



***Bacillus subtilis* Standart Suş (PY79) ile Basilisinin Bloke Edildiği Suşun (OGU1) Karşılaştırmalı Dinamik Sekretom Analizi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 116Z351

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Gülay Özcengiz

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Gülay Özcengiz

Dr. Elif Tekin İşlerel

AĞUSTOS 2018

ANKARA

ÖNSÖZ

TÜBİTAK KBAG tarafından desteklenmiş 116Z351 kodlu bu projede, *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen ve hücre dışına salgılan, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir dipeptid olan “bacilyisin (basilisin)” isimli sekonder metabolitin üretici organizmadaki fonksiyonlarının sekretom düzeyinde araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla basilisin üreticisi *B. subtilis* PY79 ve onun basilisin biyosentetik operonu inaktive edilmiş türevi olan OGU1 suşlarında hem 2DE MALDI TOF/MS, hem de LC-MS MS yaklaşımlarıyla karşılaştırmalı proteomik analizleri yapılmış, alınan sonuçlara göre seçilen belirli proteinler için de kantitatif transkript analizleri yürütülerek araştırma tamamlanmış, varılan sonuçlar tartışılıp açıklanmıştır.

Araştırma sonuçları, bursiyerlerimizden Elif Tekin İŞLEREL’in Doktora tezini ve Samet AYTEKİN’in Y. Lisans tezini oluşturmuştur. Yine projeden kaynaklanan sonuçlar iki ayrı Uluslararası Kongre’de sunulmuş olup biri tamamlanmış, diğeri tamamlanmakta olan iki uluslararası makale ise sunum aşamasındadır.

Projemizin LC-MS MS bölümünde mevcut ölçümler için bizlere her türlü destek , yardım ve kolaylığı göstermiş olan Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi Müdür Yard. Doç. Dr. Servet Özcan’a teşekkürü bir borç biliriz.

Bu araştırmayı yürütmemize olanak sağlayan TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Grubu yürütücüsü ve uzmanları başta olmak üzere tüm TÜBİTAK ekibine aldığımız destek ve projenin her aşamasında esirgemedikleri yardım, kolaylık ve nezaket için içten teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	i
İçindekiler.....	ii
Tablo ve Şekiller.....	iii
Özet.....	v
Abstract.....	vi
Sonuç Raporu Ara Metni	
1. Giriş.....	1
2. Literatür Özeti.....	2
3. Gereç ve Yöntem.....	11
3.1. Bakteri Suşları, Kültür Besiyerleri ve İnkübasyon Koşulları.....	11
3.2. Tüm Genom Dizileme ve Direkt Sekanslama.....	11
3.3. Protein Ekstraksiyonu ve Sekretom Örneklerinin Hazırlanması.....	12
3.4. Örneklerin Hazırlanması ve Nano-LC-MS/MS Analizleri.....	12
3.5. LC-MS MS Data Analizi.....	13
3.6. 2DE ve MALDI-TOF MS Analizi.....	13
3.7. Veritabanı Araştırması, Protein Tanımlama ve Lokalizasyon Analizleri.....	14
3.8. Total RNA örneklerinin hazırlanması.....	15
3.9. Primer Tasarımı.....	15
3.10. cDNA sentezi ve RT-qPCR koşullarının optimizasyonu.....	17
3.11. RT-qPCR analizi.....	18
3.12. RTq-PCR verilerinin istatistiksel analizi.....	19
4. Bulgular.....	20
4.1 PY79 ve OGU1 İçin Tüm Genom Dizileme ve Direkt Sekanslama.....	20
4.2 Karşılaştırmalı LC-MS/MS analizleri.....	20
4.3 Karşılaştırmalı 2DE MALDI-TOF/MS analizleri.....	35
4.4 Seçilen Genler Seviyesinde Kantitatif Transkript analizleri.....	39
4.4.1 RNA örneklerinin kontrolü.....	40
4.4.2 Optimize RT-qPCR Koşulları, Standart Eğriler, Verimlilik Hesaplamaları ve RT-qPCR Analiz Sonuçları.....	42
5. Tartışma / Sonuç.....	49

Kaynaklar.....	63
----------------	----

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablolar

Tablo 1. RT-qPCR analizi için tasarlanan primerler.....	16
Tablo 2. 12. saat sekretom örneklerinde OGU1'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler.....	23
Tablo 3. 16. saat sekretom örneklerinde OGU1 'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler.....	29
Tablo 4. 24. saat sekretom örneklerinde OGU1 'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler.....	33
Tablo 5. İnkübasyonun 12., 16., ve 24. saatlik zaman noktalarının ikisinde ifade değişimi gösteren (ortak) proteinlerin listesi.....	34
Tablo 6. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 12 saatlik kültürlerle ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler.....	36
Tablo 7. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 16 saatlik kültürlerle ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler.....	38
Tablo 8. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 24 saatlik kültürlerle ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler.....	39
Tablo 9. Optimize koşullardaki eğrilere göre elde edilen Ct ve Tm değerleri.....	42
Tablo 10. Tasarlanan tüm primer setlerinin verimlilik (E) değerleri.....	46

Şekiller

Şekil 1. (a) Basilisin biyosentetik gen kümesinin organizasyonu. (b) Basilisin yapısı ve biyosentetik yolağı.....	4
Şekil 2. Basilisin biyosentetik operonu üzerindeki temel regülasyonlar ağı ve operonun kontrolunun sporulasyon, kompetans ve surfaktin biyosentezi ile ilişkisi.....	5
Şekil 3. OGU1 suşunun oluşturulmasında kullanılan rekombinat pMUTIN plasmidinin yapısı.....	6
Şekil 4. Proteom alanındaki gelişmeler ve <i>B. subtilis</i> 'deki uygulamaları.....	7
Şekil 5. Zengin besiyerinde (LB) büyütülen <i>Bacillus subtilis</i> 168'e ait sekretom.....	9
Şekil 6. LC-MS/MS analizleri ile PY79 ve OGU1 suşlarının sekretom örneklerinde tanımlanan toplam proteinlerin sayıları.....	21
Şekil 7. <i>Bacillus subtilis</i> 'te PY79 ve OGU1 suşlarında 12 saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları.....	22

Şekil 8.12. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı.....	27
Şekil 9. <i>Bacillus subtilis</i> 'te PY79 ve OGU1 suşlarında 16 saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları.....	28
Şekil 10. 16. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı.....	31
Şekil 11. <i>Bacillus subtilis</i> 'te PY79 ve OGU1 suşlarında 24. saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları.....	32
Şekil 12. 24. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı.....	34
Şekil 13. <i>B. subtilis</i> PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 12. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü.....	36
Şekil 14. <i>B. subtilis</i> PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 16. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü.....	37
Şekil 15. <i>B. subtilis</i> PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 24. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü.....	39
Şekil 16. Agaroz jelde yürütülen 12. saat total RNA örnekleri.....	40
Şekil 17. Agaroz jelde yürütülen 16. saat total RNA örnekleri.....	41
Şekil 18. Total RNA örneklerinin biyoanaliz sonuçları.....	41
Şekil 19. <i>Bacillus subtilis</i> PY79 cDNA'sı kullanılarak oluşturulan standart eğriler.....	43-45
Şekil 20. <i>B. subtilis</i> OGU1'da 12 saat inkübasyon sonucunda ifadesi değişen ekstraselüler hidrolitik enzimlere ait genlerin kantitatif transkript analizleri.....	46
Şekil 21. <i>B. subtilis</i> OGU1 suşunda 16 saatlik inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen <i>yxbC</i> , <i>yugI</i> , <i>luxS</i> , <i>albE</i> ve <i>cheV</i> gen ifadeleri.....	47
Şekil 22. <i>B. subtilis</i> OGU1 suşunda 16 saat inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen <i>ispA</i> , <i>resD</i> ve <i>oppD</i> gen ifadeleri.....	48
Şekil 23. <i>B. subtilis</i> OGU1 suşunda 16 saat inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen <i>gerE</i> , <i>dnaK</i> ve <i>yceE</i> gen ifadeleri.....	48

ÖZET

Bacillus türleri, antimetabolik ve farmakolojik aktiviteye sahip çok çeşitli ikincil metabolitler üretmektedir. *B. subtilis*'e ait biyoaktif peptidlerin etkilerinin sadece antimikrobiyal aktivite ile sınırlı olmadığı bilinmektedir. *B. subtilis* tarafından üretilen basilisin, N-terminalinde L-alanin and C-terminalinde non-proteinojenik bir amino asit olan L-anticapsin'den oluşan dipeptid yapısı ile bilinen en küçük antibiyotiktir. Basilisin biyosentezinin dinamikleri ve moleküler regülasyonu ile ilgili literatür bilgilerinin çoğu grubumuz tarafından rapor edilmiştir. Biyosentezin hücre yoğunluğu sinyali global kontrol mekanizmasının bir parçası olduğu, transpozon mutajenez kütüphanesinin taranmasıyla gen düzeyinde anlaşılmış ve bu[Spo0K (Opp)'ye dayalı regülasyon ağı içerisinde ComQ/ComX, PhrC (CSF), ComP/ComA elementleri] ve transkripsiyon faktörler ComA, Spo0A, AbrB ve CodY'nin bac operonu üzerine etkileri, transkripsiyonal füzyon ve EMSA analizleri ile tarafımızca doğrulanmıştır. Önceki araştırmamızda basilisin üreticisi standart suş PY79 ve bunun basilisin operonunu bloke ederek oluşturduğumuz türevi OGU1'a ait sitozolik proteomların oldukça detaylı bir analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada, jele dayalı ve jelden bağımsız iki ayrı yaklaşım kullanılarak sekretom analizi ve bu suretle ulaşılabilen proteinlerin sayısının arttırılmasıyla *B. subtilis*'de basilisin üretimi yokluğunda ortaya çıkan sekretom değişimlerinin zaman ve mekan olarak dinamik bir analizi amaçlanmıştır. Kültivasyonun 12., 16. ve 24. saatlerinde mevcut sekretom bileşenleri tanımlanmış ve PY79 ve basilisin üretemeyen türevi OGU1 arasında farklılık gösteren proteinler ve seviyeleri nicel olarak belirlenmiştir. LC-MS/MS analizlerinde toplam 2075 protein tanımlanabilmiştir. Tanımlanabilen proteinlerin 166'sının iki suş arasında farklı ifade edilen proteinler olduğu gösterilmiştir. Beklenildiği üzere, 2DE MALDI TOF/MS yaklaşımı ile elde edilen protein sayıları çok daha düşük olmuşsa da, sonuçlar LC-MS/MS analiz bulguları ile uyumludur. Yine seçilen genler özelinde gerçekleştirilen qRT PCR çalışmaları da proteomik bulguları çok büyük ölçüde desteklemiştir. Bütünüyle ele alındığında, OGU1'de farklı ifade edilen proteinlerin transport ve metabolizma, genetik prosesler, yaşam biçimi, strese uyum, sporulasyon ve jermantasyon gibi fonksiyonel kategorilere ait olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız, basilisin yokluğunda sekretom kompozisyonundaki değişimlerin kapsamlı biçimde anlaşılmasını ve bu değişimlerde basilisin operonunun muhtemel rolünün değerlendirilmesi gerekliliğine işaret etmiş olup mevcut bulguların daha ileri fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi hedeflenmektedir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus subtilis*, basilisin, gen ifadesi, proteom, karşılaştırmalı genomik, sekretom, LC-MS/MS, 2DE MALDI TOF/MS, qRT PCR

ABSTRACT

The members of the genus *Bacillus* produce a wide variety of secondary metabolites with antimetabolic and pharmacological activities. *Bacillus subtilis* peptide antibiotics are known to show distinct roles beyond 'pure' antimicrobial action. Bacilysin, being produced and excreted by *B. subtilis*, is the simplest peptide antibiotic composed of only an N-terminal L-alanine and L-anticapsin, a non-proteinogenic C-terminal amino acid. It was shown by our group that the biosynthesis of bacilysin is under the control of quorum sensing global regulation in a Spo0K (Opp)-dependent manner and the regulatory effects of ComQ/ComX, PhrC (CSF), ComP/ComA as well as the transcriptional factors ComA, Spo0A, AbrB and CodY on the expression of bacilysin biosynthetic operon was demonstrated by transcriptional fusion and EMSA analyses. We recently compared cytosolic proteomes of bacilysin producer PY79 and its bacilysin-knock-out derivative, OGU with the aim of identifying functional roles of bacilysin biosynthesis in its producer.

An insight into this dynamic process for secreted proteins would shed light on yet unknown controls, hence the present study aimed at identifying differentially expressed secreted proteins in these organisms using a combination of 2DE MALDI TOF/MS and LC-MS/MS at different time points of 12, 16 and 24 hours of cultivation. LC-MS/MS identified a total of 2075 distinct proteins and 166 were found to be differentially expressed between two strains. As expected, the numbers were much lower in 2DE approach, still its results well supported the findings from LC-MS/MS. Q RT PCR performed for selected genes also well accorded with the proteomic findings. Overall, the differentially expressed proteins mainly belonged to the functional categories of transport and metabolism, genetic processes, lifestyle, coping with stress, sporulation and germination. The present study greatly aided in a comprehensive understanding of dynamic secretome alterations in the absence of bacilysin that remains to be further analyzed by functional studies.

