondurulmuştur. Aynı zamanda, ASKA klon *in vitro* plazmid kütüphanesinin oluşturulması için, elde edilen diğer iki tüp santrifüj edildikten sonra pellet elde edilmiş ve -80°C’de saklanmıştır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon deneyleri için stok alınması ve hücre pelleti elde edilmesi

Her bir tarama setinde üreyen klon sayısı not edilmiştir. Zenginleştirme (enrichment) deneyleri için, 1 adet “stok karışımı (stok mix)” oluşturulmuştur. Burada dikkat edilmesi gereken, her bir spesifik klonun, total mixte eşit hacimde temsil edilmesidir. Bunun için baz aldığımız bilgi, daha önceki bir yayında belirtildiği gibi, her bir klondan 20 µl alınarak birleştirilmesi ve böylece zenginleştirme başlangıç bakteri klon karışımının (mix) elde edilmesidir. Bu veriden hareketle, aşağıda tabloda detaylı

hesaplamaları verilen, klon stokları birleştirme stratejisine göre; yaklaşık 470 µl hacimde bir stok karışımı elde edilmiştir (Şekil 2.3.).

stoklanan plate numaraları	Miks Stok ismi	Üreyen klon sayısı	Toplam Stok hacmi (ml)	Toplam gliserol stok tüp hacmi (µl)	Stok birleştirme stratejisi	Toplam Hücre hacmi (µl)
Plate 1-10	A1	741	136	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate 11-20	A2	567	126,5	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate 21-30	A3	698	124	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate 31-40	A4	729	124	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate 41-50	A5	684	126	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate 51-57	A6	518	97,5	300 µl stok + 400 gliserol		300
Plate A + B*	A7	182	35	80 µl stok + 106 gliserol		80
toplam		4119				

Stok birleştirme stratejisi	Toplam stok hacmi (µl)	klon sayısı/µl stok	herbir klon *20 µl/ klon alınsaydı toplam hacim ml	µl 300µl deki oran	µl stoktan çekilecek miktar
300	700	741/300	14,82	32,7	76,3
300	700	567/300	11,34	26,9	62,8
300	700	698/300	13,96	33,8	78,8
300	700	729/300	14,58	35,3	82,3
300	700	684/300	13,68	32,6	76,0
300	700	518/300	10,36	31,9	74,4
80	186	182/80	3,64	8,3	19,3
			82,38		469,9
					mikrolitre enrichment mix

* Tarama testlerinde üremeyip tekrar teker teker ekilen ve yetiştirilen klonları temsil etmektedir
* yayınlarda her bir stoktan 20 µl çekerek birleştirmişler

Şekil 2.3. Zenginleştirme deneyleri için total stok mixinin hazırlanması

2.3.2. Genom boyu kütüphane havuzunun büyüme eğrisinin belirlenmesi ve zenginleştirme ile seleksiyon çalışmaları

Birleştirilerek elde edilen genom boyu kütüphanenin büyüme eğrisi, havuzun topyekün bir şekilde borik asite 30 saat boyunca maruz bırakılması ile elde edilmiş ve hangi konsantrasyonlarda üremenin durduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda elde edilen genom boyu kütüphane stoğu, 5 mL 30 µg/mL konsantrasyonunda kloramfenikol içeren LB besi ortamına (LB-cm) inoküle edilmiştir. Hücrelerin canlanması için, bakteri kültürü 37°C’de 20 dakika çalkalamaya bırakılmıştır. Ardından her bir konsantrasyonda OD₆₀₀ 0.05 olacak şekilde inokülasyonlar yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. ASKA genomik kütüphanesi için kullanılan konsantrasyonlar, borik asit içermeyen, 70 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM borik asit ve 100 µM IPTG içeren LB-cm besi ortamlarıdır. Negatif kontrol olarak W3110 (pCA24N) kullanılmış olup, borik asit içermeyen, 40 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 120 mM borik asit ve 100 µM IPTG içeren LB-cm

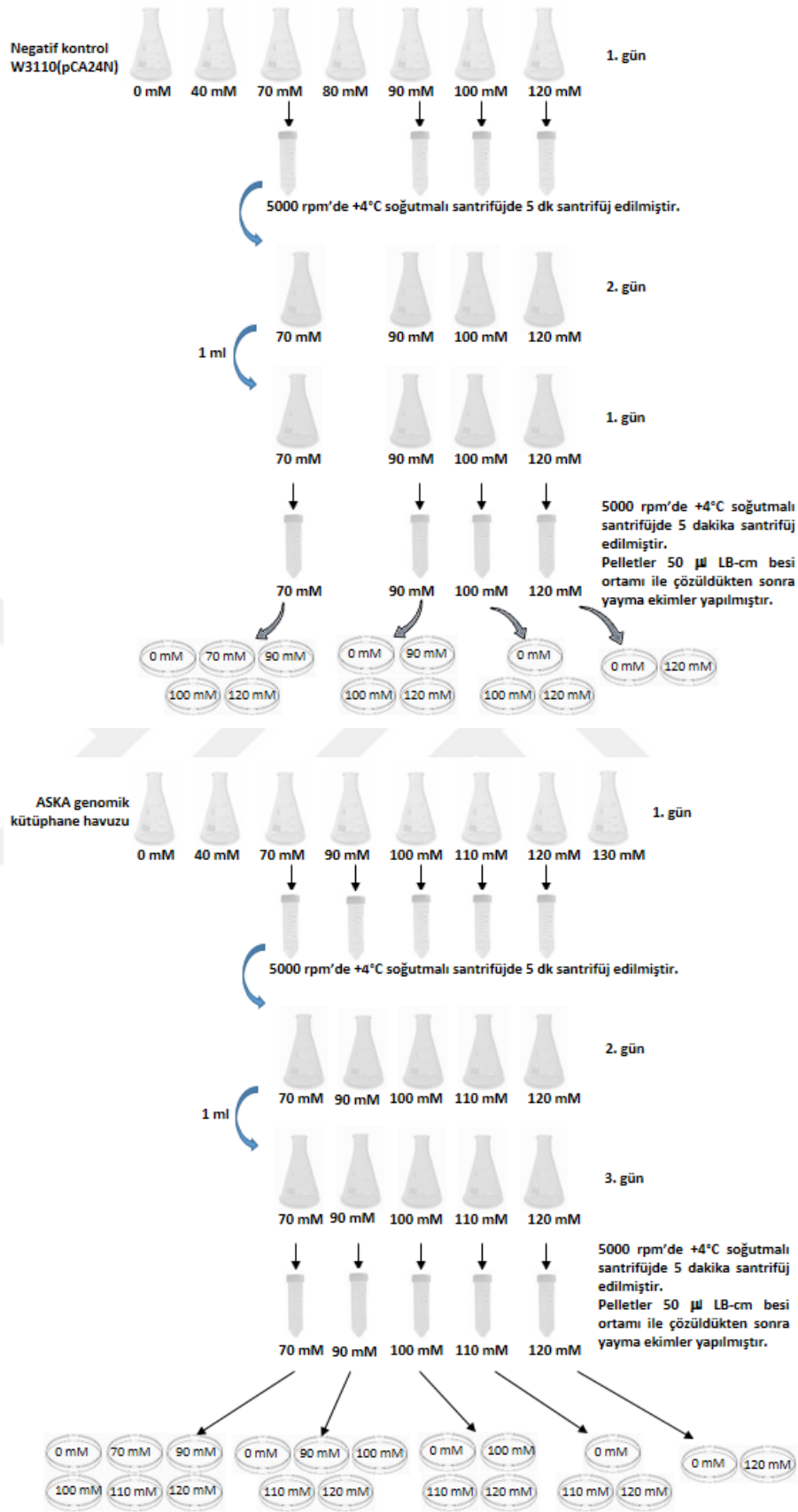
besi ortamlarında büyüme eğrisi deneyine başlanmış ve 30 saatin sonunda üremenin durduğu konsantrasyon belirlenmiştir.

Büyüme eğrisi deneyi tamamlandıktan sonra elimizdeki ASKA genomik kütüphane havuzu zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon yapılmıştır. Deneyler negatif kontrol ile birlikte yürütülmüştür. Bunun için, büyüme eğrisinden gelen örnekler, 5000 rpm +4°C soğutmalı santrifüjde 5 dakika santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edilmiştir. Farklı borik asit konsantrasyonu içeren ortamlardan gelen bu pelletlerin her biri kendi borik asit konsantrasyonundaki taze besi ortamları (LB-cm ve IPTG içeren) ile çözülerek zenginleştirme deneyinin ikinci günü için hazır hale getirilmiştir.

Besi ortamları, ASKA genomik kütüphane havuzu için 70 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM; negatif kontrol için 70 mM, 90 mM, 100 mM, 120 mM borik asit konsantrasyonları ve 100 µM IPTG ve 30 µg/mL konsantrasyonunda kloramfenikol içermektedir. 37°C bir gece inkübasyondan sonra erlenler ve tüplerden 1 mL alınıp steril ve fresh besi ortamlarına aktarılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü gün aynı işlemler tekrar edilmiş ve inkübasyon sonrası LB agar besi ortamlarına yayma ekimler yapılmıştır (Şekil 2.4.).

Bu deneyler, negatif kontrol ve ASKA genomik kütüphanesi için 5 mL LB-cm besi ortamı içeren tüplerde ve 20 mL LB-cm besi ortamı içeren erlenlerde gerçekleştirilmiştir.

Seleksiyon sonunda her bir konsantrasyondan belli bir miktar alınarak farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren (0 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM) katı besi ortamlarına ekimler yapılmıştır. Petriler, 37°C etüvde 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üreme durumları gün gün takip edilmiştir.



Şekil 2.4. Zenginleştirme deneyinin yapılmasının şematik gösterimi

2.4. DH10b ASKA Plazmid Havuzunun Elde Edilmesi (DH10b ASKA Pooled Library)

E. coli plazmid havuzu ayrıca farklı bir *E. coli* suşu olan DH10b içerisinde de elde edilmiştir. Bunun için öncelikle plazmid havuzu in vitro olarak elde edilmiş ve ardından DH10b suşu içerisinde ısı şoku yöntemi kullanılarak transforme edilmiştir.

2.4.1. ASKA klon *in vitro* plazmid kütüphanesinin elde edilmesi

Önceki deneysel çalışmalar sonucunda ASKA klon kütüphanesi pellet olarak elde edilmiş ve -80°C’de saklanmıştı. ASKA plate 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-57 ve A ve B platelerden elde edilen pelletler 1 mL PBS içerisinde birleştirilmiştir. Bu karışım iyice çözüldükten sonra 5 adet ependorf tüpe dağıtılmıştır. ASKA klon plazmid kütüphanesinin oluşturulması için elde edilen karışımlardan 2 tanesinden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu için Thermo kiti kullanılmıştır. Plazmid DNA izolasyon işleminin sonucunu görebilmek için %0.8’lik agaroz jele 2 µl yüklenmiştir.

2.4.2. DH10b kompetant hücrelerin elde edilmesi

DH10b suşu transformasyon için CaCl₂ kompetant yöntemi ile kompetant hale getirilirken (Dagert ve Ehrlich, 1979), ilk olarak stoktan tek koloni ekimi yapılmıştır. Ertesi gün tek düşen kolonilerden bir tanesine steril kürdan dokunulup, 5 mL LB sıvı besi ortamına inokule edilmiştir. 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra, tüpten 1 mL alınarak 100 mL LB besi ortamına aktarılmış, OD₆₀₀ değeri 0.4’e gelene dek büyütülmüştür. Inkübasyon sonrası hücreler +4°C soğutmalı santrifüjde, santrifüj edilerek hücre pelleti elde edilmiştir. Buzun üzerinde pellete 12 mL 0.1 M MgCl₂ eklenerek çözülmüştür. Ardından 5000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra pellet, 12 mL 0.1 M CaCl₂ eklenerek çözülmüştür. Tekrar 5000 rpm’de 5 dakika +4°C’de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet, 2.15 mL CaCl₂ ve 350 µl %100 gliserol eklenerek stok haline getirilmiştir. Stoklar 1.5 mL ependorf tüplere ayrılmış ve -20°C’de saklanmıştır.

2.4.3. Isı şoku yöntemi ile transformasyon

ASKA klon plazmidlerinden 1 µl alınmış ve elde edilen kompetant hücrelere aktarılmıştır. Ardından sırasıyla; 30 dakika buz üzerinde, 2 dakika 42°C'de, 2 dakika tekrar buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra transformant hücreler, 1 mL LB besi ortamına aktararak, 37°C'de 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 8000 g'de 3 dakika santrifüj yapılarak pellet edilmiş, pellet üzerine 50 µl LB besi ortamı eklenerek iyice çözülmüştür. LB-cm katı besi ortamlarına drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Transformasyonun başarısı değerlendirildikten sonra, kalan plazmidlerden 1'er µl DH10b kompetant hücrelere transformasyon yapılmıştır. Elde edilen binlerce koloni öze ile toplanarak yeterli miktarda PBS içerisinde çözüldükten sonra, gliserol stoğu alınarak dondurucuda saklanmıştır.

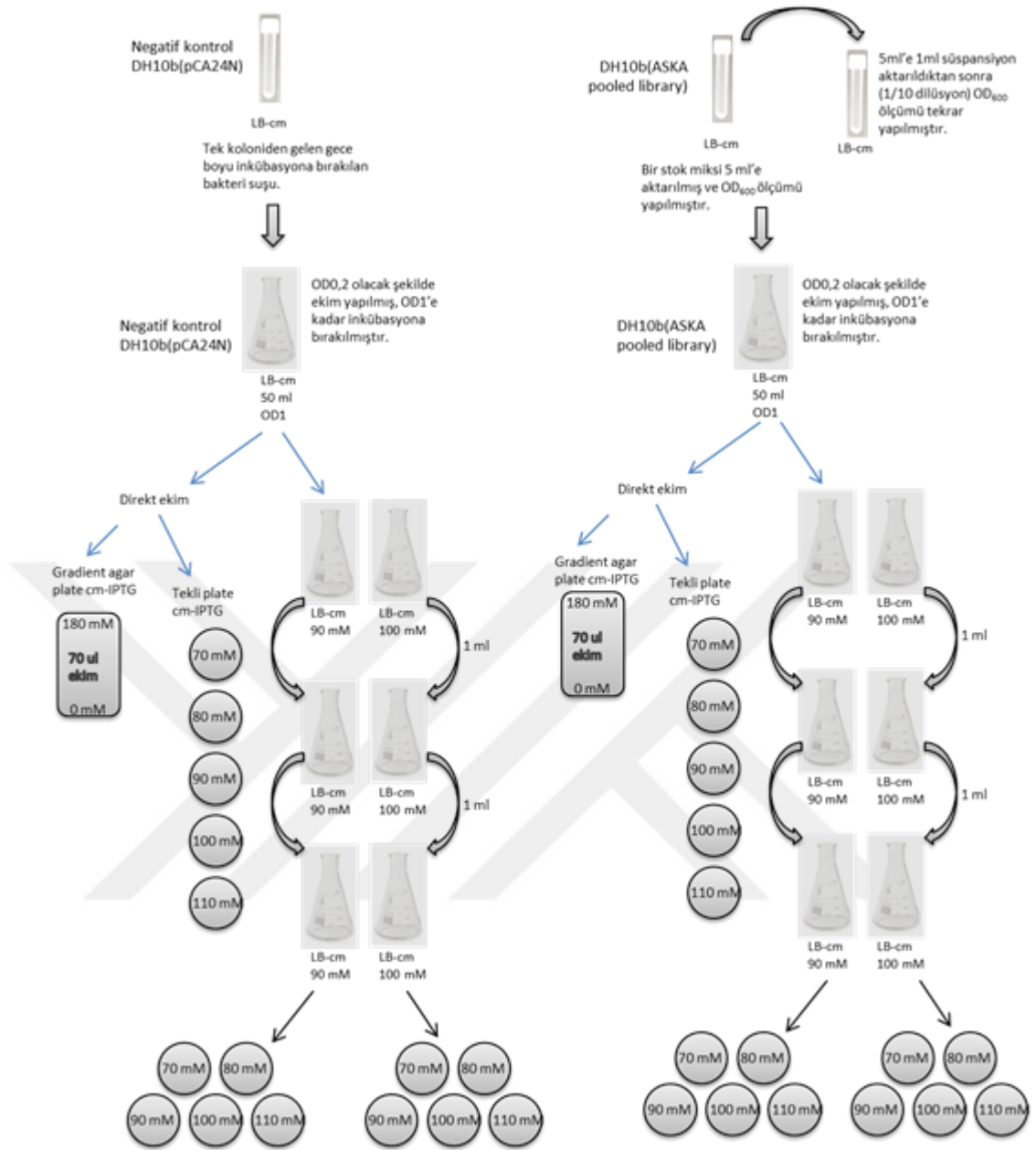
2.4.4. DH10b ASKA kütüphane havuzu ile yapılan farklı seleksiyon çalışmaları

Seleksiyon çalışmaları için üç farklı teknik kullanılmıştır. Bunlar, gradient yöntemi, direkt ekim yöntemi ve zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon teknikleridir. Bu deneyler için bir adet stok karışımı 5 mL LB-cm besi ortamına inoküle edilmiştir. OD₆₀₀ ölçümleri yapıldıktan sonra, hücrelerin canlandırılması için bakteri kültürü temiz ve steril bir besi ortamına OD₆₀₀ 0.2 olacak şekilde inoküle edilmiş ve 37°C'de OD₆₀₀ 1'e kadar çalkalamaya bırakılmıştır.

Gradient ekim tekniğinde besi ortamının birinci katı için 35 mL LB besi ortamı, stok kloramfenikol'den son konsantrasyon 30 µg/mL olacak şekilde ve 100 µM IPTG'den son konsantrasyon 100 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. %3 eğim olacak şekilde kare petri ayarlanmış ve birinci kat besi ortamı dökülmüştür. Besi ortamının ikinci katı için 180 mM borik asit konsantrasyonu içeren 30 µg/mL kloramfenikol ve 100 µM IPTG LB besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlığı tamamlanmış olan ikinci kat besi ortamı 45 dk sonra dökülerek donmaya bırakılmıştır. Besi ortamı hazırlandıktan sonra, OD₆₀₀ 1'e kadar büyütülmüş olan DH10b suşu içerisinde elde edilmiş ASKA havuzundan (DH10b(ASKA pooled library)) 100 µl alınarak yayma ekim yapılmıştır. Aynı işlemler negatif kontrol olan DH10b(pCA24N) suşu için de gerçekleştirilmiştir. Gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Bir diğerk seleksiyon yöntemi olan direkt ekim ile seleksiyon için OD₆₀₀ 1'e kadar büyütölmüş olan DH10b-ASKA havuzundan 50 µl alınarak borik asit içermeyen, 70 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM borik asit içeren besi ortamlarına yayma ekim yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Üçüncü seleksiyon yöntemi olan zenginleştirme yönteminde, ilk aşamada DH10b-ASKA havuzu ve negatif kontrol sıvı besi ortamında farklı konsantrasyonda borik asit içeren (90 mM, 100 mM, 110 mM) 50 mL LB-cm-IPTG besi ortamı ile muamele edilerek, 24'er saatlik 3 tekrar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, OD₆₀₀ 1'e kadar büyütölmüş olan DH10b-ASKA havuzundan OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde alınarak 90 mM ve 100 mM borik asit içeren 50 mL LB sıvı besi ortamlarına inoküle edilmiştir. 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir örnekten 1 mL alınarak, yeni 90 mM ve 100 mM borik asit içeren 20 mL besi ortamlarına aktarılmıştır. Aynı işlem toplamda 3 kez tekrarlanarak, zenginleştirme döngüsü tamamlanmıştır. 3. günün sonunda 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM borik asit içeren LB-cm ve 100 µM IPTG içeren katı besi ortamlarına yayma ekimler yapılmıştır. Negatif kontrol olarak pCA24N plazmidini içeren uygun *E. coli* (DH10b) suşu kullanılmış ve yukarıda anlatıldığı şekilde negatif kontrol de aynı deneylere tabii tutulmuştur (Şekil 2.5.). Ekimler yapıldıktan sonra, petriler 37°C etüvde 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince üreme durumları takip edilmiş ve 5. günün sonunda borik asit içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler belirlenmiştir.



Şekil 2.5. Seleksiyon deneylerinin yapılmasının şematik gösterimi

2.5. Klonların Farklı Tekniklerle Yüksek Borik Asit Konsantrasyonlarında Üreme Durumlarının Onaylanması

Yüksek borik asit içeren ortamlarda üreme gösteren klonların toleranslarının onaylanması ve maksimum üreme gösterdiği borik asit konsantrasyonunun belirlenmesi için “çizgi ekim”, “bor tolerans nokta testi” ve “MIC (minimum inhibisyon konsantrasyonu)” testleri kullanılmıştır.

2.5.1. Bor tolerans nokta testi

Borik asit seleksiyonu sonrası elde edilen hedef klonlar, LB-cm besi ortamlarında çoğaltılmıştır. Üreme sonrası hücrelerin spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Yoğunluğu OD₆₀₀ 0.5 olacak şekilde 200 µl PBS içerisine uygun miktarda hücre aktarılmış ve buradan 100 µl alınarak, 100 µl PBS içeren diğer kuyuya eklenmiştir. Daha sonra bu karışımın içinden tekrar 100 µl alınmış ve 100 µl PBS içine aktarılmıştır. Bu şekilde steril ortamda seri dilüsyonlarla 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, ve 1/16’lık bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. 8 kanallı pipet kullanılarak, 5 farklı dilüsyondan (1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16) 5’er µl alınarak, LB-cm farklı konsantrasyonlarda borik asit içeren besi ortamlarına ekimler yapılmış ve bakterilerin büyümesi takip edilmiştir. 37°C inkübatörde 3-5 gün inkübasyon sonrası üreme olup olmadığına bakılarak, klonların üreme durumları tespit edilmiştir.

2.5.2 MIC (Minimum Inhibition Concentration) testi

MIC testi yapılacak olan klonların stoklarından, borik asit içermeyen LB kloramfenikol (30 µg/mL) katı besi ortamına tek koloni ekimi yapılmıştır. 37°C etüvde gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tek tek düşen kolonilerden bir tanesine steril kürdan ile dokunulmuş ve 5 mL LB-cm besi ortamlarına inoküle edilmiştir. 37°C, 150 rpm çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Bu sırada, 12 farklı bor konsantrasyonu içeren (0 mM, 40 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120

mM, 130 mM, 140 mM ve 150 mM) LB-cm ve 100 µM IPTG içeren sıvı besi ortamları hazırlanmış ve 8 kanallı pipet yardımıyla her bir kuyuda 200 µl olacak şekilde, besi ortamları steril mikropalakalara dağıtılmıştır. OD₆₀₀ değerleri bilinen klonlardan, her kuyucuğa OD₆₀₀ 0.05 olacak şekilde inoküle edilmiş ve 37°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 3-4 gün boyunca üreme durumları takip edilmiştir. Her bir tolerant klon için üremenin görüldüğü maksimum borik asit konsantrasyonu tespit edilmiştir.

2.5.3. Çizgi ekim

Çizgi ekim yöntemi, farklı katı besi ortamında üreyen kolonilere tek tek kürdan ile dokunularak katı besi ortamına çizgiler halinde ekilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte hazırlanan katı besi ortamı petrisinde, bakterilerin ekileceği yerler çizgiler şeklinde işaretlenmektedir. Ardından bu işaretler üzerinden kolonilerin ekimi, steril kürdan yardımı ile gerçekleştirilmektedir. Çizgi ekim yöntemi sonucunda borik asit içermeyen besi ortamında hedef kolonilerin çoğaltılması gerçekleştirilmekte, ayrıca, artan borik asit konsantrasyonları içeren katı besi ortamlarında ek bir seleksiyon sağlanmaktadır.

2.6. Plazmidlerde Yer Alan İnsert Bölgelerinin Sekanlanması ve Biyoinformatik Analizleri

Seleksiyon çalışmaları sonucunda borik asitin hedeflediği genleri içerdiği düşünülen klonların farklı konsantrasyonlarda üreme durumları onaylandıktan sonra, taşıdıkları plazmidlerin insertleri sekanslanmıştır. Bunun için öncelikle, yüksek borik asit konsantrasyonu içeren ortamlarda yaşayabilen klonlardan plazmid izolasyonu (GeneAll, CatNo:101-150) yapılmıştır. Hedef gen bölgesinin çoğaltılabilmesi için pCA24N plazmidinin gen bölgesini içerdiği kısımlara uygun forward ve reverse primerler dizayn edilmiştir. pCAF forward primeri olup, sekans dizisi 5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCACC-3' ve pCAR reverse primeri olup, sekans dizisi 5'-TTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAG-3' şeklindedir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle plazmidlerin içerdikleri genlerin varlığı

onaylandıktan sonra, plazmidlerin içerdikleri gen dizilerini tespit etmek amacıyla, hizmet alımı kalemiyle sekans yapılmıştır. pCAsq sekans primeri olup, 5'-CATTAAGAGGAGAAATTA ACTATGAGAGG-3' dizisine sahiptir. Sekans için tek yönlü primer yeterli olmaktadır. Sekans bilgisi elde edildikten sonra, BlastN, BlastX, String gibi paket programlar veya Ecocyc, GenomeJp, RegulonD, Uniprot vb veri tabanlarının yardımıyla, bulunan genler analiz edilmiş gen bilgileri elde edilmiştir.

2.7. Seçilen Klonların Proteomik Analizleri

Seçilen klonların, borik asit içeren ve içermeyen ortamlarda protein profilleri proteomik analizi ile araştırılmıştır. Bunun için klonlardan 2 tanesi seçilerek bu deneyler gerçekleştirilmiştir.

2.7.1. Protein izolasyonu ve saflaştırma işlemleri

Seçilen iki adet klon, LB-cm katı besi ortamına tek koloni ekim yapılmış, 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleştirilen hücrelerden tek koloniye steril kürdan ile dokunulmuş ve 5 mL LB-cm sıvı besi ortamına inoküle edilmiştir. 37°C 150 rpm çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, OD₆₀₀ 0.05'den başlatılacak şekilde, seçilen klonlar 200 mL LB besi ortamlarına inoküle edilmiş, tüm hücreler logaritmik faza gelene kadar büyütülmüştür. Bu aşamada hücreler borik asit içermeyen ve 90 mM borik asit içeren ortamlarda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler 10000 rpm'de, +4°C soğutmalı santrifüjde, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri, 2 kez soğuk PBS (Fosfat Buffer Saline) ile yıkandıktan sonra +4°C soğutmalı santrifüj ile çöktürülerek besi ortamlarından arındırılmış, hücre pelletleri elde edilmiştir. Kimyasal olarak parçalama işlemi için, 2D Rehidrasyon tamponu (8M Üre, 2M Tiyöüre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 Amfolit, %0.002 Bromofenol blue) hazırlanmıştır. Hücre pelletlerine 1 mL 2D Rehidrasyon tamponu eklenerek, homojen hale gelene kadar çözülmüştür. Ayrıca örnekler sonikasyona tabii tutulmuştur. Sonikasyon işlemi, 20 saniye 5 döngü yapılmıştır. Ardından, 10000

rpm'de +4°C soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, temiz ependorf tüplere aktarılarak, buz üzerine alınmıştır. Elde edilen protein özütleri, içerdiği tuzlar ve diğer uygun olmayan bileşenlerden uzaklaştırmak için TCA/Aseton presipitasyonu veya 2D Clean-up kit (Bio-Rad) ile temizlenmiştir. TCA/Aseton presipitasyonunda, protein özütlerine en az üç katı hacim olacak şekilde TCA/Aseton/DTT solüsyonu (%10 TCA (Trichloroacetic acid) ve %90 soğuk aseton içerisinde çözülmüş olan 20 mM DTT (Dithiothreitol)) ile muamele edilmiştir. Gece boyu -20°C'de tutulan örnekler, 15200 rpm +4°C soğutmalı santrifüjde 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant pelletten tamamen uzaklaştırılmıştır. Pellet, 500 µl soğuk aseton ile iki kez yıkanmıştır. Ardından pelletin üzerine, yaklaşık 200 µl 2D rehidrasyon tamponu eklenmiş ve tamamen çözüne kadar oda sıcaklığında vorteks yapılmıştır. 15200 rpm +4°C soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar steril ependorf tüplere alınmıştır.

2.7.2 Proteinlerin miktarının belirlenmesi

Protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçülmüştür (Bradford, 1976). Bu yöntemde ilk önce, BSA (bovine serum albumin) kullanılarak 0, 5, 10, 15, 20, 40 µg olacak şekilde standart eğri oluşturulmuştur. Konsantrasyonları bilinmeyen proteinlerden 10 µl alınarak, 1990 µl Bradford Boyası içerisine aktarılmıştır. 20 dakika inkübasyonun ardından, spektrofotometrede OD₅₉₅ değerleri ölçülmüştür. Standart eğriden elde edilen denkleme göre proteinlerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.7.3. SDS-PAGE yöntemi ile proteinlerin kalitesinin analizi

Konsantrasyonu belirlenen proteinlerin kalitesinden emin olmak için sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Kullanılan SDS-PAGE ayırma jeli %12'lik olacak şekilde hazırlanmıştır. 2 adet küçük jel için, 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)'den 3 mL, %40 poliakrilamid'den 3.6 mL, %10 SDS'ten 120 µl, %10 amonyumpersülfat (APS taze hazırlanmış)'tan 120 µl ve Temed'den 4.8 µl kullanılarak saf su ile 12 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu jel karışımı, dikey elektroforez camlarına aktarılmış ve donması beklenmiştir. Sıkıştırma (üst) jelin hazırlanması için ise 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)'den 750 µl, %40

poliakrilamidinden 382 µl, %10 SDS'ten 30 µl, %10 amonyumpersulfat (APS taze hazırlanmış)'tan 30 µl ve Temed'den 3 µl kullanılarak saf su ile 3 mL'ye tamamlanmıştır. Ayırma jelinin donduğundan emin olunduktan sonra, hazırlanan sıkıştırma jeli camlara aktarılmış ve hızlıca taraklar yerleştirilmiştir. Jeller tamamen donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Protein miktarı 20 µg olacak şekilde tüplerden çekilerek, 5 µl 6X SDS loading dye (Fermentas SM0431) ile karıştırılmıştır. Toplam hacim 15 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Tüplerin kapakları buharlaşmayı önlemek için parafilm ile sarılmıştır. Tüpler kaynayan suda 5 dakika bekletilip proteinler denatüre edildikten sonra, jele yüklenmiştir. Dikey elektroforez tankına 1X SDS yürütme tamponu (1X 25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS pH 8.3) eklenerek, 180 volt, 400 miliamperde yaklaşık 60 dakika, 6X loading dye jelin alt kısmına ulaşmaya kadar, yürütülmüştür. Jel camlardan ayrılmış, fiksasyon solüsyonuna (MeOH: 50 mL, asetik asit: 10 mL, saf su: 40 mL) alınmıştır. Orbital çalkalayıcıda 30 dakika çalkalandıktan sonra Coomassie Brilliant blue R-250 boyası ile 30 dakika boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jeller distile suya alınmış ve boyadan arınana kadar çalkalanmış ve gerektiğinde suyu değiştirilmiştir. Artık görünür hale gelen bantlar beyaz ışık altında fotoğraflanmıştır. Kaliteli protein özütleri elde edildiğinden emin olunduktan sonra 2D-PAGE deneylerine geçilmiştir.

2.7.4. Birinci boyutta ayırım

2D rehidrasyon tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş proteinler uygun pH aralıklarında seçilmiş IPG (immobilized pH gradient) striplere emdirilerek, izoelektrik noktalarına (pI) göre birinci boyutta ayrılmıştır. 7 cm boyutundaki pH 4-7 gradyan aralığına sahip IPG stripine (ReadyStrip BioRad, USA) yüklenecek karışım, steril eppendorf tüplerin içine her bir örnek için ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır. 100 µg proteine denk gelecek şekilde protein özütünden alınarak, protein çözünürlüğünü arttırmak ve proteinlerin tek alt ünite şeklinde analiz edilebilmesi için TBP (Tributylphosphine) ilave edilmiştir. Aynı zamanda stripe emdirilecek toplam hacmin %1'i kadar TBP, proteinlerin izoelektrik noktalarına göre hareketini arttırabilmek için, %1 oranında amfolit eklenmiştir. Bu karışım, rehidrasyon tablasına (tray) dikkatlice, hava kabarcığı olmayacak şekilde, trayin bir ucundan bir ucuna kadar eşit miktarda dağıtılmıştır. 7 cm pH 4-7 gradyan aralığına

sahip IPG strip, yerleştirilmiştir. Striplerin kurummasını ve örneğin buharlaşmasını engellemek için, striplerin üzerlerini kapatacak miktarda mineral yağ eklenmiştir. IPG striplerin proteini emebilmesi için, Pasif Rehidrasyon Programı kullanılmıştır. Herhangi bir voltaj uygulamadan, gece boyunca, yaklaşık olarak 13 saat 20°C sıcaklıkta proteinler stripe emdirilmiştir (BioRad, USA Protean IEF Cell).

Rehidrasyonu tamamlanan IPG stripler, odaklamaya alınmadan önce mineral yağdan arındırılmalıdır. Bunun için striplerin protein emdirilen kısmı hiçbir yere temas ettirmeden yukarı bakacak şekilde kurutma kağıdı üzerine alınmıştır ve burada fazla yağın kurutma kağıdına kısmen geçmesi sağlanmıştır. IPG stripler, temiz bir odaklama tablasına (tray) dikkatlice, uç kısımlarından pens ile tutularak, protein içeren kısım elektrotlarla temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Ayrıca trayin artı ve eksi kısımları stirpin artı ve eksi kısımlarıyla denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir. IPG striplerin uygulanacak voltajda elektrotlarla direkt temasını engellemek, böylece stripin olası yanma, zarar görme durumunu ortadan kaldırabilmek için, uygun büyüklükte kesilmiş ve pastörleşmiş kurutma kağıtları steril çift distile edilmiş suya batırılıp fazla suyu alındıktan sonra striplerle elektrotlar arasına yerleştirilmiştir. Daha sonra IPG striplerin üzerlerini kaplayacak şekilde mineral yağ eklenmiştir. Odaklama işleminde 20°C sıcaklıkta, artan voltaj değerleri uygulanmıştır. Odaklama programı, 7 cm IPG stripleri için; 250 Volt 20 dakika linear ramp, 4000 Volt 2 saat linear ramp, 40000 Volt V/H rapid ramp (IEF cell Protean BioRad) olacak şekilde üç basamaktan oluşmaktadır. Odaklama süresi örnekten örneğe değişiklik göstermektedir. 7 cm'lik striplerde bu süre 10-12 saat olabilmektedir. Odaklama sonrasında stripler equilibration tablasına alınarak, sırasıyla Equilibration Tampon I (6 M Üre, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 Gliserol, %2 (w/v) DTT), Tampon II (6 M Üre, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 Gliserol, %2.5 (w/v) Iodoasetamid) ve 1X SDS tamponuyla 15'er dakikalık sürelerle yıkanmıştır.

2.7.5. Proteinlerin ikinci boyutta ayrılması

Ayırma jeli olarak %12'lik poliakrilamid jel protokole göre hazırlanmış ve dökülerek polimerizasyonu beklenmiştir. Üst jel olarak, daha önce hazırlanmış, 1X SDS tampon çözeltisi içinde, %0.5'lik overlay agaroz jel, mikrodalga fırında iyice eritilmiş ve çok soğumasına izin verilmeden ayırma jelin üstüne pipet yardımıyla

camların bitiş seviyesine kadar eklenmiştir, hava kabarcığı oluşmasını önlemek için biraz taşırılmıştır. Agaroz jelin donmasına izin verilmeden, IPG stripi ve küçük bir parça kurutma kağıdına emdirilen 3 µl unstained protein markır (Fermentas, cat no SM0431) ve 3 µl 6X SDS loading dye (Fermentas, cat no SM0431) ayırma jeli ile overlay agaroz jelin temas ettiği noktaya, stripin başlangıç kısmına bir pens yardımıyla yerleştirilmiştir. IPG strip yerleştirilirken, stripe ve protein içeren bölgeye zarar vermeden uç kısmından tutularak, pH noktalarının başlangıç ve bitiş noktaları dikkate alınarak jele yüklenmiştir. Üst jel polimerleşinceye kadar, yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra, cam plakalar SDS tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez için, yürütücü tampon olarak 1X SDS tamponu (1X 25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) kullanılmış ve jeller 400 mA (maximum), 180 Voltta yaklaşık olarak 55 dakika kadar yürütülmüştür (BioRad, Mini Protean Tetra Cell). Daha sonra jeller camlardan ayrılarak etiketlemeleri yapılmış steril kaplara alınmıştır. Jellerdeki protein spotlarını görünür hale getirebilmek için jeller öncelikle fiksasyon solusyonuna (%50 metanol, %10 asetik asit) alınmış ve orbital çalkalayıcıda gece boyu (6-24 saat arası) çalkalanmıştır. Ardından, boyama işlemi için Colloidal Coomassie boyası (KeraFAST, Bloomoose) her bir jel için 4:1 (reagent I: reagent II) oranlarında taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır. Spotlar görünür hale gelene kadar 6-24 saat arası oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda jeller bekletilmiştir. Jellerdeki spotlar görünür hale geldikten sonra jelleri fazla boyadan arındırmak için temiz kaplara alınmış ve yaklaşık 15 dakika milipore su ile orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Fazla boyadan arındırılan jeller üzerindeki spotları sabitlemek ve daha belirgin hale getirmek için “intensifying” solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon için 1:4 oranında, Reagent II: milipore su hazırlanıp homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan bu solüsyon, jellerin üzerini kaplayacak kadar her bir jel üzerine koyulmuştur. Jeller orbital çalkalayıcıda, oda sıcaklığında bırakılmıştır. Görünür hale gelen protein spotlarının görüntülenmesi VersaDoc 4000 MP görüntüleme sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

2.7.6. Protein spotlarının kesimi, MALDI TOF-TOF analizi ve proteinlerin tanımlaması

İki boyutlu jeller kesime uğratılmadan önce görüntülenerek, jel görüntüleri karşılaştırılmıştır. Eşleşen protein spotları arasında spot yoğunluklarını gösteren grafikler teker teker el ile kontrol edilerek, aralarındaki regülasyon farklılığı gösteren protein spotları tespit edilmiştir. Protein spot kesimi için çeşitli basamaklar sonucu boyadan uzaklaştırılan jel parçaları içerisindeki proteinler, 10 ng/µl Tripsin enzimi ile kesilmiştir. Ardından, MALDI TOF-TOF analizi yapılmış ve kütle spektrumları Mascot protein tanımlama arama motoru kullanılarak tanımlanmıştır.

2.8. Tespit Edilen Genlerin Real-Time PCR (qPCR) Deneyleleri ile Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Deneysel aşamalar şu şekilde özetlenebilir: Hedef genler için primerler dizayn edilmiştir. Daha sonra, *E. coli* yabancı tip suşu farklı borik asit konsantrasyonu içeren LB-sıvı besi ortamlarında yetiştirilmiştir. Bu bakterilerden kit kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından, elde edilen toplam RNA'dan cDNA sentezi (Fermentas kiti kullanılarak) gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar ile genlere özgü primerler kullanılarak Real Time PCR deneyleleri yapılmış ve bu genlerin üç farklı Bor konsantrasyonundaki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

2.8.1. Primer dizaynı

Gen ekspresyon çalışmalarında tespit edilen bor ile ilgili aday genler ve sekans dizileri listelenmiştir. Bu genlere özgü primerler Primer 3 programı ile dizayn edilmiştir.

2.8.2. Hücre yetiştirilmesi

Escherichia coli kontrol suşunun ve seçilen klonların gliserol stoğundan LB besi ortamlarına tek koloni ekimleri yapılmıştır. 37°C'de bir gece inkübasyon sonrası,

kürdan ile tek koloniye dokunularak, 5 mL LB besi ortamına inoküle edilmiştir. Hücreler, 37°C’de çalkalamalı olarak (150 rpm) bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün spektrofotometre ile 600 nm’de ölçümleri yapılmıştır. Yetiştirilen hücreler, 5 mL’lik LB besi ortamlarına OD 0.1 olacak şekilde inoküle edildikten sonra OD 0.6’ya kadar 37°C’de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Bu hücreler, steril falkon tüplere aktararak 8000xg’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atıldıktan sonra, hücre pelletleri, borik asit içermeyen, 80 mM ve 90 mM borik asit içeren LB besi ortamlarında çözülmüştür. İlk olarak hücreler farklı zaman aralıklarında bor ile muamele edilmiştir. Hücreler, borik asit içeren LB besi ortamında 10 dakika, 30 dakika ve 60 dakika borik asite maruz bırakılmıştır. Böylelikle zamana bağlı gen ekspresyon seviyeleri analiz edilmesi için hücreler elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, hücrelerin 10 dakika içinde borik asite cevap verdiği gözlenmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurularak, suşlar borik asit içermeyen, 80 mM ve 90 mM borik asit içeren LB besi ortamlarında 10 dakika büyütüldükten sonra RNA izolasyonu için üç farklı bor konsantrasyonunda hücre pelletleri elde edilmiştir.

2.8.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

RNA izolasyonu, Ambion kiti (Thermo Scientific PureLink RNA Mini Kit #12183018A) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonun ardından, elde edilen RNA’ları, genomik DNA kontaminasyonundan arındırmak için *DNaseI* (Thermo Scientific) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından random heksamer primerler ile cDNA sentezleri (Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622) gerçekleştirilmiştir. Kontrol reaksiyonları olarak –RT reaksiyonları da deneylere dahil edilmiştir.

2.8.4. Real-Time PCR deneyleri

cDNA elde edildikten sonra, gen spesifik primerler ile Real-Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilerek, bu genlerin üç farklı Bor konsantrasyonundaki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak housekeeping genlerden 16rRNA gen bölgesine özgü primerler dizayn edilmiştir. Real-Time PCR reaksiyon karışımında,

2X SYBR Green master mix (Ampliçon #A323402), gen spesifik primerler ve template DNA kullanılmıştır. Final konsantrasyonlar, SYBR green mix için 1X, primerler için 0.05-0.5 µM arası, cDNA için 0.1-10 ng olacak şekilde reaksiyon mixleri hazırlanmıştır. 3 aşamalı Real-Time PCR programı kullanılmıştır. Hot start enzimin aktivasyonu için ilk önce 95°C’de 15 dakika 1 dõngü, ardından 3 aşamalı PCR programı; 95°C’de 30 saniye, 55-60°C’de (T_m sıcaklığı) 30 saniye ve 72°C’de 30 saniye 40 dõngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney sonrası alınan C_p değerleri ve melting eğrileri (T_m değerleri) değerlendirilmiştir. Burada genlerin ekspresyon seviyeleri hesaplanması için 2^{-ΔΔC_T} metodu kullanılmıştır (Livak vd., 2001).

2.9. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) Metabolomik Analiz Yöntemleri

E. coli kontrol suşu ve bor ile seleksiyon çalışmalarında yüksek borik asit içeren ortamlarda üreme gösteren klon olan, *E. coli* (pCA24N::*aceK*) suşunun metabolit ekstraksiyonu yapıldıktan sonra NMR metabolomik analiz yöntemleri ile metabolit profilleri çalışılmıştır.

2.9.1. Metabolit ekstraksiyonu

E. coli hücrelerinden metabolitlerin ekstraksiyonu için uygun bir yöntem Dr. Young Kee Chae’nin laboratuvarında geliştirilip optimize edilmiştir. Kontrol suşu ve seçilen tolerant klon aktifleştirildikten sonra tek koloniye dokunulup 100 mL LB besi ortamında çoğaltılmıştır. Bu hücrelerden 200 mL LB-cm içeren 4 farklı erlene OD₆₀₀ 0.05 olacak şekilde inokülasyonlar yapılmıştır. Hücreler, OD₆₀₀ 0.6’ya kadar büyütölmüş ve hücre pelletleri elde edilmiştir. Hücre pelletleri, borik asit içermeyen ve 3 farklı konsantrasyonda borik asit içeren LB-cm besi ortamlarına aktarılmıştır. Kontrol suşu için, 25 mM, 50 mM, 75 mM borik asit konsantrasyonları, seçilen klon için, 50 mM, 75 mM, 100 mM borik asit konsantrasyonları ve 100 µM IPTG kullanılmıştır. Bir saat boyunca 37°C 150 rpm’de çalkalamalı inkübasyonun ardından hücreler, +4°C soğutmalı santrifüjde 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj

edilmiştir. Hücrelerin besi ortamından arındırılması için iki kez 50 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. -80°C’de en az bir saat bekletilen hücre pelletlerinin, donduğundan emin olduktan sonra liyofilizasyon işlemine alınmıştır. Hücrelerin liyofilizatörde kurutulması esnasında, ultrafiltrasyon filtrelerini (Vivaspin 20; molekül ağırlığı geçirgenlik sınırı MWCO 3 KDa olan) membranda bulunan gliserolden arındırmak için, 10 mL ddH₂O eklenmiş ve oda sıcaklığında 4000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir.

PBS ile yıkanmış ve kurutulmuş olan hücre pelletleri üzerine, kaynatılmış 15 mL ddH₂O ilave edilerek, otoklavda 120°C’de 20 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Örnekler soğutulduktan sonra, 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek elde edilen süpernatant, parçalanmış hücre kalıntılarından ayrılmıştır. Toplanan süpernatant, Vivaspin20 (MWCO~3000 Da) ultrafiltrasyon ünitesine transfer edilerek, filtrenin üst kompartımanında 1 mL’den az hacim kalıncaya kadar +4°C 4000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Filtrenin alt kompartımanında toplanan ve suda çözülmüş metabolitleri içeren karışım, dondurularak liyofilizasyon yoluyla kurutulmuştur. Metabolitlerin miktarlarının belirlenmesi için, 1.5 mL’lik ependorf tüpler önce liyofilizatörde iyice kurutulmuş ve ağırlıkları hassas terazide belirlenerek tüplerin üzerlerine kaydedilmiştir. Daha sonra, kurutulmuş olan metabolit örnekleri üzerine 1 mL ddH₂O ilave edilerek örnekler çözülmüş ve ağırlıkları belirlenmiş olan 1.5 mL’lik ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekleri içeren ependorf tüpler dondurularak yeniden liyofilizasyon ile kurutulmuş ve metabolit karışımlarını içeren tüplerin ağırlıkları belirlenmiştir.

2.9.2. Metabolit ekstraktlarının tek boyutlu (1D) proton (¹H) NMR analizleri

Metabolit ekstraktlarının NMR spektrumları Prof. Dr. Young Kee Chae ve ekibi tarafından, Sejong Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Kimya Bölümü bünyesinde mevcut 500 MHz Bruker marka NMR spektrometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek boyutlu (1D) proton (¹H) NMR spektroskopisi yüksek sayıda örnek içeren (high-throughput) hücre ekstraktlarındaki metabolitlerin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. ¹H-NMR spektrumlarının proses edilmesi, metabolitlerin ve konsantrasyonlarının belirlenmesi Chenomx NMR Suite 8.4 (ChenomX Inc., Edmonton, AB, Canada) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örnekler D₂O içerisinde hazırlanmıştır. Çözeltide 10 mM sodyum fosfat pH 7.0, 0.5 mM DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid), 0.5 mM NaN₃, 0.5 mM DFTMP bulunmaktadır. DFTMP pH indikatörü olarak kullanılmıştır (Reily vd., 2006). NMR'da XYZ gradient kapasiteli, Bruker triple resonance (¹H, ¹³C, ¹⁵N) 5 mm TXI prob kullanılmıştır. 5 mm'lik NMR tüpleri kullanılmıştır. ¹H NMR verilerinin kaydedilmesinde NOESYPR1D (1D Nuclear Overhauser effect spectroscopy with water pre-saturation) pulse programı kullanılmıştır. Kaydedilen her bir spektrum 48076 kompleks data noktasının 32 tekrarını içermektedir. Spektral genişlik 6009.6 Hz'dir. Metabolit konsantrasyonlarının belirlenmesinde, 0.5 mM DSS internal kimyasal kayma standartı olarak kullanılmıştır.

2.9.3. NMR metabolomik verilerin çok değişkenli istatistiksel yöntemler ile analizi

NMR metabolomik verilerin analizinde, borik asit varlığında ve yokluğunda kontrol suşu ve tolerant geni içeren *Escherichia coli* suşlarından elde edilen metabolit profillerindeki farklılıkları belirlemek için MetaboAnalyst 3.0 programı (<https://www.metaboanalyst.ca>) (Xia ve Wishart 2016) kullanılmıştır. Metabolitlerin borik asite karşı cevaplarını değerlendirmek için, PCA (temel bileşenler analizi) ve PLS-DA (kısmi en küçük kareler diskriminant analizi) gibi çok değişkenli veri analizleri gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR VE İRDELEME

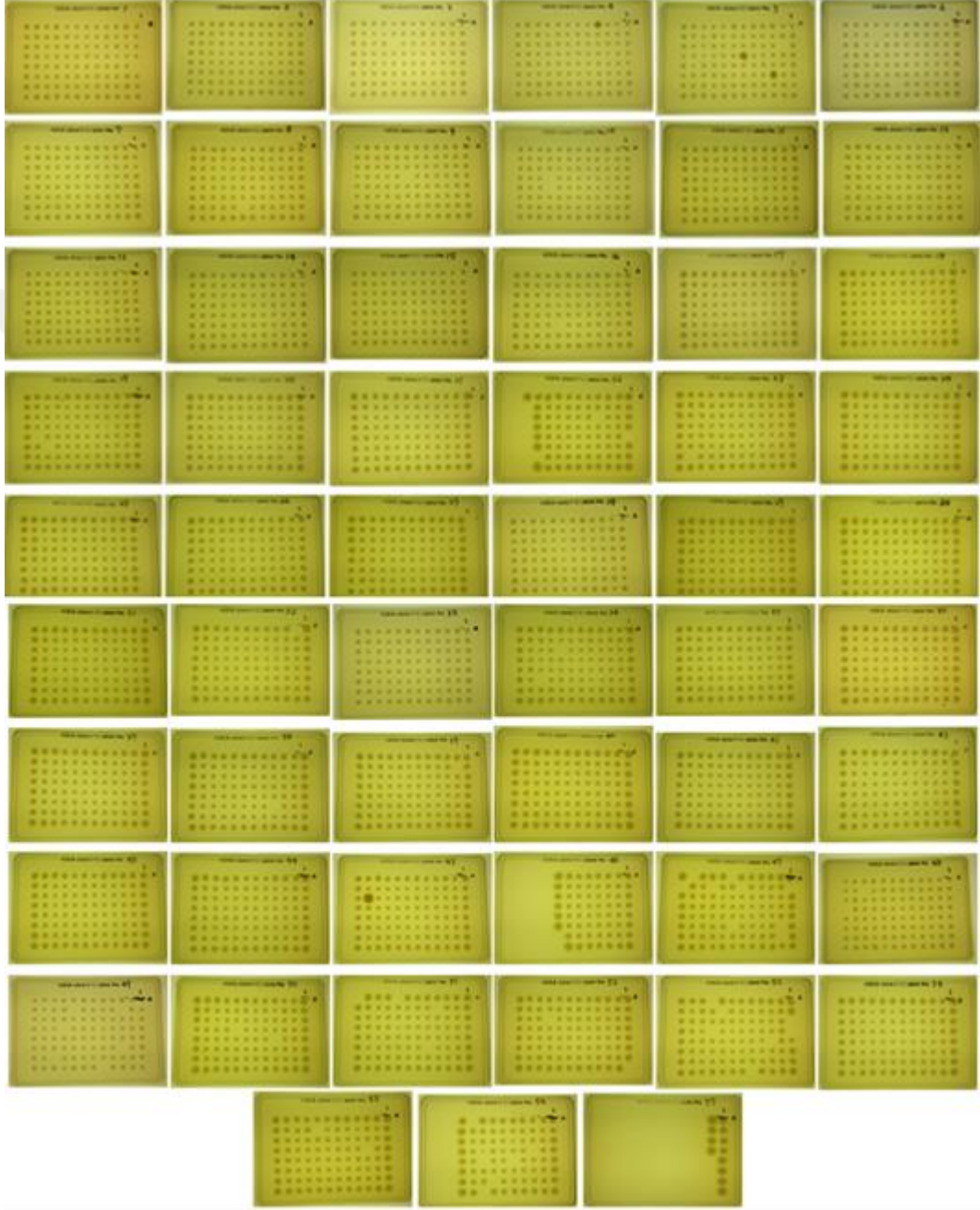
Bu çalışmada ASKA klon setinde yer alan 4123 adet klonun bor ile ilişkisi araştırılmıştır. İlk aşamada, her bir klon farklı borik asit konsantrasyonları içeren besi ortamlarında, iki farklı IPTG konsantrasyonunda genom boyu tarama deneylerine tabii tutulmuştur. Taramalar sonucu elde edilen, yüksek bor içeren ortamlarda üreme gösteren klonlar onaylama çalışmalarına alınmış ve göreceli olarak en yüksek bor toleransı gösteren klonlar belirlenmiştir. Bu klonlardan iki adet seçilerek iki boyutlu jel elektroforezi deneyleri yapılmıştır. Artan bor konsantrasyonunda regülasyon farklılığı gösteren protein spotları belirlenmiştir. Aynı zamanda, bor ile ilişkili olduğu düşünülen genlere özgü primerler dizayn edilmiş ve Real-Time PCR yöntemi ile mRNA seviyelerindeki artış değerlendirilmiştir. Son olarak kontrol suşu ile birlikte bir adet klonun metabolit ekstraksiyonu elde edilmiş ve ¹H-NMR yapılmıştır. Artan bor konsantrasyonlarında metabolit profolindeki değişimler izlenmiştir. Bu bölümde elde edilen bulgular detaylıca anlatılmıştır.

3.1. ASKA Klon Seti ile Yapılan Genom Boyu Tarama ve Onaylama Çalışmaları

Genom boyu tarama deneylerine başlamadan önce ASKA klon setinin stok alınması gerçekleştirilmiştir. Ardından optimizasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre genom boyu tarama deneylerinde kullanılacak olan konsantrasyonlara karar verilmiştir.

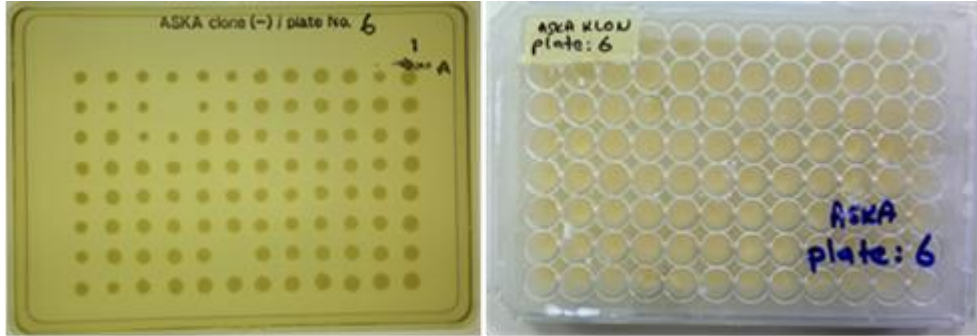
3.1.1. ASKA klon setinin canlandırılması ve stokların alınması

ASKA Klon Seti Japonya'dan temin edilmiştir. Bu klonlar, her bir petride en fazla 96 adet olmak üzere, 57 adet petri halinde laboratuvarımıza ulaşmış ve her bir petrinin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.1.).



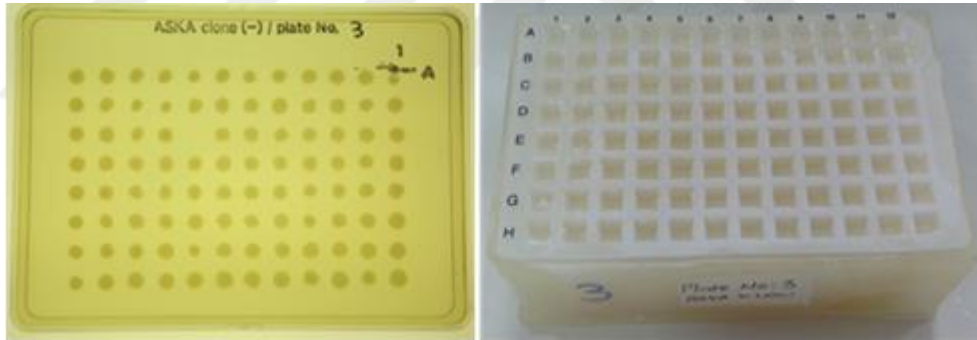
Şekil 3.1. ASKA klon setine ait 57 adet petrinin fotoğrafları

Laboratuvarımıza ulaşan bu setin stokları alınmıştır. İlk olarak, 400 µl'lik mikroplakalarda 200 µl'lik gliserol stokları alınmış ve dondurulmuştur (Şekil 3.2.). Bu stok ile tarama çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.2. Mikroplakalarda alınan stoklara bir örnek

Ardından, “deep well plate”lerde toplam hacim 1 mL olacak şekilde gliserol stoğu alınmış ve dondurulmuştur (Şekil 3.3.). Bu stoklar -80°C’de muhafaza edilmiş ve çalışmalarda kullanılmamıştır. Herhangi bir durumda steril stok yenilemelerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 3.3. Deep well platelerde alınan stoklara bir örnek

Son olarak, 4123 adet klonun 2 mL’lik ependorf tüplerde tekli stokları alınmıştır. Onaylama çalışmaları ve diğer tüm deneyler için, seçilen klonların canlandırması bu tüplerden yapılmıştır (Şekil 3.4.).

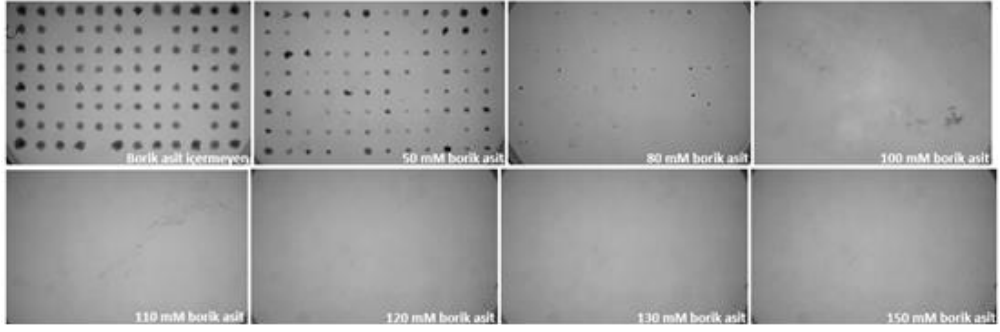


Şekil 3.4. 2 mL'lik ependorflarda alınan stoklara bir örnek

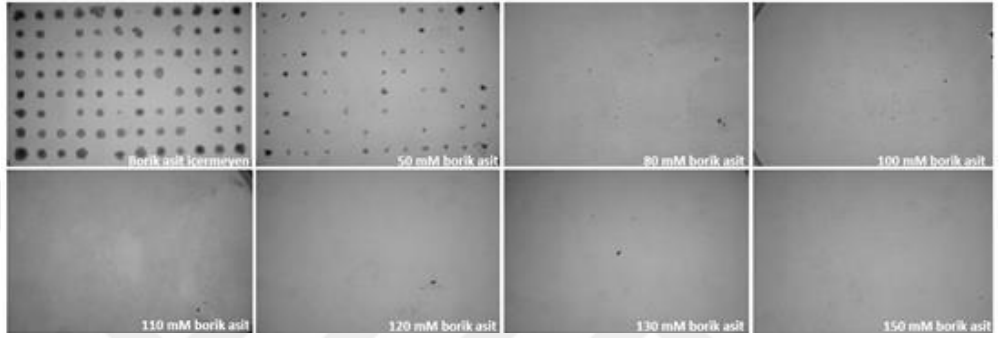
Stok alma işlemi tamamlandıktan sonra, genom boyu tarama çalışmaları için optimizasyon deneylerine geçilmiştir.

3.1.2. IPTG konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan optimizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar

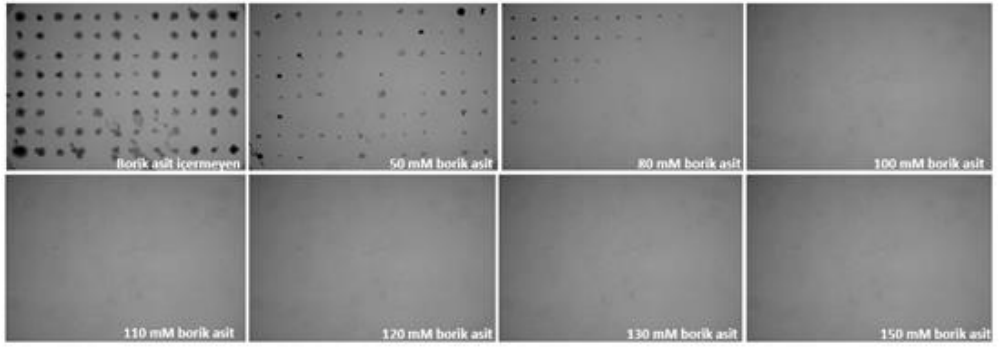
Genom boyu tarama çalışmalarına başlamadan önce, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarımız sonucu, *E. coli* DH10b ve *E. coli* DH5a gibi suşların bor toleransının 60 mM ile 80 mM arası borik asit konsantrasyonlarında olduğu belirlenmiştir. pACYCDuet1 plazmidi içeren DH10b suşları da LB-cm-borik asit içeren besi ortamlarında 80 mM - 90 mM borik asit civarı bor toleransına sahiptir. Ancak, ASKA klon suşlarının bor tolerans değerleri bilinmediğinden, bu suşların tolerans değerlerini belirlemek için optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Bor tolerans değerlerini ortalama olarak tespit etmek ve IPTG konsantrasyonuna karar vermek amacıyla, 49 numaralı ASKA Klon plakası ile deneyler yapılmıştır. Bunun için farklı borik asit konsantrasyonu (borik asit içermeyen ve 50 mM, 80 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 150 mM) ve farklı IPTG konsantrasyonları (IPTG içermeyen ve 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM) içeren LB-cm besi ortamlarında klonların üreme durumları değerlendirilmiştir (Şekil 3.5.- Şekil 3.9.).



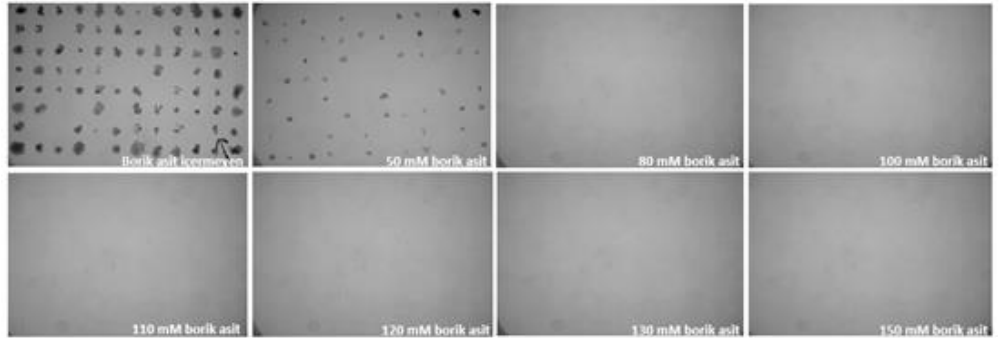
Şekil 3.5. IPTG içermeyen ve borik asit içermeyen (0)-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları



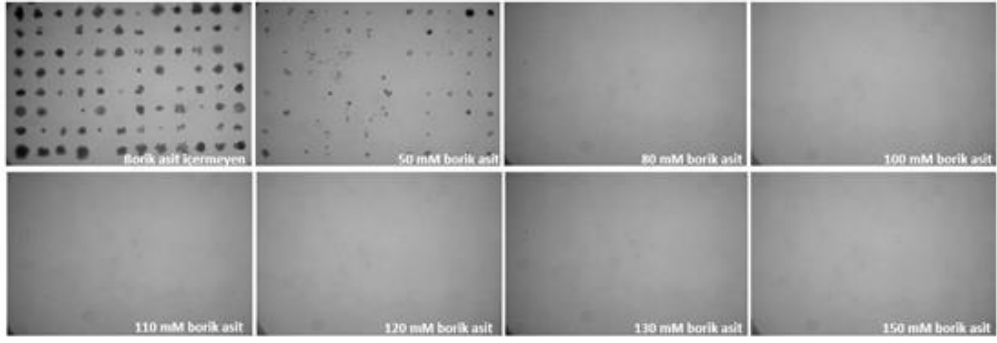
Şekil 3.6. 50 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları



Şekil 3.7. 100 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları



Şekil 3.8. 250 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları

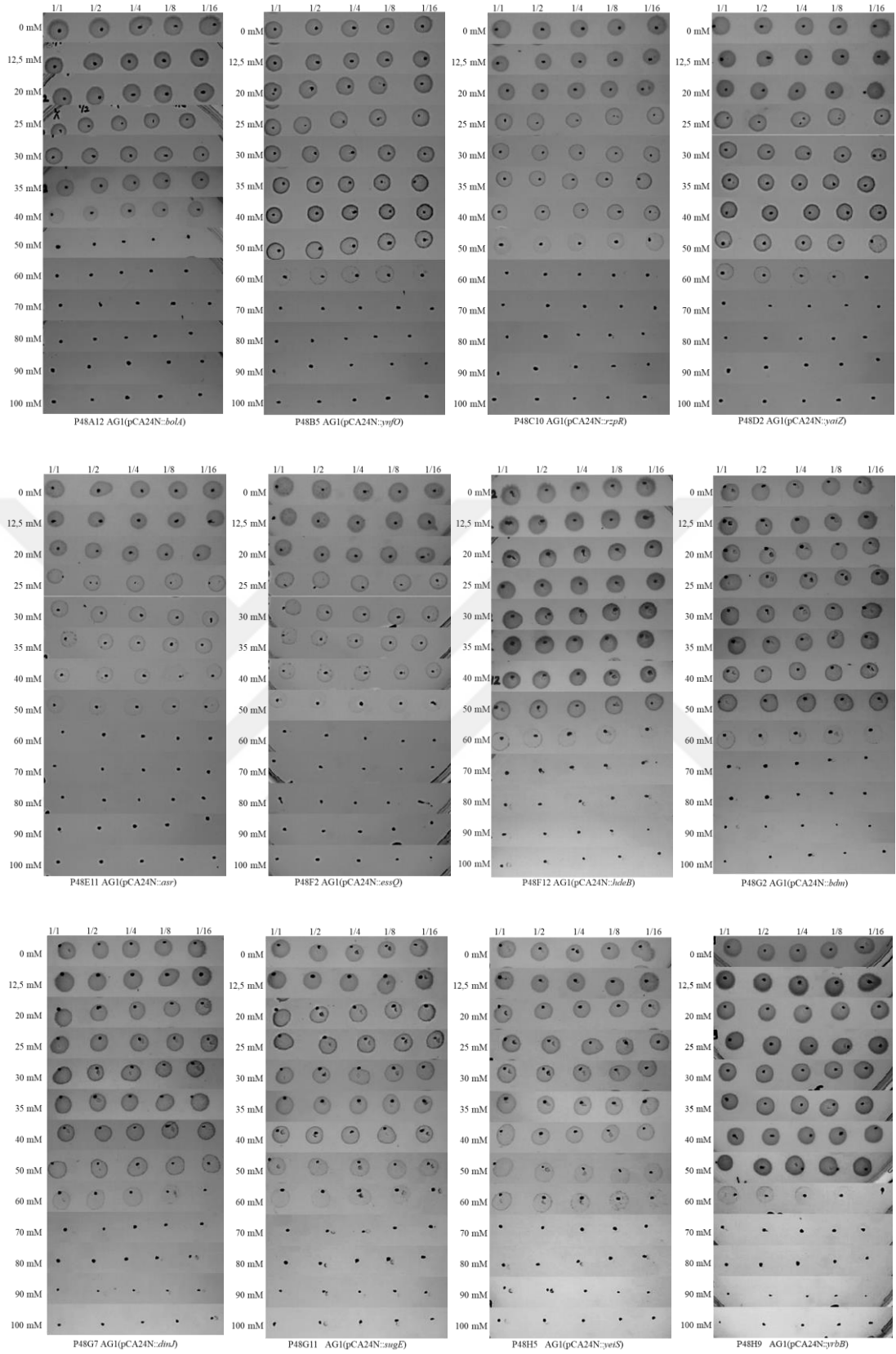


Şekil 3.9. 500 µM IPTG içeren ve 0-50-80-100-110-120-130-150 mM borik asit içeren içeren ortamlarda 49 numaralı plakadaki klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları

49 numaralı plate için sonuçlar değerlendirildiğinde, 250 µM ve 500 µM IPTG içeren besi ortamlarında üreme potansiyelinin azaldığı görülmüştür. Sonuçta, 50 µM ve/veya 100 µM IPTG konsantrasyonlarının uygun olduğuna karar verilmiştir. Fakat borik asit konsantrasyon aralıklarının çok geniş olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, bor tolerans nokta testi deneyi ile daha dar aralıklarda borik asit konsantrasyonlarının denenmesine karar verilmiştir.

3.1.3. ASKA klonların bor tolerans değerlerinin belirlenmesi için yapılan optimizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar

Buradaki amacımız seleksiyon kriteri olan borik asit konsantrasyonunun net olarak belirlenmesidir. Bu çalışmada, borik asit içermeyen ve 12.5 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM borik asit içeren LB-cm besi ortamları kullanılmıştır. IPTG konsantrasyonunun, (önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre) 100 µM olmasına karar verilmiştir. 48 numaralı plakadan rastgele 12 adet klon seçilmiş (A12-*bola*, B5-*ynfO*, C10-*rzpR*, D2-*yaiZ*, E11-*asr*, F2-*essQ*, F12-*hdeB*, G2-*bdm*, G7-*dinJ*, G11-*sugE*, H5-*yeiS*, H9-*yrbB*) ve bor tolerans nokta testi yapılmıştır. 37°C'de 3-5 gün arası inkübasyonunun ardından üremeler değerlendirilmiştir (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. 48 numaralı plakadan rastgele seçilen klonlarının bor tolerans nokta testi sonuçları

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde 60 mM borik asit içeren besi ortamlarında üremelerin azaldığı, 70 mM borik asit içeren besi ortamlarında ise üremenin durduğu gözlenmiştir. Bu nedenle tolerant klonların seçilebilmesi için bu konsantrasyonlardan daha yüksek olan 80 ve 90 mM borik asit içeren ortamlarda seleksiyon çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

3.1.4. 100 μ M IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-100) deneylerinin sonuçları

Yapılan optimizasyon deneyleri sonucu borik asit ile seleksiyon, 80 mM ve 90 mM borik asit içeren ortamlarda yapılmıştır. Plazmidde yer alan fazla genin ifadesi için de 100 μ M IPTG kullanılması uygun görülmüştür.

Gece boyu sıvı besi ortamında aktifleştirilen suşların OD₆₀₀ ölçümleri mikropılaka okuyucu ile yapılmıştır (Şekil 3.11.).

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.2460	0.2219	0.2096	0.2194	0.2145	0.2111	0.2269	0.2321	0.2271	0.2423	0.0556	0.0598
B	0.2398	0.1717	0.1909	0.1968	0.2161	0.0528	0.1817	0.1874	0.1756	0.2044	0.2210	0.2423
C	0.0498	0.2200	0.0831	0.1939	0.2008	0.1216	0.1976	0.0507	0.2053	0.0618	0.1862	0.2222
D	0.0516	0.2470	0.1850	0.2323	0.1983	0.2342	0.1156	0.0567	0.2198	0.1971	0.1926	0.2164
E	0.2359	0.1912	0.0798	0.0536	0.2071	0.2391	0.1928	0.2259	0.1882	0.1884	0.1973	0.2072
F	0.2383	0.1983	0.1914	0.2261	0.2262	0.0502	0.1988	0.1906	0.1166	0.1837	0.1969	0.2199
G	0.2530	0.0963	0.2044	0.2153	0.1960	0.2194	0.0741	0.2029	0.1931	0.1999	0.1844	0.2407
H	0.2835	0.0712	0.2479	0.2377	0.2246	0.2204	0.2278	0.2273	0.2280	0.2158	0.0533	0.2395

■ üremedi 1
■ boş 18

Şekil 3.11. 9 numaralı plakada yer alan klonların OD₆₀₀ değerleri

Herbir kuyudaki üremeler kontrol edilmiş, üreme göstermeyen klonlar not edilmiştir. Ardından, borik asit içermeyen, 80 mM ve 90 mM borik asit ve 100 μ M IPTG içeren LB-cm besi ortamlarında seleksiyon yapılmıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. 100 μ M IPTG ve sırasıyla borik asit içermeyen, 80 ve 90 mM borik asit içeren besi ortamlarında 21 numaralı plakada yer alan klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları

80 mM ve 90 mM borik asit içeren besi ortamlarında üreme gösteren klonlar not edilmiştir. 90 mM borik asit içeren besi ortamlarında üreme gösteren klonlara öncelik verilmiş ve onaylama çalışmalarına alınmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. 90 mM borik asit içeren ortamda üreme gösteren klonların lokasyon ve gen isimleri

lokasyon ve gen adı	lokasyon ve gen adı	lokasyon ve gen adı
P1A12 <i>ftsZ</i>	P34G8 <i>aceK</i>	P52H8 <i>yddV</i>
P4B8 <i>yaiB</i>	P36G9 <i>yifB</i>	P54A5 <i>eptA</i>
P4C4 <i>lacI</i>	P36H4 <i>rfaQ</i>	P54C5 <i>menD</i>
P4H3 <i>lacA</i>	P37A8 <i>yjcF</i>	P54D7 <i>recQ</i>
P14D5 <i>stfQ</i>	P40C6 <i>yicC</i>	P54H1 <i>ygcU</i>
P14F7 <i>mall</i>	P40D6 <i>dinD</i>	P54H12 <i>ptsA</i>
P14H12 <i>gdhA</i>	P40F3 <i>sgbE</i>	P55H12 <i>ydiA</i>
P15B6 <i>hisC</i>	P40F8 <i>yieH</i>	P56A2 <i>yfcT</i>
P15B8 <i>cobT</i>	P40G7 <i>yidP</i>	P56A4 <i>ccmH</i>
P15D11 <i>wcaI</i>	P44B5 <i>yiaL</i>	P56A6 <i>arsB</i>
P15G12 <i>gatD</i>	P44B6 <i>yibL</i>	P56A7 <i>yeiQ</i>
P15H9 <i>wbbI</i>	P44C7 <i>rpoZ</i>	P56B5 <i>hcaT</i>
P16B9 <i>chaC</i>	P44F3 <i>yhjR</i>	P56C5 <i>ydeE</i>
P17A7 <i>ydcD</i>	P44G9 <i>yieI</i>	P56E4 <i>paalE</i>
P18E11 <i>znuC</i>	P45F10 <i>ulaB</i>	P56E6 <i>ybfM</i>
P19D8 <i>yegK</i>	P45F12 <i>cybC</i>	P56F10 <i>pqqL</i>
P19D9 <i>flgB</i>	P48B7 <i>chpS</i>	P56F4 <i>ugpC</i>
P19E7 <i>wcaF</i>	P48F10 <i>yndE</i>	P56G5 <i>yeiT</i>
P23E11 <i>tklB</i>	P48G2 <i>bdm</i>	P56H10 <i>yehI</i>
P34D4 <i>yhiJ</i>	P50B12 <i>ymfP</i>	P56H7 <i>rtm</i>
P34D8 <i>thiC</i>	P52B3 <i>yeeY</i>	

3.1.5. Bor tolerans nokta testi sonuçları

Genom boyu tarama deneyleri sonucu tespit edilen 62 adet klon borik asit içermeyen ve 40 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM borik asit içeren LB-cm 100 µM IPTG içeren besi ortamlarında bor tolerans nokta testine tabii tutulmuştur. Üremeleri değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Bor tolerans nokta testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Gen adı	0mM	40mM	60mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM	130mM
<i>ftsZ</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yaiB</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>lacI</i>	*****	*****	***▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-
<i>lacA</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲-	▲-	▲-	▲-	-----	-----
<i>stfQ</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>malI</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>gdhA</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>hisC</i>	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>cobT</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-
<i>wcaI</i>	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>gatD</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-
<i>asr</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>wbbI</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>chaC</i>	*****	*****	*****	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>ydcD</i>	▲▲-	▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>znuC</i>	*****	*****	*****	*****	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yegK</i>	*****	*****	▲▲▲-	-▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>flgB</i>	*****	*****	▲▲▲-	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>wcaF</i>	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>tktB</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yhiJ</i>	*****	*****	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>thiC</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>aceK</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-
<i>yifB</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>rfaQ</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲▲-
<i>yjcF</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-
<i>yicC</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>dinD</i>	*****	▲▲-	▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>sgbE</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yieH</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yidP</i>	*****	*****	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>viaL</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yibL</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>rpoZ</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yhjR</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yieI</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>asr</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>ulaB</i>	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>cybC</i>	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>chpS</i>	*****	*****	▲▲▲-	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>ymdE</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----
<i>bdm</i>	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----
<i>ymfP</i>	*****	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yeeY</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----
<i>yddV</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----
<i>eptA</i>	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>menD</i>	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>recQ</i>	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-	▲▲-
<i>ygcU</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----
<i>ptsA</i>	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲▲
<i>ydiA</i>	▲▲▲▲	▲▲▲▲	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yfcT</i>	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Çizelge 3.2.^{devamı} Bor tolerans nokta testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Gen adı	0mM	40mM	60mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM	130mM
<i>ccmH</i>	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>arsB</i>	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yeiQ</i>	*****	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>hcaT</i>	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>ydeE</i>	*****	*****	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----
<i>paaE</i>	*****	*****	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----
<i>ybfM</i>	*****	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>pqqL</i>	*****	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑-	↑↑↑↑-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>ugpC</i>	*****	*****	*****	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----
<i>yeiT</i>	*****	↑↑↑↑-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yehI</i>	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>rtn</i>	↑↑↑↑↑	↑↑↑-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>asr kont</i>	*****	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
kontrol	*****	*****	↑↑↑↑↑	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Bor tolerans nokta testi sonucu 62 adet klondan 17 tanesi, 90 mM üzeri borik asit konsantrasyonunda üreme göstermiştir. Bu klonların plazmidlerinde yer alan gen isimleri, *lacI*, *lacA*, *cobT*, *gatD*, *aceK*, *rfaQ*, *yjcF*, *ymdE*, *bdm*, *yeeY*, *yddV*, *recQ*, *ycgU*, *ptsA*, *ydeE*, *paaE* ve *ugpC* dir.

3.1.6. MIC sonuçları

Bor tolerans nokta testi deneyleri devam ederken 62 adet klonun MIC testi yapılmıştır. Klonların borik asit içermeyen ve 40 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM borik asit içeren ortamlarda üremeleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.13.).

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P1A12	AG1(pCA24N:: <i>ftsZ</i>)	A	0,567	0,111	0,066	0,056	0,06	0,059	0,057	0,059	0,058	0,061	0,06	0,063	595
P4B8	AG1(pCA24N:: <i>yaiB</i>)	B	0,615	0,227	0,191	0,163	0,106	0,086	0,087	0,075	0,076	0,071	0,072	0,082	595
P4C4	AG1(pCA24N:: <i>lacI</i>)	C	0,446	0,251	0,219	0,212	0,202	0,212	0,19	0,189	0,168	0,153	0,116	0,106	595
P4H3	AG1(pCA24N:: <i>lacA</i>)	D	0,641	0,226	0,201	0,156	0,14	0,132	0,128	0,129	0,124	0,121	0,1	0,101	595
P14D5	AG1(pCA24N:: <i>stfQ</i>)	E	0,588	0,152	0,125	0,071	0,066	0,067	0,062	0,065	0,061	0,06	0,061	0,064	595
P14F7	AG1(pCA24N:: <i>malD</i>)	F	0,415	0,196	0,133	0,072	0,063	0,064	0,067	0,063	0,059	0,06	0,062	0,066	595

Şekil 3.13. MIC testi sonuçları

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P14H12	AG1(pCA24N:: <i>gdhA</i>)	A	0,223	0,121	0,079	0,066	0,061	0,058	0,064	0,062	0,067	0,058	0,063	0,062	595
P15B6	AG1(pCA24N:: <i>hisC</i>)	B	0,331	0,15	0,109	0,075	0,078	0,071	0,066	0,064	0,068	0,063	0,068	0,067	595
P15B8	AG1(pCA24N:: <i>cobT</i>)	C	0,362	0,152	0,107	0,113	0,09	0,087	0,079	0,074	0,072	0,071	0,069	0,071	595
P15D11	AG1(pCA24N:: <i>wcaD</i>)	D	0,287	0,15	0,084	0,087	0,078	0,078	0,079	0,069	0,075	0,076	0,072	0,067	595
P15G12	AG1(pCA24N:: <i>gatD</i>)	E	0,517	0,216	0,137	0,153	0,092	0,099	0,095	0,09	0,074	0,072	0,071	0,067	595
P48E11	AG1(pCA24N:: <i>asr</i>)	F	0,514	0,175	0,143	0,083	0,075	0,06	0,07	0,068	0,059	0,07	0,067	0,069	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P15H9	AG1(pCA24N:: <i>wbbD</i>)	A	0,366	0,27	0,144	0,059	0,058	0,064	0,057	0,059	0,06	0,056	0,061	0,063	595
P16B9	AG1(pCA24N:: <i>chaC</i>)	B	0,478	0,189	0,118	0,079	0,057	0,055	0,055	0,061	0,054	0,054	0,056	0,055	595
P17A7	AG1(pCA24N:: <i>ydcD</i>)	C	0,483	0,16	0,085	0,048	0,042	0,045	0,041	0,046	0,044	0,044	0,047	0,049	595
P18E11	AG1(pCA24N:: <i>znuC</i>)	D	0,429	0,116	0,118	0,064	0,063	0,056	0,053	0,052	0,052	0,06	0,053	0,058	595
P19D8	AG1(pCA24N:: <i>yegK</i>)	E	0,477	0,158	0,114	0,064	0,06	0,058	0,057	0,053	0,054	0,064	0,058	0,058	595
P19D9	AG1(pCA24N:: <i>flgB</i>)	F	0,682	0,18	0,122	0,074	0,058	0,056	0,054	0,052	0,05	0,058	0,05	0,042	595
P19E7	AG1(pCA24N:: <i>wcaE</i>)	G	0,51	0,135	0,086	0,058	0,057	0,053	0,055	0,055	0,052	0,057	0,055	0,058	595
P23E11	AG1(pCA24N:: <i>tktB</i>)	H	0,514	0,167	0,113	0,075	0,067	0,063	0,065	0,061	0,064	0,075	0,064	0,058	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P34D4	AG1(pCA24N:: <i>yhiJ</i>)	A	0,52	0,207	0,138	0,112	0,096	0,095	0,093	0,084	0,089	0,098	0,087	0,083	595
P34D8	AG1(pCA24N:: <i>thiC</i>)	B	0,508	0,285	0,219	0,108	0,064	0,06	0,06	0,053	0,057	0,057	0,057	0,058	595
P34G8	AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>)	C	0,623	0,326	0,315	0,301	0,241	0,219	0,198	0,176	0,182	0,189	0,169	0,173	595
P36G9	AG1(pCA24N:: <i>yijB</i>)	D	0,482	0,174	0,147	0,112	0,061	0,064	0,057	0,052	0,05	0,052	0,056	0,057	595
P36H4	AG1(pCA24N:: <i>rfaQ</i>)	E	0,609	0,221	0,194	0,146	0,13	0,123	0,107	0,082	0,083	0,099	0,085	0,081	595
P37A8	AG1(pCA24N:: <i>yjcF</i>)	F	0,44	0,204	0,166	0,143	0,136	0,123	0,112	0,099	0,098	0,102	0,097	0,103	595
P40C6	AG1(pCA24N:: <i>yicC</i>)	G	0,755	0,2	0,15	0,063	0,053	0,054	0,053	0,052	0,053	0,055	0,053	0,052	595
P40D6	AG1(pCA24N:: <i>dinD</i>)	H	0,313	0,069	0,062	0,061	0,062	0,06	0,058	0,056	0,058	0,057	0,058	0,054	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P40F3	AG1(pCA24N:: <i>sgbE</i>)	A	0,489	0,095	0,064	0,062	0,06	0,062	0,059	0,055	0,057	0,062	0,057	0,052	595
P40F8	AG1(pCA24N:: <i>yieH</i>)	B	0,624	0,172	0,126	0,097	0,073	0,069	0,07	0,052	0,061	0,084	0,059	0,057	595
P40G7	AG1(pCA24N:: <i>yidP</i>)	C	0,62	0,295	0,216	0,124	0,057	0,055	0,055	0,052	0,051	0,058	0,054	0,054	595
P44B5	AG1(pCA24N:: <i>yiaL</i>)	D	0,507	0,099	0,072	0,058	0,055	0,051	0,054	0,05	0,053	0,064	0,054	0,056	595
P44B6	AG1(pCA24N:: <i>yibL</i>)	E	0,473	0,166	0,135	0,062	0,055	0,051	0,058	0,049	0,051	0,053	0,051	0,053	595
P44C7	AG1(pCA24N:: <i>rpoZ</i>)	F	0,414	0,157	0,12	0,052	0,049	0,05	0,052	0,048	0,048	0,052	0,051	0,052	595
P44F3	AG1(pCA24N:: <i>yhiR</i>)	G	0,438	0,168	0,099	0,072	0,067	0,055	0,056	0,054	0,05	0,058	0,054	0,056	595
P44F9	AG1(pCA24N:: <i>yieI</i>)	H	0,616	0,311	0,126	0,107	0,088	0,062	0,051	0,051	0,049	0,049	0,049	0,062	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P45F10	AG1(pCA24N:: <i>ulaB</i>)	A	0,648	0,147	0,142	0,073	0,061	0,059	0,058	0,061	0,061	0,06	0,06	0,06	595
P45F12	AG1(pCA24N:: <i>cybC</i>)	B	0,591	0,055	0,057	0,053	0,052	0,057	0,052	0,049	0,049	0,05	0,049	0,055	595
P48B7	AG1(pCA24N:: <i>chpS</i>)	C	0,929	0,327	0,2	0,134	0,081	0,075	0,07	0,061	0,058	0,058	0,055	0,06	595
P48F10	AG1(pCA24N:: <i>ymdE</i>)	D	0,665	0,242	0,176	0,15	0,128	0,099	0,088	0,067	0,067	0,057	0,056	0,06	595
P48G2	AG1(pCA24N:: <i>bdm</i>)	E	0,912	0,28	0,227	0,153	0,128	0,098	0,086	0,089	0,071	0,07	0,061	0,066	595
P50B12	AG1(pCA24N:: <i>ympP</i>)	F	0,79	0,162	0,102	0,084	0,045	0,046	0,045	0,043	0,048	0,046	0,045	0,048	595
P52B3	AG1(pCA24N:: <i>yeeY</i>)	G	0,974	0,382	0,272	0,195	0,098	0,093	0,074	0,084	0,066	0,066	0,066	0,065	595
P52H8	AG1(pCA24N:: <i>yddV</i>)	H	0,907	0,284	0,215	0,201	0,171	0,144	0,143	0,135	0,104	0,103	0,087	0,096	595

Şekil 3.13. devam MIC testi sonuçları

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P54A5	AG1(pCA24N:: <i>eptA</i>)	A	0,65	0,168	0,11	0,096	0,048	0,048	0,047	0,049	0,049	0,051	0,052	0,053	595
P54C5	AG1(pCA24N:: <i>menD</i>)	B	0,756	0,162	0,148	0,068	0,052	0,053	0,052	0,051	0,049	0,052	0,05	0,057	595
P54D7	AG1(pCA24N:: <i>recQ</i>)	C	0,891	0,428	0,369	0,288	0,177	0,121	0,12	0,117	0,118	0,117	0,11	0,104	595
P54H1	AG1(pCA24N:: <i>ycgU</i>)	D	0,888	0,292	0,27	0,258	0,192	0,228	0,11	0,091	0,074	0,075	0,076	0,054	595
P54H12	AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>)	E	0,775	0,226	0,226	0,206	0,158	0,133	0,128	0,126	0,108	0,106	0,115	0,108	595
P55H12	AG1(pCA24N:: <i>ydiA</i>)	F	0,802	0,255	0,15	0,107	0,052	0,047	0,049	0,045	0,046	0,049	0,045	0,049	595
P56A2	AG1(pCA24N:: <i>yjcF</i>)	G	0,853	0,194	0,131	0,136	0,062	0,05	0,05	0,048	0,049	0,046	0,05	0,052	595
P56A4	AG1(pCA24N:: <i>ccmH</i>)	H	0,63	0,135	0,107	0,053	0,045	0,045	0,045	0,045	0,046	0,047	0,049	0,05	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P56A6	AG1(pCA24N:: <i>arsB</i>)	A	0,595	0,146	0,117	0,121	0,093	0,047	0,047	0,047	0,046	0,047	0,049	0,051	595
P56A7	AG1(pCA24N:: <i>yeiQ</i>)	B	0,619	0,202	0,165	0,106	0,064	0,061	0,057	0,05	0,057	0,056	0,054	0,058	595
P56B5	AG1(pCA24N:: <i>hcaT</i>)	C	0,466	0,127	0,169	0,101	0,051	0,05	0,046	0,046	0,045	0,044	0,046	0,047	595
P56C5	AG1(pCA24N:: <i>ydeE</i>)	D	0,624	0,306	0,255	0,186	0,162	0,14	0,137	0,132	0,133	0,095	0,096	0,101	595
P56E4	AG1(pCA24N:: <i>paaE</i>)	E	0,912	0,337	0,282	0,236	0,209	0,143	0,102	0,131	0,068	0,062	0,051	0,053	595
P56E6	AG1(pCA24N:: <i>ybfM</i>)	F	0,511	0,119	0,044	0,047	0,045	0,045	0,044	0,046	0,045	0,047	0,048	0,049	595
P56F10	AG1(pCA24N:: <i>pqqL</i>)	G	0,848	0,295	0,258	0,126	0,076	0,048	0,049	0,047	0,049	0,049	0,047	0,053	595
P56F4	AG1(pCA24N:: <i>ugpC</i>)	H	0,736	0,157	0,166	0,114	0,099	0,092	0,052	0,049	0,05	0,05	0,056	0,055	595

		0 mM	40 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM	130 mM	140 mM	150 mM		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
P56G5	AG1(pCA24N:: <i>yeiT</i>)	A	0,742	0,152	0,116	0,084	0,062	0,06	0,06	0,059	0,059	0,059	0,059	0,06	595
P56H10	AG1(pCA24N:: <i>yehL</i>)	B	0,533	0,172	0,158	0,107	0,061	0,051	0,053	0,048	0,05	0,05	0,053	0,051	595
P56H7	AG1(pCA24N:: <i>rtn</i>)	C	0,77	0,282	0,168	0,135	0,057	0,047	0,047	0,048	0,047	0,049	0,051	0,051	595
P48E11	AG1(pCA24N:: <i>asr</i>)	D	0,931	0,34	0,232	0,126	0,069	0,065	0,059	0,056	0,058	0,06	0,057	0,057	595

Şekil 3.13. devam MIC testi sonuçları

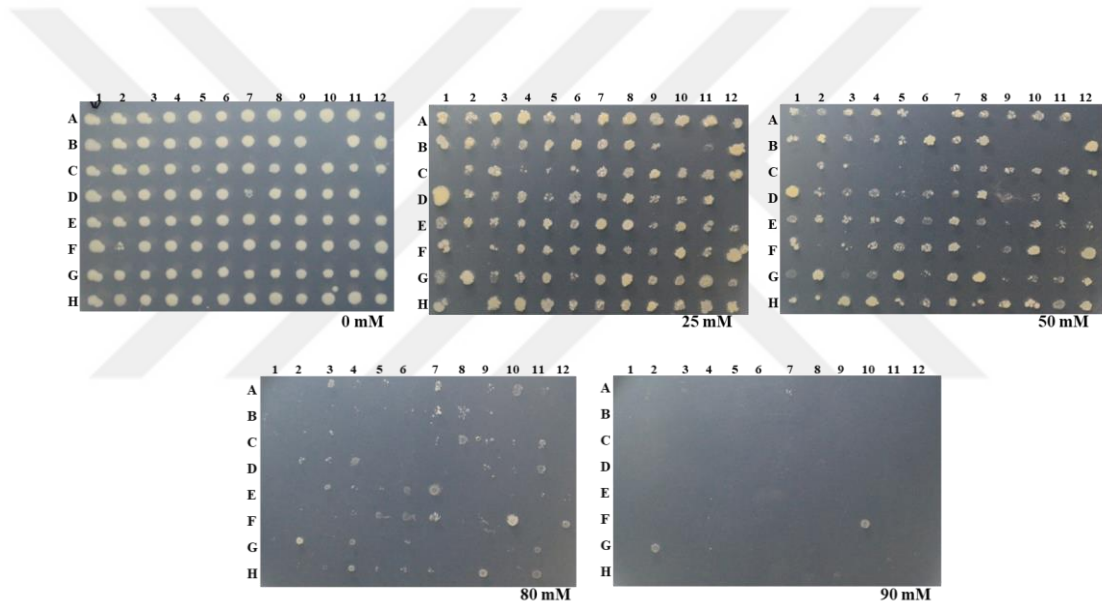
Hem bor tolerans nokta testi sonuçları, hem de MIC testi sonuçları değerlendirildiğinde borik asit içeren ortamda en iyi üreme gösteren klonların listesi elde edilmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Tolerant klonların bor tolerans değerlerinin karşılaştırılması

No	Lokasyon	Gen adı	Tarama değeri	Nokta testi	MIC değeri
1	P4C4	<i>lacI</i>	90 mM	130 mM	150 mM
2	P4H3	<i>lacA</i>	90 mM	110 mM	150 mM
3	P15B8	<i>cobT</i>	90 mM	130 mM	90 mM
4	P15G12	<i>gatD</i>	90 mM	130 mM	110 mM
5	P34G8	<i>aceK</i>	90 mM	130 mM	150 mM
6	P36H4	<i>rfaQ</i>	90 mM	130 mM	150 mM
7	P37A8	<i>yjcF</i>	90 mM	130 mM	150 mM
8	P48F10	<i>ymdE</i>	90 mM	90 mM	100 mM
9	P48G2	<i>bdm</i>	90 mM	90 mM	110 mM
10	P52B3	<i>yeeY</i>	90 mM	90 mM	110 mM
11	P52H8	<i>yddV</i>	90 mM	90 mM	150 mM
12	P54D7	<i>recQ</i>	90 mM	130 mM	150 mM
13	P54H1	<i>ycgU</i>	90 mM	110 mM	110 mM
14	P54H12	<i>ptsA</i>	90 mM	130 mM	150 mM
15	P56C5	<i>ydeE</i>	90 mM	100 mM	150 mM
16	P56E4	<i>paaE</i>	90 mM	100 mM	110 mM
17	P56F4	<i>ugpC</i>	90 mM	100 mM	90 mM

3.1.7. 33 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-33) deneylerinin sonuçları

100 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama deneylerinde IPTG konsantrasyonu, bazı genlerin ifadesi için uygun olmakta ve göreceli olarak yüksek borik asit ortamında klon/klonların yaşayabilmesine imkan sağlamaktadır. Ancak bazı genlerin aşırı ifadesi bakteriye toksik etki yaratmakta ve bakterinin ölmesine neden olmaktadır. Bu durumda, bor toleransında etkili olabilecek genleri gözden kaçırmamak için genom boyu tarama deneyi, 33 µM IPTG içeren ortamlarda tekrar edilmiştir. Borik asit içermeyen ve 25 mM, 50 mM, 80 mM, 90 mM borik asit içeren ortamlarda 57 adet plakanın ikinci kez taraması yapılmıştır (Şekil 3.14.)



Şekil 3.14. 33 µM IPTG ve sırasıyla borik asit içermeyen-25-50-80-90 mM borik asit içeren besi ortamlarında 48 numaralı plakada yer alan klonların üreme durumlarını gösteren petri fotoğrafları

GBT-33 çalışmaları sonucunda 153 adet klonun bor tolerans seviyelerinin göreceli olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, 90 mM borik asit ortamında üreme gösteren ve 80 mM borik asit ortamında diğer klonlara göre daha belirgin üreme gösteren klonlar onaylama çalışmalarına alınmıştır. Bor tolerans nokta testi için seçilen klonlar liste haline getirilmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. GBT-33 sonucu seçilen tolerant klonların listesi

Lokasyon ve gen adı	Lokasyon ve gen adı	Lokasyon ve gen adı	Lokasyon ve gen adı
P1A7 <i>imp</i>	P21C4 <i>ydhD</i>	P41E9 <i>nudC</i>	P49D8 <i>ygeM</i>
P1A10 <i>ilvH</i>	P21E7 <i>yeaC</i>	P41F7 <i>pfiC</i>	P50B12 <i>ymfP</i>
P1G5 <i>fixX</i>	P22A3 <i>yeeT</i>	P41F8 <i>nusG</i>	P50C12 <i>fsaA</i>
P1G6 <i>pdxA</i>	P24H1 <i>yflL</i>	P41G11 <i>aphA</i>	P50E5 <i>yrdA</i>
P3B2 <i>rnhA</i>	P25H10 <i>hcaD</i>	P42A5 <i>yjfZ</i>	P50E12 <i>yicR</i>
P3E4 <i>prfH</i>	P27E6 <i>yhaC</i>	P42D5 <i>ytfE</i>	P50H3 <i>hpt</i>
P4B8 <i>yaiB</i>	P31B7 <i>yfcL</i>	P42E5 <i>ytfG</i>	P51C10 <i>friC</i>
P4D12 <i>nusB</i>	P31B9 <i>yfeC</i>	P42E8 <i>sgcQ</i>	P51D7 <i>argB</i>
P4G2 <i>prpC</i>	P31C6 <i>elaB</i>	P43B9 <i>rpsJ</i>	P52A8 <i>yjjN</i>
P5G8 <i>copA</i>	P31D6 <i>elaA</i>	P43C4 <i>yhcE</i>	P52B3 <i>yeeY</i>
P7D7 <i>ybfN</i>	P32A7 <i>hypC</i>	P43F6 <i>yhdL</i>	P52H8 <i>yddV</i>
P7E4 <i>ybeU</i>	P32D7 <i>ftsB</i>	P44B5 <i>yiaL</i>	P53B5 <i>elaD</i>
P8B7 <i>moaB</i>	P32E6 <i>hycI</i>	P44B6 <i>yibL</i>	P53F1 <i>potG</i>
P8D7 <i>moaD</i>	P32G3 <i>yjiU</i>	P44C7 <i>rpoZ</i>	P54A3 <i>ansP</i>
P8F6 <i>bioD</i>	P32H9 <i>yqeK</i>	P44F9 <i>tnaC</i>	P54A5 <i>eptA</i>
P8G9 <i>ybiC</i>	P32H11 <i>yqgB</i>	P45B5 <i>yjbE</i>	P54C5 <i>menD</i>
P9B7 <i>ybjD</i>	P34D4 <i>yhiJ</i>	P45E8 <i>fxsA</i>	P54D7 <i>recQ</i>
P9C12 <i>lpxK</i>	P34D7 <i>rep</i>	P45E11 <i>ytfA</i>	P54H1 <i>ygcU</i>
P9D2 <i>yliJ</i>	P34D8 <i>thiC</i>	P45F10 <i>ulaB</i>	P54H1 <i>ygcU</i>
P9G6 <i>hcp</i>	P34G8 <i>aceK</i>	P46A4 <i>yjiS</i>	P55A6 <i>nrdI</i>
P9H6 <i>ybjE</i>	P34G10 <i>cpdB</i>	P46B2 <i>yjgX</i>	P55A7 <i>ygeF</i>
P10A11 <i>cbpM</i>	P34H3 <i>pck</i>	P46B3 <i>yjhX</i>	P55H6 <i>yadI</i>
P11D6 <i>miaB</i>	P35B8 <i>yhhZ</i>	P46H2 <i>sgcA</i>	P55H12 <i>ydiA</i>
P12A1 <i>rne</i>	P35C4 <i>rpoA</i>	P46H6 <i>ymfJ</i>	P56A2 <i>yfcT</i>
P12A6 <i>torZ</i>	P36D4 <i>rfaJ</i>	P46H7 <i>yjfV</i>	P56A4 <i>ccmH</i>
P12A7 <i>flgK</i>	P36G9 <i>yifB</i>	P47A6 <i>yohH</i>	P56A5 <i>rffE</i>
P12H7 <i>trpD</i>	P36H4 <i>rfaQ</i>	P47G7 <i>ybhT</i>	P56A6 <i>arsB</i>
P13A7 <i>oppF</i>	P37A6 <i>aceA</i>	P48B7 <i>chpS</i>	P56A7 <i>yeiQ</i>
P13H6 <i>oppD</i>	P37A8 <i>yjcF</i>	P48E7 <i>yceP</i>	P56A12 <i>lacY</i>
P13H8 <i>pspF</i>	P38E8 <i>creC</i>	P48F10 <i>ymdE</i>	P56B3 <i>yddK</i>
P14A4 <i>ego</i>	P40F3 <i>sgbE</i>	P48G2 <i>bdm</i>	P56B9 <i>yejH</i>
P14A5 <i>ydeA</i>	P41A5 <i>rhaS</i>	P48H4 <i>yjhD</i>	P56C5 <i>ydeE</i>
P14A7 <i>fumC</i>	P41A6 <i>tpiA</i>	P48H9 <i>yrbB</i>	P56E4 <i>paae</i>
P14F7 <i>mall</i>	P41B2 <i>fre</i>	P49A9 <i>gatR</i>	P56E6 <i>ybfM</i>
P14H2 <i>ddpD</i>	P41C5 <i>sodA</i>	P49C3 <i>yoeF</i>	P56F4 <i>ugpC</i>
P15B5 <i>ruvB</i>	P41D1 <i>udp</i>	P49C8 <i>yeeP</i>	P56F10 <i>pqqL</i>
P15B8 <i>cobT</i>	P41D2 <i>hemG</i>	P49C11 <i>arpB</i>	P56H7 <i>rtn</i>
P15B12 <i>yegD</i>	P41E6 <i>rraA</i>	P49D2 <i>hybF</i>	
P15D7 <i>fliM</i>	P41E7 <i>fsaB</i>	P49D4 <i>yfiO</i>	

3.1.8. Bor tolerans nokta testi sonuçları

Genom boyu tarama deneylerinden seçilen 153 adet klonun bor tolerans değerlerinin belirlenmesi için, bor tolerans nokta testi yapılmıştır. Borik asit içermeyen ve 25 mM, 50 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM borik asit içeren ve 33 µM IPTG içeren LB-cm besi ortamlarına ekimler yapılmıştır. Üremeler gün gün takip edilmiş ve 5. günün sonunda üreme durumları not edilmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Bor tolerans nokta testi sonucu klonların üreme durumları

Gen	0mM	25mM	50mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM
<i>imp</i>	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ilvH</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^
<i>fixX</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>pdxA</i>	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>rnhA</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>prfH</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^
<i>yaiB</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>nusB</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^
<i>prpC</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>copA</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ybfN</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ybeU</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>moaB</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>moaD</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>bioD</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ybiC</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ybjD</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>lpxK</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yliJ</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>hcp</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ybjE</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>cbpM</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>miaB</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>rne</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>torZ</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>flgK</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>trpD</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>oppF</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>oppD</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>pspF</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ego</i>	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ydeA</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>fumC</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>mall</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ddpD</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ruvB</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>cobT</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yegD</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>fliM</i>	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ydhD</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yeaC</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yeeT</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yfjL</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>hcaD</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yhaC</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yfcL</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yfeC</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>elaB</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>elaA</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>hypC</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ftsB</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^

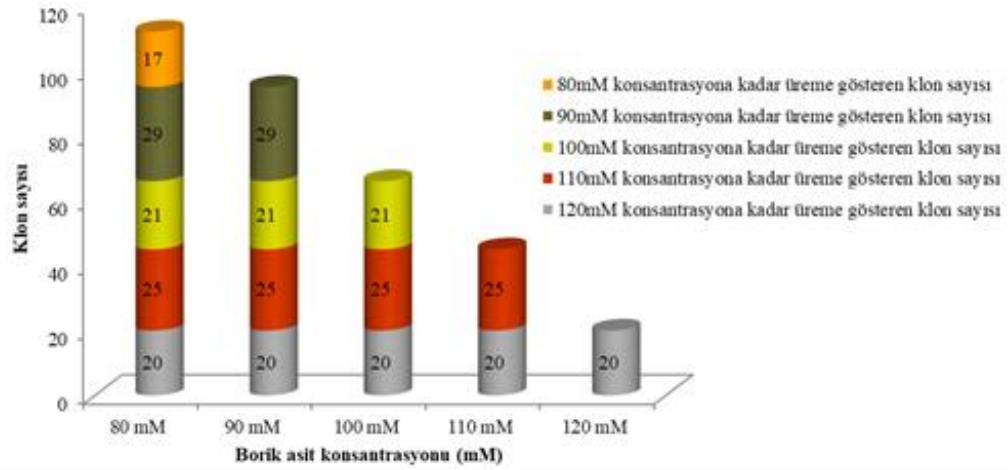
Çizelge 3.5.^{devamı} Bor tolerans nokta testi sonucu klonların üreme durumları

Gen	0mM	25mM	50mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM
<i>hycI</i>	*****	*****	*****	*****	^^^..	^^...
<i>yfiU</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>yqeK</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^
<i>yqgB</i>	*****	*****	*****	^^^^^
<i>yhiJ</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>rep</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...	^^...	^^...
<i>thiC</i>	*****	*****	*****	^^...	^^...	^^...	^^...	^^...	^^...
<i>aceK</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^...	^^...	^^...
<i>cpdB</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^
<i>pck</i>	*****	*****	*****
<i>yhhZ</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>rpoA</i>	*****	*****	*****
<i>rfaJ</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^
<i>yifB</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^..	^^...
<i>rfaQ</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...	^^...
<i>aceA</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...	^^...
<i>yjcF</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>creC</i>	*****	*****	*****	*****	^^..
<i>sgbE</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^^..	^^..	^^...
<i>rhaS</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>tpiA</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^
<i>fre</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...	^^...	^^...
<i>sodA</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^
<i>udp</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^
<i>hemG</i>	*****	*****
<i>rraA</i>	*****	*****	*****	*****	^^...
<i>fsaB</i>	*****	*****	*****	*****	^^...
<i>nudC</i>	*****	*****	*****	*****	^^...
<i>pfiC</i>	*****	*****	^^^^^	^^...
<i>nusG</i>	*****	^^^^^
<i>aphA</i>	*****	*****	*****	^^^^^
<i>yifZ</i>	*****	*****	*****	^^..	^^...
<i>ytfE</i>	*****	*****	*****	^^...	^^...	^^...	^^...	^^...
<i>ytfG</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^...	^^...
<i>sgcQ</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...	^^...	^^...
<i>rpsJ</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...	^^...	^^...
<i>yhcE</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^...	^^...
<i>yhdL</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...	^^...
<i>yiaL</i>	*****	*****	^^^^^	^^..	^^...	^^...	^^...
<i>yibL</i>	*****	*****	*****	*****	^^...	^^...	^^...
<i>rpoZ</i>	*****	*****	*****	*****	^^...	^^...
<i>tnaC</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...	^^...
<i>yjbE</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>fxsA</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^...
<i>ytfA</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^^..	^^..	^^...
<i>ulaB</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^...
<i>yjiS</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^
<i>yjgX</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^^..	^^...	^^...
<i>yjhX</i>	*****	*****	*****	^^^^^	^^^^^	^^^^^	^^^^^
<i>sgcA</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^^^^^	^^..	^^..	^^..
<i>ymfJ</i>	*****	*****	*****	*****	^^^^^

Çizelge 3.5.^{devamı} Bor tolerans nokta testi sonucu klonların üreme durumları

Gen	0mM	25mM	50mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM
<i>yffV</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yohH</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>ybhT</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----	-----
<i>chpS</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^
<i>yceP</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>ymdE</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^
<i>bdm</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----
<i>yjhD</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yrbB</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----
<i>gatR</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----
<i>yoeF</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----
<i>yeeP</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>arpB</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>hybF</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>yfiO</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>ygeM</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>ymfP</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>fsaA</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
<i>yrdA</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>yicR</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>hpt</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>friC</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>argB</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>yjiN</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
<i>yeeY</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>yddV</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>elaD</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>potG</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>ansP</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
<i>eptA</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----	-----
<i>menD</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>recQ</i>	*****	*****	*****	*****	*****	-----	-----	-----	-----
<i>ygcU</i>	*****	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>nrdI</i>	*****	*****	*****	*****	*****	-----	-----	-----	-----
<i>ygeF</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----	-----
<i>yadI</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>ydiA</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yfcT</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----
<i>ccmH</i>	*****	*****	*****	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>rffE</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>arsB</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>yeiQ</i>	*****	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----
<i>lacY</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>yddK</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^
<i>yehH</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>ydeE</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>paaE</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>ybfM</i>	*****	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----
<i>ugpC</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
<i>pqqL</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
<i>rtn</i>	*****	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----
(K) <i>asr</i>	*****	*****	^ ^ ^ ^ ^	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Bor tolerans nokta testi yapılan 153 adet klonun üreme gösterdikleri tolerans seviyelerine göre değerlendirilmeleri şekil 3.15.'de grafik olarak gösterilmiştir. Bu klonlardan, 17 tanesi 80 mM'da, 29 tanesi 90 mM'da, 21 tanesi 100 mM'da, 25 tanesi 110 mM'da, 20 tanesi 120 mM'da üreme göstermiştir. Sonuç olarak 112 adet klonun 80 mM ve üzeri borik asit konsantrasyonunda üreme gösterdikleri onaylanmıştır.



Şekil 3.15. Bor tolerans nokta testi sonucu seçilen klonların tolerans seviyelerinin dağılımı.

İkinci genom boyu tarama sonucu onaylanan klonlardan, bor tolerans nokta testinde göreceli olarak daha yüksek borik asit konsantrasyonunda üreme gösteren 58 adet klon listelenmiştir (Çizelge 3.6.).

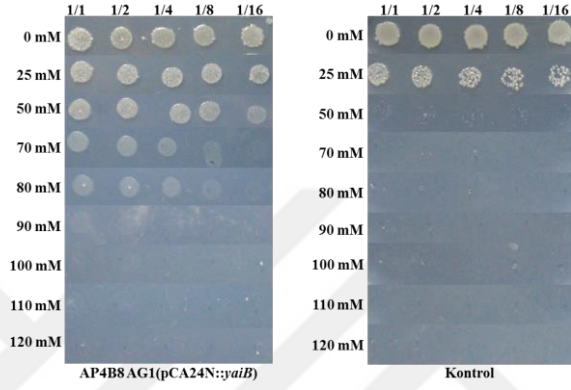
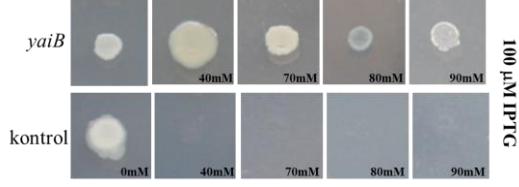
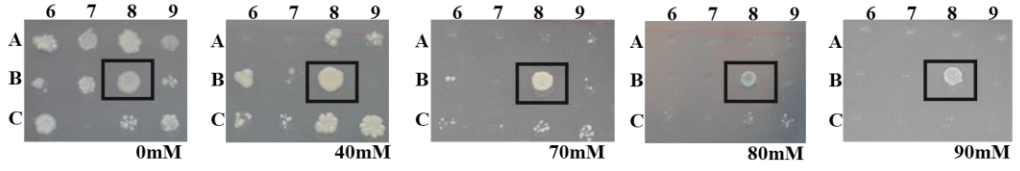
Çizelge 3.6. Bor tolerans nokta testi sonucu seçilen tolerant klonların listesi

Lokasyon ve gen	Tarama	Nokta testi	Lokasyon ve gen	Tarama	Nokta testi
P3E4 <i>prfH</i>	80 mM	120 mM	P44F9 <i>taC</i>	80 mM	100 mM
P4B8 <i>yaiB</i>	90 mM	120 mM	P45E11 <i>ytfA</i>	90 mM	120 mM
P4D12 <i>nusB</i>	80 mM	110 mM	P45F10 <i>ulaB</i>	80 mM	110 mM
P10A11 <i>cbpM</i>	90 mM	110 mM	P46B2 <i>yjgX</i>	90 mM	120 mM
P14F7 <i>malI</i>	80 mM	110 mM	P46B3 <i>yjhX</i>	90 mM	100 mM
P21C4 <i>ydhD</i>	80 mM	110 mM	P46H2 <i>sgcA</i>	80 mM	120 mM
P21E7 <i>yeaC</i>	80 mM	110 mM	P48B7 <i>chpS</i>	80 mM	120 mM
P22A3 <i>yeeT</i>	80 mM	110 mM	P48E7 <i>yceP</i>	80 mM	100 mM
P24H1 <i>yfiL</i>	80 mM	110 mM	P48F10 <i>ymdE</i>	90 mM	120 mM
P25H10 <i>hcaD</i>	80 mM	110 mM	P48G2 <i>bdm</i>	90 mM	110 mM
P31C6 <i>elaB</i>	80 mM	100 mM	P48H4 <i>yjhD</i>	90 mM	120 mM
P32A7 <i>hypC</i>	80 mM	100 mM	P48H9 <i>yrbB</i>	90 mM	110 mM

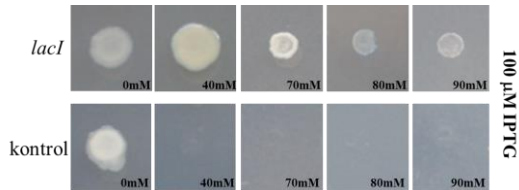
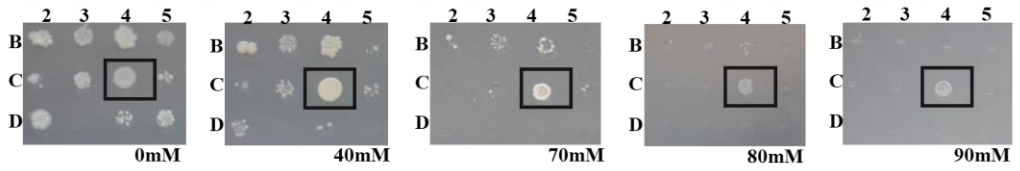
Çizelge 3.6.^{devamı} Bor tolerans nokta testi sonucu seçilen tolerant klonların listesi

Lokasyon ve gen	Tarama	Nokta testi	Lokasyon ve gen	Tarama	Nokta testi
P32G3 <i>yfiU</i>	80 mM	120 mM	P49A9 <i>gatR</i>	80 mM	110 mM
P32H9 <i>yqeK</i>	80 mM	110 mM	P49C3 <i>yoeF</i>	80 mM	110 mM
P34D4 <i>yhiJ</i>	80 mM	120 mM	P49C11 <i>arpB</i>	80 mM	100 mM
P34D7 <i>rep</i>	80 mM	120 mM	P49D2 <i>hybF</i>	80 mM	100 mM
P34D8 <i>thiC</i>	80 mM	120 mM	P49D8 <i>ygeM</i>	90 mM	100 mM
P34G8 <i>aceK</i>	80 mM	110 mM	P50B12 <i>ymfP</i>	90 mM	100 mM
P36G9 <i>yifB</i>	80 mM	110 mM	P50E12 <i>yicR</i>	90 mM	90 mM
P36H4 <i>rfaQ</i>	80 mM	110 mM	P50H3 <i>hpt</i>	90 mM	90 mM
P37A6 <i>aceA</i>	80 mM	110 mM	P51C10 <i>friC</i>	90 mM	90 mM
P37A8 <i>yjcF</i>	90 mM	120 mM	P54C5 <i>menD</i>	90 mM	100 mM
P40F3 <i>sgbE</i>	80 mM	120 mM	P54D7 <i>recQ</i>	90 mM	80 mM
P41B2 <i>fre</i>	90 mM	110 mM	P54H1 <i>ygcU</i>	90 mM	100 mM
P42E5 <i>ytfG</i>	80 mM	110 mM	P55H6 <i>yadI</i>	90 mM	120 mM
P42E8 <i>sgcQ</i>	80 mM	120 mM	P55H12 <i>ydiA</i>	90 mM	120 mM
P43B9 <i>rpsJ</i>	80 mM	110 mM	P56A6 <i>arsB</i>	90 mM	100 mM
P43C4 <i>yhcE</i>	80 mM	120 mM	P56A7 <i>yeiQ</i>	90 mM	100 mM
P43F6 <i>yhdL</i>	80 mM	100 mM	P56B3 <i>yddK</i>	90 mM	120 mM

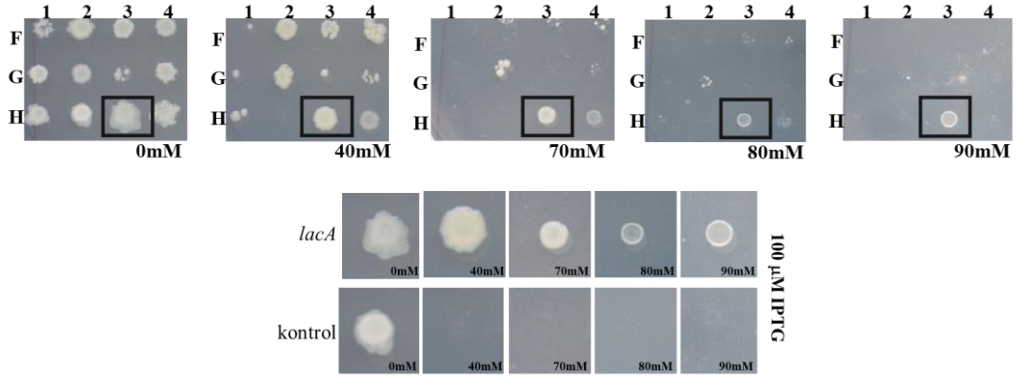
Sonuç olarak, 100 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-100) sonucu 62 adet, 33 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-33) sonucu 153 adet klonun borik asite karşı diğer klonlara göre daha toleranslı olduğu görülmüştür. Bunun üzerine, bu klonların farklı borik asit ortamında üreme durumları, farklı bir teknik olan “bor tolerans nokta testi” ile değerlendirilmiştir. GBT-100’den 17 adet, GBT-33’ten 112 adet klonun göreceli olarak yüksek borik asit konsantrasyonunda üremeleri onaylanmıştır. Bu 112 adet klon içerisinde, borik asit ortamında daha iyi üreme gösteren 58 adet klon seçilmiştir. İki farklı IPTG konsantrasyonunda gerçekleştirilen taramalar sonucunda bazı klonlar her iki taramada, bazı klonlar ise taramaların birinde görülmüştür. Taramaların iki farklı IPTG konsantrasyonu ile yapılması bor toleransında etkili olabilecek farklı genlerin (ifade farkından dolayı) avlanmalarına olanak sağlamıştır. Seçilen tolerant klonlardan, tarama ve nokta testi sonuçlarından örnekler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.16. - Şekil 3.54.).



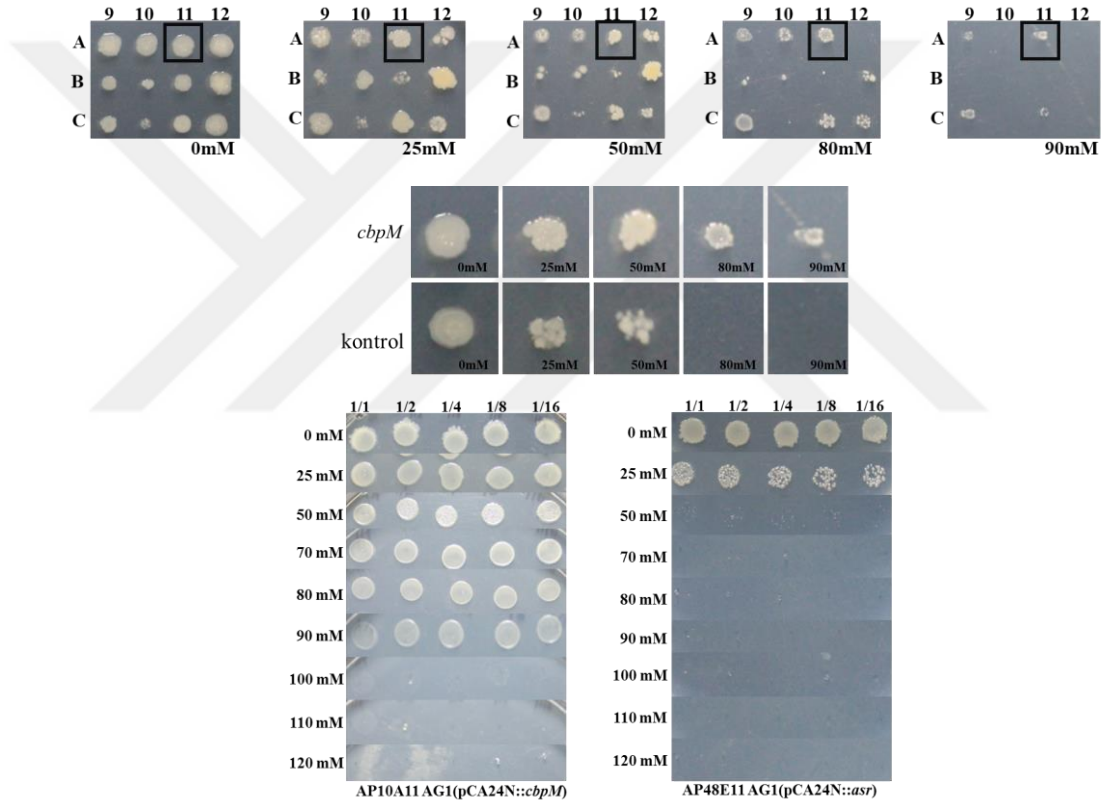
Şekil 3.16. P4B8 (*yaiB*) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



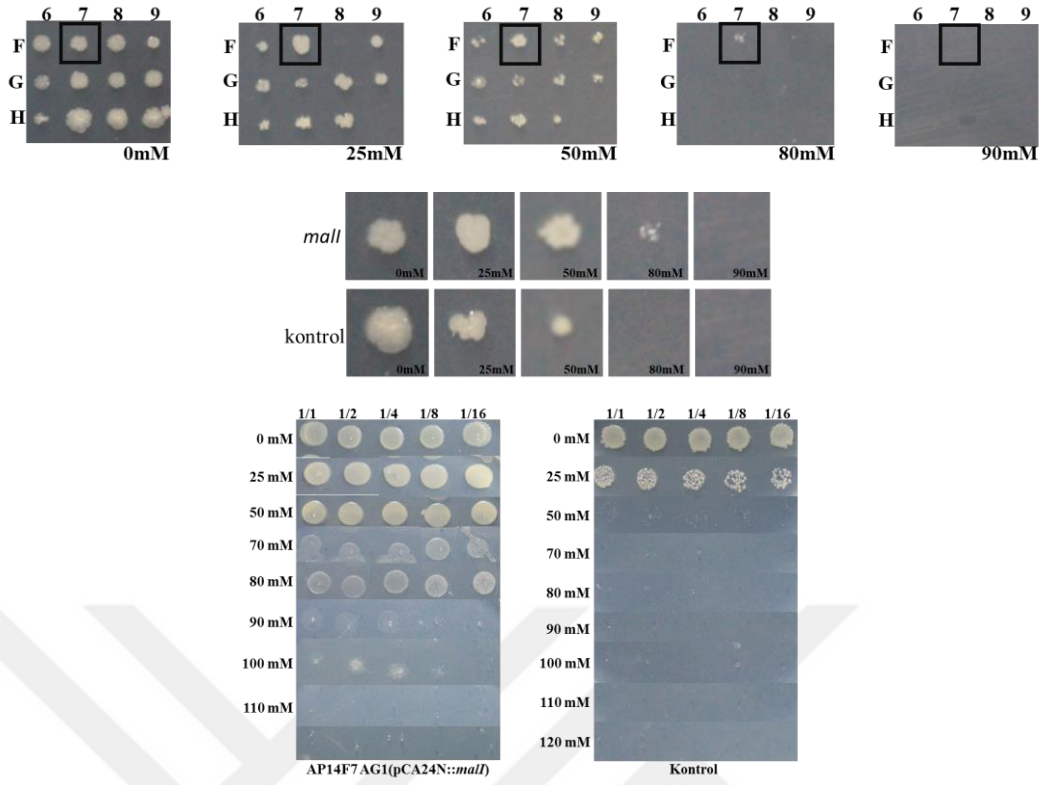
Şekil 3.17. P4C4 (*lacI*) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçlarından elde edilen görüntüler



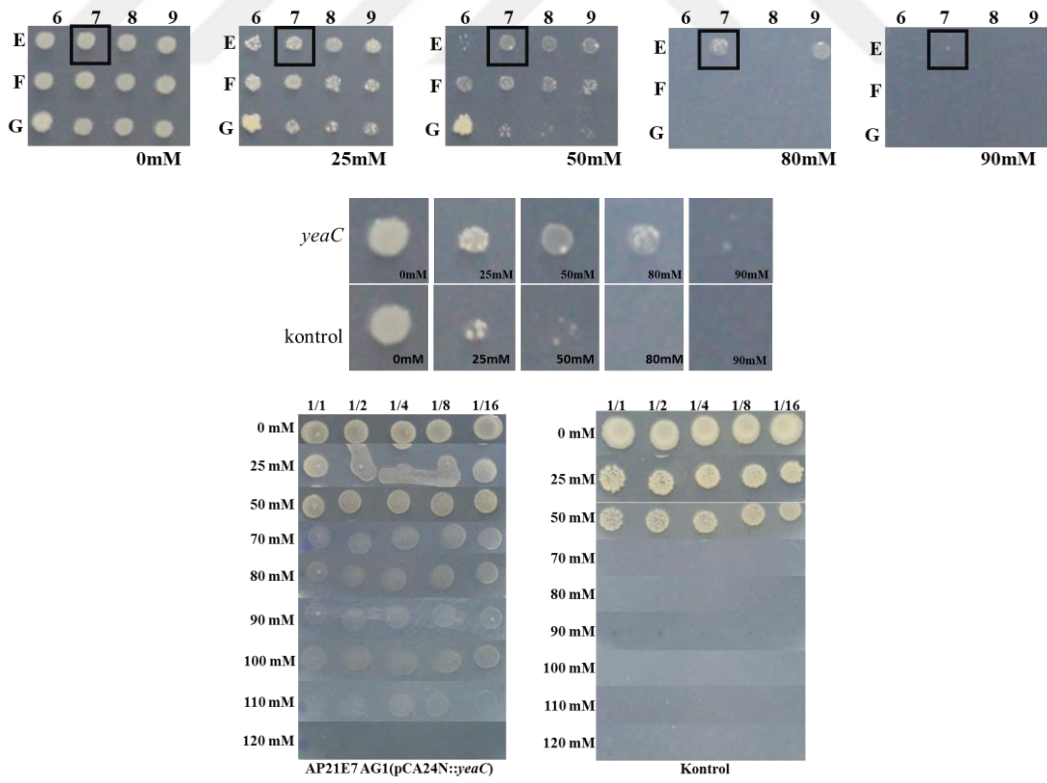
Şekil 3.18. P4H3 (*lacA*) klonunun replikatör ile GBT-100 sonuçlarından elde edilen görüntüler



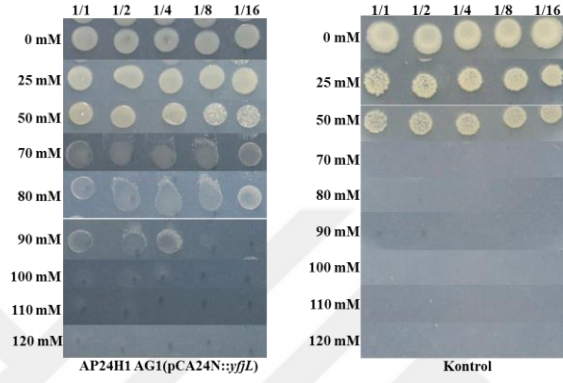
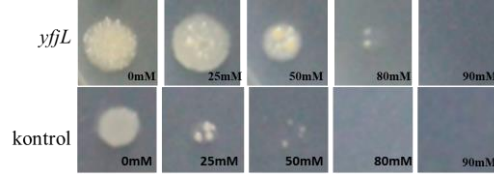
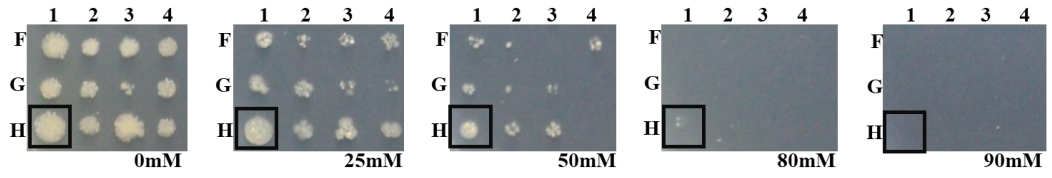
Şekil 3.19. P10A11 (*cbpM*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



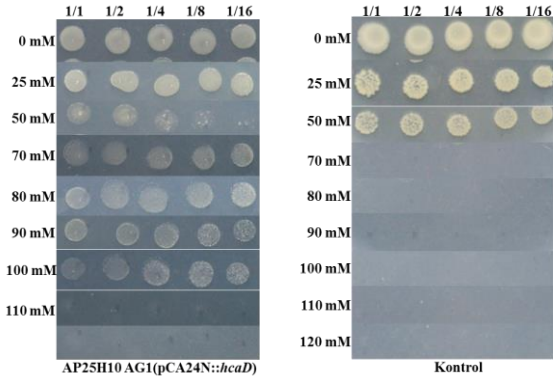
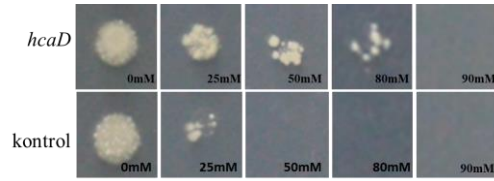
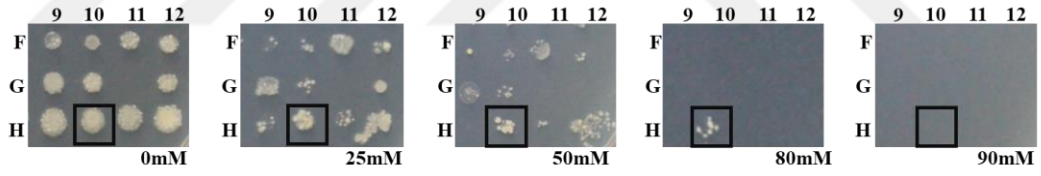
Şekil 3.20. P14F7 (*mall*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



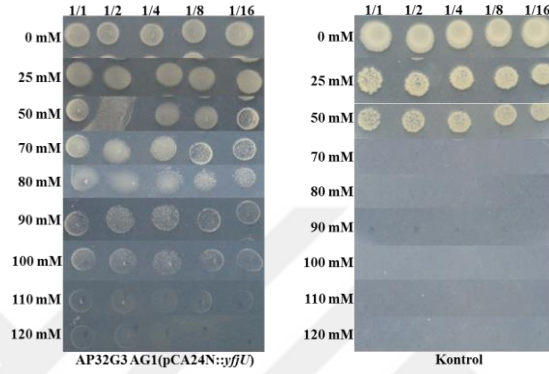
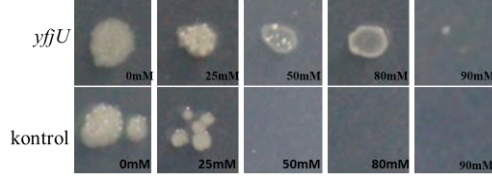
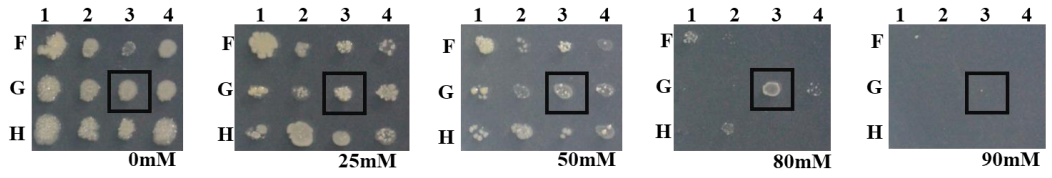
Şekil 3.21. P21E7 (*yeaC*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



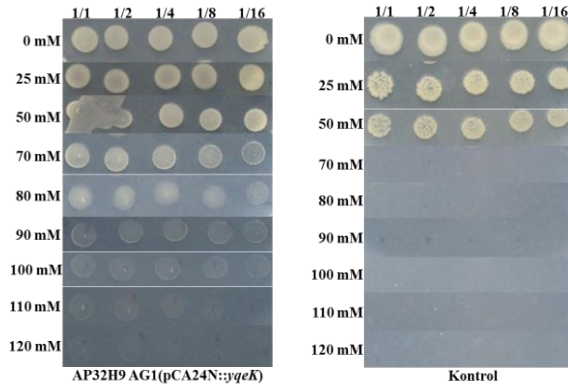
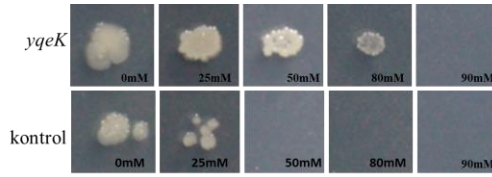
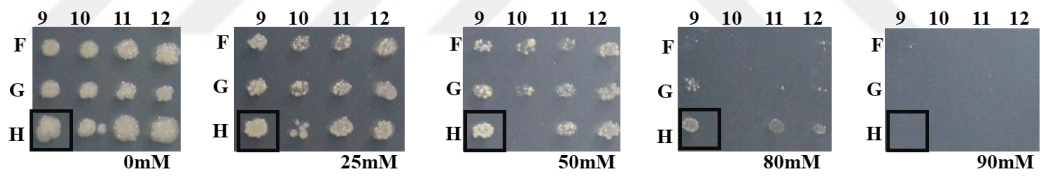
Şekil 3.22. P24H1 (*yjl*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



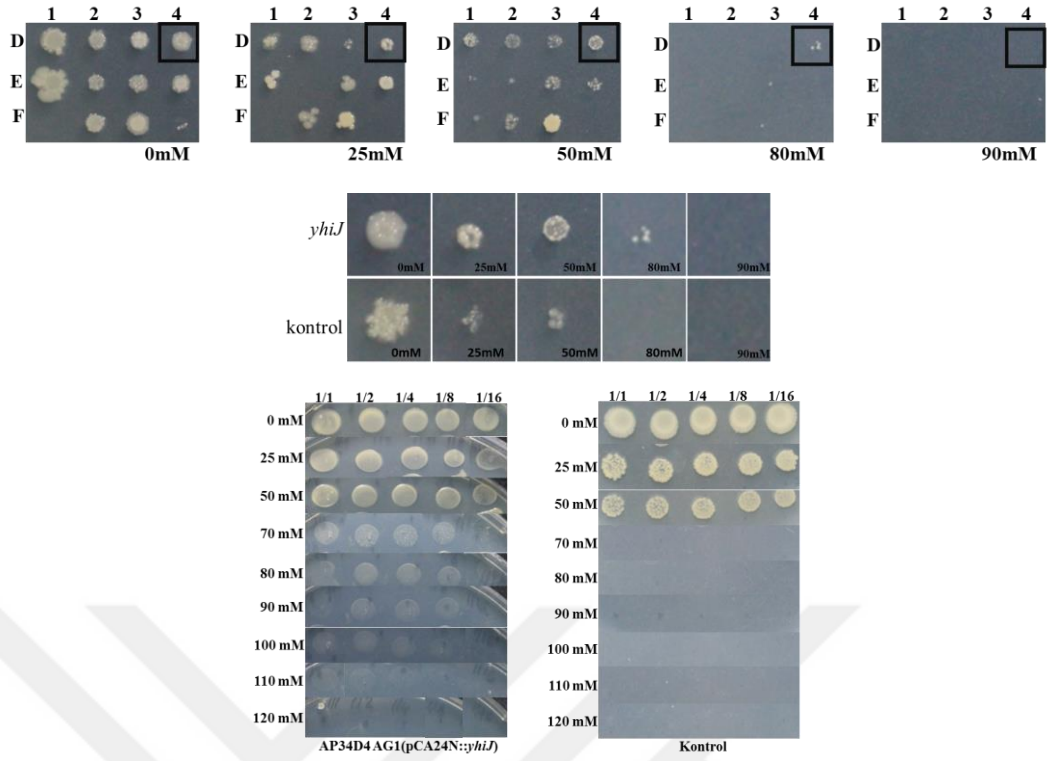
Şekil 3.23. P25H10 (*hcaD*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



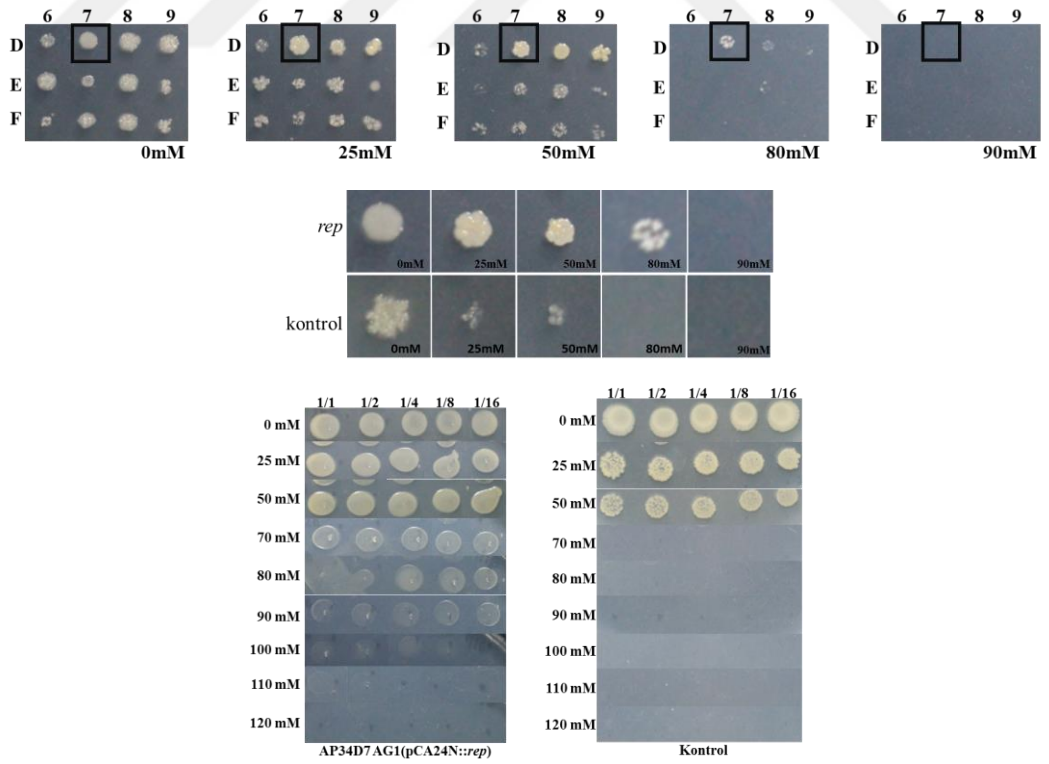
Şekil 3.24. P32G3 (*yffU*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



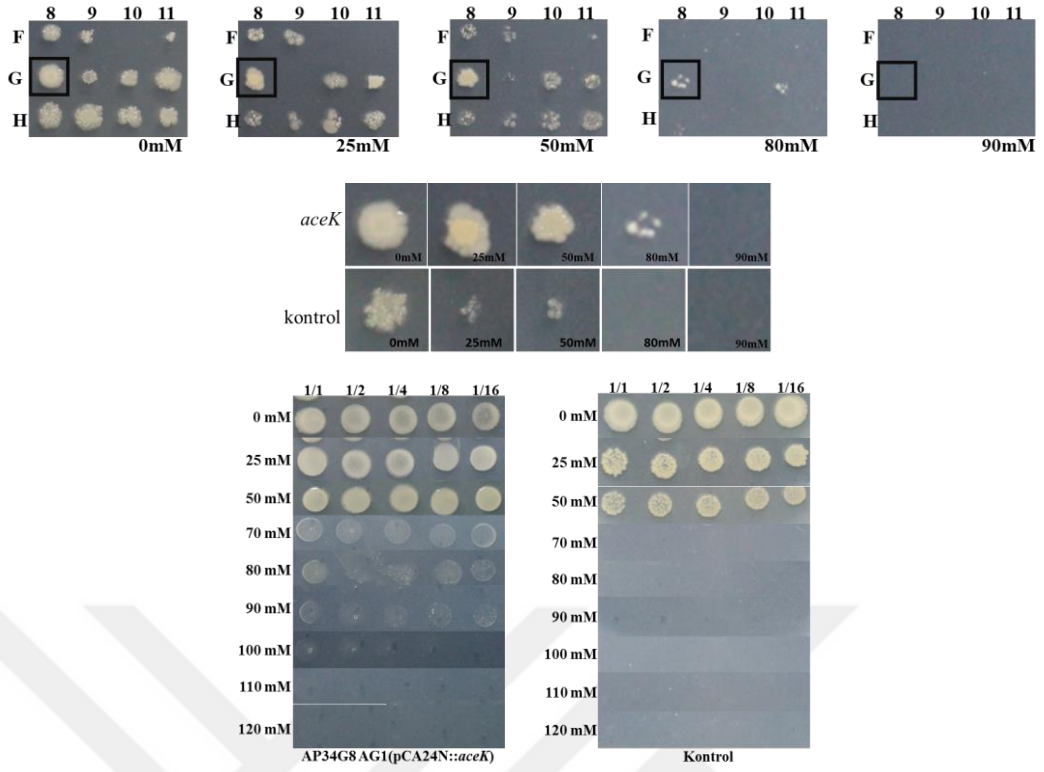
Şekil 3.25. P32H9 (*yqeK*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



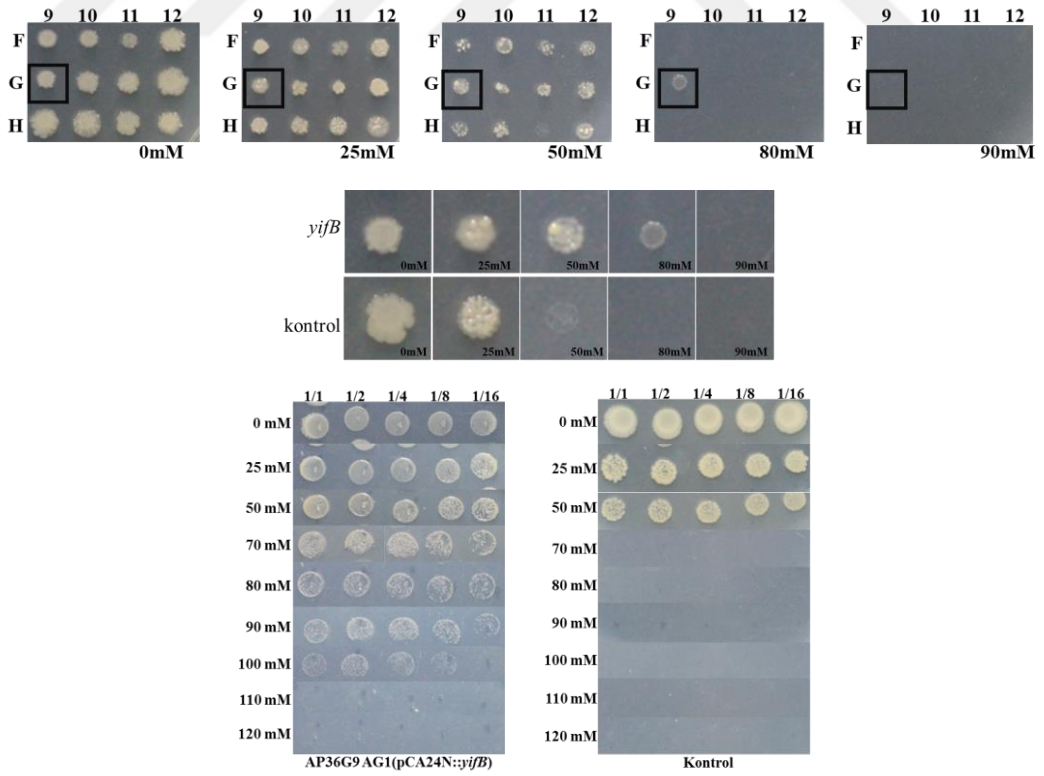
Şekil 3.26. P34D4 (*yhiJ*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



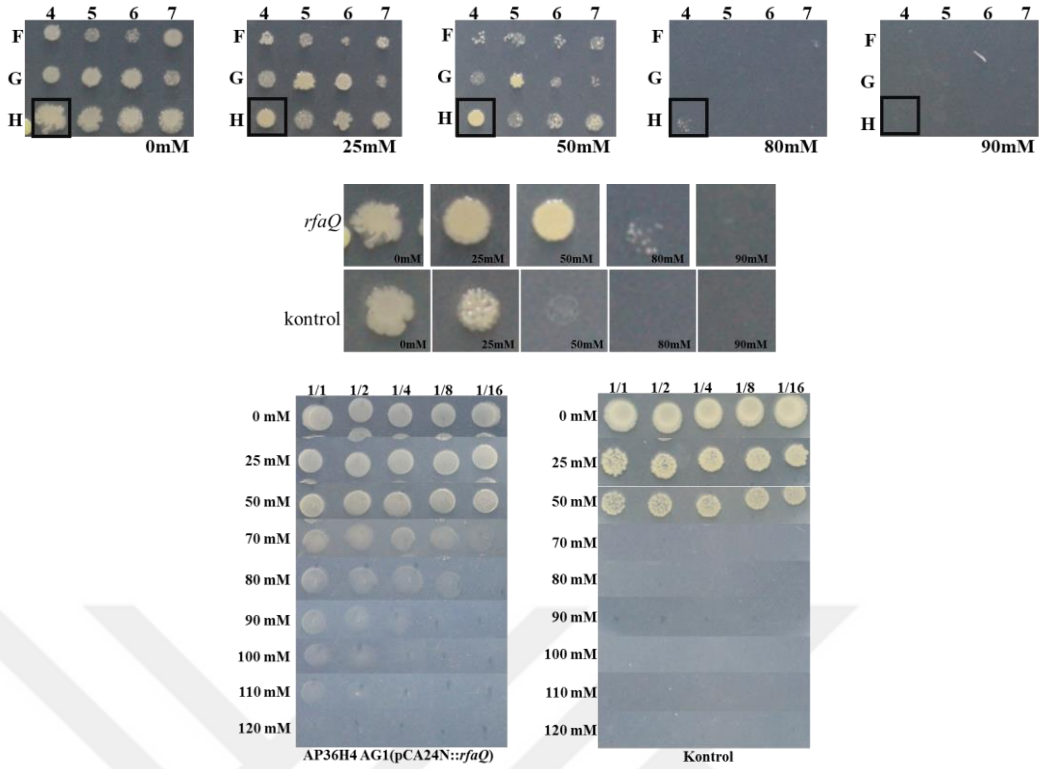
Şekil 3.27. P34D7 (*rep*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



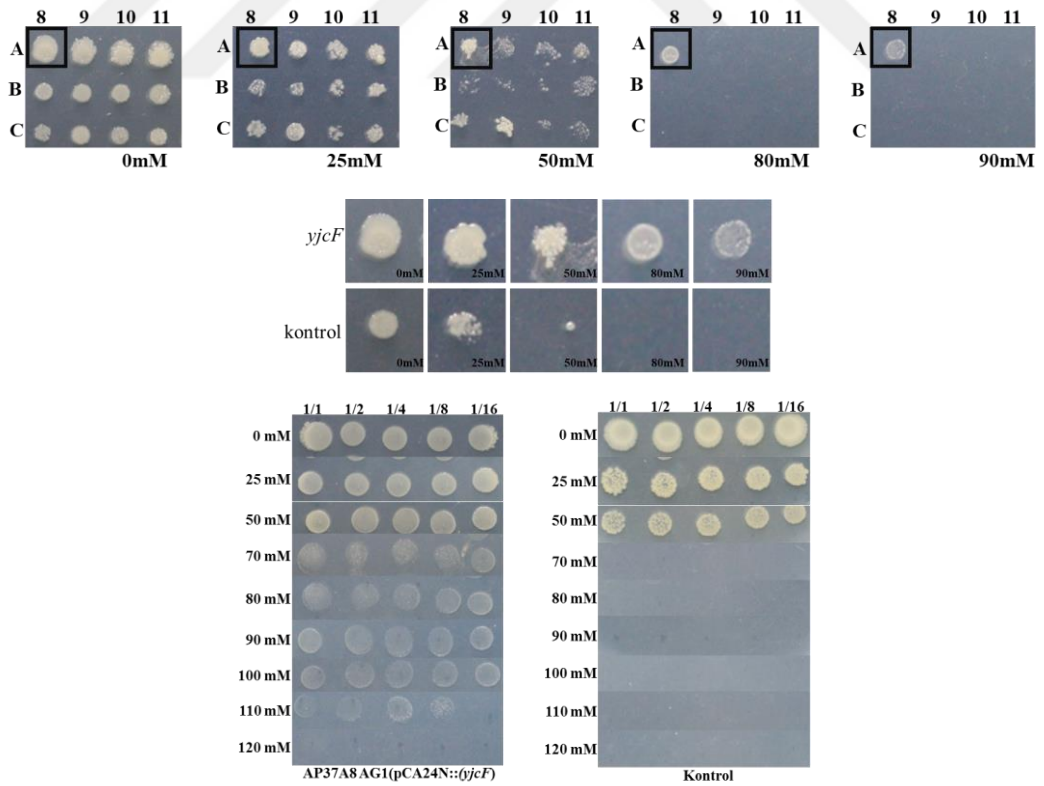
Şekil 3.28. P34G8 (*aceK*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



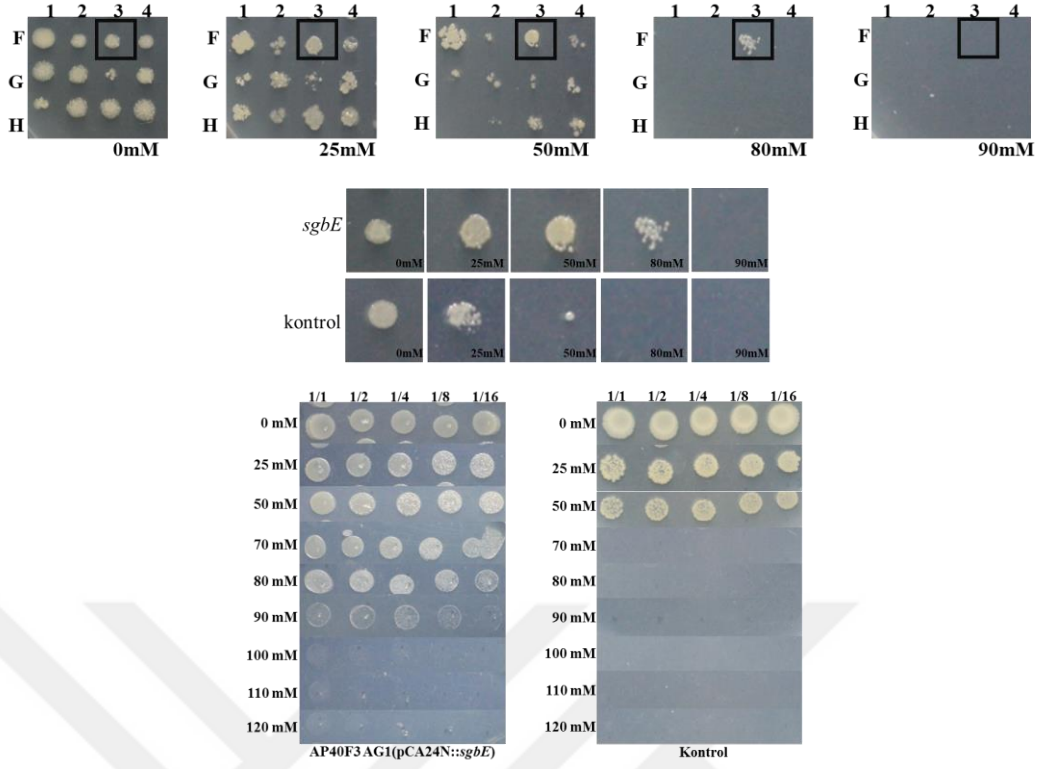
Şekil 3.29. P36G9 (*yifB*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



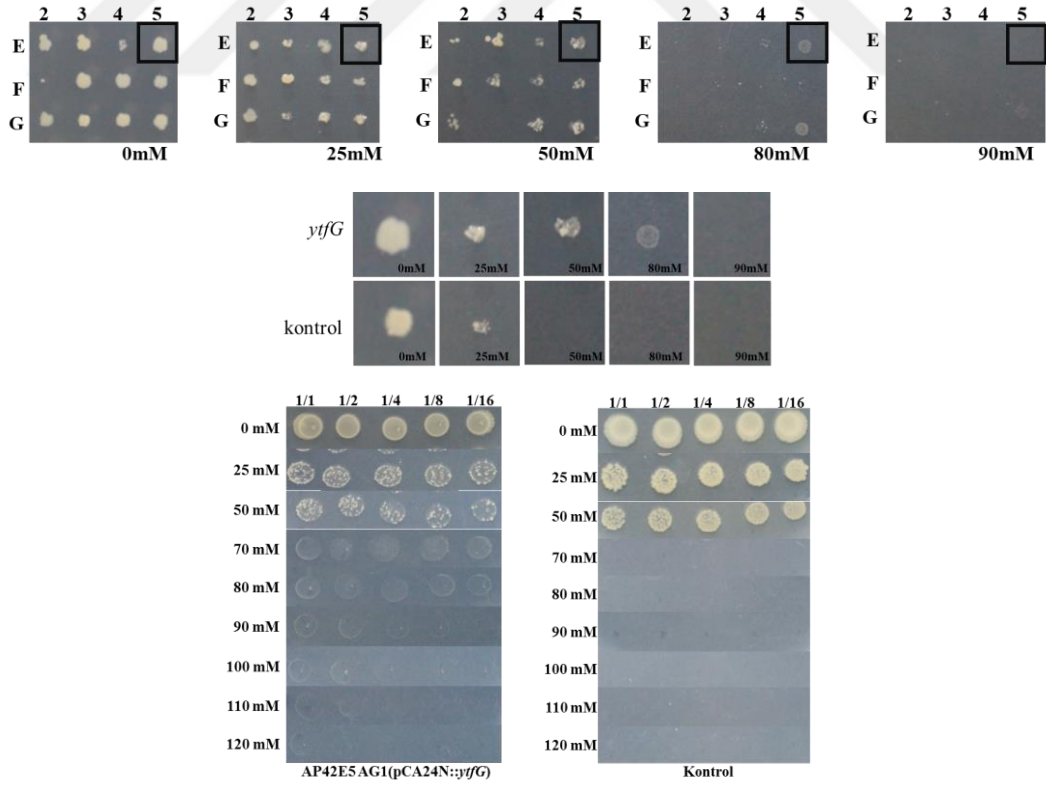
Şekil 3.30. P36H4 (*rfaQ*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



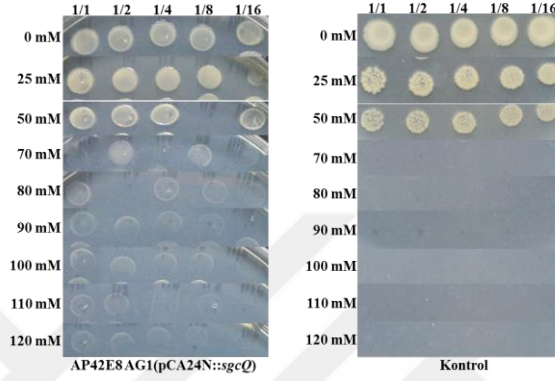
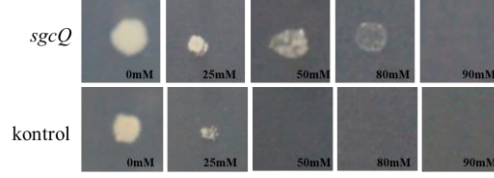
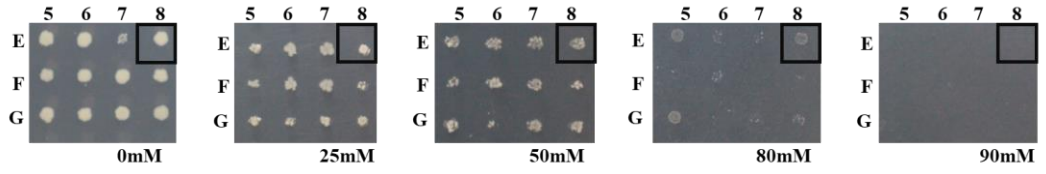
Şekil 3.31. P37A8 (*yjcF*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



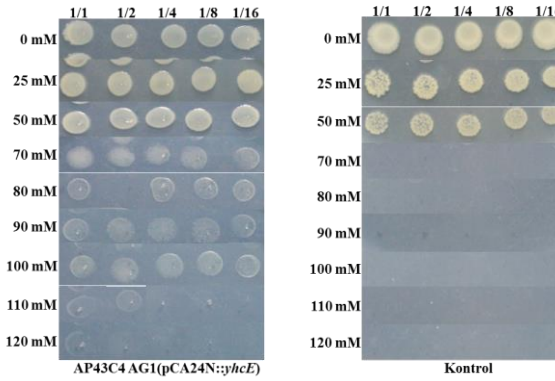
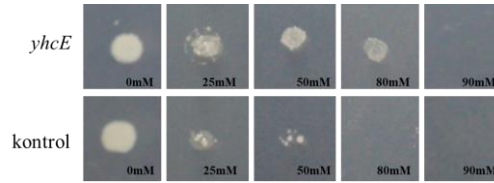
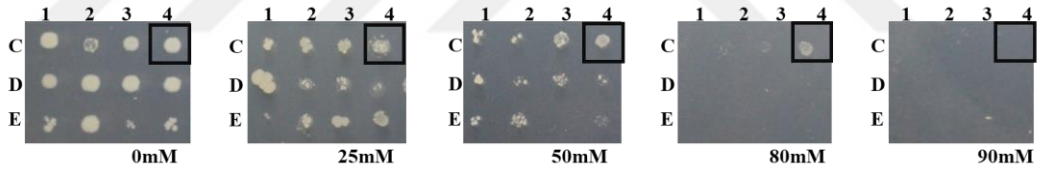
Şekil 3.32. P40F3 (*sgbE*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



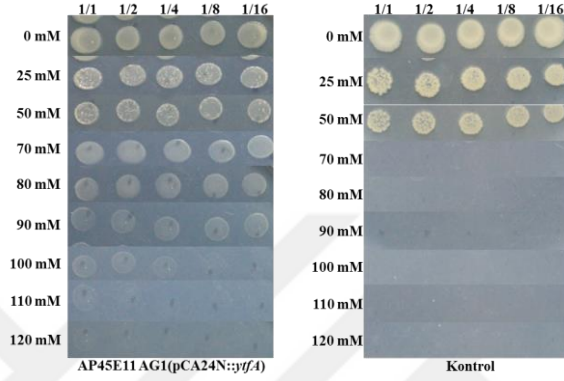
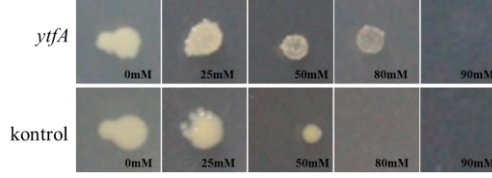
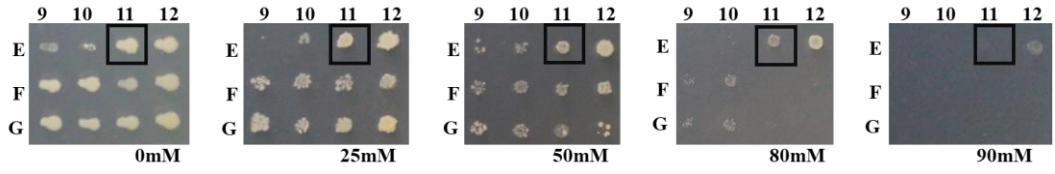
Şekil 3.33. P42E5 (*ytfG*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



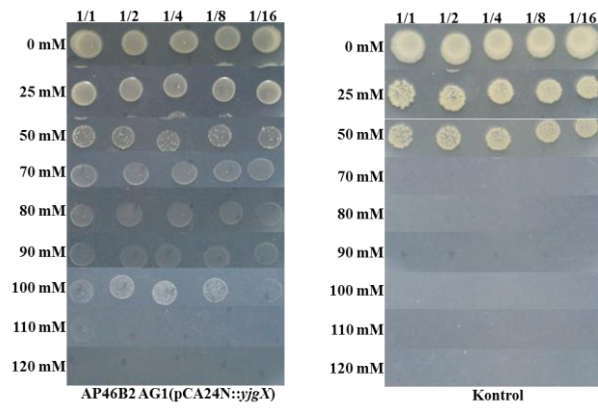
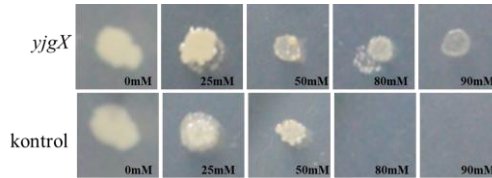
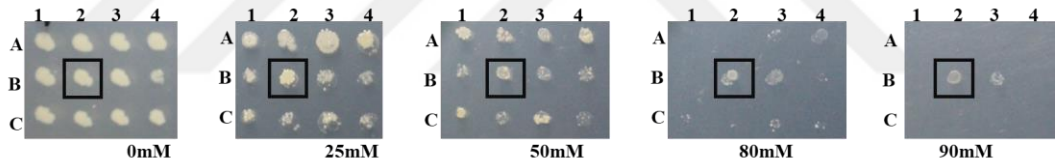
Şekil 3.34. P42E8 (*sgcQ*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



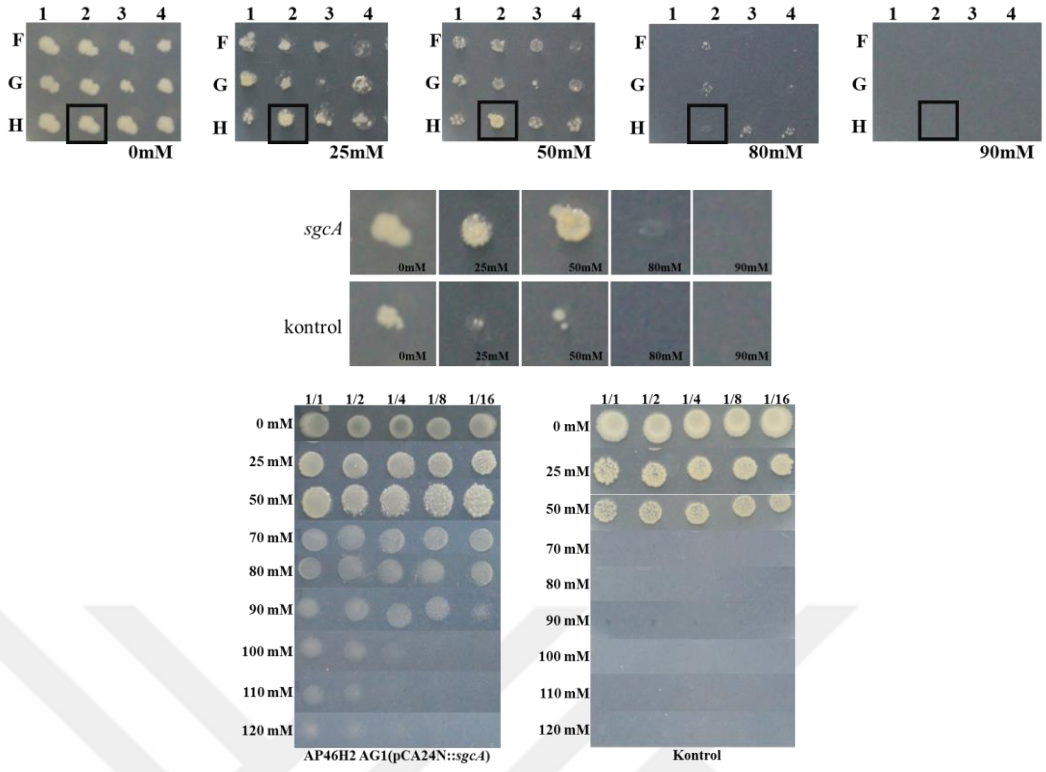
Şekil 3.35. P43C4 (*yhce*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



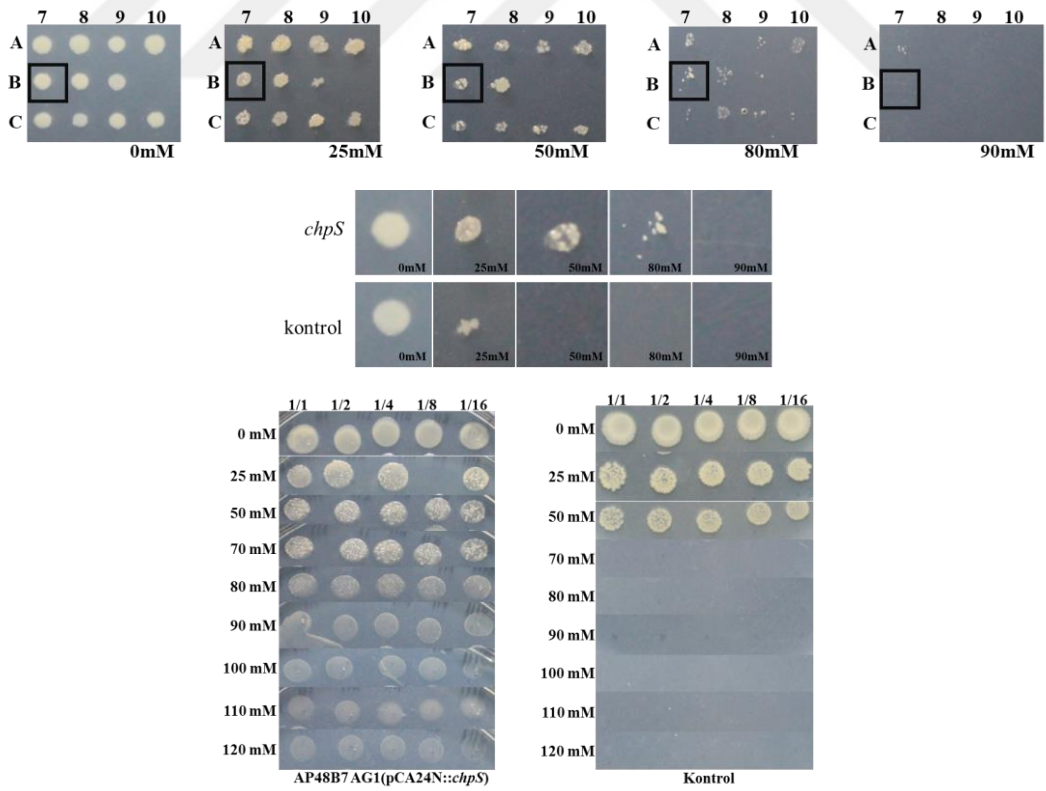
Şekil 3.36. P45E11 (*ytfA*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



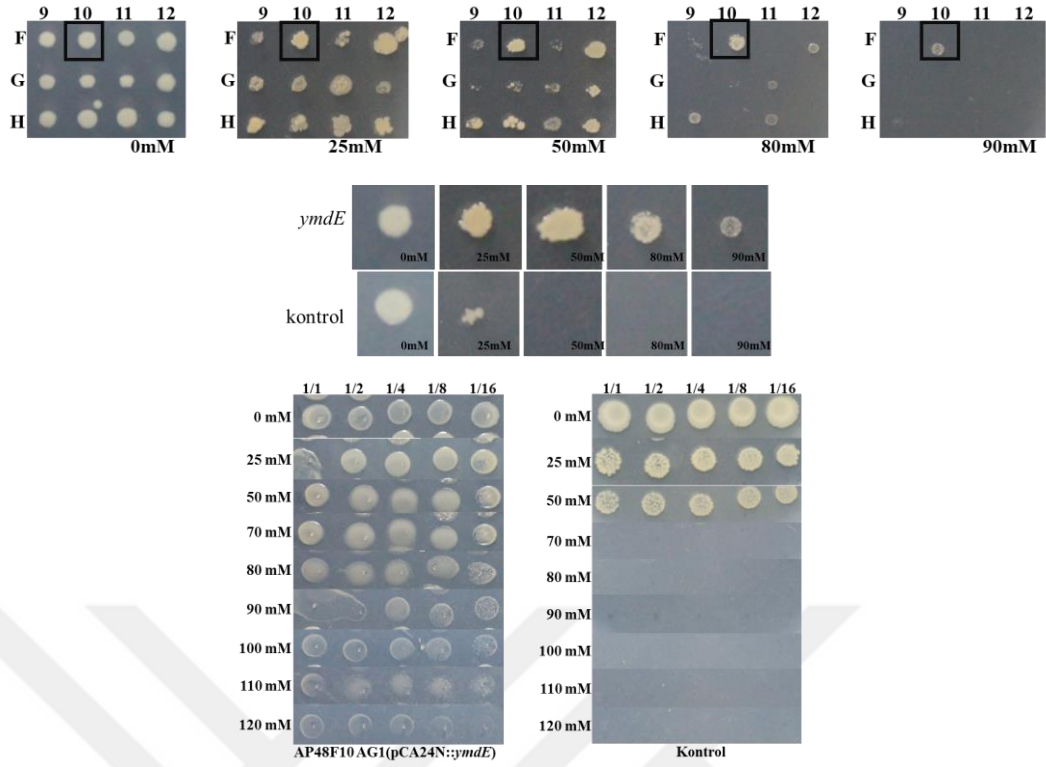
Şekil 3.37. P46B2 (*yfgX*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



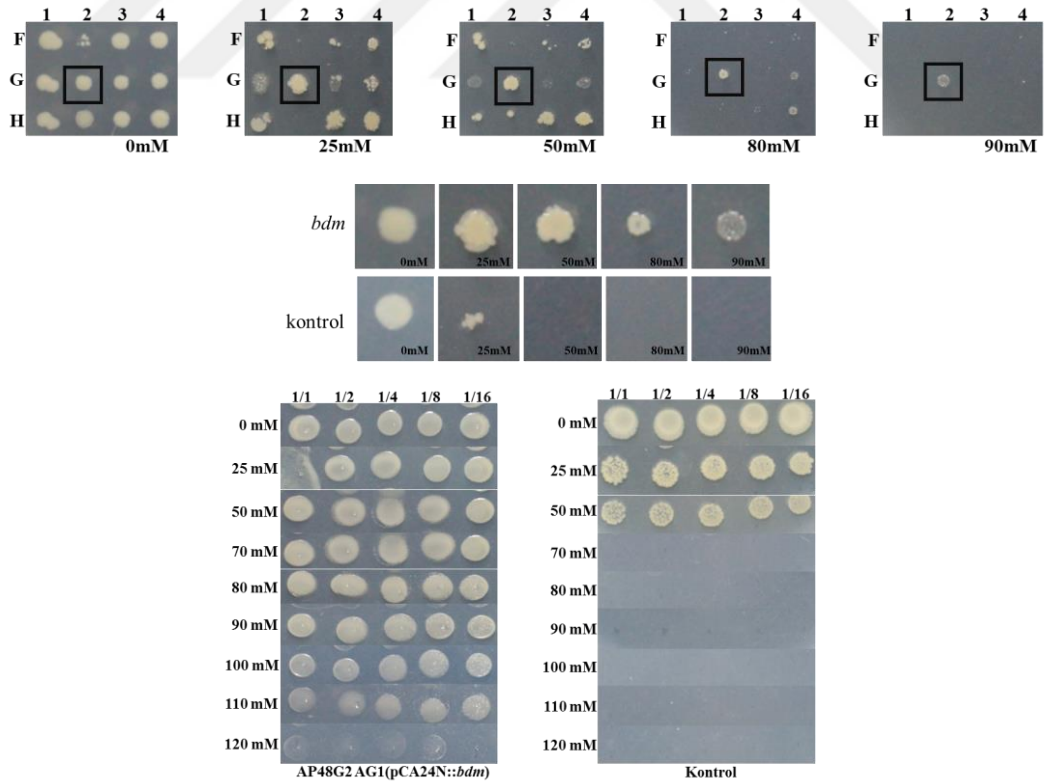
Şekil 3.38. P46H2 (*sgcA*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



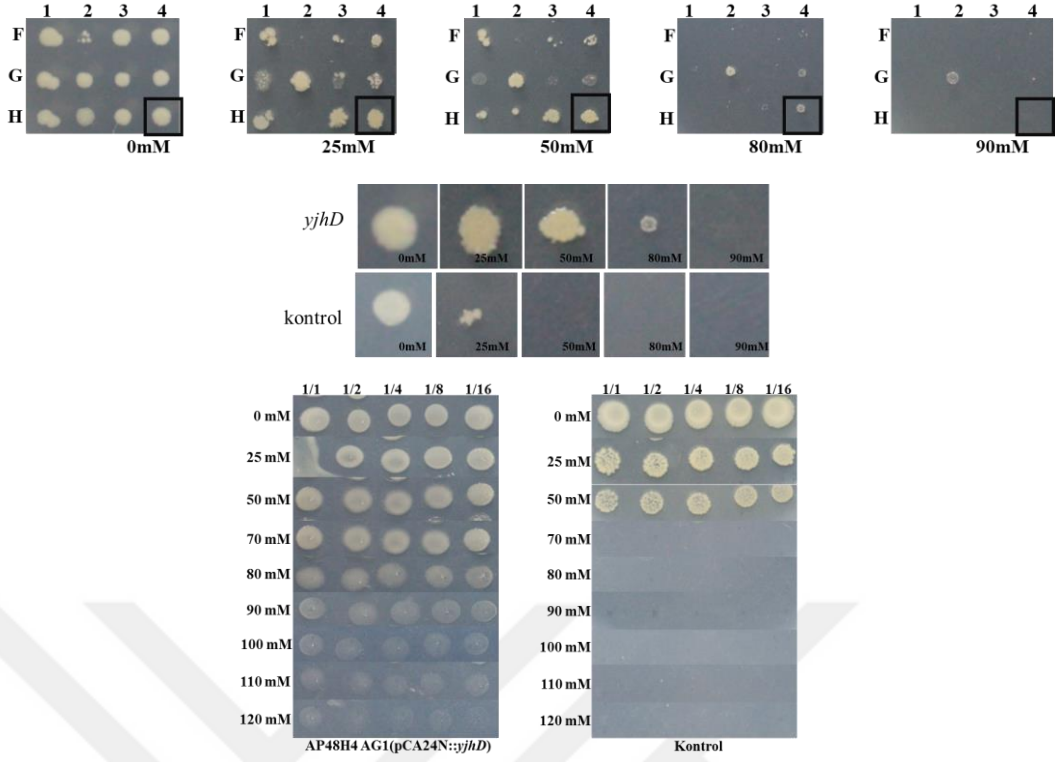
Şekil 3.39. P48B7 (*chpS*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



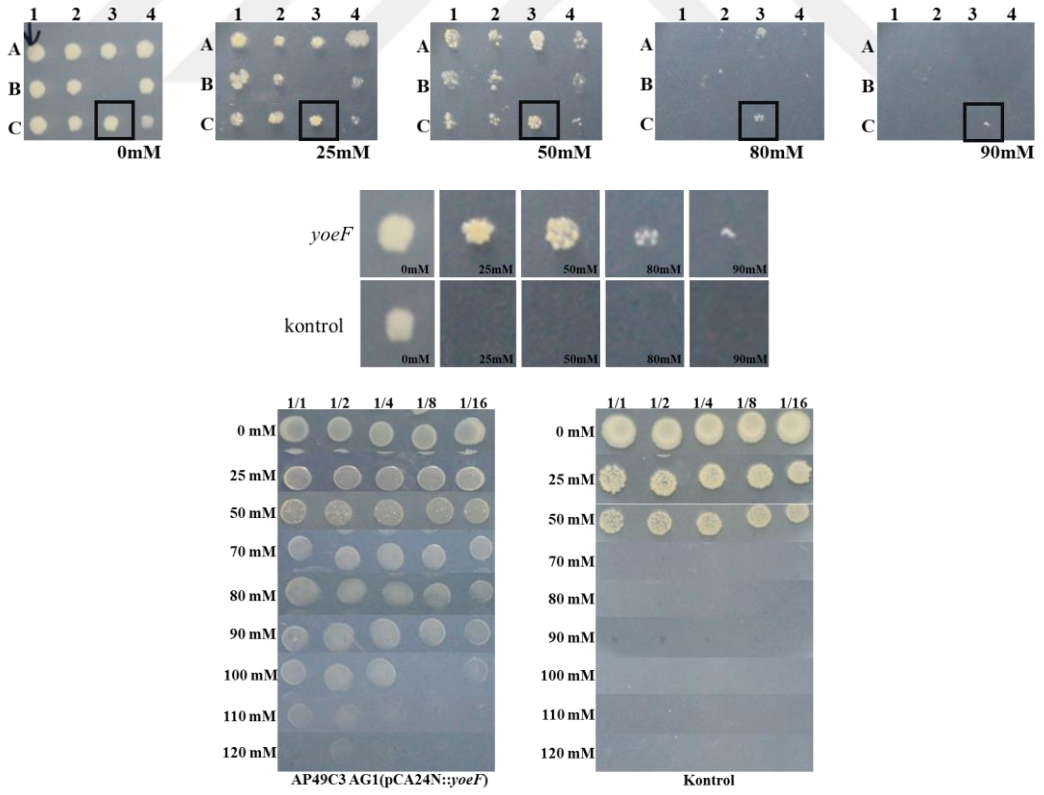
Şekil 3.40. P48F10 (*ymdE*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



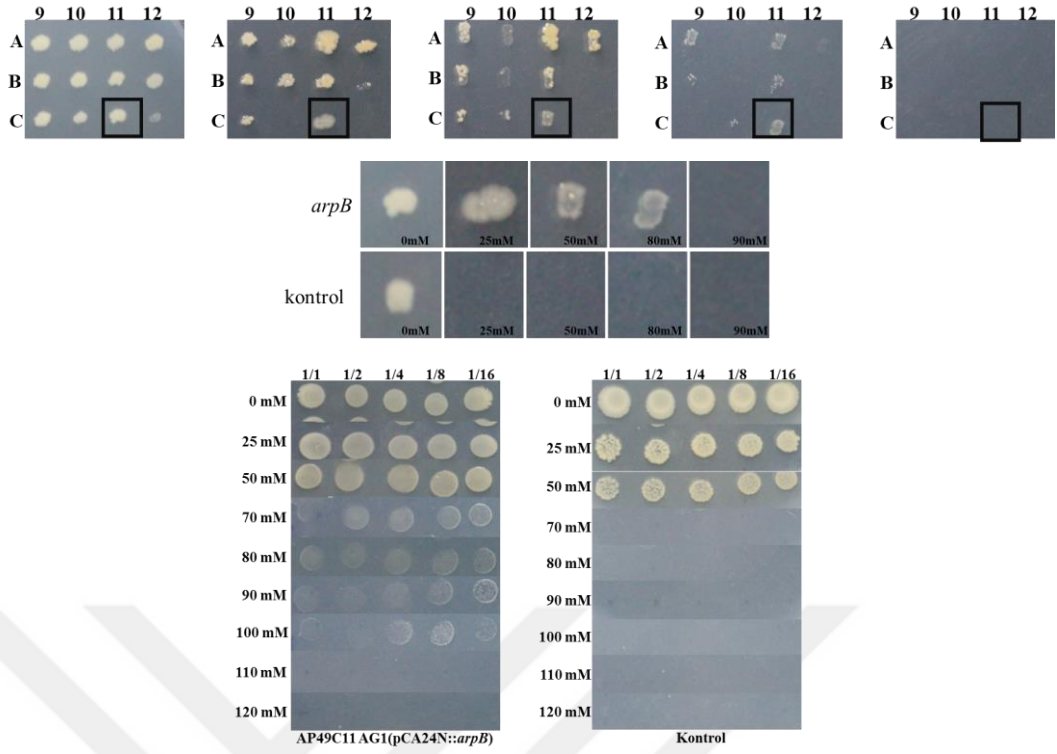
Şekil 3.41. P48G2 (*bdm*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



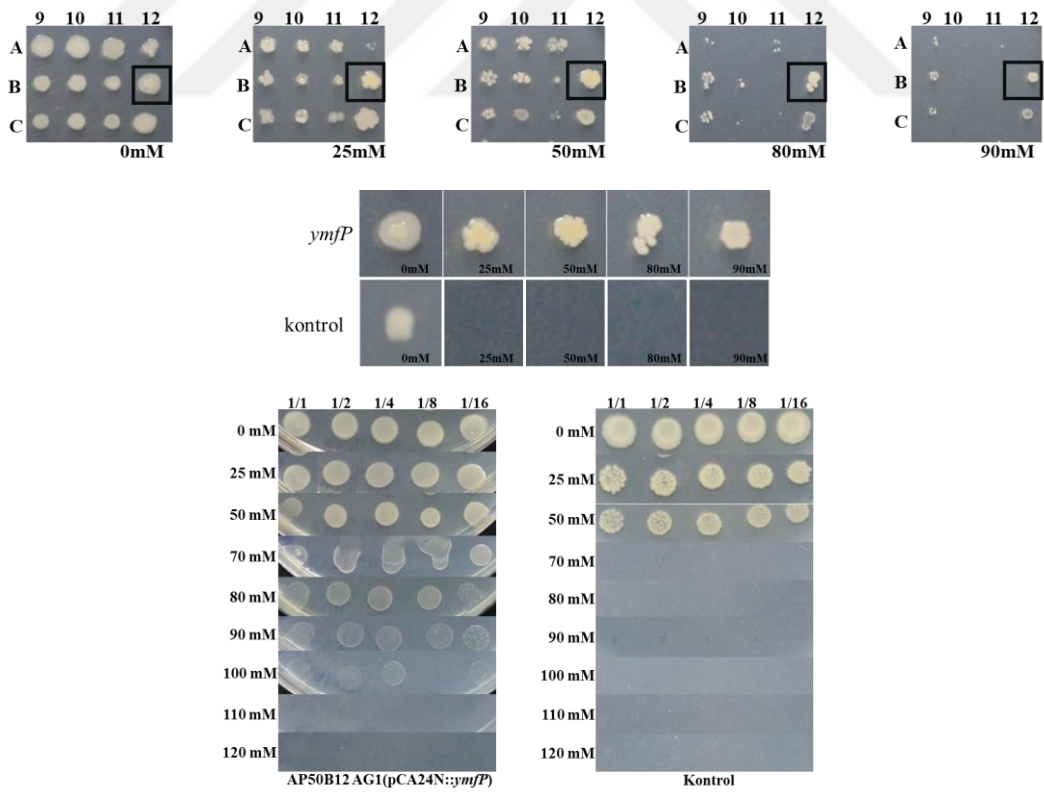
Şekil 3.42. P48H4 (*yjhD*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



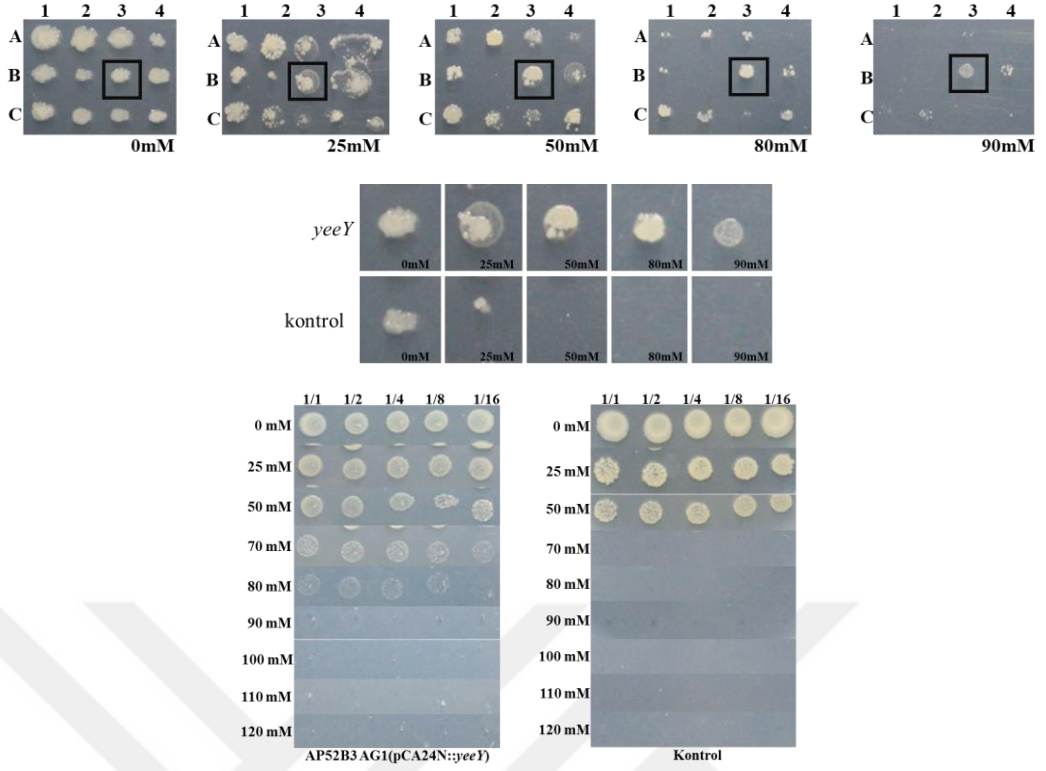
Şekil 3.43. P49C3 (*yoeF*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



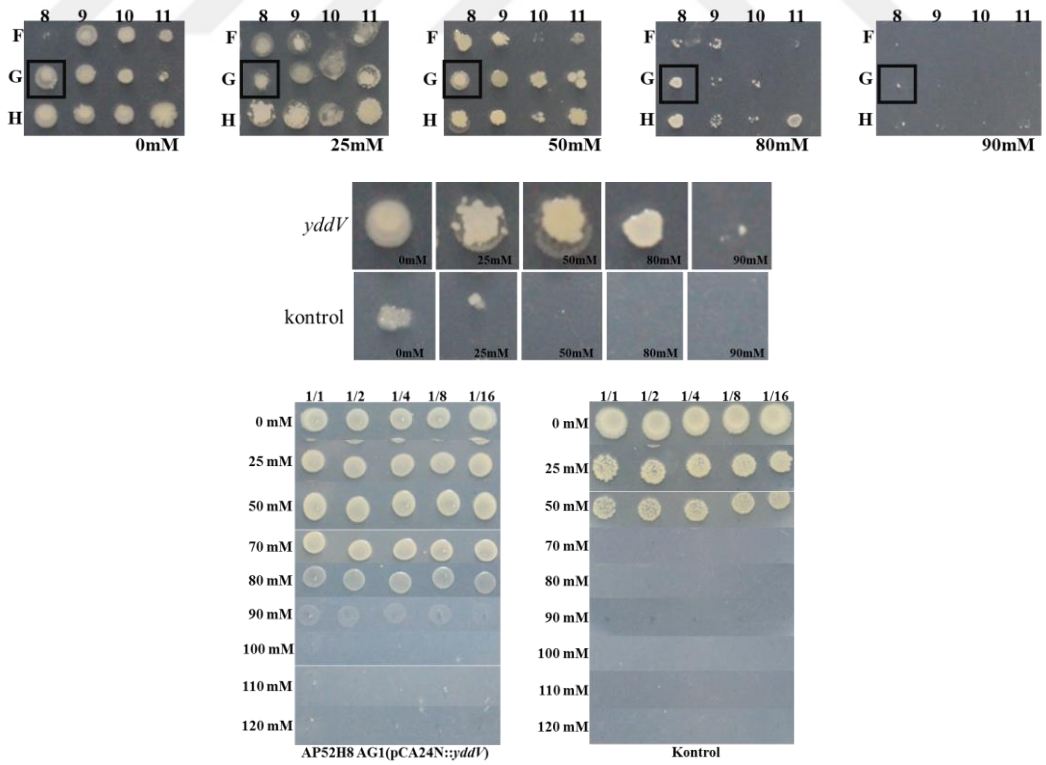
Şekil 3.44. P49C11 (*arpB*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



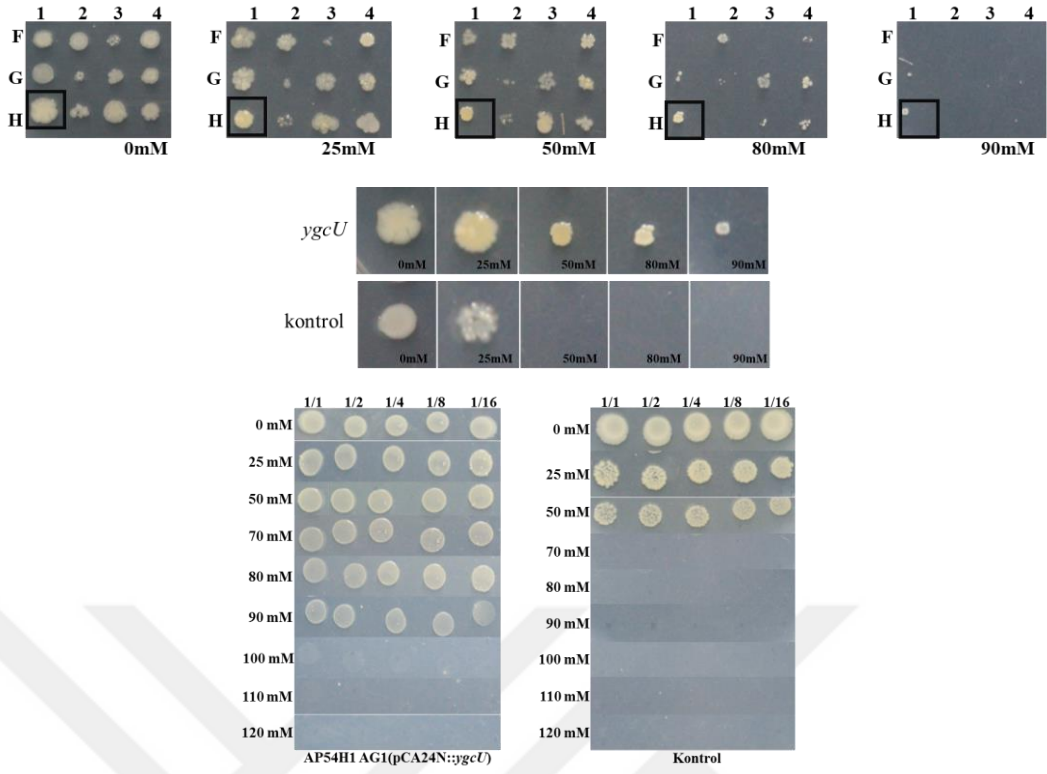
Şekil 3.45. P50B12 (*ymfP*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



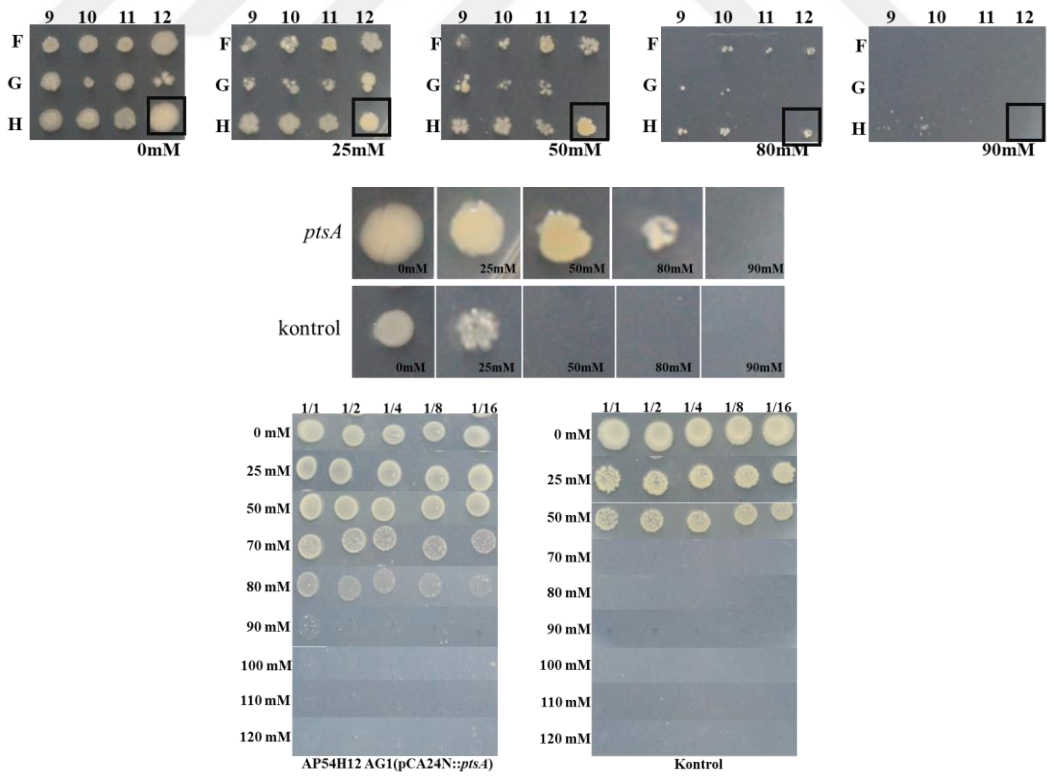
Şekil 3.46. P52B3 (*yeeY*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



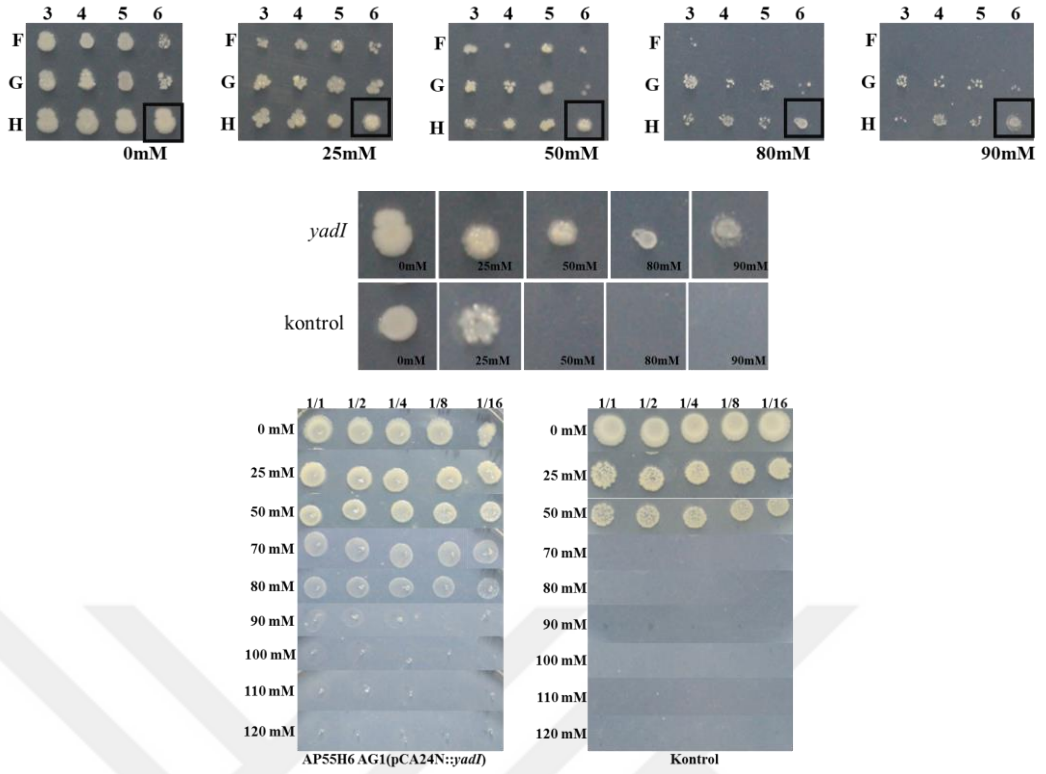
Şekil 3.47. P52H8 (*yddV*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



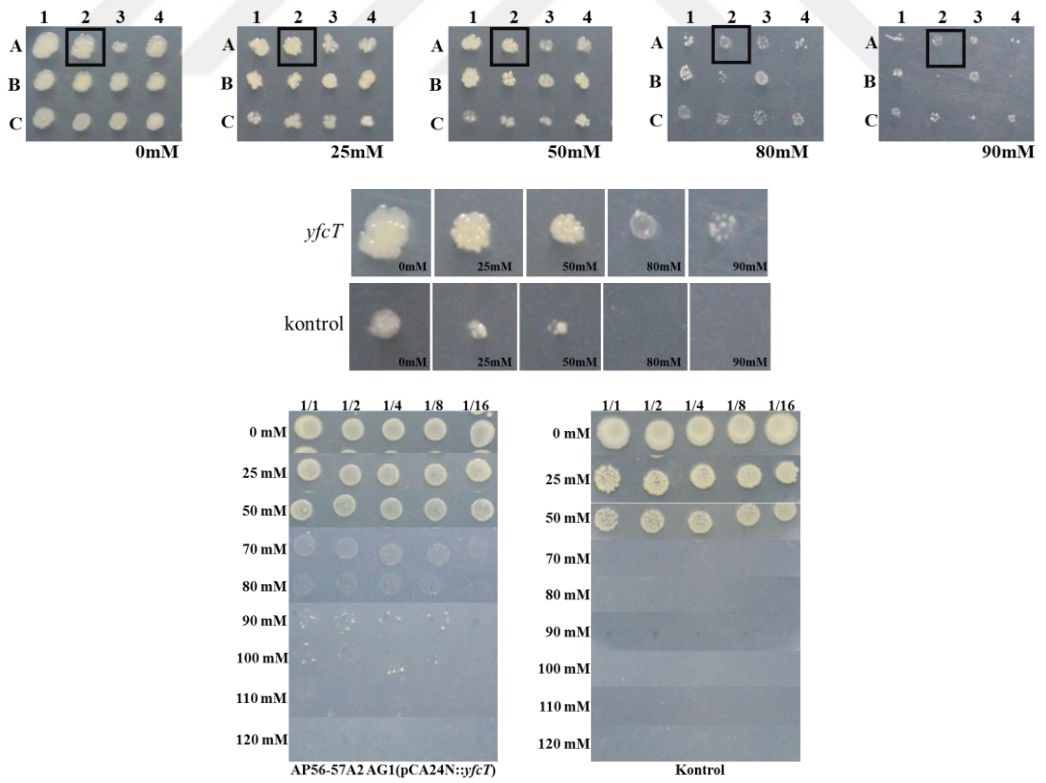
Şekil 3.48. P54H1 (*ygcU*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



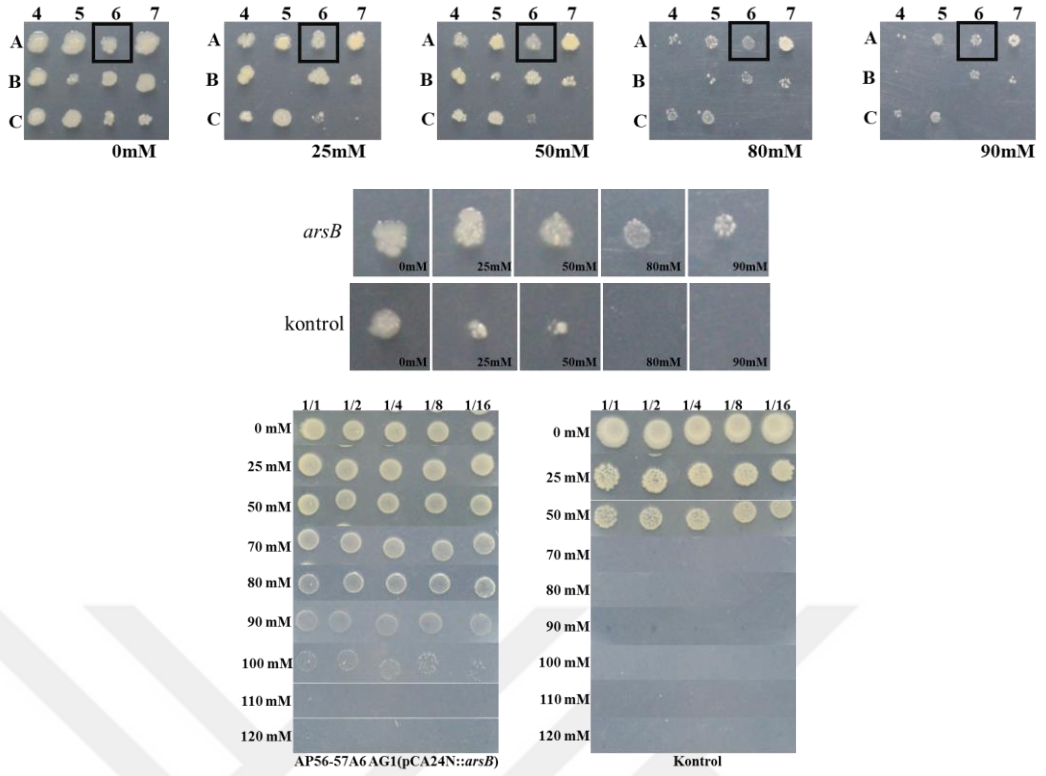
Şekil 3.49. P54H12 (*ptsA*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



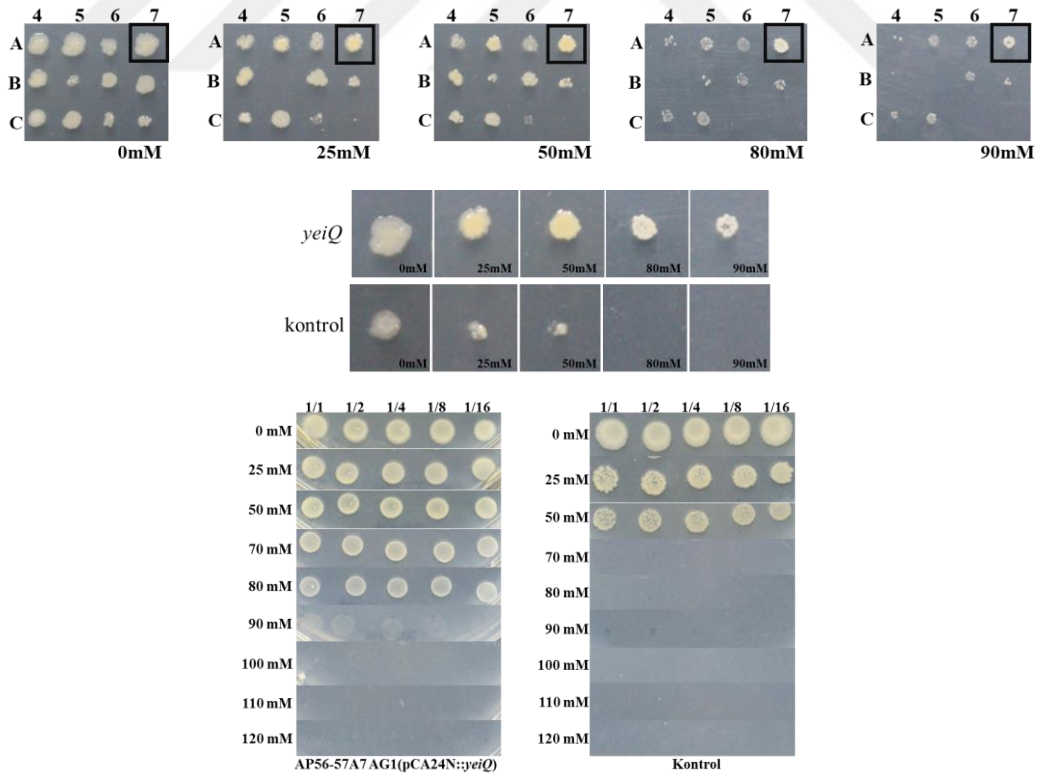
Şekil 3.50. P55H6 (*yadI*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



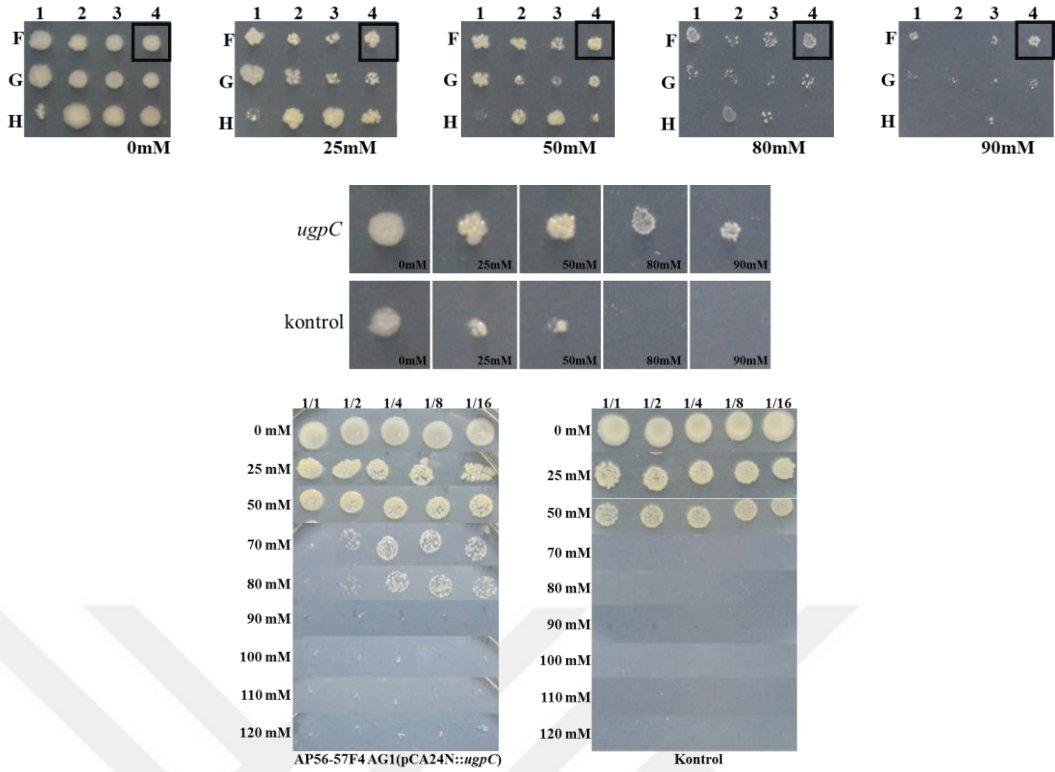
Şekil 3.51. P56A2 (*yfcT*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



Şekil 3.52. P56A6 (*arsB*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



Şekil 3.53. P56A7 (*yeiQ*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler



Şekil 3.54. P56F4 (*ugpC*) klonunun replikatör ile GBT-33 sonuçları ve bor tolerans nokta testi sonucu elde edilen görüntüler

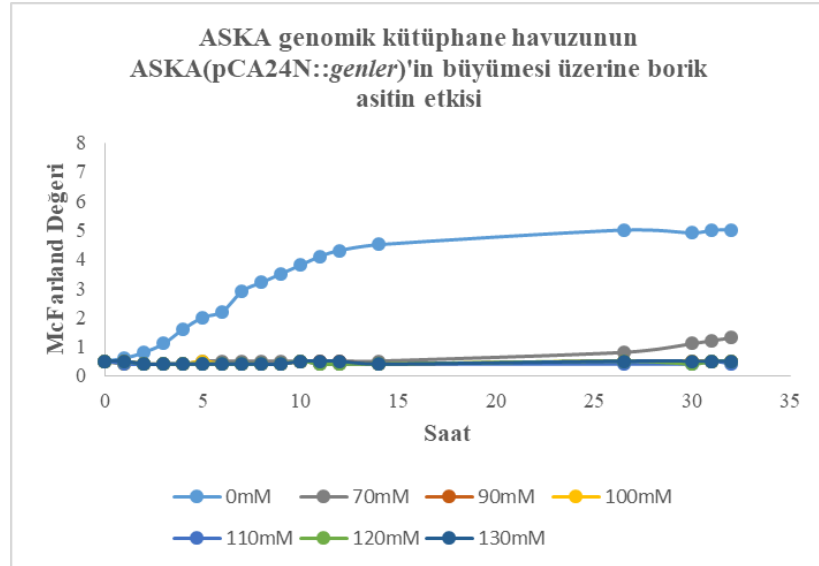
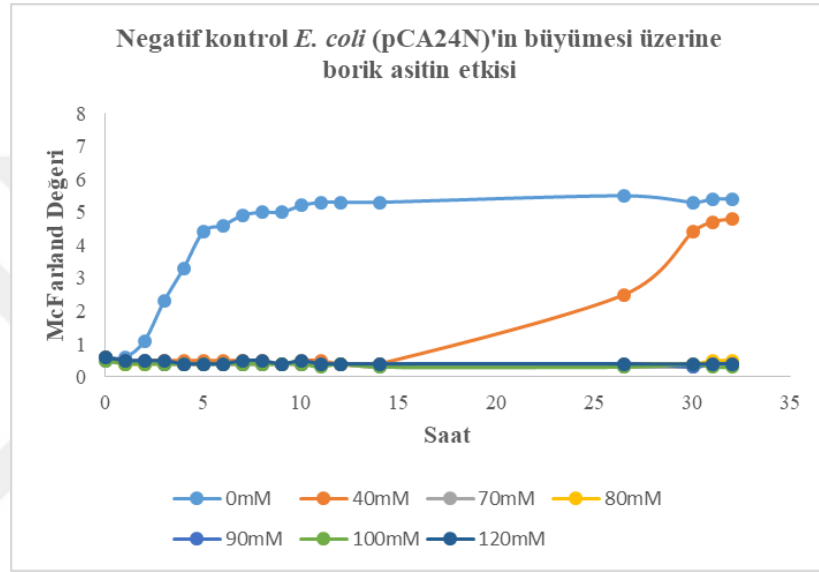
3.2. Genom Boyu Kütüphane Havuzu ile Yapılan Seleksiyon ve Optimizasyon Deneyleri

ASKA genom boyu kütüphane havuzu elde edilmiştir. Bu havuzun, ilk olarak, büyüme eğrisi belirlenmiştir. Ardından zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon yapılmıştır. Seleksiyon sonrası göreceli olarak yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında yaşayan tolerant klonlar belirlenmiştir. Onaylama çalışmalarından sonra seçilen klonların, plazmidlerinde taşıdıkları gen bilgilerinin belirlenmesi için sekans analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Genom boyu kütüphane havuzunun oluşturulması ve farklı borik asit konsantrasyonlarında büyüme eğrisinin belirlenmesi

ASKA genomik kütüphane havuzu, genom boyu tarama deneyleri devam ederken bir araya getirilmiş ve stok olarak saklanmıştır. Tüm ASKA klonlarını içeren bu

havuzun borik asit içermeyen ve 70 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM borik asit ve 100 μ M IPTG içeren LB-cm besi ortamlarında (negatif kontrol ile paralel olarak) büyüme eğrisi deneyleri yapılmıştır. Negatif kontrol olarak *E. coli* (pCA24N) kullanılmış olup, borik asit içermeyen ve 40 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 120 mM borik asit ve 100 μ M IPTG içeren LB-cm besi ortamlarında büyüme eğrisi deneyleri yapılmıştır. Negatif kontrolün en fazla 40 mM borik asit içeren ortamda büyüdüğü, ASKA genomik kütüphane havuzunun ise 70 mM borik asit içeren ortamda az üreme gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.55.).