Key words: *Bacillus subtilis*, bacilysin, gene expression, proteome, secretome, LC-MS/MS, 2DE MALDI TOF/MS, qRT PCR

1. GİRİŞ

Daha önceki çalışmalarımızda, *Bacillus subtilis* PY79 ve onun basilisin biyosentezinin bloke edildiği knock-out (KO) mutanları olan OGU1 suşunda GeLC-MS/MS ve 2DE MALDI-TOF/MS yöntemlerini içeren oldukça kapsamlı karşılaştırmalı sitozolik (çözünür) proteom analizleri daha önceki çalışmalarımız kapsamında tamamlanmış, basilisin yokluğunun etkilediği proteinler ve onların fizyolojik fonksiyonları belirlenmişti (Taşkın, 2010; Demir, 2013; Taşkın vd., Front. Microbiology, davetli makale sunum aşamasında). Sekretom analizleri bu çalışmalarda yer almadığından basilisin biyosentezinin blokajı sonucu ortaya çıkan ve önemli fonksiyonlara işaret edebilecek ekstraselüler proteinlerin (tanımlanabilen hücre membranı ve hücre duvarı proteinleri de sekretom komponentleridir) de araştırılması gerekliliği ortaya çıkmış ve şimdiki projemizin ilk bir yıllık ara rapor döneminin konusunu oluşturmuştur. İnkübasyonun 12., 16. ve 24. saatlerinde kültürlerden toplanan sekretom örneklerinin analizi sonucu PY79 ve OGU1 arasında farklılık gösteren proteinler tanımlanmış ve ifade farklılıkları nicel olarak belirlenmiş, sonuçlar yorumlanmıştır. Araştırmamızın son 6 aylık, yani final dönemine dek yapılan çalışmalar ise, seçilen belirli sekretom bileşenleri ve bunların fonksiyonel kategorilerine göre düzenleyici görevi olduğu düşünülen iki-komponentli global regülatör proteinlere karşılık gelen genler ve onların geri düzenleyicileri için yapılan kantitatif transkriptom analizlerini içermiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

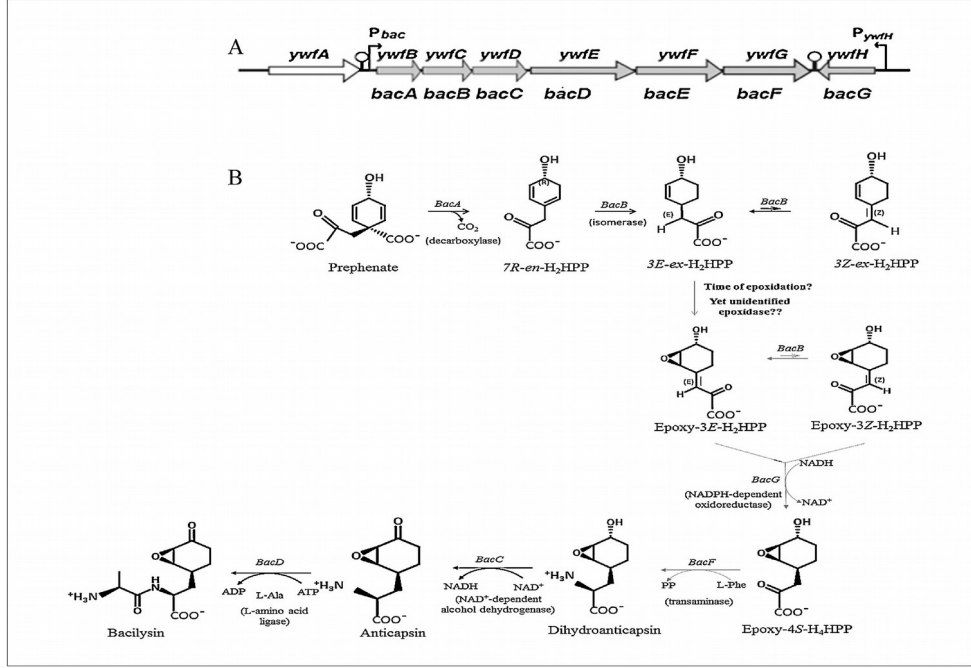
Peptid antibiyotik üretme potansiyelleri ve bu antibiyotiklerin olası hücrel rolleri, morfolojik ve biyokimyasal farklılaşma (sporulasyon) kabiliyetine sahip kompleks bir prokaryot ve model bir organizma olan *B. subtilis* özelinde yürütülmekte olan araştırmalar için özel bir motivasyon oluşturmaktadır. *B. subtilis* 4.2 Mb boyutunda bir genomu sahiptir ve özellikle genom sekansının 1997 yılında yayımlanmasının (Kunst vd. 1997) ve özellikle 2009 yılında güncellenmesinin (Barbe vd. 2009) ardından, fonksiyonel genomik ve proteomik çalışmalarında daha fazla yer almaktadır (Eymann vd. 2004). Vejetatif *B. subtilis* 2 DE proteomunun ilk yayınlanmasından (Büttner *et al.*, 2001) bu yana, proteomik teknikler *B. subtilis* hücrelerinin başta stres ve açlık olmak üzere çeşitli çevresel faktörlere yanıt olarak kullandığı oldukça kompleks gen ifade ağlarının aydınlatılmasında etkin biçimde kullanılmaktadır (Antelmann vd., 2000; Bernhardt vd., 2003; Mostertz vd., 2004; Tam vd., 2006; Höper vd., 2006; Hecker vd., 2009).

Bir toprak bakterisi olan *B. subtilis*'in doğal ortamındaki yüksek rekabet şartlarında maruz kaldığı birçok farklı çevresel zorluklar ve besinsel kısıtlamalara karşı geliştirdiği mekanizmaların en önemlisi sporlanma kabiliyeti olup bu sayede birçok farklı ortama kolayca adapte olabilmektedir (Wipat ve Harwood 1998; Budde vd. 2006; Sansinenea ve Ortiz 2011). *B. subtilis* genomunun en az 4%'lük kısmı sporulasyon, germinasyon ve yeniden vejetatif sürece geçiş mekanizmalarına adanmaktadır (Wipat ve Harwood 1999). Spor oluşumu, yüksek enerji harcanmasını gerektiren bir süreçtir ve farklı morfolojik değişikliklere neden olan yüzlerce farklı genin ekspresyonunu içermektedir. Sporulasyon, master transkripsiyonel regülatör olan Spo0A'nın fosforilasyonu ile; üç temel histidin kinaz KinA, KinB ve KinC aracılığıyla fosfat grubunun Spo0F'ten Spo0B'ye ve en sonunda Spo0A'ya geçmesiyle başlatılmaktadır. Spo0A'nın fosforile formu 120'den fazla genin transkripsiyonunu onların promotor bölgelerine bağlanarak doğrudan kontrol eder ve bu hedef genler gen ekspresyonunda global bir değişime neden olarak 500'den fazla genin transkripsiyonunu modifiye ederken sporulasyonu tetikler. Spo0A kontrolü altındaki genlerden sporulasyon için gerekli genlerin aktivasyonu için yüksek Spo0A seviyeleri yeterliyken, düşük Spo0A seviyelerinde ise kompetans ve biofilm oluşumu gibi alternatif gelişmelerin kontrolünü sağlayan faktörler havuzu oluşturulur (Solomon and Grossman, 1996; Garti-Levi vd. 2013).

Bacillus türleri oldukça geniş bir kimyasal çeşitliliği temsil eden sekonder metabolitler üretirler. Çoğu antimikrobiyal etkiye sahip biyoaktif maddeler ağırlıklı olarak ribozomal sentezlenen peptidler, translasyon sonrası modifiye edilen peptidler (antibiyotik ve

lantibiyotik benzeri peptidler), non-ribozomal (enzimatik) olarak sentezlenen peptidlerin yanı sıra peptid yapıda olmayan maddeleri (poliketit, fosfolipid ve amino şekerler) içermektedir. *B. subtilis*'e ait antibiyotiklerin etkilerinin salt antimikrobiyal etki ile sınırlı olmadığı, özellikle non-ribozomal olarak sentezlenen peptidlerin biofilm ve hareket oluşumunda; lantibiyotiklerin hücre yoğunluğu algılama mekanizmasında feromon (sinyal) fonksiyonu ile kardeş hücrelerde programlı hücre ölümünü sağlayan 'öldürücü faktör' fonksiyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Stein, 2005). Mikrobiyal özütlerin araştırılması neticesinde birçok farklı yapıya sahip bu doğal maddelerin antimikrobiyal, antiviral, immunosupresif ve anti-kanser gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu metabolitlerin biyolojik aktiviteleri ve yapısal formları farmasötik endüstri için çok önemlidir (Sansinenea ve Ortiz, 2011).

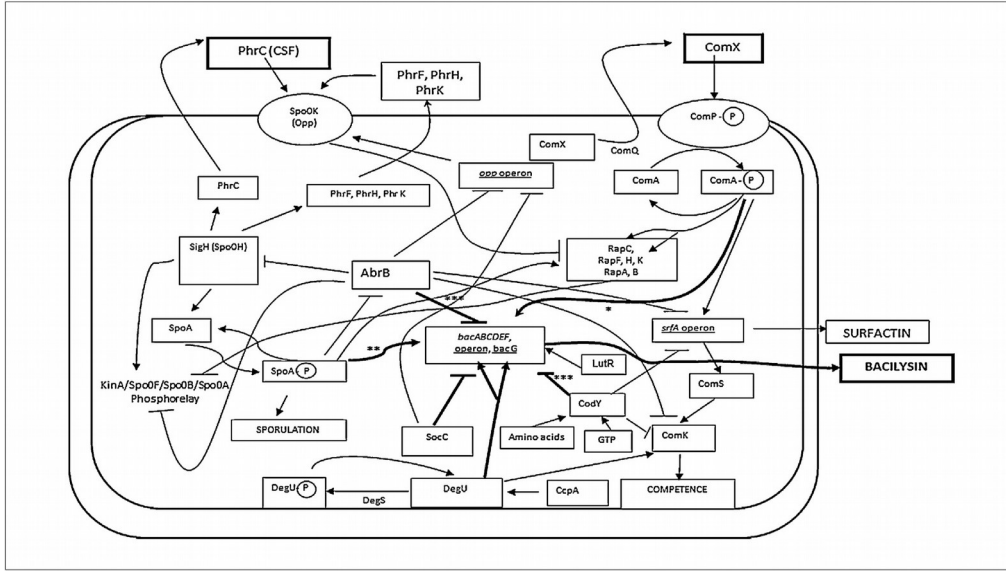
Bacillus subtilis'in bazı suşları tarafından sentezlenen ve bilinen en basit yapılı peptid antibiyotik olan basilisin aktif çoğalan *Staphylococcus aureus* kültürlerinde kısmi hücre yıkımına neden olan bir antibiyotik olduğu ilk kez 1949 yılında keşfedilmiştir (Newton, 1949). Basilisin (Şekil 1b), N-terminalinde L-alanin ve C-terminalinde modifiye bir epoksi amino asit olan antikapsinden oluşan basit dipeptidyapısına karşın (Rogers vd., 1965) çok sayıda bakteri ve mantar türlerine karşı etkilidir. Antikapsin biyosentezinin aromatik amino asit biyosentetik yolağının prefenik asit molekülünden ayrıldığı belirlenmiş ve L- alanin ile peptid bağının daha sonra muhtemelen ribozomal olmayan peptid sentezi yoluyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Sakajoh ve ark., 1987). *Bacillus* türlerine ait diğer peptid antibiyotikler gibi basilisin de bir multifonksiyonel, ribosomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) tarafından sentezlendiği uzun yıllardır düşünülmesine rağmen yapılan enzim çalışmaları neticesinde basilisin biyosentezinin genel NRPS mekanizmasına tam anlamıyla uymadığı gösterilmiştir. Inoaka ve ark.(2003) *ywfBCDEFG* gen kümesi ve monosistronik *ywfH* geninin birlikte basilisin biyosentetik mekanizmasında yer aldığını göstermişler ve daha sonra basilisin sentezinin temel fonksiyonlarından sorumlu genler olarak, uygunluk açısından, *bacABCDEF* (*bac* operonu) ve monosistronik *bacG* geni olarak yeniden adlandırılmışlardır (Steinborn vd, 2005; Şekil 1a). *bac* operonunda antikapsin biyosentezi için gerekli enzimatik basamakları kodlayan genler *bacABCG*, aminoasit ligasyonunu sağlayan *bacD* ve basilisin hücre dışına atılmasını sağlayarak otoimmünite sağlayan gen ise *bacE*'dir (Inoaka vd., 2003; Steinborn vd, 2005; Özcengiz ve Öğülür, 2015). Prefenik asitten itibaren basilisin biyosentezini sağlayan oldukça kompleks enzimatik reaksiyonlar dizisi ise pek çok biyokimyasal ve biyofiziksel çalışma sonrası aydınlatılmıştır (Parker ve Walsh, 2012; Mahlstedt ve Walsh, 2010; Parker ve Walsh, 2012; Mahlstedt vd., 2010; Rajavel vd., 2009; Rajavel ve Gopal, 2010; Rajavel vd., 2013; Parker ve Walsh, 2013).



Şekil 1. (a) Basilisin biyosentetik gen kümesinin organizasyonu. (b) Basilisin yapısı ve biyosentetik yolağı (Özcengiz ve Ögülür, 2015)

Basilisinin etki mekanizması, hedef hücre içine alınmasını takiben peptidazlar tarafından serbest kalan antikapsin kısmının bir glutamin analogu olarak glukozamin sentetaz enzimini bloke etmesi ve böylece bakteriyel peptidoglikan ve fungal mannoprotein sentezini engelleyip hücre yıkımına neden olmasını içermektedir (Walker ve Abraham 1970; Kenig ve ark. 1976, Özcengiz ve Ögülür 2015). Antikapsinin antibiyotik aktivitesi spesifik olarak glukosamin ya da N-acetylglukosamin tarafından antagonize edilir (Walton ve Rickes, 1962; Kenig ve Abraham 1976). Basilisin sentezinin, *B. subtilis* kültürlerinin sentetik besiyerinde büyütüldüklerinde aktif olup glukoz, amonyum ve kasaminoasit gibi bazı besin maddeleri varlığında ve 30 °C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda baskılandığı gösterilmiştir (Özcengiz ve ark., 1990; Özcengiz ve Alaeddinoğlu, 1991). Basilisin biyosentezinin global bir kontrol olan sıkı kontrol (stringent response) ve aynı zamanda geribildirim (feedback) regülasyonu altında olduğu ve global hücre yoğunluğu algılama kontrol sisteminin de bir parçası olduğu gösterilmiştir (Özcengiz ve Alaeddinoğlu 1991; Inoaka ve ark. 2003). *B. subtilis*'te sporulasyon, biyofilm oluşumu, proteolitik enzim sentezleri ve kompetans gibi kompleks fizyolojik süreçlerin tamamının aynı zamanda COMQXPA yolağı olarak da bilinen hücre yoğunluğu algılama (quorum sensing) global mekanizmasının kontrolü altında olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmanın basilisin biyosentezini de regüle ettiği, gen düzeyinde ilk kez laboratuvarımızda gösterilmiştir (Yazgan vd. 2001; Karataş vd. 2003). Bu çok önemli kontrol, basilisin üretemeyen transpozon mutajenez kütüphanesinin taranmasıyla gen düzeyinde anlaşılması ve Spo0K (Opp)'ye dayalı

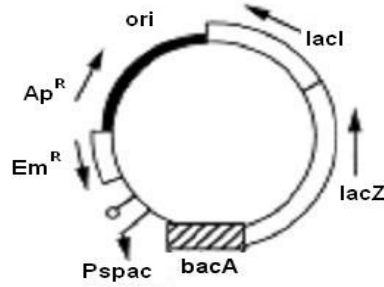
regülasyon ağı içerisinde ComQ/ComX, PhrC (CSF), ComP/ComA elementleri] ve transkripsiyon faktörler ComA, Spo0A, AbrB ve CodY'nin bac operonu üzerine etkileri, ilgili genlerin susturulması, transkripsiyonal füzyon analizleri ve EMSA analizleri ile doğrulanmıştır. farklı seviyelerde regule edilmektedir ve özetle GTP tarafından transkripsiyonel regülatörlerden CodY ile AbrB aracılığıyla negatif regülasyona maruz kalırken, ppGpp tarafından ve phrC feromonu aracılığıyla hücre yoğunluğu algılama mekanizması tarafından pozitif regülasyona maruz kalmaktadır ve daha detaylı regülasyonu şekil 2 de şematize edilmiştir (Özcengiz ve Ögülür, 2015).



Şekil 2. Basilisin biyosentetik operonu üzerindeki temel regülasyonlar ağı ve operonun kontrolünün sporulasyon, kompetans ve surfaktin biyosentezi ile ilişkisi (Özcengiz ve Ögülür, 2015)

Basilisin üreticisi PY79 suşunda biyosentetik operonunu bloke ederek *B. subtilis* OGU1 olarak isimlendirilen türevini [(basilisin-knock out (KO))] oluşturmada grubumuzda kullanılan ve transkripsiyonel bacA-lacZ füzyonunu içeren rekombinant plazmid Şekil 3'de gösterilmektedir. Bu rekombinant plazmidin *B. subtilis* PY79 kromozomal DNA'sına spesifik noktada tekli genetik değişim ile bacA lokusuna eklenmesiyle bac operonu inaktif hale getirilmiştir (Koroğlu vd., 2011). lac transkripsiyonal füzyonu ile yapılan basilisin ekspresyon deneyleri, basilisin aktivitesinin logaritmik büyüme fazında sabit ve yavaş bir artış gösterirken maximum seviyesine logaritmik büyüme fazından durağan faz geçişte, yani 16. saatte

ulaştığını göstermiştir. Aynı çalışmada *bac* operon (*bacABCDEywfG*) regülasyonunu hassas bir biçimde yöneten proteinlerden *AbrB* ve *CodY* *bac* operonunun negatif transkripsiyonel regülatörleri iken *ComA* ve *Spo0A* pozitif transkripsiyonel regülatörlerdir. Buna ek olarak, *bac* operonunun hem bazal seviyede, hem de durağan faza geçişteki indüklenmesinin doğrudan *ComA*'ya bağlı olduğu, *Spo0A*'nın ve *PhrC* (CSF), *PhrF*, *PhrK* peptidlerinin ise sadece maksimal ekspresyon için gerektiği, özellikle *PhrC* peptidinin *RapC* fosfatazdan bağımsız olarak *bac* ekspresyonunu desteklediği ortaya konulmuştur. Geçiş fazındaki indüklenmenin diğer bir pozitif regülatörü olan *Spo0A*, direk olarak *bac* promotor bölgesiyle etkileşimi içindedir ve aynı zamanda dolaylı olarak da *bac* operonunun negatif regülatörlerden biri olan *AbrB* ekspresyonunu baskılayarak görev yapar (Köroğlu vd., 2011). EMSA analiz sonuçlarına göre, *ComA* ve *Spo0A* *bac* operonu promotoruna (P_{bac}) bağlanmak için yarışmakta ve konantrasyona bağlı bir biçimde birbirlerini bu bölgeden uzaklaştırmaktadırlar. Diğer yandan, hücrelerde GTP seviyesine duyarlı (GTP'ye bağlanan) ve besince zengin koşullarda erken sporlanma genlerini baskılayan erken pleiotropik represör *CodY* (Inoaka vd., 2003), *AbrB* represörü ile birlikte P_{bac} 'a bağlanabilme özelliğindedir (Köroğlu vd., 2011).

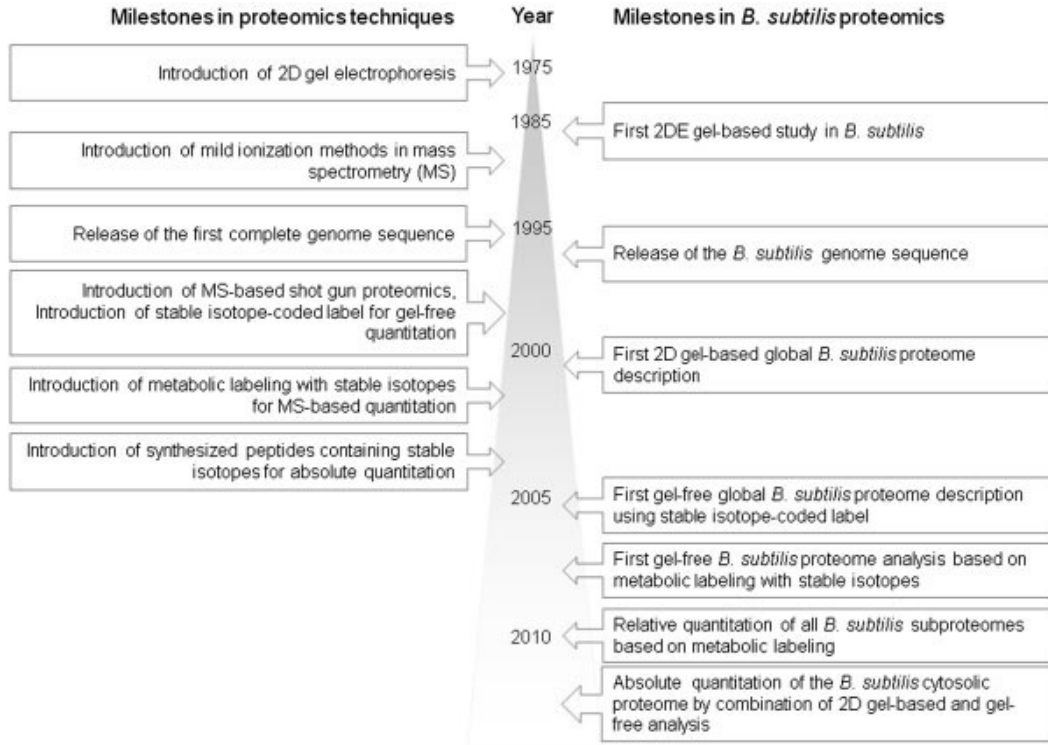


Şekil 3. OGU1 suşunun oluşturulmasında kullanılan rekombinat pMUTIN plasmidinin yapısı

Yukarıda adı geçen regülasyonların yanısıra, bir durağan faza geçiş regülatörü olan *ScoC* (*Hpr*)'nin P_{bac} 'a bağlanmak suretiyle basilisin biyosentezini regüle ettiği (Inoaka vd., 2009), *B. amyloliquefaciens* ile yapılan diğer bir çalışmada ise iki-komponentli bir sinyal iletimi sistemi olan *DegS/DegU*'nun hem *bac* operonu, hem de *bacG* transkripsiyonu üzerine pozitif kontrol uyguladığı gösterilmiştir (Mariappan vd., 2012).

1975 yılında iki boyutlu jel elektroforez yöntemi (2DE yönteminin) O'Farrel tarafından kompleks protein karışımlarının ayrıştırılmasında kullanılmasıyla birlikte proteom çalışmaları başlamış ve bu teknik sayesinde binlerce proteinin aynı anda ayrıştırılabilmesi mümkün olmuştur (O'Farrel 1975; Becher vd. 2011). 20. yüzyılın ortalarından itibaren genom sekanslama çalışmalarındaki gelişmeler, proteom çalışmalarına tamamen yeni bir perspektif

ve geniş bir boyut kazandırarak çeşitli uygulama alanları bulmasına yardımcı olmuştur. Model organizma olması ve moleküler biyoloji, genetik ve fizyoloji alanlarında hakkında yoğun bilgi birikimine sahip olunması sebebiyle *B. subtilis* proteom çalışmaları için çok tercih edilen bir organizmadır. *B. subtilis* kullanılarak ilk proteom çalışması (2DE) 1986 yılında gerçekleştirilmiş ve kapsamlı bir proteom haritası ise ilk kez 2001 yılında yayınlanmıştır (Büttner vd., 2001). Stres ve açlık ile indüklenen toplam 200'den fazla protein ve sigma B regülonu komponentleri de bu yönde yapılan proteom çalışmaları sayesinde açığa çıkarılmıştır (Antelmann vd., 2000; Bernhardt vd., 2003; Mostertz vd., 2004; Tam vd., 2006; Höper vd., 2006). Proteom tekniklerinin gelişimindeki mihenk taşları ve *B. subtilis* proteom çalışmalarında bunlarla eş zamanlı gelişmeler Şekil 4'de şematize edilmektedir (Becher vd., 2011).



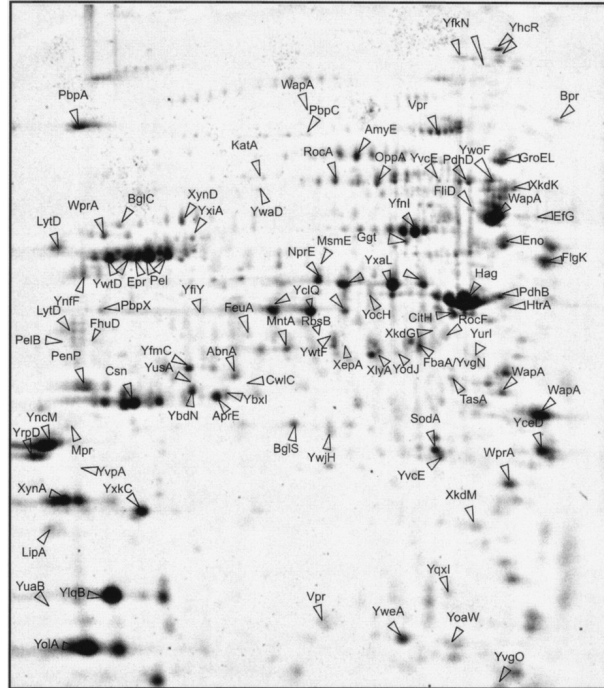
Şekil 4. Proteom alanındaki gelişmeler ve *B. subtilis*'deki uygulamaları (Becher vd., 2011).