Şekil 3.55. Negatif kontrol (üstte) ve ASKA genomik kütüphane havuzunun farklı borik asit konsantrasyonlarında elde edilen büyüme eğrisi grafiği

3.2.2. Zenginleştirme ile seleksiyon çalışmaları

35 saatin sonunda büyüme eğrisi çalışmalarından gelen örnekler kullanılarak, zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon yapılmıştır. Üç günün sonunda, tolerant klonların seçilebilmesi için katı besi ortamlarına ekimler yapılmıştır. ASKA genomik kütüphane havuzunda gelen tolerant klonların ve negatif kontrolün üreme durumları değerlendirilmiştir (Çizelge 3.7. - Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.7. Negatif kontrolün (Erlen) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları

Petriler Tüpler	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
70 mM	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme
90 mM	Smear üreme		Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme
100 mM	Smear üreme			Fazla koloni	Üreme yok	Üreme yok
120 mM	Fazla koloni					Üreme yok

Çizelge 3.8. ASKA genomik kütüphane havuzunun (Erlen) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları

Petriler Tüpler	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
70 mM	Smear üreme	12 koloni	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme
90 mM	Smear üreme		23 koloni	Üreme yok	Smear üreme	Üreme yok
100 mM	Smear üreme			Üreme yok	2 koloni	Üreme yok
110 mM	Fazla koloni				Üreme yok	Üreme yok

Çizelge 3.9. Negatif kontrolün (tüp) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları

Petriler Tüpler	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
70 mM	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Az üreme	Az üreme	Üreme yok
90 mM	Smear üreme		Fazla koloni	Fazla koloni	Üreme yok	Üreme yok
100 mM	Smear üreme			Fazla koloni	Üreme yok	Üreme yok
120 mM	Fazla koloni					Üreme yok

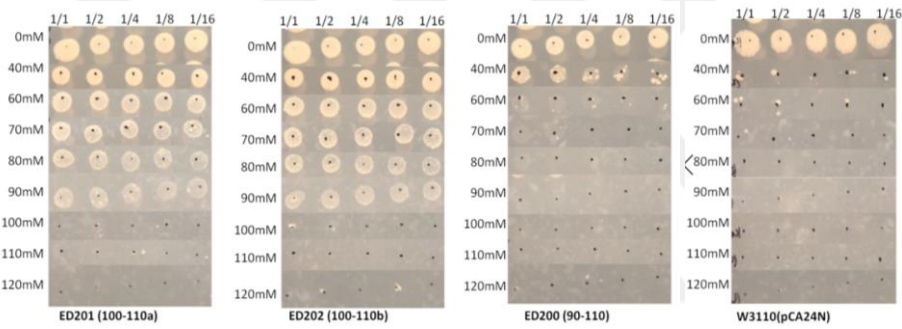
Çizelge 3.10. ASKA genomik kütüphane havuzunun (tüp) borik asit içeren katı besi ortamlarında üreme durumları

Petriler Tüpler	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
70 mM	Smear üreme	Smear üreme	Smear üreme	Az üreme	Az üreme	Üreme yok
90 mM	Smear üreme		Üreme yok	Üreme yok	1 koloni	Üreme yok
100 mM	Smear üreme			Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok
110 mM	Smear üreme				Üreme yok	Üreme yok
120 mM	Fazla koloni					1 koloni

Deney sonucunda 3 adet koloninin 110 mM ve 1 adet koloninin 120 mM borik asit içeren besi ortamında üreme gösterdiği gözlenmiş ve onaylama çalışmalarına geçilmiştir.

3.2.3. Bor tolerans nokta testi

Bor ile seleksiyon sonrası seçilen 4 adet koloni, borik asit içermeyen LB-cm besi ortamlarında çoğaltılmıştır. 120 mM borik asit içeren ortamından seçilen koloni LB-cm besi ortamında üreme göstermemiştir. Diğer üç adet koloninin bor tolerans nokta testi yapılmıştır. 0 mM, 40 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM borik asit ve 100 µM IPTG içeren LB-cm besi ortamları kullanılmıştır (Şekil 3.56.).



Şekil 3.56. Bor tolerans nokta testi sonuçları

3 adet koloninin yüksek borik asit konsantrasyonu içeren ortamlarda üreme gösterdiği tespit edilmiş ve kontrol suşlarının bu yüksek konsantrasyonlarda üreme göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 3.11.). Bu üç adet klonun sekans verileri Blast analizine tabii tutulmuştur (Çizelge 3.12.).

Çizelge 3.11. Bor tolerans nokta testi sonuçları

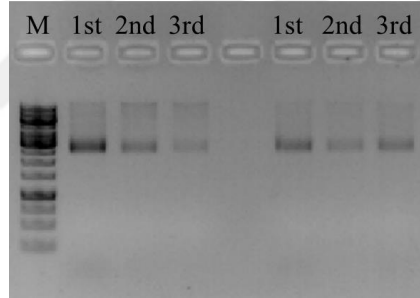
No	0mM	40mM	60mM	70mM	80mM	90mM	100mM	110mM	120mM
200	*****	**^人人	^^^..	^----	^----	-----	-----	-----	-----
201	*****	*****	*****	*****	*****	*****	-----	-----	-----
202	*****	*****	*****	*****	*****	*****	-----	-----	-----
kont	*****	人人人人	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Çizelge 3.12. Toleranslı klonların sekans analizleri sonuçları

Plazmid adı	Eşleşen aktivite adı	Gen adı	Eşleşme oranı	Benzerlik	Veritabanı
pED200	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	<i>dtd</i>	%49	%100	ncbi_blastx
	D-aminoacyl-tRNA deacylase	<i>dtd</i>		%100	ecocyc blastx
pED201 ve 202	InsAB' transposase			%100	ecocyc blastx

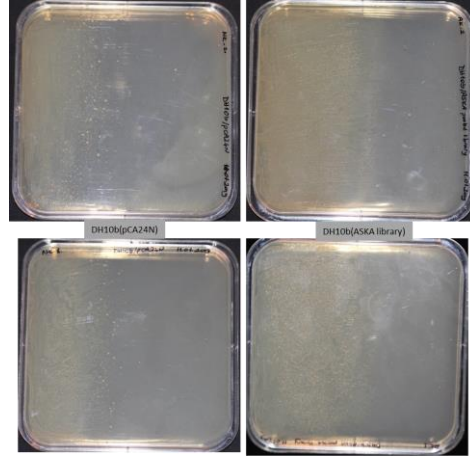
3.2.4. DH10b - ASKA genom boyu kütüphane havuzunun gradient ekim, direkt ekim ve zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon sonuçları

Önceki deneysel çalışmalar sonucunda ASKA genomik kütüphane havuzu pellet olarak elde edilmiş ve -80°C'de saklanmıştı. ASKA plazmid kütüphanesinin elde edilmesi için bu pelletlerden ticari bir kit ile (GeneAll 101-150) plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonun başarısı agaroz jel elektroforezi ile gösterilmiştir (Şekil 3.57.)



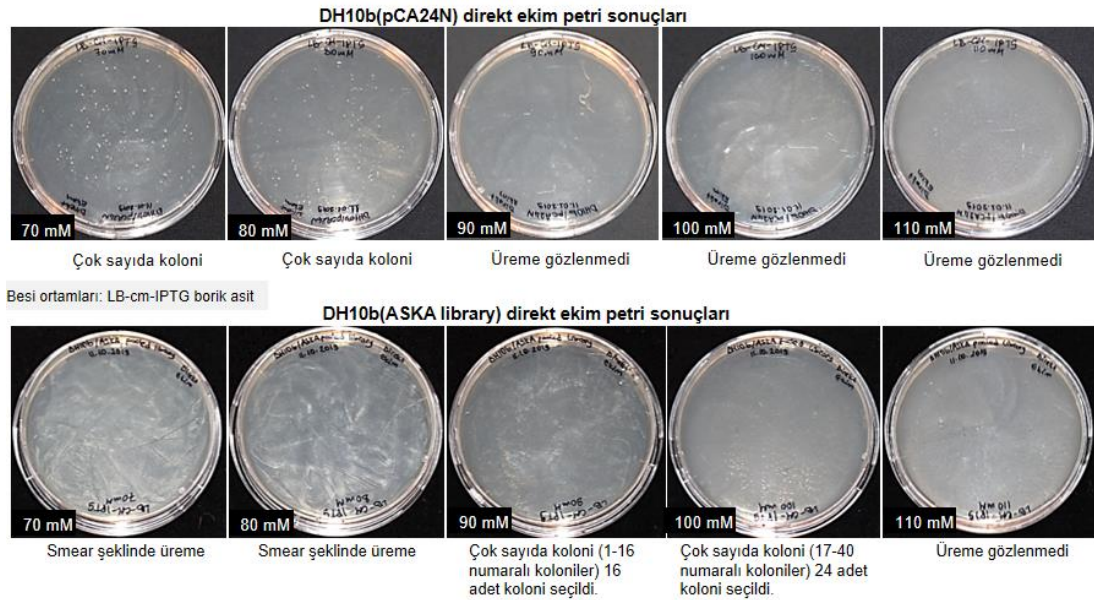
Şekil 3.57. ASKA kütüphanesinden elde edilen plazmid izolasyonunun agaroz jel görüntüsü

İzole edilen plazmidler, DH10b kompetant hücrelere ısı şoku yöntemi ile tranforme edilmiştir. Elde edilen binlerce koloni bir araya getirildikten sonra ilk olarak gradient besi ortamına yayma ekim yapılmıştır. Gradient ekim sonuçları değerlendirildiğinde, kolonilerin tek tek düşmediği, bir yayılma söz konusu olduğu için, toleranslı olan klonların seçimi yapılamamıştır (Şekil 3.58.). Şekilde, sağ taraftaki petriyerler negatif kontrol, sol taraftakiler DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 3.58. Gradient ekimlerin sonuçları gösteren petri fotoğrafları

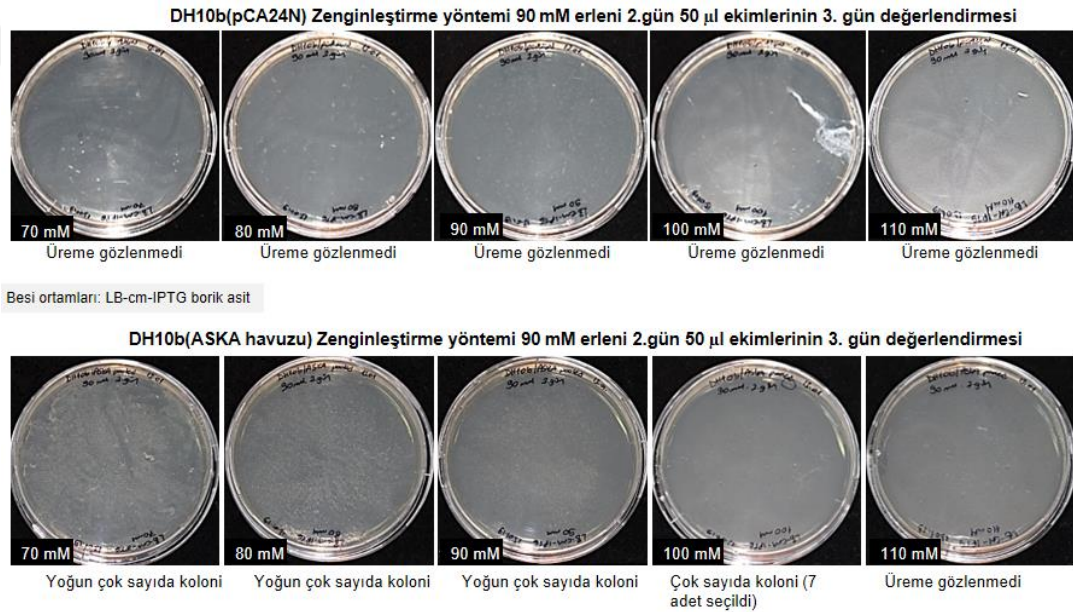
Aynı zamanda direkt ekim ile seleksiyon yapılmıştır. Borik asit içermeyen ve 70 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM borik asit içeren besi ortamlarına yapılan yayma ekim sonucu koloniler değerlendirilmiştir. Direkt ekim sonuçlarında, DH10b(pCA24N) (negatif kontrol) değerlendirildiğinde 100 mM ve 110 mM borik asit içeren besi ortamlarında üreme gözlenmemiştir. DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu ile yapılan direkt ekim sonuçlarında, 100 mM ve 110 mM borik asit içeren besi ortamlarında çok sayıda koloninin üreme gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.59.) ve bunlardan 40 tanesi onaylama deneylerine alınmak üzere seçilmiştir.



Şekil 3.59. Borik asit içeren besi ortamlarına yapılan direkt ekim sonuçlarını gösteren petri fotoğrafları

Zenginleştirme yönteminde 3 gün boyunca seleksiyon yapılmış, ardından 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM borik asit içeren katı besi ortamlarında, negatif kontrol ile karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.60. - Şekil 3.65.). Bu kolonilerden 128 tanesi onaylama çalışmalarına alınmıştır.

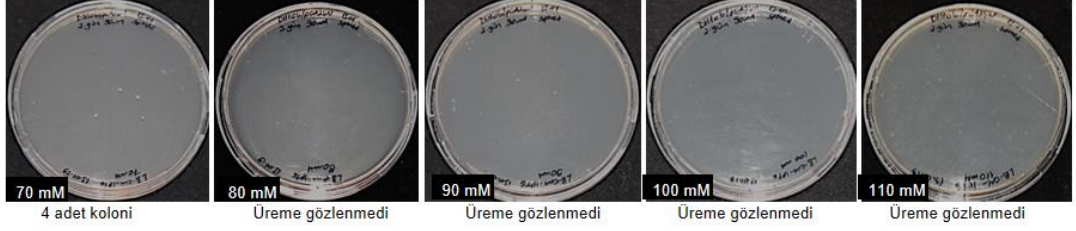
Şekil 3.60.'da görüldüğü üzere, 90 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b (pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri (50 µl) yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.



Şekil 3.60. 90 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

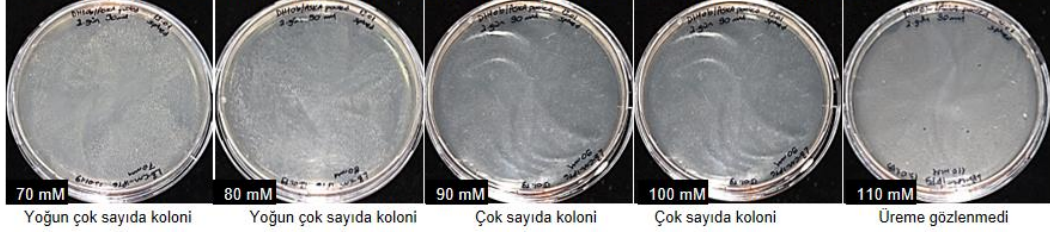
Şekil 3.61.'da görüldüğü üzere, 90 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b(pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde hücreler 8000g'de 3dk santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri elde edilmiştir. Pelletler 50 µl LB besi ortamı ile çözüldükten sonra, farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.

DH10b(pCA24N) Zenginleştirme yöntemi 90 mM erleni erleni 2.gün spin sonrası yapılan ekimlerin 3. gün değerlendirmesi



Besi ortamları: LB-cm-IPTG borik asit

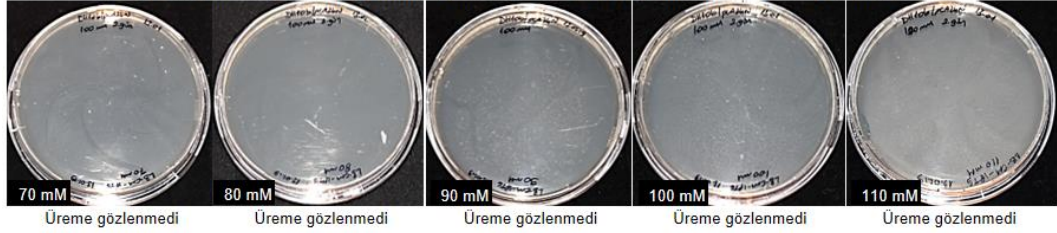
DH10b(ASKA havuzu) Zenginleştirme yöntemi 90 mM erleni 2.gün spin sonrası yapılan ekimlerin 3. gün değerlendirmesi



Şekil 3.61. 90 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

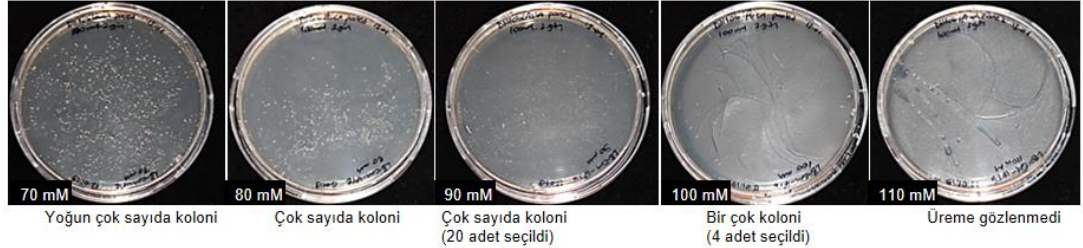
Şekil 3.62.'de görüldüğü üzere, 100 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b (pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri (50 µl) yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.

DH10b(pCA24N) Zenginleştirme yöntemi 100 mM erleni 2.gün 50 µl ekimlerinin 3. gün değerlendirmesi



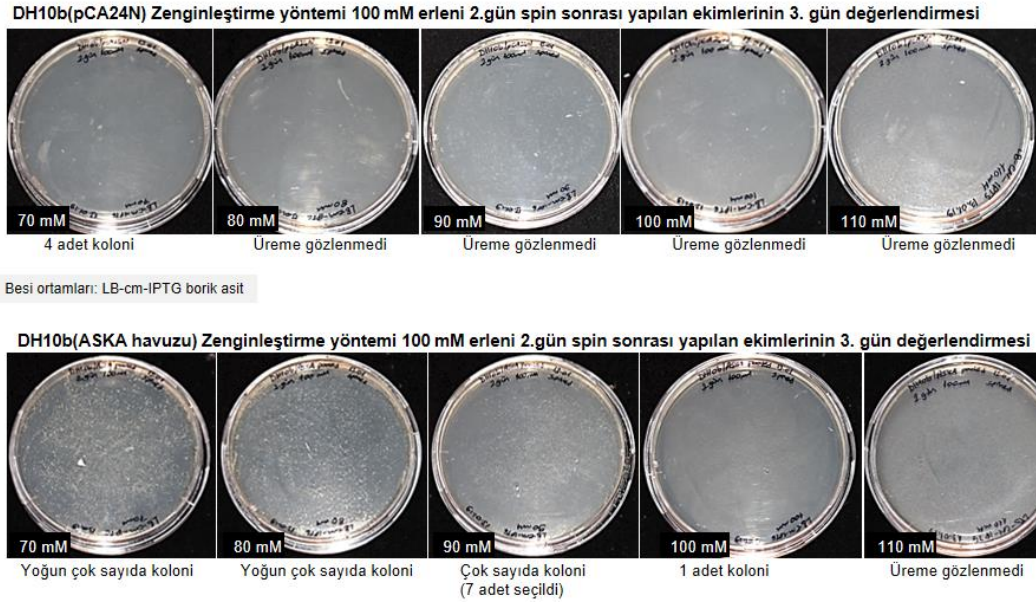
Besi ortamları: LB-cm-IPTG borik asit

DH10b(ASKA havuzu) Zenginleştirme yöntemi 100 mM erleni 2.gün 50 µl ekimlerinin 3. gün değerlendirmesi



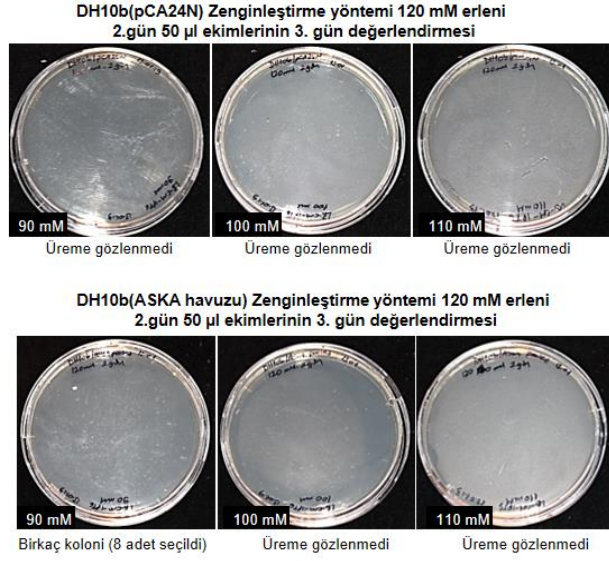
Şekil 3.62. 100 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

Şekil 3.63.'de görüldüğü üzere, 100 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b (pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde hücreler 8000g'de 3dk santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri elde edilmiştir. Pelletler 50 µl LB besi ortamı ile çözüldükten sonra, farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.



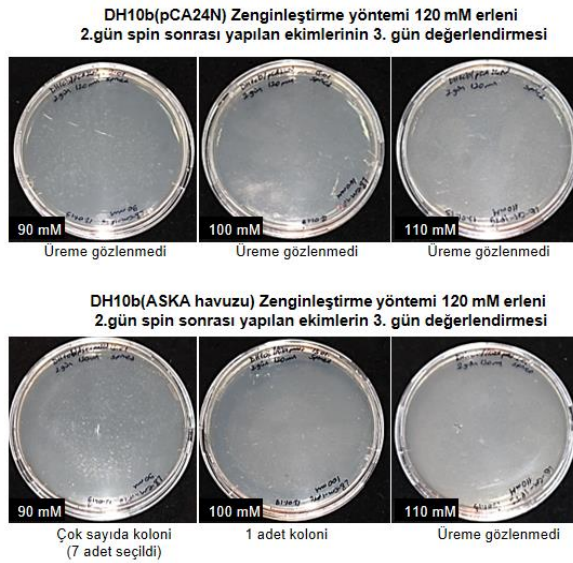
Şekil 3.63. 100 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

Şekil 3.64.'de görüldüğü üzere, 120 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b (pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri (50 µl) yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.



Şekil 3.64. 120 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonucu elde edilen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

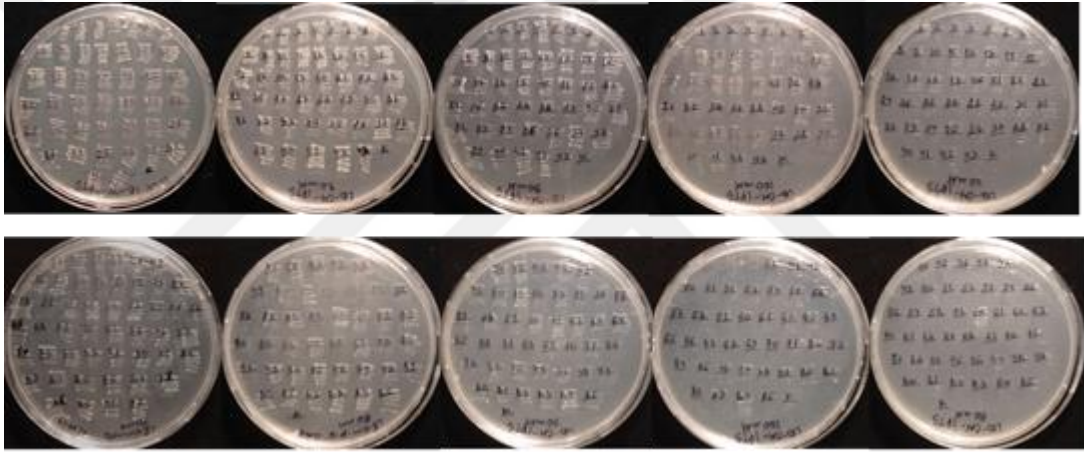
Şekil 3.65.'de görüldüğü üzere, 120 mM borik asit içeren ortamda yetiştirilen DH10b (pCA24N) (üstte) ve DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu (altta) zenginleştirme yönteminin ikinci gününde hücreler 8000g'de 3dk santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri elde edilmiştir. Pelletler 50 µl LB besi ortamı ile çözüldükten sonra, farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarına yayma ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren besi ortamlarında üreme gösteren koloniler seçilmiştir.



Şekil 3.65. 120 mM borik asit içeren ortamdan seleksiyon sonrası çöktürülen hücrelerin farklı borik asit konsantrasyonu içeren katı besi ortamlarındaki üreme durumları

3.2.5. Çizgi ekim yöntemi ile seleksiyon sonuçları

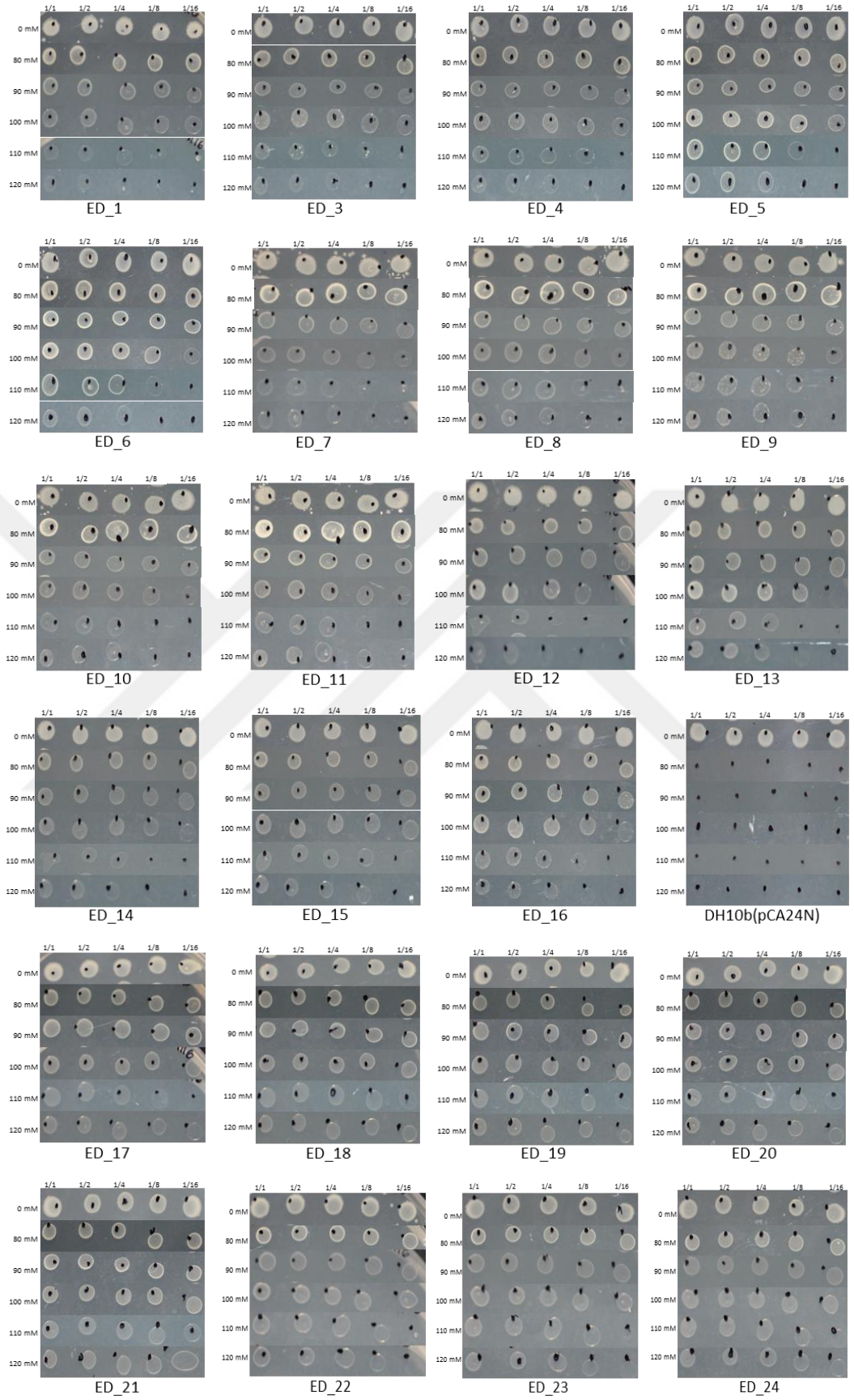
Direkt ekim ve zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon sonucu tolerant olduğu gözlenen 168 adet koloninin canlandırılması için LB-cm besi ortamlarına kürdan ile ekimler yapılmıştır. 37°C etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bu kolonilere tek tek steril kürdan ile dokunularak LB-cm 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM borik asit içeren besi ortamlarına çizgi ekimler yapılmıştır (Şekil 3.66.). 37°C inkübatörde 5 gün inkübasyona bırakılmış ve sonuçta 100 mM ve 110 mM borik asit içeren besi ortamlarında üreme gözlenen koloniler seçilmiştir. Tolerant olduğu gözlenen 65 adet koloni bir diğer onaylama çalışmasına alınmıştır.



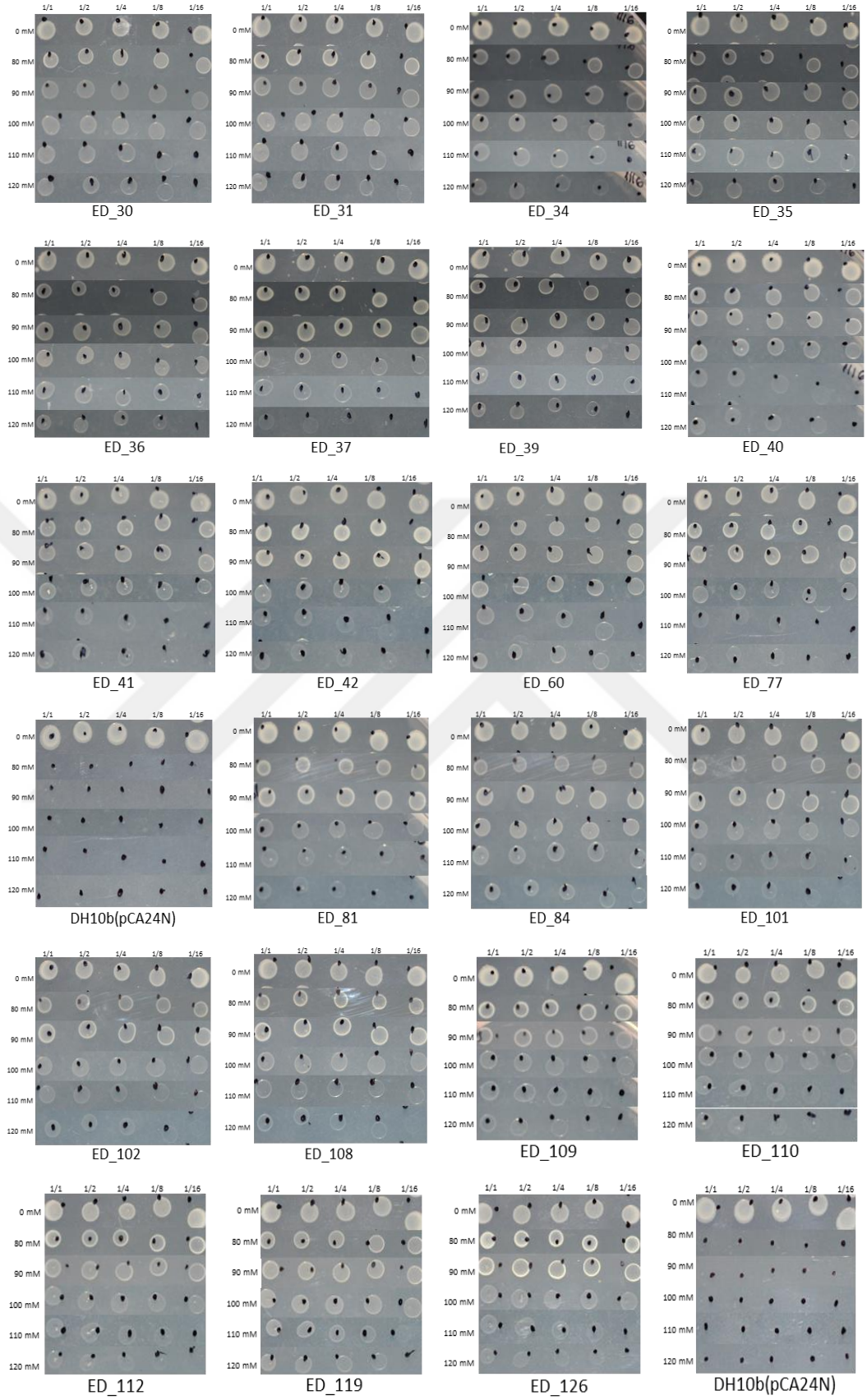
Şekil 3.66. Çizgi ekim petri fotoğraflarından bazıları

3.2.6. Bor tolerans nokta testi sonuçları

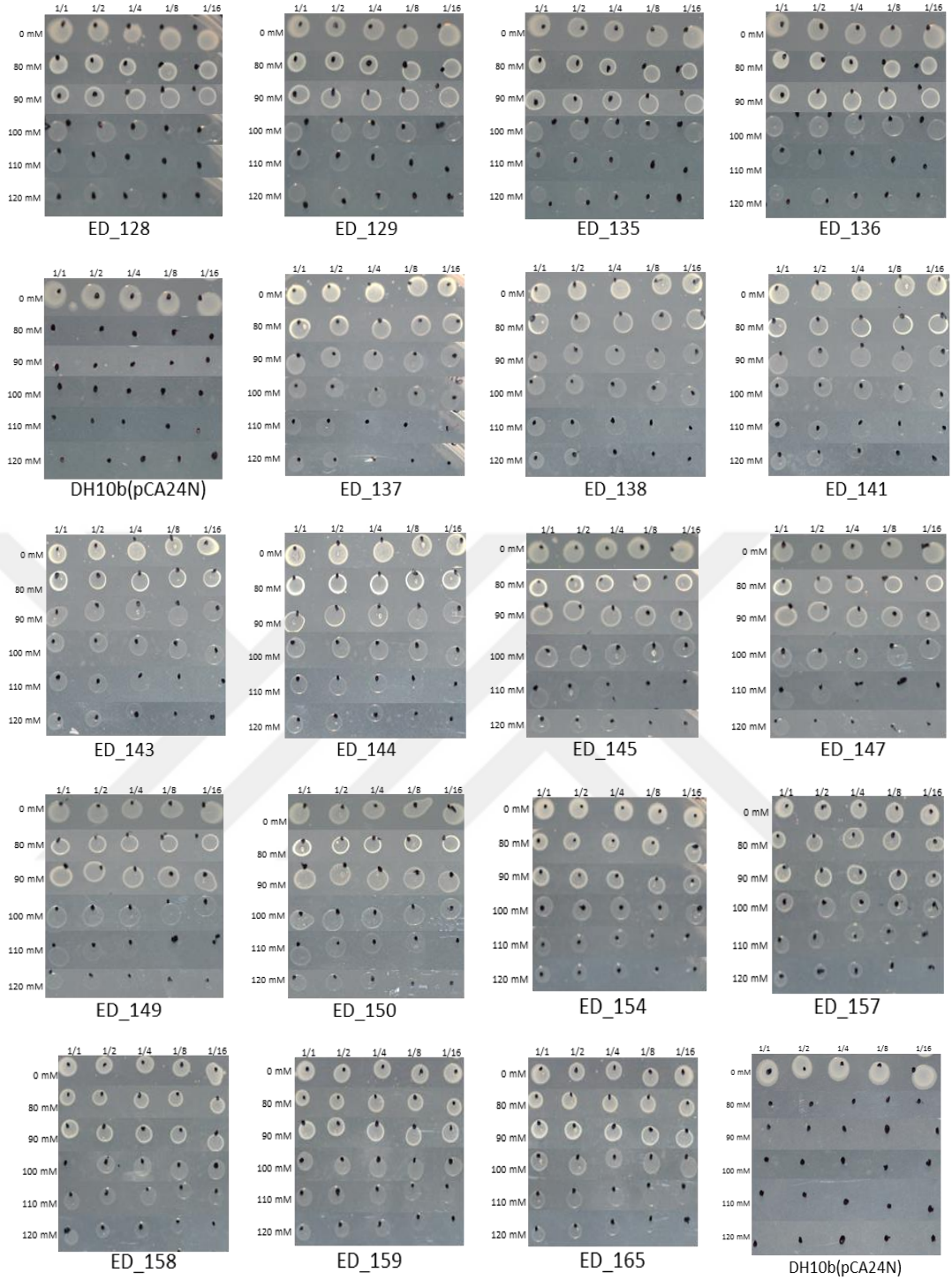
DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu ile yapılan seleksiyon deneyleri sonucu belirlenen tolerant koloniler, borik asit içermeyen LB-cm besi ortamlarında çoğaltılmıştır. Üreme sonrası, bor tolerans nokta testi yapılmıştır. Borik asit içermeyen ve 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM borik asit içeren besi ortamlarında her bir koloninin üreme durumları değerlendirilmiştir (Şekil 3.67.).



Şekil 3.67. Bor tolerans nokta testi sonucu petri fotoğrafları



Şekil 3.67.(devam) Bor tolerans nokta testi sonucu petri fotoğrafları



Şekil 3.67. (devam) Bor tolerans nokta testi sonucu petri fotoğrafları

Onaylama çalışmalarında seçilen kolonilerin hepsinin yüksek konsantrasyonda borik asit içeren ortamlarda üreme gösterdiği tespit edilmiş ve kontrol suşlarının bu yüksek konsantrasyonlarda üreme göstermediği görülmüştür (Çizelge 3.13.).

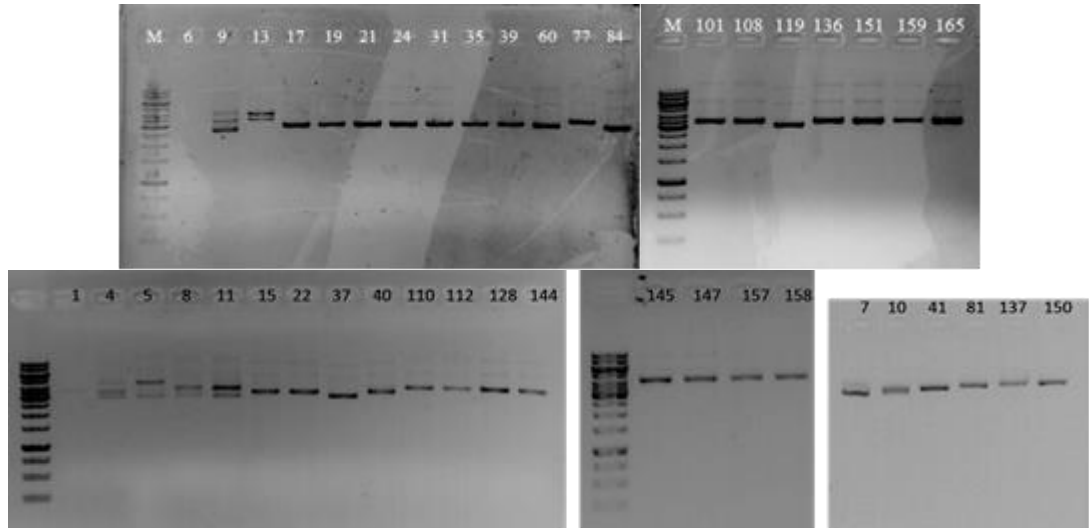
Çizelge 3.13. Seleksiyon sonrası seçilen tolerant klonların bor tolerans nokta testi sonuçları

Örnek	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
ED1	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲--	▲▲--
ED3	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲-	▲▲▲--
ED4	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲-	▲▲▲--
ED5	*****	*****	*****	*****	***▲-	▲▲▲--
ED6	*****	*****	*****	*****	***▲-	▲▲▲--
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED7	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲--	▲▲▲--
ED8	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED9	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED10	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲--	▲▲▲--
ED11	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED12	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲--	▲▲▲--
ED13	*****	*****	*****	***▲-	▲▲▲--	▲▲▲--
ED14	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲--	▲▲▲--
ED15	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED16	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED17	*****	*****	*****	***▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲▲
ED18	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED19	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED20	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED21	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED22	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-
ED23	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED24	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED30	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲-	▲▲▲▲▲
ED31	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED34	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-
ED35	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED36	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED37	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲--
ED39	*****	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
kontrol)	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED40	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED41	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED42	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED60	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED77	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲--	▲▲▲--
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED81	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲--
ED84	*****	*****	*****	*****	*****	***▲▲
ED101	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED102	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
ED108	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED109	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED110	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
ED112	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲--
ED119	*****	*****	*****	*****	***▲▲	***▲-
ED126	*****	*****	*****	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲-	▲▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----

Çizelge 3.13.^(devam) Seleksiyon sonrası seçilen tolerant klonların bor tolerans nokta testi sonuçları

Örnek	0 mM	80 mM	90 mM	100 mM	110 mM	120 mM
ED128	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED129	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲	▲▲▲-
ED134	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED135	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED136	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED137	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED138	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED141	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED143	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED144	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED145	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED147	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED149	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED150	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
ED151	*****	*****	*****	▲▲▲▲	▲▲▲-	▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----
ED154	*****	*****	*****	*****	▲▲▲	▲▲▲-
ED157	*****	*****	*****	*****	▲▲▲	▲▲▲-
ED158	*****	*****	*****	*****	▲▲▲	▲▲▲
ED159	*****	*****	*****	*****	▲▲▲	▲▲▲-
ED165	*****	*****	*****	*****	▲▲▲	▲▲▲-
kontrol	*****	-----	-----	-----	-----	-----

Bor tolerans seviyeleri belirlenen klonlar tek tek 5 mL LB-cm besi ortamlarında büyütüldükten sonra pellet ve stokları alınmıştır. Bunlardan 40 tanesinden plazmid izole edilmiştir (Şekil 3.68.). Ardından rekombinant plazmidlerin taşıdıkları gen dizileri sanger sekanslama ile belirlenmiştir (Çizelge 3.14.).



Şekil 3.68. Tolerant klonların içerdiği plazmidlerin agaroz jel görüntüsü

Çizelge 3.14. Direkt ekim ve zenginleştirme yöntemi sonucu seçilen tolerant klonların içerdiği plazmidlerin insert blast analizleri

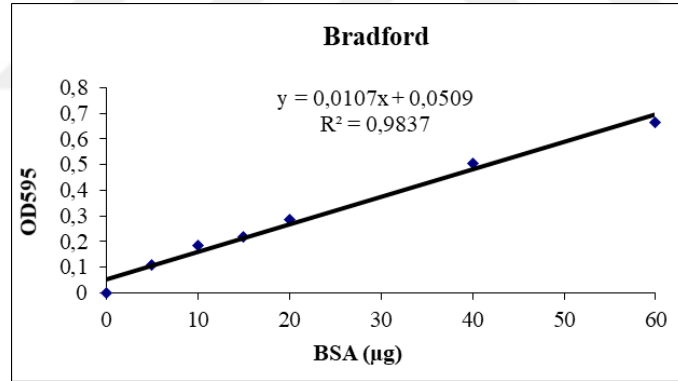
Plazmid adı	Eşleşen aktivite adı	Gen adı	Koloni hakkında bilgi
pED7	putative acetyltransferase YedL	<i>yedL</i>	90 mM Direkt ekim 5.gün
pED9	envelope stress response protein PspG	<i>yjbO</i>	90 mM Direkt ekim 5.gün
pED10	putative fimbrial usher protein outer membrane	<i>elfC</i> (<i>ycbS</i>)	Sekans kalitesi kötü 90 mM Direkt ekim 5.gün
pED5- pED13	CP4-57 prophage protein	<i>yfjK</i>	90 mM Direkt ekim 5.gün
pED15- pED17- pED19- pED21- pED22- pED24- pED31- pED35- pED39- pED40- pED60- pED84- pED119	tRNA(Val) (adenine(37)-N(6))- methyltransferase tRNA1(Val) A37 N6-methylase TrmN6 (Translation, ribosomal structure and biogenesis)	<i>yfiC</i> (<i>trmM</i>)	pED15-90 mM Direkt ekim 5.gün pED17-19-21-22-24-31-35-39-40- 100 mM Direkt ekim 5.gün pED60 2.gün zenginleştirme-3.gün 120 mM'dan 90 mM'a pED84 2.gün zenginleştirme-3.gün 100 mM'dan 90 mM'a pED119 3.gün zenginleştirme- 3.gün 90 mM'dan 100 mM'a
pED8- pED11- pED77- pED81- pED101- pED108- pED110- pED112- pED128- pED136- pED137- pED144- pED145- pED147- pED150- pED151- pED157- pED158- pED159- pED165	Fe-S cluster assembly protein	<i>sufD</i>	pED8-11-90 mM Direkt E. 5.gün pED77 2.gün zenginleştirme-3.gün 120 mM'dan 100 mM'a pED81 2.gün zenginleştirme-3.gün 100 mM'dan 90 mM'a pED101 2.gün zenginleştirme- 3.gün 100 mM'dan 90 mM'a pED108-110 2.gün zenginleştirme 3.gün 100 mM'dan 100 mM'a pED112 2.gün zenginleştirme- 3.gün 100 mM'dan 100 mM'a pED128-136-137-144-151 3.gün- zenginleştirme-100 mM'dan 90 mM'a pED159-165 3.gün zenginleştirme- 3.gün 100 mM'dan 100 mM'a
pED37	DUF2594 domain-containing protein transposase	<i>yecF</i>	100 mM Direkt ekim 5.gün
pED41	L-idonate regulatory protein	<i>idnR</i>	2.gün zenginleştirme-90 mM'dan 100 mM'a

3.3. Seçilen Klonların Proteomik Analizleri

Genom boyu tarama deneyleri sonucu yüksek borik asit konsantrasyonu içeren ortamlarda üremesi onaylanan AG1(pCA24N::*aceK*) ve AG1(pCA24N::*ptsA*) suşları proteomik analizleri için seçilmiştir. Bu suşların borik asit içermeyen ve 90 mM borik asit içeren ortamlarda protein profilleri 2D analizi ile araştırılmıştır.

3.3.1. Protein izolasyonu ve miktarlarının belirlenmesi

Seçilen iki adet klonun, protein izolasyonu ve saflaştırma işlemleri protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve protein miktar hesaplamaları elde edilen denkleme göre hesaplanmıştır (Şekil 3.69. ve Çizelge 3.15.).



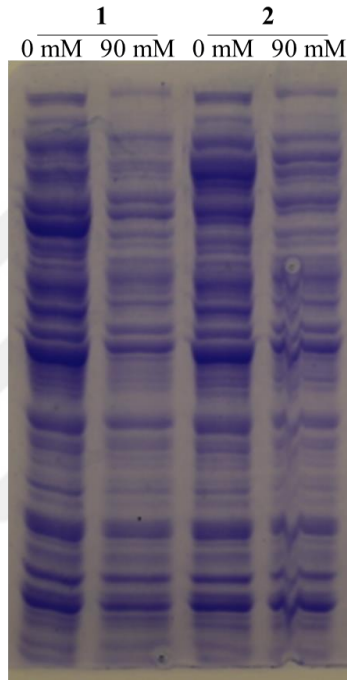
Şekil 3.69. Bradford sonucu elde edilen denkleme ve grafik

Çizelge 3.15. Bradford sonucu elde edilen denkleme kullanılarak hesaplanan protein miktarları

Örnek adı	OD 595	µg/10 µl	mg/ml	20 µg
AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) 0 mM	0.92	81.50	8.15	2.45
AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>) 90 mM	0.53	45.06	4.51	4.44
AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) 0 mM	0.91	80.29	8.03	2.49
AG1(pCA24N:: <i>ptsA</i>) 90 mM	0.55	46.74	4.67	4.28

3.3.2. SDS-PAGE yöntemi ile proteinlerin kalitesinin analizi

Konsantrasyonu belirlenen proteinlerin, kalitesinden emin olmak için sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. AG1(pCA24N::*aceK*) ve AG1(pCA24N::*ptsA*) suşlarından borik asite maruz bırakılmayan ve 90 mM borik asite maruz bırakılan hücrelerden elde edilen protein özütlerinden 20 µg olacak şekilde poliakrilamid jele yüklenmiş ve yürütme ve boyama işlemlerinden sonra jel fotoğrafı alınmıştır (Şekil 3.70.).



Şekil 3.70. Sırasıyla 1-AG1(pCA24N::*aceK*) ve 2-AG1(pCA24N::*ptsA*) suşlarından elde edilen protein özütlerinin SDS-PAGE sonuçları jel fotoğrafı

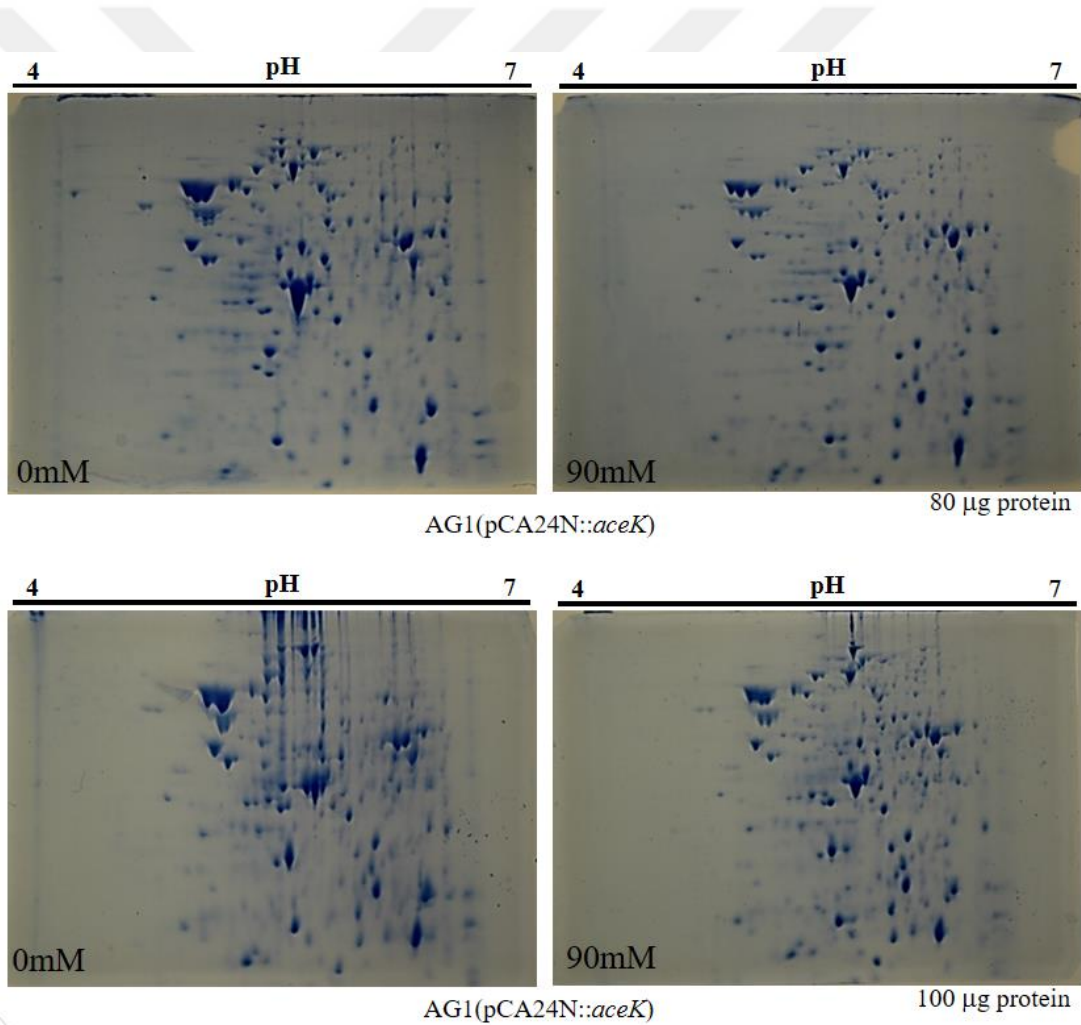
Her iki örnek için yeterli ve kaliteli protein özütleri elde edilmiş olup bu protein özütleri ile 2D-PAGE deneylerine geçilmiştir.

3.3.3. Proteinlerin birinci ve ikinci boyutta ayrımı

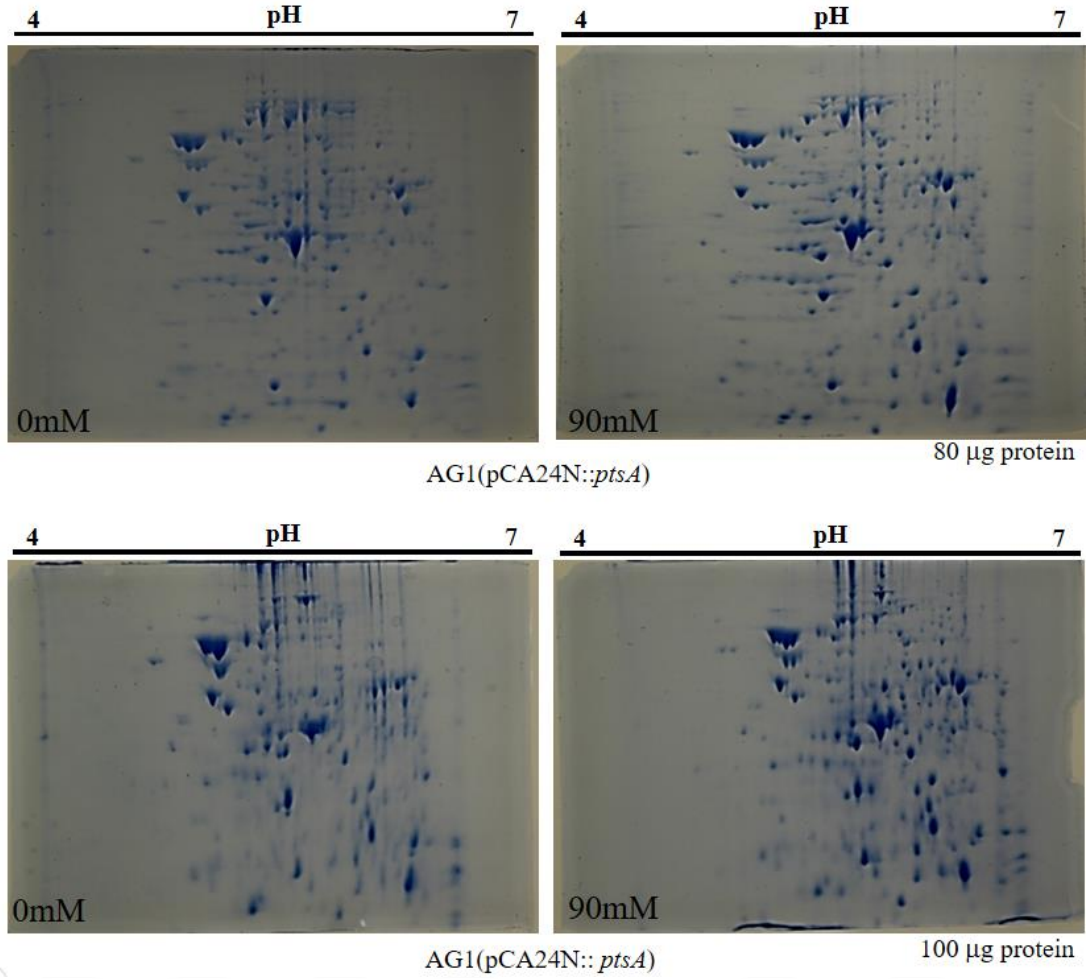
Deneyler iki farklı protein konsantrasyonunda yapılmıştır. İlk deneyde 80 µg protein kullanılmış olup, ikinci deneyde 100 µg protein kullanılmıştır. Her iki deneyde, 7 cm pH 4-7 gradyan aralığına sahip IPG striplerde, pasif rehidrasyon programı kullanılarak proteinler emdirilmiştir. Rehidrasyonu tamamlanan IPG stripler,

fokuslamaya alınmış ve bu işlem başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra ikinci boyutta ayırma geçilmiştir. IPG stripler hazırlanan poliakrilamid jellere aktarılmış, yürütülmüş ve boyama işlemlerinin ardından protein spotları gözlenmiştir (Şekil 3.71. ve Şekil 3.72.).

Şekil 3.71.'de AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun borik asite maruz bırakılmadan (sol) ve 90 mM borik asite maruz bırakılması (sağ) ile elde edilen proteinlerin ikinci boyutta jel elektroforez görüntüsü verilmiştir. Şekil 3.72.'de AG1(pCA24N::*ptsA*) suşunun borik asite maruz bırakılmadan (sol) ve 90 mM borik asite maruz bırakılması (sağ) ile elde edilen proteinlerin ikinci boyutta jel elektroforez görüntüsü verilmiştir. Üstteki jellerde 80 µg protein, alttaki jellerde 100 µg protein kullanılmıştır.



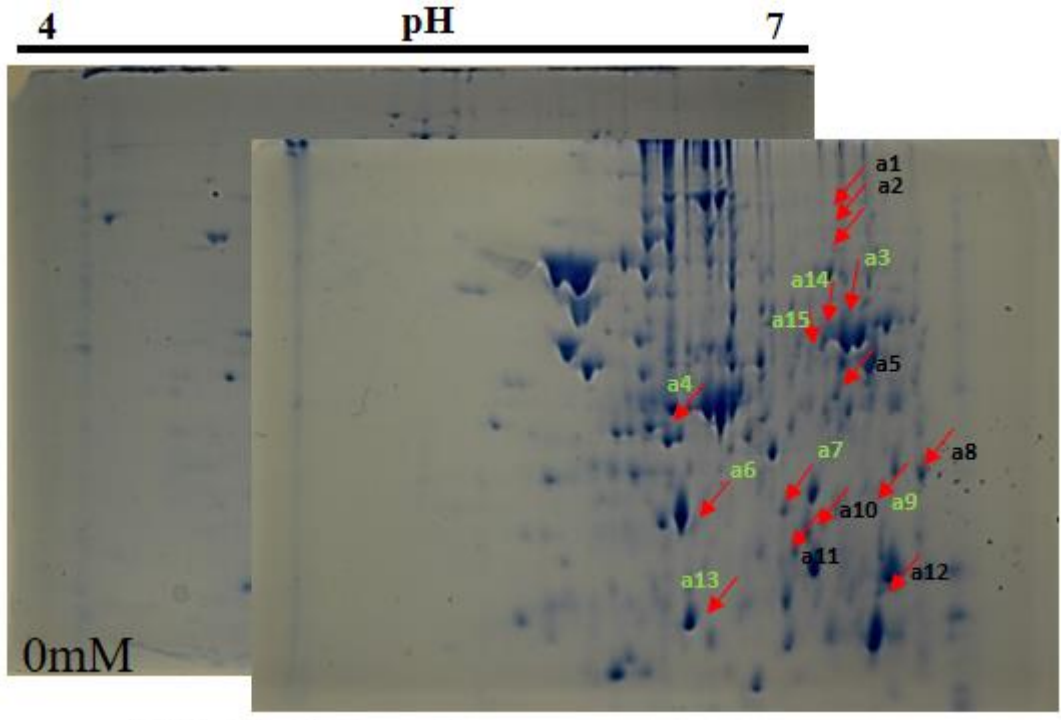
Şekil 3.71. AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun sitoplazmik protein 2D profilleri



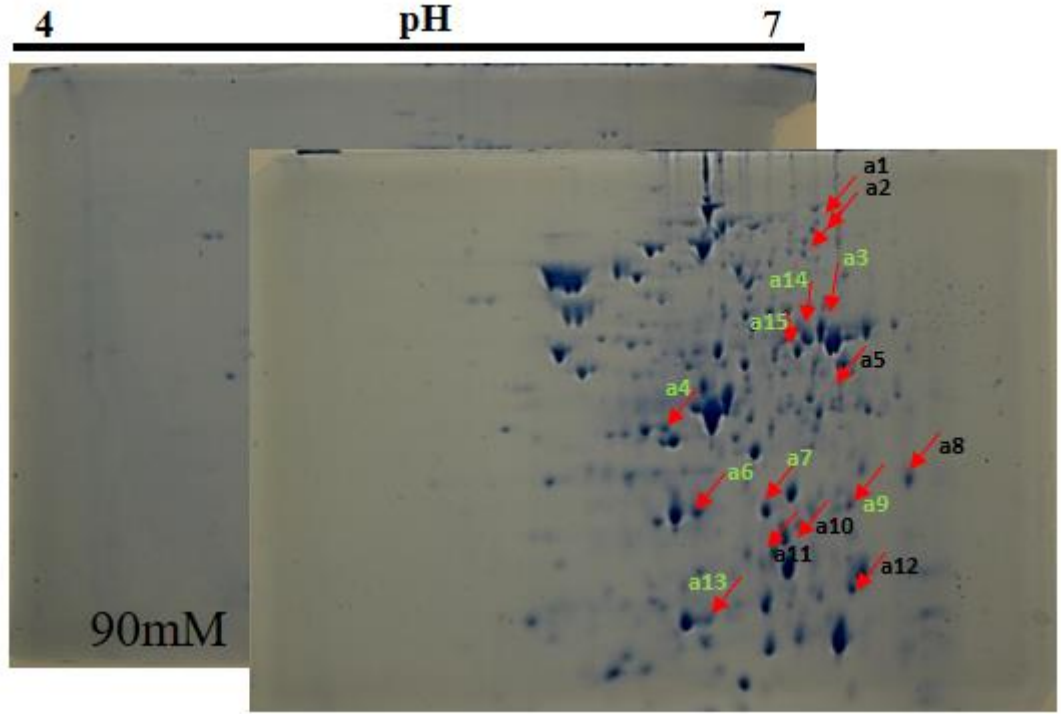
Şekil 3.72. AG1(pCA24N::ptsA) suşunun sitoplazmik protein 2D profilleri

3.3.4. Protein spotlarının kesimi, MALDI TOF-TOF analizi ve proteinlerin tanımlaması

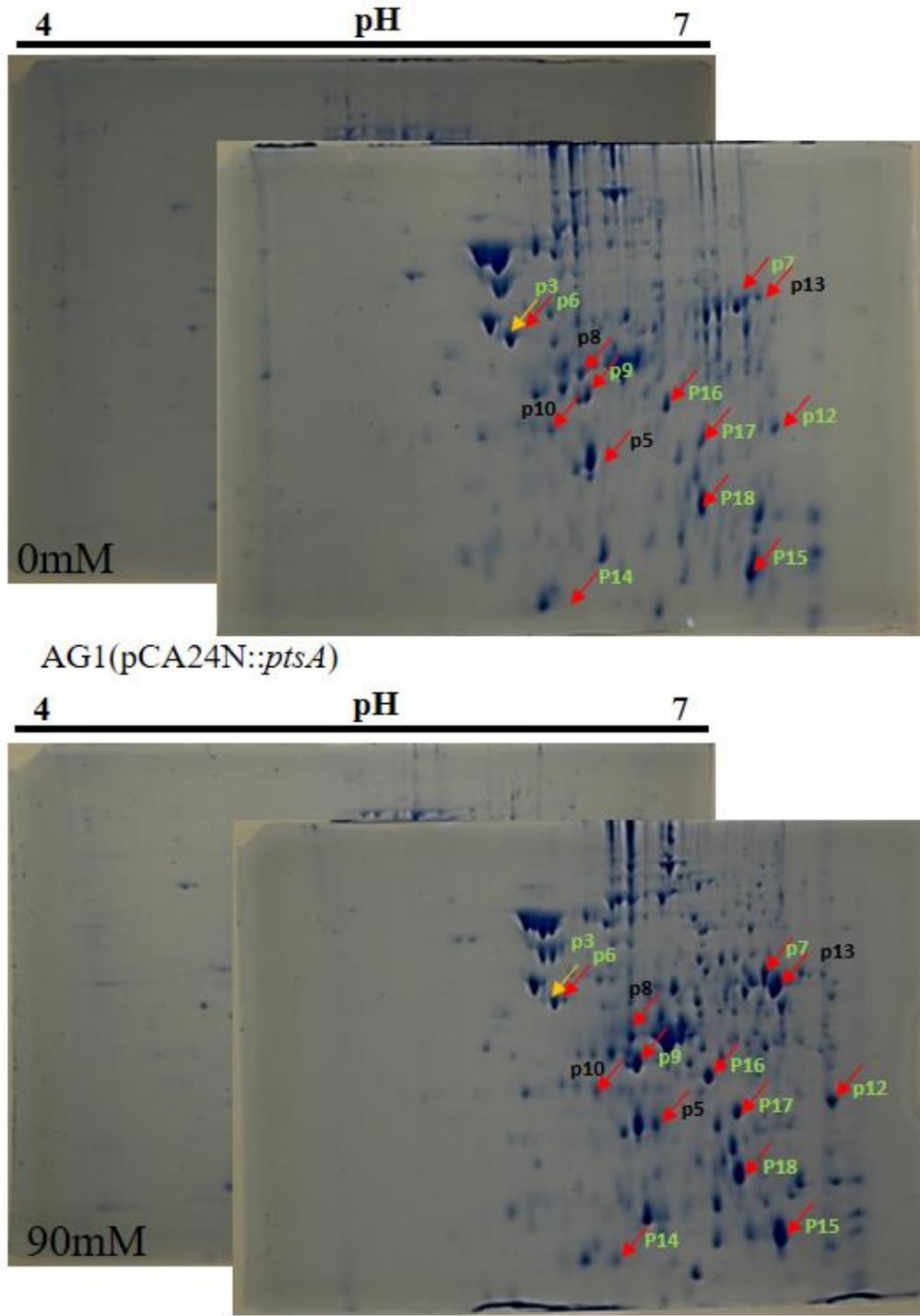
İki boyutlu jeller kesime uğratılmadan önce, jel görüntüleri karşılaştırılmıştır. Borik asite maruz bırakılmayan ve 90 mM borik asite 1 saat maruz bırakılarak elde edilen bakteri hücrelerinin protein profilleri incelenerek, regülasyon farklılığı gösteren protein spotları belirlenmiştir (Şekil 3.73. ve Şekil 3.74). Bu spotlar her iki deneyde de onaylanmış ve sonuçta farklılık gösteren spotlar jellerden kesilmiştir.



AG1(pCA24N::*aceK*)



Şekil 3.73. AG1(pCA24N::*aceK*) şuşuna ait regülasyon farklılıkları gösteren spotların seçimi



Şekil 3.74. AG1(pCA24N::*ptsA*) suşuna ait regülasyon farklılıkları gösteren spotların seçimi

Şekil 3.73.'de AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun borik asite maruz bırakılmadan (sol) ve 90 mM borik asite maruz bırakılması (sağ) ile elde edilen 2D jellerinde sitoplazmik protein spotlarındaki regülasyon farklılıklarının karşılaştırılması sonucu seçilen spotlar gösterilmiştir. Aynı şekilde, şekil 3.74.'de AG1(pCA24N::*ptsA*) suşuna ait

seçilen spotlar gösterilmiştir. Kesime uğratılan bu spotların MALDI TOF-TOF analizi yapılmış ve kütle spektrumları, Mascot protein tanımlama arama motoru kullanılarak tanımlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.16. ve Çizelge 3.17’de verilmiştir.

Çizelge 3.16. AG1(pCA24N::aceK) şusundan elde edilen proteinlerin mascot protein tanımlama sonuçları

Spot no	Protein erişim	Teorik kütle ağırlığı MW (Da)	Protein skoru	Tanımlanan protein
A3	KPYK1_ECO57	50697	500	Piruvat kinaz I OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=pykF
A4	PGK_ECO24	41093	295	Fosfogliserat kinaz OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 GN=pgk
A6	EFTS_ECO24	30404	147	Elongasyon faktör Ts OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 GN=tsf
A7	OMPA_ECO57	37178	482	Dış membran protein A OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=ompA
A9	CYSK_ECO57	34468	157	Sistein sentaz A OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=cysK
A13	KDUD_ECOLI	27053	109	2-dehidro-3-deoksi-D-glukonat 5-dehidrogenaz OS= <i>Escherichia coli</i> GN=kduD
A14	ATPA_ECO24	55188	182	ATP sentaz altünite alfa OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 GN=atpA
A15	PRPD_ECOLI	53917	212	2-metilsitrat dehidrataz OS= <i>Escherichia coli</i> GN=prpD

Çizelge 3.17. AG1(pCA24N::ptsA) şusundan elde edilen proteinlerin mascot protein tanımlama sonuçları

Spot no	Protein erişim	Teorik kütle ağırlığı MW (Da)	Protein skoru	Tanımlanan protein
P7	KPYK1_ECO57	50697	518	Pyruvate kinase I OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=pykF
P9	MALE_ECO57	43360	240	Maltoz-bağlanma periplasmik protein OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=malE
P12	G3P1_ECO57	35510	258	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz A OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=gapA
P14	AHPC_ECO57	20748	209	Alkil hidroperoksit redukaz altünite C OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=ahpC
P16	ALF_ECO57	39123	286	Fruktoz-bisfosfat aldolaz sınıf 2 OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=fbaA
P17	MDH_ECO24	32317	583	Malat dehidrogenaz OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 GN=mdh
P18	KDUI_ECOBW	31056	479	4-deoksi-L-threo-5-heksosuloz-uronat ketol-izomeraz OS= <i>Escherichia coli</i> GN=kduI

3.4. Aday Bor Genlerinin Artan Bor Konsantrasyonuna Bağlı Ekspresyon Analizleri (Real-Time PCR Deneyleri)

Laboratuvarımızda ayrıca, *E. coli* mutant suşlar ile bor ortamında genom boyu tarama çalışmaları ve *E. coli* yabanıl tip suşu ile proteomik analizi deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucu bir dizi gen elde edilmiş ve bu genlerin borik asit ortamında ekspresyon seviyeleri merak edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmaların devamında, bulunan bu genlerin bora bağlı olarak ifade değişimleri araştırılmıştır. Farklı borik asit konsantrasyonuna maruz bırakılan bakteri hücrelerindeki gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için Real-Time PCR analizleri kullanılmıştır. Laboratuvarımızda Keio koleksiyonu ile yapılan çalışmalarımızda *dinJ*, *garP*, *torR*, *yfeS*, *ylaC*, *aceF*, *trmU*, *cheZ*, *glxK*, *ygaV*, *trpR*, *talB*, *nohA*, *yddE*, *aroK*, *galS*, *yoaC*, *yohN* genlerinin nakavt edilmiş olduğu mutant suşlarının bora karşı duyarlı oldukları gözlemlenmiştir (Sezer, 2018). Bu nedenle bu genlerin bor ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yine önceki çalışmalarımızdan, yabanıl tip *E. coli* ile yapılan proteomik çalışmaları sonucunda borik asit içeren ortamlarda AceE, Lamb, GatY, Tuf1, TdcE, OmpR, SodA, DeoB, Icd, KduD ve KduI proteinlerinin artış (upregülasyon) gösterdikleri tespit edilmiştir (Gökcan, 2015). Bu yüzden bu proteinleri kodlayan genlerin de bor ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu tez çalışması esnasında belirlenen bor toleransında etkili olduğu düşünülen *aceK*, *rfaQ*, *yjcF*, *yeeY*, *yddV*, *ygcU*, *ptsA*, *ugpC*, *lacI*, *ydeE*, *dtd*, *yjfK* genleri ile de çalışılmıştır. Ancak deneysel çalışmalar devam ettiği için bu tezde anlatılmamıştır. Daha önceki çalışmalardan elde edilen 30 adet genin Real-Time PCR analizleri yapılmıştır.

3.4.1. Primer dizaynı

Gen ekspresyon çalışmalarında, ASKA seti ile yapılan çalışmalar, proteomik çalışmaları sonucu elde edilen proteinleri kodlayan genler ve *E. coli* mutant hattı (Keio koleksiyonu) ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenen aday bor genleri ve sekans dizileri listelenmiştir. Bu genlere özgü primerler, Primer 3 programı ile dizayn edilmiş (Çizelge 3.18. – Çizelge 3.20.) ve primerler satın alınmıştır. Kontrol (house keeping) geni olarak 16S rRNA geni için primer dizayn edilmiştir.

Çizelge 3.18. Keio koleksiyonu ile yapılan çalışmalardan seçilen genler için dizayn edilen primerler

Gen adı	Primer adı	Primer sekansı (5'-3')
<i>dinJ</i>	dinJ-F	CGCCCGAATCGATGAAGATC
	dinJ-R	AACATCAATGCCAGCTTCGC
<i>garP</i>	garP-F	CTGCCTCCGCCATCTTTAAC
	garP-R	GTGGGTGATCTGTCTGGGTTA
<i>torR</i>	torR-F	ATTACGTCACCAAACCGCTG
	torR-R	GGGTCAGTTTAATCGGCTCG
<i>yfeS</i>	yfeS-F	GCCAGTAAATTGATTGCCGC
	yfeS-R	CTTCATCGCTGCCAAAAGGA
<i>ylaC</i>	ylaC-F	TGATGTTGCAGTCCGAAACG
	ylaC-R	GTGTTGTACCATTCCGCCGTT
16S	357-F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG
	519-R	GWATTACCGCGGCKGCTG
<i>aceF</i>	aceF-F	TGTTACTCACTTCGACAAAA
	aceF-R	ACCGATGTTGATGTATTCT
<i>trmU</i>	trmU-F	TATTCTGTGCAACAAAGAGA
	trmU-R	AGGAAGTAGCTCTGGTCTTT
<i>cheZ</i>	cheZ-F	TCGTTTGTACTATGTTGTGC
	cheZ-R	CAGAAATTGTCGTGTATCTG
<i>glxK</i>	glxK-F	ACATTCGCCATATTATTCTC
	glxK-R	GTTATCAACGTCACATGCTA
<i>ygaV</i>	ygaV-F	TAAACGATTGCTGATTCTG
	ygaV-R	GCCTCATTITTTAATGGAATA
<i>trpR</i>	trpR-F	CATTTACCGTTGTTAAACCT
	trpR-R	CTTTCAGGCTGTTAGATCC
<i>talB</i>	talB-F	CTGGCAGTAAATATTGGTCT
	talB-R	GTTACAGTTGATGCCTTCTT
<i>nohA</i>	nohA-F	CTGAAATTGAGAACGAAAAG
	nohA-R	ACAGCACGAAAGTACAGAAT
<i>yddE</i>	yddE-F	ACAACAGGACACTCAAAAAGT
	yddE-R	GATCTTCCACAATACCAATC
<i>aroK</i>	aroK-F	ATCAAGAGATTGAGAAACGA
	aroK-R	ATGGTCGTTTCAAGATAAAC
<i>galS</i>	galS-F	ATTGGTTATCTTTCTTCCAG
	galS-R	ATGCCATTATCTTTTAATGC
<i>yoaC</i>	yoaC -F	GTGCCATGGATGTATCAGCG
	yoaC -R	AGAACGTTACCTGTCTCCA
<i>yohN</i>	yohN -F	GTTTCGACCAATACCTCGGGA
	yohN -R	ATATAGGTCCAGTGCGTCCC

Çizelge 3.19. Proteomik analizi sonucu seçilen proteinleri kodlayan genler için dizayn edilen primerler

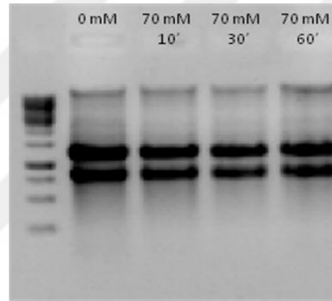
Gen adı	Primer adı	Primer sekansı (5'-3')
<i>16SrRNA</i>	16SrRNA-F	CCGTGTCTCAGTTCCAGT
	16SrRNA-R	TGAGCCTAGGTCGGATTA
<i>sodA</i>	SodA-F	GGAAATCCACCACACCAAAC
	SodA-R	GATAGCCGCTTTCAGGTCAC
<i>deoB</i>	DeoB-F	AAGAAACCTTTGGCCTGGAT
	DeoB-R	ACCGACAGAAACCACCTGAC
<i>icd</i>	İcd-F	ATATGCCGGTCAGGACAAAAG
	İcd-R	GCGTCACCAAACCTCTGAACA
<i>kduD</i>	KduD-F	AACCGACTGAAACCATCGAG
	KduD-R	ATCAATCCGGCGTTATTAC
<i>kduI</i>	KduI-F	GGTGCCGGTACGATTACTGT
	KduI-R	CGACGGTACTGGTGAGGTT
<i>aceE</i>	aceE-F	GGTTCTGAAGAGCATACCTA
	aceE-R	GATCTTTGATCGACTTGTTTC
<i>lamB</i>	lamB-F	ATGACTATACCAACGAAACC
	lamB-R	CTGAGTATGTTTCAGCAGTGA
<i>tdcE</i>	tdcE-F	CAGTACGTAAAACCAACCTT
	tdcE-R	GGGTAAAGGTACGTGAAATA
<i>TufI</i>	tufI-F	GTGAAGAAGTTGAAATCGTT
	tufI-R	TCATCTTTGGACAGAATGTA
<i>gatY</i>	gatY-F	GATGTGCAAGTCAATGAAG
	gatY-R	CCAGTCTAGAAAAATCAAGC
<i>ompR</i>	ompR-F	GTCTTCGTAGTCAGAGCAAC
	ompR-R	GAACCTACCGAAAGCAATTA

Çizelge 3.20. ASKA ile yapılan çalışmalardan seçilen genler için dizayn edilen primerler

Gen adı	Primer yönü	Primer sekansı (5'-3')
<i>aceK</i>	aceK-F	CAACTGGTGAAAGAGCACGA
	aceK-R	AGATATTGAGCGGCACCATC
<i>rfaQ</i>	rfaQ-F	ATGTTGTCATCCAACCGACA
	rfaQ-R	ACCCAGTTCAGGAAAACGTG
<i>yjcF</i>	yjcF-F	ATTCGAATTTTGCAGGTTGC
	yjcF-R	TTGAACATGCATAGCGGAAC
<i>yeeY</i>	yeeY-F	GCCACCATCTTCCAGTGAGT
	yeeY-R	TCGTGAGAAAGTTGTGATGC
<i>yddV</i>	yddV-F	AAGAACGGCAAATAGCCTCA
	yddV-R	CTGGTGTACGCATGGTTTG
<i>ygcU</i>	ygcU-F	GTCACATCATCATCGGCAAC
	ygcU-R	AAGTGTGGGTGCCATCTTC
<i>ptsA</i>	ptsA-F	CAGCAAATCTACGGTGAGCA
	ptsA-R	CACGGAGTAAGGGCATCAAT
<i>ugpC</i>	ugpC-F	CCGCATATGAGTGTGCGAAGA
	ugpC-R	GCTTGGCATCGAGGTTAGAG
<i>lacI</i>	lacI-F	TGGTGGTGTGATGGTAGAA
	lacI-R	TCAAGAAATAACGCCGGAAC
<i>ydeE</i>	ydeE-F	CGTTTCCCATGCTTTTCATT
	ydeE-R	CCATCAGCAATCACCATCAC
<i>dtd</i>	dtd-F	CTCGGCTACGCATCTTTAG
	dtd-R	GCGTGTTCATCTCTTGCTGA
<i>yfjK</i>	yfjK-F	AGTTCCCAAGTGTGCCATTC
	yfjK-R	TCGATGACTCGTTCGTCTTG

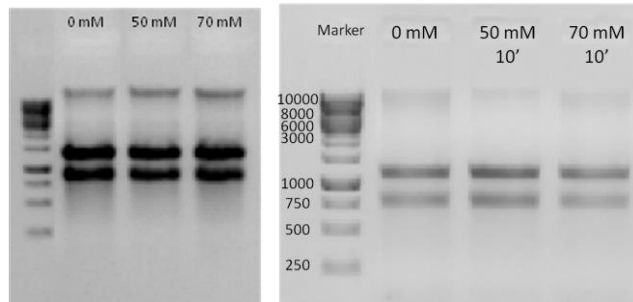
3.4.2. *E. coli* kontrol suşundan RNA izolasyonu ve cDNA eldesi

Borik asit içermeyen ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda, zamana bağlı olarak bora maruz bırakılan yabancı tip *E. coli* hücrelerinden RNA izolasyonları yapılmıştır. Bunun için, materyal metod bölümünde detayları verildiği üzere, borik asit içermeyen ve içeren besi ortamlarında, 10 dk, 30 dk ve 60 dk borik asit ile muamele edilen bakteri hücreleri kullanılmıştır. RNA izolasyonları kit kullanılarak yapılmıştır. Kaliteli ve verimli RNA elde edildiğini görmek için RNA'lar %0.8'lik agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 3.75.). Şekilde verilen bir örnekte görüldüğü üzere 16S ve 23S rRNA bantları net olarak görülmektedir. Üstte gözlenen genomik DNA bantı daha sonra *DNaseI* muamelesi ile yok edilmiştir.



Şekil 3.75. Zamana bağlı RNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü

Diğer bir yaklaşımda ise, farklı borik asit ortamlarında yetiştirilen hücrelerden RNA izolasyonları yapılmıştır. Burada borik asit içermeyen, 50 mM borik asit içeren ve 70 mM borik asit içeren besi ortamlarında 10 dakika boyunca bora maruz bırakılan hücrelerden kit ile RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 3.76.). Kaliteli ve verimli RNA'lar elde edildiği gözlenmiştir.



Şekil 3.76. Farklı borik asit konsantrasyonlarına bağlı RNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü

Total RNA'lar *DNaseI* uygulaması ile genomik DNA'dan arındırıldıktan sonra, elde edilen toplam RNA'dan cDNA sentezi (Fermentas kiti kullanılarak) gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Real-Time PCR reaksiyonun gerçekleştirilmesi

cDNA elde edildikten sonra, gen spesifik primerler ile Real-Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilerek, farklı borik asit konsantrasyonlarında ve zamana bağlı olarak bu genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu deneylerde, FastStart SYBR Green Master Mix (REF 04 673 484 001) kullanılmıştır. Kontrol house keeping geni olarak 16SrRNA geni kullanılmıştır.

3.4.4. Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Real-Time PCR deneyleri sonucunda her bir genin farklı bor konsantrasyonundaki hücre içi mRNA seviyeleri, göreceli regülasyon farklılıkları açısından değerlendirilmiştir.

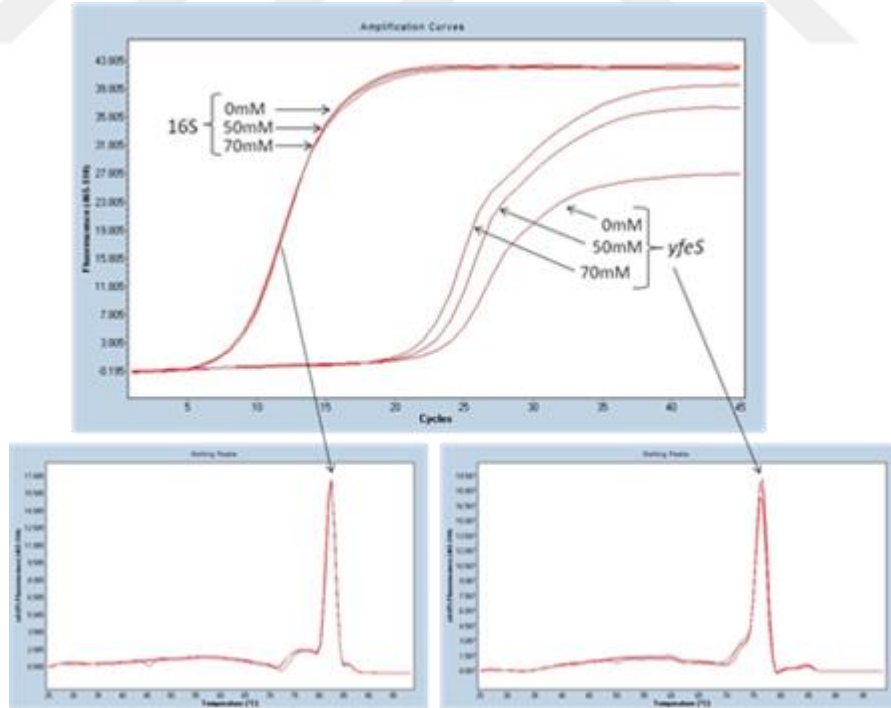
Genlerin hücre içi ekspresyon seviyelerine bakıldığında, house keeping geninin (16S) ekspresyon seviyesinin değişmediği gözlenmiştir. Test edilen genlerin bazılarının ifade seviyeleri dramatik bir şekilde artmış ve diğer bazı genlerde ise değişim daha az görülmüştür. Aşağıda her bir genin göreceli regülasyon farklılıkları ayrı ayrı belirtilmiştir. Grafiklerin nasıl oluşturulduğu, elde edilen Ct (cycle threshold) ve amplifikasyon eğrilerinin yorumlanması ve buradan göreceli ifade farklılıklarının (fold difference) hesaplanması ile ilgili izlenen yol, aşağıda *yfeS* geni ile elde edilen Real-Time PCR sonuçları ile anlatılmaktadır. Takip eden bölümlerde, her bir genin kendi içinde, kontrol geninin normalizasyonu ile göreceli ekspresyon seviyeleri verilmiştir. Bununla birlikte, en sonda, farklı genlerin *E. coli* hücresinde mRNA kopya sayılarını kalitatif olarak yansıması açısından, deneylerde elde edilen ortalama Ct değerleri de verilerek yorumlanmıştır.

Real-Time PCR deneylerinde elde edilen amplifikasyon pikleri, Ct değerleri ve melting curve (erime eğrisi) analiz sonuçlarının (melting peaks) değerlendirilerek,

ekspresyon farkı katlarının (fold difference) nasıl hesaplandığı, aşağıda *yfeS* geni örneğinde detaylı olarak anlatılmış ve diğer genlerde sonuçlar özet olarak verilmiştir.

3.4.4.1. *yfeS* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

Real-Time PCR deney sonuçları değerlendirilirken ilk önce amplifikasyon eğrileri analiz edilmiştir. Üç farklı boric asit konsantrasyonunda house-keeping geninin (16S) ekspresyonunda bir değişim olmadığı gözlenirken, *yfeS* geninin ekspresyonunda değişim gözlenmektedir (Şekil 3.77.). Bu genlerin mRNA seviyelerindeki artışı analiz etmeden önce melting pikleri de kontrol edilmiştir. Melting pikleri, elde edilen bu ekspresyon farkının genden kaynaklı veya primer dimerinden kaynaklı olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Birden fazla belirgin pik görülmesi ya da ana pikte daha düşük seviyede belirgin pik sırtlarının oluşması, primer dimerinin varlığını göstermektedir. Bu yüzden melting piklerinin değerlendirilmesi, elde edilen C_t değerlerinin kalitesinin yorumlanması için önem taşımaktadır. Bu sebepten dolayı analiz edilen tüm genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilirken bu veriler göz önünde bulundurulmuştur.



Şekil 3.77. 16S geni ve *yfeS* geninin bora bağlı ekspresyon seviyelerini gösteren grafikler

Üstteki şekilde amplifikasyon eğrileri, alttaki şekillerde ise melting pikleri görülmektedir.

Melting pikleri 16S ve *yfeS* genlerinde analiz edildiğinde primer dimeri olmadığını, elde edilen eğrilerin sadece genden kaynaklı olduğunu göstermektedir (Şekil 3.77.). Buna göre, C_t değerleri incelendiğinde *yfeS* genin bor içermeyen ortamda daha yüksek bir değere sahip olduğu, bor içeren ortamlarda ise C_t değerlerinin azaldığının görülmesi mRNA seviyesindeki artışı ifade etmektedir. Çizelge 3.21.'de *yfeS* genin Real-Time PCR analizi sonucu elde edilen C_t değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.21. House-keeping geni ve *yfeS* geninin Real-Time PCR sonrası C_t (C_p) değerleri

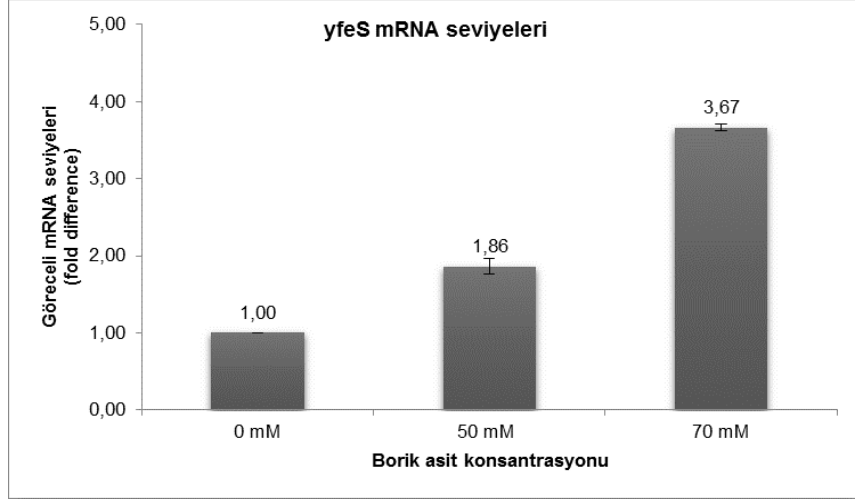
Gen adı	Borik asit Konsantrasyonu (mM)			Cp Değerleri
	0mM	50mM	70mM	
<i>yfeS</i>	23,53	22,59	21,63	
16S_1/100	8,74	8,54	8,71	

Yapılan analizler sonucu, *yfeS* geninin mRNA seviyelerindeki değişim hesaplanmıştır. Bor ortamında *yfeS* geninin ekspresyon farkının hesaplanması için, literatür incelenmiş ve hesaplamalar için $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanılmıştır (Livak vd., 2001) (Şekil 3.78.).

	Experimental Well1	Experimental Well2	Experimental Well3	Control Well1	Control Well2	Control Well3	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	Raw Ct Value	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Housekeeping Gene	0,71	0,71	0,71	0,74	0,74	0,74	-	0,71	-	0,74	12,92	14,79	-1,07	3,655326
Gene being Tested	21,63	21,63	21,63	23,53	23,53	23,53	21,63	-	23,53	-				

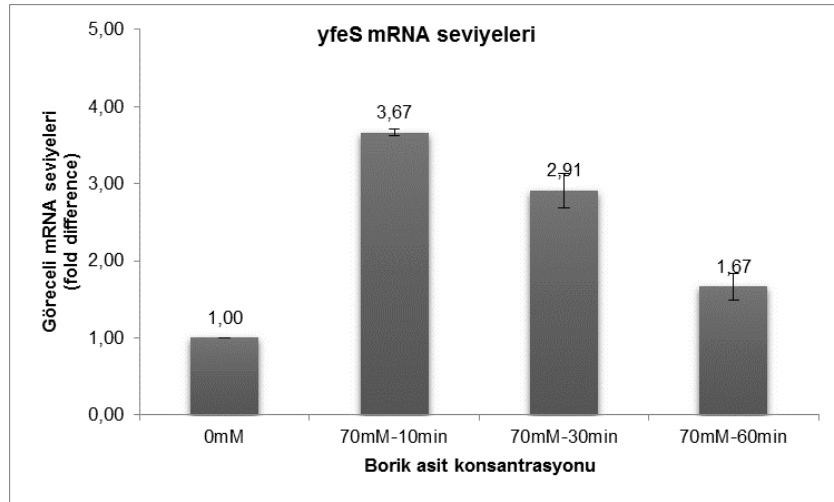
Şekil 3.78. Göreceli mRNA seviyelerinin hesaplanışını gösteren excel sayfasının şematik şekli

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodunda house keeping ve analiz edilen genin C_t değerleri kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve mRNA seviyelerindeki göreceli değişim grafik olarak gösterilmiştir. *yfeS* geninin hücre içi ekspresyon seviyelerine bakıldığında, house keeping geninin (16S) ekspresyon seviyesinin değişmediği gözlenirken, *yfeS* geninin 50 mM borik asit içeren ortamda borik asit içermeyen ortama göre 1.86 kat, 70 mM borik asit içeren ortamda 3.67 kat daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Şekil 3.79.'da görüldüğü üzere, artan borik asit konsantrasyonlarına bağlı olarak, *yfeS* geninin mRNA seviyelerinde göreceli olarak artış gözlemlenmiştir.



Şekil 3.79. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *yfeS* geninin ekspresyon seviyelerindeki artışı gösteren grafik

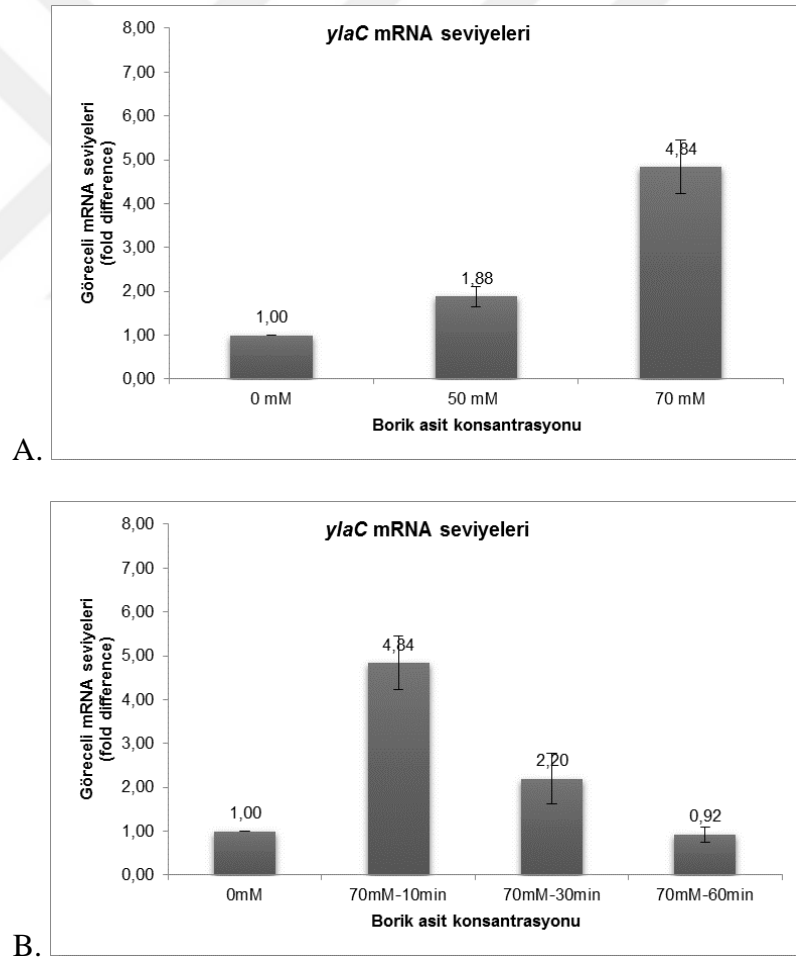
Aynı zamanda, *yfeS* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Burada, 70 mM borik asite 10 dakika maruz kalma sonucu mRNA seviyesinde göreceli olarak bir artış görülmektedir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.80.).