B. subtilis ile yapılan çalışmaların odağında, sayıca oldukça fazla olan ekstraselüler proteinler de bulunmakta ve gen/protein bazında yapılan moleküler genetik çalışmalarına kıyasla proteom çalışmaları sonucunda elde edilen global, daha kapsamlı sonuçlara duyulan ihtiyaç doğrultusunda 2000'li yılların başında Sekretom (Ekstraselüler proteom) terimi yaygın biçimde kullanılmaya başlamıştır. Sekretom hücre dışına salgılanan proteinleri ve bu

proteinleri salgılama mekanizmalarının elemanlarını içerir ve proteom çalışmalarının bir alt grubunu oluşturur (Greenbaum vd., 2001; Tjalsma vd., 2004). Hem değişen çevre koşullarına adaptasyon sağlayan protein salgılama mekanizmalarını anlayabilmek, hem de salgılanan ürünleri tanımlayıp kullanım alanları yaratmaya olanak sağlamak bakımından sekretom çalışmaları önemli bir konuma sahiptir, çünkü ekstraselüler proteinler bulaşıcı hastalıklara neden olan mikroorganizmalara karşı tedavi edici buluşlarda, kanser çalışmalarında biyolojik işaret olarak kullanımlarının yanı sıra temelde gıda ve ilaç endüstrisi, enzim biyoteknolojisi, tarım ve çevre alanlarında önemli fonksiyon ve kullanım alanlarına sahiptirler (Brown vd., 2012).

B. subtilis hücreleri kompleks besiyerinde büyütüldüğünde en yüksek ekstraselüler protein miktarı gözlenirken, minimal besiyerinde büyütüldüğünde ekstraselüler protein miktarı çok daha düşük kalmaktadır. Diğer yandan ekstraselüler protein miktarı durağan faza geçişten sonra çok daha yüksek seviyelere ulaşmaktadır (Voigt vd., 2006). Matematiksel algoritmalarla dayanılarak yapılan tahminlere göre *B. subtilis*'e ait yaklaşık 300'den fazla ekstraselüler protein bulunmaktadır ve bu proteinlerin büyük bir bölümü besin yakalama, detoksifikasyon, iletişim, savunma ve benzer bir çok faaliyet için doğrudan çevreye salgılanmaktadır (Van Dijk vd., 2002; Tjalsma vd., 2004; Yamane vd., 2004). *B. subtilis*'e ait ekstraselüler protein profili minimal besiyerinde logaritmik büyüme fazının sonunda incelendiğinde yaklaşık 110 protein spotu belirlenmiştir (Hirose vd., 2000). Bunlar ekstraselüler proteinler, membran proteinler, flagellin proteini, faj proteini ve sitoplazmik proteinlerden oluşmaktadır. Aynı çalışmada, protein translokasyon ve hücre büyümesi için gerekli olan SecA ve Ffh proteinlerinin ekstraselüler protein salgılanmasında çok önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Farklı karbon kaynakları kullanıldığında 19 yeni ekstraselüler protein belirlenmiştir. *B. subtilis* zengin besiyerinde (LB) büyütüldüğünde ise 2DE yöntemi ile yaklaşık 200 den fazla ekstraselüler protein spotu elde edilmiş ve 75 farklı proteinin yanı sıra fosfat yoksunluğunda 8 farklı ekstraselüler protein daha belirlenmiştir (Şekil 5). Toplamda belirlenen proteinlerden 39'u sinyal peptid içermekte olup matematiksel algoritmalarla ekstraselüler oldukları tahmin edilmişken, geriye kalan 43 protein tahmin edilmeyen ekstraselüler proteinler olup bunlardan 15'inin sinyal peptidi içerdiği, 6'sı transmembran proteini olduğu ve kalan 22'sinin ise sinyal peptid içermeyen proteinlerden oluşmakta olduğu rapor edilmiştir. Özetle, belirlenen ekstraselüler proteinler karbonhidrat, proteaz, peptidaz gibi enzimler ve amino asit metabolizmasında, lipid, DNA ve RNA yıkılma metabolizmalarında yer alan enzimler, hücre duvarı biyosentezi, lipoproteinler ve taşıma sistemleri, detoksifikasyon, flagella ile ilgili proteinler, transkripsiyonel regülatörler, faj ile ilgili proteinler, sporulasyon proteinleri ve fonksiyonu bilinmeyen proteinlerden oluşmaktadır (Tjalsma vd., 2004).

Sekretom çalışmalarının ne denli önemli ve gerekli olduğu, genom sekansı kullanılarak yapılan ekstraselüler protein tahminlerinin proteom çalışmalarıyla elde edilen gerçek ekstraselüler proteinlerin ancak %50'ye yakın bir kısmını kapsamamasından anlaşılmaktadır (Antelman vd., 2001). Aynı zamanda, sekretom çalışmalarında belirlenen proteinlerin büyük bir kısmının herhangi bir sinyal peptidi içermemesi de, bu proteinlerin hücre yıkımı sonucu hücre dışı ortama çıkıp çıkmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Bu amaçla yapılan başka bir çalışmada, N-terminali herhangi bir sinyal peptid içermeyen bir protein olan Est55'in *B. subtilis*'e klonlanıp ifade edildikten sonra durağan fazın başlangıcından itibaren hücre dışına salgılanmaya başlandığı, ancak durağan fazın sonlarına doğru salgılanma miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Hücre içinde bulunan ve hücre dışına salgılanan Est55 protein sekansının da aynı olduğu, dolayısıyla da hiçbir kesime uğramadığı bu çalışmada gösterilmiştir. Bu bulgular, Est55 gibi birçok sitoplazmik proteinin herhangi bir sinyal peptid içermemesine ya da ekstraselüler olarak tahmin edilmemesine rağmen hücre dışına salgılandığı ve bu olgunun durağan fazda gerçekleşen herhangi bir hücre yıkımından kaynaklanmadığını göstermiştir (Yang vd, 2011). *B. cereus* ile zamana bağlı yapılan bir sekretom çalışmasında, sadece vegetatif fazda salgılanan bir protein belirlenememiş ve protein salgılanmasının vegetatif faz ile başlayıp durağan fazın erken dönemlerine kadar devam eden sürekli bir süreç olduğu sonucuna varılmıştır (Gilois vd., 2007).



Şekil 5. Zengin besiyerinde (LB) büyütülen *Bacillus subtilis* 168'e ait sekretom (Tjalsma vd., 2004).

Bacillus türleri, bakteri türleri arasında ekstraselüler enzim üretimi bakımından birinci sırada yer almaktadır. Biyoteknolojik ve endüstriyel protein üretim süreçlerinde özellikle *B. subtilis* üstün fermentasyon özellikleri, yüksek üretim kapasitesi (20-25 gram/litre) ve toksik yan ürünlere sahip olmaması bakımından en popüler organizmalardan birisidir. Özellikle *Bacillus subtilis* 'in ekzotoksin ve endotoksinden yoksun olması nedeniyle bu organizmaya ait birçok ürün GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) olarak bilinmektedir. Kullanılan mikroorganizmaların enzimleri doğrudan fermentasyon besiyerine salgılaması alt aşamalarda maliyeti düşürmekte, daha verimli ve avantajlı olmasını sağlamaktadır. *B. subtilis*'in uzun yıllardır yoğun çalışılan bir organizma olmasının yanı sıra iyi karakterize edilmiş olması ve sporulasyon, kompetans gibi gelişim programlarına sahip olması onu tercih edilen bir üretici kılmaktadır. Bunlara ek olarak, genetik manipülasyonlara ve büyük hacimli fermentasyon üretimine yatkın olması ile de endüstriyel uygulamalarda tercih sebebidir. *Bacillus* türleri uzun yıllardır endüstriyel çalışmalarda proteaz ve alfa-amilaz gibi hidrolitik enzimlerin üretiminden vitamin ve amino asit gibi özel metabolitlerin üretimine dek önemli yere sahiptir (Widner vd., 2005; Djill ve Hecker 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bakteri Suşları, Kültür Besiyerleri ve İnkübasyon Koşulları

Proje kapsamında, prototrofik bir suş olan PY79 (168'den oluşturulan prototrof; P. Youngman, University of Georgia, Athens, GA) ve onun grubumuz tarafından basilisin biyosentetik operonu spesifik olarak bloke edilen (*bacA::lacZ::erm*) bir türevi olan OGU1 suşu (Koroğlu vd., 2011) kullanılmıştır. Özetle, *bacA-lacZ* füzyonu, pMutin kökenli bir plazmidin tekli bir crossover integrantı olup bu integrasyonla *bacA* geni, böylelikle tüm *bac* operonu inaktive edilmiştir. *B. subtilis* PY79 ve OGU1 suşları 37°C'de LA besiyerlerinde bir gece boyunca inkübe edildikten sonra 10 mL PA besiyerine (pH 7.4) (Perry ve Abraham, 1979) transfer edilip 16 saat boyunca 37°C'de (200 rpm'de) büyütülmüştür. Kültürlerin belli bir miktarı 595 nm'de (OD₅₉₅) başlangıç optik yoğunluğu 0.1 olacak şekilde 100 mL PA besiyerine aktarıldıktan sonra zamana bağlı sekretom değişimlerinin belirlenebilmesi için 12, 16 ve 24 saat boyunca 37°C'de (200 rpm'de) inkübe edilmiştir. Bu zaman aralıkları daha önce grubumuz tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular referans alınarak belirlenmiştir (Özcengiz vd., 1990; Koroğlu vd., 2011). Basilisin seviyesi *B. subtilis* PA besiyerinde büyütüldüğünde 16. saatte maksimum seviyeye ulaşmaktadır ve aynı zamanda kültürlerin durağan faza girişini temsil etmektedir. Protein salgılanma süreci dinamik ve devamlı bir süreç olduğundan, 16. saat baz alınarak durağan faza girmeden 4 saat öncesinde ve girdikten 8 saat sonrasında protein kalıplarında meydana gelen değişimlerin sonuçların daha sağlıklı olmasını sağlayacak birer değişken oluşturması hedeflenmiştir.

3.2 Tüm Genom Dizileme ve Direkt Sekanslama

B. subtilis OGU1'in (GenBank erişim no. QLNM00000000) tüm genom dizilemesi tekli koloniler üzerinde Illumina Truseq 2x150 baz çiftli çift yönlü dizileme ile yapılmıştır. (Macrogen, Inc., Güney Kore). Ortalama örtüşme örnek başına 1-2 Gb'tır. SNPLer ve küçük ekle-sil (indel) mutasyon analizleri için, işlenmemiş veriler Burrows-Wheeler Aligner ile Bacillus Genetic Stock Center (BGSC)'a kayıtlı *B. subtilis* PY79 referans genomuna (GenBank erişim no. CP006881.1 ile DDBJ/EMBL/GenBank veritabanları) göre karşılaştırılmıştır. (Schroeder ve Simmons, 2013). SAMTools ve Picard, iki kere okunan dizileri kaldırmak ve daha ileri konfirmasyon için varyant bilgilerini bulmak amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra laboratuvarımızda uzun yıllardır kullanılan (lab-adapte) PY79 ve onun türevi olan OGU1 suşumuz, tüm genom dizilemesi sonucu bulunmuş varyant genlerle BGSC-PY79'a göre Illumina MiSeq 2x150 baz çiftli çift yönlü direkt sekanslamaya tabi tutulmuştur. (Sentegen Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye). Veriler IGV 2.3 (Broad Institute,

Cambridge, MA, ABD) ve UniPro UGENE (<http://ugene.net>) yazılımları ile analiz edilmiştir. Bulunan mutasyonların haritaları çıkarılmış ve SnapGene (<http://snapgene.com>) kullanılarak her bir suşun karşılaştırılması için referans sekanslara göre dizilmiştir.