Şekil 3.80. Borik asit içermeyen, 70 mM 10 dakika, 70 mM 30 dakika ve 70 mM 60 dakika bora maruz kalma sonucu *yfeS* geninin göreceli olarak mRNA seviyelerini gösteren grafik

3.4.4.2. *ylaC* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

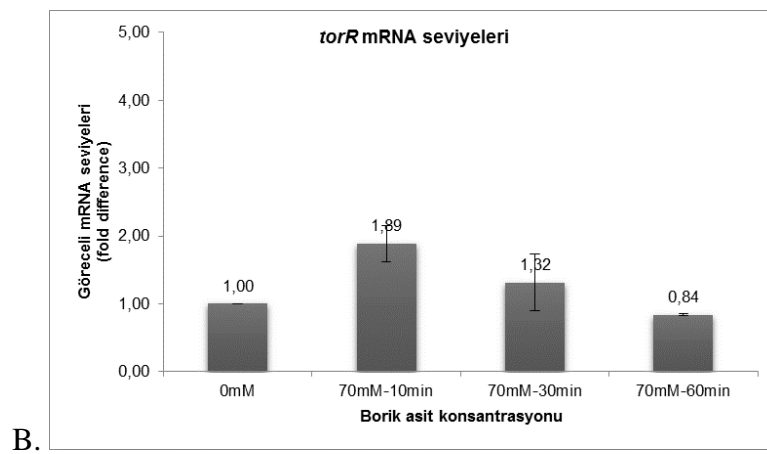
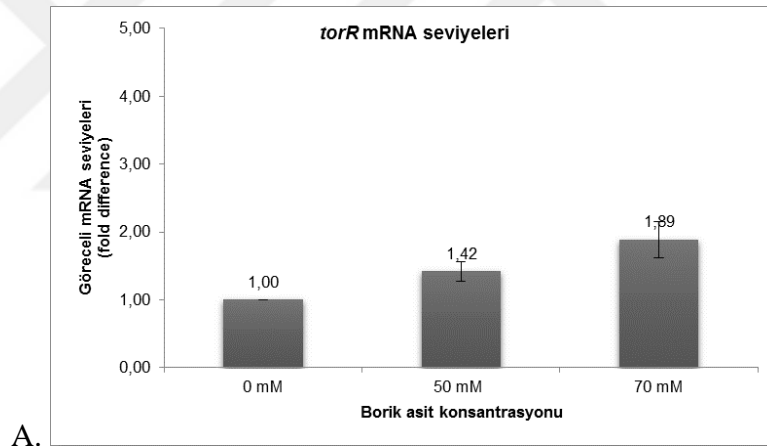
ylaC geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 50 mM borik asit içeren ortama maruz bırakıldığında 10 dakika içerisinde *ylaC* geninin mRNA seviyesinin ortalama 1.88 kat arttığı; 70 mM borik asit içeren ortamda ise 10 dakika içerisinde ekspresyon seviyesinin ortalama 4.84 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.81A). Aynı zamanda, *ylaC* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Burada, 70 mM borik asite 10 dakika maruz kalma sonucu mRNA seviyesinde göreceli olarak bir artış görülmektedir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.81B).



Şekil 3.81. *ylaC* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.3. *torR* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

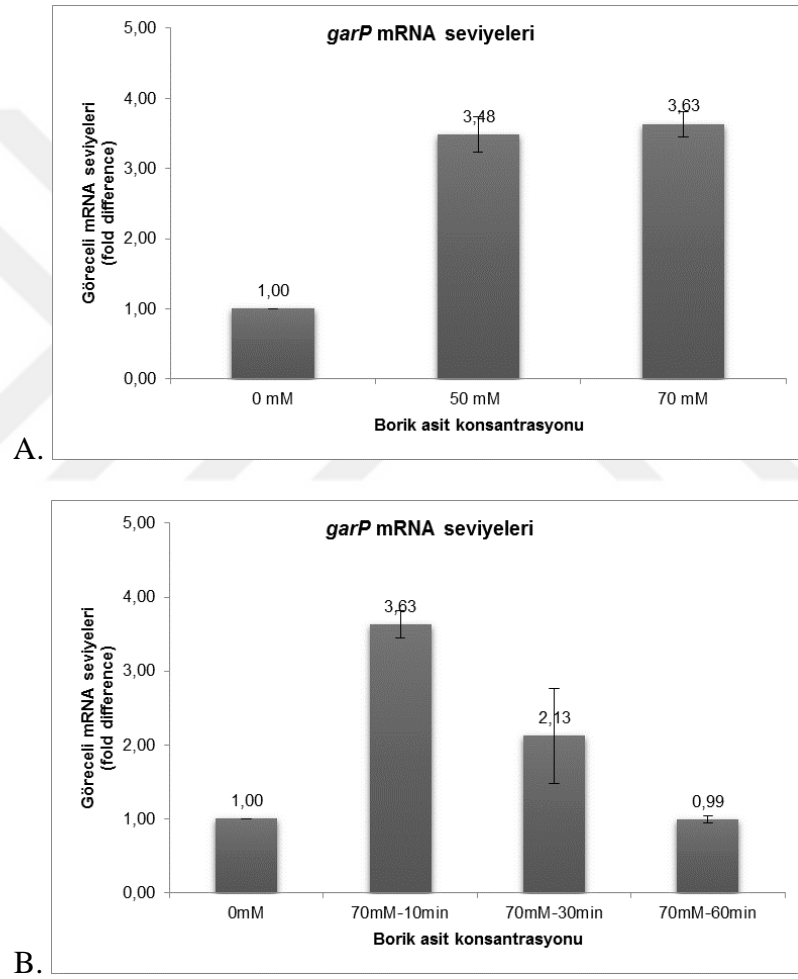
Şekil 81A’da Borik asit içermeyen, 50 mM borik asit içeren ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *torR* geninin ekspresyon seviyelerindeki artışı gösterilmiştir. *torR* geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 50 mM borik asit içeren ortama maruz bırakıldığında 10 dakika içerisinde mRNA seviyesinin ortalama 1.42 kat arttığı; 70 mM borik asit içeren ortamda ise 10 dakika içerisinde ekspresyon seviyesinin ortalama 1.89 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.82A). Aynı zamanda, 70 mM borik asite 10, 30 ve 60 dk maruz bırakılmasıyla mRNA seviyelerindeki değişimi de izlenmiştir. Burada, 70 mM borik asite 10 dakika maruz kalma sonucu mRNA seviyesinde göreceli olarak bir artış görülmektedir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.82B).



Şekil 3.82. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *torR* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.4. *garP* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

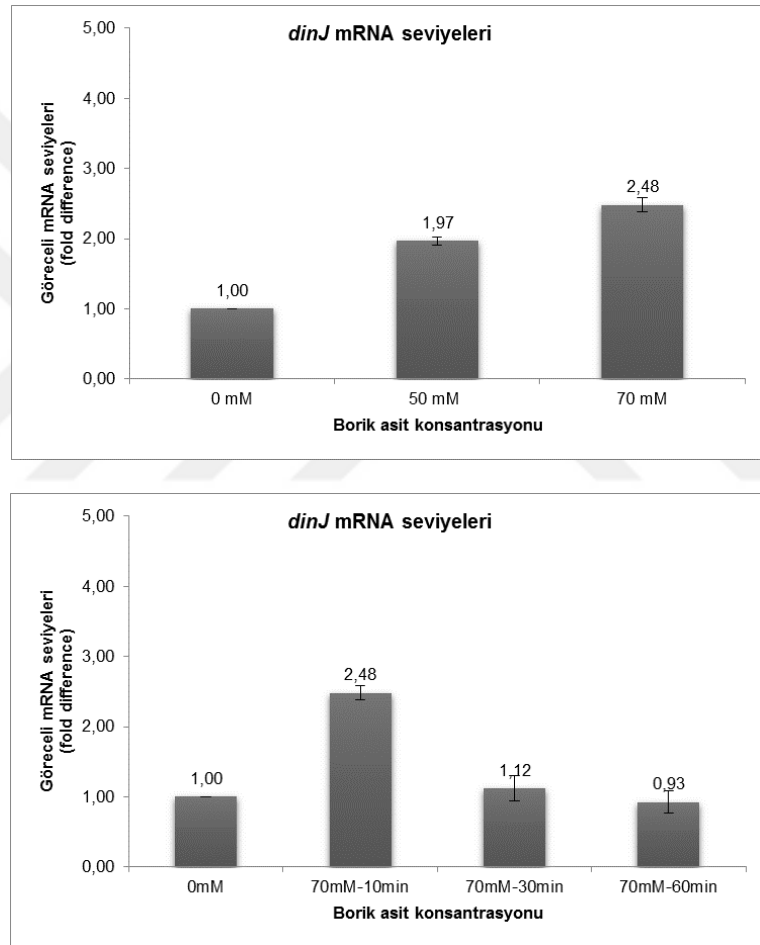
garP geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *garP* geninin mRNA seviyesinin ortalama 3.48 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 3.63 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.83A). Aynı zamanda, *garP* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.83B).



Şekil 3.83. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *garP* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.5. *dinJ* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

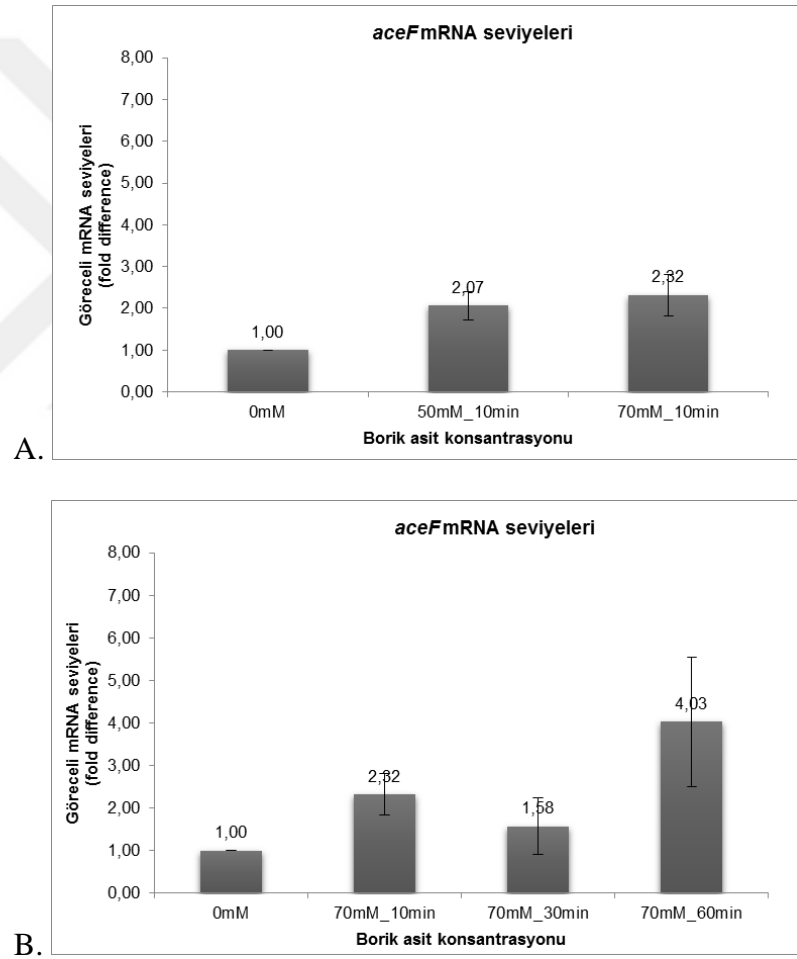
dinJ geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *dinJ* geninin mRNA seviyesinin ortalama 1.97 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 2.48 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.84A). Aynı zamanda, *dinJ* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.84B).



Şekil 3.84. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *dinJ* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.6. *aceF* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

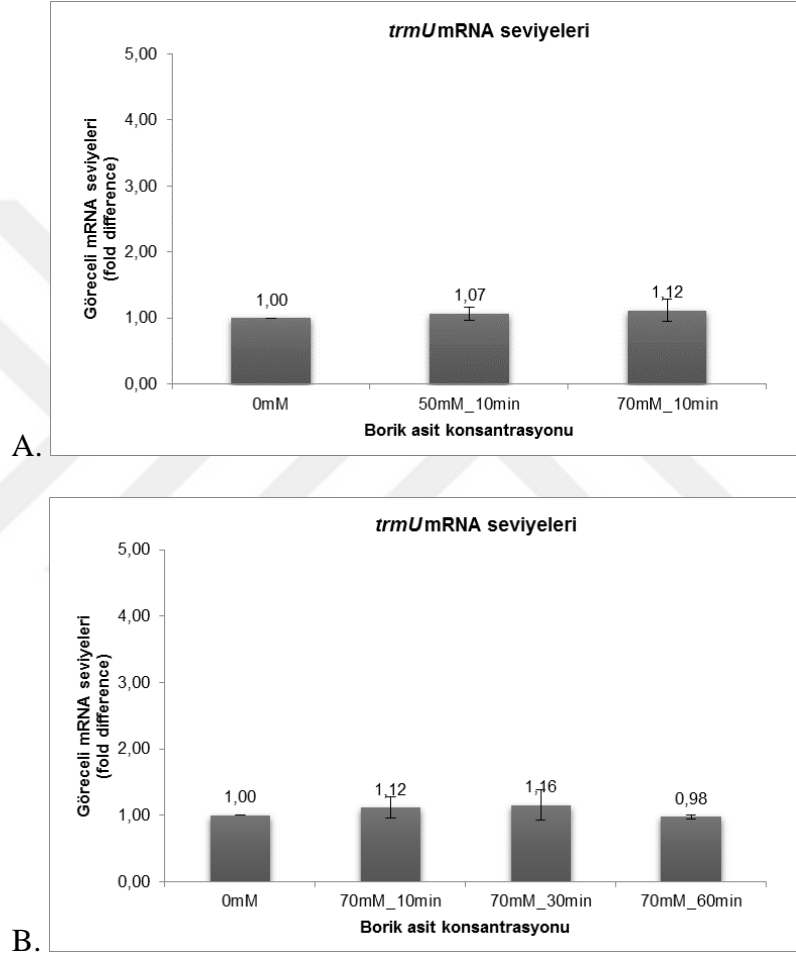
aceF geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *aceF* geninin mRNA seviyesinin ortalama 2.07 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 2.32 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.85A). Aynı zamanda, *aceF* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. 30 dk borik asite maruz kalma sonucu mRNA seviyesinde azalma gözlenmiş, 60 dk içerisinde ise 4,03 kat artış gözlenmektedir (Şekil 3.85B).



Şekil 3.85. Borik asit içermeyen, 50 mM borik ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *aceF* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.7. *trmU* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

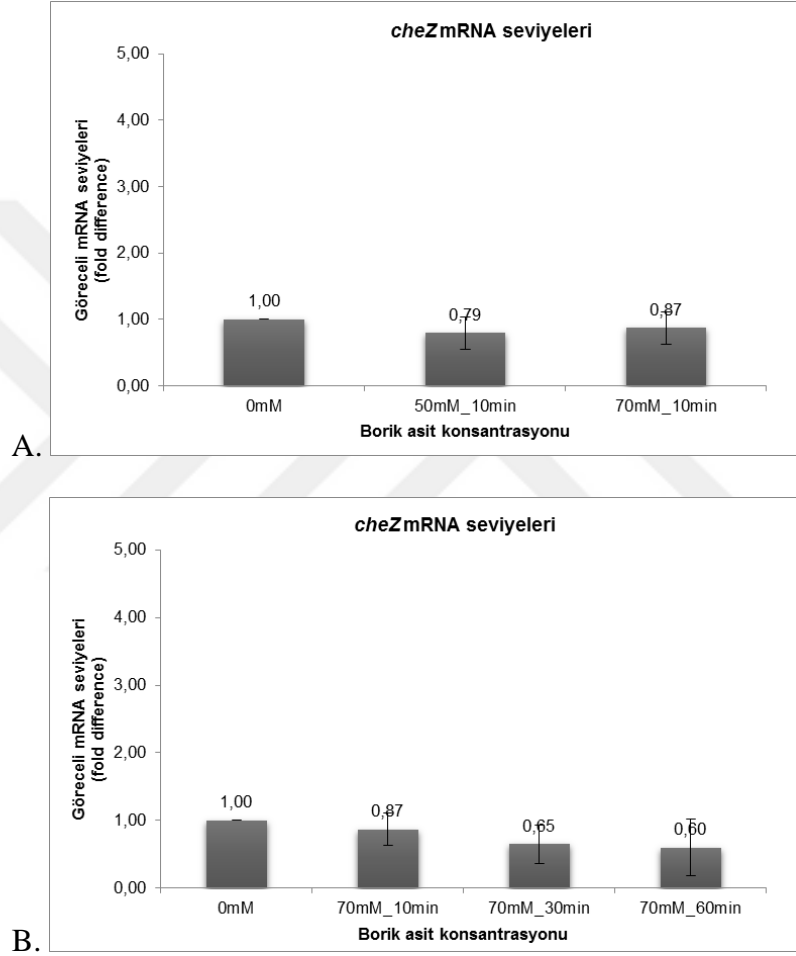
trmU geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *trmU* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.86A). Aynı zamanda, *trmU* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.86B).



Şekil 3.86. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *trmU* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.8. *cheZ* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

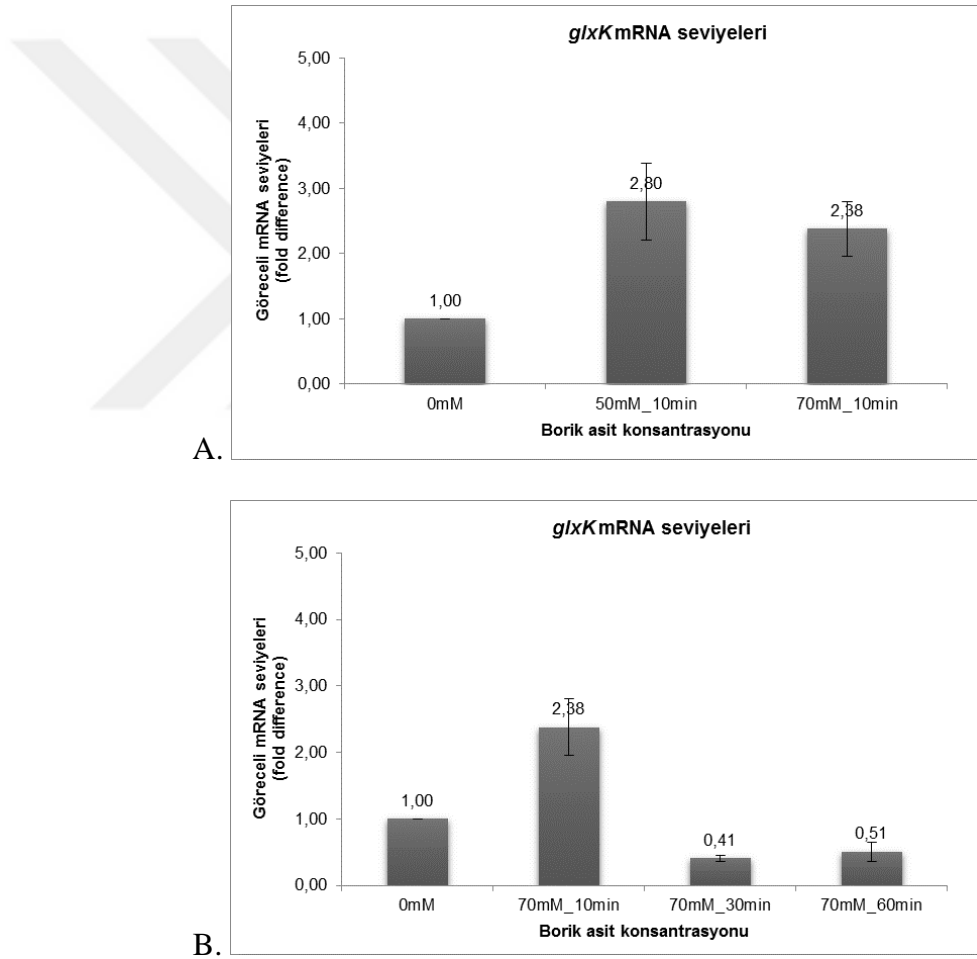
cheZ geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *cheZ* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.87A). Aynı zamanda, *cheZ* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.87B).



Şekil 3.87. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *cheZ* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.9. *glxK* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

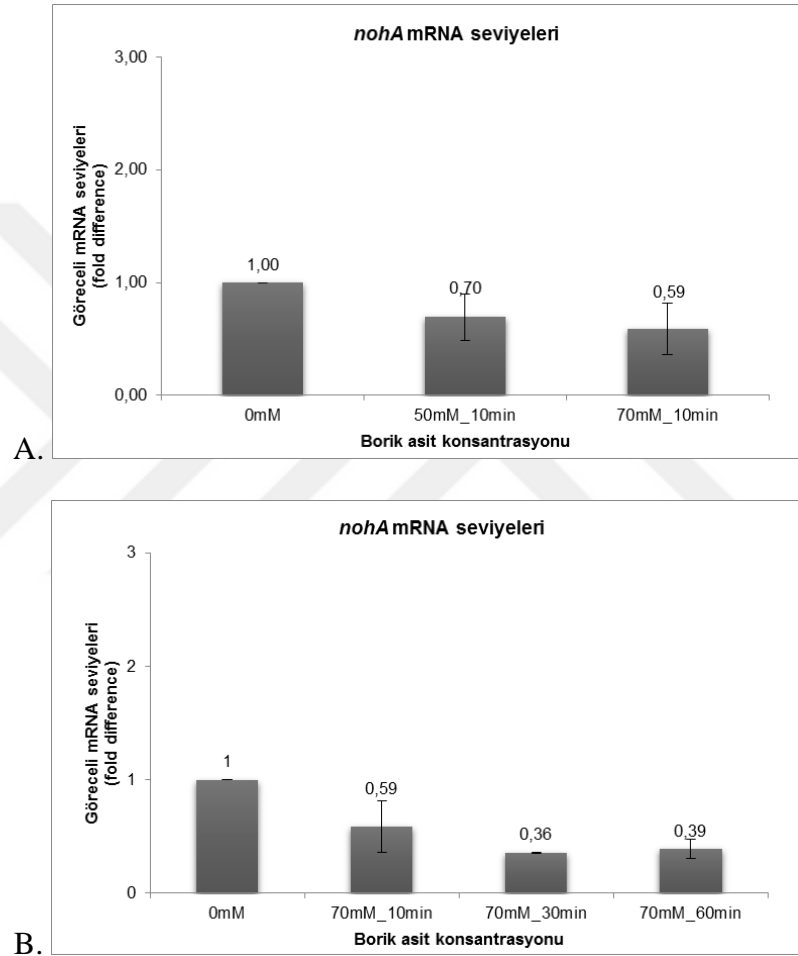
glxK geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *glxK* geninin mRNA seviyesinin ortalama 2.80 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 2.38 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.88A). Aynı zamanda, *glxK* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.88B).



Şekil 3.88. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *glxK* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.10. *nohA* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

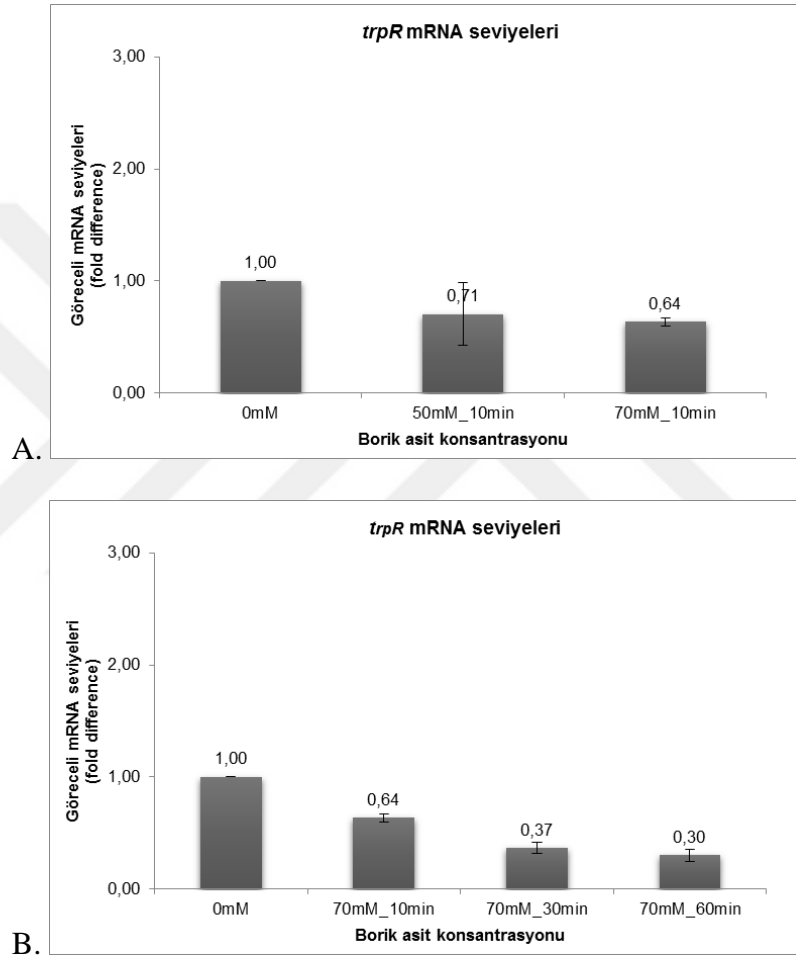
nohA geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *nohA* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.89A). Aynı zamanda, *nohA* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.89B).



Şekil 3.89. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *nohA* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.11. *trpR* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

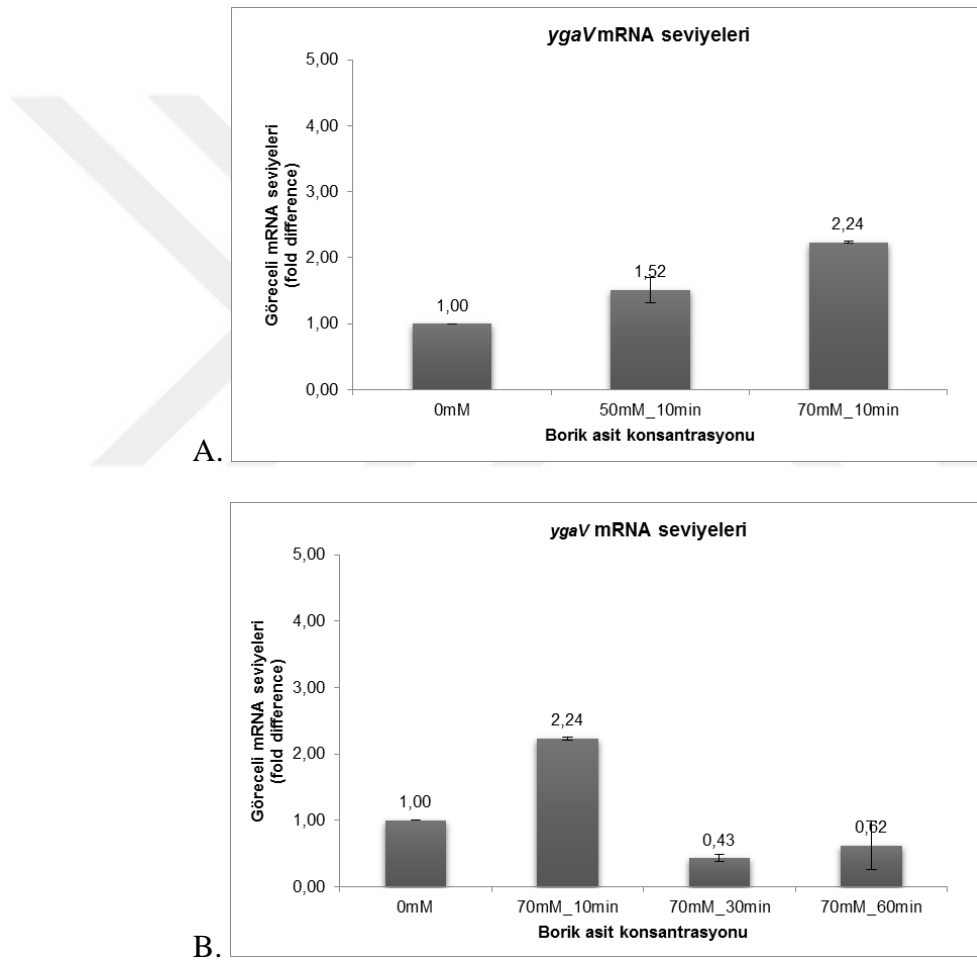
trpR geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *trpR* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.90A). Aynı zamanda, *trpR* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.90B).



Şekil 3.90. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *trpR* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.

3.4.4.12. *ygaV* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

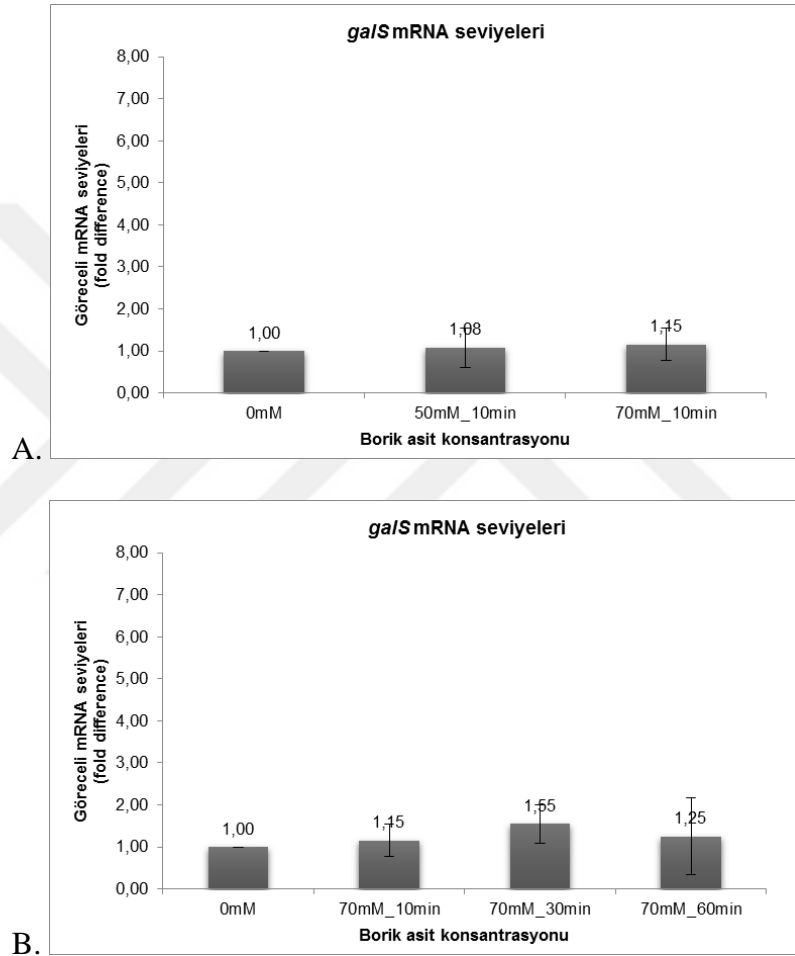
ygaV geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *ygaV* geninin mRNA seviyesinin ortalama 1.52 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 2.24 kat arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.91A). Aynı zamanda, *ygaV* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 91B).



Şekil 3.91. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *ygaV* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.13. *galS* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

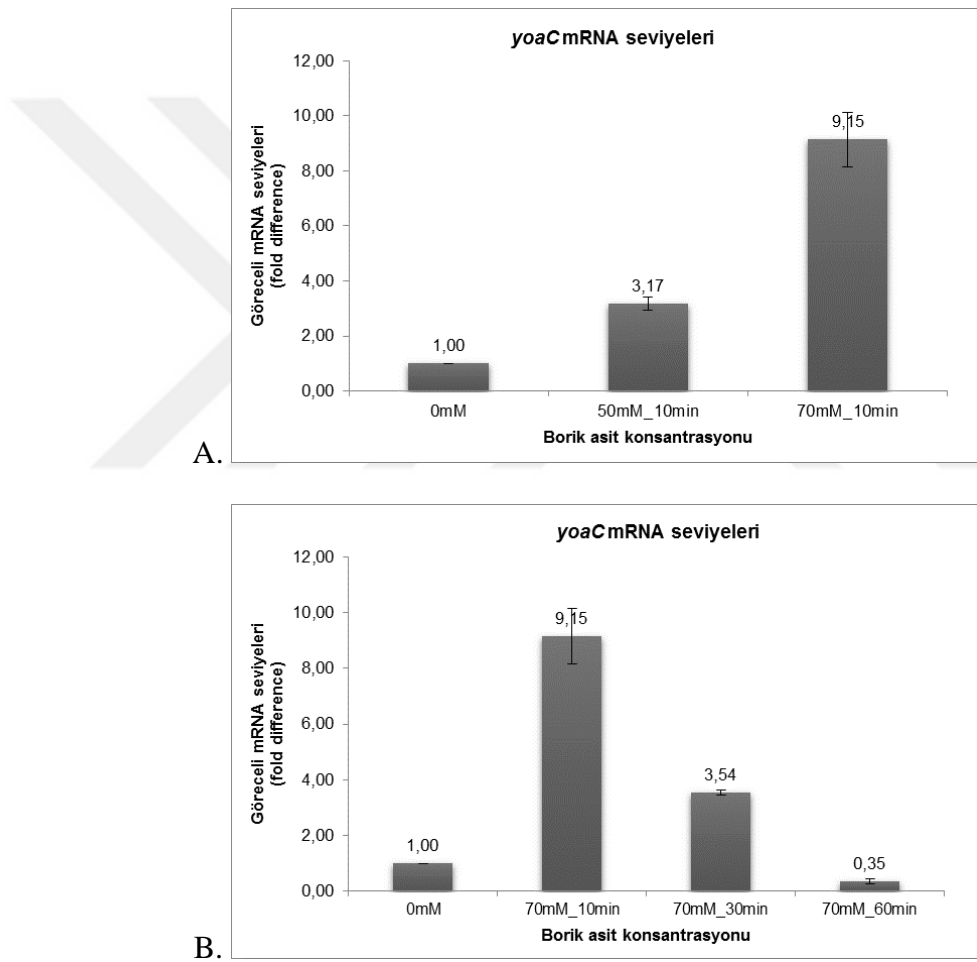
galS geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *galS* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.92A). Aynı zamanda, *galS* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.92B).



Şekil 3.92. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *galS* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.14. *yoaC* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

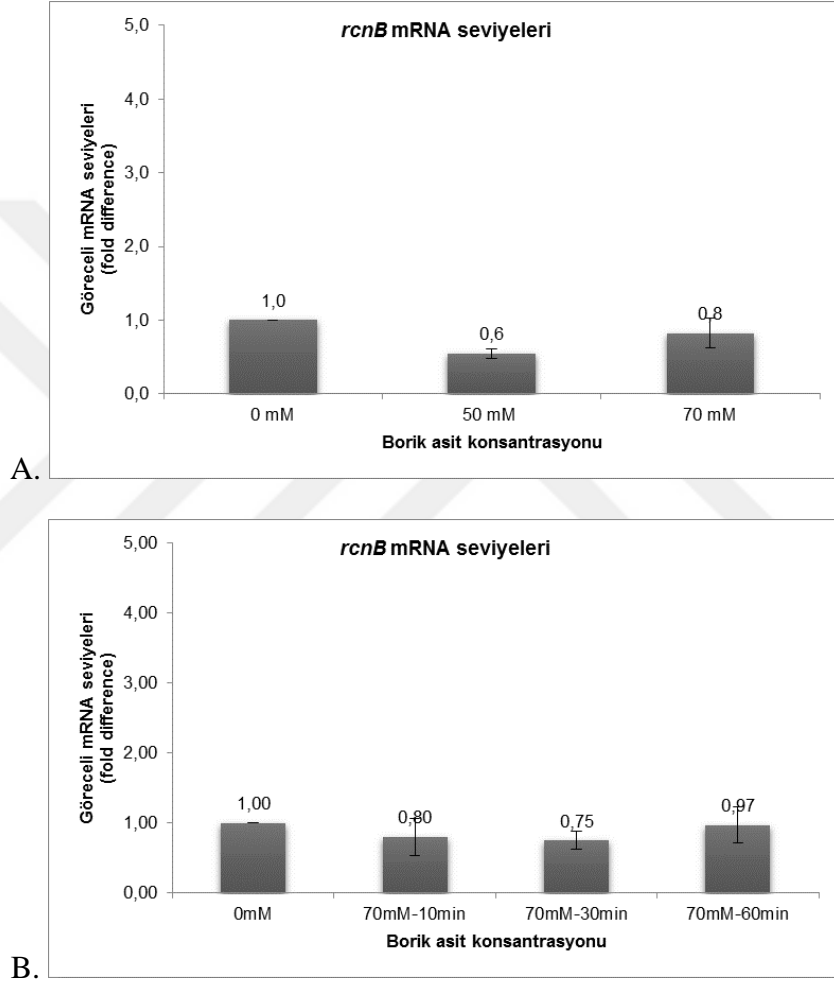
yoaC geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *yoaC* geninin mRNA seviyesinin ortalama 3.17 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 9.15 kat arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.93A). Aynı zamanda, *yoaC* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.93B).



Şekil 3.93. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *yoaC* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.15. *rcnB* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

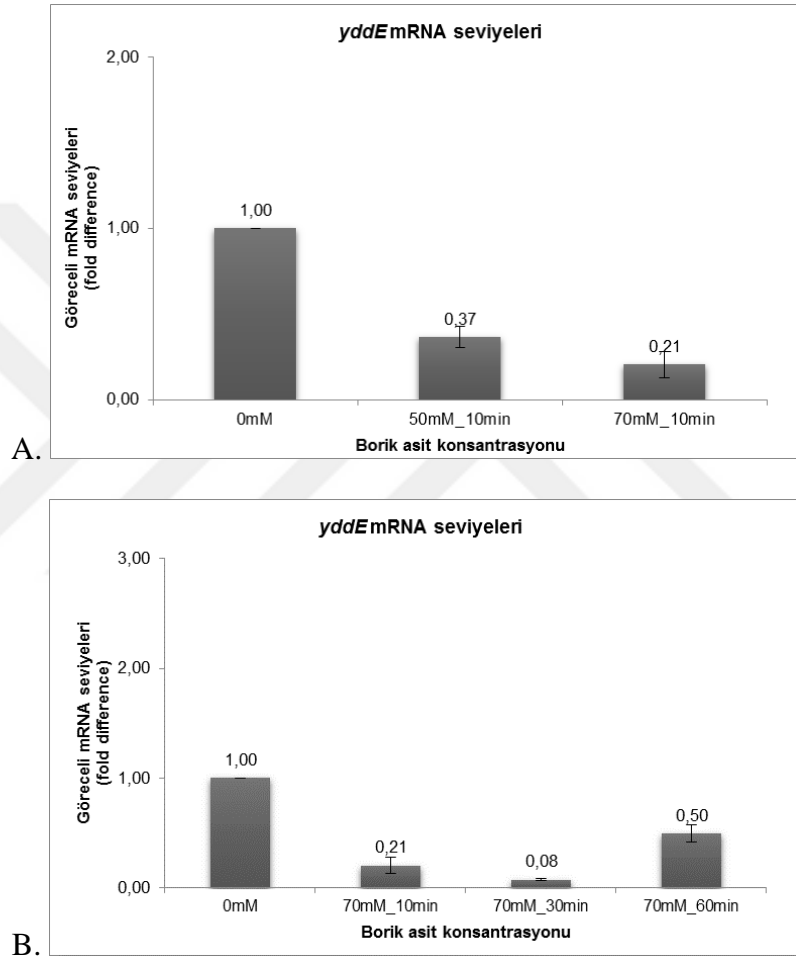
rcnB geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *rcnB* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.94A). Aynı zamanda, *rcnB* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.94B).



Şekil 3.94. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *rcnB* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.16. *yddE* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

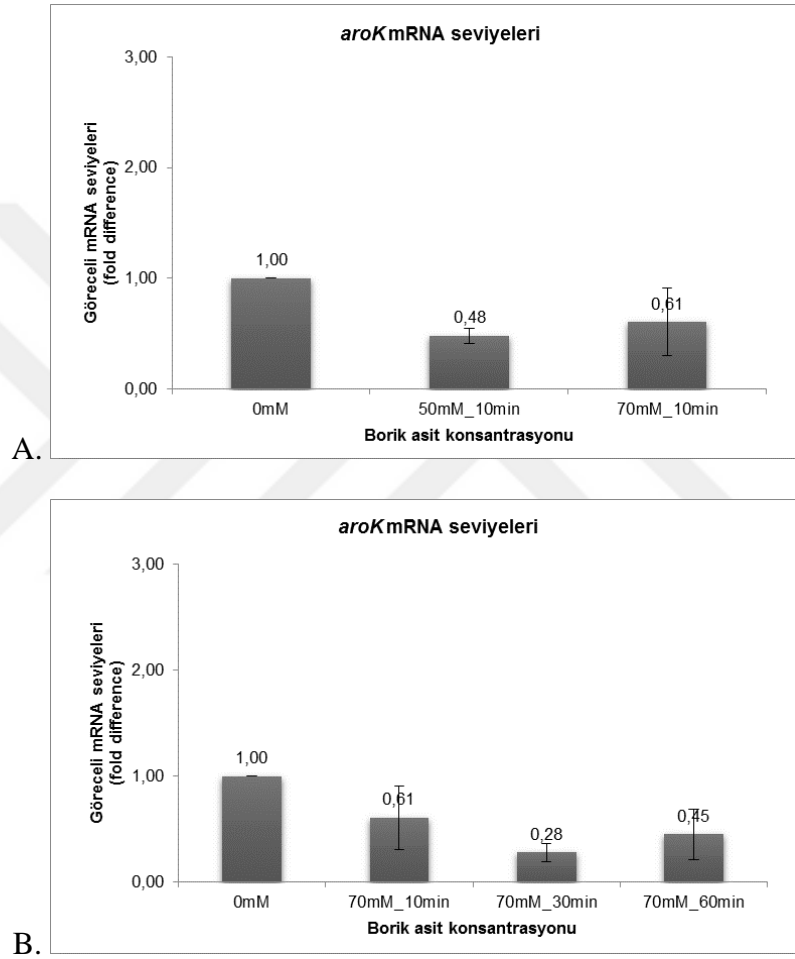
yddE geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *yddE* geninin mRNA seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Şekil 3.95A). Aynı zamanda, *yddE* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.95B).



Şekil 3.95. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *yddE* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.17. *aroK* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

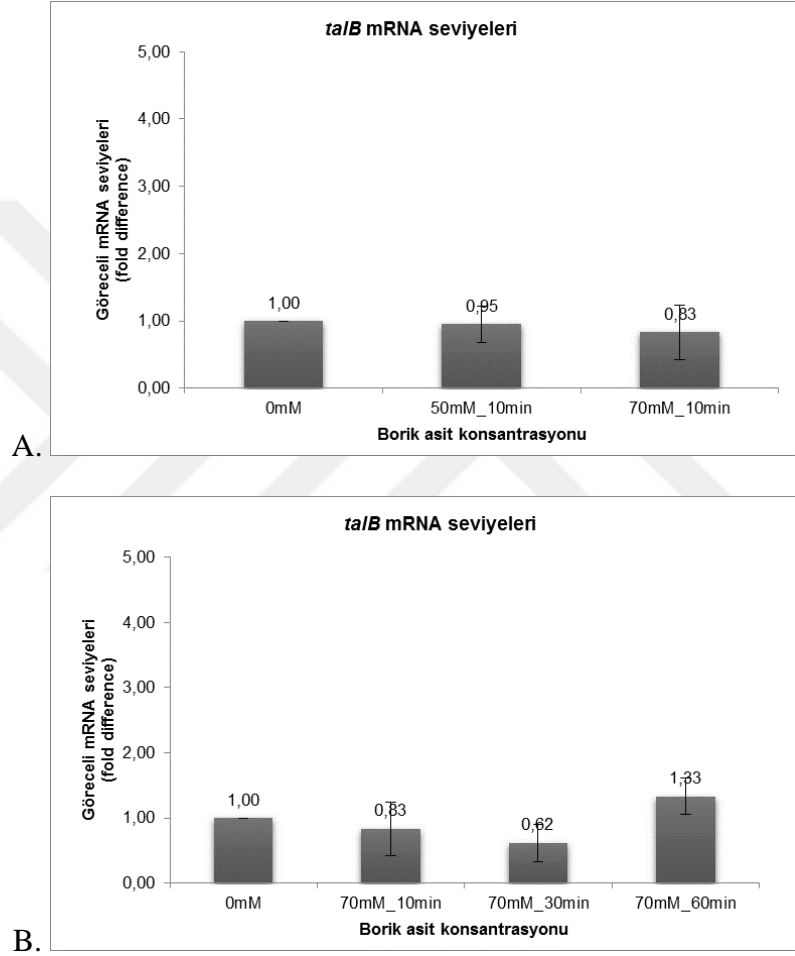
aroK geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *aroK* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.96A). Aynı zamanda, *aroK* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.96B).



Şekil 3.96. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *aroK* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.18. *talB* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

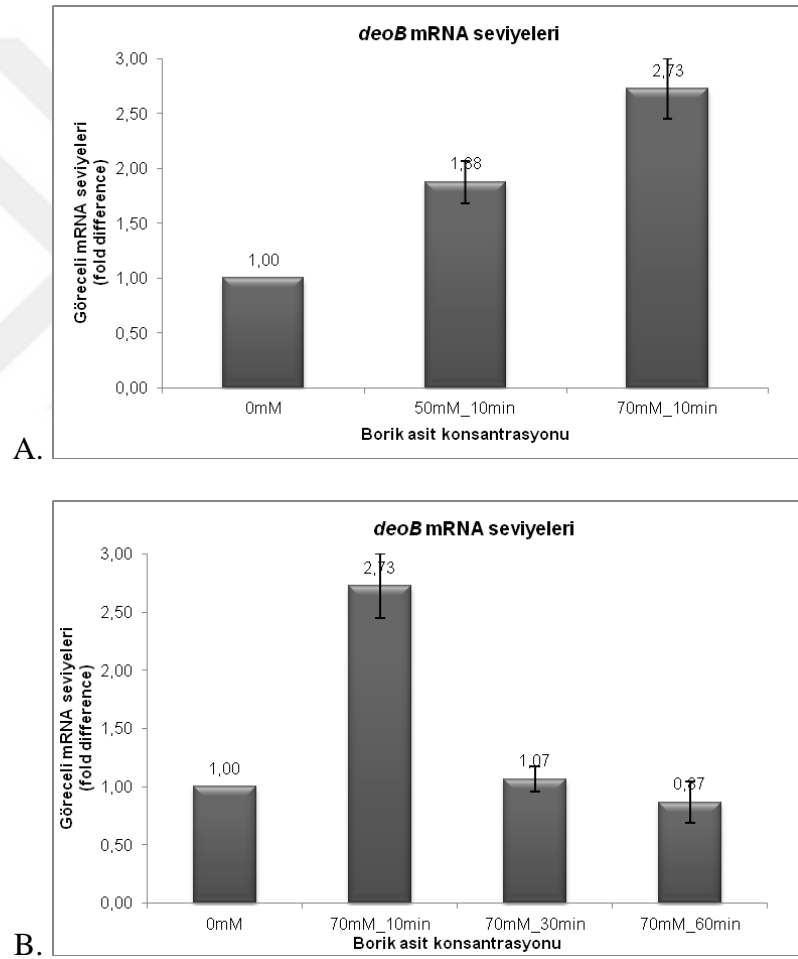
talB geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *talB* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.97A). Aynı zamanda, *talB* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.97B).



Şekil 3. 97. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *talB* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik.

3.4.4.19. *deoB* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

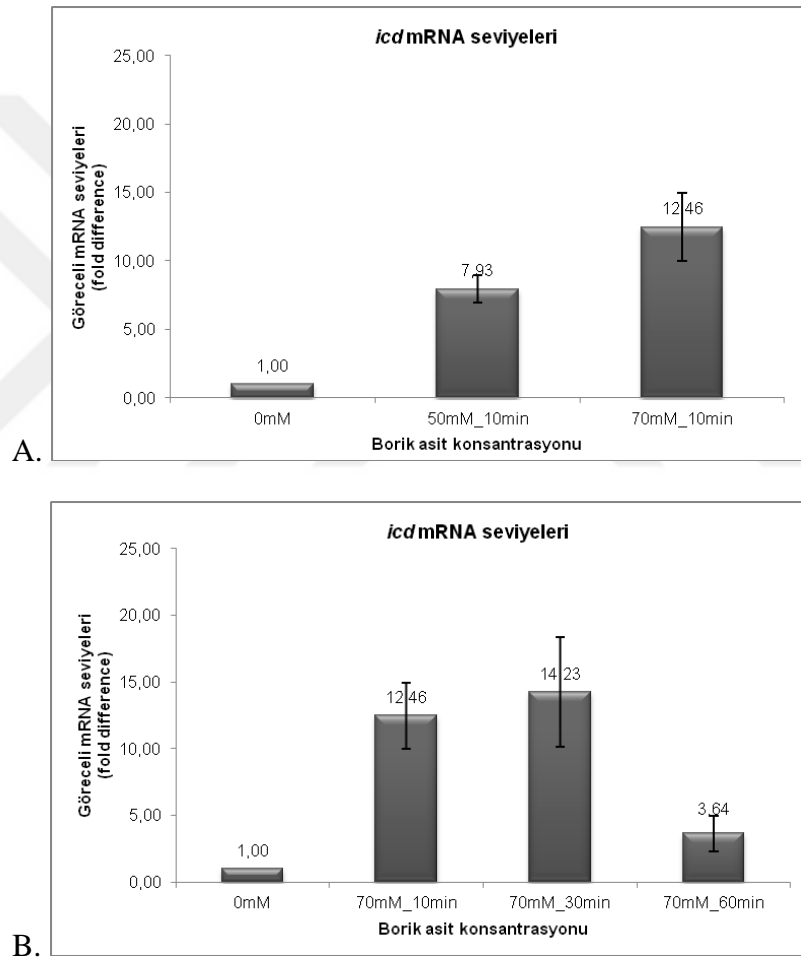
deoB geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *deoB* geninin mRNA seviyesinin ortalama 1.88 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 2.73 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.98A). Aynı zamanda, *deoB* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.98B).



Şekil 3.98. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *deoB* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.20. *icd* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

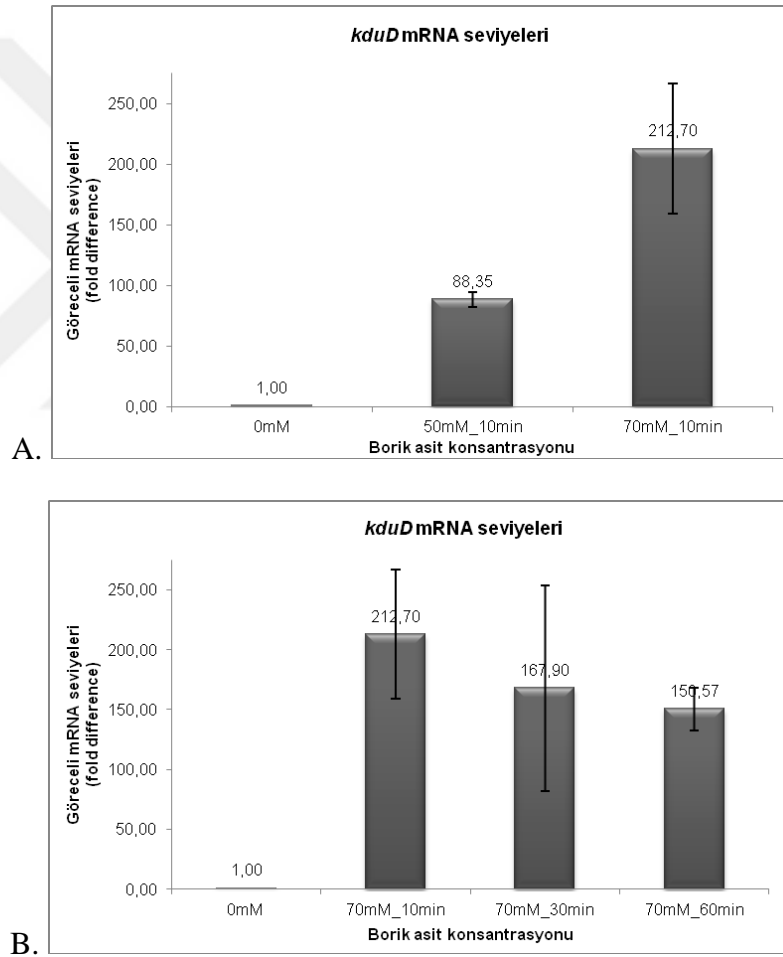
icd geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *icd* geninin mRNA seviyesinin ortalama 7.93 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 12.46 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.99A). Aynı zamanda, *icd* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.99B).



Şekil 3.99. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *icd* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.21. *kduD* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

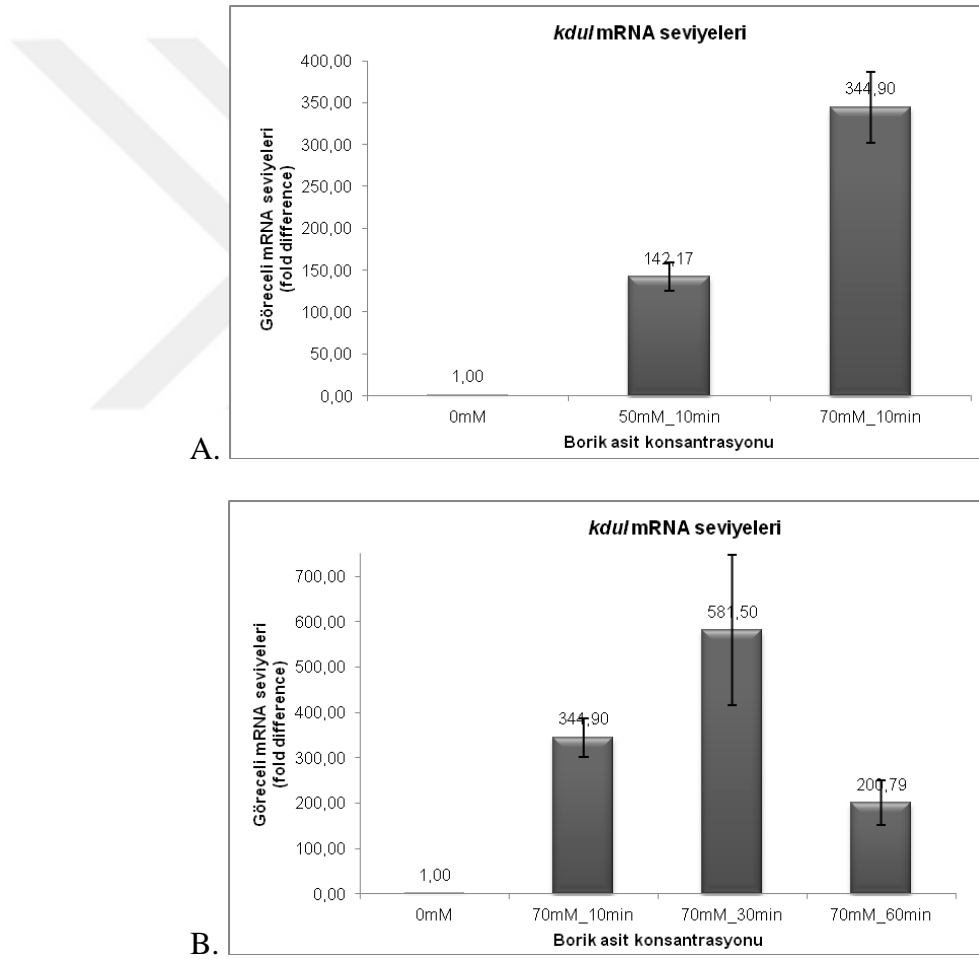
kduD geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *kduD* geninin mRNA seviyesinin ortalama 88.35 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 212.70 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.100A). Aynı zamanda, *kduD* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.100B).



Şekil 3.100. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *kduD* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.22. *kduI* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

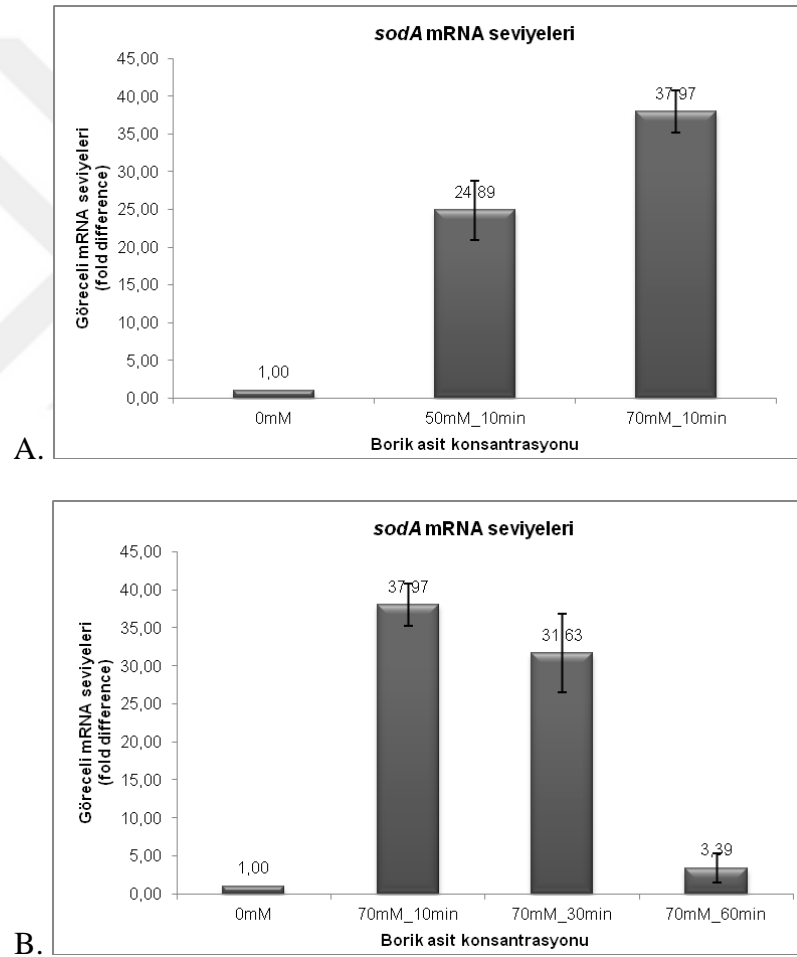
kduI geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *kduI* geninin mRNA seviyesinin ortalama 142.17 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 344.90 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.101A). Aynı zamanda, *kduI* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.101B).



Şekil 3.101. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *kduI* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.23. *sodA* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

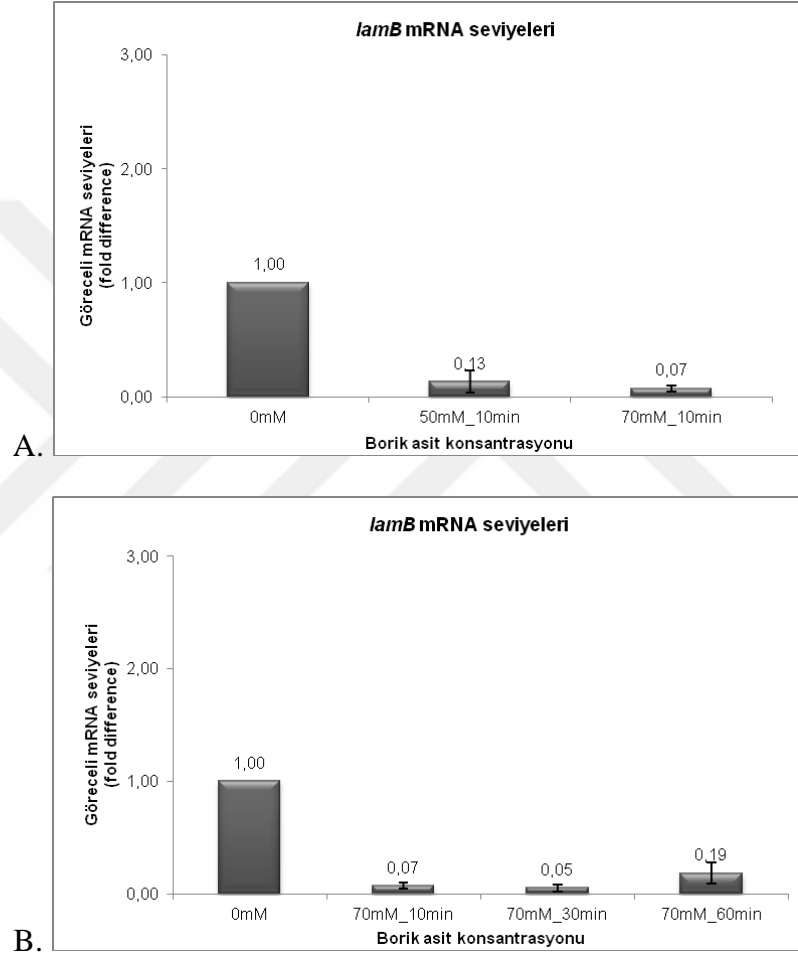
sodA geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *sodA* geninin mRNA seviyesinin ortalama 24.89 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 37.97 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.102A). Aynı zamanda, *sodA* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.102B).



Şekil 3.102. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *sodA* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.24. *lamB* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

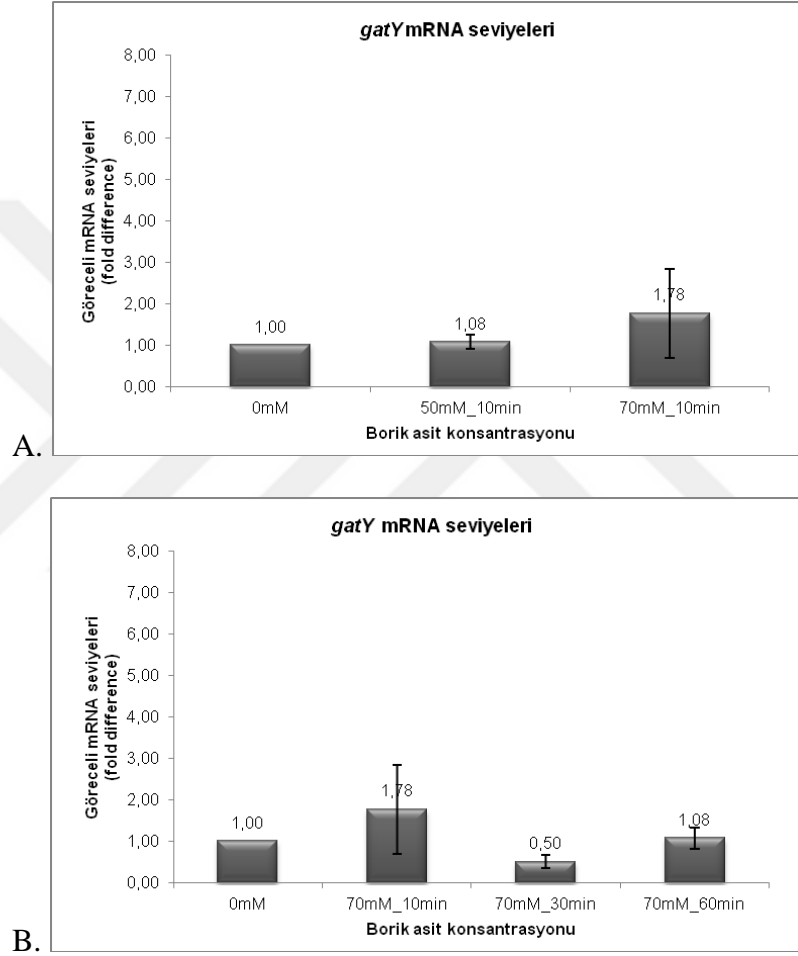
lamB geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *lamB* geninin mRNA seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Şekil 3.103A). Aynı zamanda, *lamB* geninin mRNA seviyelerinin zamana bağlı olarak da azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.103B).



Şekil 3.103. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *lamB* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.25. *gatY* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

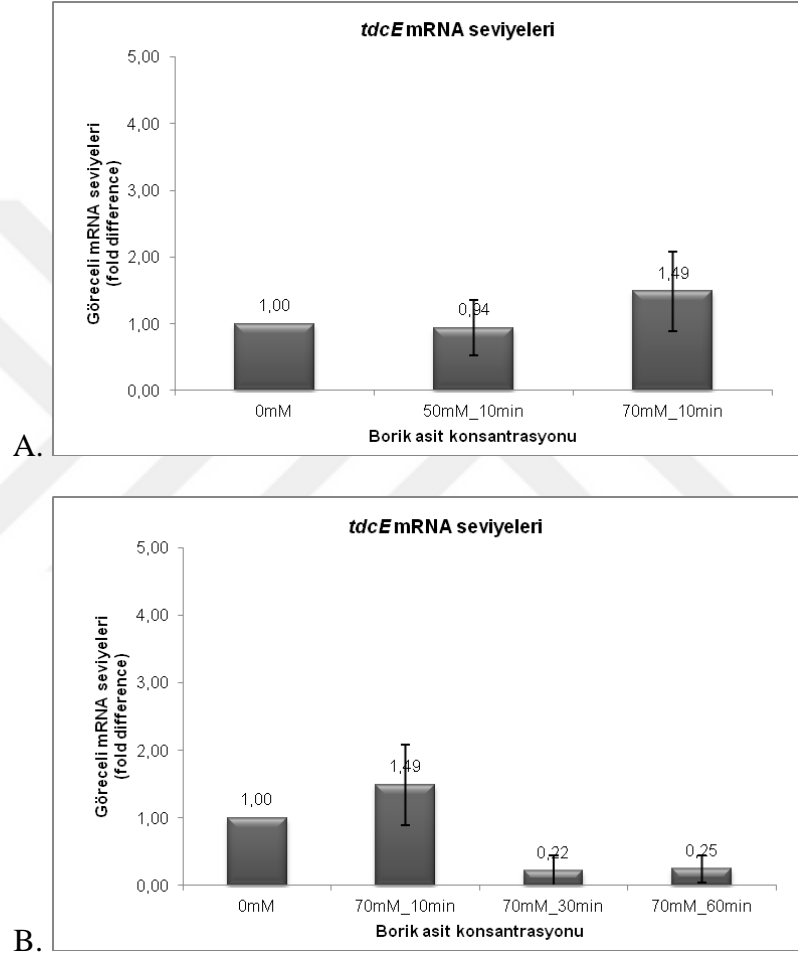
gatY geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *gatY* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.104A). Aynı zamanda, *gatY* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.104B).



Şekil 3.104. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *gatY* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.26. *tdcE* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

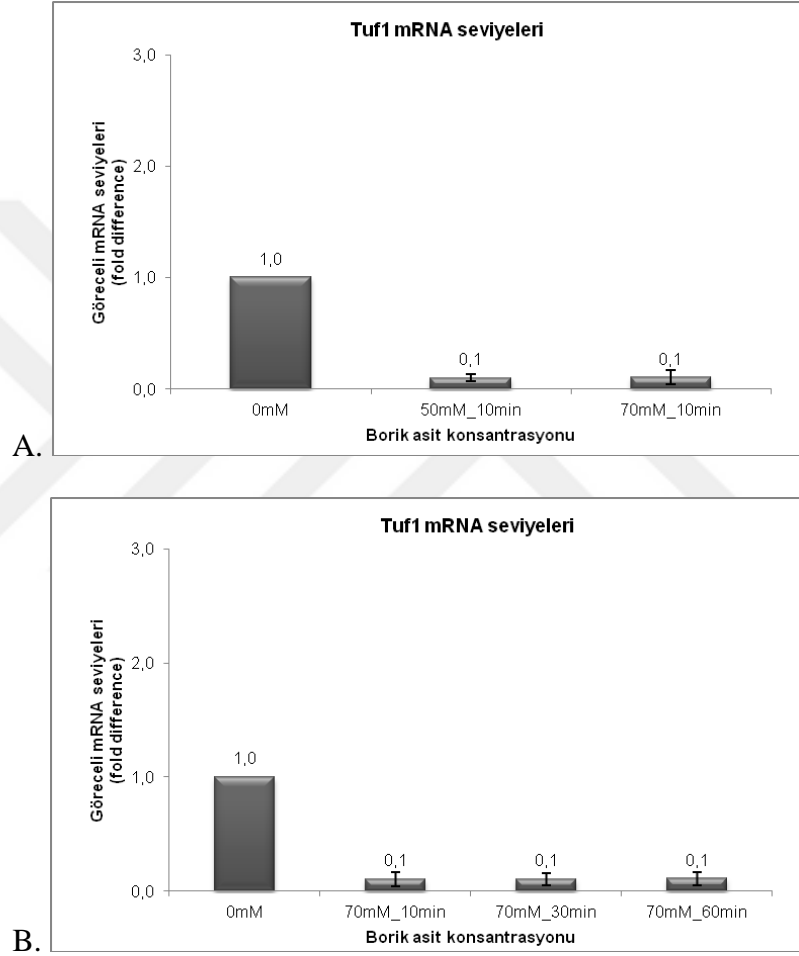
tdcE geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *tdcE* geninin mRNA seviyelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 3.105A). Aynı zamanda, *tdcE* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.105B).



Şekil 3.105. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *tdcE* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.27. *tuf1* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

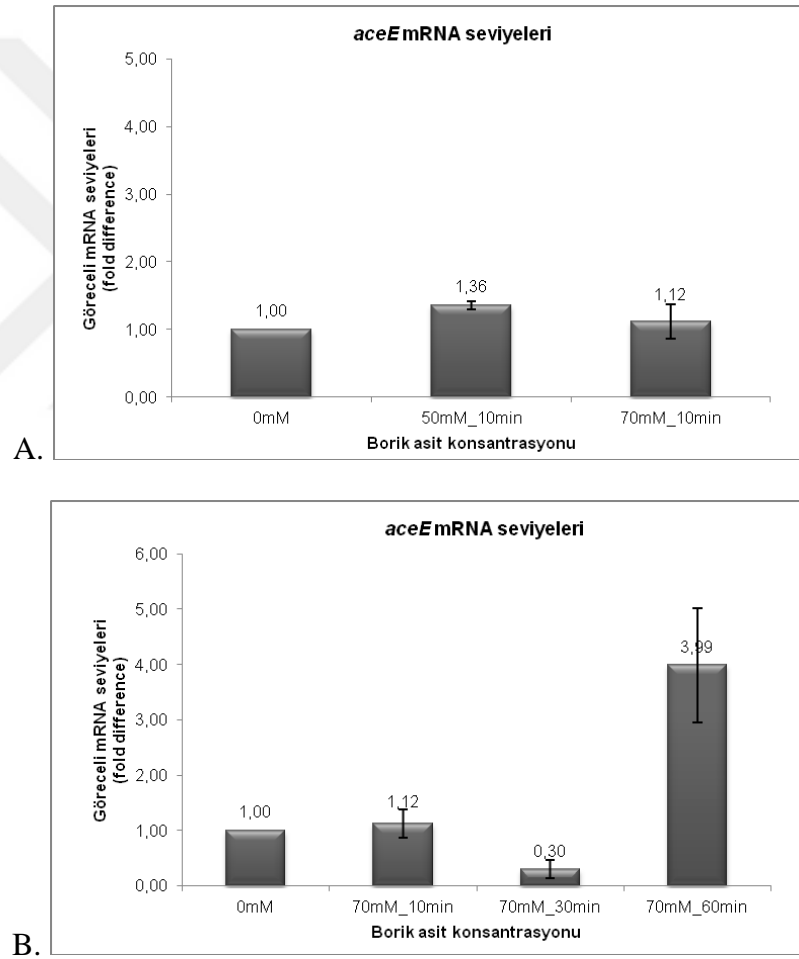
tuf1 geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *tuf1* geninin mRNA seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Şekil 3.106A). Aynı zamanda, *tuf1* geninin mRNA seviyelerinin zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.106B).



Şekil 3.106. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *tuf1* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.28. *aceE* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

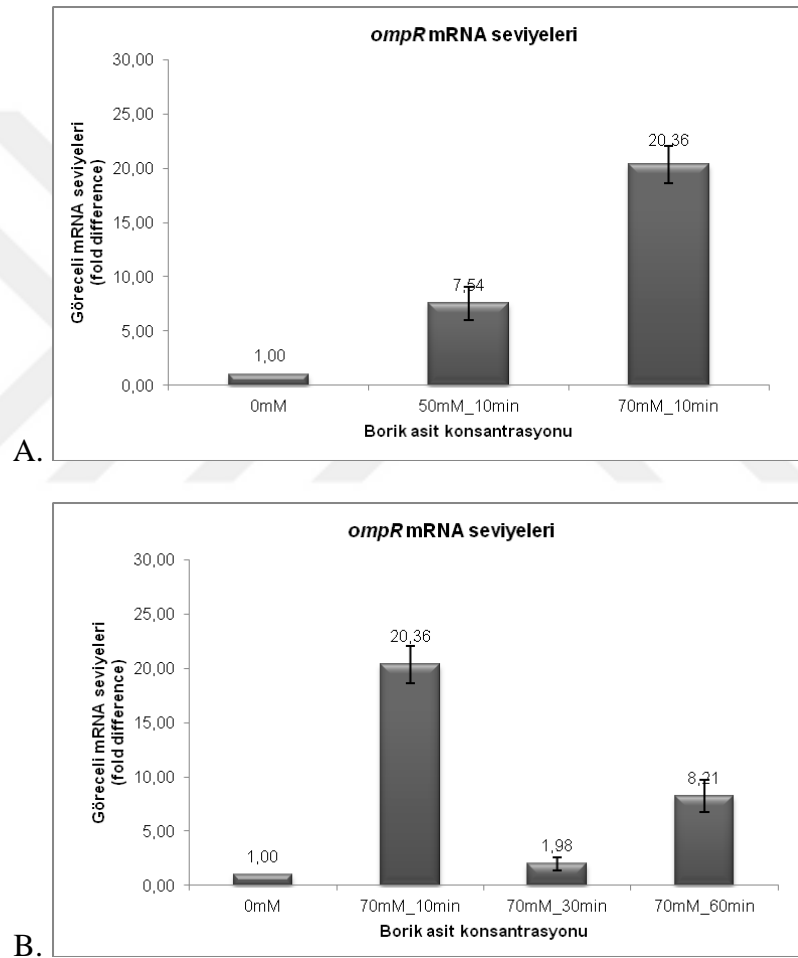
aceE geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *aceE* geninin mRNA seviyesinin ortalama 1.36 kat; 60 dk içerisinde 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 3.99 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.107A). Aynı zamanda, *aceE* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. 30 dk borik asite maruz kalma sonucu mRNA seviyesinde azalma gözlenmiş, 60 dk içerisinde ise yaklaşık 4 kat artış gözlenmektedir (Şekil 3.107B).



Şekil 3.107. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *aceE* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

3.4.4.29. *ompR* geninin Real-Time PCR analizi sonuçları

ompR geninin Real-Time PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, 10 dk içerisinde 50 mM borik asit içeren ortamda *ompR* geninin mRNA seviyesinin ortalama 7.54 kat; 70 mM borik asit içeren ortamda ekspresyon seviyesinin ortalama 20.36 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.108A). Aynı zamanda, *ompR* geninin mRNA seviyeleri zamana bağlı olarak da değerlendirilmiştir. Borik asite maruz kalma süresi arttıkça ise gen ekspresyon seviyesinde göreceli olarak bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.108B).



Şekil 3.108. Borik asit içermeyen, 50 mM ve 70 mM borik asit içeren ortamlarda *ompR* geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimi gösteren grafik

Real-Time PCR analiz çalışmaları sonucunda, *yfeS*, *ylaC*, *torR*, *garp*, *dinJ*, *aceF*, *ygaV*, *yoaC*, *deoB*, *icd*, *kduD*, *kduI*, *soda*, *aceE* ve *ompR* genlerinin ortamda bor konsantrasyonu arttıkça, mRNA seviyelerinin de arttığı görülmüştür.

3.5. Bor Stresi Altında *E. coli* (DH10b) Suşu ve *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) Suşlarının NMR Yaklaşımıyla Metabolomiks Analizi

Borik asit *E. coli* DH10b suşu üzerinde 80-90 mM konsantrasyonda büyümeyi inhibe eder. Bor stresine karşı hücre belli konsantrasyonlarda mücadele edebilir. Bunun için çeşitli genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin seviyeleri değiştirilerek hücresel sistemin hayatına devam etmesi sağlanmaya çalışılır. Bu tez çalışmasında genom boyu tarama, gen ekspresyonu ve proteomik yaklaşımları ile bor ile ilgili genleri ve proteinleri tespit etmek için birçok deneyler yapılmış ve yeni önemli veriler elde edilmiştir. Hücresel hayatın devamında ve her türlü koşula karşı cevapta aksiyon aşamasında en önemli olan aslında canlılık için sistemin işlemesi ve yeniden düzenlenmesidir. Burada metabolik yolların aktivasyonu/inhibisyonu ile hücrede yeni kararlar verilir, bazı moleküller sentezlenir bazıları yıkıma uğratılır, katabolik reaksiyonlar sonucu elzem olan metabolitler ve enerji metabolizması düzenlenerek gerekli olan ATP elde edilir. Sonuçta yeni yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ile bor stresi altında canlılığın devam etmesi için gerekenler yapılır. Yani ayrıca bakılması gereken metabolizmadır ve bunun için bu tez çalışmasında metabolomiks yaklaşımı ile NMR yöntemi kullanılarak bazı seviyeleri değişen metabolitlerin bulunması ve düzenlenen sisteme dair ipuçları elde edilmesi de amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 2 suş kullanılmıştır. Bunlar *E. coli*(DH10b) suşu ve genom boyu tarama çalışmalarından elde edilen, bor tolerans seviyesinin yüksek olduğu gözlenen *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) suşlarıdır. Bu suşlar sub-lethal borik asit konsantrasyonlarına 1 saat maruz bırakılarak metabolit ekstraksiyonları yapılmıştır (Bknz Malzeme ve Yöntem, bölüm 2.9.). Ekstraksiyon sonrası yapılan liyofilizasyon sonucu elde edilen metabolit pelletlerinin miligram miktarları belirlenmiş ve aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.22. ve Çizelge 3.23.).

Çizelge 3.22. *E. coli*(DH10b) kontrol suşunun metabolit ekstrakt miktarları

Suş	Borik asit	Liyofilize edilmiş boş tüp	Ekstrakt ve tüp	Metabolit ekstraktı (g)	Metabolit ekstraktı (mg)
DH10b 1a	0 mM	1.03631	1.03947	0.00316	3.16 ^a
DH10b 1b	0 mM	1.03363	1.04202	0.00839	8.39
DH10b 1c	0 mM	1.03106	1.03789	0.00683	6.83
DH10b 2a	25 mM	1.04689	1.05354	0.00665	6.65
DH10b 2b	25 mM	1.03385	1.03797	0.00412	4.12
DH10b 2c	25 mM	1.02422	1.0313	0.00708	7.08
DH10b 3a	50 mM	1.02928	1.03801	0.00873	8.73
DH10b 3b	50 mM	1.04235	1.05152	0.00917	9.17
DH10b 3c	50 mM	1.03250	1.04026	0.00776	7.76
DH10b 4a	75 mM	1.02943	1.03501	0.00558	5.58 ^a
DH10b 4b	75 mM	1.03233	1.04083	0.00850	8.5
DH10b 4c	75 mM	1.02392	1.03271	0.00879	8.79

^a Santrifüj/liyofilizasyon esnasında kayıp olmuştur.

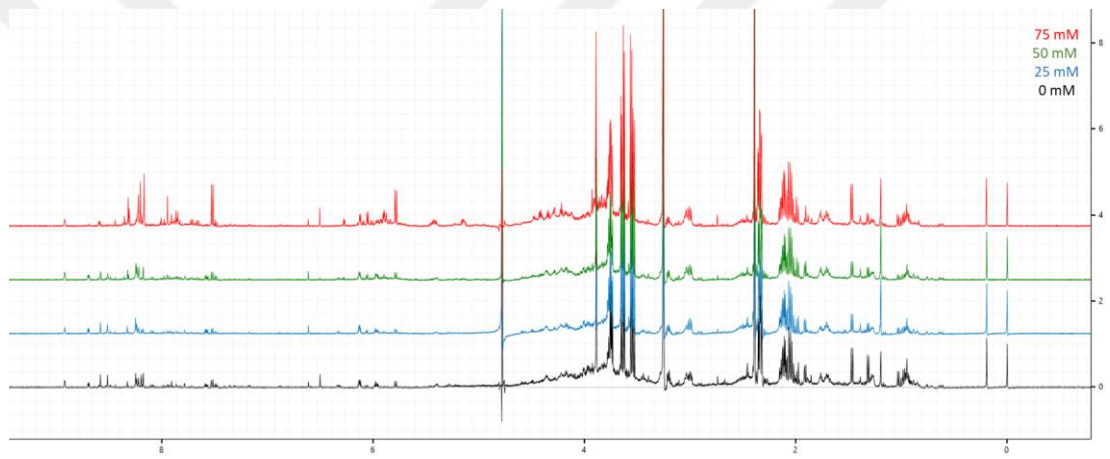
Çizelge 3.23. *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun metabolit ekstrakt miktarları

Suş	Borik asit	Liyofilize edilmiş boş tüp	Ekstrakt ve tüp	Metabolit ekstraktı (g)	Metabolit ekstraktı (mg)
aceK 1a	0 mM	1.03097	1.03855	0.00758	7.58
aceK 1b	0 mM	1.02926	1.03607	0.00681	6.81
aceK 1c	0 mM	1.03117	1.03708	0.00591	5.91
aceK 2a	50 mM	1.02451	1.03257	0.00806	8.06
aceK 2b	50 mM	1.03981	1.04779	0.00798	7.98
aceK 2c	50 mM	1.0474	1.05489	0.00749	7.49
aceK 3a	75 mM	1.03395	1.04107	0.00712	7.12
aceK 3b	75 mM	1.03649	1.04152	0.00503	5.03
aceK 3c	75 mM	1.04763	1.05375	0.00612	6.12
aceK 4a	100 mM	1.03392	1.04057	0.00665	6.65
aceK 4b	100 mM	1.03329	1.03879	0.0055	5.50
aceK 4c	100 mM	1.03145	1.03842	0.00697	6.97

Tek boyutlu (1D) proton (¹H) NMR teknolojisi kullanılarak, ekstraktlardaki metabolitleri temsil eden “pik”ler belirlenmiştir. Daha sonra bu piklerin analizleri yani ¹H-NMR spektrumlarının düzenlenmesi ve incelenmesi, metabolitlerinin ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için Chenomx NMR suite yazılımı kullanılmıştır. Bu programda 338 adet metabolit bilgisi mevcuttur ve değerlendirme bunların arasından yapılmaktadır.

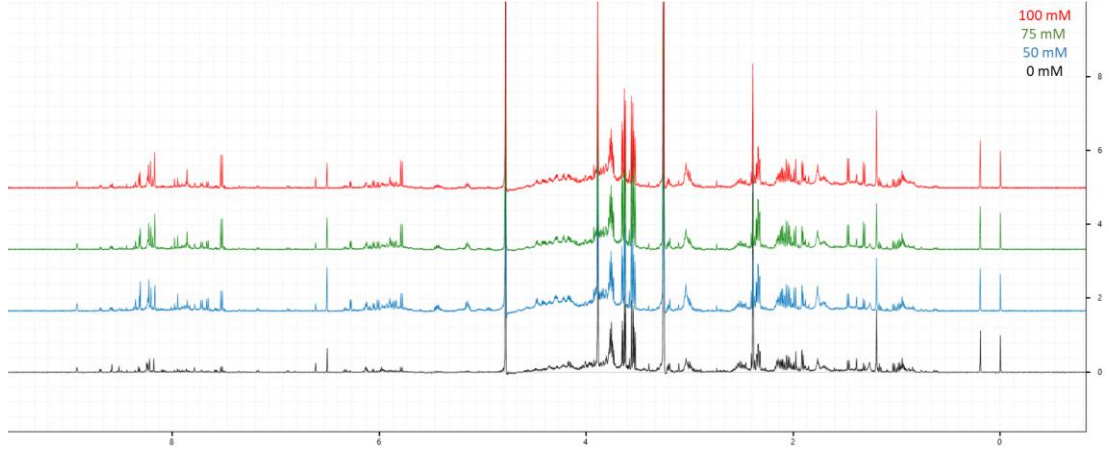
E. coli(DH10b) kontrol suşunun, borik asit içermeyen ve sub-lethal (25 mM, 50 mM ve 75 mM) borik asit konsantrasyonlarında yetiştirilmesinden elde edilen ekstraktlar kullanılarak, ¹H-NMR analizi sonuçları Chenomx NMR programı yardımıyla

metabolitlerinin spektrumları elde edilmiştir (Şekil 3.109.). Chenomx profillerin kütüphanesinde bulunan yüzlerce bileşik ve pikler, elde edilen her bir metabolit için tek tek değerlendirilmiştir. Muhtemel metabolitler, 0.5 mM DSS pikinin şiddeti ile karşılaştırılarak metabolitlerin konsantrasyonları otomatik olarak tespit edilmiştir. Daha sonra, programın tespit ettiği her bir metabolit için ve konsantrasyon için, spektrumlardaki pikler, manuel olarak tek tek değerlendirilmiş, konsantrasyonları onaylanmıştır. Her bir suş için 4 konsantrasyonda üçlü tekrardan elde edilen spektrum vardır ve toplamda 2 suş için, 2 suş x 4 konsantrasyon x 3'lü tekrar olmak üzere, 24 spektrumda yer alan yüzlerce pik teker teker manuel olarak değerlendirilmiş ve güvenilirliklerine karar verilmiştir.



Şekil 3.109. *E. coli* DH10b kontrol suşundan elde edilen metabolit ekstraktlarının ¹H-NMR spektrumları

Aynı işlemler *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için de yapılmıştır. Bu suşun bor tolerans değeri daha yüksek olduğu için kullanılan sub-lethal konsantrasyonlar, borik asit içermeyen, 50 mM, 75 mM ve 100 mM olarak tercih edilmiş ve yetiştirilen hücrelerden elde edilen metabolitlerinin analizleri için, ¹H-NMR çıktıları program yardımıyla spektrumlara dönüştürülmüş ve NMR spektrumlarındaki (Şekil 3.110.) pikler teker teker kontrol edilmiştir.



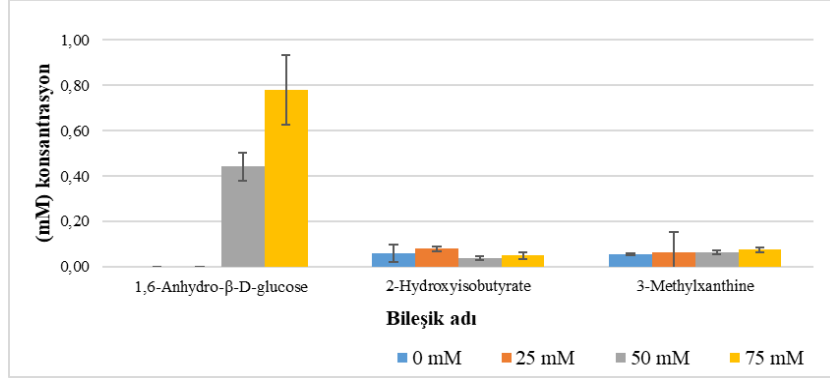
Şekil 3.110. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşundan elde edilen metabolit ekstraktlarının ¹H-NMR spektrumları

Her iki suştan elde edilen üç tekrarlı olarak yapılan NMR sonuçları Chenomx programında analiz edildikten sonra, metabolitlerin isimleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. *E. coli*(DH10b) kontrol suşu ve *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunun, metabolit ekstrakt miktarlarına (Çizelge 3.22. ve Çizelge 3.23.) göre, normalizasyon yapılmıştır. Burada her bir örnek için normalizasyon faktörü hesaplanmış ve normalizasyon faktörü metabolit konsantrasyonu ile çarpılarak, metabolitlerin göreceli konsantrasyonları elde edilmiştir. Örneğin *E. coli* DH10b(3a) için normalizasyon faktörü, “ $9.17/8.73=1.050$ ” olarak hesaplanmış ve her bir metabolit konsantrasyonu normalizasyon faktörü ile çarpıldıktan sonra, metabolitlerin son konsantrasyonları elde edilmiştir. Her iki suş için kendi içerisinde normalizasyonlar yapıldıktan sonra her suşun, her bir borik asit konsantrasyonu için 3 tekrarlı sonuçların ortalaması alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 3.24. ve Çizelge 3.25.). Her iki suşun kendi içerisinde, en yüksek pellet miktarı baz alınarak hesaplamalar yapılmıştır. DH10b suşu için normalizasyonda baz alınan pellet miktarı 9.17 mg’dır. AG1(pCA24N::aceK) suşu içinse pellet miktarı 8.06 mg’dır. Buradaki amaç göreceli olarak metabolit konsantrasyonlarının karşılaştırılmasıdır. Değerler grafiklere dönüştürülmüş ve DH10b için Şekil 3.111. - Şekil 3.129. ve *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşu için Şekil 3.130. - Şekil 3.149. arasında gösterilmiştir.

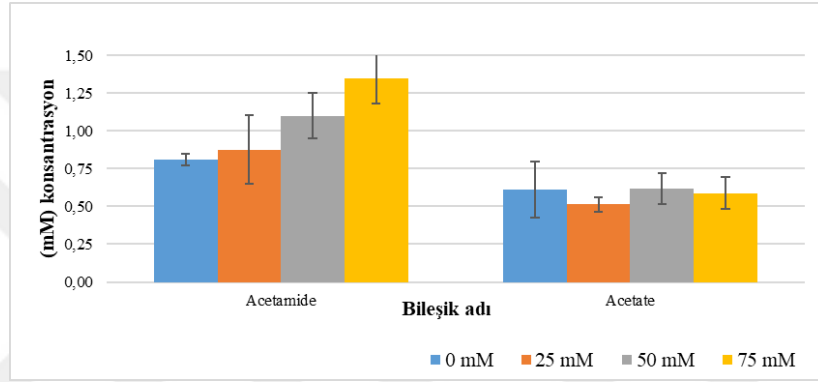
Çizelge 3.24. *E. coli*(DH10b) suşu için metabolit konsantrasyonları

Bileşik adı ^a	0 mM ^b	25 mM ^b	50 mM ^b	75 mM ^b
1,6Anhydro-β-D-glucose	0.000 ±0.000 ^c	0.000 ±0.000	0.442 ±0.061	0.778 ±0.153
2-Hydroxyisobutyrate	0.060 ±0.039	0.079 ±0.010	0.039 ±0.008	0.050 ±0.014
3-Methylxanthine	0.056 ±0.002	0.064 ±0.091	0.065 ±0.009	0.075 ±0.009
Acetamide	0.810 ±0.040	0.876 ±0.227	1.101 ±0.149	1.345 ±0.162
Acetate	0.610 ±0.185	0.513 ±0.050	0.616 ± 0.101	0.588 ±0.105
Adenosine	0.043 ±0.037	0.447 ±0.273	1.163 ±0.079	2.488 ±0.311
Alanine	1.018 ±0.777	0.979 ±0.679	1.362 ± 0.123	1.972 ±0.633
ATP	0.302 ±0.068	0.474 ±0.041	0.382 ±0.105	0.346 ±0.061
Betaine	11.933 ±0.878	3.915 ±0.950	11.731 ±2.257	11.882 ±3.731
cis-Aconitate	0.000 ± 0.000	0.000 ±0.000	0.269 ±0.043	0.349 ±0.024
Creatine phosphate	0.234 ±0.021	0.290 ±0.061	0.266 ±0.100	0.423 ±0.061
Creatinine	0.114 ±0.056	0.225 ±0.018	0.358 ±0.035	0.319 ±0.019
Cytidine	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.445 ±0.097	0.576 ±0.143
Formate	0.265 ±0.024	0.252 ±0.041	0.311 ±0.058	0.481 ±0.113
Fumarate	0.355 ±0.260	0.236 ±0.242	0.461 ±0.326	1.102 ±0.416
Galactarate	0.000 ±0.000	0.248 ±0.117	0.571 ±0.104	1.490 ±0.230
Galactonate	0.082 ±0.012	0.540 ±0.058	1.288 ±0.207	1.802 ±0.326
Glucarate	0.270 ±0.128	0.905 ±0.070	0.865 ±0.175	1.556 ±0.458
Glutamate	20.219 ±0.663	20.935 ±0.837	27.289 ±2.279	25.447 ±5.695
Glycerol	10.246 ±0.448	19.883 ±0.259	16.030 ±2.107	19.265 ±5.962
Glycine	3.047 ±0.899	1.314 ±0.163	1.507 ±0.031	1.943 ±0.513
Guanidoacetate	0.490 ±0.041	0.343 ±0.110	1.167 ±0.220	0.893 ±0.075
Hydroxyacetone	0.316 ±0.141	0.349 ±0.168	0.302 ±0.068	0.322 ±0.021
Hypoxanthine	0.061 ±0.105	0.771 ±0.482	0.738 ±0.379	1.628 ±0.439
Inosine	0.392 ±0.062	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000
Isocitrate	1.778 ±0.423	2.231 ±0.137	1.400 ±0.242	1.431 ±0.077
Lactate	0.611 ± 0.131	0.364 ±0.201	0.232 ±0.048	0.176 ±0.160
Maleate	0.058 ±0.027	0.050 ±0.009	0.189 ±0.085	0.318 ±0.083
N-Acetylornithine	0.000 ±0.000	0.215 ±0.043	0.214 ±0.032	0.299 ±0.053
Niacinamide	1.291 ±0.094	0.907 ±0.153	0.318 ±0.053	0.258 ±0.019
Nicotinate	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.981 ±0.057	1.321 ±0.245
Nicotinurate	0.000 ±0.000	0.817 ±0.279	0.934 ±0.093	0.592 ±0.121
O-Phosphoethanolamine	2.810 ±0.153	1.869 ±0.279	1.771 ±0.083	1.802 ±0.222
Oxypurinol	3.685 ±0.267	6.016 ±0.532	22.346 ±6.322	22.946 ±8.424
Pantothenate	0.019 ±0.017	0.199 ±0.019	0.120 ±0.014	0.180 ±0.039
Putrescine	0.144 ±0.023	0.640 ±0.055	0.842 ±0.034	0.964 ±0.006
Pyridoxine	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.164 ±0.024	0.266 ±0.139
Pyruvate	0.530 ±0.164	0.213 ±0.007	0.469 ±0.079	0.175 ±0.057
Saccharopine	0.853 ±0.093	0.017 ±0.029	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000
Succinate	13.139 ±0.752	12.876 ±2.536	11.123 ±0.978	6.437 ±0.844
Thymidine	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.146 ±0.022	0.333 ±0.011
Thymine	0.093 ±0.081	0.139 ±0.030	0.287 ±0.090	0.250 ±0.096
Uracil	0.778 ±0.447	1.295 ±0.410	3.172 ±1.524	6.251 ±0.745
Uridine	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.517 ±0.261	1.009 ±0.703
Valine	0.630 ±0.037	0.438 ±0.077	0.409 ±0.121	0.540 ±0.260
Xanthine	0.368 ±0.024	0.432 ±0.101	0.599 ±0.098	0.774 ± 0.204
Xanthosine	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.355 ±0.134	0.716 ±0.383

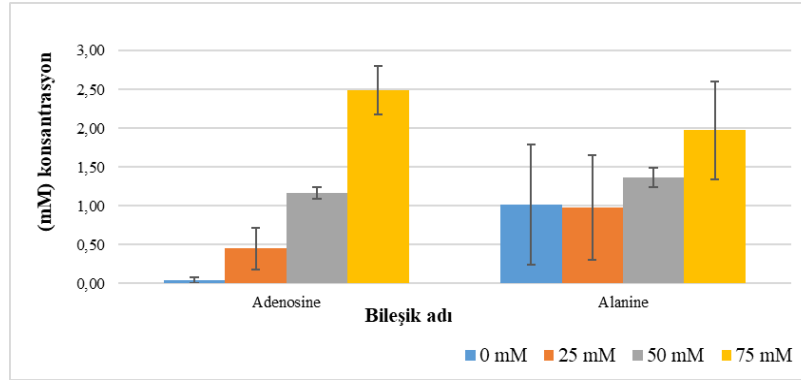
^a NMR spektrumlarındaki piklerin teker teker analizi sonucu onaylanan metabolitleri göstermektedir. ^b LB besi ortamında yetiştirilen bakteri hücrelerinin maruz bırakıldığı borik asit konsantrasyonunu temsil etmektedir. ^c Her bir borik asit konsantrasyonu için tespit edilen metabolitlerin 3 tekrarlı deneysel sonuçlarının ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanarak çizelgeye yazılmıştır.