3.3 Protein Ekstraksiyonu ve Sekretom Örneklerinin Hazırlanması

Besiyerinden ekstraselüler proteinlerin izolasyonu için Kaffarnik vd. (2009) tarafından rapor edilmiş olan metod bazı ufak tefek değişikliklerle kullanılmıştır: Hücreler 16,000 d'de 15 dak çöktürüldükten sonra süpernatant kalması muhtemel vejetatif hücreleri uzaklaştırmak için 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 0.5 hacim Tris tamponlu fenol (pH 8.0) eklenmiş ve sonra kuvvetlice çalkalanmıştır. 30 dakika boyunca buzda inkübe ettikten sonra faz ayrışması için 6,000 g'de oda sıcaklığında 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Alttaki fenol fazı yeni bir santrifüj tüpüne transfer edilerek bir hacim geri ekstraksiyon tamponu (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM KCl, 10 mM EDTA, % 0.4 (v/v) β-merkaptoetanol, 100 mM PMSF) ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve 6,000 g'de yine oda sıcaklığında 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Aynı işlem iki kere tekrarlandıktan sonra fenol fazı yeni bir santrifüj tüpüne alınmıştır. 5 hacim metanol (0.1 M NH₄OAc eklenen) ile proteinler -20°C'de 16 saat boyunca çöktürülmüştür. Sekretom örneğinin 15,000 g'de 4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmesi sonucu elde edilen çökelti metanol (0.1 M NH₄OAc eklenen) ile iki kere yıkandıktan sonra %80 aseton ile de iki defa yıkanmıştır. Örnek santrifüj edilmiş ve çökelti vakum ile kurutulularak toz halinde -20°C'de saklanmıştır. Toplam protein konsantrasyonunu belirlemek için modifiye Bradford analizi kullanılmıştır (Ramagli ve Rodriguez, 1985).

3.4 Örneklerin Hazırlanması ve Nano-LC-MS/MS Analizleri

Jelden-bağımsız metodlara yeni bir yaklaşım içeren Filter-Aided Sample Preparation (FASP) metodu kullanılmıştır. FASP metodu, proteinlerin ekstraksiyonu sonrasında uygulanır ve MS analizi öncesinde filtre üzerinde pürifikasyon ve tripsin ile kesime olanak tanır. FASP, aynı zamanda deterjanların ve SDS, CHAPS gibi kaotrofik ajanların ve tuzların temizlenmesini sağlayan ve yüksek protein kapsayışına olan tanıyan bir yöntemdir (Aebersold and Mann, 2003; Wisniewski vd., 2009; Nel vd., 2015). Proteinler doğrudan solüsyon içerisinde, Expedon FASP protein digestion kit protokolüne göre hazırlanmıştır. Özetle, 30µg protein, üre solüsyonu (1mM Tris içerisinde çözülmüş) eklenerek 30K Amicon Spin filtrelerine alınmış, 14.000g de 15 dk santrifuj edilip aynı işlem 200µL üre solüsyonu eklenerek iki defa tekrarlanmıştır. 10µL iodoasetamit ile 90 µL üre solüsyonu karıştırılıp spin filtre 1 dak çalkalanmış, daha sonra 20 dak süreyle karanlıkta inkübe edildikten sonra santrifüj edilmiştir. Ardından 2 kez üre solüsyonu ile yıkama ve santrifüj yapılmış, 50µM amonyum

bikarbonattan 100µL eklenip santrifüj edilmiştir. Bu aşama iki kez tekrarlanmıştır. 75 µL kesim solüsyonu (tripsin ve kimotripsin) hazırlanıp eklendikten sonra 37° C'de 18 saat kesime bırakılmıştır. Spin filtre yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp 40 µL 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiş ve santrifuj edilmiştir. Üzerine 50µL 0.5 M NaCl eklenip tekrar santrifuj edilmiş, kesim işlemi tamamlandıktan sonra konstantre etme ve Ziptip ile temizleme aşamaları da gerçekleştirildikten sonra LC-MS için hazır hale getirilmiştir (Wisniewski vd., 2009).

Triptik kesim işlemiyle elde edilen peptitlerin analizi için nano-LC-MS/MS (AB SCIEX TripleTOF 5600+) cihazı kullanılmıştır. Cihaz Exigent expert nano-LC 400 sistem (AB SCIEX) eklentisine sahiptir. Trap kolonu (180µm x 20mm column, 300, nanoACQUITY UPLC® 2G-VM Trap 5µm Symetry® C18, Waters, UK) ve separasyon kolonu (75µm, x 150mm column, nanoACQUITY UPLC® 1.8µm 120 Å HSS T3, C18, Waters, UK) kullanılmıştır. Analyst® TF v.1.6 (AB SCIEX) veritabanı MS and MS/MS data kazanımı, ProteinPilot 4.5 Beta (AB SCIEX) ise peptid tanımlanması için kullanılmıştır. Öncül tolerans 10 ppm ve fragmente iyonlar için tolerans 1 atomik kütle birimi (amu) olarak ayarlanmıştır. Decoy veritabanı araştırmasına bağlı olarak yanlış bulma oranı (FDR=Faalse Discovery Rate) %1 olarak kabul edilmiştir. Son aşamada proteinler eğer en az iki eşsiz peptid ile eşleşiyorsa tanımlanmış olarak kabul edilmiştir.

3.5 LC-MS MS Data Analizi

Data analizi için, MxQuant platformu ve Perseus yazılımı ile birlikte istatistiksel program R kullanılmıştır (Kulak vd., 2014). Volkan çizimleri KO mutant ile parental suş arasında anlamlı ifade farklılığı gösteren (p değeri < 0.05 ve en az 2 kat ifade değişimi) proteinleri içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.6 2DE ve MALDI-TOF MS Analizi

IPG stripleri (11 cm, pH 3-10, BioRad, ABD) 200µl rehidrasyon tamponu (8M üre, 2M tiyoüre, 2% w/v CHAPS, 50 mM DTT ve 1 % v/v amfolit 3-10) uygulanarak mineral yağı ile kaplanmış şekilde 14 saat boyunca oda sıcaklığında pasif olarak rehidrate edilmiştir. İzoelektrik odaklama PROTEAN IEF Cell System (Biorad, ABD) cihazında yapılmıştır. Rehidre edilen stripler takip eden voltaj profili ile IEF işlemine maruz bırakılmıştır: 1.5 saat 200V; 1.5 saat 400V; 1.5 saat 500V; 3 saat 1000V; 6 saat 4000V; 8000V 63.000Vhr'a ulaşıncaya sonlandırılmıştır. IPG striplerinin her biri önce 3 mL solüsyon 1'de (6M üre, 50mM Tris-HCl (pH 8.8), 30% v/v gliserin, 2% w/v SDS, 50mg DTT) 15 dakika, daha sonra 3 mL solüsyon 2'de (6M üre, 50mM Tris-HCl (pH 8.8), 30% v/v gliserin, 2% w/v SDS, 225 mg iyodoasetamid) 15 dakika boyunca dengelenmiştir (Görg vd., 2004). Daha sonra IPG stripte

fokuslanan proteinler Criterion TGX Stain-Free Precast Gels™ (Bio-RAD, USA) sistemi kullanılarak yaklaşık 100V uygulanarak ikinci boyutta ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan proteinleri görüntülemek için her bir jel Collodial Comassie Blue (CCB) ile literatürde belirtilen yöntemle boyanmıştır (Neuhof vd., 1988). CCB-boyanmış jeller incelendiğinde elde edilen görüntülerin kalitesi yeterli bulunmadığı için, jellerin boyanması için LavaPurple kiti (Fluorotechnics, Sydney, Australia) kullanılmıştır. LavaPurple, epicocconone floroforu bazlı bir floresan boya kiti olup bu boyama yöntemi “Deep Purple Total Protein Staining” olarak da bilinir. Özetle, jeller bir gece boyunca %15 etanol, %1 sitrik asit içerisinde fikse edilir, 100 mM sodyum borat tamponuyla (pH 10.8) 1:200 oranında dilue edilmiş LavaPurple konsantresi ile 1 saat boyanır, %15 etanol (Ball and Karuso, 2007), fazla boyanın uzaklaştırılması için %15 etanolde 30 dak inkübe edilir, ve sonra %15 etanol, %1 sitrik asit içerisinde asififikasyon yapıldıktan sonra görüntü alımına hazırdır. Boyanan jeller, analizler için Typhoon 9400 multi-mode imager (GE Healthcare) cihazı ile taratılmıştır (yeşil lazerle 532 nm’de eksitasyon, 610 nm’de dar band geçiş filtresi ile ölçüm) (Griebel vd., 2013).

Elde edilen görüntüler için Delta 2D versiyon 4.3 (Decodon, Germany) yazılımı kullanılarak ekspresyon farklılığı gösteren proteinler belirlendi. 2 kat artış gösteren ve p değeri 0.05 ten küçük olan proteinler değişim gösteren proteinler olarak kabul edilmiştir. MALDI-TOF MS analizleri, bizzat proje bursiyeri tarafından, projemizin yurtdışı seyahat fonunu hem Berlin’de LC MS MS datasını tebliğ olarak sunacağı uluslararası toplantı için kullanmak, hem de aynı yanında götürdüğü 2DE jellerin MALDI TOF analizini Greifswald Üniversitesi, Almanya’da bizzat yaparak tek kalemde etkin ve ekonomik bir biçimde deneyleri için kullanmak üzere, yapıldı. Analizler için AB SCIEX TOF / TOFTM 5800 Analyzer (AB Sciex / MDS Analytical Technologies) cihazı kullanıldı. Kütle kesinliği (mass accuracy) için genelde kullanılan aralık olan 10 ve 30 ppm arası tercih edildi.

3.7 Veritabanı Araştırması, Protein Tanımlama ve Lokalizasyon Analizleri

B. subtilis’in genom projesinin websitesinde bulunan, *B. subtilis*’e ait tüm genomik DNA sekans verileri FASTA formatında amino asit sekansına dönüştürülmüş ve 20 Kasım 1997 tarihinde yayınlanmıştır (Kunst vd., 1997). MALDI-TOF/MS ölçümlerinden elde edilen her bir protein spotunun peak listeleri (peptid kütle parmak izi ve MS/MS verileri) *B. subtilis* PMF veritabanına karşı MASCOT yazılımının (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) “Peptide Mass Fingerprint” ve “MS/MS Ion Search” motorları yardımı ile analiz edildi. MASCOT yazılımı tarafından verilen sonuçlar arasında protein olasılık skoru 49’dan yüksek olanlar protein tanımlanması için kullanıldı. Putatif işlevleri bulmak için, tanımlanan spotların MASCOT çıktısında bulunan protein erişim numaraları *B. subtilis* genom sekanslama

projesinin (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>), Subtiwiki (<http://www.subtiwiki.uni-goettingen.de/>) ve Protein Knowledgebase (UniProtKB) websitelerinde araştırıldı (<http://www.uniprot.org/>). Proteinler, Subtiwiki 2.0 veritabanını kullanılarak, işlevsel kategori listesinin yardımı ile sınıflandırıldı. Tanımlanan her bir proteinin amino asit sekansı pSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>) sunucusu kullanılarak hücre içi lokalizasyon tahminleri yapıldı. Sinyal peptit sekanslarının varlığı sinyal peptit tahmin programı olan SignalP versiyon 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ile belirlendi.

3.8 Total RNA örneklerinin hazırlanması

Total RNA izolasyonu için, 12. veya 16. saatlerde 100 mL'lik besiyerlerinden 2 mL'lik Eppendorf tüplere (her saat için 3'er biyolojik replika olacak şekilde) 2 mL *B. subtilis* PY79 ve OGU1 hücreleri aktarılmıştır. Hücreleri çöktürmek ve besiyerinden tamamen kurtulmak için tüpler 10 dak boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alındıktan sonra hücreler, olası bir fizyolojik değişimi engellemek amacıyla -80°C dolabına kaldırılarak soğuk şoka maruz bırakılmıştır. Total RNA izolasyonu için öncelikle Simms vd. (1993) tarafından rapor edilmiş TRIzol metodu denenmiş, fakat istenilen verim elde edilememiştir. Bu yüzden Macherey-Nagel Nucleospin® RNA izolasyon kiti protokolde birkaç değişiklik yapılarak kullanılmıştır. Bu değişiklikler sırasıyla; (i) 350 µL yerine 450 µL RA1 hücre parçalama tamponu kullanılması ve (ii) 350 µL yerine 450 µL %70 (v/v) etanol kullanılmasıdır. Ayrıca, olası bir RNase kontaminasyonunu engellemek amacıyla bütün kimyasallar nükleazlardan arındırılmış suyla hazırlanmış ve çalışılan ortam RNase inhibitör solüsyonuyla (RNase AWAY®, Sigma-Aldrich) deneyler öncesi temizlenmiştir. Nükleazdan arındırılmış su, distile su dietil pirokarbonat (DEPC) ile muamele edilerek elde edilmiştir.

RNA molekülleri, riboz şekerinin yapısındaki ekstra oksijen atomundan ötürü DNA moleküllerine oranla kırılmaya daha yatkındır. (Larralde vd., 1995) Bu yüzden, elde edilen total RNA örneklerinin bütünlüğü; gerçek zamanlı kantitatif PCR verilerinin kalitesi ve tekrarlanabilirliği için hayati bir önem taşımaktadır (Fleige ve Pfaffl, 2006). Bu yüzden total RNA izolasyonundan sonra RNA konsantrasyonu BioDrop® aleti ile ölçülmüş, elde edilen 60 µL'lik RNA örneğinin 5 µL'si 1% konsantrasyona sahip agaroz jelde yürütülmüştür. Ayrıca, Agilent® 2100 Bioanalyzer ile RNA örneklerinin bütünlüğü detaylı bir şekilde raporlanmıştır.

3.9 Primer Tasarımı

mRNA ifade seviyesi incelenecek 19 gen ve *rpoB* referans geninin sekansları NCBI veritabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) alınmış ve bu sekanslar primer tasarlamak için kullanılmıştır. Primer tasarımı için IDT'nin PrimerQuest® Tool adlı algoritması

kullanılmıştır (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Optimal primer tasarımı için aşağıdaki koşullar belirlenmiştir:

- Amplikon uzunluğu: 100 bp
- Ergime sıcaklığı (T_m): 62°C
- Primer uzunluğu: 22 bp
- GC içeriği: %50

Algoritmaya göre elde edilen primer setlerinin herhangi bir ikincil yapı veya primer-dimer'i oluşturup oluşturmayacağı IDT'nin OligoAnalyzer 3.1® algoritmasıyla kontrol edilmiştir. (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) Tasarlanan primerler Oligomer (Ankara, Türkiye) şirketi tarafından sentezlenmiştir. Sentezlenen primerler Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 1. RT-qPCR analizi için tasarlanan primerler

Gen ismi	Primer İsmi	Primer Sekansı	T _m	Amplikon Uzunluğu
rpoB (BSU01070)	rpoB_F	5' TGAACATCGGGCAGGTATTG 3'	62°C	112 bp
rpoB (BSU01070)	rpoB_R	5' GTTCCAGACATCCTCTTCTC 3'	62°C	112 bp
yxB (BSU39880)	yxB_F	5' GAACTCGCTGTAATCATCAATCC 3'	62°C	108 bp
yxB (BSU39880)	yxB_R	5' GGTCAATGTCTCTGCGTTCT 3'	62°C	108 bp
resD (BSU23120)	resD_F	5' TGAAGCGGGAACAGATGATT 3'	62°C	96 bp
resD (BSU23120)	resD_R	5' GAGGTTGGGATGCTCTTCT 3'	62°C	96 bp
luxS (BSU30670)	luxS_F	5' GAAGCCTGACACCATTACACA 3'	62°C	110 bp
luxS (BSU30670)	luxS_R	5' GGCAGCCATTGGAGAAATA 3'	62°C	110 bp
cheV (BSU14010)	cheV_F	5' AGTTGGCGTGGGTGAAA 3'	62°C	108 bp
cheV (BSU14010)	cheV_R	5' CTTCTACATGCTGATGGGAGTG 3'	62°C	108 bp
albE (BSU37410)	albE_F	5' TCACTGATCCCTTCTCCTACTC 3'	62°C	108 bp
albE (BSU37410)	albE_R	5' GAATCGCCTTTATCCTGTCTCTC 3'	62°C	108 bp
dnaK (BSU25470)	dnaK_F	5' ATTCAGGGCGCGTTATC 3'	62°C	118 bp
dnaK (BSU25470)	dnaK_R	5' TGTTGCGGTCGATCAGTTT 3'	62°C	118 bp
yugI (BSU31390)	yugI_F	5' GCTGCTCAAGTAAGCGAAGA 3'	62°C	100 bp
yugI (BSU31390)	yugI_R	5' TAAGTCTTTGCGGTTGGAC 3'	62°C	100 bp
yceE (BSU02910)	yceE_F	5' GGCATCACAGTGACCATTCA 3'	62°C	124 bp
yceE (BSU02910)	yceE_R	5' CTCCCAAATCGAAGCGAAGA 3'	62°C	124 bp
oppD (BSU11460)	oppD_F	5' CTGCTGGAATTAGTCGGTATCC 3'	62°C	95 bp
oppD (BSU11460)	oppD_R	5' GCAATGACAACCCTCTGTCT 3'	62°C	95 bp

ispA (BSU13190)	ispA_F	5' AGCTTCCTGAGGGCATTAAA 3'	62°C	101 bp
ispA (BSU13190)	ispA_R	5' GTCGCAGCCTGTGTCTAATA 3'	62°C	101 bp
gerE (BSU28410)	gerE_F	5' CTCGTTCAAGATAAGACAACAAAGG 3'	62°C	102 bp
gerE (BSU28410)	gerE_R	5' CACACCCAATTTCTGCATGG 3'	62°C	102 bp
sacC (BSU27030)	sacC_F	5' CTGGCTGGACGACTGTAAAT 3'	62°C	105 bp
sacC (BSU27030)	sacC_R	5' CCGGATGCTGAAGACAAGAT 3'	62°C	105 bp
abn2 (BSU39330)	abn2_F	5' CCACAACCTCCGCATACTATGAT 3'	62°C	98 bp
abn2 (BSU39330)	abn2_R	5' GGACTCTGACTTCGTGTTCTTC 3'	62°C	98 bp
csn (BSU26890)	csn_F	5' GCCGCTCAAGACAAAGTAAATG 3'	62°C	129 bp
csn (BSU26890)	csn_R	5' ACCATCGCCATGCTGAATAA 3'	62°C	129 bp
phy (BSU19800)	phy_F	5' ACAGATCCGAACCATCCTATTTC 3'	62°C	111 bp
phy (BSU19800)	phy_R	5' CCCTTGTTTGCTGTCACTA 3'	62°C	111 bp
lipA (BSU02700)	lipA_F	5' ATCTGGACGGCGGAAATAAAG 3'	62°C	135 bp
lipA (BSU02700)	lipA_R	5' TATCGGCACTGCTGTAAATGG 3'	62°C	135 bp
yhcR (BSU09190)	yhcR_F	5' AGCTCTCCAGTTTCCTCTCT 3'	62°C	112 bp
yhcR (BSU09190)	yhcR_R	5' CATCCGTGCCTTCATCAAATTC 3'	62°C	112 bp
bpr (BSU15300)	bpr_F	5' GGAGAGAAAGAAGCAGGAGAAA 3'	62°C	119 bp
bpr (BSU15300)	bpr_R	5' GTTGTTCCGTTGTCAGTTGATG 3'	62°C	119 bp
vpr (BSU38090)	vpr_F	5' TCTTGCTTATCGTGTGTTAGGG 3'	62°C	110 bp
vpr (BSU38090)	vpr_R	5' CGAGAGACAGTTTCATCACATC 3'	62°C	110 bp

3.10 cDNA sentezi ve RT-qPCR koşullarının optimizasyonu

Oligo(dT) ve random heksamer primerler birlikte kullanıldığında, cDNA sentezinin neredeyse bütün mRNA kopyalarını kapsadığı bilinmektedir (Bustin vd., 2005). Bu iki primer çeşidini içermekte olan BioRad iScript® cDNA sentez kiti projemiz kapsamında kullanılmıştır. Özetle, her bir RNA örneğinden 20 µL hacimde cDNA elde edilmiştir. Bu 20 µL; 4 µL 5x iScript reaksiyon karışımı, 1 µL revers transkriptaz ve geri kalan 15 µL de 1 µg edecek kadar RNA örneği ve nükleazdan arındırılmış sudan oluşmaktadır. Pipetajla karıştırılan 20 µL'lik reaksiyon karışımı sırası ile 25°C'de 5 dakika (oligo(dT) ve random primerlerin bağlanması için) 46°C'de 30 dakika (cDNA sentez reaksiyonu için) ve 95°C'de 5 dakika (enzim inaktivasyonu için) inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonlar sonucunda elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) analizinin verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için; primer konsantrasyonu, cDNA miktarı, MgCl₂ konsantrasyonu gibi çeşitli etkenlerin optimize edilmesi zorunludur (Klein, 2002). Bu araştırmada RT-qPCR reaksiyonu için BioRad SYBR® Green Supermix kullanılmıştır. Bu karışımda gerekli tampon solüsyonlar, gerekli

kofaktörler ve enzim bir arada bulunduğundan ve optimum cDNA miktarı (100 ng) belirtildiğinden; yalnızca optimum primer konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmiştir. Optimum primer konsantrasyonunu bulmak için; 50, 100, 150, 200 ve 300 nM konsantrasyonundaki primerlerle aşağıda belirtilen RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş, bu koşullardan en az primer-dimer oluşmasını sağlayan koşul optimum olarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı toplam 10 µL olmakla beraber; 5 µL BioRad SYBR® Green Supermix, 2 µL ileri ve geri primer ve de 1 µL cDNA içermektedir. RT-qPCR reaksiyon koşulları grubumuzca daha önce gerçekleştirilen RT-qPCR analizleri göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır ve aşağıdaki gibidir:

İlk denatürasyon: 95°C-30 saniye

Denatürasyon: 95°C-5 saniye (40 tekrar)

Çoğaltma: 62°C-1 dakika (40 tekrar)

Melting curve analizi: 65°C'den 95°C'a 0.5°C aralıklarla ölçüm alınmıştır.

Farklı primer konsantrasyonlarında primer-dimer yapısının oluşup oluşmadığı, melting curve analizi ile ölçülmüştür. Bu analizde sadece bir adet Tm maksimum değerinin olması sadece istenilen ürünün elde edildiği anlamına gelmektedir (Valasek vd., 2005). Melting curve analizlerine göre, bütün primerler için optimum primer konsantrasyonu 200 nM olarak belirlenmiştir.

3.11 RT-qPCR analizi

Relatif kantifikasyon, bir organizmanın farklı suşlarındaki mRNA ifade seviyelerini karşılaştırmak için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, ifadesi elde edilmek istenilen genin Ct değerleri karşılaştırılmakta ve bu karşılaştırma referans gene göre normalize edilmektedir. (Rao vd., 2013) RT-qPCR reaksiyonunun her aşamasında ampikon kopya sayısının iki katına çıktığı varsayıldığında, bu teknik matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir:

$$\text{Relatif kantifikasyon (kat değişimi)} = 2^{-[\Delta C_{t\text{mutant}} - \Delta C_{t\text{kontrol}}]} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

$$\Delta C_t = C_t(\text{hedef gen}) - C_t(\text{referans gen})$$

Bu teknik aynı zamanda $2^{-\Delta \Delta C_t}$ yöntemi olarak da adlandırılmaktadır (Arocho vd., 2006). Fakat, laboratuvar koşullarında RT-qPCR verimliliği çoğu zaman 100%'den farklıdır. Bunun sebebi, reaksiyon ortamında bulunan kimyasallar, cDNA örneğinden kaynaklı kontaminasyon veya

araştırmacı kaynaklı kontaminasyon olabilir (Rujiter vd., 2009). Rt-qPCR reaksiyon verimliliği neredeyse her tepkimede değiştiğinden yukarıdaki formülün analiz için uygulanması varyasyona sebep olacaktır. Bu yüzden bu formül değişen verimlilik değerleri göz önünde bulundurularak değiştirilmiş ve aşağıdaki hale getirilmiştir (Pfaffl, 2012):

$$\text{Relatif kantifikasyon (kat değişimi)} = \frac{E_{\text{hedef gen}}^{-\Delta Ct \text{ hedef gen}}}{E_{\text{referans gen}}^{-\Delta Ct \text{ referans gen}}}$$

Bu yüzden bütün genler için verimlilik değerinin (E) bulunması gerekmiştir. Bu amaçla her gen için standart eğriler oluşturulmuş, bu eğrilerin eğiminden E değeri hesaplanmıştır. Standart eğriler oluşturulurken konsantrasyonu belli cDNA örnekleri ve dilüsyonları (1x, 10x, 100x, 1000x) kullanılmış, ve eğri konsantrasyon vs. Ct değerleri olacak şekilde çizilmiştir.

Her bir genin mRNA ifadesi analizi için; 3'ü biyolojik, 2'si teknik replika olmak üzere toplam 6 replika ile çalışılmıştır. Yani her bir gen için toplam 12 Ct (6 tanesi PY79'a, 6 tanesi OGU1'a ait) değeri elde edilmiştir. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınmış ve yukarıdaki formüle göre her bir gen için kat değişimi hesabı yapılmıştır.

3.12 RTq-PCR verilerinin istatistiksel analizi

Yukarıdaki formüle göre elde edilen RTq-PCR kat değişimi verilerinin istatistiksel analizi için Student'in t testi kullanılmıştır. Bu testin uygulanması ve sonuçların grafik haline getirilmesi GraphPad Prism® 7.04 programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı; grafiklerde *(p<0.05), **(p<0.01) ve ***(p<0.001) olacak şekilde verilmiştir.