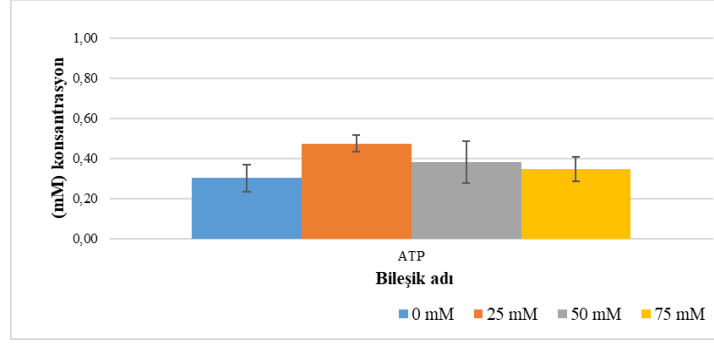
Şekil 3.111. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında 1,6Anhydro-β-D-glucose, 2-Hydroxyisobutyrate, 3-Methylxanthine metabolitlerinin seviyeleri



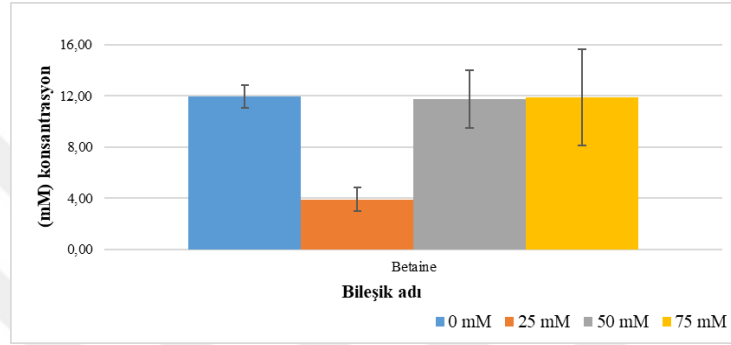
Şekil 3.112. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Acetamide ve Acetate metabolitlerinin seviyeleri



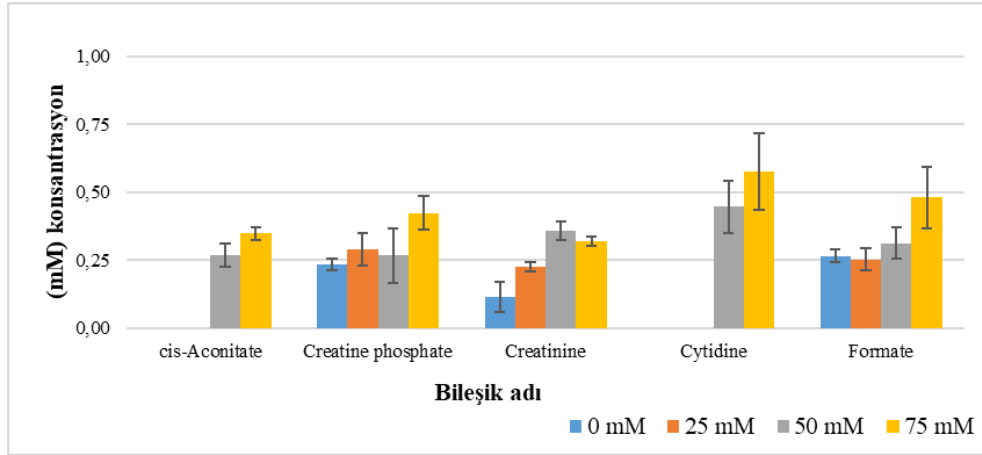
Şekil 3.113. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Adenosine ve Alanine metabolitlerinin seviyeleri



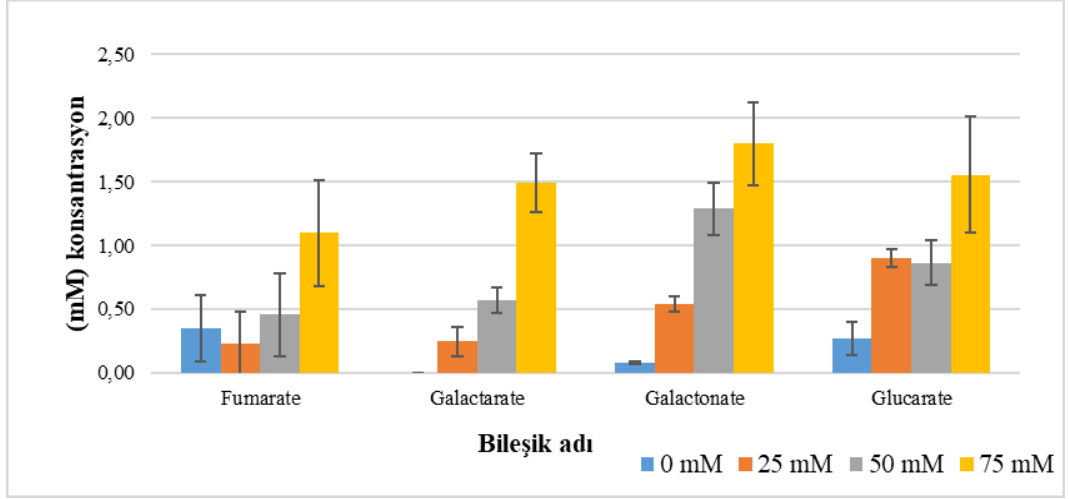
Şekil 3.114. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında ATP metabolitinin seviyeleri



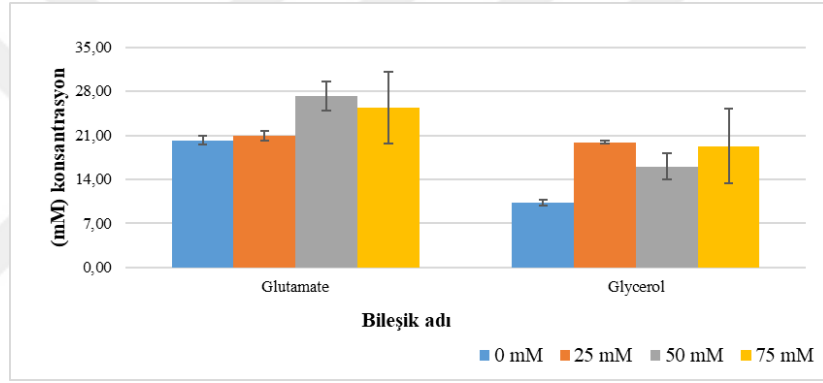
Şekil 3.115. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında Betaine metabolitinin seviyeleri



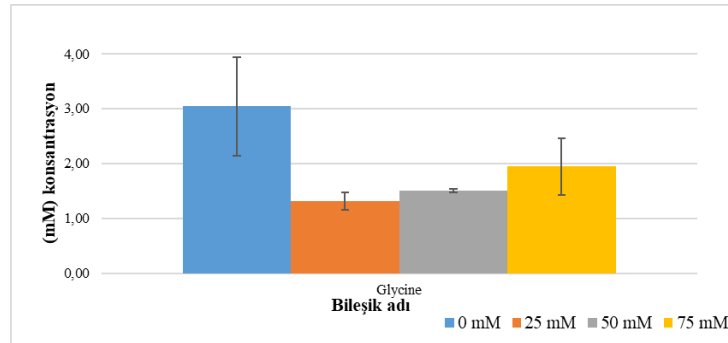
Şekil 3.116. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında cis-Aconitate, Creatine phosphate, Creatinine, Cytidine, Formate metabolitlerinin seviyeleri



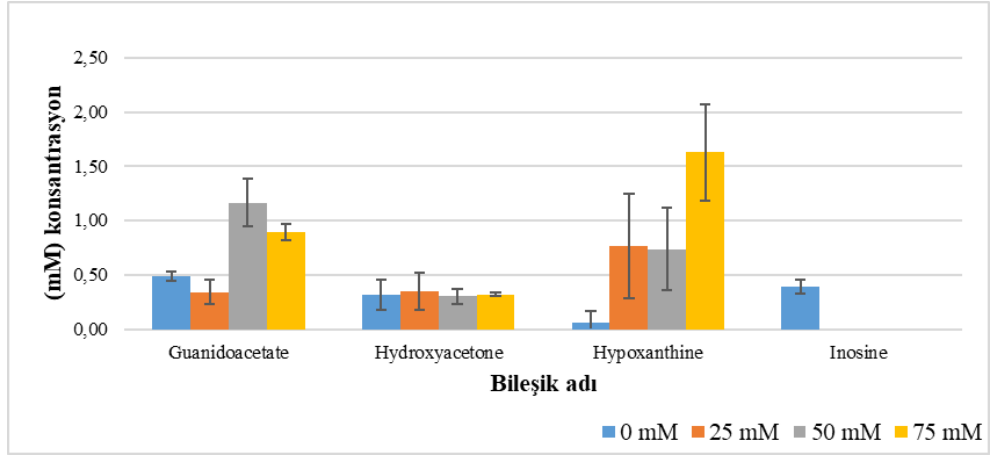
Şekil 3.117. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında Fumarate, Galactarate, Galactonate, Glucarate metabolitlerinin seviyeleri



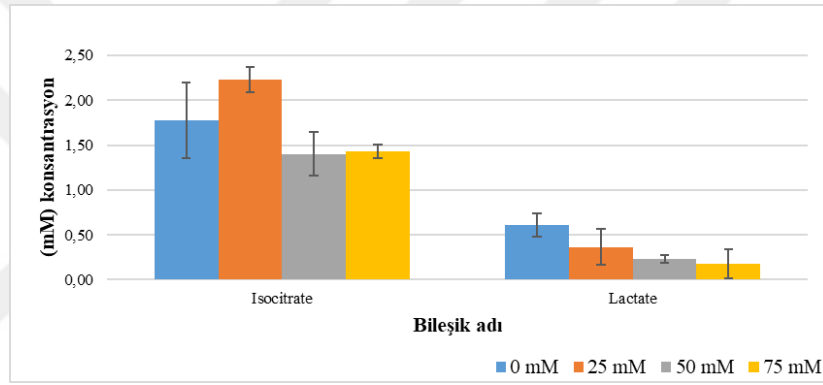
Şekil 3.118. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glutamate ve Glycerol metabolitlerinin seviyeleri



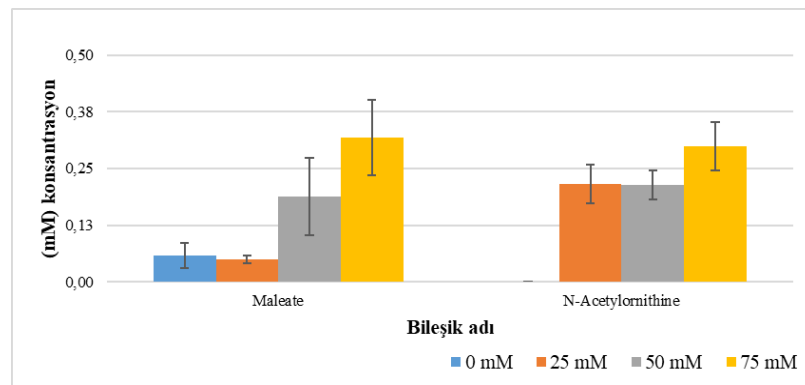
Şekil 3.119. DH10b şusunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glycine metabolitinin seviyeleri



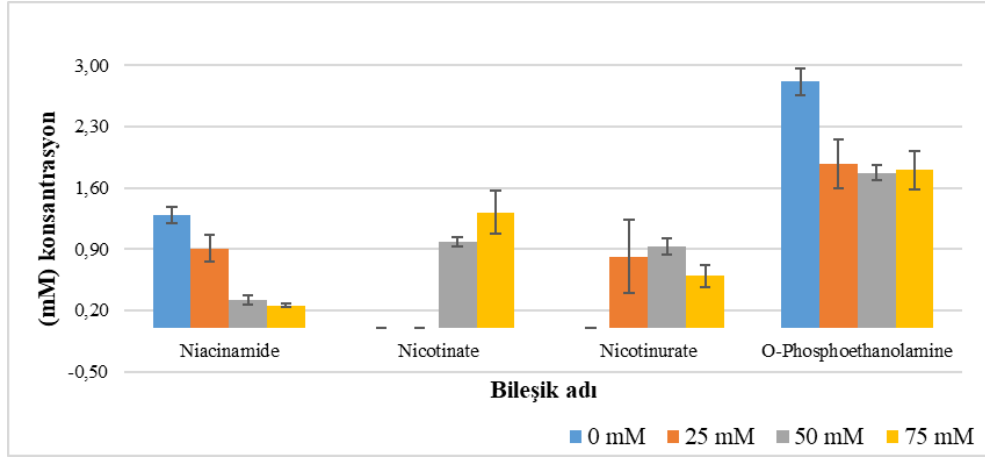
Şekil 3.120. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Guanidoacetate, Hydroxyacetatone, Hypoxanthine ve Inosine metabolitlerinin seviyeleri



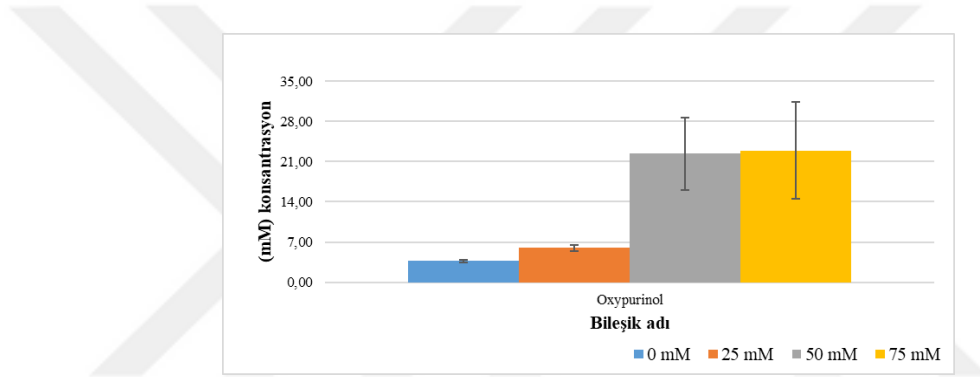
Şekil 3.121. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Isocitrate ve Lactate metabolitlerinin seviyeleri



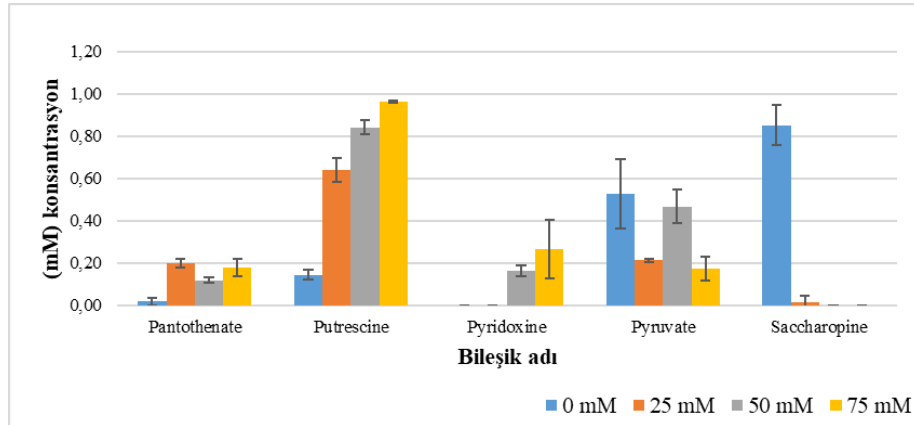
Şekil 3.122. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Maleate ve N-Acetylmethionine metabolitlerinin seviyeleri



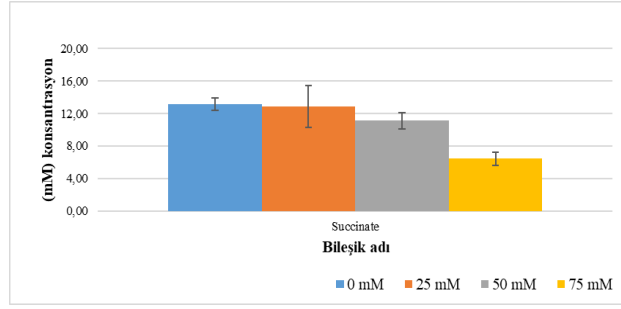
Şekil 3.123. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Niacinamide, Nicotinate, Nicotinurate ve O-Phosphoethanolamine metabolitlerinin seviyeleri



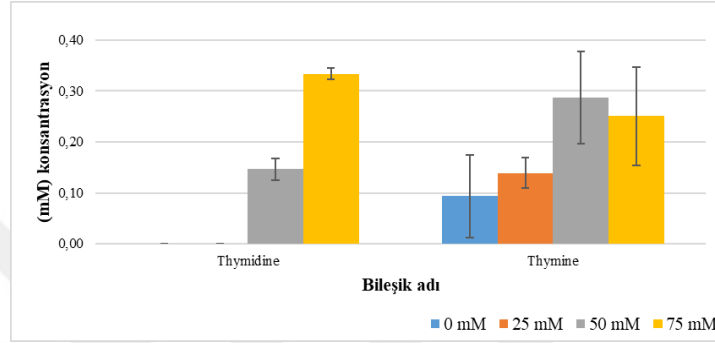
Şekil 3.124. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Oxypurinol metabolitinin seviyeleri



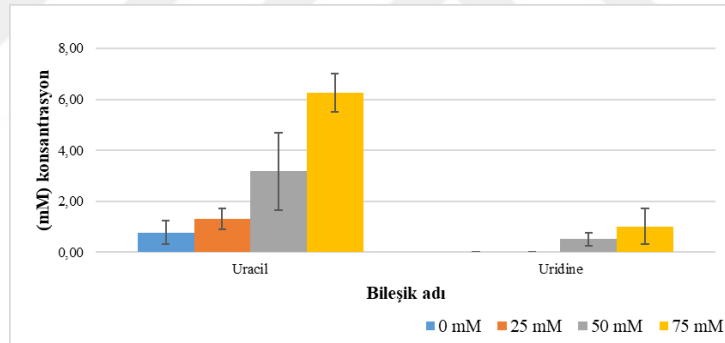
Şekil 3.125. DH10b suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Pantothenate, Putrescine, Pyrodoxine, Pyruvate ve Saccharopine metabolitlerinin seviyeleri



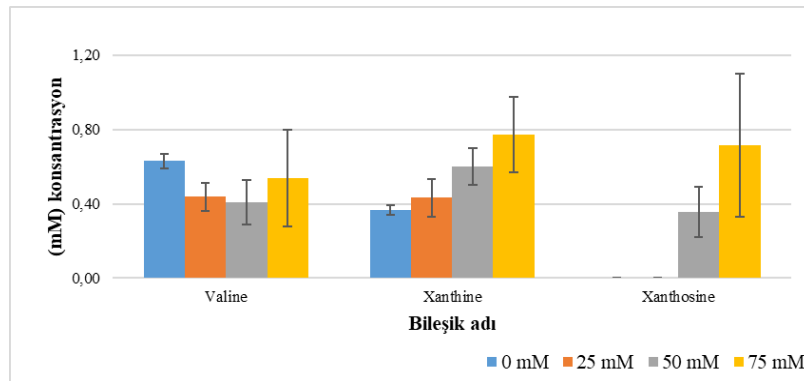
Şekil 3.126. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Succinate metabolitinin seviyeleri



Şekil 3.127. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Thymidine ve Thymine metabolitlerinin seviyeleri



Şekil 3.128. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uracil ve Uridine metabolitlerinin seviyeleri

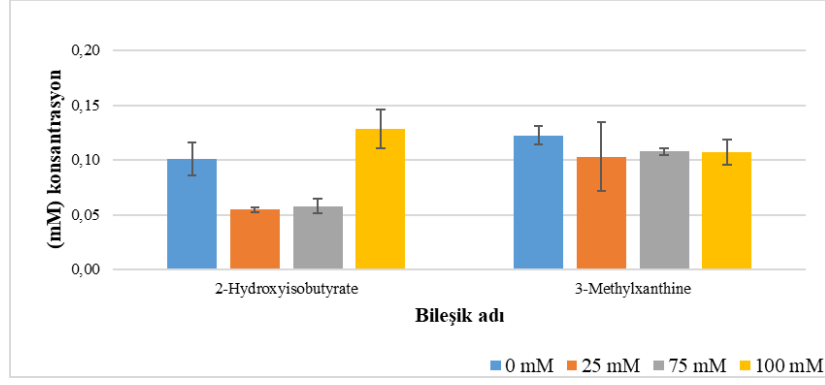


Şekil 3.129. DH10b şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Valine, Xanthine ve Xanthosine metabolitlerinin seviyeleri

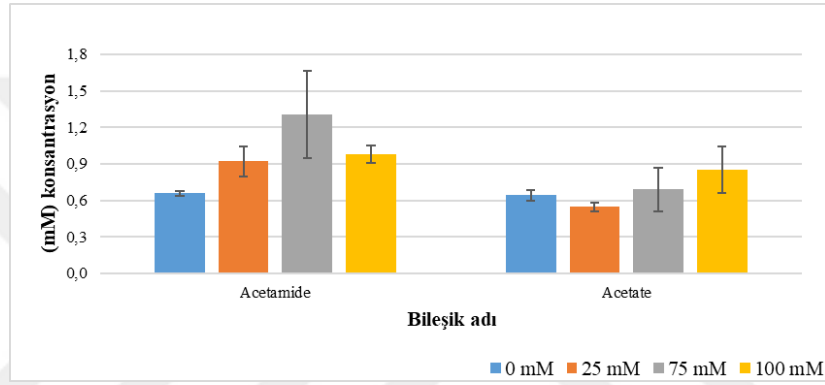
Çizelge 3.25. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşu için metabolit konsantrasyonları

Bileşik adı ^a	0 mM ^b	25 mM ^b	75 mM ^b	100 mM ^b
2-Hydroxyisobutyrate	0.101 ±0.015 ^c	0.055 ±0.002	0.058 ±0.006	0.128 ±0.018
3-Methylxanthine	0.123 ±0.008	0.103 ±0.032	0.108 ±0.003	0.107 ±0.011
Acetamide	0.660 ±0.019	0.922 ±0.121	1.310 ±0.359	0.982 ±0.072
Acetate	0.643 ±0.046	0.547 ±0.034	0.691 ±0.177	0.850 ± 0.190
Adenine	0.887 ±1.156	2.793 ±2.420	4.042 ±3.192	2.943 ±2.424
Adenosine	1.084 ±0.192	0.529 ±0.104	1.613 ±0.594	1.287 ±0.065
Alanine	1.485 ±0.370	1.137 ±0.022	1.918 ±0.041	2.090 ±0.293
AMP	0.294 ±0.016	0.338 ±0.007	0.496 ±0.180	0.378 ±0.110
ATP	0.411 ±0.093	0.363 ±0.040	0.452 ±0.141	0.502 ±0.258
Betaine	25.430 ±1.899	13.649 ±1.335	22.999 ±4.217	14.864 ±3.173
cis-Aconitate	0.215 ±0.029	0.357 ±0.076	0.370 ±0.129	0.317 ±0.023
dTTP	0.547 ±0.026	0.906 ±0.276	1.037 ±0.042	0.580 ±0.231
Erythritol	3.373 ±0.429	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000
Ethylene glycol	0.269 ±0.044	0.170 ±0.009	0.159 ±0.014	0.233 ±0.049
Formate	0.472 ±0.069	0.402 ±0.104	0.488 ±0.077	0.486 ±0.064
Galactarate	0.206 ±0.009	0.282 ±0.021	0.954 ±0.045	0.167 ±0.290
Gluconate	0.727 ±0.068	0.613 ±0.182	0.969 ±0.141	1.601 ±0.390
Glutamate	7.818 ±0.638	10.676 ±0.781	15.417 ±2.087	15.506 ±3.461
Glycerol	16.374 ±0.582	11.050 ±0.379	19.934 ±3.492	20.365 ±3.238
Glycine	2.680 ±0.304	2.015 ±0.125	2.749 ±0.476	2.960 ±0.727
Guanidoacetate	1.363 ±1.533	1.766 ±0.832	2.397 ±0.823	2.997 ±0.452
Guanosine	0.110 ±0.008	0.142 ±0.012	0.823 ±0.286	0.698 ±0.050
Inosine	0.064 ±0.009	0.101 ±0.070	0.315 ±0.035	0.279 ±0.037
Isocitrate	2.766 ±0.102	2.669 ±0.283	2.684 ±0.086	2.714 ±0.039
Isoleucine	0.457 ±0.032	0.336 ±0.066	0.431 ±0.066	0.482 ±0.055
Lactulose	0.916 ±0.031	1.981 ±0.480	2.452 ±0.890	1.862 ±0.872
Maleate	0.223 ±0.083	0.357 ±0.244	0.426 ±0.130	0.327 ±0.020
Methionine	0.217 ±0.005	0.157 ±0.057	0.162 ±0.033	0.179 ±0.027
N-Acetylcysteine	0.140 ±0.024	0.128 ±0.031	0.155 ±0.019	0.317 ±0.109
N-Acetylglutamine	0.153 ±0.018	0.154 ±0.027	0.232 ±0.026	0.231 ±0.054
N-Acetylorithine	0.149 ± 0.040	0.437 ±0.406	0.205 ±0.024	0.138 ±0.048
Niacinamide	0.556 ±0.040	0.796 ±0.136	0.747 ±0.545	1.030 ±0.383
Nicotinate	1.042 ±0.030	0.669 ±0.058	1.273 ±0.270	1.045 ±0.038
Oxypurinol	18.061 ±1.389	32.546 ±9.614	20.624 ±11.989	22.152 ±11.261
Pantothenate	0.188 ±0.022	0.103 ±0.019	0.228 ±0.070	0.139 ±0.055
Putrescine	0.349 ±0.045	2.304 ±0.322	3.230 ±1.569	2.422 ±0.116
Pyridoxine	0.213 ±0.055	0.186 ±0.014	0.149 ±0.052	0.116 ±0.104
Pyroglutamate	0.318 ±0.074	3.124 ±0.476	2.309 ±0.060	1.776 ±2.237
Pyruvate	0.321 ±0.054	0.344 ±0.041	0.548 ±0.163	0.483 ±0.047
Riboflavin	0.189 ±0.027	0.102 ±0.009	0.132 ±0.013	0.147 ±0.014
Saccharopine	2.175 ±0.036	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000
Threonine	0.000 ± 0.000	0.734 ±0.178	1.207 ±0.247	1.611 ±0.267
Thymidine	0.224 ±0.033	0.221 ±0.024	0.221 ±0.019	0.233 ±0.006
Thymine	0.354 ±0.043	0.227 ±0.021	0.351 ±0.016	0.470 ±0.069
Uracil	4.711 ±2.529	4.985 ±2.889	6.264 ±1.276	6.905 ±2.091
Uridine	0.000 ±0.000	0.827 ±0.579	1.094 ±0.246	0.940 ±0.035
Valine	0.875 ±0.045	0.448 ±0.047	0.683 ±0.047	0.796 ±0.152
Xanthine	0.573 ±0.035	0.435 ±0.024	0.706 ±0.058	0.816 ±0.026
Xanthosine	0.693 ±0.417	0.495 ±0.188	0.847 ±0.138	0.335 ±0.057

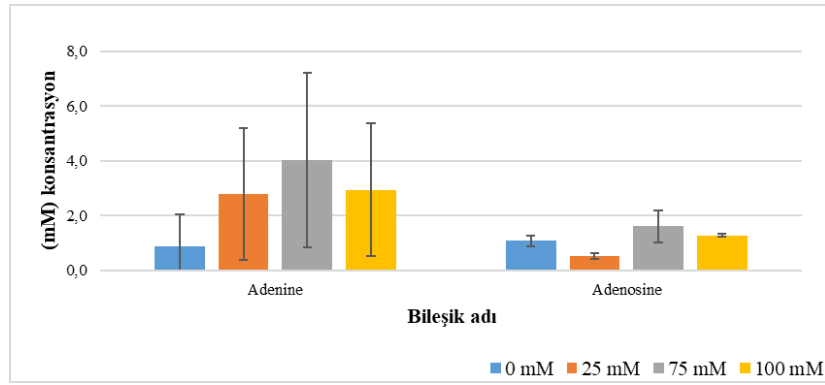
^a NMR spektrumlarındaki piklerin teker teker analizi sonucu onaylanan metabolitleri göstermektedir. ^b LB besi ortamında yetiştirilen bakteri hücrelerinin maruz bırakıldığı borik asit konsantrasyonunu temsil etmektedir. ^c Her bir borik asit konsantrasyonu için tespit edilen metabolitlerin 3 tekrarlı deneysel sonuçlarının ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanarak çizelgeye yazılmıştır.



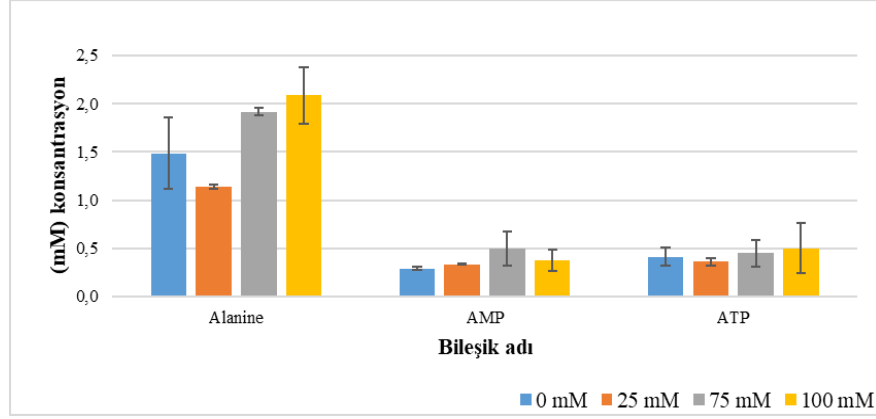
Şekil 3.130. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında 2-Hydroxyisobutyrate ve 3-Methylxanthine metabolitlerinin seviyeleri



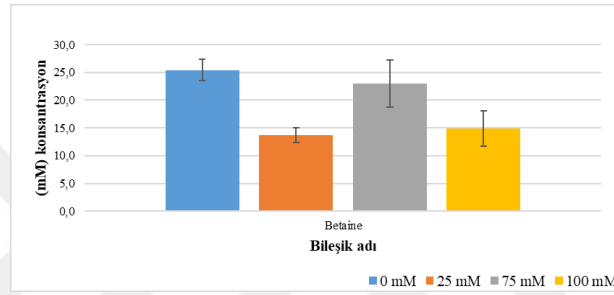
Şekil 3.131. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Acetamide ve Acetate metabolitlerinin seviyeleri



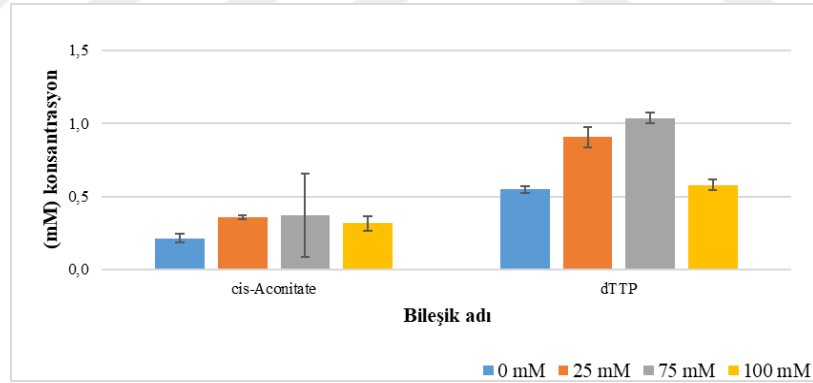
Şekil 3.132. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) şuşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Adenine ve Adenosine metabolitlerinin seviyeleri



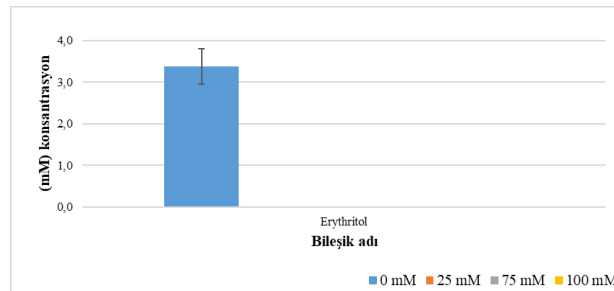
Şekil 3.133. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Alanine, AMP ve ATP metabolitlerinin seviyeleri



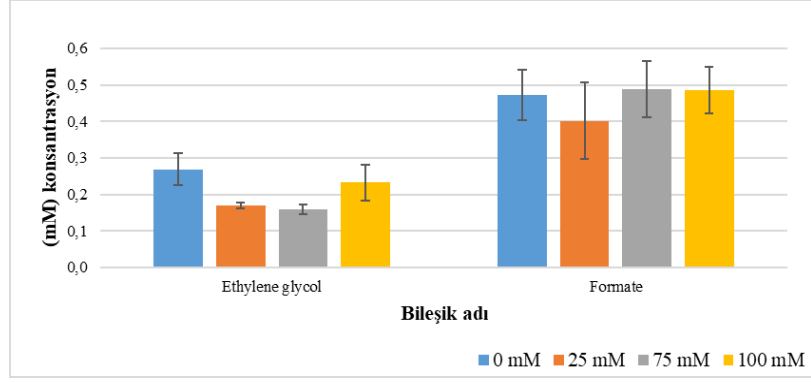
Şekil 3.134. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Betaine metabolitinin seviyeleri



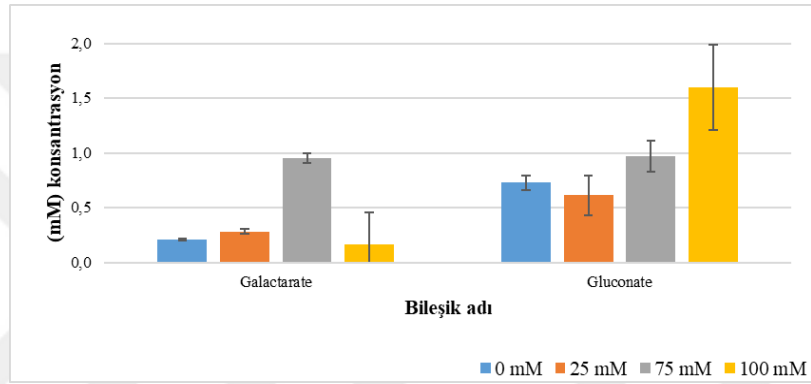
Şekil 3.135. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında cis-Aconitate ve dTTP metabolitlerinin seviyeleri



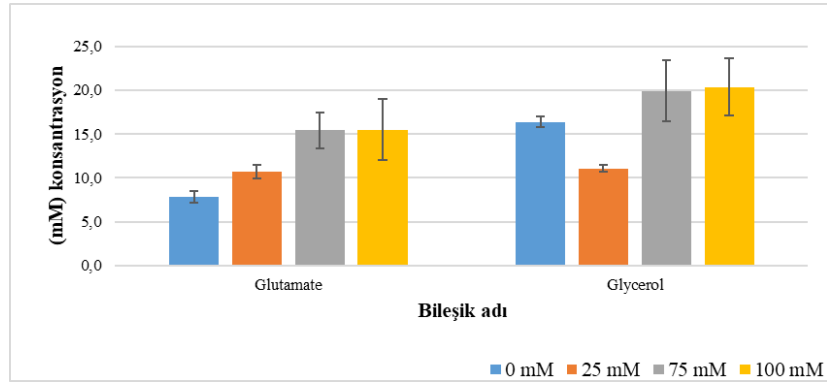
Şekil 3.136. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Erythritol metabolitinin seviyeleri



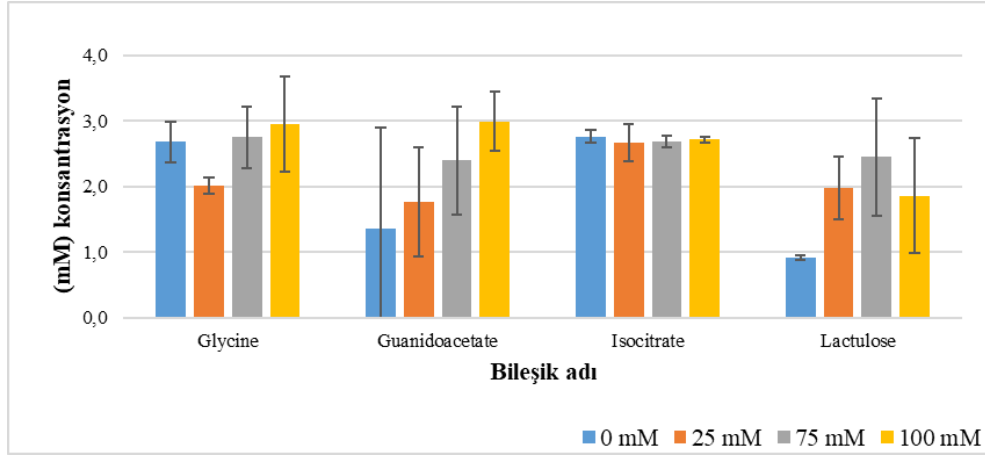
Şekil 3.137. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Ethylene glycol ve Formate metabolitlerinin seviyeleri



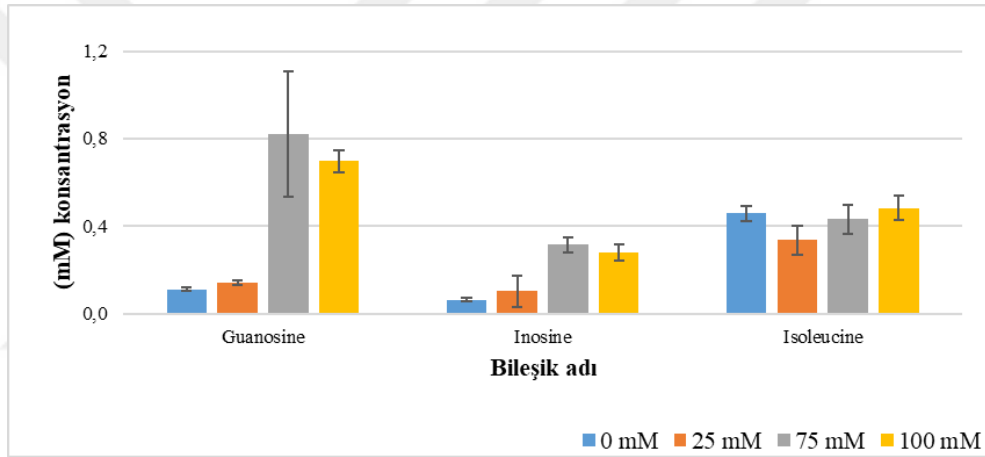
Şekil 3.138. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Galactarate ve Gluconate metabolitlerinin seviyeleri



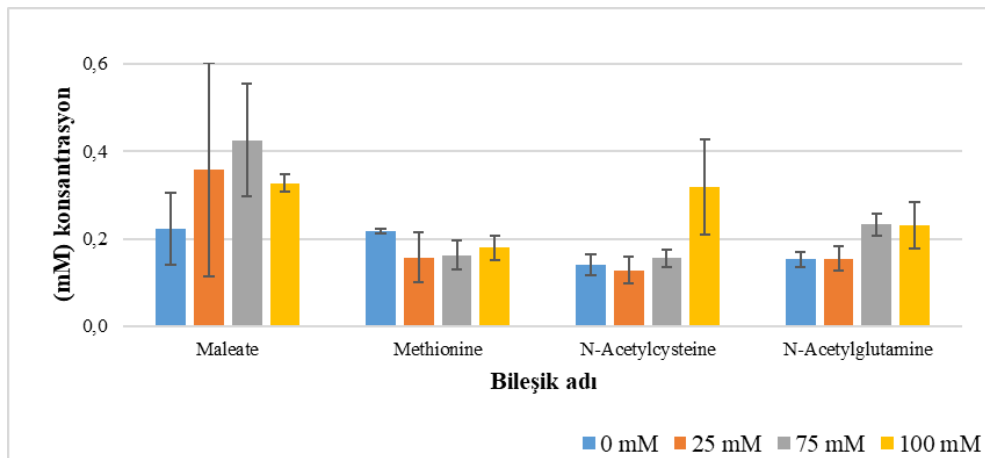
Şekil 3.139. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glutamate ve Glycerol metabolitlerinin seviyeleri.



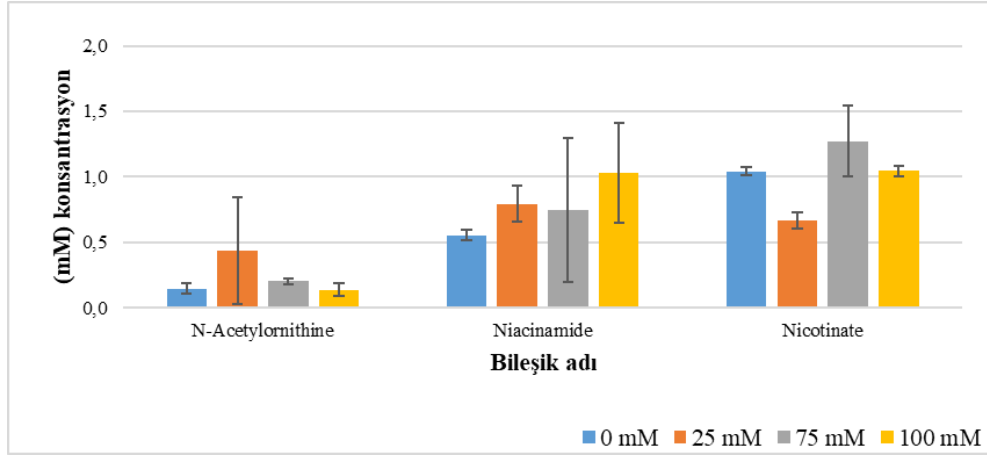
Şekil 3.140. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Glycine, Guanidoacetate, Isocitrate ve Lactulose metabolitlerinin seviyeleri



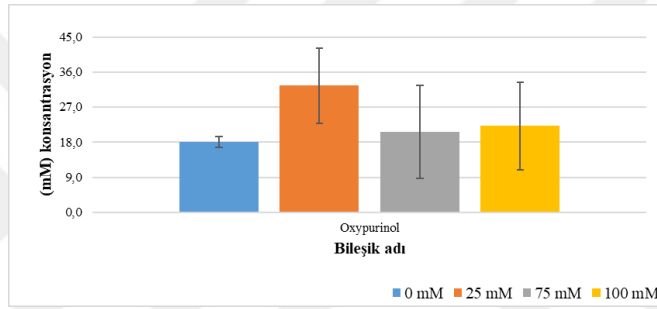
Şekil 3.141. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Guanosine, Inosine ve Isoleucine metabolitlerinin seviyeleri



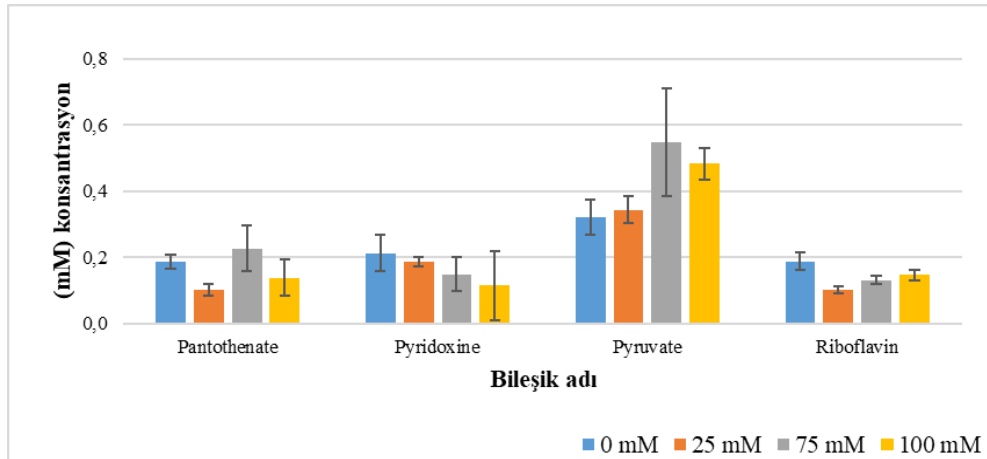
Şekil 3.142. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Maleate, Methionine, N-Acetylcysteine ve N-Acetylglutamine metabolitlerinin seviyeleri



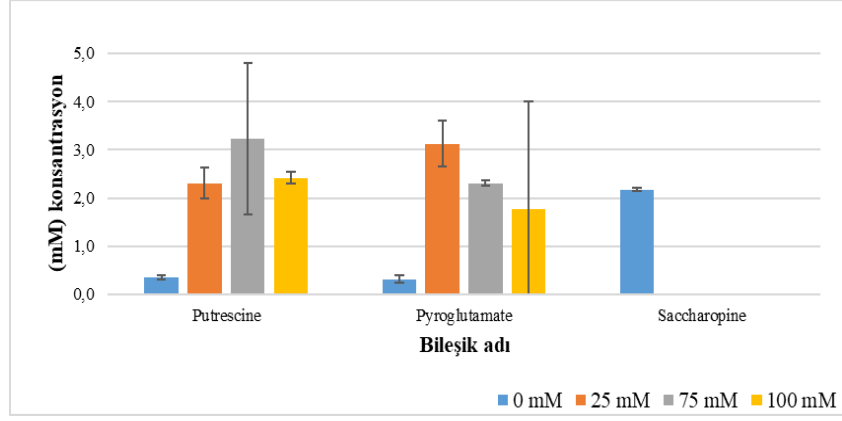
Şekil 3.143. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında N-Acetylmethionine, Niacinamide ve Nicotinate metabolitlerinin seviyeleri



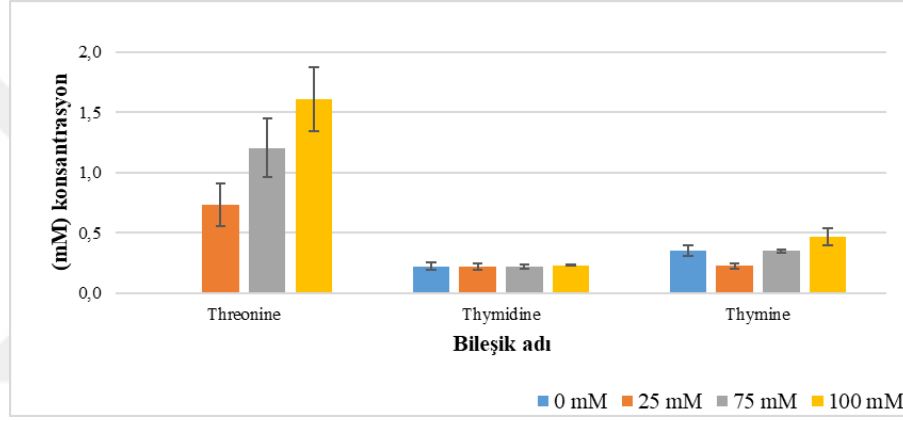
Şekil 3.144. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Oxypurinol metabolitinin seviyeleri



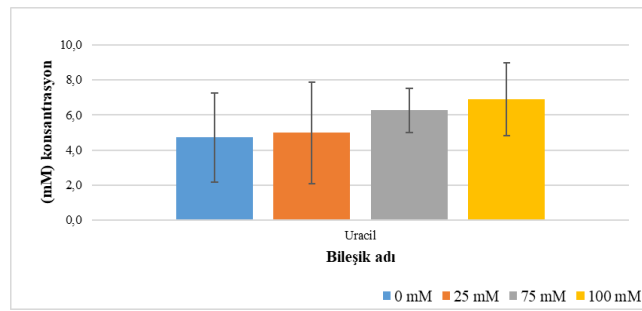
Şekil 3.145. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Pantothenate, Pyridoxine, Pyruvate ve Riboflavin metabolitlerinin seviyeleri



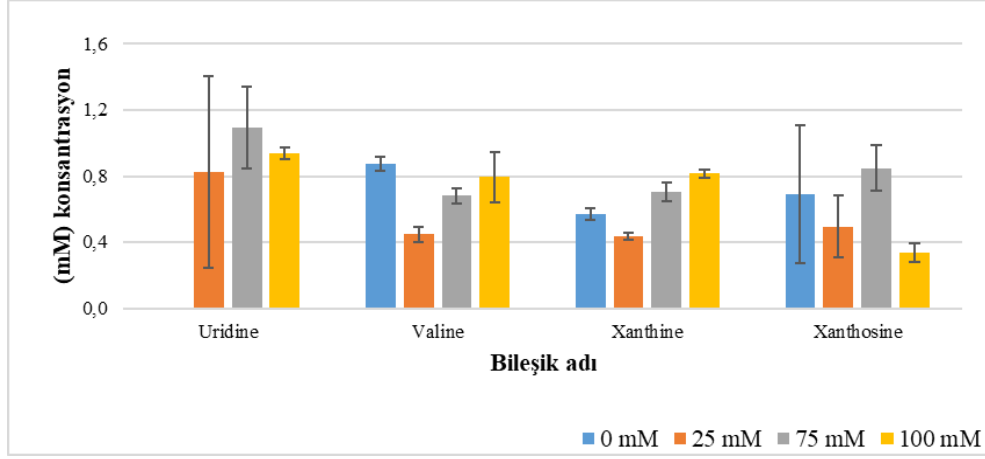
Şekil 3.146. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Putrescine, Pyroglutamate ve Saccharopine metabolitlerinin seviyeleri



Şekil 3.147. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Threonine, Thymidine ve Thymine metabolitlerinin seviyeleri



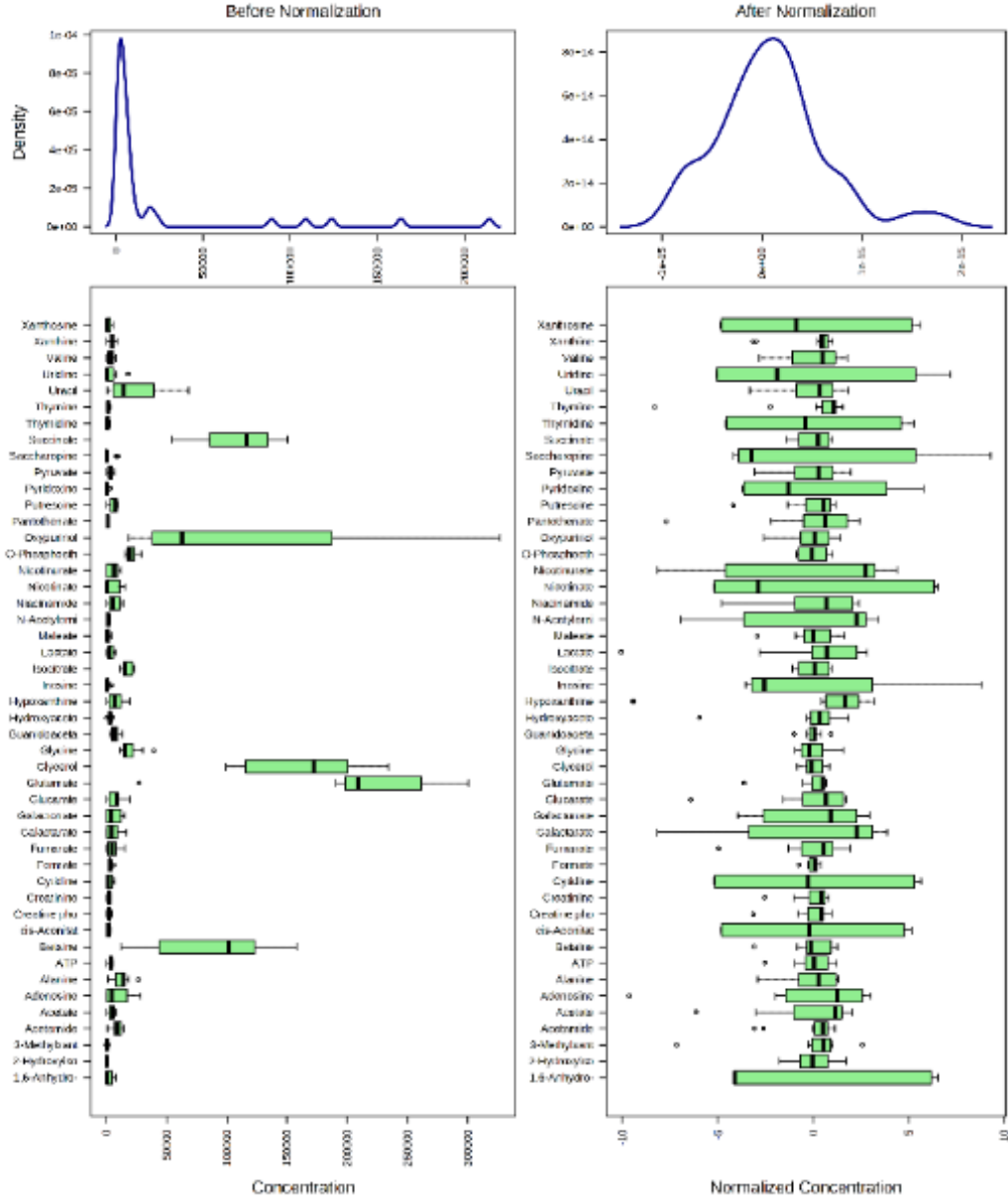
Şekil 3.148. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uracil metabolitinin seviyeleri.



Şekil 3.149. *E. coli* AG1(pCA24N::aceK) suşunda artan borik asit konsantrasyonlarında Uridine, Valine, Xanthine ve Xanthosine metabolitlerinin seviyeleri.

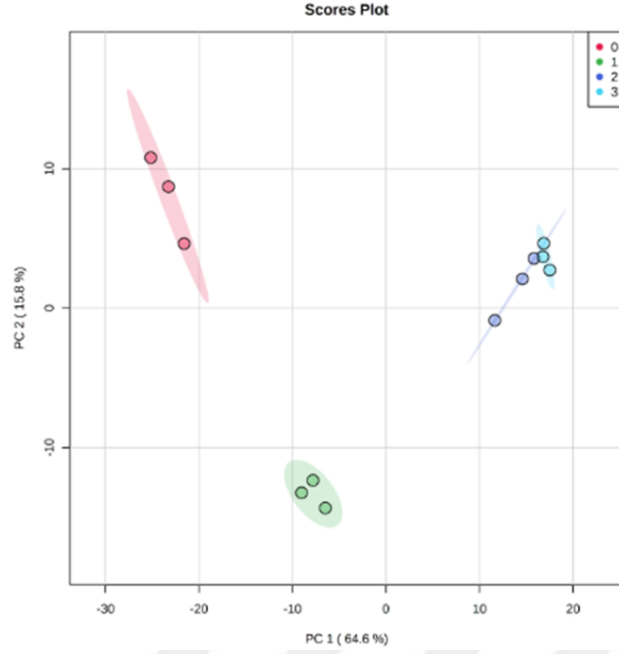
3.5.1. MetaboAnalyst programı kullanılarak metabolitlerin analizleri

MetaboAnalyst paket programı kullanılarak Chenomx programından elde edilen sonuçlar istatistiksel analizlere tabii tutularak grafikler elde edilmiştir. Her iki suştan elde edilen üç tekrarlı olarak yapılan NMR sonuçları Chenomx programında analiz edilmiş, metabolitlerin isimleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. İlk olarak *E. coli* (DH10b) suşu için, metabolit ekstrakt miktarlarına göre normalizasyon yapılmıştır. Ardından sonuçlar MetaboAnalyst programına yüklemek üzere hazırlanmıştır. Bu programa istenilen formatta metabolit isimleri ve miktarları yüklenmiştir. Programın kendi içerisindeki parametreler kullanılarak da normalizasyon yapılmıştır (Şekil 3.150.).



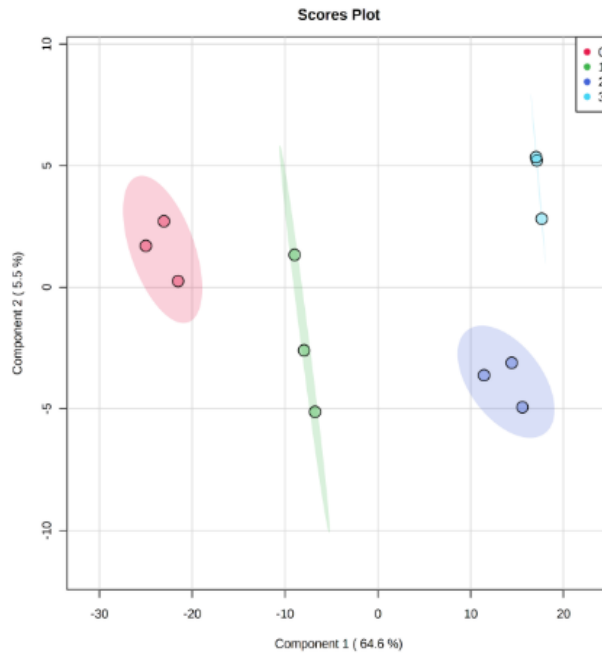
Şekil 3.150. MetaboAnalyst programı ile yapılan normalizasyon sonuçları

Normalizasyonun ardından PCA (temel bileşenler analizi)'ne başvurulmuştur (Şekil 3.151.). PCA analizinde, ilk üç bileşenden her biri sırasıyla, PC 1 %64.6, PC 2 %15.8 ve PC 3 %4.1 olmak üzere, toplam varyasyonda %84.5 katkıda bulunmaktadır. Bu analizde öne çıkan metabolitler, Nicotinate, Cytidine, Uridine, Xanthosine, cis-Aconitate ve Thymidine'dir.



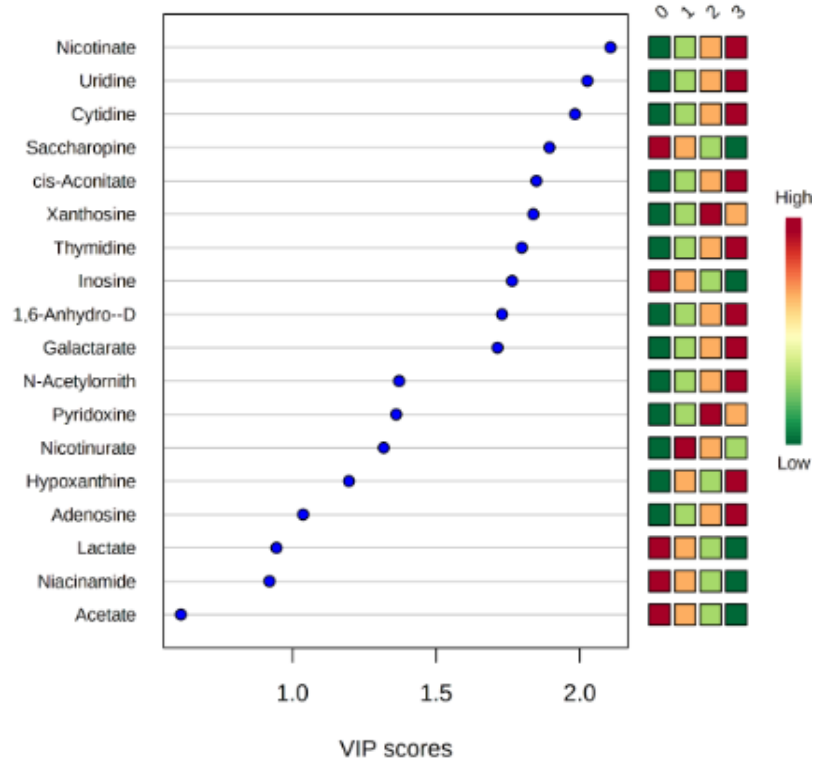
Şekil 3.151. PCA ile her bir borik asit konsantrasyonunda yetiştirilen hücrelerden elde edilen metabolitlerin miktarlarının analizi

Hücrede borik asite karşı cevapta, metabolitlerin artış ve azalışlarını değerlendirmek için, ayrıca PLS-DA (kısmi en küçük kareler diskriminant analizi) veri analizine başvurulmuştur. PLS-DA skor grafiğinde bileşiklerin artan borik asit konsantrasyonlarında gruplanmaları görülmektedir (Şekil 3.152.).



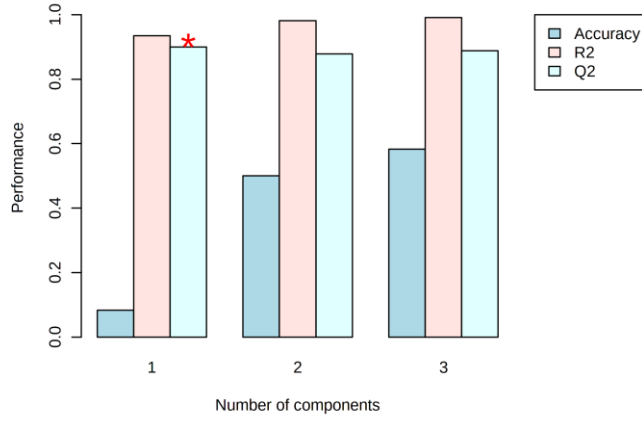
Şekil 3.152. PLS-DA analizi sonucu belirlenen DH10b şuşundaki metabolitlerin skor grafiği.

Skor grafiğinin değerlendirilmesinin ardından VIP (variables important in projection) skor grafiğinde skoru 1'den büyük olan metabolitlerin artış ve azalış durumları renk skalası kullanılarak grafik halinde toplu olarak gösterilmiştir (Şekil 3.153.). Sağdaki renkli kutular, incelenen her grupta karşılık gelen metabolitin göreceli konsantrasyonlarını göstermektedir. 0-1-2-3 değerleri ise sırasıyla borik asit içermeyen, 25 mM-50 mM-75 mM borik asit konsantrasyonlarını temsil etmektedir. Yeşil renk göreceli en düşük, kırmızı renk ise en yüksek konsantrasyonu temsil etmektedir. Yeşil renkten kırmızıya doğru gidiyorsa metabolitlerin konsantrasyonlarında artış, kırmızı renkten yeşile doğru gidiyorsa konsantrasyonlarda azalış görülmektedir (Şekil 3.153.). Metabolitler arasından ayrıca artan ve azalanlar seçilmiş ve bu tezin Sonuçlar ve Öneriler kısmında yorumlanmıştır.



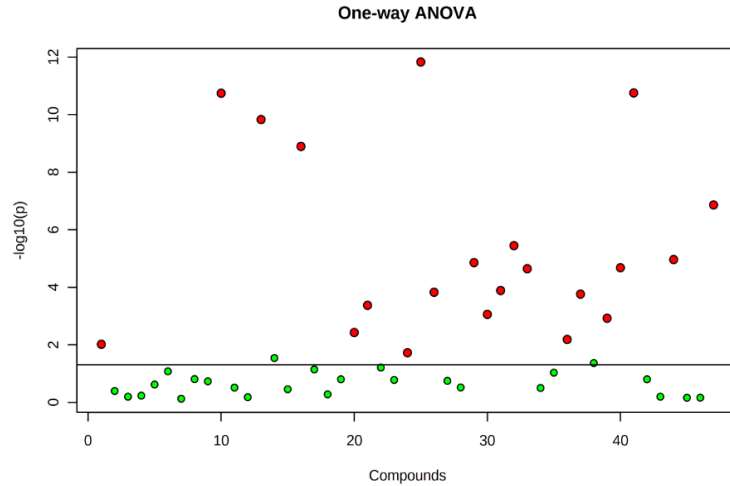
Şekil 3.153. PLS-DA analizi sonucu belirlenen DH10b suşundaki değişim gösteren metabolitlerin artan bor konsantrasyonuna bağlı konsantrasyon değişiklikleri

İstatiksel analizin geçerli ve/veya kabul edilebilir olduğu cross validation grafiği ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.154.) Burada R², Q² ve p değerlerinin belli bir seviyenin üzerinde olduğu gözlenmiş ve yapılan analizin kabul edilebilir olduğu değerlendirilmiştir.



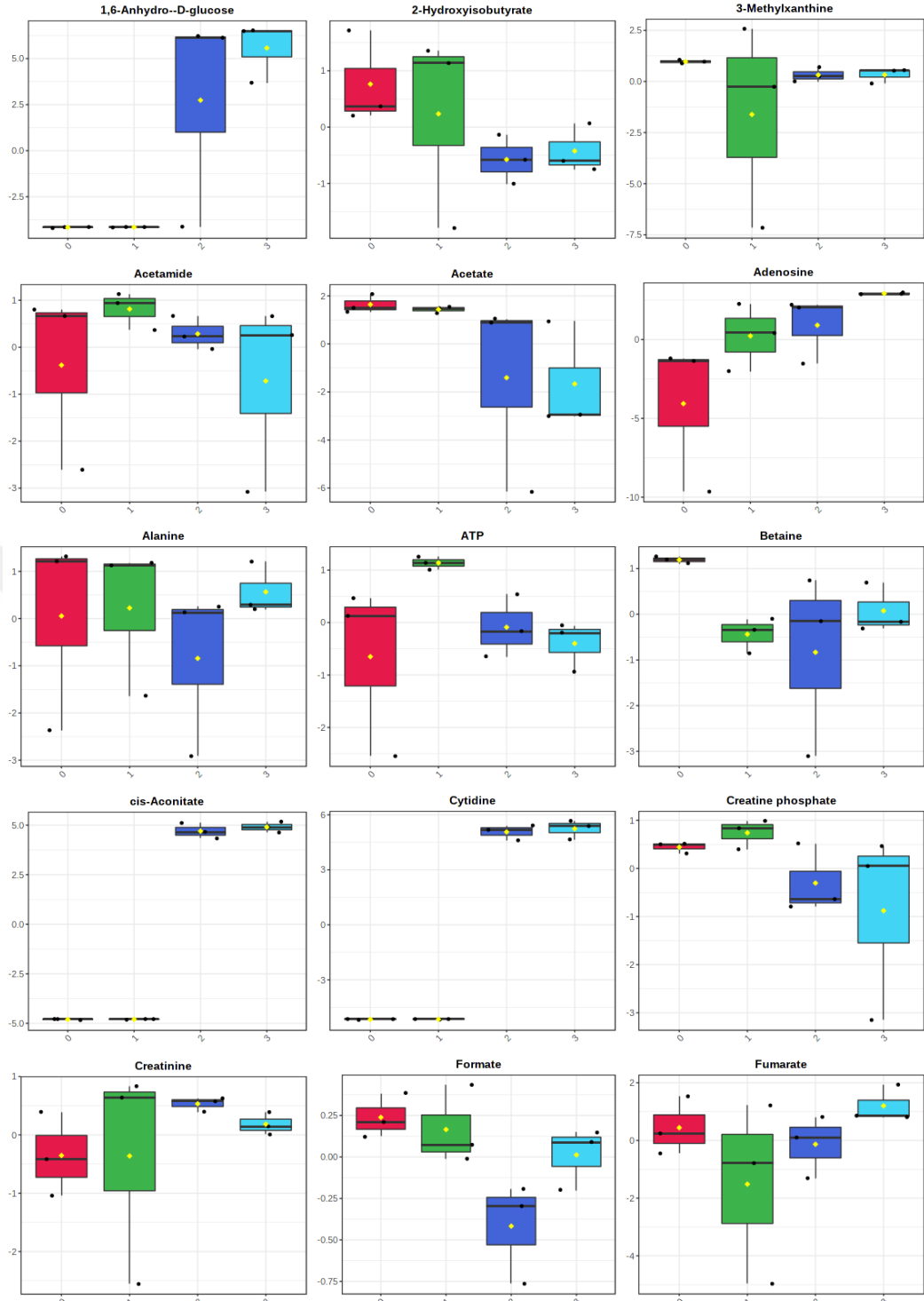
Şekil 3.154. DH10b suşuna ait analiz için cross validation değerlerini gösteren grafik

MetaboAnalyst programında ayrıca ANOVA (one-way Analysis of Variance) analizleri yapılmıştır. Bu analiz, Fisher's LSD göre yapılmış ve p değeri 0,5 olarak alınmıştır. ANOVA bize bütün karşılaştırmalar sonucu önemli olan metabolit seviyelerini söylemektedir (Şekil 3.155.). Anova analizi sonrası, önemli olduğu gözlenen metabolitler, Inosine, Thymidine, *cis*-Aconitate, Cytidine, Galactarate, Xanthosine, Nicotinurate, Uridine, N-Acetylorithine, Succinate, O-Phosphoethanolamine, Nicotinate, Isocitrate, Pyridoxine, Glycine, Niacinamide, Saccharopine, Glycerol, Putrescine, 1,6-Anhydro-D-glucose, Hypoxanthine'dir.

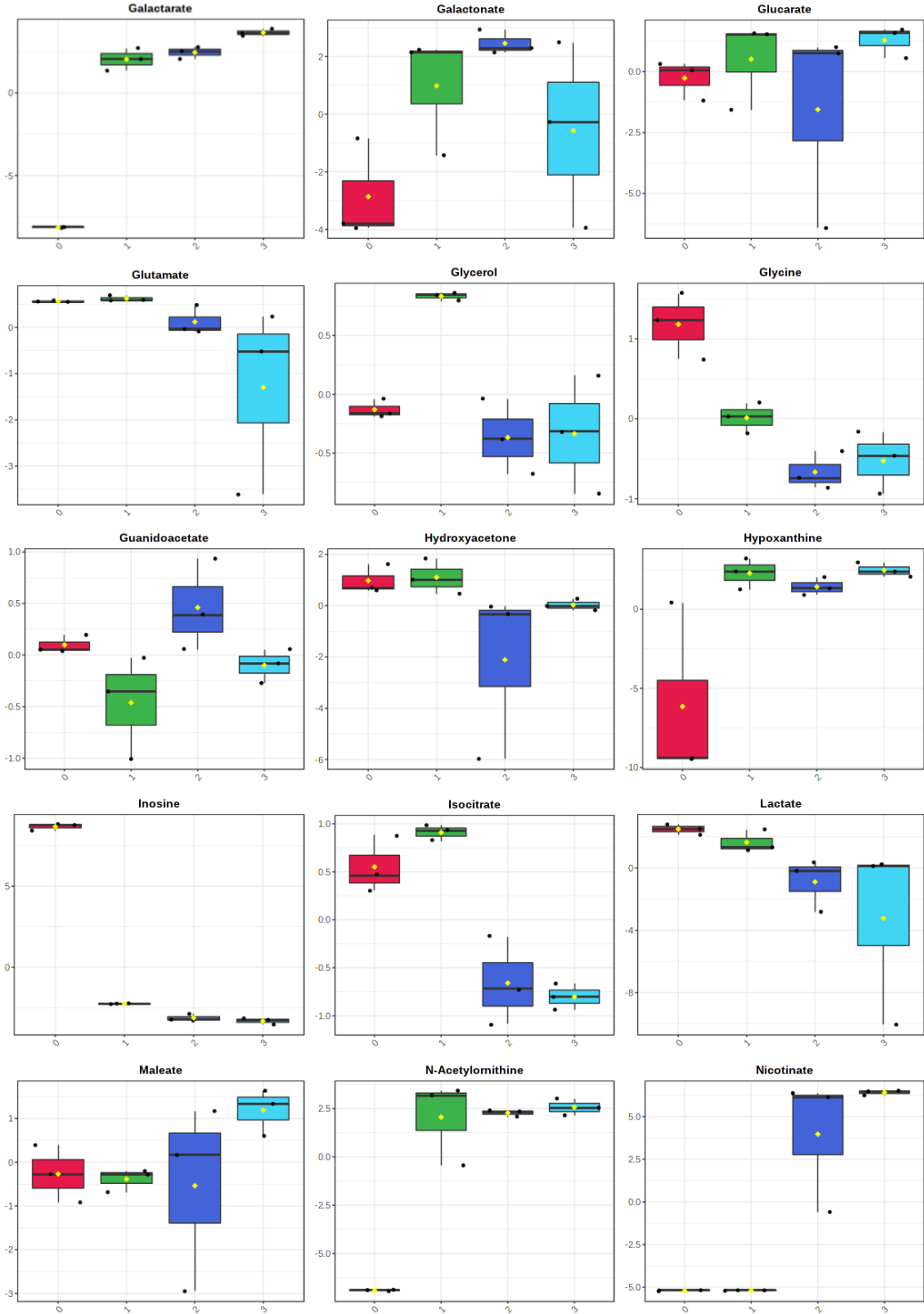


Şekil 3.155. Anova analizi sonucu DH10b suşuna ait grafik ve metabolitler

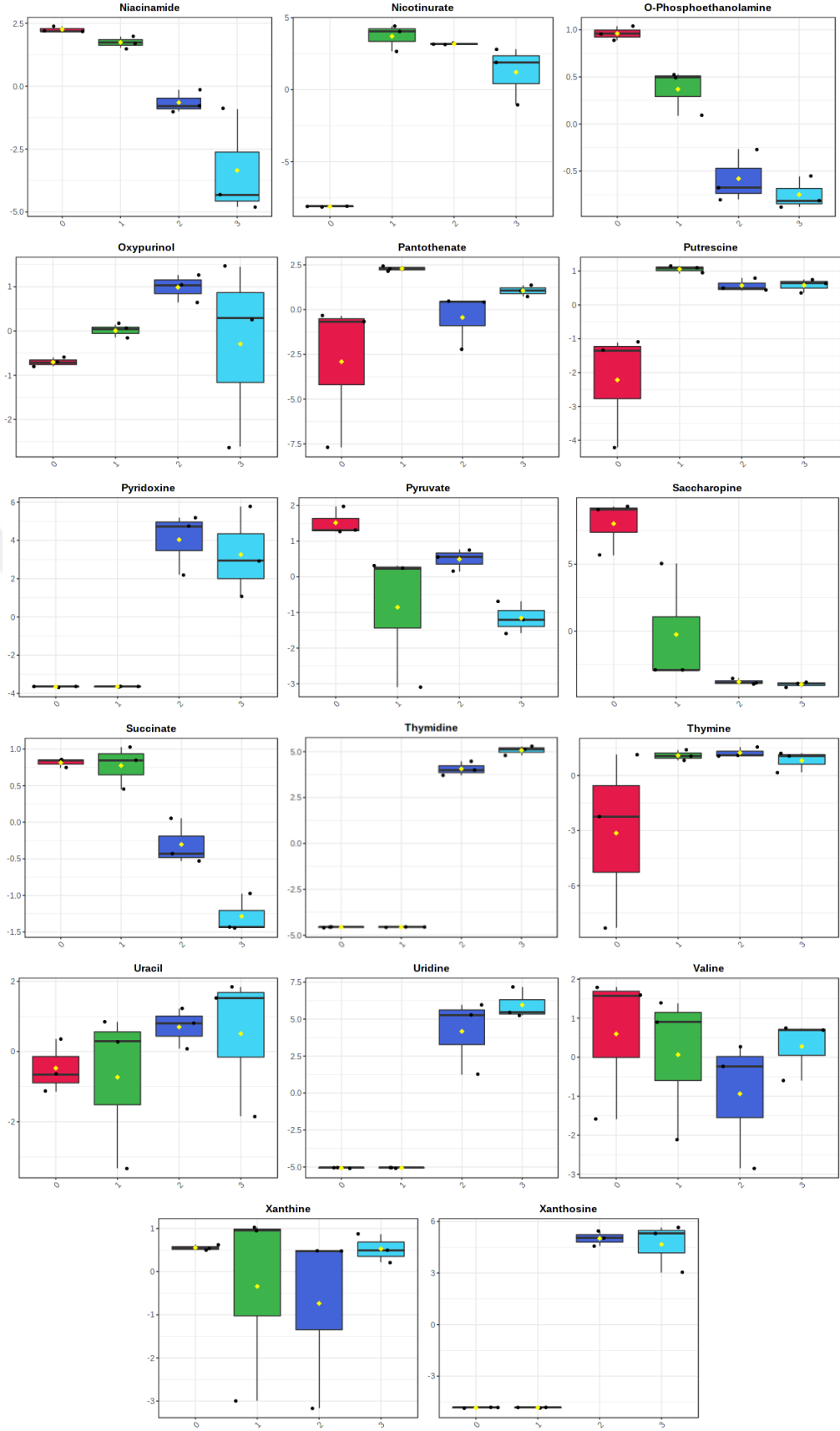
Aşağıda Anova analizi sonucu elde edilen normalize edilmiş sonuçların her bir metabolit için ayrı ayrı grafikleri, standard sapma değerlerini de göz önüne alarak verilmiştir (Şekil 3.156.).



Şekil 3.156. Anova analizi sonucu DH10b'ye ait her bir metabolit için elde edilen grafikler

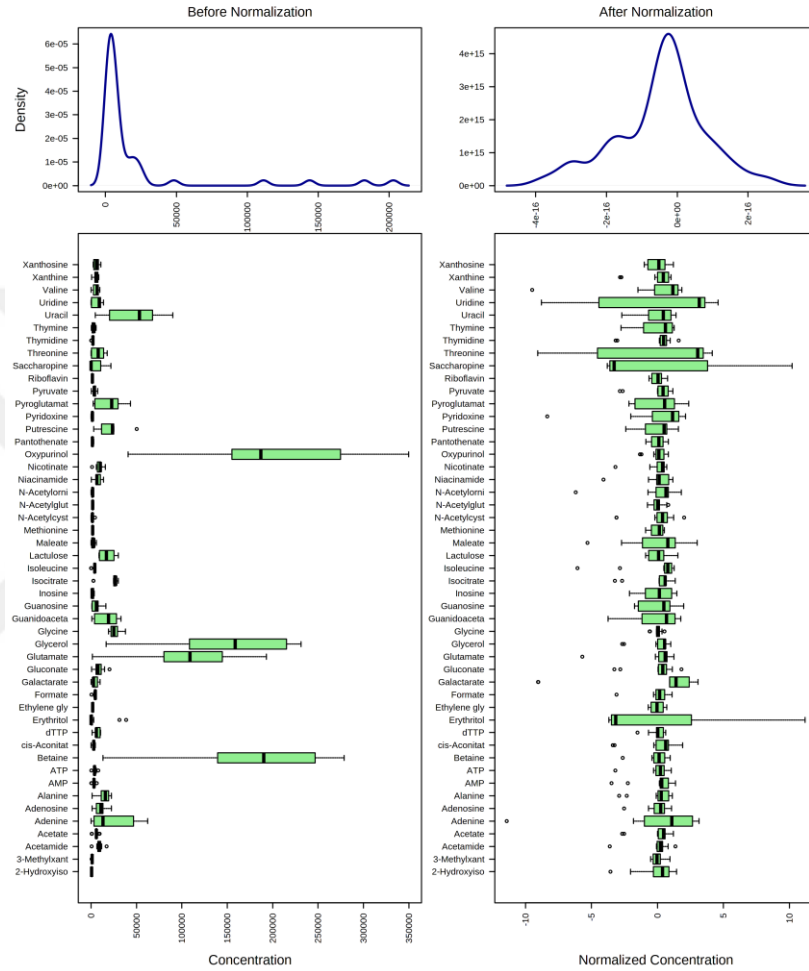


Şekil 3.156. (devam) Anova analizi sonucu DH10b'ye ait her bir metabolit için elde edilen grafikler



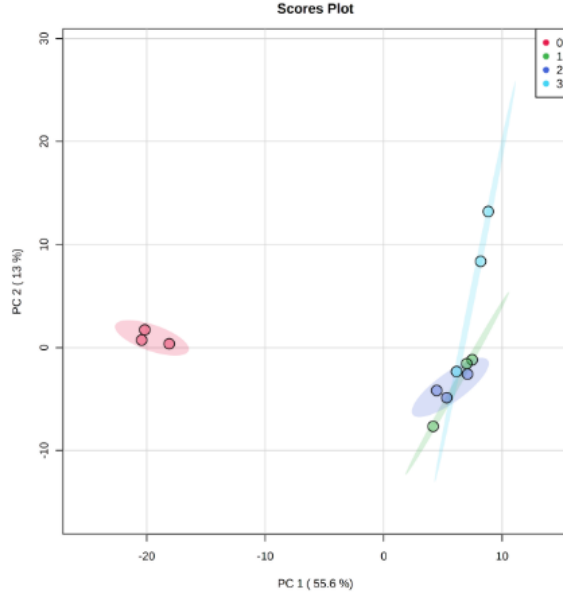
Şekil 3.156. (devamı) Anova analizi sonucu DH10b'ye ait her bir metabolit için elde edilen grafikler

Ardından *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için hücre içi metabolit miktarlarına göre normalizasyon yapılmış ve sonuçlar MetaboAnalyst programına yüklenmek üzere hazırlanmıştır. Bu programa istenilen formatta metabolit isimleri ve miktarları yüklenmiştir. Programın kendi içerisinde normalizasyon yapılmıştır (Şekil 3.157.).



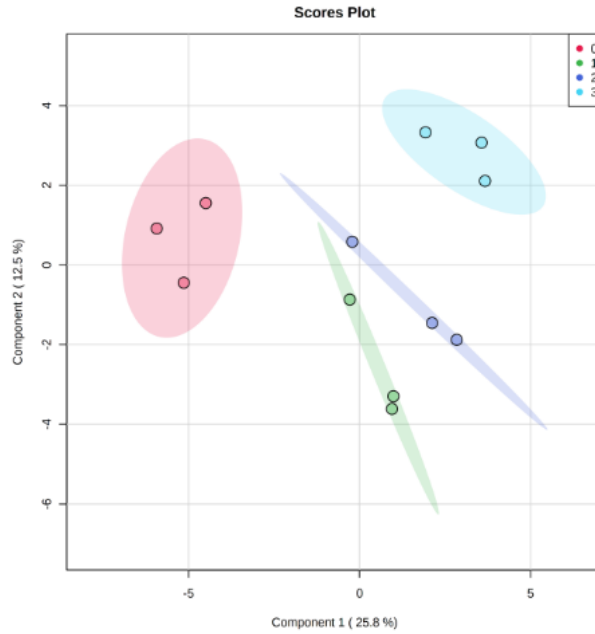
Şekil 3.157. *E. coli* AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için MetaboAnalyst programı ile yapılan normalizasyon sonuçları

Normalizasyonun ardından PCA (temel bileşenler analizi)'ne başvurulmuştur (Şekil 3.158.). PCA analizinde, ilk üç bileşenden her biri sırasıyla, PC 1 %55.6, PC 2 %13 ve PC 3 %7.8 olmak üzere, toplam varyasyonda %76.4 katkıda bulunmaktadır. Bu analizde öne çıkan metabolitler, Threonine, Uridine, Putrescine, N-Acetylcysteine ve Pyroglutamate'dir.



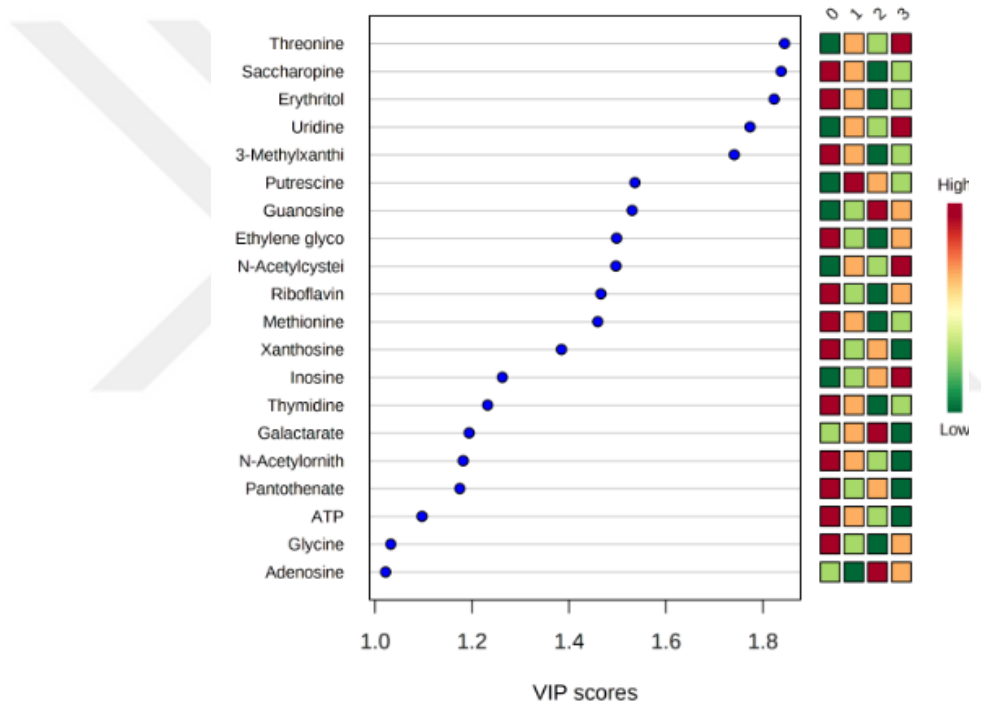
Şekil 3.158. PCA ile her bir borik asit konsantrasyonunda AG1(pCA24N::*aceK*) suşuna ait metabolitlerin analizi

Metabolitlerin borik asit stresine karşı artış ve azalışlarını değerlendirmek için, PLS-DA (kısmi en küçük kareler diskriminant analizi) veri analizi de kullanılmıştır. PLS-DA skor grafiğinde bileşiklerin artan borik asit konsantrasyonlarında gruplanmaları görülmektedir (Şekil 3.159.).



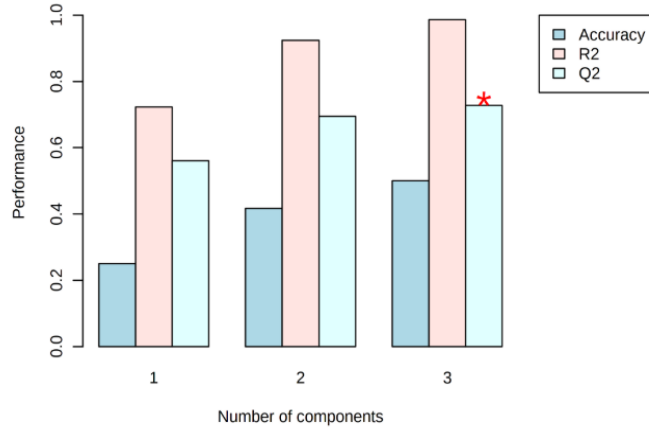
Şekil 3.159. PLS-DA analizi sonucu belirlenen AG1(pCA24N::*aceK*) suşundaki metabolitlerin skor grafiği.

Skor grafiğinin değerlendirilmelerinin ardından VIP (variables important in projection) skor grafiğinde skoru 1'den büyük olan metabolitlerin artış ve azalış durumları renk skalası kullanılarak grafik halinde toplu olarak gösterilmiştir (Şekil 3.160.). Sağdaki renkli kutular, incelenen her grupta karşılık gelen metabolitin göreceli konsantrasyonlarını göstermektedir. 0-1-2-3 değerleri ise sırasıyla borik asit içermeyen, 25 mM-75 mM-100 mM borik asit konsantrasyonlarını temsil etmektedir. Yeşil renk göreceli en düşük, kırmızı renk ise en yüksek konsantrasyonu temsil etmektedir (Şekil 3.160.). Metabolitler arasından ayrıca artan ve azalanlar seçilmiş ve bu tezin Sonuçlar ve Öneriler kısmında yorumlanmıştır.



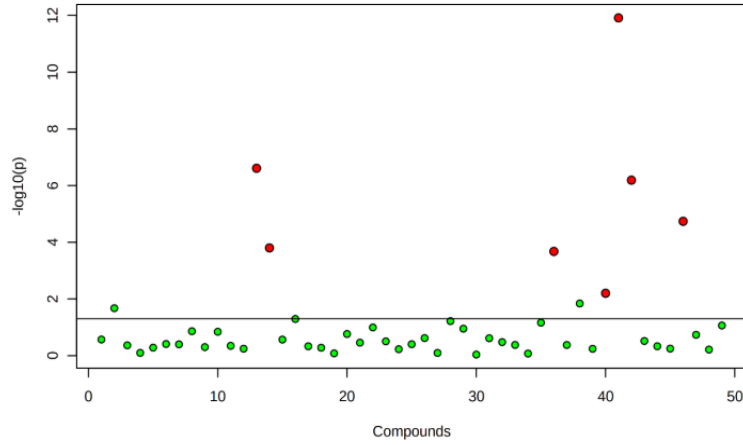
Şekil 3.160. PLS-DA analizi sonucu belirlenen AG1(pCA24N::aceK) suşundaki metabolitlerin artan bor konsantrasyonuna bağlı konsantrasyon değişiklikleri

İstatiksel analizin geçerli ve/veya kabul edilebilir olduğu cross validation grafiğı ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.161.) Burada R², Q² ve p değerlerinin belli bir seviyenin üzerinde olduğu gözlenmiş ve yapılan analizin geçerli olduğu değerlendirilmiştir.



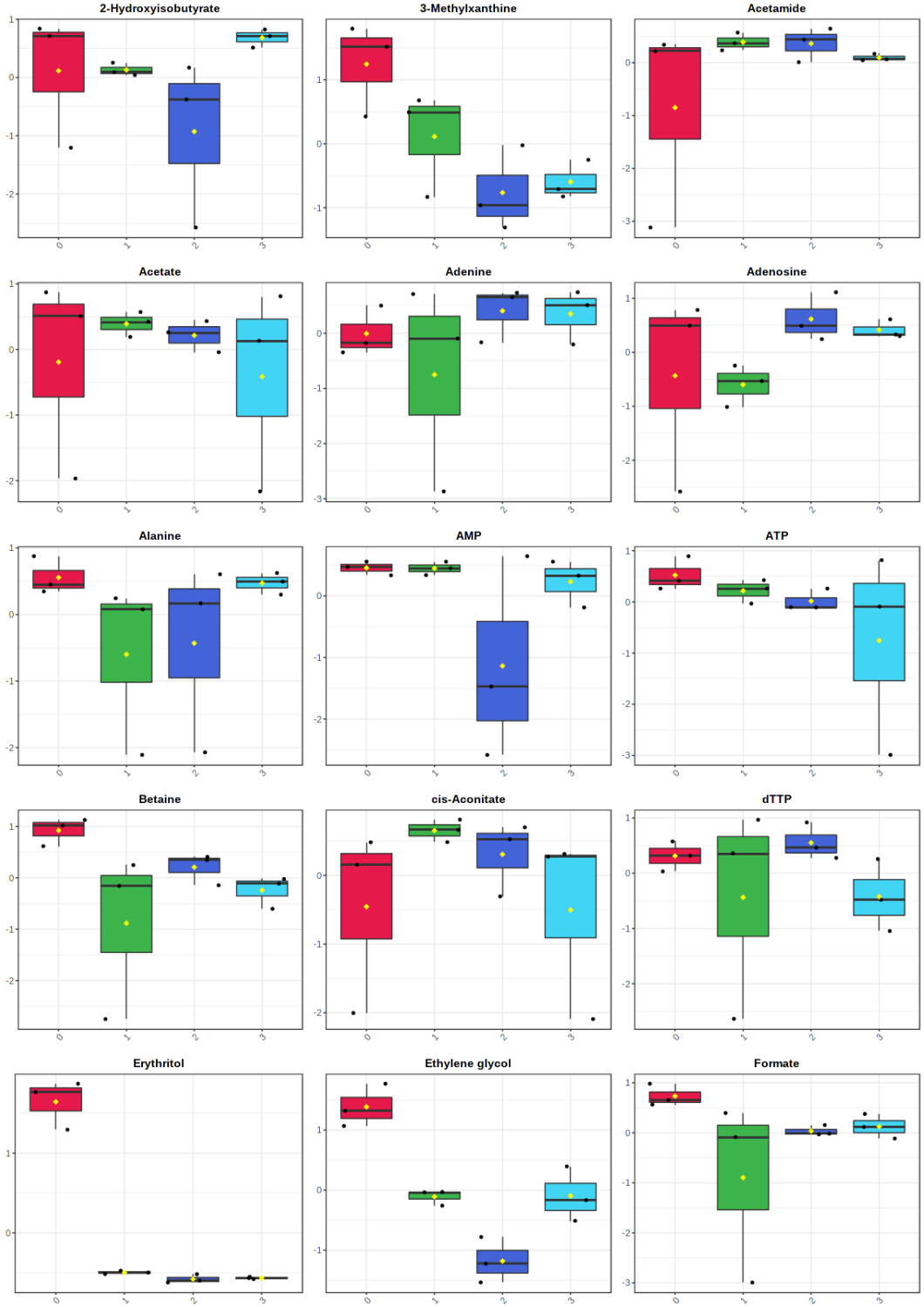
Şekil 3.161. AG1(pCA24N::*aceK*) suşuna ait analiz için cross validation değerlerini gösteren grafik

MetaboAnalyst programında ayrıca ANOVA (one-way Analysis of Variance) analizleri yapılmıştır (Şekil 3.162.). Bu analiz, Fisher's LSD göre yapılmış ve p değeri 0,5 olarak alınmıştır. Anova analizi sonrası, önemli olduğu gözlenen metabolitler, Saccharopine, Erythritol, Threonine, Uridine, Ethylene glycol, Putrescine ve Riboflavin'dir.

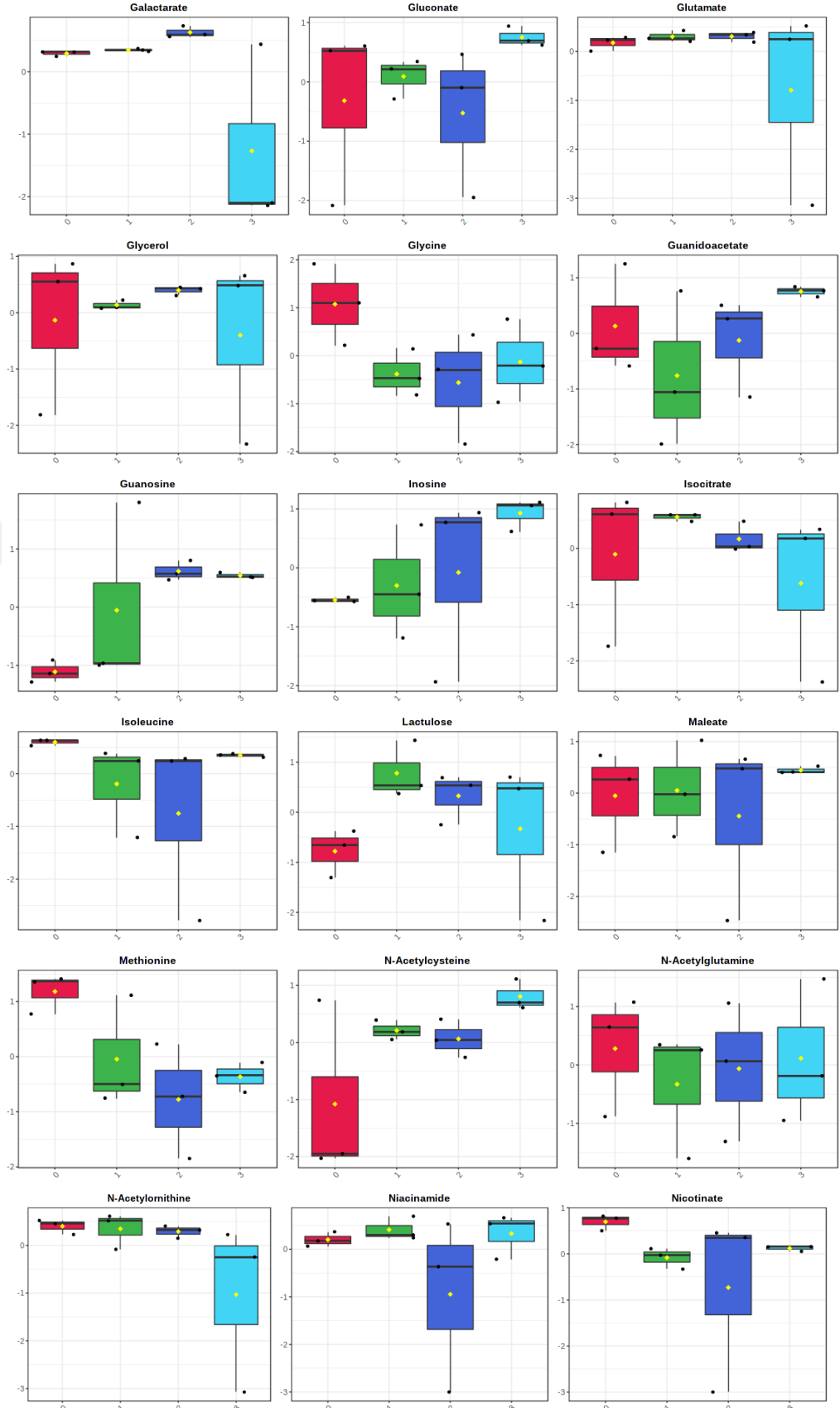


Şekil 3.162. Anova analizi sonucu elde edilen AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için grafik ve metabolitler

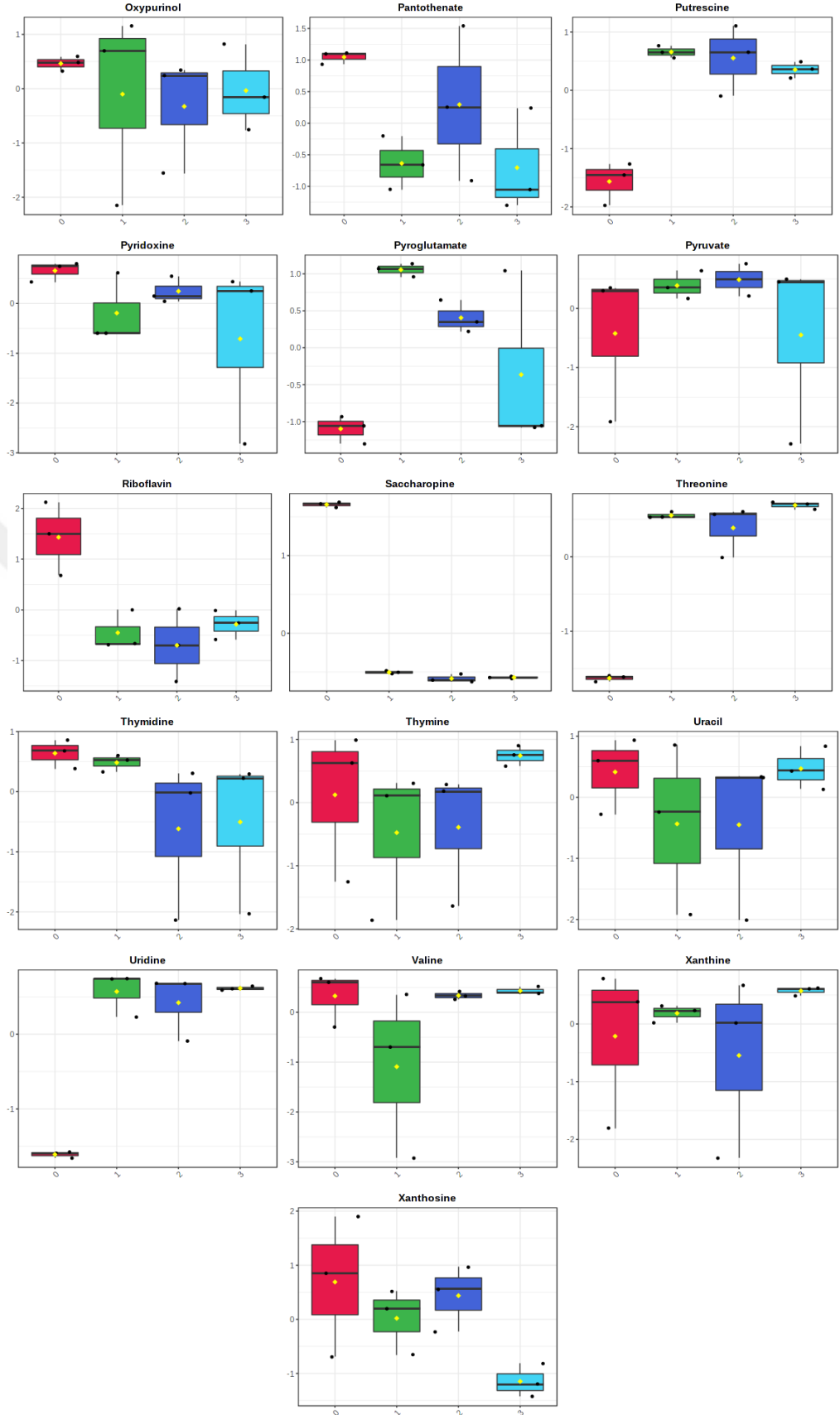
Aşağıda Anova analizi sonucu elde edilen normalize edilmiş sonuçların her bir metabolit için ayrı ayrı grafikleri, standard sapma değerlerini de göz önüne alarak verilmiştir (Şekil 3.163.).



Şekil 3.163. Her bir metabolit için Anova analizi sonucu AG1(pCA24N::aceK) suşu için elde edilen grafikler



Şekil 3.163. (devam) Her bir metabolit için Anova analizi sonucu AG1(pCA24N::aceK) suşu için elde edilen grafikler



Şekil 3.163. (devam) Her bir metabolit için Anova analizi sonucu AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için elde edilen grafikler

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, yapılan mikrobiyolojik, moleküler, genomik, proteomik, gen ekspresyonu ve metabolomik çalışmaları sonucu, hücrenin bora karşı cevabında doğrudan ya da dolaylı etkisi olabilecek genler, proteinler ve metabolitler belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çizelge 4.1.'de toplu halde listelenmiştir.

Çizelge 4.1. *E. coli* genomunda borik asit toleransı ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler proteinler ve metabolitlerin listesi

Yapılan çalışma	Gen adı	Aktivitesi
100 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama sonucu elde edilen genler	<i>lacI</i>	DNA-binding transcriptional repressor LacI
	<i>lacA</i>	galactoside O-acetyltransferase
	<i>cobT</i>	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase
	<i>gatD</i>	galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
	<i>aceK</i>	isocitrate dehydrogenase kinase / isocitrate dehydrogenase phosphatase
	<i>rfaQ</i>	lipopolysaccharide core heptosyltransferaz
	<i>yjcF</i>	pentapeptide repeat-containing protein
	<i>ymdE</i>	putative uncharacterized protein
	<i>bdm</i>	biofilm-dependent modulation
	<i>yeeY</i>	putative DNA-binding transcriptional regulator
	<i>yddV</i>	diguanylate cyclase DosC
	<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ
	<i>ygcU</i>	putative FAD-containing dehydrogenase
	<i>ptsA</i>	putative PTS multiphosphoryl transfer protein
	<i>ydeE</i>	dipeptide exporter
	<i>paaE</i>	phenylacetyl-CoA 1,2-epoxidase, reductase subunit
<i>ugpC</i>	sn-glycerol 3-phosphate ABC transporter ATP binding subunit	

Çizelge 4.1. (devam) *E. coli* genomunda borik asit toleransı ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler proteinler ve metabolitlerin listesi

Yapılan çalışma	Gen adı	Aktivitesi
33 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama sonucu elde edilen genler	<i>prfH</i>	putative peptide chain release factor
	<i>yaiB</i>	anti-adaptor protein for σS stabilization
	<i>nusB</i>	transcription antitermination protein NusB
	<i>cbpM</i>	chaperone modulator
	<i>mall</i>	DNA-binding transcriptional repressor
	<i>ydhD</i>	glutaredoxin 4
	<i>yeaC</i>	Uncharacterized protein
	<i>yeeT</i>	CP4-44 prophage; DUF987 domain-containing protein YeeT
	<i>yfiL</i>	CP4-57 prophage; anti-bacteriophage protein
	<i>hcaD</i>	putative 3-phenylpropionate/cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase
	<i>elaB</i>	tail-anchored inner membrane protein ElaB
	<i>hypC</i>	hydrogenase 3 maturation protein HypC
	<i>yfiU</i>	CP4-57 prophage; conserved protein
	<i>yqeK</i>	predicted protein
	<i>yhiJ</i>	DUF4049 domain-containing protein
	<i>rep</i>	ATP-dependent DNA helicase
	<i>thiC</i>	phosphomethylpyrimidine synthase
	<i>aceK</i>	isocitrate dehydrogenase kinase / isocitrate dehydrogenase phosphatase
	<i>yifB</i>	putative magnesium chelatase
	<i>rfaQ</i>	lipopolysaccharide core heptosyltransferaz
	<i>aceA</i>	isocitrate lyase
	<i>yjcF</i>	pentapeptide repeat-containing protein
	<i>sgbE</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase
	<i>fre</i>	flavin reductase
	<i>yifG</i>	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
	<i>sgcQ</i>	KpLE2 phage-like element; putative nucleoside triphosphatase
	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal subunit protein S10
	<i>yhcE</i>	putative uncharacterized protein
	<i>yhdL</i>	alternative ribosome-rescue factor A
	<i>tnaC</i>	tnaAB operon leader peptide
	<i>ytfA</i>	putative transcriptional regulator
	<i>ulaB</i>	L-ascorbate specific PTS enzyme IIB component
	<i>yjgX</i>	KpLE2 phage-like element; putative phosphoethanolamine transferase
	<i>yjhX</i>	toxin of the TopAI-YjhQ toxin-antitoxin system, TopA inhibitor
	<i>sgcA</i>	putative PTS enzyme IIA component
	<i>chpS</i>	ChpS antitoxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system
	<i>yceP</i>	regulator of biofilm formation
	<i>ymdE</i>	putative uncharacterized protein
	<i>bdm</i>	biofilm-dependent modulation
	<i>yjhD</i>	KpLE2 phage-like element; surface adhesin E-like protein
	<i>yrbB</i>	intermembrane phospholipid transport system protein MlaB
	<i>gatR</i>	DNA-binding transcriptional repressor GatR, N-terminal fragment
	<i>yoeF</i>	CP4-44 prophage; putative uncharacterized protein
	<i>arpB</i>	putative ankyrin repeat protein B
	<i>hybF</i>	hydrogenase maturation protein HybF
	<i>ygeM</i>	putative type III secretion system protein YgeN
	<i>ymfP</i>	e14 prophage; putative protein JayE
<i>yicR</i>	RadC-like JAB domain-containing protein YicR	
<i>hpt</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	
<i>friC</i>	fructoselysine 3-epimerase	
<i>menD</i>	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase	
<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ	
<i>ygcU</i>	putative FAD-containing dehydrogenase	
<i>yadI</i>	putative PTS enzyme IIA component	
<i>ydiA</i>	phosphoenolpyruvate synthetase regulatory protein	
<i>yfcT</i>	putative outer membrane usher protein	
<i>arsB</i>	arsenite/antimonite:H ⁺ antiporter	
<i>yeiQ</i>	putative dehydrogenase, NAD-dependent	
<i>yddK</i>	leucine-rich repeat domain-containing protein YddK	

Çizelge 4.1. ^(devam) *E. coli* genomunda borik asit toleransı ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler proteinler ve metabolitlerin listesi

Yapılan çalışma	Gen adı	Aktivitesi
AG1 ASKA pooled- zenginleştirme deneyleri sonucu	<i>dtd</i>	D-aminoacyl-tRNA deacylase InsAB' transposase
DH10b ASKA plazmid kütüphane havuzu ile yapılan zenginleştirme deneyleri sonucu	<i>yedL</i> <i>yjbO</i> <i>elfC</i> <i>yfjK</i> <i>yfiC</i> <i>sufD</i> <i>yecF</i> <i>idnR</i>	putative acetyltransferase YedL envelope stress response protein PspG putative fimbrial usher protein outer membrane CP4-57 prophage protein tRNA(Val) (adenine(37)-N(6))-methyltransferase Fe-S cluster assembly protein DUF2594 domain-containing protein transposase L-idonate regulatory protein
Proteomik çalışmaları sonucunda tespit edilen proteinlerin gen isimleri	<i>pykF</i> <i>pgk</i> <i>tsf</i> <i>ompA</i> <i>cysK</i> <i>kduD</i> <i>atpA</i> <i>prpD</i> <i>malE</i> <i>gapA</i> <i>ahpC</i> <i>fbaA</i> <i>mdh</i> <i>kduI</i>	Kpyk1--Piruvat kinaz I Pgk--Fosfogliserat kinaz EftS--Elongasyon faktör Ts OmpA--Dış membran protein A CysK--Sistein sentaz A KduD--2-dehidro-3-deoksi-D-glukonat 5-dehidrogenaz AtpA--ATP sentaz altünite alfa PrpD--2-metilsitrat dehidrataz MalE--Maltoz-bağlanma periplasmik protein G3p1--Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz A AhpC--Alkil hidroperoksit redukaz altünite C Alf--Fruktoz-bisfosfat aldolaz sınıf 2 Mdh--Malat dehidrogenaz KduI--4-deoksi-L-threo-5-heksosuloz-uronat ketol-izomeraz
Real-Time PCR analizleri yapılan genler	<i>dinJ</i> <i>garP</i> <i>torR</i> <i>yfeS</i> <i>ylaC</i> <i>aceF</i> <i>trmU</i> <i>cheZ</i> <i>glxK</i> <i>ygaV</i> <i>trpR</i> <i>talB</i> <i>nohA</i> <i>yddE</i> <i>aroK</i> <i>galS</i> <i>yoaC</i> <i>yohN</i> <i>SodA</i> <i>DeoB</i> <i>Icd</i> <i>KduD</i> <i>KduI</i> <i>aceE</i> <i>lamB</i> <i>tdcE</i> <i>TufI</i> <i>gatY</i> <i>ompR</i>	antitoxin/DNA-binding transcriptional repressor DinJ galactarate/glucarate/glycerate transporter GarP DNA-binding transcriptional dual regulator TorR conserved protein YfeS putative inner membrane protein pyruvate dehydrogenase, E2 subunit <i>mmaA</i> _tRNA-specific 2-thiouridylase chemotaxis protein CheZ glycerate 2-kinase 2 putative DNA-binding transcriptional regulator YgaV DNA-binding transcriptional repressor TrpR transaldolase B Qin prophage; putative prophage DNA-packaging protein NohA PF02567 family protein Ydde shikimate kinase 1 DNA-binding transcriptional dual regulator GalS DUF1889 domain-containing protein YoaC (<i>rcnB</i>) periplasmic protein involved in nickel/cobalt export Superoxide dismutase Phosphopentomutase, DeoB Isocitrate dehydrogenase (NADP), Icd 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate5-dehydrogenase, KduD 4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronateketol-isomerase, KduI pyruvate dehydrogenase maltose outer membrane channel / phage lambda receptor protein 2-ketobutyrate formate-lyase/pyruvate formate-lyase 4 Elongation factor Tu 1, TufI D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit, GatY OmpR dimer

Çizelge 4.1.^(devam) *E. coli* genomunda borik asit toleransı ile ilgili olduğu düşünülen tüm genler proteinler ve metabolitlerin listesi

Yapılan çalışma	Adı	Aktivitesi
NMR çalışmaları sonucu tespit edilen metabolitler	DH10b	Artan; Oxypurinol, Uracil, Xanthine, Glucarate, Putrescine, Thymine, Galactonate, Hypoxanthine, Maleate, Adenosine, Pantothenate, 1,6-Anhydro-β-D-glucose, Galactarate, Nicotinate, Nicotinurate, Pyridoxine, Thymidine, Uridine, Xanthosine Azalan; Inosine, Niacinamid, Saccharopine, Glycine ve Lactate
	AG1(pCA24N:: <i>aceK</i>)	Artan; Adenine, Galactarate, Gluconate, Glutamate, Guanidoacetate, Guanosine, Inosine, Lactulose, Oxypurinol, Putrescine, Pyroglutamate, Threonine, Uridine Azalan; Erythritol ve Saccharopine

4.1. Genom Boyu Tarama Sonuçlarında Tespit Edilen Genler

100 µM IPTG konsantrasyonu kullanılarak yapılan genom boyu tarama (GBT-100) ve onaylama çalışmaları sonucu 17 adet genin, GBT-33 kullanılarak ve onaylama çalışmaları sonucu 59 adet genin daha fazla ifade edilmesi ile yer aldığı bakteri suşunun borik asite karşı toleransında göreceli olarak bir artış görülmüştür. Söz konusu gen, tek başına toleransı sağlayabileceği gibi, dolaylı olarak da başka genleri, metabolik faaliyetleri ve hücresel ağları (network) da etkileyerek bunu başarabilir. Bu çalışmada elde ettiğimiz genlerin hücrenin bor ile ilişkisinde bir rol aldığını düşünebiliriz. Aşağıda her bir gen aktivitesi için yapılan literatür taramalarından elde edilen veriler sunulmuş ve bazı genler hücresel stres veya bor stresi açısından yorumlanmıştır.

4.1.1. *lacI* - DNA-binding transcriptional repressor LacI

AG1(pCA24N::*lacI*) suşu 100 µM IPTG ile indüklendiğinde hücre 130 mM borik asite direnç göstermiştir. *lacI* geni, laktoz (*lac*) operonunun bir üyesidir ve bu operon *Escherichia coli*'de laktozun taşınması ve metabolizması için gereklidir. Çoğu bakteri karbon kaynağı olarak glikozu kullanır. Ancak ortamda glikoz olmadığı zaman, hücre enerji ve karbon kaynağı olarak laktozu kullanabilir (Griffiths vd.,

2015). *lac* operonunun transkripsiyonel repressorü LacI proteinidir. Ortamda laktoz yokken LacI repressorü, operatör adı verilen cis dizilerine bağlanarak gen ifadesini baskılar. Yani LacI negatif bir regülatördür. Eğer ortamda laktoz varsa, yüksek affinite ile repressor molekülüne bağlanır. Böylece repressor artık operatöre bağlanamaz ve RNA polimeraz promotor bölgesine bağlanarak *lacZYA* yapısal genleri transkripte eder. Bu şekilde *lac* operonu indüklenmiş olur. LacZ proteini beta-galaktosidase aktivitesine sahip bir enzimdir ve laktozu parçalamakta görevlidir. LacY ise laktoz permeaz aktivitesine sahiptir ve hücreye laktoz taşınmasında görevlidir. LacA ise aşağıda açıklanmaktadır (Lewis, 2005).

Osmotik stresin uzun bir gecikme fazı ile birlikte büyüme hızını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Ayrıca gereksiz protein üretiminin de hücre üzerinde bir yük oluşturması ve büyümeyi yavaşlatması çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin osmotik stres koşulları altında *E. coli*, minimal gliserol ortamında büyütüldüğü ve IPTG kullanılarak β -galaktosidaz indüklendiği zaman, bakterinin daha da yavaş büyüdüğü görülmüştür. Bunun nedeninin bakterinin gereksiz gen ekspresyonu yapmak zorunda kalmasından dolayı zaman kaybetmesi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü gliserol ortamında bakterinin β -galaktosidaza ihtiyacı olmamalıdır ve ilgili genin ekspresyonu bakteri büyümesine yük olmaktadır (Malakar vd., 2014).

Bu tez çalışmasında, AG1(pCA24N::*lacI*) suşunun yüksek bor toleransına sahip olduğu tekrarlanan deneylerde görülmüştür. LacI repressorünün fazla ifadesi ile bor stresine cevap arasındaki ilişkinin direkt değil indirekt olduğu düşünülmektedir. Daha fazla repressor proteininin, etkilediği genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, LB zengin besi ortamında “gereksiz gen ekspresyon”unu engellediği ve böylece bakteri suşuna zaman ve enerji kazandırabileceği yorumlanmıştır.

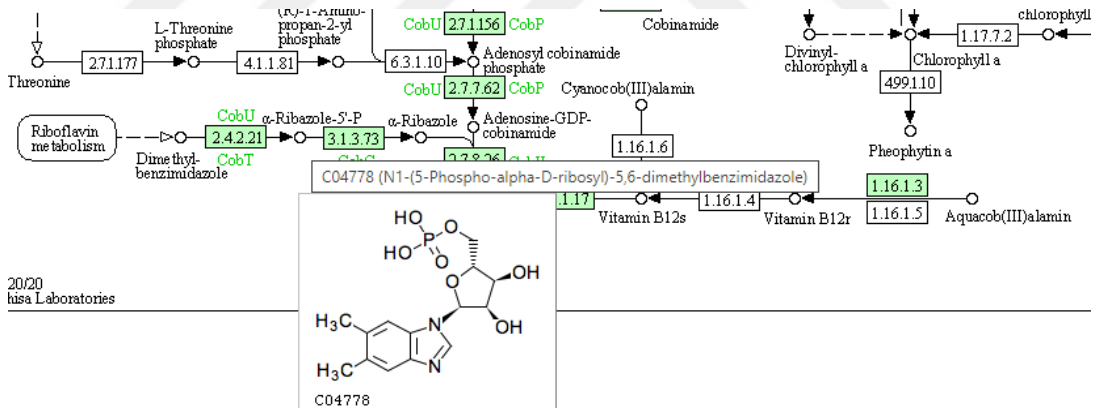
4.1.2. *lacA* - galactoside O-acetyltransferase

lacA tarafından kodlanan galaktosid O-asetiltransferaz (GAT), galaktosidlerin hidroksil grubuna coenzim A (CoA)’dan bir asetil grup transfer eder (Lewis, 2005). Bu enzim E.C. 2.3.1.18 numarasına sahiptir ve hücrede sitosolde yer alır. Enzim geniş substrat spesifitesine sahiptir, galaktosidleri, tiyogalaktosidleri, glukozidleri ve laktosidleri asetile eder. Tam fizyolojik fonksiyonu belirsiz olsa da metabolize

edilemeyen şekerleri asetile ederek, detoksifiye edici bir enzim olarak işlev görebildiği düşünülmektedir (Andrews ve Lin, 1976). LacA, LacZ ve LacY ile birlikte, iyi çalışılmış lac operonunun ürünleridir.

4.1.3. *cobT* - nicotinate nucleotide dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase

cobT geni, tahmini bir dimetilbenzimidazol (DMB) fosforibosiltransferazı kodlamaktadır. EC 2.4.2.21 numarasına sahip olan bu enzim, glikosiltransferaz ailesinin bir üyesi olup, spesifik olarak pentosiltransferazdır (Lawrence ve Roth 1995). Bu enzim, alfa-ribazol-5'-fosfat sentezinde (Şekil 4.1.) merkezi bir rol oynamaktadır (Trzebiatowski vd., 1994). Bu enzim, kobalamin biyosentezinin anaerobik pathwayinde görevlidir (Lawrence ve Roth, 1995). B12 vitamini (kobalamin), bakteri, arkea ve ökaryotlarda enzim katalizli bir dizi reaksiyonda koenzim olarak kullanılmaktadır (Raux vd., 1996).

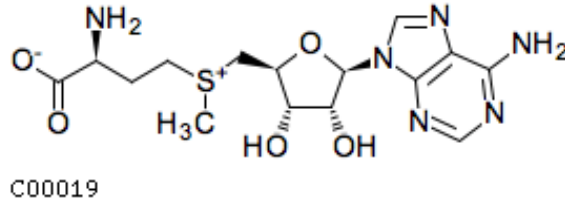


Şekil 4.1. CobT aktivitesi sonucu üretilen alfa-ribazol-5'-P ve yer aldığı kobalamin metabolik yolağı

cobT geninin stres ile ilgili bir ilişkisine dair doğrudan bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Ancak yukarıda da görüldüğü gibi hücrede ifade edilen fazla CobT aktivitesi kobalamin (B12) sentezini artırabilir. Bu olasılık ileriki çalışmalarda araştırılabilir. B12 hücrede metiyonin sentaz enziminin aktivitesi için çok önemlidir. Bu enzim metabolizmada merkezi bir konumda olup, sistein, glutatyon ve metilasyon gibi birçok kritik metabolik yolları etkilemektedir. Örneğin glutatyon

metabolizması oksidatif strese karşı mücadelede kullanılmaktadır. Çünkü glutatyon indirgeyici güçtür ve ROS (reaktif oksijen türleri)'a karşı hücreyi korur. Bor stresinin hücrede oksidatif stres yarattığına dair yorumlar mevcuttur. Dolayısıyla fazla ifade edilen *cobT* ile kobalamin-glutatyon artışı-bora bağlı oksidatif stres azaltılması ilişkisi ileriki çalışmalarda araştırılabilir.

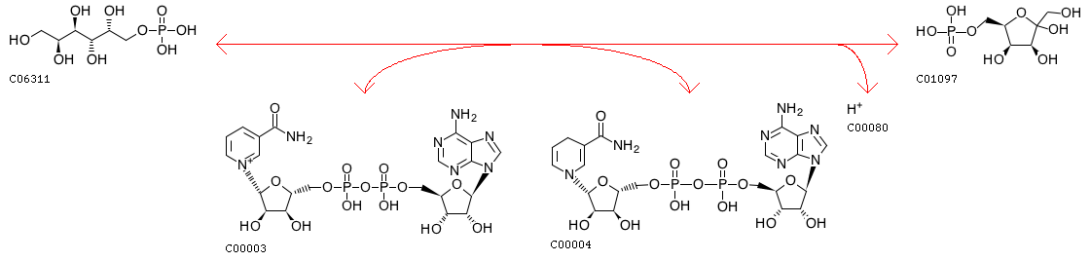
Bunun yanında metiyonun metabolizmasında yer alan S-Adenosil-Metiyonin (SAM, AdoMet) miktarının CobT aktivitesine bağlı olarak miktarı analiz edilebilir. SAM aşağıda yapısı verildiği gibi (Şekil 4.2.), *cis*-diol grubuna sahip bir molekül olup borik asite yüksek afinite ile bağlandığı bilinmektedir (Greenwood ve Earnshaw, 1984). Ayrıca SAM özellikle DNA-metilasyon epigenetik regülasyon aşamasında metil donörü olarak görev alan ve global gen regülasyonunu önemli ölçüde etkileyen bir biyokimyasal moleküldür. Dolayısıyla borik asit ve SAM ilişkisi hem bakteride hem de insan hücrelerinde detaylıca araştırılabilir. Laboratuvarımızın bundan sonraki çalışmalarında bu ilişkinin aydınlatılması üzerine deneyler yapılması planlanmaktadır.



Şekil 4.2. S-Adenosil-Metiyonin (SAM, AdoMet) biyomolekülünün yapısı

4.1.4. *gatD* - galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase

L-galaktitol-1-fosfat 5-dehidrogenaz aktivitesine sahip GatD, L-galaktitol-1-fosfatı NAD^+ kullanarak, geri dönüşümlü olarak D-tagatoz-6-fosfat ve NADH 'ye dönüşümünü (Şekil 4.3.) kataliz eden bir poliol dehidrogenazdır (Benavente vd., 2015). Bu enzim EC1.1.1.251 numarasına sahiptir, oksidoreduktaz ailesine aittir ve galaktoz metabolizmasında görev alır. Kofaktör olarak yalnız çinkoyu kullanır (Nobelmann ve Lengeler, 1995).



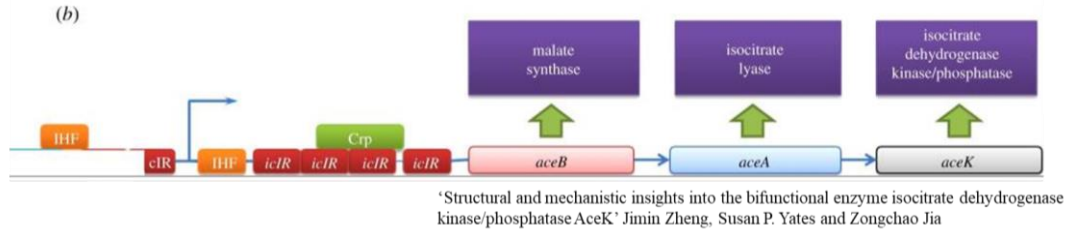
Şekil 4.3. GatD enziminin aktivitesi sonucu L-galaktitol-1-fosfatın NAD⁺ kullanılarak geri dönüşümlü olarak D-tagatoz-6-fosfat oluşumu

Literatürde *gatD* geni ve stress ile ilgili doğrudan bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü gibi GatD aktivitesinin artırılması sonucu hücrede cis-diol (aynı yöne bakan hidroksil) gruplarını içeren L-galaktitol-fosfat ve D-tagatoz-6-fosfatın daha fazla sentezlenmesi borik asit toksisitesini azaltabilir. Çünkü borik asit cis-diol gruplarına karşı yüksek afinite gösterir ve bağlanır. İleriki çalışmalarda bu iki substrat ticari olarak elde edilerek borik asit ile bağlanma durumları analiz edilebilir. Bunun yanında galaktitol metabolizması ile bor stresine cevap arasında başka bir ilişki de bulunulabilir ve bu olasılık da araştırılmalıdır.

4.1.5. *aceK* - isocitrate dehydrogenase kinase/isocitrate dehydrogenase phosphatase

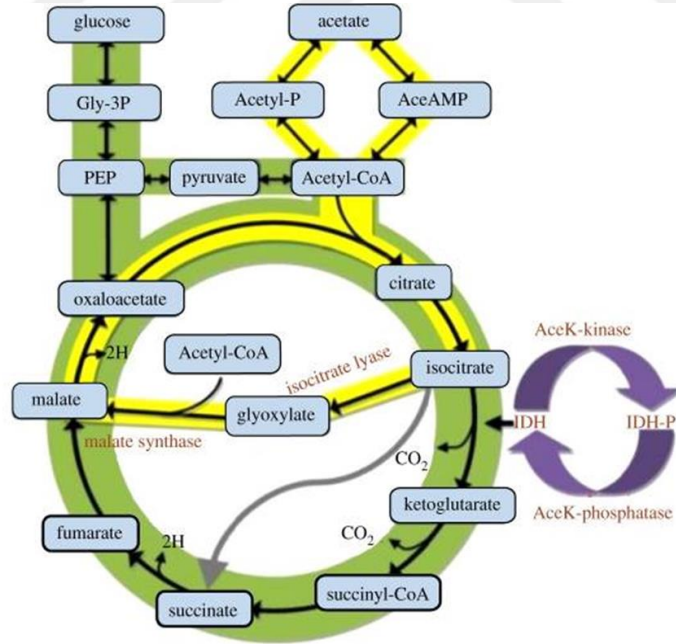
İzositrat dehidrogenaz kinaz/fosfataz (*AceK*), prokaryotlarda geri dönüşümlü protein fosforilasyonunun nadir bir örneğidir. Bu enzim Krebs döngüsü ve glioksilat bypass arasındaki metabolik anahtar olarak izositrat dehidrogenaz (*icd*, IDH) aktivitesini düzenlemektedir (Şekil 4.4.) (Zheng vd., 2012).

İzositrat dehidrogenaz kinaz/fosfataz enzimini kodlayan *aceK* geni, aynı zamanda *aceB* ve *aceA* genlerinin kodlandığı sırasıyla iki glikoksilat bypass enzimi olan malat sentaz ve izositrat liyazı içeren polisistronik *ace* operonunun bir parçasıdır (Şekil 4.5.). *aceK* ekspresyonunun, aynı operonda yer alan *aceB* ve *aceA* genlerinin ekspresyonlarından çok daha düşük olduğu görülmüştür (Cortay vd., 1988). Asetat içeren besi ortamlarında hücrenin büyümesi için *aceK* geninin esansiyel olduğu görülmüştür (elMansi, 1987). Ayrıca *AceK*, yüksek bir intrinsik ATPase aktivitesi sergilemektedir (Stueland vd., 1987; Rittinger, 1996; Miller, 1996).



Şekil 4.4. Polisistronik *ace* operonu

Escherichia coli'deki glikosilat bypassından izositrat akışı, iki işlevli bir enzim olan izositrat dehidrogenaz kinaz/fosfataz (AceK)'in aracılık ettiği izositrat dehidrogenazın fosforilasyon/defosforilasyonu yoluyla düzenlenir. İzositrat dehidrogenazın (Icd) fosforilasyonu enzimin inaktive edilmesine neden olur (Borthwick, 1984) ve böylece substratı olan izositrat, glioksilat döngüsü enzimlerinden biri olan izositrat liyaza yönlendirilir. Dolayısıyla çalışmamızdaki fazla ifade edilen AceK, Icd'yi inaktive ediyorsa glioksilat aktive edilir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. AceK ve Icd aktivitelerinin yer aldığı metabolik yolak

(Alıntı: Zheng vd., 2010)

AceK'nın fazla ifade edilmesi Icd aktive edilmesine neden olursa, daha fazla aktif Icd krebs döngüsünü döndürerek daha fazla enerji ve metabolite neden olup hücrenin bor stresine karşı mücadelesinde avantaj sağlayabilir. Ayrıca, laboratuvarımızda yapılan proteomik deneyleri sonucu Icd proteinin borik asit ortamında arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla bu iki bulgu, AceK-Icd-bor stresine cevap ilişkisini güçlendirmektedir. Bunun yanında bu tez çalışması kapsamında ayrıca *aceK* klonu ile yapmış olduğumuz proteomik sonuçları bu kanıyı desteklemektedir. İleride metabolomiks bölümünde veriler paylaşılacaktır.

Sonuç olarak, Icd enzimi AceK tarafında defosforile edilirse, aktivasyonu gerçekleşecek ve bunun sonucunda, izositrat için daha kuvvetli afinite kazanarak TCA döngüsünün beslemesi sağlanacağı düşünülmektedir (LaPorte ve Koshland, 1982). Yani burada üzerinde durulması gereken aktivite Icd olup, AceK'nın mevcut suş ve bor stresi altında, hedef enzimi fosforile mi veya defosforile mi ettiği öncelikle araştırılmalıdır. Her iki durumda bu deneysel sonuç bize bor stresine karşı TCA döngüsündeki metabolik düzenlemelerin önemli olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında ayrıca AG1(pCA24N::*aceK*) suşu üzerinde proteomik ve metabolomik çalışmaları yapılmıştır. İlerleyen bölümlerde bu sonuçlar da tartışılarak bu bölüme atıf yapılacaktır.

4.1.6. *rfaQ* - lipopolysaccharide core heptosyltransferase 3 (*waaQ*)

rfaQ geninin sinonimi *waaQ*'dur. *waaP* ve *waaQ* genleri lipopolisakkarit (LPS) biyosentezinde ve stabil dış membranın oluşumunda önemli rol oynar ve RfaH tarafından regüle edilir (Yethon vd., 1998; Belogurov vd., 2009). *WaaQ*, LPS'in yapısına heptoz eklenmesinden sorumlu olan bir heptosiltransferazdır (Yethon, 1998). Bu enzim, α (1→7) glikozidik bağı kurarak, L-glisero-D-manno-heptoz'un, Hep2-Kdo2-LipidA yapısına transferini kataliz etmektedir (Mudapaka ve Taylor, 2015). Bir araştırma, *waa* lokusundaki bir mutasyonun, dış membran geçirgenliğini önemli ölçüde arttırdığını ve hidrofobik antibiyotiklere ve deterjanlara karşı hipersensitif hale getirdiğini göstermiştir (Klena ve Schnaitman, 1993). Yapılan başka bir çalışmada, transpozon eklenmesi ile oluşturulan *waaQ* mutantlarının, sodyum dodesil sülfat, safra tuzları ve novobiyosine karşı aşırı duyarlı oldukları görülmüştür (Moller vd., 2003). Bir diğer çalışmada da *waaQ* mutantlarının,

laktoperoksidaza karşı daha fazla tolerans gösterdikleri (De Spiegeleer vd., 2005) rapor edilirken, bitki kaynaklı bir bileşik olan timole karşı ise yabancı tipten daha duyarlı oldukları görülmüştür (Shapira ve Mimran, 2007).

Tüm bu bulgular *rfaQ* (*waaQ*) geni ile hücrel stres arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Muhtemelen *rfaQ* yeterince ifade edilince LPS yapısını pozitif etkileyerek dış membranı daha stabil hale getirebileceği ve böylece bakterinin borik asite karşı tolerans sağlayabileceği düşünülebilir.

4.1.7. *yjcF* - pentapeptide repeat-containing protein YjcF

yjcF geni 1293 nükleotide sahiptir ve 430 aminoasitten oluşan proteini kodlamaktadır. Bu proteinin görevi henüz bilinmemektedir.

4.1.8. *ymdE* - putative uncharacterized protein YmdE

ymdE geni 303 nükleotidden oluşmaktadır. Göreceli olarak küçük bir protein olan YmdE'nin görevi henüz bilinmemektedir.

4.1.9. *bdm* - biofilm-dependent modulation protein

Bdm proteininin hücrede flagella biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Kim vd., 2015). Ayrıca *bdm*, Rcs (regulator of capsular synthesis) regulonun bir üyesidir (Francez vd., 2005). *Escherichia coli*'de Rcs sinyal transdüksiyon pathwayi "envelope stress response system" (ESRS) olarak fonksiyon gösteren kompleks bir sistemdir. Rcs sistemi, dış zardaki ve/veya peptidoglikandaki defektlerden veya bozulmalardan kaynaklanan envelop stresini tanır ve yanıt verir (Laloux ve Collet, 2017). Rcs sistemi *E. coli*'de, klorpromazine bağlı stresden kurtulmak için gereklidir (Conter vd., 2002). Aynı zamanda çoklu ilaç direncine (Hirakawa vd., 2003) ve biyofilm gelişimine (Ferrières ve Clarke, 2003) katılır. Yapılan başka bir çalışmada *bdm* ekspresyonunun yüksek ozmotik şok tarafından aktive edildiği ve bu osmoregülasyonun Rcs sistemine bağlı olduğu gösterilmiştir (Francez vd., 2005). Hücre asite maruz bırakıldığı zaman *bdm* geninin ekspresyonun

arttığı görülmüştür (Kannan vd., 08). Ayrıca *bdm* geninin bir plazmide aşırı ifadesi sonucu biyofilm formasyonunun arttığı gösterilmiştir (Sim vd., 2010). *bdm* mutanı ile yapılan çalışmalarda, yabancı tip suşuna kıyasla flagella biyosentezi, kemotaksis ve motilite genlerinin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. *bdm* delesyon suşunun büyüme defekti yoktur ancak motilitesi daha azdır (Kim vd., 2015). Dolayısıyla borik asit stresi altında AG1(pCA24N::*bdm*) suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi ve motilite yeteneği ileriki çalışmalarda test edilebilir.

4.1.10. *yeeY* - putative DNA-binding transcriptional regulator YeeY

yeeY geni, 930 nükleotide sahiptir. 309 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörü aktivitesine sahip olduğu tahmin edilmektedir.

4.1.11. *yddV* - diguanylate cyclase DosC

yddV geni, EC 2.7.7.65 numaralı diguanilat siklaz (DosC) aktivitesine sahip bir nükleotidil transferazı kodlar. DosC (direct oxygen sensing cyclase)'nin aktivitesi, DosP siklik diguanilik asit (c-di-GMP) fosfodiesteraz ile birlikte yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. DosC'nin oksijene bağlandığı gösterilmiştir (Tuckerman vd., 2009). DosC'nin katalitik özellikleri çeşitli "heme" yükleme koşulları ile belirlenmiş ve Fe(III) ve Fe(II)-O₂ komplekslerinin diguanilat siklaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Kitanishi vd., 2010). *dosC*'nin aşırı ekspresyonu ile hücrede, c-di-GMP seviyelerinin artışı, hücre bölünmesi üzerinde olumsuz etkileri, biyofilm oluşumunun artması ve motilitede azalmanın görüldüğü gösterilmiştir (MendezOrtiz vd., 2006; May ve Okabe, 2011; Donne vd., 2016). Yapılan bir çalışmada, bir *yhjH* mutantında, *dosC* geninin de silinmesi ile bu mutantın hareketliliğini kısmen geri kazandırmıştır. Bu sonuç, DosC'nin motilite kontrolü için c-di-GMP konsantrasyonunu ayarlayan dört diguanilat siklusundan biri olduğunu göstermektedir (Boehm vd., 2010). Bununla birlikte DosC, gen ekspresyonunun global bir regülatörü gibi görülmemektedir. *dosC* ekspresyonu, bir dizi stres koşulunda σ^S 'ye bağımlıdır (Weber vd., 2006b). *dosCP* ekspresyonunun düşük sıcaklıkta ve durağan büyüme fazında (stationary phase) arttığı görülmüştür

(Sommerfeldt vd., 2009). AG1(pCA24N::*yddV*) suşunun borik asit stresine karşı toleransını araştırarak ileriki çalışmalar, c-di-GMP ikincil haberci molekülü ile ilgisi ve biyofilm formasyonu üzerine yapılabilir.

4.1.12. *recQ* - ATP-dependent DNA helicase RecQ

RecQ, EC 3.6.4.12 numaralı ATP'ye bağımlı bir DNA helikazdır (Umezu vd., 1990). RecQ, kısa homoloji bölgeleri ile meydana gelen, ayrıca spontan ve UV kaynaklı yanlış rekombinasyonu baskılamaktadır (Ikeda vd., 2004, Hanada vd., 1997, Hanada vd., 2000). Ayrıca RecQ'nun SOS sinyalizasyonunu başlattığı ve topoizomerez aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (Umezu vd., 1990).

In vitro olarak RecQ, RecA ve SSB (tek zincirli bağlayıcı protein) işbirliğinde homolog rekombinasyonu başlatabilir, fakat aynı zamanda RecA'nın oluşturduğu rekombinasyon birleşme noktalarını gevşetip, rekombinasyonu da bozabilmektedir (Harmon vd., 1998).

recQ ve stres ilişkisine dair literatürde çok sayıda makale vardır. RecQ'nun stres sonucu meydana gelen DNA hasarını, rekombinasyon süreçlerindeki rolü ve SOS cevabındaki etkisi ile tamir etmede katkısı olduğu düşünülebilir. AG1(pCA24N::*recQ*) suşunun borik asit stresi altında DNA hasarının çalışılması bundan sonraki araştırmalar için tavsiye edilebilir.

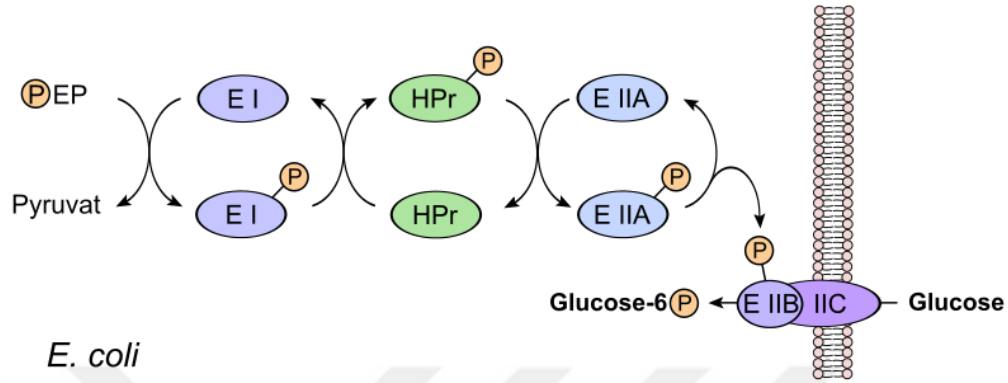
4.1.13. *ycgU* - putative FAD-containing dehydrogenase

ycgU geni, 1455 nükleotide sahiptir. Bu gen, 484 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. Bu proteinin tahmini FAD-içeren dehidrogenaz aktivitesine sahip olduğu düşünülmekte olup hakkında bir literatür bilgisi yoktur (Ecocyc).

4.1.14. *ptsA* - putative PTS multiphosphoryl transfer protein PtsA

Fosfoenolpiruvat (PEP)-bağımlı fosfotransferaz sistemi (PTS), enerji kaynağının PEP'den olduğu karbonhidratların, özellikle heksozların, heksitollerin ve

disakkaritlerin alımı için bakteriler tarafından kullanılan önemli bir mekanizmadır. PTS iki genel bileşen içerir, bunlar enzim I (EI) ile histidin fosfo-taşıyıcı protein (HPr) ve membran-bağlı şeker spesifik permeazlardan (enzimler II) oluşmaktadır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Fosfotransferaz sistemi

Her enzim II (EII) kompleksi, bir veya iki hidrofobik integral membran domainleri (C ve D domainleri) ve iki hidrofilik domainden (A ve B domainleri) oluşur. PTS, karbonhidratların alınımını ve bunların taşıma sırasında ilgili fosfoesterlere dönüşümlerini kataliz etmektedir. PTS'de dört başarılı fosforil transferi vardır. Substrat olarak PEP kullanılması ile EI'in başlangıç otofosforilasyonunu, fosforil grubunun EI'den HPr'ye aktarılması izler. EIIA, HPr'den self-fosforil transferini katalizler, ardından fosforil grubu, EIIB'nin histidin veya sistein kalıntılarına aktarılır. Şeker, membran-bağlı EIIC boyunca taşınır ve uygun şeker spesifik EIIB tarafından fosforile edilir (Tchieu vd., 2001).

AG1(pCA24N::ptsA) suşunun borik asit stresine tolerans göstermesinin nedeni, plazmidde ifade edilen *ptsA* geni ile hücre içerisine daha fazla şeker molekülünün alınarak enerji elde edilmesi olabilir. Bu tez çalışmasında ayrıca AG1(pCA24N::ptsA) suşunun borik asit içermeyen ve içeren ortamlarda jel tabanlı proteomik analizi gerçekleştirilmiştir. İlerleyen bölümlerde bununla ilgili veriler yorumlanacaktır.

4.1.15. *ydeE* - dipeptide exporter

YdeE proteini, transporterların Büyük Kolaylaştırıcı Süperaille (Major Facilitator Superfamily: MFS) içinde yer alan ilaç:H⁺ Antiporter-1 (DHA) ailesinin bir üyesidir (Saier vd., 2016). YdeE'nin arabinozu dışarı pompalamada (effluks) görev aldığı düşünülmektedir (Koita ve Rao, 2012). YdeE, dipeptidlerin aşırı üretildiği suşlarda, dipeptidleri (Ala-Gln ve L-alanil-L-dallı zincirli amino asitler) de transport edebilmektedir (Hayashi vd., 2010).

AG1(pCA24N::*ydeE*) suşunda fazla ifade edilen *ydeE*, doğrudan veya dolaylı effluks aktivitesi ile borik asit stresine karşı bakteriye avantaj sağlayabildiği düşünülmektedir.

4.1.16. *paaE* - phenylacetyl-CoA 1,2-epoxidase reductase subunit

PaaE, EC 1.14.13.149 numarasına sahip olan enzimdir ve amino asit metabolizmasında görev almaktadır. Spesifik olarak fenilalanine metabolizmasında görevli olan fenilasetil-CoA 1,2-epoksidazın redüktaz altünitesidir (KEGG). PaaE, NAD(P)H ve PaaACD oksijenaz bileşeni arasındaki elektron transferine aracılık eden redüktazdır (Ferrández vd., 1998). Bu aktif aktivitenin borik asit stresi ile ilgisi genel amino asit metabolizmasına etkisi üzerinden olabileceği olasılığı düşünülebilir.

4.1.17. *ugpC* - sn-glycerol 3-phosphate ABC transporter ATP binding subunit

UgpC proteininin, bir sn-gliserol 3-fosfat ABC taşıyıcısının (importer) ATP bağlayıcı alt birimi olduğu düşünülmektedir (Overduin vd., 1988). UgpC proteinin, ABC domainlerinde görülen korunmuş bölgelere özel motifleri içerdiği bilinmektedir (Linton ve Higgins, 1998). Protein dizileri, diğer bağlayıcı protein-bağımlı taşıma sistemlerinin özelliklerini içermekte, ancak özellikle maltoz sistemi ile yakından ilişkili gibi görünmektedir (Overduin vd., 1988). Bu aktivitenin ABC transportür ailesine ait olması ve gliserolun transferinde görevli olması not edilmiştir.

4.1.18. *prfH* - putative peptide chain release factor

prfH'nin pseudogen olabileceği düşünülmektedir. Yine de PrfH'nin, bir peptit zinciri salınım faktörü olarak işlev görebileceği bildirilmiştir (Baranov vd., 2006). PrfH'nin peptit zinciri salınım faktörleri olan RF1 (release factor 1) ve RF2 (release factor 2)'ye sekans benzerliği gösterdiği bilinmektedir (Pel vd., 1992). PrfH'nin bir translasyon "release" faktörü olması ve bor toleransında görevli olması, stres altında translasyonun devam ettirilmesi adına bir fayda sağlayabilir. Bu olasılık da test edilebilir.

4.1.19. *yaiB* - anti-adaptor protein for σ^S stabilization (*iraP*)

YaiB bir flavoproteindir (Mancini vd., 2015). Flavoproteinler, riboflavinin nükleik asit türevini içeren proteinlerdir. Bunlar, oksidatif strese katkıda bulunan radikallerin uzaklaştırılması, fotosentez ve DNA onarımı dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik işlevlerde yer almaktadır.

YaiB, birkaç küçük anti-adaptör proteinlerinden biridir, hücrede fosfat azlığı sırasında alternatif sigma faktörü σ^S 'nin stabilizasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Ayrıca, hücrenin durağan fazında ve hücredeki azot azlığında da rol almaktadır. RssB adaptör proteini σ^S 'ye bağlanan ve degradasyon için ClpXP proteazını hedefleyen bir RpoS regülatörüdür. YaiB, RssB proteinin seviyesini veya stabilitesini etkilemez fakat RssB proteini ile etkileşime girerek doğrudan RssB proteini aracılı σ^S bozulmasını engelleyebilmektedir. YaiB'nin diğer adlandırması bu aktivitesinden dolayı "IraP" (Inhibitor of RssB activity during phosphate starvation) olarak yapılmıştır (Bougdour vd., 2006). Her bir anti-adaptör proteini, RssB proteini ile benzersiz bir şekilde etkileşebilmektedir (Battesti vd., 2013; Micevski vd., 2015). YaiB, ClpXP'yi inaktive etmemektedir (Bougdour vd., 2006).

yaiB (*iraP*) geninin ekspresyonu hücredeki fosfat azlığı ile indüklenmektedir. Bu etkiye ppGpp aracılık etmekte ve SpoT'ya gerek duyulurken, RelA'ya gerek duyulmamaktadır (Bougdour ve Gottesman, 2007). Ayrıca, CsgD proteininin de *yaiB*'nin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Brombacher vd., 2006; Gualdi vd., 2007).

YaiB aktivitesi bor stresine cevap olarak da hücreye yukarıda anlatılan katkıları sunabilir. Burada esas olan RpoS aktivitesinin YaiB tarafından, degradasyonun önlenerek veya azaltılarak korunmasıdır. RpoS'nin kontrol ettiği genlerin bazıları birçok çevresel stress faktörüne karşı direnç sağlamada kullanıldığı bilinmektedir.

4.1.20. *nusB* - transcription antitermination protein NusB

Transkripsiyon antiterminasyon (bir gende normal sonlanma noktasından sonra, RNA polimerazla transkripsiyonun devam etmesi) proteini NusB, bir dizi genin transkripsiyonunda antiterminasyona yardımcı olmaktadır (Kuroki vd., 1982). Özellikle ribozomal RNA (rRNA) genlerinin uygun transkripsiyonu için NusB proteini gereklidir. Lambda fajında antiterminasyon için NusB gerekli olduğu belirtilmiştir (Das vd., 1992).

NusB üzerinde bir dizi yapısal analiz yapılmıştır. Bir monomer olarak aktif olduğu görülmüştür (Swindle vd., 1988). NusB'nin NMR çalışmaları, altı veya yedi heliks ile tamamen alfa sarmal olduğunu göstermiştir (Berglechner vd., 1997, Altieri vd., 1997, Altieri vd., 2000). NusB yokluğunda RNA transkript seviyelerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir (Miyashita vd., 1982).

4.1.21. *cbpM* - chaperone modulator CbpM

CbpM, spesifik olarak CbpA'nın *in vitro* (Chae vd., 2004) ve *in vivo* (Chenoweth vd., 2007) olarak, DNA bağlanma ve ko-şaperon aktivitesini inhibe etmektedir. CbpM ve CbpA proteinleri birbirleri ile etkileşim içerisindedir (Chae vd., 2004; Chenoweth vd., 2007). Bu etkileşim için gerekli olan CbpM içindeki aminoasit belirleyicileri, yapılan çalışmalar sonucunda haritalanmıştır (Chintakayala ve Grainger, 2011). CbpM, CbpA ile bağlı olmadığında, Lon ve ClpAP proteazları için bir hedef haline gelmektedir. CbpAM operonu, büyümenin durağan fazında, maksimum olarak kopyalanmakta olup (Chenoweth ve Wickner, 2008), bu fazın geç evresinde ise birikme yaptığı gözlemlenmiştir (Chae vd., 2004).

4.1.22. *malI* - DNA-binding transcriptional repressor MalI

"Maltoz inhibitörü" olan MalI, maltoz sistemiyle ilgili genleri kontrol eden bir repressordür. MalI, maltoz glukoz PTS permeaz ve MalT transkripsiyon aktivatörü ile doğrudan etkileşime giren, iki işlevli bir proteini kodlayan operonun transkripsiyonunu negatif olarak otoregüle etmektedir. Bu transkripsiyon faktörü, *malXp* ve *malIp*'yi aynı anda overlap yaparak, 12bp uzunluğunda tekrarlayan nükleotit sekansına ardışık olarak bağlanmaktadır (Reidl vd., 1989; Reidl ve Boos, 1991). MalI, GalR (%28), CytR (%21) ve LacI (%24) ile yüksek benzerlik göstermekte ve MalT ile 30 aminoasit benzerlik göstermektedir. Ayrıca, N-terminal bölgesi bir sarmal-dönüş-sarmal DNA-bağlama alanına sahiptir (Reidl vd., 1989). Bu proteini kodlayan genin, LacI/GalR ailesinin transkripsiyonel baskılayıcılarının homoloğu olduğu rapor edilmiştir. MalI aktivitesi ile hücrel stress arasındaki ilişkiyi gösteren bir yayına literatür taramasında rastlanmamıştır.

4.1.23. *ydhD* (*grxD*) - glutaredoxin 4

ydhD geni, Grx4 olarak da bilinmektedir ve monotiyoil glutaredoksin ailesine aittir. Grx4 proteini, bir (2Fe-2S) klusterını, model alıcı protein olan ferredoksinine aktaran bir işlev görebilmektedir (Yeung vd., 2011). Demir-sülfür kluster proteinleri ile fiziksel ve genetik etkileşimler sonucu, Grx4 proteinin, SUF ve CSD sistemlerinde demir-sülfür klusterları için transfer protein olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Boutigny vd., 2013).

Grx4, demir tükenmesi esnasında up-regüle edilen bir proteindir (Fernandes vd., 2005). *ydhD* mutanlığı Keio koleksiyonunda (Baba, 2006) mevcuttur ve demir tükenmesine duyarlı olduğu gösterilmiştir (Yeung vd., 2011).

Glutaredoxin, fazla borik asit kaynaklı oksidatif strese (ROS) karşı glutatyon bağlantılı indirgeyici güç olarak katkı sağlayabilir. Bu olasılık AG1(pCA24N::*ydhD*) suşunda borik asit stresi altında ileriki çalışmalarda test edilebilir.

4.1.24. *yeaC* - DUF1315 domain-containing protein YeaC

yeaC geni 273 nükleotide sahiptir. 90 aminoasitten oluşan bu protein hücre içinde sitozolde yer almaktadır (Ecocyc). Bu proteinin görevi henüz bilinmemektedir.

4.1.25. *yeiT* - CP4-44 prophage; DUF987 domain-containing protein YeeT

yeiT geni 222 nükleotide sahiptir. 73 aminoasitten oluşan bu protein hücre içinde sitozolde yer almaktadır (Ecocyc).

4.1.26. *yffL* - CP4-57 prophage; anti-bacteriophage protein (AbpA)

Önceleri *yffL* olarak isimlendirilen bu gen, günümüzde, *abpA* olarak isimlendirilmekte olup, AbpA (anti-bacteriophage protein A) proteinini kodlamaktadır (Yasui vd., 2014). *abpA* ve *abpB* genlerinin, bir plazmid sayesinde aşırı ekspresyonu, T2, T4, T7 ve λ ailesi bakteriyofajlarının 30°C'de yayılmasını engellerken 37°C'de veya 42°C'de engelleyememektedir. AbpAB proteinleri faj DNA'sının sentezini bozmaktadır, fakat bakteriyel DNA sentezine etki etmemektedir (Yasui vd., 2014). *abpA* (*yffL*)'nin, *E. coli* K-12'de stres kaynaklı mutagenезleri (stress-induced mutagenesis; SIM) kolaylaştıran bir genler ağına (network) ait olduğu gösterilmiştir (Al Mamun vd., 2012).

4.1.27. *hcaD* - putative 3-phenylpropionate/cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase subunit

hcaD geninin tahmini olarak, 3-fenilpropionat/cinnamat dioksigenaz ferredoksin reduktaz alt ünitesini kodladığı düşünülmektedir. 3-fenilpropionat dioksigenaz biyokimyasal olarak karakterize edilmemiştir (Diaz vd., 1998). *E. coli*, bazı aromatik asitleri karbon ve enerji kaynakları olarak kullanabilmektedir. 3-fenilpropionatın katabolizması için de HcaD'yi içeren bir meta-bölünme yolu kullanılmaktadır (Burlingame ve Chapman, 1983; Diaz vd., 1998).

Fenilpropanoid bileşikler doğal ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bileşikler, proteinlerin topraktaki çürümesinin yanı sıra lignin, çeşitli yağlar ve

reçineler gibi bitkilerin çeşitli bileşenlerinin parçalanma ürünlerinden kaynaklanabilmektedir. Fenilpropanoid bileşiklerin mikrobiyal katabolizması, sadece bu aromatik moleküllerin doğal bozunma döngüsünde değil, aynı zamanda şarap yapımı, yaşlanma ve depolama gibi endüstriyel uygulamalarında da önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, sinnamik asit (CI), 3-fenilpropionik asit (PP) ve bunların hidroksil türevlerinin bozulması, *Pseudomonas* türleri, *Arthrobacter* türleri (Strickland ve Massey, 1973), *Escherichia coli* (suşu K12) (Burlingame ve Chapman, 1983) ve *Rhodococcus globerulus* (Barnes vd., 1997) türleri sayesinde gerçekleşmektedir.

PP (3-fenilpropionik asi) ve 3HPP (3-hydroxyphenylpropionate) katabolizmasında görev alan genleri içermeyen mutantlar ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Sonuçta, *E. coli*'de bu bileşiklerin aerobik bozulmasının, bir ekstradiol halka bölünmesine maruz kalması ile Krebs döngüsünün ara maddelerine indirgenen 3-(2,3-dihidroksifenil) propionat (DHPP)'ye dönüşen iki ayrı yoldan ilerlediği bilgisi elde edilmiştir (Bugg, 1993; Burlingame vd., 1986).

hcaD geninin yer aldığı sistemin oksidatif stres cevabı ile bir ilişkisi olabileceği rapor edilmiştir (Turlin vd., 2005). Dolayısıyla bu aktivite ile borik asit stresi arasındaki ilişki daha fazla araştırılmalıdır.

4.1.28. *elaB* - tail-anchored inner membrane protein ElaB

ElaB, C-kuyruk-demir yüklü bir iç membran proteindir. *elaB* delesyon mutantları oksidatif ve ısı stresine karşı duyarlıdır ve persistan hücre formasyonunu artırıcı etkisi vardır. Ayrıca *elaB* transkripsiyonunun, sigma faktörü RpoS'nin doğrudan regülasyonu altında olduğu gösterilmiştir (Guo vd., 2017).

4.1.29. *hypC* - hydrogenase 3 maturation protein HypC

HypC proteini, hidrogenaz 3 izoenziminin olgunlaşmasında rol oynayan yardımcı bir proteindir (Jacobi vd.,1992). Pre-HycE'nin olgunlaşma işlemi süresince bir şaperon protein olarak demir transferini gerçekleştirir. HypC, N-terminal sistein kalıntıları protein-protein etkileşimlerinde anahtar rol oynamaktadır (Wang vd., 2007).

4.1.30. *yffU* - CP4-57 prophage; ArsC family protein YffU

yffU geni 315 nükleotide sahiptir. Bu gen, 104 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. EC 1.20.4.1 enzim numarasına sahip oksidoredüktaz sınıfına ait bir arsenat: glutatyon/glutaredoksin reduktaz olduğu düşünülmektedir. Bu enzim, arsenatın detoksifikasyon sisteminin bir parçasıdır (KEGG) ve Şekil 4.7.'deki reaksiyonu gerçekleştirmektedir.



Arsenat iyon + Glutaredoksin \rightleftharpoons Arsenit + Glutaredoksin disulfit

Şekil 4.7. Arsenat iyonun detoksifikasyon reaksiyonu

4.1.31. *yqeK* - protein YqeK

yqeK, genom içerisinde, bir ETT2 (tip III salgılama sistemi) patojenite bölgesinin bir parçası içerisinde yer almaktadır. Bu gen *E. coli* O157: H7 gibi patojenik suşlarda tam olarak bulunan, sekanslanan çoğu *E. coli* ve *Shigella* suşlarında kısmen görülen bir gen dir (Ren vd., 2004). Yapılan çalışmalarda ETT2 (tip III salgılama sistemi)'nin patogeneze etkisinin olduğu görülmüştür (Ideses vd., 2005).

4.1.32. *yhiJ* - DUF4049 domain-containing protein YhiJ

yhiJ geni, 1623 nükleotide sahiptir. Bu gen, 540 aminoasitten oluşan proteini kodlamaktadır.

4.1.33. *rep* - ATP-dependent DNA helicase Rep

Rep, SF1 süperfamilyasına ait ATP'ye bağımlı bir helikazdır. Replisomun bir bileşenidir ve bakteriyofajların replikasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (Guy vd., 2009; Denhardt vd., 1967; Takahashi vd., 1979; Kornberg vd., 1978; Scott vd., 1977). Rep, kromozomda, transkripsiyonun yüksek düzeyde gerçekleştiği bölgelerde, replikasyonu kolaylaştıran bir replikasyon çatalına özgü motor görevi görmektedir

(Guy vd., 2009; Boubakri vd., 2010; Baharoglu vd., 2006, Atkinson vd., 2011, Gupta vd., 2013).

Rep helikaz, replikasyon çatalının durmasını önleyerek çift zincirli kopmaları ve sonuçta rastgele rekombinasyonu önlemektedir. Rep, PriC ile birlikte replikasyon çatalını yeniden başlatma yolağında görev almaktadır (Shiraishi vd., 2005, Michel vd., 1997, Sandler, 2000). Ayrıca, UV hasarı nedeniyle replikasyon çatalında meydana gelen tutukluğun giderilmesini de sağlamaktadır (Courcelle vd., 2012).

Rep helikaz aktivitesi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Rep, bağlı olduğu sarmala göre 3'-5' yönünde ilerlerken tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) bağlandığında uyarılması gerçekleşir (Yarranton ve Gefter, 1979; Lohman vd., 1989; Wong vd., 1996). Rep, tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) ya da çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) bağlandıktan sonra dimerize olmaktadır (Bjornson vd., 1996; Wong vd., 1992a). Helikaz aktivitesinin başlatılması, uyarılması ve işlenmesi için dimerizasyon gerekmektedir (Ha vd., 2002; Cheng vd., 2001; Wong vd., 1996). Bu bağlanma döngüsü, ATP tarafından bağlanan ATP'nin ADP'ye hidrolizi ile ssDNA'nın bir alt birim tarafından salınmasını ve diğer tarafından dsDNA yerine ssDNA'nın bağlanmasını teşvik etmektedir (Wong vd., 1992b; Bjornson vd., 1996a).

Yapılan çalışmalarda, Δrep mutantının, nalidiksik asit ve siprofloksasin gibi kinolon antibiyotiklere karşı aşırı duyarlı oldukları gösterilmiştir (Henderson ve Kreuzer 2015). *rep recB*, *rep recC* (Uzest vd., 1995) ve *rep rnhA* (Sandler, 2005) ikili (double) mutantlarının yaşayamadıkları görülmüştür. *rep uvrD* ikili (double) mutantlarının, zengin büyüme ortamlarında öldükleri gözlenmiştir. Ayrıca bu ikili mutantın replikasyon bariyerlerine karşı aşırı duyarlı oldukları görülmüştür (Guy vd., 2009).

Bu aktivitenin AG1(pCA24N::*rep*) suşunda fazla ifade edilerek, replikasyon ve rekombinasyonu etkileyerek borik asit tarafından oluşturulmuş muhtemel DNA hasarının tamiri üzerinde bir rolü hipotez edilebilir ve ileriki çalışmalarda araştırılabilir.

4.1.34. thiC - phosphomethylpyrimidine synthase

ThiC, 5-aminoimidazolün, 4-amino-hidroksimetil-2-metilpirimidin fosfata dönüşümünü kataliz etmektedir (Lawhorn vd., 2004). ThiC'nin, AdoMet süper ailesi olarak da bilinen radikal S-adenosilmetiyonin (SAM) süper ailesinin yeni bir üyesi olduğu gösterilmiştir (Chatterjee vd., 2008). 5-aminoimidazolün 4-amino-hidroksimetil-2-metilpirimidin fosfata dönüşümünü ayrıntılı olarak incelenmiş ve potansiyel reaksiyon mekanizmaları önerilmiştir. ThiC aktivitesi, SAM ve nikotinamid kofaktörleri tarafından arttırılmıştır (Lawhorn vd., 2004).

ThiC, *Salmonella enterica*'da kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. ThiC, tüm AdoMet enzimlerinde bulunan benzer fakat tam olarak aynı olmayan bir CXXCXXXXC motifi içerir. Mutasyon çalışmaları, motifteki herhangi bir sistein kalıntısının değiştirilmesinin tiamin biyosentezini ortadan kaldırdığını göstermiştir (Dougherty ve Downs, 2006).

Bu aktivite tiamin metabolizması içerisinde yer almaktadır ve çeşitli stres koşullarına karşı koruyucu etkisi bilinmektedir (Jung ve Kim, 2003). Ancak borik asit stresi ile ilişkisine dair bir yayın bulunamamıştır.

4.1.35. yifB - putative magnesium chelatase YifB

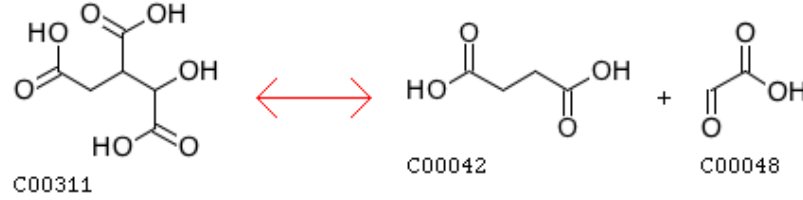
yifB geni 1521 nükleotide sahiptir. 506 aminoasitten oluşan YifB proteininin tahmini olarak magnezyum şelat aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir (KEGG). YifB, N-terminal Lon proteaz domaini içermekte ve ATP'ye bağlı bir proteaz olarak işlev görebilmektedir (Iyer vd., 2004).

Eğer borik asit stresi proteinlerin katlanmalarını engelliyorsa veya üç boyutlu yapısını bozuyorsa, Lon proteaz aktiviteleri bu tür proteinleri degrade ederek hücreye olan zararını bertaraf edebilir. Bu olasılık da ileriki çalışmalarda test edilebilir.

4.1.36. aceA - isocitrate lyase

EC 4.1.3.1 numarasına sahip olan izositrat liyaz (AceA) enzimi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizmasında görev almaktadır (KEGG) İzositrat liyaz, geri

dönüşümlü olarak D-threo-izositratın, süksinat ve glioksilata dönüşümünü katalizlemektedir (Şekil 4.8.). Glioksilat döngüsü, TCA döngüsüne benzemektedir. Ancak bu döngü, CO₂ kaybına yol açan TCA döngüsü reaksiyonlarını atlamakta ve hücrede karbon biyosentezi için TCA döngüsünün ara maddelerini sağlamaktadır (Ecocyc)



Şekil 4.8. İzositratın, süksinat ve glioksilata geri dönüşümlü olarak katalizlenen reaksiyonu

Bazı fiziksel koşullar altında glukoneogenezise ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumda, glioksilat bypassı için karbon kaynağı olarak asetat ve doymuş yağ asitlerinin kullanımının esansiyel olduğu bilinmektedir (Maloy vd., 1980). Glioksilat döngüsü, trikarboksilik asit döngüsünün bir çeşididir ve sekiz enzimden beşi ortak kullanılmaktadır. Glioksilat döngüsü, izositrat dehidrogenaz (Icd) ve alfa-ketoglutarat dehidrogenaz tarafından katalize edilen trikarboksilik asit döngüsünün karbon dioksit üreten aşamalarını atlar (Kornberg, 1966). Bu durum, oksidatif strese yanıtta, biyofilm oluşumunda ve patogeneziste önemli bir rol oynamaktadır. Gelecekteki araştırmalar bu bağlantıların daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır (Sungeun vd., 2016).

AceA aktivitesi yukarıda anlatılan AceK aktivitesi ile birlikte görülebilir. İleriki çalışmalar için hipotezimiz AceK ve AceA arttığında glioksilat döngüsü aktifleşmekte ve böylece gliokoneogenesis gerçekleştirilmektedir. Bu olasılığı test etmek için daha fazla deney yapılmasına ihtiyaç vardır.

4.1.37. *sgbE* - L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase SgbE

sgbE geni, EC 5.1.3.4 numarasına sahip olan L-ribuloz-5-fosfat 4-epimerazı kodlamaktadır (KEGG). Bu enzim, pentoz ve glukuronat dönüşümü (interconversions) metabolik yolağında L-ribuloz-5-fosfatın oluşumunu

katalizlemektedir. SgbE aktivitesi KduD ve KduI aktiviteleri aynı metabolik yolakta görevli olduğu gözlenmiştir. Borik asit stresine karşı mücadelede pentoz ve glukuronat yolağının önemli olabileceğini öneriyoruz. Çünkü daha sonra anlatılacağı gibi, *kduD* ve *kduI* mRNA seviyeleri borik asit stresi altında yüz kat üzerinde artmaktadır. Ayrıca bu tez çalışmasının NMR bölümünde görüldüğü üzere, hücre borik asit miktarı arttırıldığında galaktonat seviyesini 6 ila 21 kat arttırmaktadır. Borik asit stresine cevap ve glukuronat metabolizması arasındaki ilişki ileriki çalışmalarda farklı deneylerle irdelenmesi önerilmektedir.

4.1.38. *fre* - flavin reductase

Flavin redüktaz (Fre), EC 1.5.1.41 sahip olup, Riboflavin metabolizmasında görev almaktadır. İndirgenmiş piridin (pyridine) nükleotitleri ile çözünebilir flavinlerin indirgenmesini katalize eder. Riboflavin ile en yüksek aktivitesini gösterir. NADH alıcı olarak kullanıldığında bu enzim, riboflavinden daha düşük aktiviteye sahip olan FMN (flavin mononükleotid) ve FAD (flavin adenin dinükleotid)'i de substrat olarak kullanabilmektedir. NADPH alıcı olarak kullanıldığında, bu enzimin FAD ile aktivitesi gözlenmemekte ve FMN ile çok düşük bir aktiviteye sahip olduğu gözlenmektedir (Fontecave vd., 1987).

Flavin redüktazın, oksidatif stres tepkisinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, bir *fre* delesyon mutantının, hidrojen peroksit maruziyetine karşı daha duyarlı olduğunu gösterilmiştir (Kri vd., 2014).

4.1.39. *ytfG* - NAD(P)H:quinone oxidoreductase (*qorB*)

ytfG geninin sinonimi *qorB*'dir. EC 1.6.5.2 numarasına sahip olan QorB, bir NAD(P)H:quinon oksidoredüktazdır. Ubiquinon ve diğer terpenoid-quinon biyosentez metabolizmasında görev almaktadır. Çalışmamızda bulunan bir diğer gen olan *menD* ile aynı metabolik yolakta yer almaktadır (KEGG). Bu enzim ubiquinon, benzoquinon, ve duroquinon gibi kısa zincirli akseptör quinonların iki elektron indirgemelerini kataliz etmektedir (Kim vd., 2008).

Quinon oksidoredüktazların, oksidatif strese karşı koruyucu bir rolü olduğu bilinmektedir. *Corynebacterium glutamicum* ile yapılan çalışmada, logaritmik fazdaki hücrelere diamid uygulaması yapılmış ve gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile belirlenmiştir. *ytfG* geni diamid ile indüklendikten 5 dakika sonra transkript seviyesinde yaklaşık 200 kat artış gözlenmiştir. Quinon oksidoredüktaz, quinonlar ve semiquinon radikalleri arasında redoks döngüsünün bir sonucu olarak, reaktif oksijen türleri üreten quinonların indirgenmesini katalize etmektedir. Ancak yine de quinon oksidoredüktazların hücreyi stresten nasıl koruduğu tam olarak bilinmemektedir (Ehira vd., 2009).

4.1.40. *sgcQ* - putative nucleoside triphosphatase

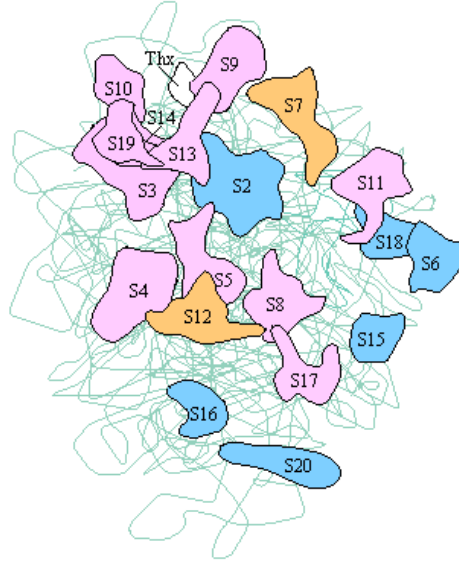
sgcQ geni, 807 nükleotide sahiptir. Bu gen, 268 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. KpLE2 faj-benzeri (phage-like) element; tahmini nukleozid trifofataz aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir (Ecocyc).

4.1.41. *rpsJ (nusE)* - 30S ribosomal subunit protein S10

rpsJ (nusE) geni, 30S ribozomal alt ünite protein S10'u kodlamaktadır (Şekil 4.9.) ve transkripsiyon ve translasyon arasında bağlantıyı sağlamaktadır. Ayrıca NusE (S10), NusB ile de bir kompleks oluşturup, transkripsiyon antiterminasyonun düzenlenmesinde rol almaktadır.

S10'un ribozomun P bölgesinde tRNA'ya bağlandığı (Riehl vd., 1982) ve aynı zamanda başka bir domaini ile 16SrRNA ile temas edebildiği (Powers vd., 1988) belirtilmiştir. Ribozomun bir parçası olan S10'un ayrıca birkaç non-ribozomal proteinlerle etkileşime girdiği bilinmektedir.

S10 genindeki mutasyonlar sonucu bakterinin tigesiklin antibiyotiğine karşı direnç kazandığı gösterilmiştir (Beabout vd., 2015). AG1(pCA24N:*rpsJ*) suşunun borik asit stresine karşı göreceli toleransı, bu kapsamda ileriki çalışmalarda değerlendirilebilir.



Şekil 4.9. Ribozun küçük alt ünitesindeki *rpsJ* (*nusE*) geni kodladığı 30S ribozomal alt ünite protein S10'un yeri

4.1.42. *yhcE* - putative uncharacterized protein YhcE

yhcE geni, 1745 nükleotide sahiptir (KEGG). YhcE proteini karakterize edilmemiştir.

4.1.43. *yhdL* (*arfA*) - alternative ribosome-rescue factor A

yhdL (*arfA*) geni, alternatif ribozom-kurtarma faktörü A proteinini kodlamaktadır. Kesintisiz mRNA'ların sonunda durmuş olan ribozomlar, hücrel protein sentezinin üretkenliği için kurtarılmalıdır (Chadani vd., 2012). ArfA proteini, durmuş olan (stalling) ribozomların kurtarılmasında rol oynamaktadır (Chadani vd., 2010). ArfA, durmuş olan ribozomun boş A bölgesine bağlanır ve daha sonra peptidil-tRNA'yı hidrolize eden RF2 (release factor 2) devreye girer (Chadani vd., 2012, Shimizu vd., 2012a). ArfA, RF2'de konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve kod çözme merkezi, stop kodununun fonksiyonel bir eşdeğeri olarak işlev görür (Zeng vd., 2016, Ma vd., 2017, Huter vd., 2017). Bu sonuçlar ArfA'nın, ribozom bağlı peptidil-tRNA'nın hidrolizini indükleyerek durmuş ribozomu kurtardığını göstermektedir (Chadani vd., 2010).

4.1.44. *tnaC* - *tnaAB* operon leader peptide

TnaC lider peptidi, *tnaCAB* operonunun atenüasyonunun düzenlenmesi için gereklidir. Triptofan metabolizmasında *tnaCAB* operonu, triptofanaz dahil olmak üzere iki anahtar enzimi kodlamaktadır. Triptofan mevcut olduğunda, Rho'ya bağlı bir terminatör yoluyla transkripsiyon devam eder ve *tnaA* ve *tnaB* transkript edilir (Stewart ve Yanofsky, 1985). Triptofan yokluğunda, peptit zinciri salınım faktörü RF1 ve peptit zinciri salınım faktörü RF2, TnaC'yi tRNA'dan ayırır ve ribozomu serbest bırakır. Bu da, Rho'nun Rho'ya bağımlı bir sonlandırıcıya erişmesine izin verir ve transkripsiyonunu erken sona ermesini sağlar (Stewart ve Yanofsky, 1985, Yanofsky vd., 1996, Konan ve Yanofsky, 2000; Gong vd., 2001; Gong ve Yanofsky, 2002). Sonunda durdurulan ribozom, ribozom geri dönüşüm faktörü ve peptit zinciri salınım faktörü RF3 ile temizlenir (Gong vd., 2007). Bu mekanizmanın doğal bir sonucu olarak *tnaCAB*'daki atenüasyon, lider peptidin translasyonuna ve Rho'nun varlığına bağlıdır (Yanofsky ve Horn, 1995; Gish ve Yanofsky, 1995; Gollnick ve Yanofsky, 1990).

4.1.45. *ytfA* - putative transcriptional regulator YtfA

ytfA geni, 327 nükleoitde sahiptir. 108 amino asitten oluşan YtfA proteininin transkripsiyonel regülatör olduğu tahmin edilmektedir (KEGG). Fazla ifadesi borik asite karşı olan direnci arttırmıştır. Bu aktivite üzerinde, yabancı tip ve mutant suşları da dahil, karşılaştırmalı proteomik ve mikrodizin çalışmalarının yapılmasını öneriyoruz.

4.1.46. *ulaB* - L-ascorbate specific PTS enzyme IIB component

ulaB geni, bir PTS Enzimi IIB domainini ve varsayılan bir sistein fosforilasyon bölgesi (Cys9) içeren hidrofilik bir proteini kodlamaktadır (Reizer vd., 1996). İsimlendirilmesi olarak "*ulaB*" utilization of L-ascorbat aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Yew ve Gerlt, 2002).

Yapılan bir çalışmada, *ulaB* delesyon mutantının, L-askorbatı hücre içine transport edemediği in vivo olarak gösterilmiştir. Ayrıca bu mutantın in vitro L-askorbat fosforile edemediği rapor edilmiştir (Zhang vd., 2003).

UlaB'nin yer aldığı metabolik yollar incelendiğinde, askorbat ve aldarat metabolizmasında yer aldığı görülmüştür. Bu metabolik yolda askorbatın yanında glukuronat, galaktonat, galaktarate, glukarat gibi birçok şeker asit molekülünün yer aldığı görülmüştür. Yukarıda anlatılan SgbE (EC 5.1.3.4) aktivitesi de bu yolda yer almaktadır. NMR sonuçlarından elde ettiğimiz ipuçları, borik asite karşı cevapta glukarat ve galaktonat gibi şeker asitlerinin miktarlarının önemli ölçüde arttığını önermektedir. Bu metabolik yoldaki metabolitlerin birçoğu cis-diol gruplarını içermektedir. Henüz detayları bilinmemekle birlikte, bakterinin bor stresine karşı cevabında “askorbat ve aldarat” ve “pentoz ve glukuronat” dönüşümleri metabolik yollarının önemli ve anahtar niteliğinde olduğunu ve bundan sonraki çalışmalarda öncelik verilmesini önermekteyiz.

4.1.47. *yjgX* - putative phosphoethanolamine transferase YjgX

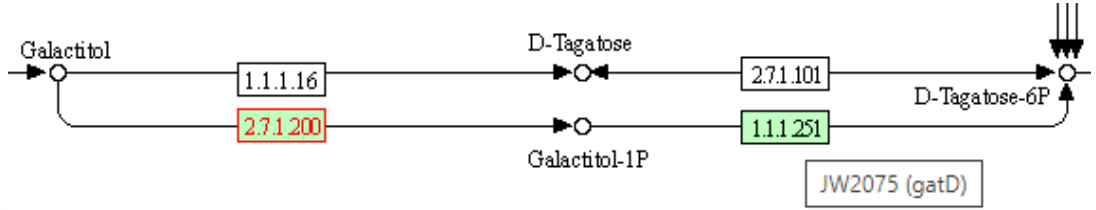
yjgX geni, 1199 nükleotide sahiptir. KpLE2 faj benzeri (phage-like) element; tahmini fosfoetanolamin transferaz YjgX N-terminal fragmenti olabileceği düşünülmektedir (Ecocyc).

4.1.48. *yjhX* - toxin of the TopAI-YjhQ toxin-antitoxin system, TopA inhibitor

Birçok serbest yaşayan bakteri genomlarında toksin-antitoksin (TA) sistemlerini içermektedir. YjhX- YjhQ bu TA sistemlerinden bir tanesidir. YjhX 81 aminoasitten oluşan ve topoizomeraz I (TopA) enzimini DNA replikasyonu ve RNA sentezini inhibe ettiği ve böylece hücre büyümesini tutarak hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir. Eğer hücrede *yjhQ* ifade edilirse bu etkiyi bertaraf ettiği bilinmektedir (Yamaguchi ve Inouye, 2015). Borik asit toksisitesinin hücreyi öldürme yollarından bir tanesinin TA sistemlerinin aracılığıyla olup olmadığını detaylıca araştırılmasını önermekteyiz.

4.1.49. *sgcA* - putative PTS enzyme IIA component SgcA

SgcA tahmini olarak galaktitol PTS sisteminin EIIA komponenti olup, EC 2.7.1.200 numarasına sahiptir (Reizer vd., 1996). Bu aktivite galaktoz metabolizmasında yer almaktadır. GatD enzimi (EC 1.1.1.251) ile aynı metabolik yolakta ve yan yana yer almaktadır (Şekil 4.10.). Yukarıda GatD-borik asit stresi arasındaki ilişkiye benzer bir durum burada da geçerli olabilir.



Şekil 4.10. *SgcA* ve *GatD* aktivitelerinin galaktoz metabolizmasındaki yeri

4.1.50. *chpS* - ChpS antitoxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system

ChpS, ChpB-ChpS toksin-antitoksin (TA) sisteminin antitoksin bileşenidir. ChpB, bu TA sisteminde toksin olarak görev alır ve ChpS yokluğunda büyümeyi inhibe eder. Eğer ChpS hücrede varsa anti toksin olarak ChpB'nin etkisini bertaraf eder ve büyüme normal seviyelerinde olur. Yani ChpB ve ChpS ikilisinin bir arada olması toksik değildir (Masuda vd., 1993). *chpSB* bölgesinin delesyonu hücrenin ölümüne neden olmaz (Masuda ve Ohtsubo, 1994).

ChpB proteininin endoribonükleaz aktivitesi vardır, yani bazı RNA'ları keserek büyümeyi inhibe eder. ChpS ise bu aktiviteyi baskılar. Her iki proteinin de (ChpS ve ChpB), *chpS-chpB* promotor bölgesine bağlanarak kendi sentezlerini otoregüle ettikleri düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki AG1(pCA24N:*chpS*) suşundaki fazla ifade edilen antitoksin (ChpS) proteinin borik asit stresi altında hücreye bir avantaj sağlaması mantıklıdır. Bundan sonraki çalışmalarda aşırı borik asitin hücreyi öldürme mekanizmalarından bir tanesinin ChpB ve/veya ChpS üzerinden olup olmadığı, yapılacak spesifik deneylerle araştırılmalıdır.

4.1.51. *yceP* (*bssS*) - regulator of biofilm formation

yceP geni, biyofilm oluşumunu düzenleyen BssS proteinini kodlamaktadır. *bssS* delesyon mutantının önemli bir büyüme kusuru yoktur. *bssS*'nin delesyonu 400'den fazla genin ekspresyonunu önemli ölçüde etkiler. Etkilenen yollar arasında indol taşınması ve AI-2 (auto-inducer 2) alımı ve işlenmesi yer alır (Domka vd., 2006).

Biyofilm oluşumu esnasında BssS transkripsiyonunun arttığı görülmüştür (Schembri vd., 2003, Beloin vd., 2004, Ren vd., 2004a). Artan transkripsiyonun 23°C'de RpoS ve DsrA'ya bağlı olduğu bulunmuştur (White-Ziegler vd., 2008). Ayrıca hydroquinona maruz bırakılan hücrelerde *bssS* ekspresyonunun indüklendiği bilinmektedir (Palevsky vd., 2016).

Domka vd., 2006 tarafından BssS, "sinyal sekresyonu yoluyla biyofilm regülatörü" olarak tanımlanmıştır.

Dolayısıyla bu tez çalışmasında fazla ifade edilen *yceP* (*bssS*) geninin bakteri hücresine biyofilm oluşumu açısından bir katkısı olabileceği ve böylece borik asit stresine karşı mücadelesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir. AG1(pCA24N::*yceP*), $\Delta yceP$ suşu ve yabancı tip suşlarıyla, borik asit varlığında ve yokluğunda yapılacak biyofilm deneyleri iyi bir başlangıç olabilir.

4.1.52. *yjhD* - surface adhesin E-like protein

yjhD geni, 231 nükleotide sahiptir. KpLE2 faj-benzeri (phage-like) element; yüzey adezin E-benzeri protein olabileceği düşünülmektedir (Ecocyc).

4.1.53. *yrbB* (*m1aB*) - intermembrane phospholipid transport system protein M1aB

M1aB, fosfolipit trafiği ile ilgili, STAS domainine sahip sitoplazmik proteindir (Malinverni ve Silhavy, 2009). M1aB, M1aF, M1aE ve M1aD ile kararlı bir kompleks oluşturur. Kompleksin oluşturulması ve/veya stabilitesi için M1aB gereklidir (Thong vd., 2016). Çeşitli genlerin taranması sonucu, *m1aB* geninin stresin ölümcül etkilerini azaltan genlerden biri olduğu görülmüştür. *m1aB* insersiyon mutantını, yabancı tipi

suşuna kıyasla mitomisin C ve diğler streslere karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Han vd., 2010). Bu aktivitenin dış zar lipit asimetrisinin korunması ile ilişkili olabileceği yorumlanmıştır (Malinverni ve Silhavy, 2009).

4.1.54. *gatR* - DNA-binding transcriptional repressor GatR, N-terminal fragment

"Galaktitol regülatörü" GatR, galaktitolün taşınması ve katabolizmasında rol oynayan bir operonun ekspresyonunu negatif olarak kontrol eder (Nobelman ve Lengeler, 1996; Nobelman ve Lengeler, 1995). *gatYZABCD* operonundaki genler, *gatR* geni içerisinde IS3E insersiyonu olduğu için her zaman ifade edilir (Nobelman ve Lengeler, 1996). DeoR ailesinin bir üyesi olarak GatR, varsayılan bir heliks-dönüş-heliks motifi içeren bir N-terminal alanına sahiptir (Zeng ve Larson, 1996; Nobelman ve Lengeler, 1996).

4.1.55. *yoeF* - putative uncharacterized protein YoeF

yoeF geni 357 nükleotide sahiptir. Bu gen, 118 aminoasitten oluşan bir protein kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. CP4-44 prophage; karakterize edilmemiş bir proteindir (Ecocyc).

4.1.56. *arpB* - putative ankyrin repeat protein B, N-terminal fragment

arpB geni 1900 nükleotide sahiptir. Tahmini ankyrin tekrar protein B, N-terminal fragmenti olabileceği düşünölmektedir (Ecocyc).

4.1.57. *hybF* - hydrogenase maturation protein HybF

HybF ve homoloğu olan HypA, hidrogenaz izoenziminin olgunlaşmasında rol oynar. Hidrogenaz izoenzimlerinden 1 ve 2'nin olgunlaşması için HybF gerekirken, hidrogenaz 3'ün olgunlaşmasında HypA rol oynamaktadır. HypA ve HybF, kısmen birbirlerinin yerine kullanılabilir (Hube vd., 2002).

Saflaştırılmış HybF çinko (Zn^{2+}) içerir. Protein, in vitro olarak Ni^{2+} 'yi $1,87 \mu M$ K_D ile bağlayabilir. H2 ve E3 kalıntıları ayrıca HybF'nin hidrogenaz olgunlaşma aktivitesi için gereklidir (Blokesch vd., 2004b).

4.1.58. *ygeM* - hypothetical protein

ygeM geni 432 nükleotide sahiptir. Bu gen, 143 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır (KEGG). Aktivitesi bilinmemektedir.

4.1.59. *ympP* - conserved hypothetical protein

ympP geni 663 nükleotide sahiptir. Bu gen, 220 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. Aktivitesi bilinmemektedir (KEGG).

4.1.60. *yicR* - RadC-like JAB domain-containing protein YicR

yicR geninin, DNA rekombinasyonunda yer alan genlerle bir takım genetik etkileşimlere sahip olduğu düşünülmektedir (Kumar vd., 2016). Yapılan bir deneyde klonlanmış *yicR* geninin UV direnci için *radC102* alelini kısmen tamamladığı, ancak yabancıl tip suşu daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Felzenszwalb vd., 1992).

4.1.61. *hpt* - hypoxanthine phosphoribosyltransferase

Hipoksantin fosforibosiltransferaz (EC 2.4.2.8), ribozil-5-fosfat grubunun 5-fosfo- α -D-riboz 1-difosfatından hipoksantin N^9 pozisyonuna IMP vermek üzere transferini katalize eden bir pürin kurtarma enzimidir (Guddat vd., 2002). Purin metabolizmasında yer alan bir aktivitedir.

4.1.62. *frlC* - fructoselysine 3-epimerase

Fruktoselizin 3-epimeraz (EC 5.1.3.4), fruktoselizin ve psikoselizin arasındaki dönüşümü katalize eder (Wiame vd., 2004). Fruktoselizin 3-epimeraz aktivitesi, hücreler glikoz üzerinde büyütüldüğünde saptanamaz. Bakteri fruktoselizin veya

psikoselizin üzerinde yetiştirildiğinde durağan fazdan elde edilen ekstraktın içinde 2 nmol/ dakika/mg epimeraz aktivitesine rastlanmıştır (Wiame vd., 2004).

4.1.63. *menD* - 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase

menD geninin ürünü, menaquinon biyosentezinin ilk adımı kataliz eder. EC 2.2.1.9 numarasına sahiptir ve “ubiquinone ve diğer terpenoid-quinon” metabolizmasında görev almaktadır. Bu enzim, izokorizmat (isochorismate) molekülünü 2-suksinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-sikloheksen-1-karboksilat molekülüne dönüştürmektedir. Bu aktivitenin vitamin K döngüsü ile bir ilişkisi düşünülebilir.

Ayrıca daha önce yukarıda anlatılan YtfG (QorB) aktivitesi de menaquinon sentezinde görev almaktadır. Oksijenli solunumu destekleyebilecek bir metabolik yolakta olması göz önüne alınabilir.

4.1.64. *yadI* - putative PTS enzyme IIA component YadI

yadI geni 441 nükleotide sahiptir. Bu gen, 146 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve tahmini olarak PTS enzimi IIA komponent YadI aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir (Riley vd., 2006). Daha önce yukarıda belirtildiği gibi, fosfoenolpiruvat (PEP)-bağımlı fosfotransferaz sistemi (PTS) ile ilişkili olan genlerin borik asit stresine karşı cevap oluşumunda etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

4.1.65. *ydiA* (*ppsR*) - phosphoenolpyruvate synthetase regulatory protein

PEP sentetaz düzenleyici protein (PSRP, PpsR), fosfoenolpiruvat sentetazın (PEPS, PpsA) P_i'ye bağlı aktivasyonunu ve ADP/ATP'ye bağlı inaktivasyonunu katalize eder. PpsR'nin fruktoz-1,6-bisfosfata (FBP) bağlandığı bulunmuştur (Piazza vd., 2018).

4.1.66. *yfcT* - putative outer membrane usher protein YfcU

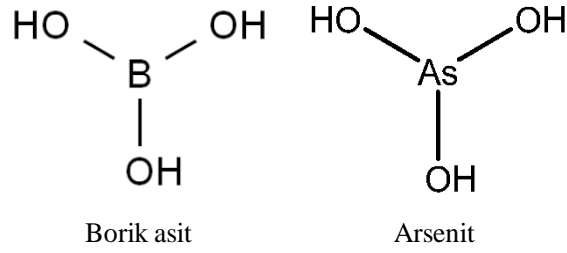
Yapılan sekans analizleri, *yfcT* ve *yfcU* genlerinin tek bir stop kodonu ile durdurulan, iki bölümden oluşan bir fimbrial usher proteinini kodladığını gösterilmiştir. *yfcTU* genlerinin diğer fimbrial genleri ile tek bir operonda bulunduğu düşünülmektedir ve fimbrial usher proteinleri ile sekans benzerliğine sahip olduğu görülmüştür (Korea vd., 2010).

4.1.67. *arsB* - arsenite/antimonite: H⁺ antiporter

ArsB bir arsenit/antimonit pompa membran proteinidir. ArsB yoluyla taşıma, bir metaloid:proton antiport mekanizması yoluyla gerçekleşmektedir. ArsA'nın bir plazmitde ekspresyonu sonucu, As(III) ve Sb(III)'e karşı hücrel direncin arttığı görülmüştür (Meng vd., 2004).

Genomdan *arsRBC* operonunun silindiği mutantlar, yabancı tiplerine göre, arsenite karşı 10-20 kat, antimonite ve arsenata karşı ise 5-10 kat daha duyarlılık göstermişlerdir (Carlin vd., 1995). *arsRBC* ekspresyonu artırıldığında ve *arsRBC* delesyon mutantında bu bölge tekrar ifade edildiğinde, arsenit, arsenat ve antimonit dirençlerinin, yabancı tiplere oranla arttığı da gözlenmiştir (Carlin vd., 1995; Diorio vd., 1995). *arsRBC* gen bölgesinin genomdan silinmesi ile hücrelerde arsenit birikimlerinin arttığı, bir plazmid yardımı ile *arsRBC*'nin ekspresyonu artırıldığında ise hücrelerde bu birikimin azaldığı görülmüştür (Carlin vd., 1995). *arsRBC* ekspresyonu, antimonit (Carlin vd., 1995), arsenat ve arsenit tarafından indüklenmektedir (Diorio vd., 1995; Carlin vd., 1995; Cai ve DuBow, 1997). ArsR ise *arsRBC* operonu için baskılayıcı görevi görmektedir (Cai ve DuBow, 1997).

Arsenik, antimoni ve bor elementleri, metalloid (yarı metal)dir. AG1(pCA24N::*arsB*) suşunda fazla ifade edilen ArsB transport proteinin arsenit yanında non-spesifik olarak borik asiti de dışarı atabileceği olasılığı düşünülebilir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Borik asit ve arsenitin moleküler yapısı.

4.1.68. *yeiQ* - putative dehydrogenase, NAD-dependent

yeiQ geni, 1467 nükleotide sahiptir. Bu gen, 488 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve hücre içinde sitozolde yer almaktadır. Tahmini olarak, NAD-bağımlı dehidrogenaz aktivitesine sahiptir (Ecocyc).

4.1.69. *yddK* - leucine-rich repeat domain-containing protein YddK

yddK geni 957 nükleotide sahiptir. Bu gen, 318 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve hücre dışı boşlukta yer almaktadır. YddK proteini, lösince zengin tekrar domaini içermektedir (Ecocyc).

4.2. Zenginleştirme ile Seleksiyon Sonucu Tespit Edilen Genler

4.2.1. *dtd* - D-aminoacyl-tRNA deacylase

D-aminoaçil-tRNA deaçilaz (Dtd), yanlış bağlanmış D-aminoasitleri tRNA'lerden uzaklaştıran bir aminoaçil-tRNA düzenleme enzimidir. D-Tyr-tRNA^{Tyr} deaçilaz aktivitesine sahiptir. Eğer tRNA^{Tyr} normalde yüklenmesi gereken L-tirozin aminoasidi yerine D-tirozin ile yüklenirse, bu yanlışlığı Dtd proteini aminaaçilasyon aktivitesi ile düzeltir (Soutourina vd., 1999). Dtd ayrıca yanlış yüklenen Gly-tRNA^{Ala} düzenleme yeteneğine sahiptir (Pawar vd., 2017). Dolayısıyla bu aktivitenin doğru aminoaçil tRNA'ların elde edilmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Borik asit stresi altında eğer yanlış aminoaçil tRNA'lar oluşursa, Dtd aktivitesi katkı sağlayarak toksisiteyi giderici etki sunabilme ihtimali düşünülmektedir.

4.2.2. *yedL* - putative acetyltransferase YedL

yedL geni 480 nükleotide sahiptir. Bu gen, 159 aminoasitten oluşan proteini kodlamakta ve tahmini olarak asetiltransferaz YedL olduğu düşünülmektedir (Ecocyc).

4.2.3. *yjbo* - phage shock protein G

PspG proteininin bir iç zar proteini olduğu tahmin edilmektedir. PspG, *psp* operonu içeren tüm bakterilerde korunmaktadır. PspG proteininin hareketliliği de etkilediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Lloyd vd., 2004).

Faj şoku operonu *pspABCDE* gibi *pspG* geninin ifadesi de pIV sekretin stresi ile upregule edilmektedir. σ^{54} -içeren RNA polimeraz ile transkripsiyon PspF ile aktive edilebilir. PspA proteininin *pspG* ekspresyonunu negatif olarak regüle ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, *pspG*, PspF regulonuna aittir (Lloyd vd., 2004). PspG proteinin *in vivo* koşullarda PspC proteini ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Jovanovic vd., 2010).

E. coli karvakrola maruz bırakılmış ve mikrodizin analizi ile gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. *pspG* geni dahil, faj şoku cevabı ile ilgili genlerin (*pspA*, *pspB*, *pspC*, *pspD*, *pspF* ve *pspG*) ifadesinin arttığı görülmüştür.

4.2.4. *elfc* (*ycbS*) - putative fimbrial usher protein ElfC

ycbQRSTUVF operonunun, *E. coli* K-12'de şaperon-yardımcı fimbrial operonu olduğu düşünülmektedir (Zhai ve Saier, 2002; Korea vd., 2010). Bu operon, normal laboratuvar koşulları altında ifade edilmemektedir ancak, tip 1 fimbrial kompleksi olmayan bir suşta ifade edildiğinde, *ycb* operonunun minimal ortamda, çeşitli abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu teşvik ettiği ve mikroskopik olarak gözlemlenebilen çok sayıda yüzey fimbrial yapı ürettiği görülmüştür (Korea vd., 2010). Ayrıca YcbS proteininin, bakteriyel enfeksiyonda rol oynadığı düşünülmektedir (Hsiao vd., 2016).

4.2.5. *yjK* - putative helicase YfjK

yjK (*abpB*) geni, CP4-57 profaj; tahmini helikaz YfjK proteinini kodlamaktadır (Ecocyc). Yapılan bir çalışma sonucu, YfjK proteini, AbpB (anti-bacteriophage protein B) olarak isimlendirilmiştir. Bakteriler, bakteriyofaj enfeksiyonlarından kurtulmak için çeşitli direnç mekanizmalarına sahiptir. Faj yayılımının engellenmesi için *abpA* ve *abpB* genlerinin her ikisinin de gerekli olduğu gösterilmiştir. *abpA* ve *abpB* genlerinin, bir plazmid sayesinde aşırı ekspresyonu, T2, T4, T7 ve λ ailesi bakteriyofajlarının 30°C'de yayılmasını engellerken, 37°C'de veya 42°C'de engelleyememektedir. AbpAB proteinleri faj DNA'sının sentezini bozmaktadır, fakat bakteriyel DNA sentezine etki etmemektedir (Yasui vd., 2014).

4.2.6. *yfiC* (*trmM*) - tRNA m6A37 methyltransferase

Bu aktivite tRNA modifikasyonu ile ilgilidir ve tRNA^{Val}'in A37 nükleotidinin N⁶ pozisyonunun metilasyonundan sorumludur. tRNA'lardaki 37 pozisyonu, antikodon üçlüsüne bitişiktir ve sıklıkla modifiye edilir. Standart büyüme koşulları altında, *yfiC* genini içermeyen mutantın, önemli bir büyüme kusuru görülmemektedir. Ancak, ozmotik veya oksidatif stres koşulları altında, *yfiC* mutantının üremesinin azaldığı gözlenmektedir (Golovina vd., 2009). Dolayısıyla bu genin osmatik ve oksidatif stres ile ilişkisi vardır ve bor stresine karşı cevapta görev alabilir.

4.2.7. *sufD* - Fe-S cluster scaffold complex subunit SufD

Demir-sülfür komplekslerinin oluşması karmaşık biyosentetik mekanizmalar gerektirmektedir. *E. coli* bu görevi gerçekleştirmek için Isc ve Suf sistemlerini kullanmaktadır. SufD, SufBC2D Fe-S kompleksinin (cluster) bir bileşenidir, *in vivo* olarak SufB üzerinde Fe-S küme oluşumu için hem SufC hem de SufD proteinleri gereklidir (Saini vd., 2010).

sufD, *sufS* veya *fhuF* mutantı, ferrioksamın B demir kaynağının kullanımında eksiklik göstermiştir (Patzner ve Hantke, 1999). Hücrede *sufABCDSE* operonu silindiğinde, süperoksit oluşturan ajanlara karşı duyarlılığın arttığı gözlenmiştir (Lee vd., 2004). *sufABCDSE* operonu ile birlikte *isc* geninin de silinmesi ile oluşturulan

ikili mutantlarda demir-sülfür küme düzeneğinin canlılık için esansiyel hale geldiği gözlenmiştir (Takahashi ve Tokumoto, 2002; Tokumoto vd., 2004). Bunun yanı sıra, *isc* operonunun silindiği suşlarda, bu genin eksikliğinin *sufABCDSE* operonun aşırı ifadesi ile tolere edildiği görülmüştür (Takahashi ve Tokumoto, 2002) *sufABCDSE* operonundaki ilk gen olan *sufA*'nın ekspresyonu, süperoksit ajanları ve hidrojen peroksit tarafından indüklenmektedir (Lee vd., 2008).

SufD, zorunlu anaerobik mikroorganizmalara kıyasla aerotoleran hücrelerde translasyon sonuçlarına bakıldığında, çeşitli kodon adaptasyonları göstermiştir. Bu nedenle, oksidatif strese karşı cevapta rol oynadığı tahmin edilmiştir. *sufD* geni delesyona uğratılmış olan bir mutantın yabancı tipe oranla hidrojen peroksite karşı daha duyarlı olduğu, ancak diğer streslere karşı duyarlılık göstermediği bildirilmiştir (Kri vd., 2014).

4.2.8. *yecF* - DUF2594 domain-containing protein YecF

YecF promotörünün, σ_{28} tarafından tanındığı tahmin edilmektedir ve RNA polimeraz sigma 28'in *in vitro* olarak, *yecF* transkripsiyonu gerçekleştirebildiği bilinmektedir (Yu vd., 2006). Sigma 28 faktörü, *E. coli* dahil birçok bakteride, flagella biyosentezi ve kemotaksis genlerinin ekspresyonunda rol almaktadır.

4.2.9. *idnR* - 5-ketogluconate DNA-binding transcriptional dual regulator

IdnR (L-idonat regülatör), L-idonat transport ve katabolizmasındaki genlerin ifadesini regüle eden bir transkripsiyon faktörüdür (Bausch vd., 1998, Bausch vd., 2004). IdnR, GtnR proteinine %53 oranında benzerlik göstermektedir ve LacI/GalR transkripsiyonel regülatör ailesinin bir üyesidir (Rodionov vd., 2000).

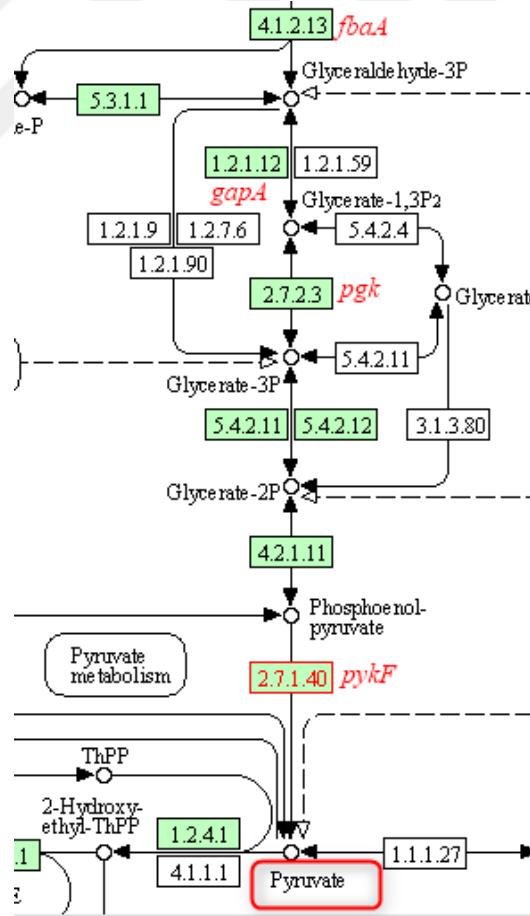
4.3. Proteomik Çalışmaları Sonucunda Tespit Edilen Proteinler ve Gen Bilgileri

AG1(pCA24N::*aceK*) ve AG1(pCA24N::*pstA*) suşu ile borik asit varlığında ve yokluğunda yapılan 2D deneyleri sonucu up-regüle olan protein spotları, MALDI TOF-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve Mascot programı kullanılarak

proteinlerin kimlikleri belirlenmiştir. AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun proteomik analizi sonucu, Kpyk1, Pgc, EftS, OmpA, CysK, KduD, AtpA, PrpD proteinlerinin, AG1(pCA24N::*ptsA*) suşunun proteomik analizi sonucu, Kpyk1, MalE, G3P1, AhpC, Alf, Mdh, KduI proteinlerinin up-regüle olduğu gözlenmiştir. Her bir protein ile ilgili bilgiler ve yorumlar aşağıda verilmiştir.

4.3.1. *pykF* - Kpyk1- Piruvat kinaz I

PykF proteininin, AG1(pCA24N::*aceK*) ve AG1(pCA24N::*ptsA*) suşunun proteomik analizi sonuçlarına göre borik asit varlığında up-regüle olduğu gözlenmiştir. Yine laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada da bu proteinin up-regüle olduğu tespit edilmiştir. EC 2.7.1.40 numarasına sahip olan bu enzim, glikolizis/glukoneogenesis yolağında görev almaktadır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Piruvat kinaz I enziminin görev aldığı metabolik yolak

Piruvat kinaz, glikolizin anahtar allosterik bir enzimidir. ADP'ye fosfofenolpiruvatın fosforil grubunun transferi ile piruvat ve ATP oluşmaktadır. Böylece glikolitik yolun son adımı geri dönüşümsüz olarak tamamlanmaktadır. Oluşan piruvat, ya hücre materyallerini sentezlemek için birçok metabolik yolda kullanılır ya da TCA döngüsü yoluna gider (Valentini vd., 2000; Mattevi vd., 1995).

E. coli'de *pykF* tarafından kodlanan piruvat kinaz I ve *pykA* tarafından kodlanan piruvat kinaz II olmak üzere, piruvat kinazın iki formu bulunmaktadır. Bu iki form fiziksel ve kimyasal özellikleri, kinetik davranışları bakımından birbirinden oldukça farklıdır ve genetik kontrolleri birbirinden bağımsızdır. Ancak çeşitli besinsel ve metabolik durumlarda bir arada bulunabilirler (Malcovati vd., 1973; Gibriel ve Doelle, 1975; Valentini vd., 1979; Malcovati ve Valentini, 1982; GarridoPertierr ve Cooper, 1983; Valentini vd., 1993; Ponce vd.1995). Piruvat kinaz I, fruktoz 1,6-bisfosfatla aktive edilirken, ATP ve süksinil-CoA tarafından inhibe edilmektedir. Piruvat kinaz II, AMP ve çeşitli şeker fosfatları tarafından allosterik olarak aktive edilmektedir (Waygood vd., 1975; Mort ve Sanwal, 1978; Somani vd., 1977; Valentini vd., 1979; Malcovati ve Valentini, 1982; Valentini vd., 1991).

Yapılan bir çalışmada, *pykF* delesyon mutantının ısı şokuna karşı yabancı tipten daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Krisiko vd., 2014).

4.3.2. *pgk* - P_{gk}- Fosfogliserat kinaz

pgk geni tarafından kodlanan fosfogliserat kinaz, *E. coli*'de glikoliz ve glukoneogenez yolağında yer almaktadır. EC 2.7.2.3 numarasına sahip olan bu enzim, PykF ile aynı metabolik yolaktadır (Şekil 4.12.). Glikolitik reaksiyon yönündeki bu enzim 1,3-bisfosfo-D-gliserattan bir fosforil grubunun ADP'ye transferini kataliz ederek ATP ve 3-fosfo-D-gliserat oluşturmaktadır (Bardey vd., 2005).

pgk mutantının, şekerler veya glukoneojenik substratlar üzerinde büyüyemedikleri görülmüştür (Irani ve Maitra, 1974; Thomson vd., 1979). P_{gk} sentezinin, büyüme eğrisinde, logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında 10 katın üzerinde indüklendiği gösterilmiştir (Nellemann vd., 1989).

Borik asit stresine cevap ile olan ilişkisinin enerji ve ara metabolit eldesindeki katkısı ile olduğu düşünülmektedir.

4.3.3. *tsf* - EftS- Elongasyon faktör Ts

Escherichia coli'de protein sentezinin uzama basamağı, non-ribozomal protein faktörleri EF-G ve EF-T'ye ihtiyaç duymaktadır. Uzama faktörü olan EF-T; EF-Ts ve EF-Tu olmak üzere iki bileşene sahiptir (Wittinghofer ve Leberman, 1976). EF-Ts, ribozom ile ilişkili bir uzama faktörüdür ve EF-Tu_GTPaz için guanin nükleotit değişim faktörü olarak işlev görmektedir (LucasLenard ve Lipmann, 1966). EF-Ts büyüme için esansiyeldir (Hwang vd., 1989; Baba vd., 2006).

Elongasyon Faktörü Tu (EF-Tu) GTP ile bağlandığı zaman aktif formuna dönüşür ve amino açillenmiş tRNA'lara bağlanır. Ribozom üzerine geldiğinde eğer doğru kodon-antikodon eşleşmesi olursa, GTP hidrolizi gerçekleşir ve EF-TU ile GDP ayrılırken, aminoasit-tRNA ribozomun A bölgesinde kalır. EF-Ts tekrar EF-Tu'nun aktifleşmesini sağlar. Bunun için EF-Tu-GDP'yi EF-Tu-GTP'ye dönüştürür. Daha önceki yapılan proteomik analizleri göstermiştir ki EF-Tu stres cevabında maksimum olarak ifade edilmektedir (Muela vd., 2008). Bu tez çalışmasında da EF-Ts seviyesinin arttığı tespit edilmiş olması literatür ile uyumludur.

4.3.4. *ompA* - OmpA- Dış membran protein A

Bu protein bir dış membran proteini olup, peptidoglikan ile ilişkili lipoproteinlere benzerlik göstermektedir. Biyolojik işlevi, iyon transportu ile ilgili olan bir membran proteindir.

E. coli'de OmpA proteininin stres ortamındaki fonksiyonu araştırılmıştır. *ompA* mutantının, asidik ortam, yüksek ozmotik basınç gibi koşullara, normal suşa göre çok daha fazla duyarlı olduğu gösterilmiştir (Wang, 2002).

Ayrıca *ompA*'nın biyofilm oluşumu sırasında aşırı ifade edildiği görülmüştür (Orme vd., 2006). MG1655 suşunda *ompA* geninin delesyonu sonucu biyofilm oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (Barrios vd., 2006). Yapılan çalışmalarda hem stres koşulları

ile ilişkisi olan, hem de biyofilm oluşumuna katkısı olan bu proteinin bor stresi ortamında hücreye katkı sağlaması söz konusudur.

4.3.5. *cysK* - CysK- Sistein sentaz A

cysK geni, EC 2.5.1.47 numarasına sahip olan bir sistein sentaz enzimini kodlamaktadır. O-asetilserin sülfhidrilaz A olarak da bilinen sistein sentaz A (CysK), sistein biyosentez yolundaki ikinci adımı gerçekleştirmektedir. Bu reaksiyonda asetat, L-sistein oluşturmak üzere, hidrojen sülfid aracılığıyla O-asetil-L-serinden uzaklaştırılmaktadır (Kredich ve Tomkins, 1966; Fimmel ve Loughlin, 1977; Boronat vd., 1984).