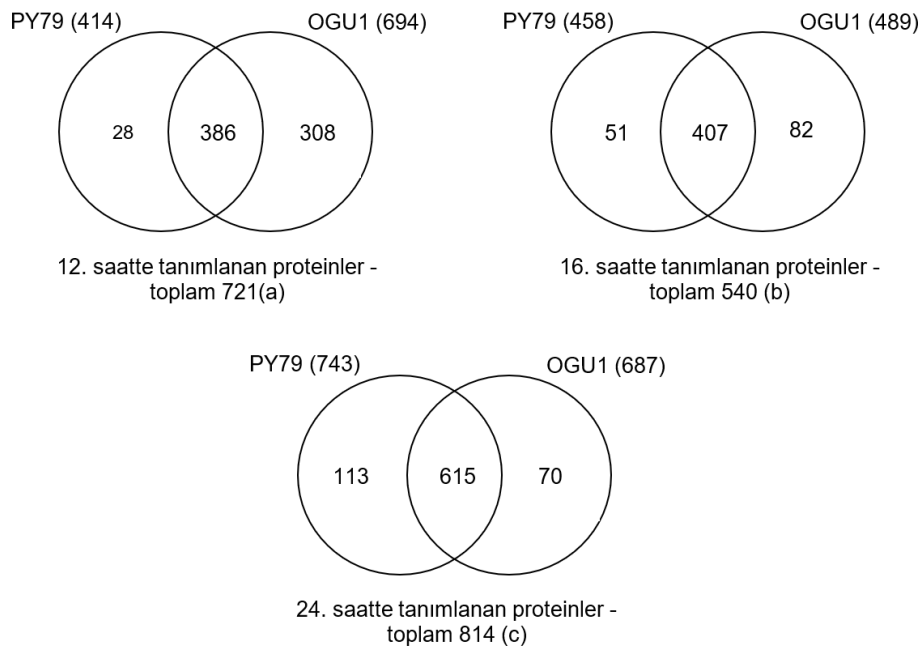
4. BULGULAR

4.1 PY79 ve OGU1 için Tüm Genom Dizileme ve Direkt Sekanslama

OGU1'in tüm genom dizilemesi *B.subtilis* PY79 (GenBank erişim no. CP006881.1)'a göre toplamda 5 SNP ve 1 delesyon olduğunu göstermiştir. Bu SNP'lerin 4'ü *prkA* geninin (varsayılan serin protein kinaz, SigK'ye bağlı gen ifadesinin kontrolü) kodlayan bölgesinde, deasetilaz olduğu varsayılan *ylxY* ve *yxkH* isimli 2 gende ve 16S RNA kodlayan *rnrE* geninde bulunmuştur. Geriye kalan 1 SNP, *ywcC* geni ve *slrA* geninin 5' UTR bölgesi arasında kalan, teoride hiçbir transkripsiyon faktörünün spesifik olarak bağlanmadığı kodlanmayan kısımda bulunmuştur. Daha açık olmak gerekirse SNP'ler, protein seviyesinde *prkA*'nın R₅₂₅ pozisyonunda belirsiz (silent) mutasyona, *yxkH* ve *ylxY*'de ise sırasıyla P₂₆₄'ten K₂₆₄ 'e ve V₁₆₈'den M₁₆₈'e değişim göstererek yanlış anlam (missense) mutasyonuna neden olmuştur. Bununla birlikte K₆'daki küçük delesyon, *swrAA1*'de (swarming motilite geni, DegU aktivitesi kontrolü) çerçeve kayması (frameshift) mutasyonuna yol açmaktadır. Daha sonra doğrulamak amacıyla, OGU1 ve ana suşu (30 yılı aşkın süredir laboratuvarımızda kapsamlı bir şekilde kullanılmakta olan) lab-adapte PY79, yukarıda adı geçen varyant genler için *B.subtilis* PY79'a göre direkt dizileme yöntemiyle analiz edilmiştir. Varyant gen sekansları iki suşta tamamen aynı olup, OGU1 ve parental suşu arasındaki proteomik farklılıkların sadece basilisin biosentetik operonunun bozulmasından kaynaklandığını doğrulamaktadır.

4.2 Karşılaştırmalı LC-MS/MS analizleri

İnkübasyonun 12., 16. ve 24. saatlerinde toplanan sekretom örnekleri FASP yöntemi kullanılarak hazırlanıp LC MS/MS analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 12., 16. ve 24. saat örneklerinde toplamda sırasıyla 721, 540 ve 814 protein tanımlanmış olup dağılımları Şekil 6'da gösterilmektedir.

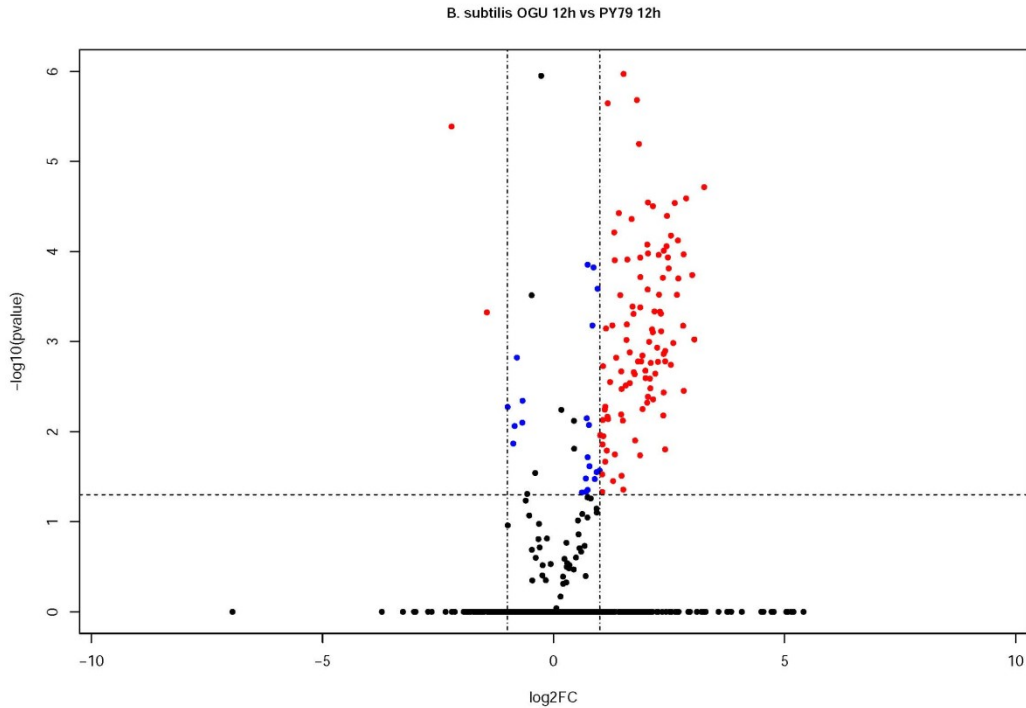


Şekil 6. LC-MS/MS analizleri ile PY79 ve OGU1 suşlarının sekretom örneklerinde tanımlanan toplam proteinlerin sayıları a) 12. saat, b) 16. saat, c) 24. saat. Sadece tek bir suşta tanımlanan proteinlerin ve her iki suşta da gösterilmiş proteinlerin sayıları sırasıyla çemberler ve kesişme noktaları içerisinde yer almaktadır.

Sayıları yukarıda verilen tanımlanmış proteinlerin mevcut algoritmalar (Max Quant, Perseus ve R) çerçevesinde detaylı analizleri sonucunda iki suşta gerçekten ifade farklılığı gösteren proteinler belirlenmiştir. Buna göre, tanımlanan proteinlerden mutant suş OGU1'da standard suş PY79'a göre 12. saatte 108, 16. saatte 46 ve 24. saate 12 proteinin ifade farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. İfade farklılığı gösteren proteinler saat bazında incelenmiş ve hücresel lokasyonlarına göre kategorize edildikten sonra fonksiyonları araştırılmıştır.

12. saat sekretom örneklerinin LC-MS/MS analizi sonucunda toplamda 108 proteinin mutant suşta ifade farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. Bu proteinlerden 63'ü sitoplazmik protein olup standard suşla karşılaştırıldığında mutant suşta ifadelerinde artış gösterdiği görülmüştür.

Toplamda 12. saatte tanımlanan proteinlerin dağılımı, volkan çizimi (volcano plot) ile Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. *Bacillus subtilis*'te PY79 ve OGU1 suşlarında 12 saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları. İfadelerinde en az iki kat

fark gösteren ve p değeri 0.05'ten küçük olanlar “diferensiyonel” kabul edilmiş olup kırmızı noktalar olarak işaretlenmiştir. Şemada x ve y eksenini, sırasıyla p değerleri (-log₁₀ tabanında) ve kat artışa (log₂ tabanında) karşılık gelmektedir. Yatay kesik çizgili hat p=0.05 (-log 0.05=1.3)değerine karşılık gelmekte olup bu hattın üstünde kalan noktalar p<0.05'e, altında kalan noktalar ise p>0.05'e karşılık gelmektedir. Dikey kesik çizgili hat log 2=1 değerine karşılık gelip bu alandaki proteinlerin ifadesinde bir değişim olmadığını belirtmektedir ve ilgili proteinler siyah noktalar kullanılarak gösterilmiştir. Kırmızı noktalar ise ifadesinde farklılık olan proteinlere karşılık gelmekte olup eksi ve artı değerler mutant suşta standard suşa göre azalış ve artış gösteren proteinlere işaret eder.

12. saatte ifade farklılığı gösteren proteinler alt hücrel lokasyonlarına (SSL), fonksiyonlarına, pI (izoelektrik noktası), Mw (moleküler ağırlık), SP (Sinyal peptid varlığı) gibi özelliklerine göre incelenmiş ve bu özelliklerini de içerecek şekilde Tablo 2' de listelenmiştir. Genel olarak bakıldığında, bu saatte, FabZ ve FlgK proteinleri dışında listelenen tüm proteinlerin ifadesinin mutant suşta ana suşa göre artış gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 2. 12. saat sekretom örneklerinde OGU1'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Protein	Gen	log ₂ F _C	Kat artış	P değeri	Fonksiyonel kategori kodu	Fonksiyonel kategori	Fonksiyon	SSL	Kütle (Da)	pI	SP
BSU09310	Phosphoglucomutase	pgcA	1.107	2.15	0.0057	SW 1.1	Cellular processes	interconversion of glucose 6-phosphate and alpha-glucose 1-phosphate	C	64663	4	
BSU35770	Putative major teichoic acid biosynthesis protein C	tagC	1.173	2.25	0.0000	SW 1.1	Cellular processes	biosynthesis of teichoic acid	C	50826	7.338	
BSU00500	Bifunctional protein GImU	glmU	1.688	3.22	0.0000	SW 1.1	Cellular processes	cell wall metabolism	C	49610	5.65	
BSU33930	Phosphoglycerate kinase	Pgk	2.036	4.10	0.0003	SW 2.1	Metabolism	enzyme in glycolysis/ gluconeogenesis	C	42190	4	
BSU18570	Probable oxidoreductase YoaE	yoaE	1.153	2.22	0.0162	SW 2.1	Metabolism	unknown	C	76167	7.333	
BSU33910	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	gpmI	2.700	6.50	0.0002	SW 2.2	Metabolism	enzyme in glycolysis / gluconeogenesis	C	56309	5.21	
BSU19370	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	odhA	1.922	3.79	0.0014	SW 2.2	Metabolism	TCA cycle	C	106278	5.871	
BSU18360	Aldose 1-epimerase	galM	1.119	2.17	0.0053	SW 2.2	Metabolism	unknown	C	37228	5.602	
BSU33900	Enolase	Eno	1.879	3.68	0.0002	SW 2.2	Metabolism	enzyme in glycolysis/ gluconeogenesis	C	46581	4	
BSU32610	Fructosamine deglycase FrlB	friB	2.541	5.82	0.0001	SW 2.2	Metabolism	metabolism of aminoacylated fructose	C	36876	5.442	
BSU33040	Fumarate hydratase class II	fumC	1.802	3.49	0.0000	SW 2.2	Metabolism	TCA cycle	C	50532	5.475	