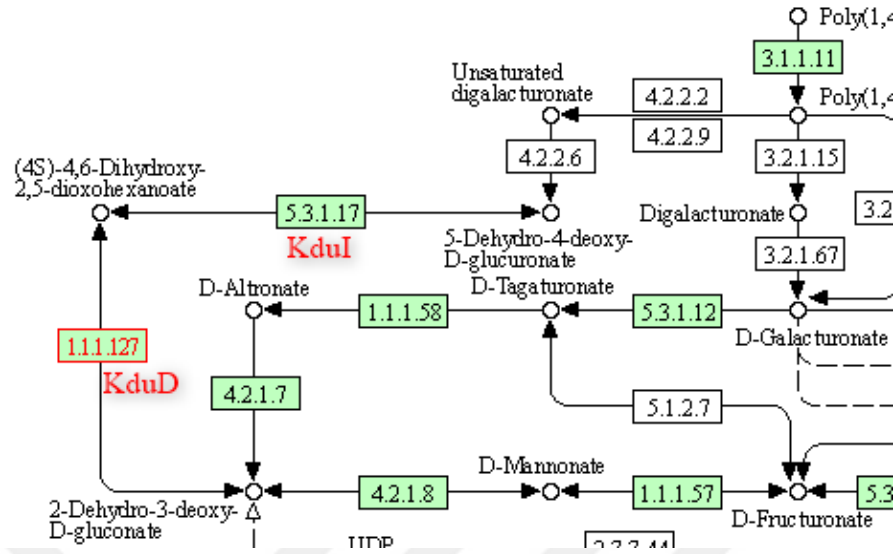
cysK ekspresyonu, en az bir hücre dışı sinyal yolu ile uyarılmaktadır ve yüksek pH, kromat, çinko, potasyum tellürit ve diğer metal iyonlarına maruz kalma sonucu indüklenmektedir (Ackerley vd., 2006; Sigdel vd., 2006; Fuentes vd., 2007; Yamamoto vd., 2011; Gao vd., 2013). CysK fonksiyonu olmayan mutantların, kromata maruz kalması sonucu oluşan oksidatif etkiler nedeniyle kromat toksisitesine karşı daha duyarlı oldukları görülmüştür (Ackerley vd., 2006). Ayrıca sistein sentaz kompleksinin oluşumunun, soğuk inaktivasyonuna ve proteolize karşı koruma sağladığı görülmüştür (Mino vd., 2001).

4.3.6. *kduD* - KduD 2-keto-3-deoxy-D-gluconate dehydrogenase

KduD proteini, 2-keto-3-deoksi-D-glukonat dehidrogenaz (EC 1.1.1.127) aktivitesine sahip olup “Pentose and glucuronate interconversions” yolağında görev almaktadır (Şekil 4.13). Bu enzim, 2-Dehidro-3-deoksi-D-glukonat’ın NAD⁺ kullanılarak 4,6-Dihidroksi-2,5-dioksoheksanoat’a dönüşümünü kataliz etmektedir.

kduD geninin ifadesinin galakturonat ve glukuronat tarafından upregüle edildiği görülmüştür. Ayrıca, KduD’nin, osmotik stres ortamında UxaB ve UxuB enzimlerinin redüktaz aktivitelerinin yerine geçtiği rapor edilmiştir (Rothe vd., 2013). KduD ve KduI proteinlerinin osmatik stresse cevapta rol oynadığı gözlenmiştir.

PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSIONS



Şekil 4.13. KduD ve KduI aktivitelerinin görev aldığı metabolik yolak

4.3.7. *atpA* - AtpA- ATP sentaz altünite alfa

ATP sentaz enzimi AtpA proton gradiyentini kullanarak membran üzerinde ADP'den ATP sentezini gerçekleştirir. Alfa zinciri ise düzenleyici alt ünedir (UniProt ID P0ABB0). ATP sentaz bir F-ATPaz'dır. ATP üretimine izin veren dönen bir motor mekanizmasına sahip F_0 ve F_1 olmak üzere iki ana alt birimden oluşur (Junge ve Nelson., 2015). Alfa-alt birimi, F_1 ve F_0 komplekslerin bağlanması ve birleşmesi ve enzimin katalitik mekanizmasında esansiyel bir rol oynamaktadır (Rao vd., 1988).

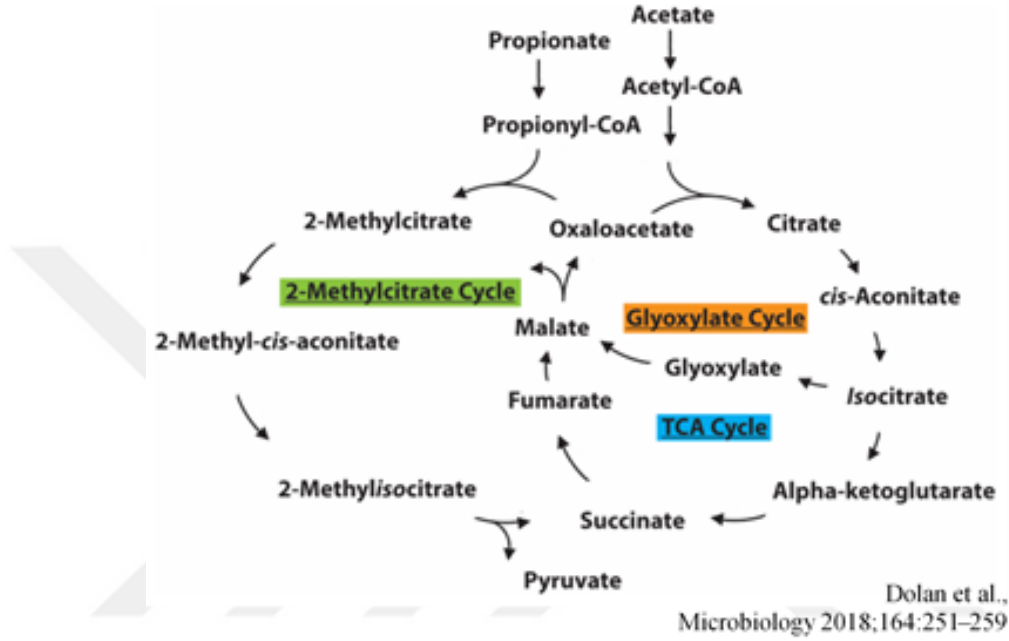
Bu çalışmada bor stresi altında, ATP sentaz seviyesinin artması enerji elde edilmesine pozitif katkı sağlayarak hücreye yarar sağladığı düşünülebilir.

4.3.8. *prpD* - PrpD- 2-metilsitrat dehidrataz

prpD geni, EC 4.2.1.79 numarasına sahip olan 2-metilsitrat dehidrataz aktivitesini kodlamaktadır. Metil sitrat döngüsünde, propiyonat katabolizmasında yer almaktadır ve metil sitratı, metil akonitata dönüştürmektedir (Blank vd., 2002). PrpD ayrıca akonitaz benzer bir aktiviteyi (akonitaz C) kodlamaktadır. Bu aktivite hücresel

akonitaz aktivitesinin %5 veya daha azını oluşturmaktadır ve özellik *acnA acnB* ikili mutantında gözlenmektedir (Gruer vd.,1997).

TCA döngüsü ile metil sitrat döngüsü içe içe geçmiştir. Metil sitrat döngüsü propiyonat varsa kullanılmaktadır (Şekil 4.13.). AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun proteomik analizi sonucu PrpD seviyesinin artması, krebs reaksiyonlarından sitrat-cis-akonitat- izositrat dönüşümüne katkı sağlayabileceği şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.14. Metil sitrat ve döngüsünde PrpD aktivitesinin rolü

4.3.9. *malE* - MalE- Maltoz-bağlanma periplazmik protein

malE geni, Maltoz ABC transport periplazmik bağlanma proteinini kodlar ve maltoz, maltotetraoz, maltotrioz şekerlerinin taşınmasında rol oynar (Kellermann ve Szmelcman, 1974; Ferenci, 1980). *E. coli* maltoz ile büyütüldüğü zaman, MalE'nin yüksek seviyelerde ifade edildiği gözlenmiştir.

MalE'nin maltoz ABC transport aktivitesi yanında, MalE-maltoz kompleksi kemoreseptör Tar proteinine bağlanarak, maltoza yönelik kemotaksiste rol alır. *malE* mutantlarının maltoza yönelik kemotaksis yeteneklerini kaybettikleri gösterilmiştir (Hazelbauer, 1975; Zhang vd., 1992; Zhang vd., 1999).

AG1(pCA24N::*pstA*) suşunun proteomik analizi sonucu MalE protein seviyesinin artmasının nedeni araştırıldığında, *E. coli*'nin LB besi ortamında yetiştirildiği zaman,

öncelikle maltoz ve maltodekstrin substralarını tercih ettiğini belirten bir yayın bulunmuştur (Baev vd., 2006). Bu yayında, mikrodizin yöntemi ile global gen ekspresyonu incelenerek, fonksiyonel metabolik analizler yapılmış ve LB ortamında büyüyen *E. coli*'nin büyüme sırasında sıralı bir substrat kullanımı modundan eş zamanlı olana geçtiğini ortaya çıkarmıştır. Maltoz ve maltodekstrinler büyümeyi destekleyen substratlardan ilkidir. Bakteri kültürünün en yüksek büyüme oranı ile ilişkili diğer besin maddelerinin D-mannoz, mellibioz, D-galaktoz, L-fukoz, L-rannoaz, D-mannitol, amino şekerler, trehaloz, L-arabinoz, gliserol ve laktat olduğu yorumlanmıştır. Dolayısıyla AG1(pCA24N::*pstA*) suşunda MalE'nin up-regülasyonu sonucu hücreye daha fazla maltoz veya maltodekstrin alınarak gerekli olan enerji ve karbon kaynağının sağlanmış olabileceği düşünülmektedir.

4.3.10. *gapA* - G3p1- Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz A

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz A (EC 1.2.1.12), *E. coli*'de glikoliz ve glukoneogenezde görev alan çok önemli bir enzimdir. NAD⁺ varlığında, D-gliseraldehid-3-fosfatın, 1,3-bisfosfo-D-gliserata dönüşümünü kataliz eder (Şekil 4.12.). AG1(pCA24N::*pstA*) suşunda, hücre içine alınan şekerlerin miktarının arttığı ve GapA proteinin de up-regüle edilmesi ile alınan şekerlerden glikoliz yolağı kullanılarak daha fazla enerji elde edildiği ve böylece hücrenin borik asit stresine mücadelesinde bir katkı sunulduğu düşünülmektedir.

4.3.11. *ahpC* - AhpC- Alkil hidroperoksit reduktaz altünite C

AhpC, alkil hidroperoksit reduktazın peroksidaz bileşenidir (EC 1.11.1.-). Hidroperoksit substratını indirgediği düşünülmektedir. Aerobik büyüme koşullarında, asidik ortamda (Blankenhorn vd., 1999), sülfat kıtlığında (Quadroni vd.,1996) ve indol (Garbe vd., 2000) varlığında bu proteinin miktarı artmaktadır. AhpC'nin aşırı ifadesi furfurala karşı tolerans sağlamaktadır (Glebes vd., 2015).

AG1(pCA24N::*pstA*) suşunun proteomik analizi sonucu AhpC'nin miktarının artmasının nedeni oksidatif stres bağlantısı ile açıklanabilir. Muhtemelen borik asit hücrede oksidatif strese neden olabilir ve bunun sonucunda hidroperoksit ve/veya

hidrojen peroksit oluşabilir. AhpC aktivitesinin artması ile hücredeki hidroperoksit, alkil hidroperoksit reduktaz sayesinde parçalanarak alkol ve suya indirgendiği rapor edilmiştir (Zhang vd., 2019). Bu şekilde hücrenin, borik asitin oluşturduğu oksidatif stresi ortadan kaldırabileceği düşünülmektedir.

4.3.12. *fbaA* - Alf- Fruktoz-bisfosfat aldolaz sınıf 2

FbaA fruktoz-bisfosfat aldolaz, glikoliz ve glikoneogenezin çok önemli bir enzimidir. β -D-fruktoz 1,6 bisfosfatı, dihidroksiaseton fosfat ve D-gliseraldehit 3-fosfata dönüştürür. Enerji ve karbon metabolizmasında merkezi konumda olan bir enzimdir (Stribling ve Perham, 1973).

AG1(pCA24N::*pstA*) suşunda FbaA miktarının artmış olması çok mantıklıdır. Çünkü içeri alınan şekerlerin metabolize edilmesi ve enerji üretilmesi için gereklidir. Elde edilen metabolitler ve enerji ise borik stresine karşı mücadelede kullanılabilir.

4.3.13. *mdh* - Mdh- Malat dehidrogenaz

Mdh, malat dehidrogenaz enzimi Krebs döngüsünde görev alır, malatı NAD^+ kullanarak oksaloasetat ve $\text{NADH}+\text{H}^+$ ye dönüştürür (Sutherland ve McAlister-Henn, 1985). Dolayısıyla bu enzim, merkezi enerji ve karbon metabolizmasında önemli olup hücrenin ihtiyaç duyduğu ATP ve ara metabolitlerin üretilmesinde kritik öneme sahiptir. Borik asit stresine karşı olan etkisi de bu açıdan değerlendirilebilir.

4.3.14. *kduI* - KduI- 5-keto 4-deoxyuronate isomerase

KduI proteini, 5-keto 4-deoksiuronat izomeraz aktivitesine (EC 5.3.1.17) sahiptir (Maruyama vd., 2015). KduI ile KduD aynı metabolik yolakta yer almaktadır (Şekil 4.13.). Bu yolakta KduI, 5-dehidro-4-deoksi-D-glukuronat'ın 3-deoksi-D-gliserol-2,5-heksodiyulosonat'a dönüşümünü kataliz etmektedir. KduD ve KduI'nın osmotik stres ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Rothe vd., 2013). Bu nedenle bu iki aktivitenin hücrede strese neden olan Bor ile bir ilişkisinin olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Real Time PCR Çalışmaları

Bunun yanı sıra, daha önceki çalışmalarımızda tespit edilen bor ile ilgili olduğu düşünülen genlerin Real-Time PCR deneyleri ile hücre içi ifadeleri çalışılmıştır. Real-Time PCR deneylerinde, kontrol ile birlikte toplam 30 adet genin bora bağlı göreceli mRNA seviyelerinin değişimleri analiz edilmiştir. Burada Keio taramalarından elde edilen toplam 18 adet genin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda, proteomik çalışmaları sonucu elde edilen spotların MS identifikasyonlarından elde edilen 11 adet genin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Bu genlerden toplam 15 tanesinin mRNA seviyelerinde, bor konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak, farklı oranlarda artış (upregülasyon) gözlenmiştir (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.2. Çalışılan genlerin farklı bor konsantrasyonlarında göreceli mRNA seviyelerinin artış veya azalış katları

Gen ismi	mRNA seviyesi 0 mM	50 mM	70 mM	Regülasyon durumu
<i>yfeS</i>	1.00	1.86±0.10	3.67±0.05	Up-regülasyon
<i>ylaC</i>	1.00	1.9±0.20	4.84±0.62	Up-regülasyon
<i>torR</i>	1.00	1.42±0.10	1.89±0.27	Az Up-regülasyon
<i>garP</i>	1.00	3.48±0.30	3.63±0.18	Up-regülasyon
<i>dinJ</i>	1.00	1.97±0.10	2.48±0.10	Up-regülasyon
<i>aceF</i>	1.00	2.07±0.30	2.32±0.50	Up-regülasyon
<i>trmU</i>	1.00	1.07±0.10	1.12±0.16	Regülasyon yok
<i>cheZ</i>	1.00	0.79±0.20	0.87±0.25	Regülasyon yok
<i>glxK</i>	1.00	2.80±0.60	2.38±0.42	Az Up-regülasyon
<i>nohA</i>	1.00	0.70±0.21	0.59±0.23	Down-regülasyon
<i>trpR</i>	1.00	0.71±0.28	0.64±0.04	Az down-regülasyon
<i>ygaV</i>	1.00	1.52±0.20	2.24±0.02	Az Up-regülasyon
<i>galS</i>	1.00	1.08±0.50	1.15±0.38	Regülasyon yok
<i>yoaC</i>	1.00	3.17±0.24	9.15±0.99	Up-regülasyon
<i>rcnB</i>	1.00	0.6±0.10	0.80±0.27	Regülasyon yok
<i>yddE</i>	1.00	0.37±0.06	0.21±0.08	Down-regülasyon
<i>aroK</i>	1.00	0.49±0.07	0.61±0.30	Regülasyon yok
<i>talB</i>	1.00	0.95±0.30	0.83±0.40	Regülasyon yok
<i>deoB</i>	1.00	1.88±0.20	2.73±0.30	Az Up-regülasyon
<i>icd</i>	1.00	7.93±1.0	12.46±2.5	Up-regülasyon
<i>kduD</i>	1.00	88.35±6.3	212.70±53.9	Çok Up-regülasyon
<i>kduI</i>	1.00	142.17±17.2	344.90±42.28	Çok Up-regülasyon
<i>sodA</i>	1.00	24.89±3.9	37.97±2.79	Çok Up-regülasyon
<i>lamB</i>	1.00	0.13±0.10	0.07±0.0	Down-regülasyon
<i>gatY</i>	1.00	1.08±0.20	1.78±1.07	Regülasyon yok
<i>tdcE</i>	1.00	0.94±0.40	1.49±0.60	Regülasyon yok
<i>tufI</i>	1.00	0.11±0.03	0.11±0.10	Down-regülasyon
<i>aceE</i>	1.00	1.36±0.10	1.12±0.25	Regülasyon yok
<i>ompR</i>	1.00	7.54±1.54	20.36±1.69	Up-regülasyon

Çizelge 4.3. Çalışılan genlerin zamana bağlı bor ortamında göreceli mRNA seviyelerinin artış veya azalış katları

mRNA seviyesi Gen ismi	0 mM	70 mM_10'	70 mM_30'	70 mM_60'
<i>yfeS</i>	1.00	3.67±0.05	2.91±0.23	1.67±0.18
<i>ylaC</i>	1.00	4.84±0.62	2.20±0.57	0.92±0.17
<i>torR</i>	1.00	1.89±0.27	1.32±0.42	0.84±0.01
<i>garP</i>	1.00	3.63±0.18	2.13±0.64	0.99±0.05
<i>dinJ</i>	1.00	2.48±0.10	1.12±0.18	0.93±0.16
<i>aceF</i>	1.00	2.32±0.50	1.58±0.70	4.03±1.5
<i>trmU</i>	1.00	1.12±0.16	1.16±0.23	0.98±0.04
<i>cheZ</i>	1.00	0.87±0.25	0.65±0.28	0.60±0.42
<i>glxK</i>	1.00	2.38±0.42	0.41±0.05	0.51±0.15
<i>nohA</i>	1.00	0.59±0.23	0.36±0.01	0.39±0.08
<i>trpR</i>	1.00	0.64±0.04	0.37±0.05	0.30±0.06
<i>ygaV</i>	1.00	2.24±0.02	0.43±0.06	0.62±0.37
<i>galS</i>	1.00	1.15±0.38	1.55±0.45	1.25±0.91
<i>yoaC</i>	1.00	9.15±0.99	3.54±0.08	0.35±0.10
<i>rcnB</i>	1.00	0.80±0.27	0.75±0.13	0.97±0.25
<i>yddE</i>	1.00	0.21±0.08	0.08±0.01	0.50±0.08
<i>aroK</i>	1.00	0.61±0.30	0.29±0.09	0.45±0.24
<i>talB</i>	1.00	0.83±0.40	0.62±0.30	1.33±0.30
<i>deoB</i>	1.00	2.73±0.30	1.07±0.10	0.87±0.20
<i>icd</i>	1.00	12.46±2.5	14.23±4.1	3.64±1.3
<i>kduD</i>	1.00	212.70±53.9	167.90±85.8	150.57±17.9
<i>kduI</i>	1.00	344.90±42.28	581.50±166.17	200.79±48.39
<i>sodA</i>	1.00	37.97±2.79	31.63±5.13	3.39±1.93
<i>lamB</i>	1.00	0.07±0.0	0.05±0.0	0.19±0.10
<i>gatY</i>	1.00	1.78±1.07	0.50±0.16	1.08±0.25
<i>tdcE</i>	1.00	1.49±0.60	0.22±0.20	0.25±0.20
<i>tufI</i>	1.00	0.11±0.10	0.11±0.0	0.11±0.10
<i>aceE</i>	1.00	1.12±0.25	0.30±0.16	3.99±1.04
<i>ompR</i>	1.00	20.36±1.69	2.98±0.61	8.21±1.48

Not edilmelidir ki bu sonuçlar Real-Time PCR analizini sonucunda göreceli mRNA seviye farklılıklarını ifade etmektedir. Her bir genin hücre içerisindeki göreceli mRNA miktarını (relative mRNA abundance) göstermemektedir. Yani genler arasında hangi genin daha fazla ifade edildiği, hangi genin daha az ifade edildiğini bilmek başka bir konudur. Daha önce yapılan proteomik analizlerinde *tufI* geninin kodladığı proteinin miktarının arttığı gösterilmiştir. Ancak mRNA seviyesine baktığımızda aynı artış görülmemiş, aksine mRNA seviyesinde test edilen bor konsantrasyonu ve zaman aralıklarında bir azalış görülmüştür. Deneyin tekrarlanmasına rağmen aynı sonucun görülmesi, *tufI* geninin bora cevabının translasyon ile ilgili olabileceği yorumunu doğurmuştur. Tabii bunu kesin olarak belirlemek için birçok başka deneye ihtiyaç vardır. Bu ve benzeri bulgular bize genlerin Ct değerlerine başka bir yaklaşımla da irdelememizi sağlamıştır. Şöyle ki,

örneğin daha önce yapılan çalışmalarda Keio mutantlarından *talB* ve *nohA* mutantlarının bora karşı hipersensitif olmasına rağmen, regülasyonlarının etkilenmemesi acaba bu genlerin normalde ifade edilip edilmediğini düşündürmüştür. Ct değerleri incelendiğinde, *talB*'nin Ct değerinin 18 civarında olması bu genin ifade edildiği kanısını oluşturmuştur. Yani tam olarak olmasa da, genlerin göreceli Ct değerlerinin ifade seviyelerini en azından kalitatif olarak yansıtabileceği düşünüldüğü için, aşağıda Ct değeri çoktan aza doğru sıralanarak bu rapora dahil edilmiştir.

Primerlerin bağlanma dinamikleri ve amplifikasyon durumları aynı olarak kabul edildiği takdirde, farklı deneylerden elde edilen Ct değerlerine göre azdan çoğa; göreceli mRNA seviyelerine göre çoktan aza doğru sıralanış şu şekildedir:

16SrRNA geni (Ct ~8; 1/100 dilüsyon) > *tufI* (Ct ~17-19) > *kduI* (Ct ~17-25) > *talB* (Ct ~18) > *kduD* (Ct ~19-25) > *aceF* (Ct ~20) > *dinJ* (Ct ~21-23) > *sodA* (Ct ~21-26) > *aceE* (Ct ~22-23) > *tdcE* (Ct ~23-24) > *trmU* (Ct ~23-25) > *ylaC* (Ct ~23-25) > *rcnB* (Ct ~25) > *yoaC* (Ct ~25-27) > *trpR* (Ct ~25-27) > *yfeS* (Ct ~25-27) > *icd* (Ct ~25-29) > *torR* (Ct ~26-28) > *gatY* (Ct ~26-29) > *yddE* (Ct ~27) > *galS* (Ct ~27-28) > *garP* (Ct ~27-29) > *cheZ* (Ct ~29-31) > *lamB* (Ct ~29-34) > *nohA* (Ct ~30-32) > *ompR* (Ct ~30-34) > *glxK* (Ct ~32) > *aroK* (Ct ~34-36) > *deoB* (Ct ~35-36) > *ygaV* (Ct ~35-37).

16SrRNA geninin analizi için cDNA 1/100 dilüsyona uğratılırken, diğer genler için 1/5 dilüsyona uğratılmıştır.

Real-Time PCR sonuçlarından önemli yorumlar elde edilmiştir. Bunlardan en dikkat çeken *kduD* ve *kduI* genlerinin bora cevapta yüksek seviyede ifade edilmeleridir. Bu iki genin yüz kat üzerinde bir seviyede cevap vermeleri oldukça ilginçtir. Bu sonuçlar görüldükten sonra, deneyler tekrar tekrar yapılmıştır ve *kduD* ve *kduI*'nin gerçekten de bora çok yüksek seviyede cevap verdiği teyit edilmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda bu iki geni yöneten promotor üzerine gidilmesi düşünülmektedir. *sodA*'nın cevap vermesi ise beklenen bir durum olup, borik asit stresinin oksidatif strese katkı sağlayarak bu genin (ve proteinin) hücre içerisindeki miktarını arttırabileceği yorumuna neden olmuştur.

ΔyocC mutantının bor ortamında hipersensitif olması ve aynı zamanda yabancıl tip *E. coli* suşunun bora cevabında 70 mM borik asit ortamında 10 dakika içinde *yocC* geninin mRNA seviyesinin 9 kat artış göstermesi diğer ilgi çekici bir bulgudur. Daha önceki proteomik çalışmalarında belirlenen OmpR proteinini kodlayan *ompR* geninin, mRNA seviyelerinin bor eklendiğinde artması (~7-20 kat) bu genin de bora karşı hücrel cevapta rol alabileceği ihtimalini güçlendirecek bir kanıt sunmuştur. *icd* geninin mRNA seviyelerinin de farklı bor konsantrasyonlarında değiştiği (8-14 kat fark), yani bora karşı hücrel cevapta bir ilgisinin olabileceği, gen ekspresyon deneylerinde de gösterilmiştir. Diğer genlerin ekspresyon seviyelerinde ya değişim gözlenmemiş ya da göreceli olarak az regülasyonun olabileceği yorumlanmıştır.

Çalışmamızda tespit edilen gen bilgilerinin bor toleransı ile doğrudan veya dolaylı ilişkisinin anlaşılabilmesi ve uygun biyolojik hipotezlerin kurulabilmesi ve açıklamaların yapılabilmesi için tekrar detaylı şekilde literatür taraması yapılmıştır. Öncelikle genlerin her biri değerlendirilerek aktiviteleri incelenmiştir ve genler hakkında bilgiler elde edilmiştir. Ardından birbirleri ile ilişkili olabilecek genler tespit edilmiştir. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanı taranılarak hücre içerisinde nasıl bir yolak izleyebilecekleri araştırılmıştır.

4.5. NMR Çalışmaları Sonucu Tespit Edilen Metabolitler

AG1(pCA24N::*aceK*) suşu ve *E. coli* (DH10b) suşu ile yapılan ¹H- NMR deneyleri sonucu seviyeleri artan ve azalan metabolitler belirlenmiştir.

E. coli(DH10b) suşunun borik asit ortamında Oxypurinol, Uracil, Xanthine, Glucarate, Putrescine, Thymine, Galactonate, Hypoxanthine, Maleate, Adenosine, Pantothenate, 1,6-Anhydro-β-D-glucose, Galactarate, Nicotinate, Nicotinurate, Pyridoxine, Thymidine, Uridine, Xanthosine metabolitlerinin seviyeleri artmıştır. Seviyeleri azalan metabolitler ise Inosine, Niacinamid, Saccharopine, Glycine ve Lactate'dır (Çizelge 4.4.).

Bor stresi altında indüklenen metabolik yolların bulunabilmesine yardımcı olması amacıyla, artan ve azalan metabolit seviyeleri NMR yaklaşımıyla tespit edilmiştir. Bulgular bölümünde göreceli metabolit konsantrasyonları mM olarak verilmiştir.

Burada ise bora bağı olarak artış ve azalış kat farkı (fold difference) olarak hesaplanmıştır. Bunun için borik asit içermeyen besi ortamında yetiştirilen bakteri hücrelerindeki metabolit konsantrasyonu “1” olarak alınmış ve diğer konsantrasyonlar buna göre normalize edilerek, artan/azalan kat oranları bulunmuştur.

Çizelge 4.4. DH10b suşundaki metabolitlerin göreceli artış ve azalış oranları

Metabolit adı		0 mM ^a	25 mM ^a	75 mM ^a	100 mM ^a
Adenosine	↑ ^b	1 ^c	10.49	27.26	58.33
Galactonate	↑	1	6.61	15.77	22.06
Hypoxanthine	↑	1	12.70	12.15	26.80
Pantothenate	↑	1	10.48	6.29	9.47
Oxypurinol	↑	1	1.63	6.06	6.23
Putrescine	↑	1	4.44	5.84	6.69
Uracil	↑	1	1.67	4.08	8.04
Maleate	↑	1	0.86	3.23	5.45
Glucarate	↑	1	3.35	3.20	5.76
Thymine	↑	1	1.49	3.08	2.68
Xanthine	↑	1	1.18	1.63	2.11
1.6-Anhydro-β-D-glucose	↑	-	0.00	0.44	0.78
Galactarate	↑	-	0.25	0.57	1.49
Nicotinate	↑	-	0.00	0.98	1.32
Nicotinurate	↑	-	0.82	0.93	0.59
Pyridoxine	↑	-	-	0.16	0.27
Thymidine	↑	-	-	0.15	0.33
Uridine	↑	-	-	0.52	1.01
Xanthosine	↑	-	-	0.36	0.72
Inosine	↓ ^d	0.39 ^e	- ^f	-	-
Niacinamid	↓	1 ^c	0.70	0.25	0.20
Saccharopine	↓	1	0.02	0.00	0.00
Glycine	↓	1	0.43	0.49	0.64
Lactate	↓	1	0.60	0.38	0.29

^a Besi ortamında kullanılan mM borik asit konsantrasyonunu göstermektedir.

^b Metabolit seviyesinin arttığını, ^d azaldığını simgelemektedir.

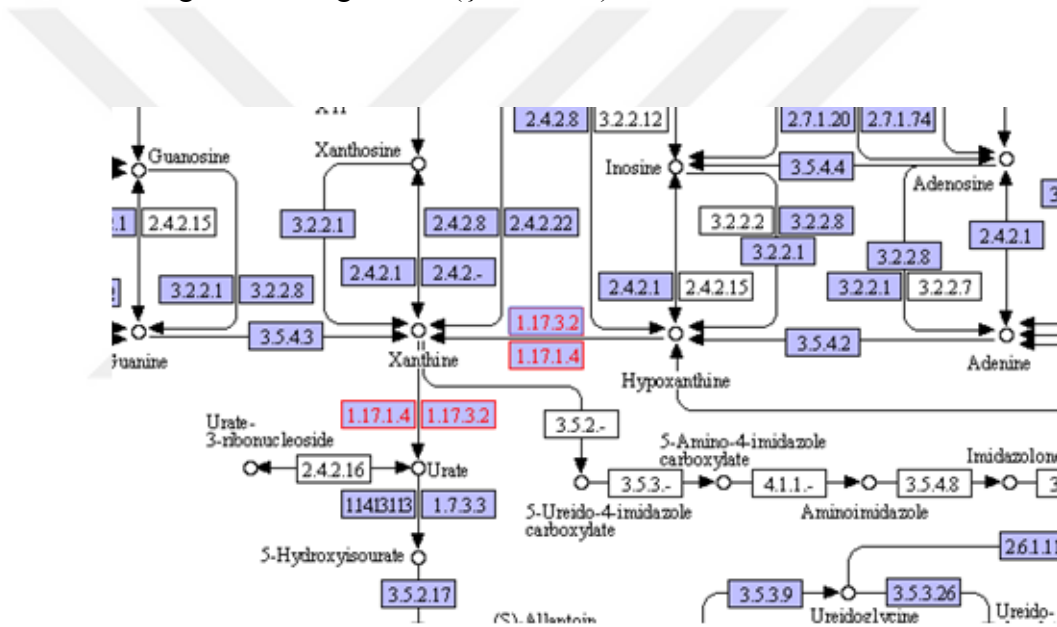
^c Borik asit içermeyen (0 mM) besi ortamında yetiştirilen hücrelerin metabolit seviyeleri 1 olarak normalize edilmiş ve göreceli artış (fold difference) rakamlarla ifade edilmiştir.

^e Bu metabolitlerin seviyeleri normalize edilmemiştir. Borik asit arttığında tespit edilememiştir. Rakamsal değerler mM seviyeleri temsil etmektedir.

^f Metabolit tespit edilmemiştir.

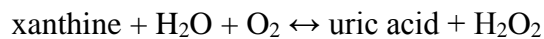
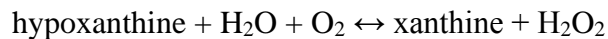
DH10b suşunda bariz olarak konsantrasyonu artan metabolitlerden galactonate (~6-22 kat) ve glucarate (~3-6 kat) ilgi çekicidir. Çünkü proteomik ve gen ekspresyon çalışmalarından bulduğumuz KduI ve KduD aktiviteleri bu metabolitlerin yer aldığı yollarda görev almaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda özellikle HPLC ve benzer deneylerle bu metabolitlerin seviyelerinin ölçülmesinin faydalı olacağını öneriyoruz. Borik asit stresi ile glucuronate-pentoz fosfat-aldehid metabolik yollarının bir bağlantısı olabilir (“Pentose and glucuronate interconversions” ve “Ascorbate and aldehidate metabolism”).

Bor stresine bağlı olarak Adenozin miktarının artması (~10-58 kat) enerji ihtiyacı ile bağlantılı olabilir. Hipoksantin seviyesinin artması pürin metabolizmasının yeniden düzenlendiği anlamına gelebilir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Hipoksantin molekülünün purin metabolizmasındaki yeri

Oksipurinolun seviyesi (~1,6-6 kat) de bor stresine bağlı olarak artmıştır. Yapılan bir çalışmada, oksipurinolün “xanthine oxidase” enziminin inhibitörü olduğu belirtilmiştir (Sokol vd., 1998). Yukarıdaki metabolik yolda (Şekil 4.15.) görüldüğü üzere, xanthine dehydrogenase/oxidase (EC:1.17.1.4 ve 1.17.3.2) enzimi hipoksantini ksantine ksantini de ürik aside okside etmektedir. Bu reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir.



Xanthine oksidaz enziminin, memelilerde hidrojen peroksit ve oksijen radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturduğu bilinmektedir (Ardan vd., 2004). Çalışmamızda bulunan ve seviyesi artan oksipurinol molekülünün bu şekilde bu enzimi inhibe ederek ROS oluşumunu engellediği düşünülebilir. Oksipurinol molekülünün *E. coli*'de borik asit stresine bağlı olarak göreceli olarak nasıl yüksek seviyelerde üretildiği bilinmemektedir. İlerleyen çalışmalarda bu konu da araştırılabilir.

Putrescine seviyesi de bor stresine bağlı olarak (~4-6 kat) artmıştır. *E. coli*'de en çok bulunan poliaminlerden bir tanesi putrescine molekülüdür. Putrescine molekülünün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber bitkide oksidatif strese karşı dirençte rol oynadığı belirtilmiştir (Durmu ve Kadioğlu, 2005). Ayrıca *E. coli*'de transkripsiyon faktörleri dahil birçok genin translasyonunu sitümüle ettiği, dolaylı olarak da yaklaşık üçyüz geni etkilediği bildirilmiştir (Terui vd., 2009; Yoshida vd., 2004). Putrescine katabolizmasının *E. coli*'de birkaç farklı strese karşı metabolik bir cevap olarak kullanıldığı ve RpoS üzerinden etkisinin olabileceği rapor edilmiştir (Schneider vd., 2013)

Saccharophine molekülü her iki suşta da artan borik asit konsantrasyonlarında azalmış veya yok olmuştur. Saccharophine yolağının bitkiler ve hayvanlarda lizin aminoasit seviyelerinin ayarlanması ve stres cevabı ile ilgili olduğu bilinmektedir (Arruda vd., 2000). L-lizin aminoasiti alfa-keto-glutarat ile birleşerek NAD(P)H varlığında saccharophine dönüştürülür. Daha sonra saccharophine alfa-amino-adipik-semi aldehit (AASA) toksik molekülüne dönüştürülür. Bazı canlılarda AASA'nın L-pipecolate molekülüne dönüştürüldüğünü ve bu molekülün de osmoprotektan olduğu iddia edilmektedir. Yapılan bir genom boyu analizde lizinin AASA'ye dönüşüm yolağının osmotik strese karşı dirençte rol alabileceği tavsiye edilmiştir (Neshich vd., 2013).

Pantothenate B5 vitamini olup ko-enzim A (CoA)'nın sentezinde görevlidir. CoA ise TCA döngüsü gibi birçok karbon metabolizmasında rol alan bir bileşiktir (Voet vd., 2006).

AG1(pCA24N::*aceK*) suşu için borik asit ortamında Adenine, Galactarate, Gluconate, Glutamate, Guanidoacetate, Guanosine, Inosine, Lactulose, Oxypurinol, Putrescine, Pyroglutamate (5-Oxoproline), Threonine, Uridine metabolitlerinin seviyeleri artmış, Erythritol ve Saccharopine metabolitlerinin seviyelerinin azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. AG1(pCA24N::*aceK*) suşundaki metabolitlerin göreceli artış ve azalış oranları

Metabolit adı		0 mM ^a	25 mM ^a	75 mM ^a	100 mM ^a
Adenine	↑ ^b	1 ^c	3.1	4.6	3.3
Galactarate	↑	1	1.4	4.6	0.8
Gluconate	↑	1	0.8	1.3	2.2
Glutamate	↑	1	1.37	1.97	1.98
Guanidoacetate	↑	1	1.3	1.8	2.2
Guanosine	↑	1	1.3	7.5	6.3
Inosine	↑	1	1.6	4.9	4.3
Lactulose	↑	1	2.2	2.7	2.0
Oxypurinol	↑	1	1.80	1.14	1.23
Putrescine	↑	1	6.6	9.2	6.9
Pyroglutamate	↑	1	9.8	7.3	5.6
Threonine	↑	-	7.3	12.1	16.1
Uridine	↑	-	8.3	10.9	9.4
Erythritol	↓ ^d	3.37 ^e	- ^f	-	-
Saccharopine	↓	2.17 ^e	-	-	-

^a Besi ortamında kullanılan mM borik asit konsantrasyonunu göstermektedir.

^b Metabolit seviyesinin arttığını, ^d azaldığını simgelemektedir.

^c Borik asit içermeyen (0 mM) besi ortamında yetiştirilen hücrelerin metabolit seviyeleri 1 olarak normalize edilmiş ve göreceli artış (fold difference) rakamlarla ifade edilmiştir.

^e Bu metabolitlerin seviyeleri normalize edilmemiştir. Borik asit arttığında tespit edilememiştir. Rakamsal değerler mM seviyeleri temsil etmektedir.

^f Metabolit tespit edilmemiştir.

AG1(pCA24N::*aceK*) suşunun 120 mM borik asit içeren LB besi ortamında büyüebilmesinin ve bu kadar bor stresine karşı hücreye nasıl bir avantaj sağladığının nedeni bilinmemektedir. NMR analizine dayalı olarak tüm metabolitleri tespit etmek bazı limitasyonlardan dolayı mümkün değildir. Özellikle ¹H-NMR'ı çoğu metaboliti tespit etmede yetersiz kalabilmektedir. Bazı metabolitleri daha net belirlemek için 2D-NMR (¹³C-¹H-NMR) yaklaşımına başvurulmasını öneriyoruz. Ancak tespit edilen metabolitlerin artış veya azalış paterni üzerinden bir karşılaştırma

yapılarak, AceK proteinin bakteri metabolizması üzerindeki etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. *aceK* ekspresyonunun borik asit stresi altında metabolit regülasyonu üzerine etkisi

Metabolit adı	DH10b	pCA24N:: <i>aceK</i>	
1,6-Anhydro-β-D-glucose	↑	-	
Adenine	-	↑	
Adenosine	↑	↔	*
Erythritol	-	↓	
Galactarate	↑	↑	
Galactonate	↑	-	
Glucarate	↑	-	
Gluconate	-	↑	
Glycine	↓	↔	*
Guanidoacetate	↑	↑	
Guanosine	-	↑	
Hypoxanthine	↑	-	
Inosine	↓	↑	**
Lactate	↓	-	
Lactulose	-	↑	
Maleate	↑	↑	
Niacinamide	↓	↑	
Nicotinate	↑	↔	*
Nicotinurate	↑	-	
Oxypurinol	↑	↑	
Pantothenate	↑	↔	*
Putrescine	↑	↑	
Pyridoxine	↑	↔	*
Pyroglutamate	-	↑	
Saccharopine	↓	↓	
Threonine	-	↑	
Thymidine	↑	↔	*
Thymine	↑	↔	*
Uracil	↑	↔	*
Uridine	↑	↑	
Xanthine	↑	↔	*
Xanthosine	↑	↔	*

Artan borik asit stresine bağlı metabolit konsantrasyonundaki artış (↑), azalış (↓), değişmemiş (↔) ve tespit edilememiş veya bilinmeyen (-) durumları gösterilmiştir.
*farklı paternlerden üzerinde durulması gerekenleri temsil etmektedir.

İki suştan elde edilen metabolik veriler incelendiğinde, borik asite bağlı olarak, Oxypurinol, Putrescine, Galactarate, Guanidoacetate, Maleate ve Uridine metabolitlerinin miktarlarının arttığı onaylanmıştır. Saccharopine molekülünün her iki suşta azaldığı görülmüştür. İki suş arasında birbirine zıt artış azalış paterninde olan moleküller Inosine ve Niacinamide molekülleridir. Çizelge 4.6.'daki veriler bundan sonraki çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır.

4.6. Yorum

Bu tez çalışmasında, bakterinin bor stresine karşı oluşturduğu yanıtın anlaşılabilmesi için genomik, proteomik, metabolomik ve gen ekspresyon analizlerini içeren yaklaşımlar kullanılmıştır. Bu yaklaşımlar sonucu elde edilen gen bilgileri, proteinler ve metabolitler ile bor toleransında görev alan mekanizmalara dair ışık tutulması amaçlanmıştır.

Kabaca bir sınıflandırma yapıldığında, hücrenin enerji metabolizmasında görev alan genlerden *aceF*, *aceE*, *pykF*, *fbaA*, *pgk*, *talB*, *tdcE*, *mdh*, *icd*, *aceK*, *gapA*, *deoB* genleri tespit edilmiş olup, bora karşı tolerans sağlamada, bu genlerin fazla ifade edilmesi sonucu, hücrenin enerji ve karbon kaynağı sağlayıp yaşamayı devam ettirdiği düşünülmektedir.

Pentoz ve glukuronat dönüşüm metabolizmasında görev alan *ulaB*, *sgbE*, *kduD*, *kduI* genleri belirlenmiş ve bor toleransında bu genlerin aşırı ifade edilmesinin etkileri daha fazla araştırılmalıdır. *paaE*, *tnaC*, *dtd*, *trmM*, *talB*, *cysK*, *aroK*, *yfiC*, *trmU* genlerinin aminoasit biyosentezinde yer aldığı görülmüştür.

Elde edilen *miaB*, *ugpC*, *malE*, *ydeE*, *yfcT*, *arsB*, *ompA* genleri ile ilgili bilgilerin bor ve transport aktiviteleri arasındaki doğrudan ve dolaylı ilişkilere dair ipuçları sunacağı düşünülmektedir. Bu genlerin ifade ettiği proteinlerin non-spesifik olarak boru hücre dışına atıp atmadığının daha spesifik deneylerle araştırılması önerilmektedir.

recQ, *yaiB*, *yicR* ve *rep* genlerinin rekombinasyon, replikasyon veya DNA tamiri ile ilgili olduğu görülmüştür. Burada fazla borun hücre DNA'sını etkilediği ve bazı tamir genlerinin bakterinin toleransını bu şekilde arttırdığı akla gelmektedir.

Ayrıca *yeeY*, *nusB*, *nusE*, *malI*, *ytfA*, *gatR* ve *idnR* gen ürünlerinin transkripsiyonda görev aldığı, *prfH* *yhdL* gen ürünlerinin ise translasyonda görev aldığı bilinmektedir.

bdm, *yceP*, *yddV* ve *elfC* genlerinin biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu görülmüştür. Bakterinin borik asit ortamında biyofilm oluşturduğu ve stresten bu şekilde korunduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen genlerin görev aldıkları metabolizmalar kabaca sınıflandırılmış ve Çizelge 4.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Elde edilen genlerden bazılarının hücrede görev aldıkları yerler

Enerji metabolizması	<i>aceK, aceF, aceE, aceA, pykF, pgk, talB, tdcE, mdh, icd, gapA, deoB, atpA, fbaA</i>
Amino asit biyosentezi	<i>paaE, tnaC, dtd, trmM, talB, cysK, aroK, yfiC, trmU</i>
DNA, RNA, transkripsiyon, translasyon	<i>recQ, yaiB, yicR, rep, yeeY, nusB, nusE, mall, ytfA, gatR, idnR, prfH yhdL, tsf, lacI, dinJ, torR, ygaV, trpR, nohA, galS, TufI</i>
Fosfoenolpiruvat-bağımlı fosfotransferaz sistemi (PTS)	<i>ptsA, sgcA, yadI, ydiA</i>
Pentoz ve glukuronat metabolizması	<i>ulaB, sgbE, kduD, kduI</i>
Glutasyon metabolizması	<i>yfjU, ydhD, cobT</i>
Chaperone	<i>cbpM, hypC, elfC</i>
Transporter	<i>mIaB, ugpC, malE, ydeE, yfcT, arsB, ompA, lamB, yrbB, garP, yohN</i>
Lipopolisakkarit (LPS) biyosentezi	<i>rfaQ (waaQ)</i>
Biyofilm oluşumu	<i>bdm, yceP, yddV ve elfC</i>
Ubiquinone metabolizması	<i>menD, ytfG,</i>
Galaktoz metabolizması	<i>gatD, gatY, sgcA</i>
Toksin-antitoksin sistemleri	<i>yjhX, chpS, dinJ</i>
Aktiviteyi bilinmeyen genler	<i>yjcF, ymdE, ydeE, prfH, yeaC, yeeT, yfjL, yfjU, yqeK, yhiJ, yifB, sgcQ, yhcE, ymdE, yoeF, arpB, ygeM, ymfP, ygcU, yadI, yfcT, yeiQ, yddK, yedL, yecF, ylaC, ygaV, yoaC, yfjK</i>

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, genomik, proteomik, gen ekspresyonu ve metabolomik yaklaşımlarıyla oldukça yoğun çalışmalar yapılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. 4123 gen genom boyu tarama yaklaşımıyla taranmış, yüzlerce protein proteomik analizi ile araştırılmış, onlarca genin bor ortamında gen ekspresyon seviyelerine bakılmış ve yüzlerce metabolit arasından NMR yaklaşımıyla bor ile ilgili metabolitler tespit edilmiştir. Alanında ilk olan, birçok önemli veriyi üreten bu tez çalışmasında, öngörülen bütün hedeflere ulaşılmış ve başarılı bir şekilde sonlandırılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J., Matin, A. (2006) Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 188 (9): 3371-81.
- Ahmed, I., Yokota, A., Fujiwara, T. (2007) A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth, *Extremophiles*, 11: 217-224.
- Al Mamun, A.A., Lombardo, M.J., Shee, C., Lisewski, A.M., Gonzalez, C., Lin, D., Nehring, R.B., vd., (2012) Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks, *Science*, 338 (6112): 1344-8.
- Altieri, A.S., Mazzulla, M.J., Zhou, H., Costantino, N., Court, D.L., Byrd, R.A. (1997) Sequential assignments and secondary structure of the RNA-binding transcriptional regulator NusB, *FEBS Lett*, 415 (2): 221-6.
- Altieri, A.S., Mazzulla, M.J., Horita, D.A., Coats, R.H., Wingfield, P.T., Das, A., Court, D.L., vd., (2000) The structure of the transcriptional antiterminator NusB from *Escherichia coli*, *Nat Struct Biol*, 7(6): 470-4.
- Amoroso, M.J., Benimeli, C.S., Cuzzo, S.A. (2013) *Streptomyces from Soils Contaminated with Boron Compounds* Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial enzymes, 1. Baskı, 9. Bölüm, CRC Press.
- Anderson, G.R., Jordon, J.V. (1961) Boron: A Non-Essential Growth Factor for *Azotobacter Chroococcum*, *Soil Science*, 92: 113-116.
- Andrews, K.J., Lin, E.C. (1976) Thiogalactoside transacetylase of the lactose operon as an enzyme for detoxification, *J Bacteriol*, 128 (1): 510-3.
- Arai, M., Koizumi, Y., Sato, H., Kawabe, T., Sugauma, M., Kobayashi, H., Tomoda, H., Omura, S. (2004) Boromycin abrogates bleomycin-induced G2 checkpoint, *J Antibiot*, 57: 662-668.
- Arđan, T., Kovaceva, J., Cejkova, J. (2004) Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium, *Acta Histochemica*, 106 (1): 69-75.
- Arruda, P., Kemper, E.L., Papes, F., Leite, A. (2000) Regulation of lysine catabolism in higher plants, *Trends Plant Sci*, 5 (8): 324-30.
- Atkinson, J., Gupta, M.K., McGlynn, P. (2011) Interaction of Rep and DnaB on DNA, *Nucleic Acids Res*, 39 (4): 1351-9.
- Atkinson, J., Gupta, M.K., Rudolph, C.J., Bell, H., Lloyd, R.G., McGlynn, P. (2011) Localization of an accessory helicase at the replisome is critical in sustaining efficient genome duplication, *Nucleic Acids Res*, 39 (3): 949-57.

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Mol Syst Biol*, 2: 2006.0008.
- Baev, M.V., Baev, D., Radek, A.J., Campbell, J.W. (2006) Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays, *Applied microbiology and biotechnology*, 71 (3): 310–316.
- Baharoglu, Z., Petranovic, M., Flores, M.J., Michel, B. (2006) RuvAB is essential for replication forks reversal in certain replication mutants, *EMBO J*, 25 (3): 596-604.
- Baranov, P.V., Vestergaard, B., Hamelryck, T., Gesteland, R.F., Nyborg, J., Atkins, J.F. (2006) Diverse bacterial genomes encode an operon of two genes, one of which is an unusual class-I release factor that potentially recognizes atypical mRNA signals other than normal stop codons, *Biol Direct*, 1 (1): 28.
- Bardey, V., Vallet, C., Robas, N., Charpentier, B., Thouvenot, B., Mougin, A., Hajnsdorf, E., vd., (2005) Characterization of the molecular mechanisms involved in the differential production of erythrose-4-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 57 (5): 1265-87.
- Barnes, M.R., Duetz, W.A., Williams, P.A. (1997) A 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globerulus* PWD1: cloning and characterization of the hpp operon, *J Bacteriol*, 179: 6145-53.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D. (2004) Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, *Cancer Letters*, 216: 21-29.
- Barranco, W.T., Kim, D.H., Stella, S.L., Eckhert, C.D. (2009) Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells, *Cell Biology and Toxicology*, 25: 309-320.
- Barrios, A.F., Zuo, R., Ren, D., Wood, T.K. (2006) Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility, *Biotechnol Bioeng*, 93 (1): 188-200.
- Barth, R.F., Joensuu, H. (2007) Boron neutron capture therapy for the treatment of glioblastomas and extracranial tumours: As effective, more effective or less effective than photon irradiation?, *Radiotherapy and Oncology*, 82: 119-122.
- Barth, R.F., Soloway, A.H., Goodman, J.H., Gahbauer, R.A., Gupta, N., Blue, T.E., Yang, W., Tjarks, W. (1999) Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality, *Neurosurgery*, 44: 433-450; discussion 450-431.
- Battesti, A., Hoskins, J.R., Tong, S., Milanesio, P., Mann, J.M., Kravats, A., Tsegaye, Y.M., vd., (2013) Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein, *Genes Dev*, 27 (24): 2722-35.
- Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, C., Blais, T., Murray, E., Lowary, T., Conway, T. (1998) Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate

- metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 180 (14): 3704-10.
- Bausch, C., Ramsey, M., Conway, T. (2004) Transcriptional organization and regulation of the L-idonic acid pathway (GntII system) in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 186 (5): 1388-97.
- Beabout, K., Hammerstrom, T.G., Perez, A.M., Magalhaes, B.F., Prater, A.G., Clements, T.P., Arias, C.A., vd., (2015) The Ribosomal S10 Protein Is a General Target for Decreased Tigecycline Susceptibility, *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (9): 5561-6.
- Belogurov, G.A., Mooney, R.A., Svetlov, V., Landick, R., Artsimovitch, I. (2009) Functional specialization of transcription elongation factors, *EMBO J*, 28: 112-122.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A., vd., (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression, *Mol Microbiol*, 51 (3): 659-74.
- Benavente, R., Esteban-Torres, M., Kohring, G.W., Cortes-Cabrera, A., Sanchez-Murcia, P.A., Gago, F., Acebron, I., vd., (2015) Enantioselective oxidation of galactitol 1-phosphate by galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase from *Escherichia coli*, *Acta Crystallogr D Biol*, 71 (7): 1540-54.
- Benkovic, S.J., Baker, S.J., Alley, M.R., Woo, Y.H., Zhang, Y.K., Akama, T., Mao, W., vd., (2005) Identification of borinic esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases CcrM and MenH, *J Med Chem*, 48: 7468-7476.
- Berglechner, F., Richter, G., Fischer, M., Bacher, A., Gschwind, R.M., Huenges, M., Gemmecker, G., Kessler, H. (1997) Studies on the NusB protein of *Escherichia coli* expression and determination of secondary-structure elements by multinuclear NMR spectroscopy, *Eur J Biochem*, 248 (2): 338-46.
- Bergmiller, T., Ackermann, M., Silander, O.K. (2012) Patterns of evolutionary conservation of essential genes correlate with their compensability, *PLoS Genet*, 8 (6): e1002803.
- Bjornson, K.P., Amaratunga, M., Moore, K.J., Lohman, T.M. (1994) Single-turnover kinetics of helicase-catalyzed DNA unwinding monitored continuously by fluorescence energy transfer, *Biochemistry*, 33 (47): 14306-16.
- Bjornson, K.P., Moore, K.J., Lohman, T.M. (1996) Kinetic mechanism of DNA binding and DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* Rep helicase, *Biochemistry*, 35 (7): 2268-82.
- Bjornson, K.P., Wong, I., Lohman, T.M. (1996) ATP hydrolysis stimulates binding and release of single stranded DNA from alternating subunits of the dimeric *E. coli* Rep helicase: implications for ATP-driven helicase translocation, *J Mol Biol*, 263 (3): 411-22.
- Blank, L., Green, J., Guest, J.R. (2002) AcnC of *Escherichia coli* is a 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) that can use citrate and isocitrate as substrates, *Microbiology*, 148 (1): 133-46.

- Blankenhorn, D., Phillips, J., Slonczewski, J.L. (1999) Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis, *J Bacteriol*, 181 (7): 2209-16.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., vd., (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277: 1453-62.
- Blokesch, M., Rohrmoser, M., Rode, S., Bock, A. (2004a) HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation, *J Bacteriol*, 186 (9): 2603-11.
- Blokesch, M., Albracht, S.P., Matzanke, B.F., Drapal, N.M., Jacobi, A., Bock, A. (2004b) The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of (NiFe)-hydrogenases, *J Mol Biol*, 344 (1): 155-67.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaever, V., vd., (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity, *Cell*, 141 (1): 107-16.
- Bonilla, I., Garciagonzalez, M., Mateo, P. (1990) Boron Requirement in Cyanobacteria - Its Possible Role in the Early Evolution of Photosynthetic Organisms, *Plant Physiology*, 94: 1554-1560.
- Boronat, A., Britton, P., Jones-Mortimer, M.C., Kornberg, H.L., Lee, L.G., Murfitt, D., Parra, F. (1984) Location on the *Escherichia coli* genome of a gene specifying O-acetylserine (thiol)-lyase, *J Gen Microbiol*, 130 (3): 673-85.
- Borthwick, A.C., Holms, W.H., Nimmo, H.G. (1984) The phosphorylation of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase in intact cells, *Biochem J*, 222 (3): 797-804.
- Boubakri, H., Septenville, A.L., Viguera, E., Michel, B. (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo, *EMBO J*, 29 (1): 145-57.
- Bougdour, A., Gottesman, S. (2007) ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP, *Proc Natl Acad Sci*, 104 (31): 12896-901.
- Bougdour, A., Wickner, S., Gottesman, S. (2006) Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*, *Genes Dev*, 20 (7): 884-97.
- Boutigny, S., Saini, A., Baidoo, E.E., Yeung, N., Keasling, J.D., Butland, G. (2013) Physical and Functional Interactions of a Monothiol Glutaredoxin and an Iron Sulfur Cluster Carrier Protein with the Sulfur-donating Radical S-Adenosyl-L-methionine Enzyme MiaB, *J Biol Chem*, 288 (20):14200-11.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., Landini, P. (2006) Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose

- biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion, *J Bacteriol*, 188 (6): 2027-37.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., vd., (2002) Boron in Plant Biologyogy, *Plant Biologyogy*, 4: 205-223.
- Bugg, T.D. (1993) Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 120: 258-64.
- Bull, M.J., Plummer, N.T. (2014) Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease, *Integr Med (Encinitas)*, 13 (6): 17–22.
- Burlingame, R., Chapman, P.J. (1983) Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivative by *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 155 (1): 113-21.
- Burlingame, R.P., Wyman, L., Chapman, P.J. (1986) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants defective for phenylpropionate degradation, *J Bacteriol*, 168: 55-64.
- Butland, G., Babu, M., Diaz-Mejia, J.J., Bohdana, F., Phanse, S., Gold, B., Yang, W., vd., (2008) eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis, *Nature Methods*, 5 (9): 789-95.
- Cai, J., DuBow, M.S. (1997) Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA), *Biodegradation*, 8 (2): 105-11.
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S., Rosen, B.P. (1995) The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance, *J Bacteriol*, 177 (4): 981-6.
- Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., Abo, T. (2012) ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 86 (1): 37-50.
- Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., vd., (2010) Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system, *Mol Microbiol*, 78 (4): 796-808.
- Chae, C., Sharma, S., Hoskins, J.R., Wickner, S. (2004) CbpA, a DnaJ homolog, is a DnaK co-chaperone, and its activity is modulated by CbpM, *J Biol Chem*, 279 (32): 33147-53.
- Chatterjee, A., Li, Y., Zhang, Y., Grove, T.L., Lee, M., Krebs, C., Booker, S.J., vd., (2008). Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily, *Nat Chem Biol*, 4 (12): 758-65.
- Chen, A.I., Goulian, M. (2018) A network of regulators promotes dehydration tolerance in *Escherichia coli*, *Environ Microbiol*, 20 (3): 1283-1295.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron, *Nature*, 415: 545–549.
- Cheng, W., Hsieh, J., Brendza, K.M., Lohman, T.M. (2001) *E. coli* Rep oligomers are required to initiate DNA unwinding in vitro, *J Mol Biol*, 310 (2): 327-50.

- Chenoweth, M.R., Trun, N., Wickner, S. (2007) In vivo modulation of a DnaJ homolog, CbpA, by CbpM, *J Bacteriol*, 189 (9): 3635-8.
- Chenoweth, M.R., Wickner, S. (2008) Complex regulation of the DnaJ homolog CbpA by the global regulators sigmaS and Lrp, by the specific inhibitor CbpM, and by the proteolytic degradation of CbpM, *J Bacteriol*, 190 (15): 5153-61.
- Chintakayala, K., Grainger, D.C. (2011) A conserved acidic amino acid mediates the interaction between modulators and co-chaperones in enterobacteria, *J Mol Biol*, 411 (2): 313-20.
- Conter, A., Sturny, R., Gutierrez, C., Cam, K. (2002) The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazine-induced stress in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 184: 2850-2853.
- Cortay, J.C., Bleicher, F., Rieul, C., Reeves, H.C., Cozzone, A.J. (1988) Nucleotide sequence and expression of the aceK gene coding for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 170 (1): 89-97.
- Couce, A., Briales, A., Rodríguez, R. A., Costas, C., Pascual, A., Blázquez, J. (2012) Genomewide Overexpression Screen for Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*: MurA Confers Clinical Resistance at Low Fitness Cost, *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (5): 2767-9.
- Coughlin, J.R. (1998) Sources of human exposure - Overview of water supplies as sources of boron, *Biol Trace Elem Res*, 66: 87-100.
- Courcelle, C.T., Landstrom, A.J., Anderson, B., Courcelle, J. (2012) Cellular characterization of the primosome and rep helicase in processing and restoration of replication following arrest by UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 194 (15): 3977-86.
- Da Re, S., Valle, J., Charbonnel, N., Beloin, C., Latour-Lambert, P., Faure, P., Turlin, E., vd., (2013) Identification of commensal *Escherichia coli* genes involved in biofilm resistance to pathogen colonization, *PLoS One*, 8 (5): e61628.
- Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells, *Gene*, 6 (1): 23-28.
- Das, A. (1992) How the phage lambda N gene product suppresses transcription termination: communication of RNA polymerase with regulatory proteins mediated by signals in nascent RNA, *J Bacteriol*, 174 (21): 6711-6.
- Dell, B., Huang, L.B. (1997) Physiological response of plants to low boron, *Plant and Soil*, 193: 103-120.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I., Srebnik, M. (2002) Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms, *Plant Science*, 163: 931-942.
- Denhardt, D.T., Dressler, D.H., Hathaway, A. (1967) The abortive replication of Φ X174 DNA in a recombination-deficient mutant of *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci*, 57 (3): 813-20.

- Diaz, E., Ferrandez, A., Garcia, J.L. (1998) Characterization of the hca cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 180 (11): 2915-23.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., DuBow, M.S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria, *J Bacteriol*, 177 (8): 2050-6.
- Domka, J., Lee, J., Wood, T.K. (2006) YliH (BssR) and YceP (BssS) Regulate *Escherichia coli* K-12 Biofilm Formation by Influencing Cell Signaling, *Applied and Environ Microbiol*, 72 (4): 2449-59.
- Donne, J., Van Kerckhoven, M., Maes, L., Cos, P., Dewilde, S. (2016) The role of the globin-coupled sensor YddV in a mature *E. coli* biofilm population, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864 (7): 835-9.
- Dordas, C., Brown, P.H. (2000) Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting, *J Membr Biol*, 175: 95-105
- Dougherty, M.J., Downs, D.M. (2006) A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*, *Microbiology*, 152 (8): 2345-53.
- Durmu, N., Kadioğlu, A. (2005) Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves, *Acta Physiol Plant*, 27: 515–522.
- Eckhert, C.D. (1998) Boron stimulates embryonic trout Growth, *Journal of Nutrition*, 128: 2488-2493.
- Ehira, S., Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009) Regulation of quinone oxidoreductase by the redox-sensing transcriptional regulator QorR in *Corynebacterium glutamicum*, *J Biology Chem*, 284 (25): 16736–16742.
- Elewski, B.E., Tosti, A. (2014) Tavaborole for the treatment of onychomycosis, *Expert Opin Pharmacother*, 15 (10): 1439-48.
- el-Mansi, E.M., MacKintosh, C., Duncan, K., Holms, W.H., Nimmo, H.G. (1987) Molecular cloning and over-expression of the glyoxylate bypass operon from *Escherichia coli* ML308, *Biochem J*, 242 (3): 661-5.
- Felzenszwalb, I., Boiteux, S., Laval, J. (1992) Molecular cloning and DNA sequencing of the radC gene of *Escherichia coli* K-12, *Mutat Res*, 273 (3): 263-9.
- Ferenci, T. (1980) The recognition of maltodextrins by *Escherichia coli*, *Eur J Biochem*, 108 (2): 631-6.
- Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., vd., (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase, *J Biol Chem*, 280 (26): 24544-52.
- Fimmel, A.L., Loughlin, R.E. (1977) Isolation and characterization of cysK mutants of *Escherichia coli* K12, *J Gen Microbiol*, 103 (1): 37-43.

- Flores, N., de Anda, R., Flores, S., Escalante, A., Hernandez, G., Martinez, A., Ramirez, O.T., Gosset, G., Bolivar, F. (2004) Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, *J Mol Microbiol*, 8: 209-221.
- Fontecave, M., Eliasson, R., Reichard, P. (1987) NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase, *J Biol Chem*, 262 (25): 12325-31.
- Fort, D.J. (2002) Boron deficiency disables *Xenopus laevis* oocyte maturation events, *Biol Trace Elem Res*, 85: 157-169.
- Francez-Charlot, A., Castanie-Cornet, M.P., Gutierrez, C., Cam, K. (2005) Osmotic regulation of the *Escherichia coli* bdm (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay, *J Bacteriol*, 187 (11): 3873-7.
- Frommer, W.B., von Wiren, N. (2002) Plant Biologyogy: Ping-pong with boron, *Nature*, 420: 282-283.
- Fuentes, D.E., Fuentes, E.L., Castro, M.E., Perez, J.M., Araya, M.A., Chasteen, T.G., Pichuantes, S.E., vd., (2007) Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite, *J Bacteriol*, 189 (24): 8953-60.
- Gallardo-Williams, M.T., Chapin, R.E., King, P.E., Moser, G.J., Goldsworthy, T.L., Morrison, J.P., Maronpot, R.R. (2004) Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice, *Toxicologic Pathology*, 32: 73-78.
- Gao, Y., Peng, X., Zhang, J., Zhao, J., Li, Y., Li, B., Hu, Y., vd., (2013) Cellular response of *E. coli* upon Hg²⁺ exposure--a case study of advanced nuclear analytical approach to metalloproteomics, *Metallomics*, 5 (7): 913-9.
- Garbe, T.R., Kobayashi, M., Yukawa, H. (2000) Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity, *Arch Microbiol*, 173 (1): 78-82.
- Garrido-Pertierra, A., Cooper, R.A. (1983) Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *Escherichia coli* K-12, *FEBS Lett*, 162 (2): 420-2.
- Gibriel, A.Y., Doelle, H.W. (1975) Investigation into pyruvate kinases from *Escherichia coli* K-12 grown under aerobic and anaerobic conditions, *Microbios*, 12 (50): 179-97.
- Gish, K., Yanofsky, C. (1995) Evidence suggesting cis action by the TnaC leader peptide in regulating transcription attenuation in the tryptophanase operon of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 177 (24): 7245-54.
- Glebes, T.Y., Sandoval, N.R., Gillis, J.H., Gill, R.T. (2015) Comparison of genome-wide selection strategies to identify furfural tolerance genes in *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng*, 112 (1): 129-40.
- Goldbach, H.E., Wimmer, M.A. (2007) Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure?, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 170: 39-48.
- Gollnick, P., Yanofsky, C. (1990) tRNA(Trp) translation of leader peptide codon 12 and other factors that regulate expression of the tryptophanase operon, *J Bacteriol*, 172 (6): 3100-7.

- Golovina, A.Y., Sergiev, P.V., Golovin, A.V., Serebryakova, M.V., Demina, I., Govorun, V.M., Dontsova, O.A. (2009) The yfiC gene of *E. coli* encodes an adenine-N6 methyltransferase that specifically modifies A37 of tRNA^{1Val}(cmo⁵UAC), *RNA*, 15 (6): 1134-41.
- Gong, F., Ito, K., Nakamura, Y., Yanofsky, C. (2001) The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA(Pro), *Proc Natl Acad Sci*, 98 (16): 8997-9001.
- Gong, F., Yanofsky, C. (2002) Analysis of tryptophanase operon expression in vitro: accumulation of TnaC-peptidyl-tRNA in a release factor 2-depleted S-30 extract prevents Rho factor action, simulating induction, *J Biol Chem*, 277 (19): 17095-100.
- Gong, M., Cruz-Vera, L.R., Yanofsky, C. (2007) Ribosome recycling factor and release factor 3 action promotes TnaC-peptidyl-tRNA Dropoff and relieves ribosome stalling during tryptophan induction of tna operon expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 189 (8): 3147-55.
- Gökcan, B.H. (2015) *Bor madenlerinden izole edilmiş bor toleransı yüksek bir Pseudomonas izolatının proteomik analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 95s.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. (1984) *Chemistry of the elements*, 1. Baskı. Pergamon Press, New York.
- Grice, E. A., Segre, J. A. (2011) The skin microbiome, *Nat Rev Microbiol*, 9 (4): 244–253.
- Gruer, M.J., Bradbury, A.J., Guest, J.R. (1997) Construction and properties of aconitase mutants of *Escherichia coli*, *Microbiology*, 143 (6): 1837-46.
- Gualdi, L., Tagliabue, L., Landini, P. (2007) Biofilm formation-gene expression relay system in *Escherichia coli*: modulation of sigmaS-dependent gene expression by the CsgD regulatory protein via sigmaS protein stabilization, *J Bacteriol*, 189 (22): 8034-43.
- Guddat, L.W., Vos, S., Martin, J.L., Keough, D.T., de Jersey, J. (2002) Crystal structures of free, IMP-, and GMP-bound *Escherichia coli* hypoxanthine phosphoribosyltransferase, *Protein Science*, 11 (7): 1626-38.
- Guo, Y., Liu, X., Li, B., Yao, J., Wood, T.K., Wang, X. (2017) Tail-Anchored Inner Membrane Protein ElaB Increases Resistance to Stress While Reducing Persistence in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 199 (9).
- Gupta, M.K., Guy, C.P., Yeeles, J.T., Atkinson, J., Bell, H., Lloyd, R.G., Mariani, K.J., vd., (2013) Protein-DNA complexes are the primary sources of replication fork pausing in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci*, 110 (18): 7252-7.
- Guy, C.P., Atkinson, J., Gupta, M.K., Mahdi, A.A., Gwynn, E.J., Rudolph, C.J., Moon, P.B., vd., (2009) Rep provides a second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA, *Mol Cell*, 36 (4): 654-66.

- Ha, T., Rasnik, I., Cheng, W., Babcock, H.P., Gauss, G.H., Lohman, T.M., Chu, S. (2002) Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase, *Nature*, 419 (6907): 638-41.
- Habes, D., Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Soltani, N. (2006) Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84: 17-24.
- Han, X., Dorsey-Oresto, A., Malik, M., Wang, J.Y., Drlica, K., Zhao, X., Lu, T. (2010) *Escherichia coli* genes that reduce the lethal effects of stress, *BMC Microbiol*, 10: 35.
- Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J., Ikeda, H. (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci*, 94 (8): 3860-5.
- Hanada, K., Iwasaki, M., Ihashi, S., Ikeda, H. (2000) UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: synergistic action with RecQ helicase, *Proc Natl Acad Sci*, 97 (11): 5989-94.
- Harmon, F.G., Kowalczykowski, S.C. (1998) RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination, *Genes Dev*, 12 (8): 1134-44.
- Hayashi, M., Tabata, K., Yagasaki, M., Yonetani, Y. (2010) Effect of multidrug-efflux transporter genes on dipeptide resistance and overproduction in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett*, 304 (1): 12-9.
- Hazelbauer, G.L. (1975) Maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 122 (1): 206-14.
- Helvacı, M., Kizilgunesler, A., Kasirga, E., Ozbal, E., Kuzu, M., Sozen, G. (2004) Efficacy of hepatitis B vaccination and interferon-alpha-2b combination therapy versus interferon-alpha-2b monotherapy in children with chronic hepatitis B, *J Gastroenterol Hepatol*, 19: 785-791
- Henderson, M.L., Kreuzer, K.N. (2015) Functions that Protect *Escherichia coli* from Tightly Bound DNA-Protein Complexes Created by Mutant EcoRII Methyltransferase, *PLoS One*, 10 (5): e0128092.
- Hirakawa, H., Nishino, K., Hirata, T., Yamaguchi, A. (2003) Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 185 (6): 1851-6.
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., Yamaguchi, A. (2003) Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 576-582.
- Hsiao, F.S., Sutandy, F.R., Syu, G.D., Chen, Y.W., Lin, J.M., Chen, C.S. (2016) Systematic protein interactome analysis of glycosaminoglycans revealed YcbS as a novel bacterial virulence factor, *Sci Rep*, 6: 28425.

- Hu, Q.H., Liu, R. J., Fang, Z. P., Zhang, J., Ding, Y. Y., Tan, M., Wang, M., Pan, W., Zhou, H. C., Wang, E. D. (2013) Discovery of a potent benzoxaborole-based anti-pneumococcal agent targeting urinecyl-tRNA synthetase, *Sci Rep*, 3: 2475.
- Hube, M., Blokesch, M., Bock, A. (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF, *J Bacteriol*, 184 (14): 3879-85.
- Huter, P., Muller, C., Beckert, B., Arenz, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Wilson, D.N. (2017) Structural basis for ArfA-RF2-mediated translation termination on mRNAs lacking stop codons, *Nature*, 541 (7638): 546-549.
- Hutkins, R.W. (2006) Microbiology and Technology of Fermented Foods, *Institute of Food Technologists Series*, 32: 488.
- Hwang, Y.W., Sanchez, A., Miller, D.L. (1989) Mutagenesis of bacterial elongation factor Tu at lysine 136. A conserved amino acid in GTP regulatory proteins, *J Biol Chem*, 264 (14): 8304-9.
- Ideses, D., Gophna, U., Paitan, Y., Chaudhuri, R.R., Pallen, M.J., Ron, E.Z. (2005) A degenerate type III secretion system from septicemic *Escherichia coli* contributes to pathogenesis, *J Bacteriol*, 187 (23): 8164-71.
- Ikeda, H., Shiraishi, K., Ogata, Y. (2004) Illegitimate recombination mediated by double-strand break and end-joining in *Escherichia coli*, *Adv Biophys*, 38: 3-20.
- Irani, M., Maitra, P.K. (1974) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants defective in enzymes of glycolysis, *Biochem Biophys Res Commun*, 56 (1): 127-33.
- Irschik, H., Schummer, D., Gerth, K., Hofle, G., Reichenbach, H. (1995) The tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, *Sorangium cellulosum*, *J Antibiot*, 48: 26-30.
- Ishii, T., Matsunaga, T. (1996) Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp, *Carbohydrate Research*, 284: 1-9.
- Iwai, H., Masaoka, N., Ishii, T., Satoh, S. (2002) A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem, *Proc Natl Acad Sci of the United States of America*, 99: 16319-16324.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., Aravind, L. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases, *J Struct Biol*, 146 (1-2): 11-31.
- Jacobi, A., Rossmann, R., Bock, A. (1992) The hyp operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*, *Arch Microbiol*, 158 (6): 444-51.
- Jovanovic, G., Engl, C., Mayhew, A.J., Burrows, P.C., Buck, M. (2010) Properties of the phage-shock-protein (Psp) regulatory complex that govern signal transduction and induction of the Psp response in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 156 (10): 2920-32.

- Jung, I.L., Kim, I.G. (2003) Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15 (1): 19-26.
- Junge, W., Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annual Review of Biochemistry*, 84: 631–57.
- Kajikawa, M., Fujibe, T., Uruguchi, S., Miwa, K., Fujiwara, T. (2011) Expression of the Arabidopsis borate efflux transporter gene, AtBOR4, in rice affects the xylem loading of boron and tolerance to excess boron, *Biosci Biotechnol Biochem*, 75: 2421-2423.
- Kannan, G., Wilks, J.C., Fitzgerald, D.M., Jones. B.D., Bondurant, S.S., Slonczewski, J.L. (2008) Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery, *BMC Microbiol*, 8: 37.
- Kaya, A., Karakaya, H.C., Fomenko, D.E., Gladyshev, V.N. Koc, A. (2009) Identification of a Novel System for Boron Transport: Atr1 Is a Main Boron Exporter in Yeast, *Molecular and Cellular Biology*, 29: 3665-3674.
- Kellermann, O., Szmelcman, S. (1974) Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein, *Eur J Biochem*, 47 (1): 139-49.
- Keren, R., Mezuman, U. (1981) Boron Adsorption by Clay Minerals Using a Phenomenological Equation, *Clays and Clay Minerals*, 29: 198-204.
- Kim, I.K., Yim, H.S., Kim, M.K., Kim, D.W., Kim, Y.M., Cha, S.S., Kang, S.O. (2008) Crystal structure of a new type of NADPH-dependent quinone oxidoreductase (QOR2) from *Escherichia coli*, *J Mol Biol*, 379 (2): 372-84.
- Kim, J.S., Kim. Y.J., Seo, S., Seong, M.J., Lee, K. (2015) Functional role of bdm during flagella biogenesis in *Escherichia coli*, *Curr Microbiol*, 70 (3): 369-73.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research, *DNA Research*, 12 (5): 291-9.
- Kitanishi, K., Kobayashi, K., Kawamura, Y., Ishigami, I., Ogura, T., Nakajima, K., Igarashi, J., vd., (2010) Important roles of Tyr43 at the putative heme distal side in the oxygen recognition and stability of the Fe(II)-O₂ complex of YddV, a globin-coupled heme-based oxygen sensor diguanylate cyclase, *Biochemistry*, 49 (49): 10381-93.
- Klena, J.D., Schnaitman, C.A. (1994) Genes for TDP-rhamnose synthesis affect the pattern of lipopolysaccharide heterogeneity in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 176 (13): 4003-10.
- Kliegel, W. (1972) Boron compounds from the pharmaceutical-chemical viewpoint, *Pharmazie*, 27: 1-14.
- Kobayashi, M., Match, T., Azuma, J. (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls, *Plant Physiology*, 110: 1017-1020.

- Kohno, J., Kawahata, T., Otake, T., Morimoto, M., Mori, H., Ueba, N., Nishio, M., vd., (1996) Boromycin, an anti-HIV antibiotic, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60: 1036-1037.
- Koita, K., Rao, C.V. (2012) Identification and Analysis of the Putative Pentose Sugar Efflux Transporters in *Escherichia coli*, *PLoS One*, 7 (8): e43700.
- Konan, K.V., Yanofsky, C. (2000) Rho-dependent transcription termination in the *tna* operon of *Escherichia coli*: roles of the *boxA* sequence and the *rut* site, *J Bacteriol*, 182 (14): 3981-8.
- Korea, C.G., Badouraly, R., Prevost, M.C., Ghigo, J.M., Beloin, C. (2010) *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperoneusher fimbriae with distinct surface specificities, *Environ Microbiol*, 12 (7): 1957-77.
- Kornberg, A., Scott, J.F., Bertsch, L.L. (1978) ATP utilization by *rep* protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork, *J Biol Chem*, 253 (9): 3298-304.
- Kornberg, H.L. (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*, *Biochem J*, 99: 1–11.
- Kredich, N.M., Tomkins, G.M. (1966) The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *J Biol Chem*, 241 (21): 4955-65.
- Kri, K.A., Copi, T., Gabaldon, T., Lehner, B., Supek, F. (2014) Inferring gene function from evolutionary change in signatures of translation efficiency, *Genome Biol*, 15 (3): R44.
- Krisko, A., Copi, T., Gabaldon, T., Lehner, B., Supek, F. (2014) Inferring gene function from evolutionary change in signatures of translation efficiency, *Genome Biol*, 15 (3): R44.
- Kumar, A., Beloglazova, N., Bundalovic-Torma, C., Phanse, S., Deineko, V., Gagarinova, A., Musso, G., vd., (2016) Conditional Epistatic Interaction Maps Reveal Global Functional Rewiring of Genome Integrity Pathways in *Escherichia coli*, *Cell Rep*, 14 (3): 648-61.
- Kuroki, K., Ishii, S., Kano, Y., Miyashita, T., Nishi, K., Imamoto, F. (1982) Involvement of the *nusB* gene products in transcription of *Escherichia coli* tryptophan operon in vitro, *Mol Gen Genet*, 185 (2): 369-71.
- Laloux, G., Collet, J.F. (2017) Major Tom to Ground Control: How Lipoproteins Communicate Extracytoplasmic Stress to the Decision Center of the Cell, *J Bacteriol*, 199 (21): e00216-17.
- LaPorte, D.C., Koshland, D.E. (1982) A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle, *Nature*, 300 (5891): 458-60.
- Law, B. A., Tamime, A. (2011) *Technology of Cheesemaking*, 2. Baski.
- Lawhorn, B.G., Mehl, R.A., Begley, T.P. (2004) Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction, *Org Biomol Chem*, 2 (17): 2538-46.

- Lawrence, J.G., Roth, J.R. (1995) The cobalamin (coenzyme B12) biosynthetic genes of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 177 (22): 6371-80.
- Lee, K.C., Yeo, W.S., Roe, J.H. (2008) Oxidant-responsive induction of the suf operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 190 (24): 8244-7.
- Lewer, P., Chapin, E.L., Graupner, P.R., Gilbert, J.R., Peacock, C. (2003) Tartrolone C: a novel insecticidal macrodiolide produced by *Streptomyces* sp. CP1130, *J Nat Prod*, 66: 143-145.
- Lewis, M. (2005) The lac repressor, *Comptes Rendus Biologies*, 328 (6): 521-548.
- Linton, K.J., Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins, *Mol Microbiol*, 28 (1): 5-13.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (4): 402-8.
- Lloyd, L.J., Jones, S.E., Jovanovic, G., Gyaneshwar, P., Rolfe, M.D., Thompson, A., Hinton, J.C., vd., (2004) Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG), *J Biol Chem*, 279 (53): 55707-14.
- Lohman, T.M., Chao, K., Green, J.M., Sage, S., Runyon, G.T. (1989) Large-scale purification and characterization of the *Escherichia coli* rep gene product, *J Biol Chem*, 264 (17): 10139-47.
- Lucas-Lenard, J., Lipmann, F. (1966) Separation of three microbial amino acid polymerization factors, *Proc Natl Acad Sci*, 55 (6): 1562-6.
- Ma, C., Kurita, D., Li, N., Chen, Y., Himeno, H., Gao, N. (2017) Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2, *Nature*,
- Malakar, P., Singh, V.K., Karmakar R., Venkatesh, K.V. (2014) Effect on β -galactosidase synthesis and burden on growth of osmotic stress in *Escherichia coli*, Springer Plus, 3: 748.
- Malcovati, M., Valentini, G. (1982) AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol*, 90: 170-9.
- Malcovati, M., Valentini, G., Kornberg, H.L. (1973) Two forms of pyruvate kinase in *E. coli*: their properties and regulation, *Acta Vitaminol Enzymol*, 27 (1): 96-111.
- Malinverni, J.C., Silhavy, T.J. (2009) An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane, *Proc Natl Acad Sci*, 106 (19): 8009-14.
- Maloy, S.R., Bohlander, M., Nunn, W.D. (1980) Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in *Escherichia coli* strains constitutive for fatty acid degradation, *J Bacteriol*, 143: 720-725.
- Mancini, S., Abicht, H.K., Gonskikh, Y., Solioz, M. (2015) A copper-induced quinone degradation pathway provides protection against combined

- copper/quinone stress in *Lactococcus lactis* IL1403, *Mol Microbiol*, 95(4): 645–659
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, 2. Baskı, Academic Press, London.
- Maruyama, Y., Oiki, S., Takase, R., Mikami, B., Murata, K., Hashimoto, W. (2015) Metabolic Fate of Unsaturated Glucuronic/Iduronic Acids from Glycosaminoglycans: Molecular identification and structure determination of streptococcal isomerase and dehydrogenase, *J Biol Chem*, 290 (10): 6281-92.
- Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y., Ohtsubo, E. (1993) *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100, *J Bacteriol*, 175 (21): 6850-6.
- Masuda, Y., Ohtsubo, E. (1994) Mapping and disruption of the *chpB* locus in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 176 (18): 5861-3.
- Mattevi, A., Valentini, G., Rizzi, M., Speranza, M.L., Bolognesi, M., Coda, A. (1995) Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition, *Structure*, 3 (7): 729-41.
- Maurel, C. (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties, *FEBS Lett*, 581 (12).
- May, T., Okabe, S. (2011) Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*, *Environ Microbiol*, 13 (12): 3149-62.
- Mendez-Ortiz, M.M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Membrillo-Hernandez, J. (2006) Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid, *J Biol Chem*, 281 (12): 8090-9.
- Meng, Y.L., Liu, Z., Rosen, B.P. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 279 (18): 18334-41.
- Micevski, D., Zammit, J.E., Truscott, K.N., Dougan, D.A. (2015) Anti-adaptors use distinct modes of binding to inhibit the RssB-dependent turnover of RpoS (σ (S)) by ClpXP, *Front Mol Biosci*, 2: 15.
- Michel, B., Ehrlich, S.D., Uzest, M. (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest, *EMBO J*, 16 (2): 430-8.
- Miller, S.P., Karschnia, E.J., Ikeda, T.P., LaPorte, D.C. (1996) Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. Kinetic characteristics of the wild-type and two mutant proteins, *J Biol Chem*, 271 (32): 19124-8.
- Mino, K., Imamura, K., Sakiyama, T., Eisaki, N., Matsuyama, A., Nakanishi, K. (2001) Increase in the stability of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* against cold inactivation and proteolysis by forming a hienzyme complex, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (4): 865-74.
- Miwa, H., Fujiwara, T. (2009) Isolation and identification of boron-accumulating bacteria from contaminated soils and active sludge, *Soil Science and Plant Nutrition*, 55: 643-646.

- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K. Fujiwara, T. (2007) Plants tolerant of high boron levels, *Science*, 318: 1417.
- Miyashita, T., Kano, Y., Kuroki, K., Ishii, S., Imamoto, F. (1982) In vivo evidence for nusA and nusB gene function in general transcription of the *Escherichia coli* genome, *Biken Journal*, 25 (3): 121-30.
- Moller, A.K., Leatham, M.P., Conway, T., Nuijten, P.J., de Haan, L.A., Krogfelt, K.A., Cohen, P.S. (2003) An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine, *Infection and Immunity*, 71 (4): 2142-52.
- Mort, J.S., Sanwal, B.D. (1978) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*: further studies of the enzyme activated by ribose-5-phosphate, *Can J Biochem*, 56 (6): 647-53.
- Mudapaka, J., Taylor, E.A. (2015) Cloning and characterization of the *Escherichia coli* Heptosyltransferase III: Exploring substrate specificity in lipopolysaccharide core biosynthesis, *FEBS Lett*, 589 (13): 1423-9.
- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J.A. (2008) Isabel Barcin Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state, *FEMS Microbiology Ecology*, 64 (1): 28–36.
- Nable, R.O., Banuelos, G.S., Paull, J.G. (1997) Boron toxicity, *Plant and Soil*, 193: 181-198.
- Nakamura, H., Iitaka, Y., Kitahara, T., Okazaki, T., Okami, Y. (1977) Structure of Aplasmomycin, *J Antibiot*, 30: 714-719.
- Negrete-Raymond, A.C., Weder, B., Wackett, LP. (2003) Catabolism of arylboronic acids by *Arthrobacter nicotinovorans* strain PBA, *Applied and Environ Microbiol*, 69: 4263-4267.
- Nellemann, L.J., Holm, F., Atlung, T., Hansen, F.G. (1989) Cloning and characterization of the *Escherichia coli* phosphoglycerate kinase (pgk) gene, *Gene*, 77 (1):185-91.
- Neshich, I. A., Kiyota, E., ve Arruda, P. (2013) Genome-wide analysis of lysine catabolism in bacteria reveals new connections with osmotic stress resistance, *The ISME journal*, 7 (12): 2400–2410.
- Nielsen, F.H. (2000) The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle, *Nutrition*, 16: 512-514.
- Nielsen, F.H. (2004) Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats, *Biofactors*, 20: 161-171.
- Nobelmann, B., Lengeler, J.W. (1995) Sequence of the gat operon for galactitol utilization from a wild-type strain EC3132 of *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1262 (1): 69-72.
- Nobelmann, B., Lengeler, J.W. (1996) Molecular analysis of the gat genes from *Escherichia coli* and of their roles in galactitol transport and metabolism, *J Bacteriol*, 178 (23): 6790-5.

- Nozawa, A., Takano, J., Kobayashi, M., Von Wiren, N., Fujiwara, T. (2006) Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol Lett*, 262 (2): 216-222.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide, *Annu Rev Plant Biol*, 55: 109-139.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester - In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer, *J Biol Chem*, 271: 22923-22930.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., Darvill, A.G. (2001) Requirement of Borate Cross-Linking of Cell Wall Rhamnogalacturonan II for Arabidopsis Growth, *Science*, 294 (5543): 846-849.
- Orme, R., Douglas, C.W., Rimmer, S., Webb, M. (2006) Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA, *Proteomics*, 6 (15): 4269-77.
- Overduin, P., Boos, W., Tommassen, J. (1988) Nucleotide sequence of the *ugp* genes of *Escherichia coli* K-12: homology to the maltose system, *Mol Microbiol*, 2 (6): 767-75.
- Pache, W., Zahner, H. (1969) Metabolic products of microorganisms, 77. Studies on the mechanism of action of boromycin, *Arch Mikrobiol*, 67: 156-165.
- Palevsky, N., Shemer, B., Connolly, J.P., Belkin, S. (2016) The Highly Conserved *Escherichia coli* Transcription Factor YhaJ Regulates Aromatic Compound Degradation, *Front Microbiol*, 7: 1490.
- Patrick, W.M., Erik, M.Q., Swartzlander, D.B., Matsumura, I. (2007) Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability, *Mol Biol Evol*, 24 (12): 2716-2722.
- Patzer, S.I., Hantke, K. (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the (2Fe-2S) FhuF protein in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 181 (10): 3307-9.
- Pawar, K.I., Suma, K., Seenivasan, A., Kuncha, S.K., Routh, S.B., Kruparani, S.P., Sankaranarayanan, R. (2017) Role of D-aminoacyl-tRNA deacylase beyond chiral proofreading as a cellular defense against glycine mischarging by AlaRS, *ELife*, 6.
- Pel, H.J., Rep, M., Grivell, L.A. (1992) Sequence comparison of new prokaryotic and mitochondrial members of the polypeptide chain release factor family predicts a five-domain model for release factor structure, *Nucleic Acids Res*, 20 (17): 4423-8.
- Piazza, I., Kochanowski, K., Cappelletti, V., Fuhrer, T., Noor, E., Sauer, U., Picotti, P. (2018) A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication, *Cell*, 172 (1-2): 358-372.

- Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., Bolivar, F. (1995) Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis, *J Bacteriol*, 177 (19): 5719-22.
- Powers, T., Stern, S., Changchien, L.M., Noller, H.F. (1988) Probing the assembly of the 3' major domain of 16 S rRNA. Interactions involving ribosomal proteins S2, S3, S10, S13 and S14., *J Mol Biol*, 201 (4): 697-716.
- Quadroni, M., Staudenmann, W., Kertesz, M., James, P. (1996) Analysis of global responses by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis. Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*, *Eur J Biochem*, 239 (3): 773-81.
- Rao, R., Pagan, J., Senior, A.E. (1988) Directed mutagenesis of the strongly conserved lysine 175 in the proposed nucleotide-binding domain of alpha-subunit from *Escherichia coli* F1-ATPase, *J Biol Chem*, 263 (31): 15957-63.
- Raux, E., Lanois, A., Levillayer, F., Warren, M.J., Brody, E., Rambach, A., Thermes, C. (1996) *Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes: functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 178 (3): 753-67.
- Raven, J.A. (1980) Short-Distance and Long-Distance Transport of Boric-Acid in Plants, *New Phytologist*, 84: 231-249.
- Reidl, J., Boos, W. (1991) The malX malY operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system, *J Bacteriol*, 173 (15): 4862-76.
- Reidl, J., Romisch, K., Ehrmann, M., Boos, W. (1989) MalI, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to the repressor proteins GalR, CytR, and LacI, *J Bacteriol*, 171 (9): 4888-99.
- Reily, M.D., Robosky, L.C., Manning, M.L., Butler, A., Baker, J.D., Winters, R.T. (2006) DFTMP, an NMR reagent for assessing the near-neutral pH of biological samples, *J Am Chem Soc*, 128 (38): 12360-12361.
- Reizer, J., Charbit, A., Reizer, A., Saier, M.H. (1996) Novel Phosphotransferase System Genes Revealed by Bacterial Genome Analysis: Operons Encoding Homologues of Sugar-Specific Permease Domains of the Phosphotransferase System and Pentose Catabolic Enzymes, *Genome Sci Technol*, 1 (2): 53-75.
- Ren, C.P., Chaudhuri, R.R., Fivian, A., Bailey, C.M., Antonio, M., Barnes, W.M., Pallen, M.J. (2004) The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition, *J Bacteriol*, 186 (11): 3547-60.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W., Wood, T.K. (2004) Gene expression in *Escherichia coli* biofilms, *Appl Microbiol Biotechnol*, 64 (4): 515-24.

- Riehl, N., Remy, P., Ebel, J.P., Ehresmann, B. (1982) Crosslinking of N-acetyl-phenylalanyl (s4U)tRNAPhe to protein S10 in the ribosomal P site, *Eur J Biochem*, 128 (2-3): 427-33.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., vd., (2006) *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005, *Nucleic Acids Res*, 34 (1): 1-9.
- Rittinger, K., Negre, D., Divita, G., Scarabel, M., Bonod-Bidaud, C., Goody, R.S., Cozzone, A.J., vd., (1996) *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. Overproduction and kinetics of interaction with its substrates by using intrinsic fluorescence and fluorescent nucleotide analogues, *Eur J Biochem*, 237 (1): 247-54.
- Rodionov, D.A., Mironov, A.A., Rakhmaninova, A.B., Gelfand, M.S. (2000) Transcriptional regulation of transport and utilization systems for hexuronides, hexuronates and hexonates in gamma purple bacteria, *Mol Microbiol*, 38 (4): 673-83.
- Rothe, M., Alpert, C., Loh, G., Blaut, M. (2013) Novel insights into E. coli's hexuronate metabolism: KduI facilitates the conversion of galacturonate and glucuronate under osmotic stress conditions, *PLoS One*, 8 (2): e56906.
- Rowe, R.I., Eckhert, C.D. (1999) Boron is required for zebrafish embryogenesis, *Journal of Experimental Biology*, 202: 1649-1654.
- Saier, M.H. Reddy, V.S., Tsu, B.V., Ahmed, M.S., Li, C., Moreno-Hagelsieb, G. (2016) The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances, *Nucleic Acids Res*, 44 (D1): 372-9.
- Saini, A., Mapolelo, D.T., Chahal, H.K., Johnson, M.K., Outten, F.W. (2010) SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe-S cluster formation on SufB, *Biochemistry*, 49 (43): 9402-12.
- Sandler, S.J. (2000) Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, 155 (2): 487-97.
- Sandler, S.J. (2005) Requirements for replication restart proteins during constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, 169 (4):1799-806.
- Sato, K., Okazaki, T., Maeda, K., Okami, Y. (1978) New antibiotics, aplasmomycins B and C, *J Antibiot*, 31: 632-635.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P. (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms, *Mol Microbiol*, 48 (1): 253-67.
- Schneider, B.L., Hernandez, V.J., Reitzer, L. (2013) Putrescine catabolism is a metabolic response to several stresses in *Escherichia coli*, *Molecular microbiology*, 88 (3): 537-550.
- Scott, J.F., Eisenberg, S., Bertsch, L.L., Kornberg, A. (1977) A mechanism of duplex DNA replication revealed by enzymatic studies of phage phi X174: catalytic strand separation in advance of replication, *Proc Natl Acad Sci*, 74.(1): 193-7.
- Sezer, M., Dibek, E., Çöl, B. (2018) Importance Of Some Metalloids In Biological Life, *Mugla Journal of Science and Technology*, 4: 236-241.

- Sezer, M. (2018) *Genom boyu taramaları ve moleküler genetik yaklaşımlarıyla Escherichia coli bakterisinde bor toleransı ile ilgili genlerin araştırılması*, Doktora Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 341s.
- Shapira, R., Mimran, E. (2007) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol, *Microb Drug Resist*, 13 (3): 157-65.
- Shimizu, Y. (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes, *J Mol Biol*, 423 (4): 624-31.
- Shiraishi, K., Imai, Y., Yoshizaki, S., Ikeda, H. (2005) Rep helicase suppresses short-homology-dependent illegitimate recombination in *Escherichia coli*, *Genes Cells*, 10 (11): 1015-23.
- Sigdel, T.K., Cilliers, R., Gursahaney, P.R., Thompson, P., Easton, J.A., Crowder, M.W. (2006) Probing the adaptive response of *Escherichia coli* to extracellular Zn(II), *Biometals*, 19 (5): 461-71.
- Sim, S.H., Yeom, J.H., Shin, C., Song, W.S., Shin, E., Kim, H.M., Cha, C.J., vd., (2010) *Escherichia coli* ribonuclease III activity is downregulated by osmotic stress: consequences for the degradation of bdm mRNA in biofilm formation, *Mol Microbiol*, 75 (2): 413-25.
- Smith, A.F., Morgan, G.J., Davies, F.E. (2006) Bortezomib (Velcade™) in the Treatment of Multiple Myeloma, *Ther Clin Risk Manag*, 2 (3): 271–279.
- Sokol, R., Devereaux, M., Khandwala, R. (1998) Effect of Oxypurinol, a Xanthine Oxidase Inhibitor, on Hepatic Injury in the Bile Duct-Ligated Rat, *Pediatr Res*, 44: 397–401.
- Somani, B.L., Valentini, G., Malcovati, M. (1977) Purification and molecular properties of the AMP-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta*, 482 (1): 52-63.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., Hengge, R. (2009) Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 155 (4): 1318-31.
- Soutourina, J., Plateau, P., Delort, F., Peirottes, A., Blanquet, S. (1999) Functional characterization of the D-Tyr-tRNA^{Tyr} deacylase from *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 274 (27): 19109-14.
- Stangoulis, J.C.R., Reid, R.J., Brown, P.H., Graham, R.D. (2001) Kinetic analysis of boron transport in *Chara*, *Planta*, 213: 142-146.
- Stewart, V., Yanofsky, C. (1985) Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 164 (2): 731-40.
- Stout, T.J., Clardy, J., Pathirana, I.C., Fenical, W. (1991) Aplasmomycin-C - Structural Studies of a Marine Antibiotic, *Tetrahedron*, 47: 3511-3520.
- Stribling, D., Perham, R.N. (1973) Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' strain), *Biochem J*, 131 (4): 833-41.

- Strickland, S., Massey, V. (1973) The purification and properties of the flavoprotein melilotate hydroxylase, *J Biol Chem*, 248: 2944-52.
- Stueland, C.S., Eck, K.R., Stieglbauer, K.T., LaPorte, D.C. (1987) Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase exhibits an intrinsic adenosine triphosphatase activity, *J Biol Chem*, 262 (33): 16095-9.
- Sutherland, P., McAlister-Henn, L. (1985) Isolation and expression of the *Escherichia coli* gene encoding malate dehydrogenase, *J Bacteriol*, 163 (3): 1074-9.
- Swate, T.E., Weed, J.C. (1974) Boric acid treatment of vulvovaginal candidiasis, *Obstet Gynecol*, 43: 893-895.
- Swindle, J., Zylicz, M., Georgopoulos, C., Li, J., Greenblatt, J. (1988) Purification and properties of the NusB protein of *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 263(21): 10229-35.
- Takahashi, S., Hours, C., Chu, A., Denhardt, D.T. (1979) The rep mutation. VI. Purification and properties of the *Escherichia coli* rep protein, DNA helicase III, *Can J Biochem*, 57 (6): 855-66.
- Takahashi, Y., Tokumoto, U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids, *J Biol Chem*, 277 (32): 28380-3.
- Takano, J., Miwa, K., Fujiwara, T. (2008) Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters, *Trends Plant Sci*, 13: 451-457.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wiren, N., Fujiwara, T. (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation, *Plant Cell*, 18: 1498-1509.
- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S., Saier, M.H. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3 (3): 329-46.
- Terui, Y., Higashi, K., Tabei, Y., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., vd., (2009) Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions, *J Bacteriol*, 191 (17): 5348-57.
- Thomson, J., Gerstenberger, P.D., Goldberg, D.E., Gociar, E., Orozco de Silva, A., Fraenkel, D.G. (1979) ColE1 hybrid plasmids for *Escherichia coli* genes of glycolysis and the hexose monophosphate shunt, *J Bacteriol*, 137 (1): 502-6.
- Thong, S., Ercan, B., Torta, F., Fong, Z.Y., Wong, H.Y., Wenk, M.R., Chng, S.S. (2016) Defining key roles for auxiliary proteins in an ABC transporter that maintains bacterial outer membrane lipid asymmetry, *ELife*, 5.
- Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., Takahashi, Y. (2004) Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*, *J Biochem*, 136 (2): 199-209.

- Trzebiatowski, J.R., O'Toole, G.A., Escalante-Semerena, J.C. (1994) The cobT gene of *Salmonella typhimurium* encodes the NaMN: 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase responsible for the synthesis of N1-(5-phospho-alpha-D-ribose)-5,6-dimethylbenzimidazole, an intermediate in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin, *J Bacteriol*, 176 (12): 3568–3575.
- Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Sousa, E.H., Wan, X., Saito, J.A., Alam, M., Gilles-Gonzalez, M.A. (2009) An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control, *Biochemistry*, 48 (41): 9764-74.
- Turlin, E., Sismeiro, O., Le Caer, J.P., Labas, V., Danchin, A., Biville, F. (2005) 3-phenylpropionate catabolism and the *Escherichia coli* oxidative stress response, *Res Microbiol*, 156 (3): 312-21.
- Umez, K., Nakayama, K., Nakayama, H. (1990) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase, *Proc Natl Acad Sci*, 87 (14): 5363-7.
- Uzest, M., Ehrlich, S.D., Michel, B. (1995) Lethality of rep recB and rep recC double mutants of *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 17 (6): 1177-88.
- Valentini, G., Chiarelli, L., Fortin, R., Speranza, M.L., Galizzi, A., Mattevi, A. (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase, *J Biol Chem*, 275 (24): 18145-52.
- Valentini, G., Iadarola, P., Somani, B.L., Malcovati, M. (1979) Two forms of pyruvate kinase in *Escherichia coli*. A comparison of chemical and molecular properties, *Biochimica et Biophysica Acta*, 570 (2): 248-58.
- Valentini, G., Stoppini, M., Iadarola, P., Malcovati, M., Ferri, G., Speranza, M.L. (1993) Divergent binding sites in pyruvate kinases I and II from *Escherichia coli*, *Biological Chemistry*, 374 (1): 69-74.
- Valentini, G., Stoppini, M., Speranza, M.L., Malcovati, M., Ferri, G. (1991) Bacterial pyruvate kinases have a shorter N-terminal domain, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 372 (2): 91-3.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (2006) *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 2. Baskı.
- Wallace, I.S., Choi, W., Roberts, D.M. (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (8): 1165-1175.
- Wang, D., Ding, X., Rather, P.N. (2001) Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 183 (14): 4210-6.
- Wang, L., Xia, B., Jin, C. (2007) Solution structure of *Escherichia coli* HypC, *Biochem Biophys Res Commun*, 361 (3): 665–669.
- Wang, Y. (2002) The function of OmpA in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun*, 292 (2): 396-401.
- Warington, K. (1923) The Effect of Boric Acid and Borax on the Broad Bean and certain other Plants, *Annals of Botany*, 37: 629-672

- Waygood, E.B., Rayman, M.K., Sanwal, B.D. (1975) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate, *Can J Biochem*, 53 (4): 444-54.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., Hengge, R. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 62 (4): 1014-34.
- White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J., Young, S. (2008) Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12, *Microbiology*, 154 (1): 148-66.
- WHO, WHO. (2009) Boron in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 1001BF-01 Güncelleme Tarihi: 27/05/2013.
- Wiame, E., Van Schaftingen, E. (2004) Fructoselysine 3-epimerase, an enzyme involved in the metabolism of the unusual Amadori compound psicoselysine in *Escherichia coli*, *Biochem J*, 378 (3): 1047-52.
- Wittinghofer, A., Leberman, R. (1976) Elongation factor T from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. Purification and some properties of EF-Tu and EF-Ts from *Bacillus stearothermophilus*, *Eur J Biochem*, 62 (2): 373-382.
- Wong, I., Chao, K.L., Bujalowski, W., Lohman, T.M. (1992) DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* rep helicase. Allosteric effects of single-stranded and duplex DNA, *J Biol Chem*, 267 (11): 7596-610.
- Wong, I., Lohman, T.M. (1992) Allosteric effects of nucleotide cofactors on *Escherichia coli* Rep helicase-DNA binding, *Science*, 256 (5055): 350-5.
- Wong, I., Moore, K.J., Bjornson, K.P., Hsieh, J., Lohman, T.M. (1996) ATPase activity of *Escherichia coli* Rep helicase is dramatically dependent on DNA ligation and protein oligomeric states, *Biochemistry*, 35 (18): 5726-34.
- Woods, W.G. (1994) An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry, *Environ Health Perspect*, 7: 5-11.
- Wyness, A.J., Parkman, R.H., Neal, C. (2003) A summary of boron surface water quality data throughout the European Union, *Science of The Total Environment*, 314-316: 255-269.
- Xia, J. ve Wishart, D.S. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis, *Curr. Protoc. Bioinform.* 55: 14.10.1- 14.10.91.
- Yamaguchi, Y., Inouye, M. (2015) An endogenous protein inhibitor, YjhX (TopAI), for topoisomerase I from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res*, 43 (21): 10387-96.
- Yamamoto, K., Oshima, T., Nonaka, G., Ito, H., Ishihama, A. (2011) Induction of the *Escherichia coli* cysK gene by genetic and environmental factors, *FEMS Microbiol Lett*, 323 (1): 88-95.

- Yanofsky, C., Horn, V. (1995) Bicyclomycin sensitivity and resistance affect Rho factor-mediated transcription termination in the *tna* operon of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 177 (15): 4451-6.
- Yanofsky, C., Horn, V., Nakamura, Y. (1996) Loss of overproduction of polypeptide release factor 3 influences expression of the tryptophanase operon of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 178 (13): 3755-62.
- Yarranton, G.T., Gefter, M.L. (1979) Enzyme-catalyzed DNA unwinding: studies on *Escherichia coli* rep protein, *Proc Natl Acad Sci*, 76 (4): 1658-62.
- Yasui, R., Washizaki, A., Furihata, Y., Yonesaki, T., Otsuka, Y. (2014) AbpA and AbpB provide anti-phage activity in *Escherichia coli*, *Genes Genet Syst*, 89 (2): 51-60.
- Yethon, J.A., Heinrichs, D.E., Monteiro, M.A., Perry, M.B., Whitfield, C. (1998) Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane, *J Biol Chem*, 273 (41): 26310-6.
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Williams, E.R., Butland, G. (2011) The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes, *Biochemistry*, 50 (41): 8957-69.
- Yew, W.S., Gerlt, J.A. (2002) Utilization of L-ascorbate by *Escherichia coli* K-12: assignments of functions to products of the *yjf-sga* and *yia-sgb* operons, *J Bacteriol*, 184 (1): 302-6.
- Yogiara, K.D., Hwang, J.K., Pan, J.G. (2015) *Escherichia coli* ASKA Clone Library Harboring tRNA-Specific Adenosine Deaminase (*tadA*) Reveals Resistance towards Xanthorrhizol, *Molecules*, 20: 16290-16305.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., vd., (2004) A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon, *J Biol Chem*, 279 (44): 46008-13.
- Yu, H.H., Kibler, D., Tan, M. (2006) In Silico Prediction and Functional Validation of σ^{28} -Regulated Genes in Chlamydia and *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 188 (23): 8206-8212.
- Yu, B.J., Kim, J.A., Ju, H.M., Choi, S.K., Hwang, S.J., Park, S., Kim, E., Pan, J.G. (2012) Genome-Wide Enrichment Screening Reveals Multiple Targets and Resistance Genes for Triclosan in *Escherichia coli*, *The Journal of Microbiology*, 50 (5): 785-791.
- Zeng, F., Chen, Y., Remis, J., Shekhar, M., Phillips, J.C., Tajkhorshid, E., Jin, H. (2017) Structural basis of co-translational quality control by ArfA and RF2 bound to ribosome, *Nature*, 541 (7638): 554-557.
- Zhai, Y., Saier, M.H. (2002) The beta-barrel finder (BBF) program, allowing identification of outer membrane beta-barrel proteins encoded within prokaryotic genomes, *Protein Science*, 11 (9): 2196-207.

- Zhang, J., Sprung, R., Pei, J., Tan, X., Kim, S., Zhu, H., Liu, C.F., vd., (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*, *Mol Cell Proteomics*, 8 (2): 215-25.
- Zhang, Y., Conway, C., Rosato, M., Suh, Y., Manson, M.D. (1992) Maltose chemotaxis involves residues in the N-terminal and C-terminal domains on the same face of maltose-binding protein, *J Biol Chem*, 267 (32): 22813-20.
- Zhang, Y., Gardina, P.J., Kuebler, A.S., Kang, H.S., Christopher, J.A., Manson, M.D. (1999) Model of maltose-binding protein/chemoreceptor complex supports intrasubunit signaling mechanism, *Proc Natl Acad Sci*, 96 (3): 939-44.
- Zhang, Z., Aboulwafa, M., Smith, M.H., Saier, M.H. (2003) The ascorbate transporter of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 185 (7): 2243-50.
- Zhang, Z.F., Winton, M.I., Rainey, C., Eckhert, C.D. (2001) Boron is associated with decreased risk of human prostate cancer, *Faseb Journal*, 15: A1089-A1089.
- Zheng, J., Jia, Z. (2010) Structure of the bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase, *Nature*, 465 (7300): 961-5.
- Zheng, J., Yates, S.P., Jia, Z. (2012) Structural and mechanistic insights into the bifunctional enzyme isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase AceK, *Biological sciences*, 367 (1602): 2656–2668.
- Zyga, L. We are living in a bacterial world, and it's impacting us more than previously thought". *Cell & Microbiology*, Son erişim tarihi: 15 şubat 2013.

EK: Plazmidlerin Taşıdıkları Insert Sekansları

Zenginleştirme yöntemi sonucu elde edilen tolerant kolonilerin içerdikleri pCA24N::insert rekombinant plazmidlerinin taşıdığı insertlerin sekansları

>pED4_F-CA 1259 nt

```
TCTATTACCATTCCCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCACTGAGGAGGAGACAG
CTCCGAGGGAAATTCAGAATCTGCAGAAACCTCTACCGCCGGCCGGCCCCCGAAGCTG
GAAGGTCTGGCGCAGAACTGGGGACTGCTAACACTACTCTGGGCTGGCTCTGAACGAC
CGTGCGGGTGAAACACGCGGATTCCATCCTGGCGGAGATTGCGATGGTTATTGCGGACAT
TGAGCTTGCCGGTGTGGAGGGATTGAGCATTGCGTGATGCGCCGGACAGTTGACAACG
ACCTCTGCTCGAGCCGTCTCGGGTAAAGAGGGGCGATCTGTAAACCGCTGGTTTTACCGAT
AATGACACTTGTATTGTTGGGAGTGATGGGCGGCTATGCCCGCTACTCCTGTAAACAACA
TTCTTCGTGGAGCATGGACATTTGTTGATAAATGTCGGAATCTCCTCCGAACGGCTGCT
GGATTTCTGCATAGCCCATGACAGCCGCAAAAAAGGTTTTATTTTGACTAATCCAACCTA
GGGGAATGGCCGTGACCGAGTGAAAATCTGACGAATTCGTCTCTGAGACGACTGTGAAG
ATCTGTGACACCTGCACGTCGGAACACGTTCCATTTTGTCTAGAATCAAATGCTGGGA
CTGGACGAGCCCGACTAGTCGCGGATCTTGGAGTCGTCGGGTGTGCTATCTGGACATGAG
CCAATCATAACGCGATAACCGGAGTGTATTGTCTCTCGATGACGAAAAGACTCAAGAACTC
TCCCTGCCCGACCCATCTTATCATCTTTATGCGTACTCAGGATAAGGAAGTCCGCGCAG
CGTGACTAGTTTGAATCTATTGTGAATGATTAGATCAGGACGTTAGATTTATCTGACTCCT
GAACGCGCTCAGACACCAGATGAGCCGGCCAGTAGGGGGACTCATACCCGGCCCTAATT
GCAACCTGAATACTACCTGGCGGCGTATGCGCATTCCGGGCAATCAATTAGTGCTAGTATG
GCCTCTATAAGACCTGCATGCCCTTGGCTGGCCTCTACAGGTAACGATCCCTCATTGTGA
TCTACCCACAGGTCGGACTGACGCGTGATGGGATCAGAAATGCCCTCCGGGACGCCTTTG
GCATGTTCCAACCTTCGGGCGCTACGGGGCTTATATAGCGGATAAATCTCGGCTATGCCAC
CTCTCGGATCCAGTAGCACCTGGTCTACACCGTTCCGGGTATACACGCCCATACCGTTGCG
ACT
```

>pED5_F-CA 1362 nt

```
CACATCCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCACAGAGATCTATGA
ACAGGCGAAACATAGCCTGCAGGGTGAGGACTTCTCATCGTTCAATTATCTGTTTGCGGT
TAACAAGCTGTTGTCTAACCCTGTTTCGTATGACTTGGGACGGGACTTGATCGTGCGAGC
TCTCGATTTCGCGCGAGCGGTTTTCCGAGCACACCACAATTTGAAAAATATGGTGAGAAA
ATCAGGTTTGTTCCTGATCTCAAAAAGGAGTTCACCAGCCTGACACCGGATGACCTGAG
GGTGCTTGAGCTATACCGGACGCCATTCTCGGATGGTTATGTTTTCCACTCAATGCAGTTC
CACATATTCGATCTGCTCAAGTCTGGTCAAAACGTGGTGCTGAGTGCACCTACAAGCATG
GGCAAAAGTGCAATCGTTCGATTCATTGCTCGGCATGGGAACTTTGAAACGGCTTGTTCG
GTTGTTCCAACCGTGGCTCTTGCCGACGAAACCCGTCGCCGACTGCAAGAGCGATTCCGT
GACCGATATCAGATCATCCACCACAGTTCCCAAGTGTGCCATTCCGATCAGGCTGTTTAT
GTGTTAACTCAGGAGCGAGTGAACGAGCGTGACGACATCGTCGACATTGACCTCTTCGTC
ATTGACGAGTTTTACAAGTTGGCGTTCGACAACCTGAAAAGCGGGGACATTGATCATCAA
GACGAACGAGTCATCGAGCTCAACATTGCGTTAAGCAAACCTGCTTAAGGTCTCCAGGCA
GTTTTACCTGACGGGACCGTTCGTTAACAGCATTCCGCGGTCTCGAAAAACTGGGATATCC
GCATACTTTCGTTTCTACCGACTTCAATACAGTCGCGCTAGATGTTAAGACGTTCCGGCATC
AAAGCGAATGACGACAAAGCCAAGCTCAAAGCGCTGGGGGAAATCGCGCCTGCATGTGT
CGACGCAACGATCTTTATTGCAAGTCACCAATGGTTGCGGGCCTGGGGGCGCGGAACT
GATAAGGCTTGGGCATGGCACTCCAATGAAAATCCCCTGTGACGGGGTCACGAAGATT
CGATGCCAATGGGATTACCAATCCCCCTAAAAACGGATTGGCTTGCCTTTGGCGCCTACC
GAGGGCCTGCCAAAACACTGGCCAAACATTCAAGGGGGGAACTGGCTTTTTTGCCTTTC
CCTCCAAAATTAAGGATTACCCCTCTTTAAAAATTTGTTTTCCAAACCCCGAAGA
```

AATTCAACTTAAAAATCCCCGGGAAAACAAGGGGGCCGGGGGGGGGGTTCCTTCTGC
AAATTTTTTTGGGAAAACCAAAAAACATAAAAAAAGAAATCCCCC

>pED7_F-CA 1482 nt

GATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTTCACGATTAACAAG
ATGATCTCACCCATCCAGCAGTGAAGCATTAGTGGCTTACCATATTTCCGGCATGCTGC
ACCAGTCTCCCCCGAAAGCAGTCATGCTTTAGATGTGCAAAAATTACGTAACCCGACAG
TGACATTCTGGTCAGTATGGGAAGGCGAACAACCTCGCAGGAATTGGTGCCTGAAGTTG
CTGGATGATAAACACGGCGAGCTGAAATCAATGCGTACCAGCCAAATTATTTACGTCGT
GGTGTCCGAGTCTGATTTTACGCCACATTTTGCAGGTCGCCAGGACAGATGCCTTCAT
CGCCTGAGCTTAGAAACGGGTACACAGGCTGGATTTACGGCCTGCCATCAACTTTATTTG
AAGCATGGTTTCGCTGATTGCGAACCGTTTGTCTGATTATCGACTTGATCCACACAGTCGA
TTTTTATCTTACGCTATGCGAAAATAATGAATTGCCAGGCCTATGCGGCCGTAAGGG
TCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATG
ACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTGAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTG
GTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGAAGTACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTC
GGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT
GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGT
GTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTACGTCAGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAACA
ACAAAAGGGCCTCCTGATACGCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCT
TAAGATCCGGGAATTCGGCGGTGCTTTTTGCCGTTACCCACCACCGCGTCAGTAGCTGAA
CAAGAAGGTACAGCTGATAAAAACAGATGCACTGCAGCACCTCAAAGCTCATCATGCA
CTAAATCAGTAAGTGGCAGCATCATCCGACGTACTTTGCGCCTAATAATACCTGTGACGG
AGCATCCTTCCAGATAAAAAATCCTGGCGTCCCGGTTGATTCCGGAAACCCCGGGGCTA
CTTTGGCGAAAAGAAAATTTGAGGGGCAAAAAGGTCCACTTCCCAAAAAAAAAAAAAAC
CCCCGGGGATTTTTTGTTTTTCTTTTTGGGACTAGGACCAAGGGAATAATTTTTTC
CCCTTTTTTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTGGGTTTTCTTTTTCCCCGTTCTAAACCCCC
CCCCCTTTTGGTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCCTCTCCCCGT
GTACAGAAAAAAGAGGGGGGGGAGGGGGGGCGCCCCCACCCC

>pED8_F-CA 1510 nt

AATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAGC
AGTAACGCGCTGCAACCGTGGCATTACTTGTGTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCCC
GCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCAGGACTGCCGACACGTAACATG
AAAAGTGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGGCAGCATGGCG
GGAGAGATAATCCACAGCAGCGTATGACCTTACGCTTAAACGTTAGACTCCGTGCGGCTG
GTGTTTGTGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGATAT
GAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTACGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCGGAAGTGT
CTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGTCA
ACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGAGG
TGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGGTG
ATCGAACATTTTTGTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTATC
GACGTGCGCAGCAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGACAACACGCTCAGT
CACCCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCCACAGT
TTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAAA
CAGCACGCTGCGGATCAATAACCTGACGATGCCGGTGAAAAACGACGTGTGTGATACCC
GTACCTGGCTGGAACACATTAAGGTTTTTGTAAACAACCGACAGTTGCACAAAACCTATCG
TCATCGACAAAGGCCGCGCTGTATTTAACGGTTTGTATCAACGTCGCGCAGCAGCCATCAA
ATCGGATGGTCCGATGACCGACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGAAC
GAACCGCAGCTGGAAAATTATGGAGAAGAAATTAACGCCTCCCCCGGCCAACGGGG
GGGGCGAATGGATAATGAACAAAAATCTTTCTGCCTCCCGGGATCAACACAAGATGGC
CATAAAAAAATTTTCCCTTCCCTGCCAATTGAAAAAACCTGGGGTAAAAGGGGCT
TTAAAAAAGGTTGGGCCCAACCGGCCAAGTTGTCAAAAGAGAAAAACCTTTTGGCCG
TAAGGGGCCCGCACCCACTTTTTTGGTTTTGGCCCGTGAGAAAGAAAATAACCCCAAAC
CCCTGTTTTTAAACCCGGGCCCGGGTTTTAGGAAAAAATAATCCAAAAAAT
ACCCCCCTGTGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACAACCGCCCTTTGGGTGGGAGAA

>ED9_F-CA 1307 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCCTGGAACACTTTTTGTG
ATTGGCTTTTTGGCTGCTGATGGCCACCGGCGTTTCGTTGCTGGGCATTATCCCCGCGCT
GGTTGTGGCGACGGCCATTATGGTCCTCGGGCGTATGCTGGCATTGATGATTAAGTTGCT
GCCGTGGTTACTACTGGCGATTGCGGAGGTGTGGGTTATTAAGGCGATTAAGCACCAA
AAGTGCCGAAATATCAGCGTTATGACCGCTGGCGTTACGGCCTATGCGGCCGCTAAGGGT
CGACCTGCAGCCCAGCTTAATTACCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCATGAATGA
CCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTACAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGG
TGAGAATCCAACCTAGGGGAATTCATCGTGACTIONGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCG
GTGACGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGACACAGCTTGTCTG
TAAACGAATGCCGGCAGCAGACTATCCCGGCAGGACCCGATCCGGGTGTTTGCGGGTG
TCGGGGCGCACGCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAATAC
GACAGTGTCTCGTTGCCGCTTATTTTTATAGGTTATGGTCATGATAACAGTTGGATTCTTTG
AAATTGGGATGTCTTGTGCTTTTGTGCTTACGCAATTTAGCCATTTCTCTGCTGGCG
AGGGACGGCTGATGAAAATAGACGCGTCTGGAGCTCAACGATGACAACATCATACTGCG
GATCAGTAGTTGGCAGCATCACAGGACGCACGTTGGGTGAGATACGTGCCTTTGACGCG
AACATAACTTCGGTTATTACTTAATTCCTGGTGTGCATGTAGATATCCGTGAAGCCTCTGG
CGCCACGCTTTATTTAAATGAGACGATCGATAGGCAGGCCAGAGGCTCAAGACTGAATG
ACAGAATGACCATGACACTACTCGCGTGATGATCTATCGAGTGGCAGGATCACCAAGAA
CGTAGCTAGCATACTATGCATGATAATATCGACTGCATACACGACGTACAATGCTCCTA
AGTGCATGATGAAAGATATTGCGACCGACCTTCAGTCGGCACCTCACATGTACGATACTA
GACATGATCGCTCGATCTTACGGGTACTATCGGACCGTGAACCCGATCTATTCGAGACAG
CGTTATATCTCAGCCGTCTACTACTACGTCCCAAAGTACTTGTGTCCGAC

>pED10_F-CA 1301 nt

TATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCCCGTGGTTCCGAACAGCA
CCGTTCCCTATAAGGGCGGCTATGGCTTGGGGATGGACGAAGGGCCGTCGGCCCTTTAA
TGTGGTCACAATTTCCAATCATTGCTGCGTAAACATAGGCCTAATGTGGACTCTCCCCTGT
TGATGGCTACCGCTAGCGTGACGGTTCCTGGCTTTGGTTGACCTCTTTGCGAACTACCT
GCCCGCAGCCCCATGACTGCTGGCTTGTCCCTCTAGGGCGGGGCCGCTGGAGTTAGG
CAATGGGCGTTGATCGTCCACTTTGGGTGATCCATCTGATGGCCTGCTGATTGATGCTCAT
GGCTTTGCCGATGTTCTATTTTACCCGACGGGGCTGCTGTTTAGCCAATATGTACGGTAA
AGACGTCGTTTCTGACGTTAGCAATTATTATCTCAATCAGGCGTATCTCGACCTCAACAA
ATTGCTGCTGTACGCCGAAGCACCCACGGCGGTGCTGGTGACATGCTAACTGTAGGAATC
ATTGACTTCCACAAATTAGGCGCCATCAGTGTTCAAAAAGGGATGGCCGCTACTGCTTT
CACGCGATGGGATGCATCTTCTGGTTGGCATCAAGGAAAATGATAACGAGCAGACAGAGA
GGCCCTTGTGATGATTACGGTAGTGTCTATCTGGCTGGCTCGATCCTGCTGACTTATG
AGTGTCTTCTGGAGTGTGTGATGCCTTGCCATCTAGCCTGGAGTACCCTCTGATGGCCCA
TCTGTTTAAACGCATCGCTACTGCGATGCCACAGAGAAGCACAGTCCGGGGCCGGTAGCA
GCTGATCGCATAACGCTGTCAAAAACGAGTCTATGCAACGCGTGTCTCCCTGGAACCACTG
TTCTGTTGCACTGCGAGGTCTAGAGGACTGTCAGTGTTACAAGGACAGAGTCATTAACTG
ATCTTGAACCTGCTGGTCATACGTCAGTAATGAGCTGCGAAGCTCCATCCTGAATTAATCC
GAAGTGTCCGAATGTCGACGGAGTGTATATATAGCGAGATCAAGCTATGCGATCATCCT
GGACTGATGACGATCTGACTGTGGGTTTATGGTGTACAGCTGATACCTCTGTGCTCCGCT
GCATCATAACGATCAGAGCCTCATCGTTAGCGATTACAGCATAACACCACTCGAGCACTCCA
GATGATCGCGTTGTATCTGTGCATGCTGAACTGCACATGCCGTACCGTATGGTACTAAG
TACTATAGCAGCAGCAGAGCGACGCAGCTATGCACCATGTAT

>pED11_F-CA 1563 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAG
CAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCC
CGCAAGCACAGCAGCATTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACAGTAAACAT
GAAAACCTGAAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGACGATTGC
GGGAGAGATATCCCACAGCAGCGTGTGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGGT
GGTGTGTTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTACGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCCGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTGACCTGAATGATGCTCGTCAATTTACCGGGGCACGGTTCATAT

CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGAAAACCCGCTCAG
TCACCACTTTGCTCATAACGATGTGTTGCTGGCTGAAGATGCCACCGCATTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACATAATAAAGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTTATTTAACGGTTTTGATCAACGTCGCGCACCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACATCAATCTGCTGATGGGCAAACTGGGCGGAATTG
GATTCAAAACCGCACCTGGAAATCTATGGAAAAGAAGTAAAATGGCAACCCGGGCGGC
AGGGTGGGGCGAATTGATAAAGAAAAAAATTTCTCTCGGCCCGCCCGGAACCAACAA
AAGGATGCCAAAAAAGAATATTTTCCCTTCGGCCAAAAGAGGAAAACCTGGGGGATGAA
AGGGTTTTAAACAGGGGGCTGGCCCAATCCCTCCCGCCGTGCCAGGAGGGGCCAAAGGG
CCTTTGGGGCCCCAGGGGGCCCCCGCCCCCCCCCTTTATATGAGGGTGGGCCCTGTGGA
AGAACCAAAAAACACCAAAAAAACCCCTGGGATTTATGAAACCCCGCCCCCCCCCGGG
TTTTTTTTTGAAAAAACAAAAAGGAAAAATATAAGAGACAAAACAACCCCCCCCTGTG
GGAAAAAAACTACACACCTCCCCACATACCTTTTTTTTTAGAGAGAAAAACAACCCGCG
CGGGGGGGTGGGGCACC

>pED13_F-CA 1269 nt

CATCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCACAAATATTTTTGAACC
GGCGAAACCTACCCTGCCTGGTGAGGACTTCTCATCGTTCACTTATCTGTTTGGCGTTTCG
GGCTGTTGGCTATCCCTGTTTCGCATGACGTGGGACGGGACTTGATCGTGCAGCTCTCG
ATTCGCGCGAGCGGTTTTCCGAGCACGCCACATTTTTGAAAAATATGGTGAGAATTTCCG
GTTTGTCCCGTATCTCAATCATGATTTACC GCCCTGACGCCGGATGACCTGAGGGTGTCT
TGACCTATACCGGACGCCATTCTCGGATGGGTATGTTTTCCACTCTGTGCTATCCCCATA
TTCGATCTGCTCAAGTCTGGTCAAACGTGGTGCTGACTGCACCTACCACCATGGGCAGA
AATGCCCTCTCCATTGCTCGGCATGGGAACTTTTAAACGGATTGTTCTGGTTGATC
CGACCGTGCCCTTGCCGACAAAACCCGTCGCCGACTGATTGAGCGATTCCGGTGACCGAT
ATCAGATCATCCGCCTTCTTCCCATGTGTGCCATTCCGATCAGGCTGTTTATGTGTTAAC
TCATGGAGCGAGTGAACGAGCGTGATCACATCCTCGACCTTGACCTCTTCGTCTTTGACG
ATGTTTACAAGATGGCGTTCCTACCACTGAAAAGCGGGGACATTGATCATCGACACCAAC
GACTCATCATGCTCTGCATTGATTAACAACACTGCTTATGGGCTCCATGCTGTTGTACCT
GACTGTACCGCTCTCTAACAGCGTTCACGGTCTCAAAAACTTGGATATCAGCATACTTT
CGTACTACCGACTTCCATACCTGGTTGCCAGATGGCTGCATGATCGGCATCTGAGCGAA
TGACTACTAGCCGAGCTCATAGCTCTGTGGGAAATCTCGCGCATCTGTGTGACATCA
CGATCATTATAGAGCGAGTCACAACTGAAATGCTGAGCCCTGATGGCCGCGCGAGCTGA
TCAGTTTGGCATGGGCCCTCCGACTGAAAAGTCCGCAATGTGTCGATGTGTCACGATA
AGCTCGACTGACTGACTGGCACTTCTACAGTCAGCCCGTAGATACGTATCGACTTGCAC
TTTAGGGCCGCTGACTGAGGCCATGACAGTCGACTACACTGGCCAACCGAATCCATGCTG
CAGACTGCGCCTTGACTGCACTTCAGATGCATGACGTAGTCAATCATAGTCTCGTTAAGA
AACG

>pED15_F-CA 1458 nt

CTTTTCACCAATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCC
GTGCTTCGTGTAATGGATTTACTTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGA
TGAAAGTGGGAACGGATGGTATTTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAA
CGTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACC
GATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCA
GGAAAATATCAACCACTCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTC
AGCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACT
ATCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACG
CTTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTTC
TGCGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGC
TGGCATTTACGTTTGCAGCGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGT
GCTGCTGGCATTCTCCCCGAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGG
GCCAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTAT
GGGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACT
CCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGG
TTGCCCGCGGGCGTTTTTTATGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGAC
TGACGATCTGCCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCC

CGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCG
CGTCAGCGGGTGTGGCGGTGTCGGGCGCACCATGACCCAGTCCGTAGCGATAGCGGAT
GTTAATTCTTGAAGACGAAGGGCCTCGTGATCGCCTATTTTAAAGGTAATGCCTGAAAAA
AAGGTTCTAGGATCGGGAGTCGGGGGGCTTTGCCTTCCCCCCCCCCCCAACCTAAAGGGG
AAATGAAAAACAACCCCGGGCCCCAAAACCCCATCCTAAATGTAAGTGGGGCCCCC
CCCTTTTCCCAAAAACACTGTGGAAAAAATCAAAAAAATTTGTGCCGTTTCCGGACCGCCCT
TAAAAAAGTTCGAAAAACATTTCTAAAAAATAAACGCGTTTTTTTTTATTTTAAAA
AAAAAAGAAAAACATCCTCCCGA

>pED17_F-CA 1675 nt

CTATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGT
GCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTTAAACAGTTTTTTTGTGCTCACGATCGCTGTGCGATG
AAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACG
TTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGA
TGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGG
AAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTTCAG
CAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTAT
CAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGCT
TGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTG
CGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTG
GCATTTACGTTTTGCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGC
TGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGGC
CAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTT
GCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCC
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGCG
TCAGCGGGTGTGGCGGTGTCGGGCGCACCATGACCCAGTACGTACGATAGCGATGAA
AATTTCTTGAAGACAAAGGGCCCCGGAACGCTATTTTTAAGGTAAGGCTGAAATAATGG
TTCTTAGGATCGGGAGTCCGGGGGGTTTTGCGTTCCCCACCCGTCATACTGAACGGAGG
AACTGAAAAACAACCCCTGGACCCCCAAAACCCCTTACCTAAACATAATTGGGGCTA
CCGACCCTTTGCCAAAAAATTGGGGGGAAATTCAAAAAATAATCGGGGCCGTTACGGGG
CCGGGCCTTGTGAAGAAAAAATAGGCCAAGACCTTCCCCAAAAAACCCTGTTTTTTT
TATATTAAGAAGAAGAGAAAAAACACATTACCGCCACAAATTTTTCTCTGCCACCCC
CCCATTAAAAAATACTCTTTCCCGTAAAGGAGTGATTGCTTATCTGTTTATCTGTTATG
AGAAAATTAAGTATAAAATTAGAGATTTGTTATTTATGAGGGTATAGATTGTTATAGT
TGGGAAGCGAGTGTGATTTGCTGGGGTGGGTTGTGGGAGATAGTGAATATATGATTGAT
AAAT

>pED19_F-CA 1715 nt

TTTTACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCG
TGCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTTAAACAGTTTTTTTGTGCTCACGATCGCTGTGCGAT
GAAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAAC
GTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCG
ATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAG
GAAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCA
GCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTA
TCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGC
TTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCT
GCGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCT
GGCATTACGTTTGGCGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTG
CTGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGG
CCAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATG
GGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTC
CTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGT
TGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACT
GACGATCTGCCTCGCGCGTTTTCCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGC

GTCACCGGTGTTGGCGGGTGTCTGGGGCGCACCCCTGACCAGTCACGTACGAAGCGATGAA
TTTTTTGTTGAGAAAGAAAGGGCCCCGAAACGCCTTTTTTTAAGGTAAGGCCGAAAATA
AGGGTCTTAGGATCCGGAATTCGGGGTGTTCCTTCCCCCCCCGCTTACTGAAAG
GAGGGAAGTGAAGAACCAAACCTGGGGCCCCAAAACCTCTACCTAATAGAATTGGGG
CCCCGCGCCTTGCCAAAAACCGGGGGAAAATTCCAAAAAATCTCGGGCCGTTCCG
GCCGGCATTGTTGGGAAAAAGATGGCCAAGGCATTCCAAAAAACACCGTTTTTTATTGTA
AAAAGAAAAAACATTACCCAAATTTTTTCTCCCCCCCCATAAAAAAATTTTTTTTCGCC
CGCGAGGGCCATTACTCTGGTATTTCTTGC GCGCCCGCCCGCGGGTGGTTTTTCTCTCCC
CCCCCCTCCCTTCTCTTTTTTTACTTATCTTATATTTTTTACTCTCTCACCCCTCCCC
CCCCACCTATTATCTTCTTACCTCCCCACCAACATAACATCACTTAATATAATAAACTTT
TAAAATTTTTTCTTCATTTACCACCCCACTATTT

>pED21_F-CA 1724 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGTTG
CTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATGA
AAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACGT
TGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGAT
GACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGGA
AAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTACAGC
AGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTATC
AGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATAACCACTACGCTT
GATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTGC
GTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTGG
CATTTACGTTTGCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGTCT
GCTGGCATTCTCCCCGAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGGGGCC
AGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGGG
CCTATGCGGCCGCTAAGGGTTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCT
GTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTG
CCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTGA
CGATCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCCG
AGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGCGT
CAGCGGTGTTGCCGGTGTCTGGGGCGCACCCCTGACCAGTCACTAGCGAAGCGATGTATTTT
TCTTGAAACAAAAGGGCCCCGGAACGCCATTTTTTAGGTAAGGCAGAAATAAGGGTTCC
TAGGATCCGGGAGTCCGGGGGGTTTTGCGTTCCCCCACCCCTCCTTACTGAAAGGAGGAA
CTGAAGAACAACCCCGGGGCCCCAAAACCCCTTACCTAATCTAATTGGGGCTCCCCGCCCT
TGCCAAAAACCGGGGAAAATTCAAAAAAAACTGACCCTTTACGGAACCCGCTTTGGAA
AAAATATAGGAAAGGCCTTCAATAAAAAACCCGTTTTTTTTATTGAAAAAAAACAA
ACCTTTCCTCCATTTTTTTCTCCCCCTGTTTAAAAAATTTTTCCCCCTGGGTGTGATTG
GCTATTTTCTGGTGGGGGGGGGGGGGGGGCCGGGGGGTGTTTTATAAAAAAAAAGGGATTT
TGAATTAGAAAAAAAACAAAAAAAACAAAAAAAACAAAAAAGATACCCAG
GGCGGCGCCCCCGCGAGAGAGAAGAAAGCGAGGCACACGAGCGCACACAGCAA
CAAAAAAAAACAAAAAAAACAAAGAAGACACCCCAAGCAAACGCACCGAGCCAAGC

>pED22_F-CA 1445 nt

CATTACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGT
GCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATG
AAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACG
TTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGA
TGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGG
AAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTACAG
CAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTAT
CAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATAACCACTACGCT
TGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTG
CGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTG
GCATTTACGTTTTCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGC
TGCTGGCATTCTCCCCGAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGGGGC
CAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTT

GCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGA CTGACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAACAAACAAGCCCGTCAGGGGGC
TCACCGGGTGTGGCGGTGTCGGGGCGCACCATGACCAGTCACGTAGCGATGCGGATGT
AAATTCTTGAGAACAAGGGCCTCGGATCGCCTATTTTTAAGGTAAGCCTGAAAAAATG
GTTTCTTAGAACGGGAGGCCGGGGGTTTTTTCCTTCCCCCCCCCCCCAAATGAAAGGAG
GGAAAGTGAACAAAAAACC CGGGCCCCAAACCTTACTAAAAGGATTGGGGCCCCC
CCCTTTTGCCAAAAACTGGGGGAAAAATTCAAAAAACC CGGGCCCTTAAGGAACCC
GCCCTTTGAAAAAATAGAAAAACATTTCAAAAAAACAACGTTTTTTTTTTTTTT
GAGAAAAAAGAA

>pED24_F-CA 1766 nt

CTTTCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCG
TGCTTCGTCGTAATGGATTACTTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGAT
GAAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAC
GTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCG
ATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAG
GAAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCA
GCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTA
TCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATAACCACTACGC
TTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCT
GCGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCT
GGCATTACGTTTGGCGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTG
CTGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGTTGG
CCAGACCAGA ACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATG
GGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTC
CTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGT
TGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGA CTGACT
GACGATCTGCCTCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGC
GTCACCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCACCTGACCCGTACGTACGTAGCGATGTTT
TATTTCTGTAGAAGAAAGGGCCCCGGAACGCCATTTTTTAAGGTAAGGCAGAAAAAAG
GGTCTTAGAACCGGGAGTCCGGGGGGGTTTTTTCCTTCCCCCCCCCGCCTTATTGACAG
GAGGGA ACTTAAGAAACAACCCGGGGCCCCAAACCTTACCTAATACTAATTGGGGC
CCCCGCCCTTGCCAAAAAACC CGGGGAAAAACCTCAAAAAAACAACCTCGTGGCGGTG
TCCCGGACCCCTTGAAAAAAGGAAGGAGGGGCCCTCCCCAAAATATACACCCCGG
TTTTTTTGTGTTTGGGGGAAAGAAAAAAGACCCACACCCGCCAAAAGTTTTCTCTCC
CCCCCTTCTTTAAAAAATCTCTCCGCCCGGACGTGTCTCGATCCACGTGCTGTCTCCG
TGCCCCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGGGGGAACGGGGTGAAGGGGGGGGGGGGAGGGG
AATATGTATAAAATCATGATGTACATTTATAACAATAACAACAAA ACTACCCCCACTCCTT
CACTCTCTCTCACTACCCCCCACTCCCCCCCCACACAGTGGGATGGTGAAGGTTATAC
TTTAAATACTAACTCCACAACACAACCCCCACCCC

>pED31_F-CA 1689 nt

TATTAACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGT
GCTTCGTCGTAATGGATTACTTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATG
AAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACG
TTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGA
TGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGG
AAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTAG
CAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTAT
CAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATAACCACTACGCT
TGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTG
CGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTG
GCATTTACGTTTGGCGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGC
TGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGTTGGC
CAGACCAGA ACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGGTT

GCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGTATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGCG
TCAGCGGTGTGGCGGTGTGGGCGCAGCCTGACCAGTCCGTACGATGCGATGAAATATT
CTGTAGAAAACAAAAGGGCCCCGGAACGCTATTTTTAAGGTAAGGCATGAAATAAGGGTT
CTTAGAACCGGGAGTCCGGGGGGCTTTGCCTTTCGCACACCCCTCGAACTGAAAGGGGG
AACCTGAAAAACAAACCCTGGGGCCCCAAAACCCTCTACCAAATAGAATTGGGGCCCC
CGCCCCTTGGCCAAAAAACGGGGGGAAAAATTCACAAAAAAAAGGGCCCGTTTCGGACC
GGGCCTTTGGAAAAAATTTGGCGAAGTCTCCCAAAAAATAACCCGTTTTTTTTTTTTTAA
AAAAAAAACAACTAACCCTAAATATTTTTCTCTCCCCCTTTAAAAAAATTC
TCCCCCCCCCGCAAGTGTCTAACTCCCTTAGTGTGCTTTGGCCACACCAATTCCTT
TTTGTATCAAATATTTATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCTGCCGATCCCCCGTGACCC
CACGGCTCGGCGCTCACACCTCATTGATAATTATTTGTTTGTGTTGATTTTTTTTTTTTC
TTTTTTTTTTTT

>pED35_F-CA 1761 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGTG
CTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATGA
AAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACGT
TGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGAT
GACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGGA
AAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCAGC
AGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTATC
AGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGCTT
GATCACCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTGC
GTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTGG
CATTTACGTTTTCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGT
GCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGTTTATGGG
AGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGGG
CCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCT
GTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGGTTG
CCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTACTGACTGA
CGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGTATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGG
AGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGCGT
CAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGCGCAGCCTGACCCAGTACGTCAGTACGATAGCGAATG
TAATATTTCTTAGAGAAGAAAGGGCCCCCGATCGCCATTTTTAAGGTTAAGGCAGGAA
ATAAGGGTCTTAGGATCCGGGAGTCCGGCGGGCTTTGCCTTCGCCACCCCTCATACT
GAAAGGAGGGAACCTGAATAAACAAACCCCGGGGCCCCAAAACCCTCTACCCTAATCA
GAATTGGGGCCTCCCGCGCCTTGCCTCAAAAAACGGGGGGAAAACATCAAAAAA
CGGGGCCGTACCGGGAGCCCGGCCCTTTGAAGAAAAGAGAGGCCAAAGCCCTCCCCCA
AAAAAACCCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGAGAAAAAAAACCCCTCTCCCCCTCTTAT
TTTCTTTTCTCTCTCCCCCTTATATATAAAAAAAATTTCTCTTCCCTGGAGAGAGAG
AGGGGTGCTCTGATCAATTGATTGAGCGGGTGGATCGCTTCTTGTTTTTTTTTTATAATA
AAAAAAAACCCCGTTAAAAA
AAAAACTGCCATCTTTTGCCTCACGTT

>pED37_F-CA 1523 nt

CTATTCAACCAATTCACCCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCAGTACGCCTGAT
TTTTCTACTGCCGAGAATAATCAAGAACTGGCAAATGAAGTCTCCTGCCTGAAAGCGATG
CTGACGCTGATGCTGCAGGCGATGGGACAAGCTGACGCGGGCCGCGTGATGTTAAAGAT
GGAAAAACAGCTTGCCTGATCGAAGACGAAACCCAGGCTGCAGTATTTTCCAAAACGG
TTAAGCAAATTAACAAGCCTACCGTCAAGGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGC
AGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAA
CTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATC
CAAGCTAGGGGAATTCATCGTACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGTATGAC
GGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGC
CAGCCATGACCCAGTACGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGC

CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGATCCGG
GATGTCCGGCGGTGCTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGAC
AGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCATCATACACTAAATCAG
TAAGTTGGCAGCATACCCGACGCACCTTTGCGCCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATC
ACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACT
TTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAAAAGGTTCCAACCTTACCATAATGAA
ATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCT
AAAATGGAGAAAAAATCACTGGATTTCCACCGTTGAATATTTCCAATGGCATCGTAAA
GAAAATTTGAGGCATTTCAAGTCATTTGCTCAATGTACCCTAAACCAACCGTTTCCCCT
GGAAATTACGGGCCTTTTTTAAAAACCGAAAAAAAATAAAAAACCAAAGTTTTTTCCC
GGCCTTATTCCCTTTTTTCGCCCCCGTAAGAGATGCTTTTCCGGAAATCCTTTTGAAAA
AGAAAAAAGGGGAGACGGGGGAATGGGGAAAAGGTTCTTCTTTTTCCCGCTTTCTCC
GGAGAAAAAAGATTTTCTCTCCCCTGGGGAGAAAAACCAAAAAATATCGGGGGTT
TTTCTCAATTTTTCAAAGGGGGGTGTGGGAAACCCCCCTTCCCAAGGTGTTTGAAT
AAATTTTTCCCCCCCACCCCCGGGGAC

>pED39_F-CA 1686 nt

TTTTACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGT
GCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATG
AAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACG
TTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGA
TGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGG
AAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTAG
CAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTAT
CAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGCT
TGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTG
CGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTG
GCATTTACGTTTTCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGC
TGCTGGCATTCTCCCCGACGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGGC
CAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGAACGCTCGGT
GCCCGCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAACTCAAGCTAGGGGAATTCATCGTACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCTTTTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCG
GAGACGCTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTACGGCGG
TCAGCGGGTGTGGCGGTGTGCGGCGGACCTGACCCGTCACGTACGATGCGAATGA
AAATTTTCTTAGAAAAGAAAGGGCCCCGGAACGCCATTTTAAGGTAAGGCAGAAATAAG
GGTTCCTAGGATCCGGGAGTCCGGGGGGTTTTGCGTTTCGCCACCCGTCGTAAGAACGGA
GGACCTGAAGAAAACAAACCTGGGACCCCAAAACCTTAACAAAAATAATTGGGGCCC
CCGACCCTTGGCCAAAAACGTGAGGAAAATTAAAAAAAAACCGGGCGGGGTGCGGGAC
CGGGCCTTGGGAAAAGAGAGGGCGAAGGCCTTCCTCAAAAAAACCCCGTTTTTTTTTTATT
GGAAAAGAAAAACCCCTTCCCCCTCAATTTTTTTCTCCCCCCCCCTTCAAAAAAAA
ATTTTGTCCCCTTAGGAGAGTGTGTGAGATCACGTAAGTTTTGTGCGGGCATGATCGGTA
GAAGGAGGTTGGCGTGCAGCGGGGGATTAATACTTCTAAATTAATCTATAATCTTATC
ATCGCCAGTCTACTGCTTTTAATCATTAGATATAACTAAATATAATAATAACTACCAGC
GACCGCTATCATGACA

>pED40_F-CA 1388 nt

CATTCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCG
TGCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGAT
GAAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAAC
GTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCG
ATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAAGTGAAGCTCCCGCGCAGGCGCAG
GAAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCA
GCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTA
TCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGC
TTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCT
GCGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCT
GGCATTACGTTTTCGGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTG

CTGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGG
CCAGACCAGA ACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATG
GGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTC
CTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGT
TGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACT
GACGATCTGCCTCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
CGTCATCGGGTGTGCCGGTGTCCGGGCGACCATGACCCAGTCACGTAGCGATACGGATG
TTAATCTTGAGAACGAAGGGCCTCGTGATCGCCTATTTTTAAGGTAAGGGCAGAAATAA
AGGTTCTAAGATCGGGAGTCGGGGGGTTTTGCCTTACCCCCCTCAAAGAAAGGAGG
AAACGAAAAAAAAAAGCCGGGGCCCCAAACCCCTCCCCAAATTAATGGGGGGCCCCCCC
TTTGCCAAAAAACGGGGGAAATATCCAAAAAACGGGCCTTTTCGGAACCGCCATTTT
AAAAAAAAAATACA

>pED41_F-CA 1529 nt

CATTAACCCAATTCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCCCGCAATCACAGAAT
TTCTTTACAGGATATCGCTACGCTGGCTGGCGTAACAAAAATGACCGTGAGTCGTTATAT
CCGCTCGCCGAAAAAGGTGGCAAAGGAAACAGGCGAGCGCATCGCCAAAATTATGGAA
GAGATCAATTATATCCCTAATCGCGCTCCCGGCATGTTGTTGAATGCACAAAGTTATACC
CTCGGTATCTTGATTCCGTCATTTCAAATCAACTCTTCGCTGACATTCTCGCGGGAATAG
AATCCGTCACCTCTGAGCATAATTATCAGACCTTATTGCTAATTACAATTACGATCGCG
ATTCCGAAGAAGAGTCGGTGATTAACCTGCTCTTATAACATTGACGGGATTATACTTT
CGGAAAAATATCACACCATCAGGACGGTGAAATTTCTGCGTTCAGCCACCATTCCGGTCC
TGGAATTGATGGATGTACAGGGAGAACGGCTGGATATGGAGGTCGGTTTTGATAATCGG
CAGGCCCGTTTTGACATGGTGTGTACCATGCTGGAGAAGCGAGTCAGGCACAAAATTCTG
TATCTCGGTTCCAAAGATGACACCCGCGATGAACAGCGTTATCAGGGGTATTGCGATGCG
ATGATGCTGCATAATCTTTCCCATACGCATGAATCCACGCGCCATCTCATCCATTCATT
TAGGAATGCAGTTAATGCGTGATGCCCTTAGCGCAAACCCGGATTTAGACGGTGTATTTT
GCACCAATGACGATATTGCGATGGGTGCGCTTCTGCTGTGCCGCGAGCGAAACCTCGCCG
TGCCAGAACAATTTCCATTGCGGGTTTTTCATGGGCTGGAGATTGGCAGGCAAATGATCC
CAAGCCTCGCCAGCGTAATTACTCCCCGTTTTGATATTGGTTCGGATGGCCGCCCAAATGT
TGCTGAGCAAAATTAATAACGATCACAACCACAACACTGTTGACCTCGGGTATCAG
ATTTATCACGGCACACGCTTGGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTT
AATTAGCTGAACTTGACTCCTGTTGAAAGATCCAGTAATGACCTCAAACCTCATCTGGA
TTTTGTTCAGAAGCTCGGTGCCGCCGGGCGTTTTTATTGGTGAAAAATCCAGTAGGGGAAT
TATCGGCTGAATGACAAATTGCCCCCGGTTTTGGGGGAAAACGGGAAAACCTTTGAA
CAGCGCCCCGAAAAGGTCCACTTTGTTTTAACGAACGGGAAAAAAACCCCTCGGGCCC
CCTCGGGGGGTGGGGGGGGGGGCCCCACACCCCCCAAAGGAAAAAATAATTTA
AAAAAGGCCCTCGGCCCTTTTTTTTTATTGTAATAAAGTTTTTTAAACGGGGGGGGG
GGTTTTTCTCCCCCCCCCGAAGAGGGGGGGGAAAAAACGCCGCCACCACCCACACC
ATATGCGCCCCCCCCCGCCAAAAAATAA

>pED60_F-CA 1627 nt

CCAACCCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCG
TGCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGAT
GAAAGTGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAC
GTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCG
ATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAG
GAAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCA
GCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTA
TCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGC
TTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCT
GCGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCT
GGCATTACGTTTGGCGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTG
CTGCTGGCATTCTCCCCGCAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGG
CCAGACCAGA ACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATG
GGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTC
CTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGT
TGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACT

GACGATCTGCCTCGCGCGTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
GTCAGCGGTGTTGGCGGGTGTCCGGCGCAGCCTGACCAGTCCGTACGAAGCGATGTAAT
TTTTTTGTGAAACCAAAGGGCCTCGGAACGCCATTTTTAAGGTAAGGCTGAAATAAGGTT
CTAAGAACCGGGAGTCCGGGGGGGTTTTGCGTTCCGCCCCCGCCTAACTGAAAGGAGG
GAACCTGAAAAACCAAACCCCGGGACCCCAAAACCTTAACCAAAAATAAAATTGGGAC
CCCCGCCCTTGCCCAAAAAAAGGGGGGAAAAAATTCAAAAAAAAACGGGGGCGGGT
CAGGGGCCCGCCCTTTGGGAGAAGAGGGGGGCAAGGCTTCCCAAAAAAATAACGCGTT
TTTTTTTTTTGGAAAAAGAAAGACAACACACCTCACCCGAGGAAAGTTTGTGTGCC
CCCCCGAATATAAAAAAAAATTCTTCCCAGGAAGGAGTTCATTGATCATTGTG
TCTTTGACGCGCGGGGGGCCCCCCCCCCCCGGGGGAGGGGGGCCAGACGCACCATCG
GCCCTACCACTCTCTCCCT

>pED77_F-CA 1697 nt

CATCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAG
CAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCC
CGCAAGCACAGCAGCATTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACAT
GAAAACCTGAAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCATTGC
GGGAGAGATATCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGCT
GGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCATAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCCACTTGACGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAACCCGCTCAG
TCACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCACCAGGGCGCGACGG
TGGGCGTATTGATGATGAACAGAAATTCTATCTGGGCTCCGCGGGATCATCAGCAGGATG
CCCACAAAAGATAATTTTCGCTTCTGCAACTGACGAAACCCTGTGATAAAGGGGTTA
AAAACAGGGTGGGCCAACCGTCACGGTGGCCAAAAAAGGAAAAAAGCATTGGGGCGGA
GGGCGCACCCCGCCCACTAATTATTTAAATGGGGCCCTTGTAAATACAAAAAACCCAA
AACCCCAATTTTTAAACAGGCCCCCCGGGTCTTTTTTAAAAAAAAGAAAAA
AAAAATACCCCCCTTGTGAGAAAAAACAACAAAAACATTTAAAAAGAAAA
AAAAAGCGCGGGGGGGGGGGGGGGCGGCGCCTAATAAAAAATTTATATATTTATTT
TTTGTTTTTCTGGTTTTGCTCCGGTGGGGTTGAGAACGAGAAACAAAAACAAAA
AAACAATCATCTATTACATTGCTTTGTCACCACAACCACAAAAACGCTTGGTGTGG
TGTGGGGGTGGGGGGGGTGGGGGGGGTCAAAGG

>pED81_F-CA 1541 nt

TATTCAACCCATTCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAA
CAGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCT
CCCCGCAAGCACAGCAGCATTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAA
CATGAAAACCTGAAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCAT
TGCGGGAGAGATATCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCC
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC
GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA
CGGTGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGCAGCGAATGCCCACTTGACGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAACCCG
TCAGTACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCC
ACAGTTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG

AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGAT
ACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAAC
ATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGC
CATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAA
TGAAACGAAACCGCAGCTGGAATCTTTGCAAAATGATTTGAAATGCACCCCCCGGCCG
ACGGGGGGGGTATGAAAGATAAAACAATTTTCTTCTGGCCTCCCCGGGGATAATCACC
GGGAGGCCAACAAAAATCTTTTCCCCCTTCTGGCAACTGACGGAAACCCGGGGGAAAA
AGGGTTTAAAACAGGGCTGGCCAAACGTCAACGGTGCCAAAGGGAAAGGCTTGGGGGC
CCAAGGGGGCCCCGCCCACTTTTTATTAAATTGGGACCGTTGGAAAAACAACAAAAACCCA
AAACCCTCGATTTTTAAACCCCTGCCCCGGGTGTTTTTTTTAAAAAAACAAGAAAAATA
AAAAAAAAAAAAATCCCCCTTTGAAAAGAAAAAAACCAACCCACAAAAACAATTTA
AAAAAGAAAAAACACCCACGCGGGGGGGGGCGGCCCCACACCCAATATAAAA

>pED84_F-CA 1695 nt

TATTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCGT
GCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGATG
AAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAACG
TTGCCCTGATATCGGCGGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCGA
TGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAGG
AAAATATCAACCAGTCCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCAG
CAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGTTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTAT
CAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGCT
TGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCTG
CGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCTG
GCATTTACGTTTTCGGACGGATGTGGCGGAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTGC
TGCTGGCATTCTCCCCGAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTTCGTGGGC
CAGACCAGAACTATTCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATGG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTACAGAACGCTCGGTT
GCCGCCGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCC
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGCG
TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCACCCTGACCCGTCACGAGCGAAGCGATGTTA
TTTTTTTGTGAGAAAGAAAGGGCCCCGGAACGCCATTTTTTAAGGTAAGGCAGGAAATA
AGGGTCTTAGGATCGGGAGGTCGGGGGGGTTTTGCGTTCGCCACCCCGCTAGTTAAA
GGAGGGAACCTGAAAAACCAAAACCCCGGGCCCCCAAACCCCTAACCTAACCTGAAATCGAAAT
TGGGGCCCCCGCCTTTGCCCAAAAAAACGGGGGGGAAAATCCCAAAAAAACCGGG
GCCGGTAGGGGACCGGGCGTTTGGGAAGAGAGGGGGCCGAGGGCCTTCACAAAAAAA
CCCGTTTTTTTTGTTTTGGAGGAGAAGAAAAAACCCCTACCTCCTATTTTTTCTTTTT
CCCCCCCCGTCCTTAAAAAATTCCTCCCGCGGAGGGGGGGGCTGAACCGCTTGGCGA
TATCGGCGCGGGGCGTGAGCCGAGATCCGGTGGCGAGAAATGACGATGTCAGTGTTC
CACACAGTCGGGCCGGTGGCGTCGGGCGCCTGGGCGCCCGGCGACTGGTGGCGGCACA
GCGCTTCGGGGTGCTAGTTGCCGTAAGG

>pED101_F-CA 1695 nt

TTTTACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAG
CAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTGTTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCC
CGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACAT
GAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTCAGCATTGC
GGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGCT
GGTGTGTTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCCGACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCAGGAAAGT
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTCACTAT
CAACGTCGACGGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGAACCCGCTCAG
TCACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA

ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGATAACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCACGGCGCGACGG
TGGGGCGTATTGATGATGAACAGATATTCTATCGGCGCTGCGCGGGATCATCAGCAGGAT
GCCCAGCAGATGATCTTTACGCCTTCTGCCAAATGACGAAACCTGGTGGATAAGGGGTT
AAAACCAGGGCTGGCCCAATCGTCAACGGTGCCAGAAGGGGAAAAGCTTCGGGCCCCAG
GGGCCCTGCCACTTATTTTTAACTTGACCCCTTAAAACCAAAAACCCCAACCCCCCGG
TTTTCAAACCCCGGGCCCGGGTTTTTTTTGGAAAAAAAAGAGAATCTAAAAAAAATCCCC
CCCTTGTAAGAAAAACAAAAAACCCCAAGCCATTTTTGGGGGGAAAAAGGGGCGGGGG
GGGGGCGGGGCCACCAAAAAAAAATAAAAAAAAATAAAATATTATTTTATGTGCGG
GCGCCCCCCCCACAAAAATAATACAAAATACCCAAAATGGACTAGAGGGCGTGTGCTG
GACTTTTTTTAATATTATATAAAATTGAAACTACCCCCACACCCACACAACCGGAGTG
CTCGAGGGAGGTGTCTTGTATTGTTGTGT

>pED108_F-CA 1726 nt

GTATTCCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAAC
AGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTC
CCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAAC
ATGAAAACCTGGAATATAACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCATT
GCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCG
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC
GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA
CGGTGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGACGGAATGCCCACTTGACGCATATCAAGCTGGCGTTTGAACCCCGC
TCAGTACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCC
ACAGTTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG
AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGAT
ACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAAC
TATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCAGCG
CATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAA
TGGATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGACAGATGATGTGAAATGCACCACGGCGCGA
CGGTGGGGCGTATTGATGATGAAAGAAATTCTATCTGCGCTCGCGCGGGATCATCAGCA
GGATGCCACCAAAGATCTTTACGCCTTCTGCCAAATGACGAAACACTGGTGGATAAG
GGTTAAAAACAGGGGTGGCCCAATCGTCACGGTGCCCGAAGGGGAGAAGCCTTGGCGC
CCTAAGGGGACCGCGCCAACCTATTTTTGAATTGGAGCCCGTTAAAAAAAACCAA
AACCTCGGTTTAAACCCCGGGGCGGCGTTTTTTTTGGAAAAACACAGGAAATATCGAAAAA
AAAATTCCCCCTTTTGAAGAGAGACACAAAAACCCAAAAACATTTTGAAGAGAAAA
AACGGGGGGGGGGGGGGCGCCGCGCCCCACAAAAAAAATAATAATTTTATTATT
TATATTATTCCGCCCCCCCCACCACAAAACACAAAAACGCAAGAAAAGCAAACACTAC
ACCCACTACCACGGCCGCGGGGGCCGGGTGGGATGGTCGACTAAGGGCTATACGATC
ATAGGTTGGAGGACCAGAACGGAAGGCCCCCCACCCCGCGCGCGCGGTGTGGGCG
GGGGGTT

>pED110_F-CA 1558 nt

CCCTCCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAAC
AGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTC
CCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAAC
ATGAAAACCTGGAATATAACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCATT
GCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCG
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC
GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA

CGGTGATCGAACATTTTGTTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGCAGCGAATGCCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGC
TCAGTACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCC
ACAGTTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG
AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGAT
ACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAAC
ATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGTATCAACGTCGCGCAGCACGC
CATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAA
TGGATACAAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGGAATGCACCCACGGGCCGA
CGGTGGGGCGTATTGATGATGAACAGAATTCTATCTGGCCTCGCCGGGATCAACAGAG
GATGCCCCGAAAAAGAACCTTTACCCCTTCTGCCCCAACTGACGGAGCCCTGCGGGATG
AGGGGTTTTAAAAACGAGGTTGCCAAATCGTCACAGGTGGCCAGAGGGGGAAAAAGGCT
TTGCGGCCGCAAGGGGCCCCCCACCCCTTATTATTTAAATTGGCCCTTTGTAAAAAC
AAAACCCAACACCCCGTTTTTAAAAACCCCGGCCCCCGGGTTTTTTGTAAAAAAACAA
AGGAAAATATAACAATAAAAAACCCCTTTGAAAAGAAACAAAATACCCACCCAAA
ATTTGTTTGTGGAGACAAAAAGCGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCACAACAAAAAAA
AAAAAAAATAAA

>pED112_F-CA 1608 nt

CCCTACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTTCAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCAGGAGTG
TTTCTGCATTTGACGAAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAG
TCACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACATC
GTCAGCGCAAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGTATCAACGTCGCGCAGCAAGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAATGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGAATTGAAATGCACCCCGGGCCACG
GTGGGGGAATTGAAGAAAAACAAATTTTTTTTCGGGCCCCCGGGGAACAATCCAC
AAGGAAGGCCAACAAAAAGATCTTTTTCCCTTCCCTGCCAAACGACCCGAAACTGC
GGGATAAGGGGTTTTAAAAACAGGGCGGCCCCATATGGTCCAACGGTCCCAAAGGGCA
AAAGCCTATGGGGCCCTAAGGGGGCACCCCGCACCCACTTAATTTTTTAATATGGTACC
CGTAAAAAAAAGAAACCAAAAAACCCCTGGATTTTTAAAAACCCGGGTGCCCGGG
GTTTTTTTTTGAAAAAAAACAGGAATATACCCACACCGAAAATCCCTCCCCCTTTG
GGTAGGAACAACCACAACCCCTTTTGGGGGGAGGAAAACCCGGCGCGGGG
GGGGGGCGCGGCCCAAAAAAATAAAAAAGAAAAACACTATTTATAATTATTGCG
CGCC

>pED119_F-CA 1642 nt

TTATTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCTCACAGTCTACATCCG
TGCTTCGTCGTAATGGATTTACTTTTTAAACAGTTTTTTGTTGCTCACGATCGCTGTGCGAT
GAAAGTGGGAACGGATGGTATTTTATTGGGCGCATGGGCACCGGTGGCTGGGGTAAAC
GTTGCCTTGATATCGGCGCGGGTAGCGGGTTGCTGGCATTAAATGCTGGCGCAGCGAACCG
ATGACAGCGTGATGATTGATGCAGTTGAACTGGAAAGTGAAGCTGCCGCGCAGGCGCAG
GAAAATATCAACCAGTCCCGTGGGCAGAGCGGATTAACGTCCATACGGCGGATATTCA
GCAGTGGATCACACAGCAGACAGTACGCTTCGATTTAATCATCAGTAACCCACCTTACTA
TCAGCAGGGAGTAGAGTGCTCGACACCTCAACGGGAACAGGCTCGCTATACCACTACGC
TTGATCACCCATCGTTGCTGACCTGTGCGGCGGAGTGCATTACCGAAGAGGGATTTTTCT
CGGTAGTGCTGCCAGAGCAGATTGGTAATGGTTTTACGGAGCTGGCATTAAAGCATGGGCT

GGCATTACGTTTGC GGACGGATGTGGCGGAAAACGAAGCGCGACTGCCGCATCGGGTG
CTGCTGGCATTCTCCCCGAGGCGGGAGAATGCTTTAGCGATCGCTTAGTCATTCTGTTGGG
CCAGACCAGA ACTATCCGAAGCGTATACGGCGCTGACCCAGGCTTTTTATCTGTTTATG
GGCCTATGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATAGCTGAGCTTGGACTC
CTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTT CAGAACGCTCGGT
TGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACT
GACGATCTGCCTCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGTGTTCGGGCGCACCCCTGACCCAGTCACGTACGATGCGATGAA
ATCTTTTGTAGAAAAGAAAGGGCCCCGGAACGCCATTTTTAAGGTAAGGCTGAAATAAG
GGTCTTAGAACCGGGAGTCGGGGGGGTTTTGCCTTCCCCACCCGCCAAACTAAAAGAG
GAAACTGAATAAAACAAACCCGGGGCCCCAAAACCCCTACCCAAAAAATAATTGGGGCCCC
CCACCCTTGCCAAAAACGGGAGAAAACCTTCAA AAAAATTGGCCGGAACGGACCCGCCCT
TGAAAAAGAGGTGGCCAAACCTTCAA AAAAACC CGTTTTTTTTTTTGGAAAAAGAAAA
AAAACCTTCTCCCTATTTCTCTCCCCCTCTTTAAAAAAATTCTTCTCGCGGGGGGGG
GGCTCATCGCTTGGTTTTCTGGGGGCGCACTGATATAATAACTATCTGTCCACCGCT
GCGGTAGGGTAGTTTGGTGCAACCAGGCGCCGCGGGGCGCGGGTGGGCGGGTGCGCGGG
GTGATGTCTGTGGATAGGATGAGCAGCTCACTG

>pED128_F-CA 1661 nt

GCTTTAACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGT CAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGT CAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCATAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGA AAAACCCGCTCAG
TCACC ACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCAGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGTTGAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGTGGAACACAATAAAGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAACATC
GTCAGCGACAAAAGGCCGCGGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCCACGGCGCGACG
GTGGGGCGTATTGATGATGAACAGAATTCTATCTGCCCTCGCGCGGGATAATCAGCAGG
ATGCCCAGCAGATGATCTTTACGCCTTCTGCCCAACTGACGGAAAAACCCCTGGTTGGAT
GGGGGTTTTAACAAACAGGGGGTCTGCCCCAAACCGTCCAAAGGCTGGCCAGGAGGGGAA
AAAGCTTTGCGCCCCCAGGGGGGCCACCTGCCCAACTTTTATTATTTGAGATTGTGAC
CCCCTGTTTATAAACCAAAAAAACAAAAAACCCCTGGATGTATATAAAAGCCCGGG
GCCCCGGGGGTGTTTTTTTGTAAAAAAAACAGGAGAAATACACCAACAAACCCCCCC
TCCTTCTGTGGGGAGACACAACACACCCTCCCGCCCCCTCGTTGTTGGTGAGAGAGA
AGACAACCCGCCCGCGGGCTGTGGGTGGGGGGCCGCCACACAACAAAATAAATAAA
AATATAAAAAATATATTATATCATATTTTTTTTTTTCTTTTCCCCAGCCACCACCCA

>pED136_F-CA 1701 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAGC
AGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCCC
GCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACATG
AAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGT CAGCATTGCG
GGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGCTG
GTGTTTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGATAT
GAAGTGAGCATTAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAAGTGTTT
CTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGTCA
ACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGAGG

TGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGGTG
ATCGAACATTTTGTGTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCCTATC
AACGTGCGCAGCGAATGCCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAGT
CACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCCACAGT
TTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAAA
CAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGATACCC
GTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATCG
TCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCATC
AAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGGA
TACGAAACCGCAGCTGGAAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCACCACGGCGCAGCGT
GGGCGTATTGATGATGAACAGATATTCTATCTGGGCTCCGCGGGATCATCAGCAGGATG
CCCACAGAAGATCTTTACGCCTTCTGCCAAATGACGAAACCTGGTGGATGAGGGTTAA
AAACAGGAGTGCCCAATCGTCACGGTGCCAGAGGGGAAAAGCCTTGGGCCCCAGGGGC
CCCGCCACCTTTTTGGATGGGTCCCTTTAAACAAGCCCCAAACCCCGATTTTTAA
CCCCGGCCCCGGGTTTTATGGAAAAAAAAGAATATAAAAAAAAACACCCCCCCC
GGAGAAAAAAAACACCCAAACATTTTATAGAAAAAAAAGGGGGGGGGGGC
GGGGCGCGCTTGTAATAAAAAATAATTATTTTTCTTTTTTTCTTTGTTTTTCCCGCTCAC
CTCCCCAAAAATAAAAAATCAACAAATATAGTGAGGAGGGCGAGCCAGCTCGAGA
AGGGGGGGTCTGTCTTCTCGCGGAGAGAGCTGAATCATACAAATCAATAATCCCTCAG
TCGCGTCACTGTTTCGGAACACGCGAAGGCAAGCAG

>pED137_F-CA 1566 nt

CTATACCCCATTCACCCTCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAA
CAGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCT
CCCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAA
CATGAAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCAT
TGCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCG
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC
GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA
CGGTGATCGAACATTTTGTGTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGCGAGCGAATGCCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCG
TCAGTACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCCGATTTAGCC
ACAGTTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG
AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGAT
ACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAAC
ATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGC
CATCAAAACGGATGGTTCGAATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAA
TGATCCAAAACCGCACCTGGAATCTTTGCAAATAATGGAAATGCACCCCCCGCGGCC
ACGGGGGGGGGATTGAAAAAAAACAAAATCCTTTTCGGCCCTCCCCGGGATAATCCCCAG
GGAACCCAACAAAAAATTTTTTCCCCCCCCCTCCCAAAGGAGGAAACCGGGGGGAAAAGG
GGTTTAAAAGAGGGGTGGGGCCAAAACGTCAAGGGGGCCAAAGGGGAAAAGCCTTGGG
GGCCAGGGGGCCCCCCCCCTTTTATTTTAGAATTGACTCTGTTTAAAACAAAAACC
CCCAACCCCCGGTTTTTTTACAAACCCCCCGCCCCGGTTTTTTTTATAGAAAAACACAA
AAGAGAAATATCTAAAAAGAAAAAATCCCCGCTTGTGAGAAGAGACAATACAACAC
ACCCAAAAAAATTTTAAATAGAGAAAAAACAGCGGCGGGGGGGGGTGGGGGGACAC
ACAAATAGAAAAAAAAGATAATAA

>pED144_F-CA 1581nt

CAATTCACCAATCACCCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAA
CAGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCT
CCCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAA
CATGAAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCAT
TGCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCG
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC

GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA
CGTGATCGAACATTTTGTGACCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGGAAAACCCGC
TCAGTCAACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCC
ACAGTTTCCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG
AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAAGTGTGTGAT
ACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAAC
ATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCACCACGCC
ATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAAT
GGAATCAAAACCGCACCTGGAAATTTTTTAAAAAAAATGAAAAAGCCCCCCCCGGCC
ACCGGGGGGGGTATTTGATAAAAAAAAAAATTTTTTCGGCCGCCCGGGGAAACATTC
ACCGGAGGGCCCAAAATAAATTTTTCCCCCTCCCTGCCGAATTGAGAGAAAACCGGG
GGGAAAAGGGTTTTAAAAACCGGGTTGGCCCCAAACCGCCACCGGTGCCCAAAAG
GGGAAAAGGTCTTTTGCGCCCTAAGGGGGCCCCCCCCCACCTTTATATAATTGAAGG
TGGGGCCCGCGGAAAGAACCAAAAACCCACAACCACCCCGATTTTATTAGACCCCGC
GCGCCCCGCGGGTTTTTTTTGAGAAAAAAAAAAGAGAAGATATATAATGAGACCGAAC
CCCCCGCTCCTGGGAGAGAAAAACCAACCCCTCCCCCACTTCTTTTTGTGGG
AGAAAACCCACACCGGCGCGGGGGGTGTGCGGGC

>pED145_F-CA 1563 nt

CATTATTCACCCATTCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCG
AACAGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACG
CTCCCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAA
ACATGAAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCA
TTGCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGC
GGCTGGTGTTTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGC
GGATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAAGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGA
AGTGTCTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGC
GCGGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGT
GAAGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGC
AACGGTGATCGAACATTTTGTGACCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTT
CACTATCAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGGAAAACCC
GCTCAGTCAACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAG
CCACAGTTTTCTGTGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACCGCAACTCAATGG
CGAAAACAGCAGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGTGTGTG
ATACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAA
AACTATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCACCA
CGCCATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGG
AAAGGGAAACAAAACCCACCTGGAAAATTTTTCCAAATAAAGTGAAAATTCCCCCC
CGGGGCCACGGGGGGGGGTATTTGTTAAATAAAAACAAAATTTTTTTCTTGGCCCCCGC
CGGGGAAAAAAACCAAAAGGAAGGCCCCACAAAAAAAATTTTTTTTCCCTCCTCTTC
CCAAAATGGAAGGAAAAACCTGGCGGGTATAAGGGCGTTTAAAAACCCGGGGTGGC
CCAAAACCTGCCAACGGGCTGTCCAAAAGGGGGAAAAAAACCTTTGGCCCCCTAAGG
GGGGCCCCGCCCCCAATTTATTATATTGTGGGTGGGGCCCGCTGTGGGGAGAAACCAC
AAAGAGAACCAACAACCCCGGTTTATTTATAAAAACCCCGTGGCGCCGCGGGCGGT
TTTTTGTGGGAAAAAACACAAGGGAAAAATCCCCACAAAAAACCTCCCGCCGCTCT
GGATAAGAGAAAAATACCA

>pED145_F-CA 1563 nt

CATTATTCACCCATTCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCG
AACAGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACG
CTCCCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAA
ACATGAAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCA
TTGCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGC
GGCTGGTGTTTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGC
GGATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAAGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCGGA
AGTGTCTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGC
GCGGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGT

GAAGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGC
AACGGTGTATCGAACATTTTGTTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTT
CACTATCAACGTTCGACGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGAAAACCC
GCTCAGTACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTAG
CCACAGTTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGG
CGAAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTG
ATACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAA
AACTATCGTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTTCGCGCACCA
CGCCATCAAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGG
AAAGGGAAACAAAAACCCACCTGGAAAATTTTTCCAAATAAAGTGAAAATTTCCCCCC
CGGGGCCACGGGGGGGGGTATTTGTTAAATAAAAACAAAAATTTTTTCTTGGCCCCCGC
CGGGAAAAAAACCAAAAGGAAGGCCCCACAAAAAAAATTTTTTCCCTCCTCTTC
CCCAAACTGGAAGGAAAAACCTGGCGGTATAAGGGGCGTTTAAAAACCCGGGGTGGC
CCCAAACTGCCAACGGGCTGTCCAAAAGGGGAAAAAACCCCTTGGCCCCCAAGG
GGGGCCCCCCCCCAATTTATTATATTGTGGGTGGGGCCCGCTGTGGGGAGAAACCAC
AAAGAGAACCACAAACCCCGGTTTATTTATAAAAACCCGTGGCGCCGCGGGCGGT
TTTTTGTGGGAAAAACACAAGGGAATAATCCCCACAAAAAACCTCCCGCCGCTCT
GGATAAGAGAAAAATACCA

>pED151_F-CA 1696 nt

CTTTCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTTCAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCAGGAAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTAT
CAACGTTCGACGCAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTGAAAACCCGCTCAG
TCACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCAGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAATATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCCCGGCGCGACGG
TGGGGCGTATTGATGATGAACAAATATTCTATCTGCGCTCGCCGGGATCATCAGCAGATG
CCCACAGAAGATCTTTACGCCTTCTGCCAAATGACGAAACCTGGTGGATAAAGGCTTAAA
AACAGGGCTGGCCAATCGTCAAGGTGCCAGAAGGGAGAAGCTTGGGGCCCAAGGTCAC
CGCCCCACCTAATATTAATTGGACCTTTAAAAAAAAGGCCAAAACCCCGGTTTCAA
ACCCGGCCCGGGTTTTTTGAAAAAAAAGGAAAAATAAAAAAAAACCCCCCCCTTTG
TAAAAAAAACCAACAACAATTTTTAAAAAAAACAAAACGGGGGGGGG
GGGGGGGGCCCCCAAAAAAAAATAATATTATTTTTTTTTTTTGTTCCTCC
CCCCACCAAAAAACAAAATAACTAAATGTAATATCTTTGTATTTCGAGTGT
TTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCTCAGAGATCAACAAAAGGCGGGGCGCGGT
GGCGGGTAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>pED150_F-CA 1586 nt

CCATTCACCAATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAAC
AGCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTC
CCCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAAC
ATGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTTCAGCATT
GCGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCG
GCTGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCG
GATATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCGGAA
GTGTTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGC

GGTCAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGA
AGAGGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAA
CGTGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCA
CTATCAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGC
TCAGTCAACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAAGATGCCACCGCATTTAGCC
ACAGTTTCCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCG
AAAACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAAACGAAGTGTGTGA
TACCCGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAA
CTATCGTCAGCGACAAAGGCCCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGC
CATCAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGGTGATGGGCAAACCTGGCGGAAA
TGAAACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAAAGAATTGAAAAGCCCCCCCCGGCCGAC
CGGGGGGGCGTTTAAAAAAAATAAATTTTTCATCTGGCCCCCGGAAACAATCACCAGA
GGCCCAAAAAAATTTCCCTTCCCCGAACGAGGAAACCTGGGGTAA
AACAAGGGCGGGCCCAATAGTTAACCGGGTCCAAAAGGGGAAAAAGCCTTGGGGCCCC
AAGGGGCACCCCCCACTTTATATTTGATTGGGCCCTTGTA AAAAACAAAAAACCCA
AAACCCCTGGAATTTTAAACACCCGGGGCCCCGGGGTTTTTTTATTGAAGAAAAACAAG
AGAAAAATACCACTCAAAAAAATCTCCCCCGTCTCTTGGAGGGAAAAAAAACCCCAAC
CCCCCCCCACACCACACTCTCTTGTGTGCGCGAAAAAACCCGCCGGGGTGGGGG
GGGCCCCCCCACAAAAATAAAAAACAAAACCTCTTTCTTTTT

>pED151_F-CA 1696 nt

CTTTCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCAGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTGAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCATAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAG
TCACCACCTTGTGTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTAGCCACAG
TTTCTGTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCAGCTGCCGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTGAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCCCGGCGCGACGG
TGGGGCGTATTGATGATGAACAAATATTCTATCTGCGCTCGCCGGGATCATCAGCAGATG
CCCACAGAAGATCTTTACGCCTTCTGCCAAATGACGAAACCTGGTGGATAAAGGCTTAAA
AACAGGGCTGGCCAATCGTCAAGGTGCCAGAAGGGAGAAGCTTGGGGCCCAAGGTCAC
CGCCCCACCTAATATTAATTGGACCTTTAAAAAAAAGCCCAAAACCCCGGTTTCAA
ACCCGGCCCGGGGTTTTTTGAAAAAAAAGGAAAATAAAAAAAAACCCCCCCCTTTG
TAAAAAAAACCAACAACAATTTTTTAAAAAAAACAAAACGGGGGGGGG
GGGGGGGGCCCCCAAAAAAAAATAAATATTATTTTTTTTTTTTGTGTGCCCC
CCCCACCAAAAAACAAAATAACACTAAATGTAAAATATCTTTGTATTGCGAGTGT
TTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCTCAGAGATCAAACAAAAGGCGGGGCGCGGT
GGCGGGTAGGGTTTTTTTTTTTTTTTT

>pED157_F-CA 1534 nt

CATTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCAGGAAGTG

TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTACGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAG
TCACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCACCACGGCGGACGG
GGGGCGTTGATGATGAACGAAATTCTATCTGCGCTCCGCGGATCATCAGCAGATGCCA
ACAATGATCTTACGCCTTCTGCGAATGACGAAACCTGGCTGAAAAGGGCTTAAAAACCC
GGGCTGGCCCAATCTTCCAGGGGCCAAAGGGCAAAGGCCTCGGCCAAGGGCCCCGCC
ACTTTTTGGACTGGCCCTTTGAAAAAAAAGCCCAAAAACCCCGTTTTTAAACCCGGGCC
CGGGGTTTTTTTTAAAAAAACAAGAATTCAAAACAAAACCTCCCCCTTGAGAGAAAAAAA
ACACCCCAACAATATTTAAGGGAAAAAAAACAACGGGGGGGGGGGGGGCGCCACCAAAAA
AAAAAAAATATTATATTATTTTTTTTTTTGTTTTCCCGCGGGCGAAACA

>pED158_F-CA 1582 nt

CATTCACCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTTCAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCAGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA
GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTACGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAG
TCACCACTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTGTAAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACCTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCCACGCGCGACGG
TGGGGCGTATTGATGATGAACAAAATTCTATCTGCGCTCGCCGGGATCATCAGCAGGATG
CCCACCAATGATCTTTACGCCTTCTGCGACTGAGGAGCCCTGCGGGGAAAGGGGTTAAC
AAAAGGGCTGGCCCAATCGTTAACGCTGCCAAAGGGGAAAAAGCCATGGGCCCAAGG
GCCCCGCCACTTTATTGAGTTGGCCCTTAAAACCAAACCCCAACCCCGTTTTTTAA
AACCCGGGCCCCGCGGTTTTTTAGAAAAAAAAGAAGTAACAAACAAAAAACACCCCC
CCTCTAGAAAAAAAACACCCCAAAACATTTATAAGAGAAAAAAAAGCCCGGG
TGGGGGGCGGGGCCCAAAAAAAAATAAAAAATATATTTTTATTTATTTTATCCGGCC
GGCCACAAAGAACAGACACAAAATAGAACACGGCGG

>pED159_F-CA 1651 nt

CATCCCCCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACA
GCAGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCC
CCGCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAAACA
TGAAAACCTGGAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTTCAGCATTG
CGGGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGC
TGGTGTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGAT
ATGAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTCAGGCAGGAAGTG
TTTCTGCATTTGACGGAAAGCCTGGCACAAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGT
CAACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGA

GGTGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGG
TGATCGAACATTTTGTGTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCACTAT
CAACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAG
TCACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTAGCCACAG
TTTCTGCTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAA
ACAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACC
CGTACCTGGCTGGAACACAATAAAGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATC
GTCAGCGACAAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCAT
CAAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGG
ATACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCACGGCGCGACGG
TGGGCGTATTGATGATGAACAGATATTCTATCTGCGCTCGCCGGGATCAATCAGCAGGAT
GCCAGCAAAGATCATTACCCTTCTGCCAAGTACGAAACCCTGTGTATGAGGGCTTAAA
AGCAGGGCTGGCCCAATCGTCACGGTGCCAGAGGGCAAAGCCTTTGGGCCCTAGGGCC
ACTGCCCACTTTTATTGAATTGCCCTTAAAAACCAAAGCAAAAAACCCCGATTTTT
AAACCCGGGCCCGGTTTTTTTTGAAAAAAAAGAATACCCCAAAAAACCCCTCTTTT
AAAAAACAAAACCCCAAAAAATTTTTTAAAAAAAAGCGCGGGGGGGGGGGGGC
CCCCCAAAAATATAAATATAAATATTTTTATTTTTTTTTTTGGTTTTCCCCCGCCAAC
ACAAAAACAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CAAATTGGGTTTTTGTGTTGTTGTTGTTGGGGTGGGGGTTAGGCCG

>pED165_F-CA 1740 nt

CATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCGCTGGCTTACCGAACAGC
AGTAACGCGCTGCAACAGTGGCATCACTTGTGTTGAAGCTGAAGGGACAAAACGCTCCCC
GCAAGCACAGCAGCATTTACAACAATTGCTGCGTACCGGACTGCCGACACGTAACATG
AAAACCTGGAAATATACGCCGCTGGAAGGGCTGATCAATAGCCAGTTTGTGTCAGCATTGCG
GGAGAGATATCCCCACAGCAGCGTGATGCCTTAGCGTTAACGTTAGACTCCGTGCGGCTG
GTGTTTGTGTCGATGGGCGTTACGTGCCCGCACTGAGCGATGCAACTGAAGGCAGCGGATAT
GAAGTGAGCATTAAACGACGACCGTCAGGGTTTACCCGACGCTATTACGGCGGAAGTGTTT
CTGCATTTGACGGAAGCCTGGCACAAGCGTGACGCATATCGCCGTGAAGCGCGGTCA
ACGGCCGGCAAAGCCATTGCTGTTAATGCATATCACCCAGGGCGTGGCAGGTGAAGAGG
TGAACACTGCCATTACCGACATCATCTGGATCTGGCGGAAGGTGCCGAAGCAACGGTG
ATCGAACATTTTGTGTCAGCCTGAATGATGCTCGTCATTTTACCGGGGCACGGTTCATATC
AACGTCGCAGCGAATGCCACTTGCAGCATATCAAGCTGGCGTTTAAAAACCCGCTCAGT
CACCACCTTTGCTCATAACGATTTGTTGCTGGCTGAGGATGCCACCGCATTAGCCACAGT
TTCTGTGGGTGGCGCAGTGTTACGACACAACACCAGTACGCAACTCAATGGCGAAAA
CAGCACGCTGCGGATCAATAGCCTGGCGATGCCGGTAAAAACGAGGTGTGTGATACCC
GTACCTGGCTGGAACACAATAAAGGTTTTTTGTAACAGCCGACAGTTGCACAAAACCTATCG
TCAGCGACAAAGGCCGCGCGGTATTTAACGGTTTGATCAACGTCGCGCAGCACGCCATC
AAAACGGATGGTCAGATGACCAACAACAATCTGCTGATGGGCAAACTGGCGGAAGTGGA
TACGAAACCGCAGCTGGAATCTATGCAGATGATGTGAAATGCAGCCACGGCGCGACGG
TGGGGCGTATTGATGATGAACAGAAATTCTATCTGGGCTCGCGCGGGATCAATCAGCAG
GATGCCCAGCAGAATGATCATTTACGCCTTCCCTGCCAAATGACGGAACCTGCGGGATA
AGGGGTTAAAAACAAGGCTGGCCCAATCGTCAAGGGGGCCAGAGGGGGAAAAAGCCTT
GCGGGCCCTAGGGGGCCCTGCGCCAACCTATAATTGAAACTGGGACCCCGTGAAAAAAT
CAAAAAGACCCCAAAACCCCGGTTTTTCAAACCCCGGCGCCCCGCGGTTTTTTTTTTTA
AAAAACAAGAAAATCAAGAAGAGAAAAACACCCCTTTTGAAGAGAAAACAATA
AACACCAAGAACTTTTTAAAGAGAAAAACAACCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCC
AAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CGAAAAACAATATACAAAAGCAACTTACAGAGGCGGACCCGCGGGCGGCCCCCCC
CTCGTTTCAGAAATTAAGAAACCCGAATTCACATACGGGGGGGTGGGGGGGGGGGTGT
GTGTTGGGGTGGGTGTGGG

>pED200_F-CA 1654 nt

ACATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGAGGGCCATTGCATTAATTCAACG
CGTAACCCGTGCCAGCGTCACCGTGGAGGGAGAAGTGACGGGCGAAATTGGCGCGGGAC
TTTTGGTGTATTGGGTGTGCGAAAAGGATGACGACGAACAGAAAGCAAACCGTCTGTGC
GAGCGTGTGCTCGGCTACCGCATCTTAGCGATGCCGAAGGCAAGATGAATCTCAACGTG
CAACAGGCGGGCGGCAGTGTGCTGGTGGTTTTCCAGTTTACCCTCGCCGAGATACCGAA
CGGGGATGCGCCAAGTTTCTCAAAGGTGCATCACCGGATCGCGCAGAGGCGTTATA

TGACTATTTTCGTCGAACGCTGCCGTCAGCAAGAGATGAACACGCAAACAGGACGCTTCG
CTGCGGATATGCAGGTATCGCTGGTCAATGATGGCCCCGTGACATTCTGGTTGCAGGTAG
GCCTATGCGGCCGCTAAGGGTGCACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC
TGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTT
GCCGCCGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTG
ACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCC
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCCGTGAGGGCGC
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCG
GAGTGTATAATCCTGGAGAAAAACAAAAGGGCCTCCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTT
AATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGATCCGGGATGTCCGGCGGTGCTTTTGCCGTTA
CGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGG
AGCACCCTCAAAAACACCATCATACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATCACCCGACGCA
CTTTGCGCCGAATAAATACCTGTGACGGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGT
GTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCACTTTTGGCGAAAATGAAACGTTGATCGGC
CCGTA AAAAGTTCCACTTTC CCAAAAAGAAAAAATCCCTCCCGGGCTTTTTTTGATTTT
CAAATTTCCGGGGCAAGAACCAAAAAGGGAAAAAAACCCGGGAACCCCTTTAATTCCAG
GGGCCAAAAAATTTTGGGGTTTCTCCTTTTCTGGCCCAACCCACCCCTCGGGTTTGGC
CTTTTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTCCGCTTTTCTTTTTCCCGCGAGACTCCC
CATACCCCGAGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCCCCCAACTCCCCCCCC
ACCCCCCCCCCCCCACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTAGTTTTTTTCTTCTTTTTTGCACCC
CACCCCCCCCCCGCGCCGCTGTGCGGGAGGACATTAGAACGAGACACCGAGGCCGCC
GCCCTCCCCCGCCCCCCCCCCCCGCCGAAGACAAGCGCCG

>pED201_F-CA 1720 nt

ATATTCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGC
AGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAA
CTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATC
CAAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTTCCGGTGATGAC
GGTGA AACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCG
CAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGATCCGG
GATGTCCGGCGGTGCTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGAC
AGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCATCATACTAAATCAG
TAAGTTGGCAGCATCACCCGACGCACCTTTCGCGCCGAATAAATACCTGTGACGCGGAATC
ACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAAT
TTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTTCACCATAATGAAA
TAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTA
AAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCAATGGCATCGTAAA
GAACATTTTGGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTG
GATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATAAGCACAAGTTTTTATCCGGCCTTT
ATTCACATTTCTGCCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGATGGAATGAAAGAC
GGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTACCCGTTTTTCATGAGCAACTGAA
ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACACGACGATTTCCGGCGTTTTCTACCCTAAATTCGC
AGAAGTGGCGGGTTACGGGGAAAACCTGGCCATTTCCCAAAGGGTTATTGAAAAAAGTTT
TCCCCCACCAACCCCGGGGGAATTTCCAGATTTTATTAAGGGGAAAAGGGAAAATTTT
CCCCCTTTTCTCCGGGAAAAA AAAAAAAAAAGGGGAAGGGGAGGCCGGGGATAATTTTTATC
TTGTGGGTTTTTTGCGAGAGAAATAAAAAAAGGAAGGGGGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTT
GTTTTACCCCTCTCCAAAAAATAAAAAAAGAAAAGAAAACAACCCCGGGGGGAATCT
ATTCTTTGTTTTTTTTTAAATATTA AAAATGTTATGATAATTAGGGTTTAAACGTAGATAA
ATACGACTGAGTGTAACAAAGATATGATCGCTATTTACTAGATGATCAGTTACATAATA
GATACAAGAGACATTCAGCAATACGTCTAAGCTAGATCCAACGCATACAATGTGGAATA
AAATTAAGTAGTTGGTTCAGTTGTGAGATTGGATTACAGCTGAGT

>pED202_F-CA 1666 nt

ATATCACCATCACCATCACCATACGGATCCGGCCCTGCGGCCGCTAAGGGTCGACCTGCA
GCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAAC
TCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCC

AAGCTAGGGGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACG
GTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGC
AGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCC
TCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGATCCGGG
ATGTCCGGCGGTGCTTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGACA
GCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCATCATACTAAATCAGT
AAGTTGGCAGCATCACCCGACGCACTTTGCGCCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCA
CTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTT
TTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACTTTCACCATAATGAAAT
AAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAA
AATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAG
AACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGG
ATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTTATCCGGCCTTTA
TTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCGTATGGCAATGAAAGACG
GTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTACCCCTGTTACCCGTTTTCCATGAGCAACTGAA
ACGTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACACGACGATTTTCGGCAGTTTCTACCATTATTTCCA
GGATGGGGCGGGTACGGTGAAACCTGGCCTATTTCTTAAAGGGTTATTGAAAAATTTTT
TTCCACCCACCCCGGGGAAATTTCCCATTTTTATTAAGGGCCAAAGGAAAATCTTT
CCCCTTTTTTCAGGGGGAAAAATTAAGGGGAAAAGGGTGGAGCGCGGGAATTGGT
TTTTCTTTTTGGGGTCTCTGCGAAAAATAAATAAAACACGGGGAGGGGGGGGGGTTT
TTTATGTTTGGCCCCCCCCCGCGCCAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
GAATTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAGCTAAAGAGGTCCCCGAAAATAATAAAAAATAGAATG
CAAGAGTACTTTATTATATATGATTTTATCTATCGCAGCGAGTATACTAGGGGTAGTGTA
GACCAACGTGAGACCTGATGATAATTTGGGGGAGAGTTTTACTCTAACGTG

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Esra Dibek
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 21.05.1988 Antakya
E-posta : esradibek@gmail.com
Yazışma Adresi : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, 48000, Muğla.

EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	DERECE	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
2011	Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2013	Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Bölümü
Devam ediyor	Doktora	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Bölümü
2015 yaz dönemi	Misafir Bilim İnsanı (P1 transdüksiyon deneyleri)	Virginia Tech. Üniversitesi, Amerika
2017 (güz dönemi)	Erasmus (İnsan mitokondriyal DNA analizi)	Perugia Üniversitesi, İtalya
2017 (1 ay)	Misafir Bilim İnsanı (Genom sekanslama)	The Leibniz Institute DSMZ, Almanya

PROJELER

01.09.2019- devam ediyor	Tübitak 1001 Bursiyer	Bor İçeren Antibiyotik Epetraborole ve Borik Asitin Bakteri Üzerine Etkisinin ASKA Klonlarının Fonksiyonel Genomik Analizi, 2 Boyutlu Jel Elektroforez Ve Transkriptomik Yaklaşımlarıyla Araştırılması
04.02.2019-30.09.2019	Uluslararası Bursiyer	Propolise Yanıtta Rol Oynayan <i>E. coli</i> Genlerinin KEIO Gen Nakavt Koleksiyonunun Taranması ile Belirlenmesi ve Propolis ve Aktif Bileşenlerinin Etki Mekanizmalarının NMR Metabolomik Yöntemler ile Araştırılması
01.05.2015-07.05.2018	Tübitak 1001 Bursiyer	KEIO mutant koleksiyonu, moleküler, genomik ve proteomik yaklaşımlarla Bor genlerinin araştırılması
03.04.2018-devam ediyor	MSKÜ BAP Yardımcı Araştırmacı	<i>Escherichia coli</i> 'de Aşırı İfade Edilen Genlerin Bor Toleransına Etkisinin Araştırılması ve Bora Bağlı Gen Ekspresyon Analizleri
01.09.2012-01.09.2013	Tübitak 1002 Bursiyer	Bor toleransı yüksek bakteri izolatlarının genomik kütüphanelerinin oluşturulması ve Bor ile ilgili genlerin araştırılması
30.10.2012-30.10.2013	MSKÜ BAP Araştırmacı	Yüksek Bor Toleransına Sahip <i>Pseudomonas</i> Cinsine Ait Bazı İzolatların Genomik Kütüphanelerinin Oluşturulması ve Bor ile İlgili Genlerin Bulunması
2010-2012	Boren Projesi (Eğitim süreci, deney takibi)	Anadolu menşeli bir bor bakterisi, <i>Bacillus boroniphilus</i> 'un tüm gen diziliminin çıkarılması ve hazırlanacak genomik kütüphanesi üzerinden bor ile ilgili genlerinin araştırılması
2010-2011	Tübitak projesi (Eğitim süreci, deney takibi)	Bor ve bakteri ilişkisinin moleküler, biyokimyasal ve mikrobiyolojik yaklaşımlarla araştırılması

TEZLER

SAVUNMA TARİHİ	ÜNİVERSİTE	PROGRAM	TEZ BAŞLIĞI
13.12.2013	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Yüksek Lisans	Yüksek Bor Toleransına Sahip <i>Pseudomonas</i> Cinsine Ait Bazı İzolatların Genomik Kütüphanelerinin Oluşturulması ve Bor ile İlgili Genlerin Bulunması
Tez savunma aşamasında	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Doktora	<i>Escherichia coli</i> 'de Aşırı İfade Edilen Genlerin Bor Toleransına Etkisinin Araştırılması ve Bora Bağlı Gen Ekspresyon Analizleri

BİLİMSEL FAALİYETLER, YAYINLAR, BİLDİRİLER

1. Esra Dibek, Merve Sezer Kürkçü, Begüm Hazar Çiftçi, Bekir Çöl, 2020. “P1 transdüksiyon yöntemi ile birden fazla gen bakımından mutant olan *Escherichia coli* suşlarının elde edilmesi” Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 9(1), 110-119.
2. Esra Dibek, Anara Babayeva, Merve Sezer Kürkçü, Nihan Akgüç Çöl, Bekir Çöl, 2020. “Bor içeren bazı biyoaktif bileşikler.” Journal of Boron, 5(1), 29-39.
3. Gizem Nur Demirel, Hakan Allı, Anara Babayeva, Esra Dibek, Bekir Çöl, 2019. “*Entoloma mougeotii* (Fr.) Hesler: Köyceğiz Yöresinden Türkiye Mikotası İçin Bir Yeni Kayıt” Mugla Journal of Science and Technology, 5(2), 77-80.
4. Merve Sezer, Esra Dibek, Bekir Çöl, 2018. “Importance of some metalloids in biological life.” Mugla Journal of Science and Technology, 4: 236-241.
5. Esra Dibek, Merve Sezer, Nihan Akgüç, Bekir Çöl, 2017. “Genomic library construction of a boron tolerant bacterium in *Escherichia coli* and selection by boron” Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology, 2(01), 21-29.
6. Bekir Çöl, Merve Sezer, Esra Dibek, Hatice Güneş, Ahmet Arslantürk, 2012. “Yüksek Bor toleransına sahip bir *Staphylococcus aureus* suşunun izolasyonu ve filogenetik analizi” 7. Ulusal Moleküler Ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara.
7. Ramazan Karakaya, Esra Dibek, Nihan Akgüç, Bekir Çöl, 2012. “Bakterilerde hücrel Bor miktarının belirlenmesi için Azomethin H yönteminin kullanılması” 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir.
8. Merve Sezer, Esra Dibek, Murat Kasap, Bekir Çöl, 2013. “Ekstremofil bir Staphylococcus izolatının genomik kütüphanesinin oluşturulması ve Bor toleransı ile ilgili genlerin araştırılması” XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası /Aydın.
9. Esra Dibek, Merve Sezer, Gülşah Kapısuz, Bekir Çöl, 2013. “Bir Pseudomonas izolatından bir sodyum antiport geninin rasgele klonlanması ve *Escherichia coli*'de Bor toleransında olası etkisi” XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası /Aydın. (Birincilik Ödülü)
10. Merve Sezer, Esra Dibek, Bekir Çöl, 2014. “Ekstremofil bir Bacillus izolatının genomik kütüphanesinden Bor toleransını arttırdığı görülen bir C4 dikarboksilat ABC taşıyıcı proteininin belirlenmesi” 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir.
11. Esra Dibek, Merve Sezer, Bekir Çöl, 2014. “Kırka Bor Madeninden İzole Edilen bir *Pseudomonas putida* benzeri izolatta OmpA/MotB domain proteininin belirlenmesi ve Bor tolerans aday geni olarak önerilmesi” 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir.
12. Bekir Çöl, Esra Dibek, Merve Sezer, Begüm H. Gökçan, Ramazan Karakaya, 2014. “Çam Balından DNA izolasyonu ve S35 promotor bölgesinin gerçek zamanlı PCR analizi: manyetik boncuk kullanımının ve iki farklı PCR yaklaşımının değerlendirilmesi” 4. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Ölüdeniz, Muğla.
13. Esra Dibek, Merve Sezer, Bekir Çöl, 2015. “Bor Madeninden izole edilmiş bir *Pseudomonas sp*'nin genomik kütüphanesinin oluşturulması ve Bor seleksiyonu

sonucu Bor toleransına karşılık gelen astADB gen grubunun belirlenmesi” XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye.

14. Merve Sezer, Esra Dibek, Bekir Çöl, 2015. “Moleküler, mikrobiyolojik ve genomik yaklaşımlar kullanılarak ekstremofil *Staphylococcus sp.* bakterisinde Bor’a karşı aday stres geninin tespit edilmesi: homolog fosfat ABC transporter” XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye.

15. Bekir Çöl, Begum H. Gökcan, Murat Kasap, Merve Sezer, Esra Dibek, Gürler Akpınar, 2015. “Proteomic Profiling of *Escherichia coli* Cytoplasmic Proteins under Different Boron Concentrations” Gordon Research Seminars: Applied & Environmental Microbiology (GRS), South Hadley, MA, USA.

16. Esra Dibek, Bekir Çöl, 2016. “Bazı *Pseudomonas* İzolatlarında Bor ile İlgili Genlerinin Araştırılması” Uluslararası Tarımda Bor Sempozyumu, Ankara.

17. Esra Dibek, Bekir Çöl, Merve Sezer, Begüm Hazar Çiftçi, 2017. “The effect of boric acid stress on the mRNA levels of some genes detected initially by proteomics analysis in *Escherichia coli*” International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, Afyon.

18. Bekir Çöl, Emir Demirsoy, Niyazi Uluçoban, Gökçe Has, Anara Babayeva, Merve Sezer, Esra Dibek, Hakan Allı, Hasan Sungur Civelek, 2017. “Distinguishing the black Truffle samples purchased for commercial purposes in Turkey by molecular typing using multiplex PCR analyzes” International Congress on Molecular Biology and Biotechnology. Afyon.

19. Esra Dibek, Bekir Çöl, Merve Sezer, Nihan Akgüç, 2017. “Investigation of boron-related genes in a highly boron tolerant isolate similar to *Pseudomonas zhaodongensis*” International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, Afyon. Sözlü Sunum.

20. Bekir Çöl, Merve Sezer, Esra Dibek, 2017. “The Bacterial Toxin-Antitoxin DinJ/YafQ module and Boron Toxicity in *Escherichia coli*” International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, Afyon. Sözlü Sunum.

21. Bekir Çöl, Merve Sezer, Esra Dibek, 2018. “*yfeS* mutant of *Escherichia coli* is comparatively hypersensitive to boric acid and may play a role in boron stress response” Annual Conference 2018 of the Association for General and Applied Microbiology, Wolfsburg, Germany.

22. Bekir Çöl, Esra Dibek, Merve Sezer, Nihan Akgüç, 2018. “Identification and analysis of mRNA levels of an antiporter, excinuclease subunit and endonuclease genes in response to boron in a *Pseudomonas* isolate” Annual Conference 2018 of the Association for General and Applied Microbiology, Wolfsburg, Germany.

23. Bekir Çöl, Anara Babayeva, Esra Dibek, Merve Sezer, 2018. “Boron containing antibiotics” The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine. Sözlü sunum.

24. Bekir Çöl, Esra Dibek, Murat Kasap, Gürler Akpınar, Merve Sezer, Gülşah Kapısuz, 2018. “Boric Acid Stress Induction of *clpP* gene in *Bacillus subtilis*” The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine. Sözlü sunum.

25. Esra Dibek, Bekir Çöl, Merve Sezer, Anara Babayeva, 2018. “OMP encoded genes in *Escherichia coli* and the phenotypes of the corresponding mutants under several salt, metal and antibiotics stresses” The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine. Sözlü sunum.
26. Merve Sezer, Esra Dibek, Bekir Çöl, 2018. “Potential relationship between galactarate/glucarate/glycerate transporter GarP and boron toxicity in *Escherichia coli*” The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine. Sözlü sunum.
27. Bekir Çöl, Merve Sezer, Esra Dibek, Nihan Akgüç, 2018. “Identification of a gene that may be involved in providing boron tolerance to an extremophilic *Bacillus* isolate” The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine.

Deneysel Yetkinlik ve Tecrübe

1. Bakteri izolasyonu ve kültürü
2. Genomik DNA ve Plazmid DNA izolasyonları
3. Agaroz jel elektroforezi
4. Genomik kütüphane çalışmaları (Restriksiyon enzim ile DNA kesim çalışmaları, rekombinant plazmid elde edilmesi, kompetant hücre hazırlanması, transformasyon çalışmaları, klonlama deneyleri)
5. Protein İzolasyonu
6. Nanodrop, Qubit ve spektrofotometrik yöntemler ile konsantrasyon ölçümleri
7. Bradford analizi
8. Poliakrilamid jel elektroforezi, SDS-PAGE ve 2-D elektroforez yöntemleri
9. Proteomik Teknolojisi
10. Genom boyu tarama deneyleri, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve tolerans nokta testi deneyleri
11. Gen sekanslama ve tüm genom sekanslama çalışmaları
12. BlastN, BlastX, String, Ecocyc, GenomeJp, Uniprot veri tabanlarının kullanılması
13. P1 transdüksiyon yöntemi ile ikili üçlü mutantlar oluşturma
14. RNA izolasyonu, gen ekspresyon çalışmaları
15. Standart PCR, RT-PCR, Real Time PCR, Primer dizaynı
16. GDO Analizi
17. His-Taq Purification
18. Western Blot analizi
19. İnsan mitokondriyal DNA analizi
20. Metabolit ekstraksiyonu, ¹H-NMR verilerinin analizleri