BSU23850	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Zwf	1.355	2.56	0.0015	SW 2.2	Metabolism	initiation of the pentose phosphate pathway	C	55632	5.28	
BSU37660	Phosphate acetyltransferase	Pta	1.288	2.44	0.0353	SW 2.2	Metabolism	overflow metabolism	C	34791	4.649	
BSU37120	Probable fructose-bisphosphate aldolase	fbaA	1.461	2.75	0.0064	SW 2.2	Metabolism	enzyme in glycolysis/ gluconeogenesis	C	30401	5.03	
BSU29220	Probable NAD-dependent malic enzyme 4	ymtJ	1.165	2.24	0.0068	SW 2.2	Metabolism	malate utilization	C	43667	5.046	
BSU14860	Pyruvate carboxylase	Pyc	2.154	4.45	0.0044	SW 2.2	Metabolism	replenishment of the oxaloacetate pool	C	127937	5	
BSU14580	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	pdhA	2.999	8.00	0.0002	SW 2.2	Metabolism	links glycolysis and TCA cycle	C	41548	5	
BSU37110	Transaldolase	Tal	1.514	2.86	0.0000	SW 2.2	Metabolism	pentose phosphate pathway	C	22971	5.876	
BSU13180	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate--homocysteine methyltransferase	metE	2.132	4.38	0.0007	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of methionine	C	86806	4	
BSU31930	Alanine dehydrogenase	Ald	2.591	6.03	0.0010	SW 2.3	Metabolism	alanine utilization	C	39684	5	
BSU28290	Ketol-acid reductoisomerase	ilvC	3.047	8.26	0.0009	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of branched-chain amino acids	C	37458	5	
BSU02690	L-asparaginase 2	ansZ	2.491	5.62	0.0002	SW 2.3	Metabolism	asparagine utilization	C	40103	6	+
BSU24080	Leucine dehydrogenase	yqiT	2.671	6.37	0.0003	SW 2.3	Metabolism	utilization of branched-chain keto acids	C	39992	4.942	
BSU38920	Peptidase T	pepT	2.183	4.54	0.0005	SW 2.3	Metabolism	peptide degradation	C	45509	4.538	
BSU10020	Phosphoserine aminotransferase	serC	1.499	2.83	0.0075	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of serine	C	40136	5	
BSU36900	Serine hydroxymethyltransferase	glyA	1.272	2.41	0.0007	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of glycine	C	45490	5.475	
BSU32250	Threonine synthase	thrC	1.443	2.72	0.0003	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of threonine	C	37464	5.185	
BSU38960	Uncharacterized protein YxjG	yxjG	1.596	3.02	0.0001	SW 2.3	Metabolism	unknown	C	43165	5	
BSU36640	Urease subunit alpha	ureC	1.986	3.96	0.0021	SW 2.3	Metabolism	utilization of urea as alternative nitrogen source	C	61187	5.091	
BSU11250	Ornithine carbamoyltransferase	argF	1.877	3.67	0.0004	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of arginine	C	34663	4.965	
BSU36370	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	fabZ	-1.443	0.37	0.0005	SW 2.4	Metabolism	fatty acid biosynthesis	C	15740	9	
BSU15500	Dihydroorotase	pyrC	1.465	2.76	0.0021	SW 2.5	Metabolism	pyrimidine biosynthesis	C	46533	5.427	
BSU37670	Putative heme-dependent peroxidase YwfI	ywfI	1.990	3.97	0.0025	SW 2.6	Metabolism	biosynthesis of heme	C	29505	4	
BSU00110	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	pdxS	2.384	5.22	0.0001	SW 2.6	Metabolism	pyridoxal-5-phosphate biosynthesis	C	31612	5	
BSU22790	DNA-binding protein HU 1	hupA	2.301	4.93	0.0005	SW 3.1	Genetics	DNA packaging, function of the signal recognition complex	C	9884	9.501	
BSU16120	DNA topoisomerase 1	topA	1.841	3.58	0.0000	SW 3.1	Genetics	DNA replication	C	79078	9	
BSU01280	50S ribosomal protein L5	rplE	2.104	4.30	0.0017	SW 3.3	Genetics	translation	C	20148	9	
BSU22080	Carboxypeptidase 1	ypwA	2.691	6.46	0.0001	SW 3.3	Genetics	unknown	C	58175	4.77	
BSU01130	Elongation factor Tu	Tuf	1.927	3.80	0.0056	SW 3.3	Genetics	translation	C	43593	4	
BSU15430	Isoleucine--tRNA ligase	ileS	1.180	2.27	0.0072	SW 3.3	Genetics	translation	C	104845	5.191	
BSU00380	Methionine--tRNA ligase	metG	1.059	2.08	0.0139	SW 3.3	Genetics	translation	C	76188	4.958	
BSU28090	Valine--tRNA ligase	valS	2.365	5.15	0.0002	SW 3.3	Genetics	translation	C	101745	4.868	
BSU30320	Leucine--tRNA ligase	leuS	2.044	4.12	0.0001	SW 3.3	Genetics	translation	C	91543	4.857	
BSU16160	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	clpY	1.827	3.55	0.0017	SW 3.3	Genetics	protein degradation	C	52586	5	
BSU18000	Aconitate hydratase A	citB	1.223	2.33	0.0028	SW 3.4	Genetics	TCA cycle	C	99334	4	
BSU17460	Glutamine synthetase	glnA	1.070	2.10	0.0019	SW 3.4	Genetics	glutamine biosynthesis, control	C	50278	4	

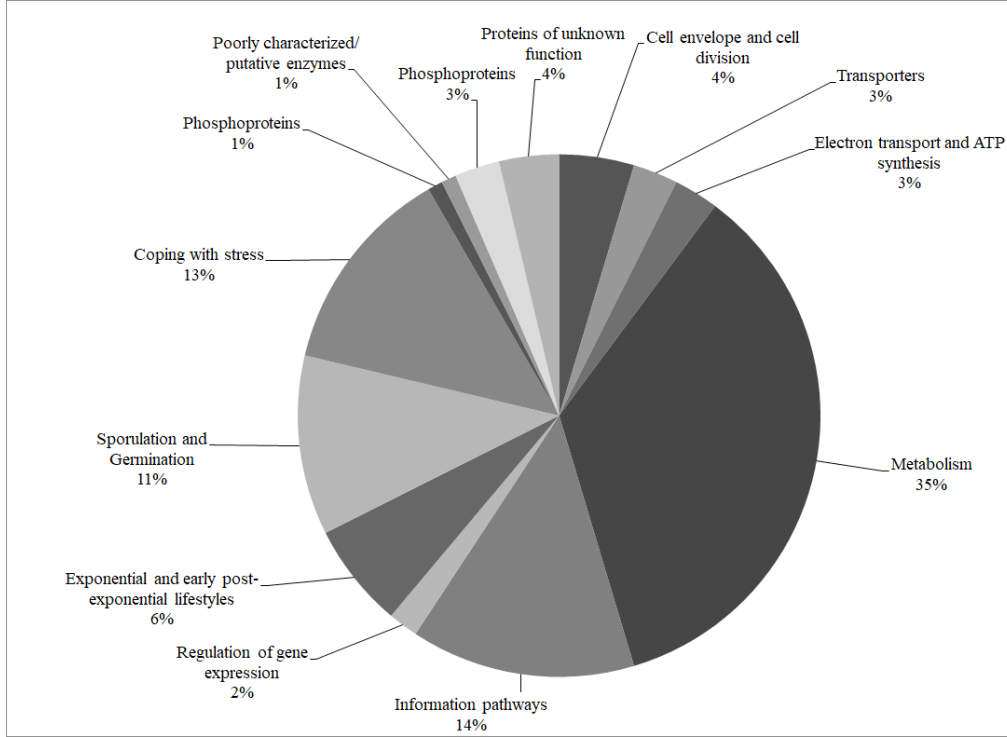
									of TnrA and GlnR activity				
BSU16690	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Pnp	1.764	3.40	0.0125	SW 4.1	Lifestyles	DNA repair, competence development, RNA degradation	C	77464	4		
BSU16770	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	dapA	2.242	4.73	0.0012	SW 4.2	Sporulation and Germination	biosynthesis of lysine and peptidoglycan	C	31042	4		
BSU16750	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Asd	1.897	3.72	0.0017	SW 4.2	Sporulation and Germination	biosynthesis of threonine, lysine, dipicolic acid, peptidoglycan	C	37847	4.971		
BSU11540	Oligoendopeptidase F homolog	yjbG	2.454	5.48	0.0000	SW 4.2	Sporulation and Germination	protein degradation	C	77073	5.131		
BSU08760	Sporulation-control protein spo0M	spo0M	1.578	2.99	0.0010	SW 4.2	Sporulation and Germination	sporulation	C	29733	4		
BSU06030	60 kDa chaperonin	groL	2.474	5.56	0.0001	SW 4.3	Coping with stress	protein folding and re-folding	C	57425	4		
BSU30650	General stress protein 20U	Dps	1.063	2.09	0.0074	SW 4.3	Coping with stress	iron storage, survival of of stress conditions	C	16594	4.444		
BSU33400	Glyoxal reductase	yvgN	2.444	5.44	0.0001	SW 4.3	Coping with stress	unknown	C	31663	5.066		
BSU03130	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	nadE	1.735	3.33	0.0022	SW 4.3	Coping with stress	NAD biosynthesis	C	30395	4.888		
BSU33240	Oxalate decarboxylase OxdC	oxdC	1.871	3.66	0.0183	SW 4.3	Coping with stress	unknown	C	43566	5		
BSU25020	Superoxide dismutase [Mn]	soda	1.412	2.66	0.0000	SW 4.3	Coping with stress	detoxification of oxygen radicals	C	22490	5		
BSU28500	Thioredoxin	trxA	3.259	9.57	0.0000	SW 4.3	Coping with stress	protection of proteins against oxidative damage	C	11393	4		
BSU25880	Uncharacterized protein YqxJ	yqxJ	1.007	2.01	0.0110	SW 5.1	Prophages and mobile genetic elements	unknown	C	14341	4.821		
BSU12410	Uncharacterized protein YjoA	yjoA	1.322	2.50	0.0001	SW 6.4	Proteins with unknown functions	unknown	C	17793	5.808		
BSU23910	Uncharacterized protein YqjE	yqjE	2.149	4.44	0.0000	SW 6.6	Proteins with unknown functions	unknown	C	39647	4.761		
BSU13010	6-phosphogluconolactonase	Pgl	1.134	2.20	0.0007	SW 4.3	Coping with stress	pentose phosphate pathway	C	38411	5		
BSU29120	Malate dehydrogenase	Mdh	2.043	4.12	0.0000	SW 2.2	Metabolism	TCA cycle	C	33644	4.727		
BSU04140	Penicillin-binding protein 3	pbpC	1.849	3.60	0.0000	SW 1.1	Cellular processes	unknown	CM	74406	6		
BSU23980	Arginine-binding extracellular protein ArtP	artP	2.537	5.81	0.0018	SW 1.2	Transporters	arginine uptake	CM	28312	5.086	+	
BSU27040	Fructose permease IID component	levG	2.067	4.19	0.0010	SW 1.2	Transporters	fructose uptake and phosphorylation	CM	30087	9.935		
BSU30770	Manganese-binding lipoprotein MntA	mntA	2.624	6.16	0.0000	SW 1.2	Transporters	manganese uptake	CM	33418	6.162	+	
BSU36830	ATP synthase subunit alpha	atpA	1.562	2.95	0.0031	SW 2.1	Metabolism	ATP synthesis	CM	54598	5		
BSU14590	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	pdhB	2.814	7.03	0.0001	SW 2.2	Metabolism	links glycolysis and TCA cycle	CM	35474	4		
BSU28440	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	sdhA	1.328	2.51	0.0179	SW 2.2	Metabolism	TCA cycle	CM	65152	5.714		
BSU09950	Foldase protein PrsA	prsA	2.085	4.24	0.0026	SW 3.3	Genetics	protein folding	CM	32510	9.122	+	
BSU3108	Uncharacterized protein	yuaB	1.010	2.01	0.010	SW 4.1	Lifestyles	biofilm formation,	CM	19257	9	+	

0	YuaB				9			control of entry into sporulation via the phosphorelay					
BSU3100	Uncharacterized protein YuaG	yuaG	1.508	2.84	0.0440	SW 4.1	Lifestyles	involved in the control of membrane fluidity	CM	55994	5.135		
BSU11430	Oligopeptide-binding protein OppA	oppA	2.869	7.31	0.0000	SW 4.1	Lifestyles	initiation of sporulation, competence development	CM	61525	5	+	
BSU27440	ABC transporter glutamine-binding protein GlnH	glnH	2.328	5.02	0.0008	SW 4.2	Sporulation and Germination	glutamine uptake	CM	29756	8	+	
BSU12110	Uncharacterized protein YjfA	yjfA	1.709	3.27	0.0004	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	CM	16880	9.495	+	
BSU30610	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YtlC	ytIC	1.312	2.48	0.0001	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	CM	29303	5.427		
BSU03000	Glycine betaine-binding protein OpuAC	opuAC	2.028	4.08	0.0001	SW 4.3	Coping with stress	compatible solute transport	CM	32215	8.015	+	
BSU07260	Lipoteichoic acid synthase 1	ltaS1	2.413	5.32	0.0157	SW 4.3	Coping with stress	biosynthesis of lipoteichoic acid	CM	73315	5		
BSU01935	Sporulation-killing factor biosynthesis protein SkfC	skfC	1.117	2.17	0.0215	SW 4.3	Coping with stress	may be involved in spore killing	CM	56292	8.146		
BSU25380	UPF0365 protein YqfA	yqfA	2.027	4.07	0.0048	SW 4.3	Coping with stress	resistance against subblancin	CM	35641	4.917		
BSU26820	Uncharacterized protein YrpD	yrpD	1.053	2.08	0.0298	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	CM	24876	9.964	+	
BSU26890	Chitosanase	Csn	2.323	5.01	0.0005	SW 2.2	Metabolism	chitin degradation	S	31497	8.892	+	
BSU39330	Extracellular endo-alpha-(1->5)-L-arabinanase 2	abn2	1.585	3.00	0.0006	SW 2.2	Metabolism	arabinan degradation	S	52607	7.371	+	
BSU27030	Levanase	sac	2.202	4.60	0.0023	SW 2.2	Metabolism	degradation of levan to fructose	S	75951	6.789	+	
BSU02700	Lipase EstA	estA	1.876	3.67	0.0001	SW 2.4	Metabolism	lipid degradation	S	22791	10	+	
BSU19800	3-phytase	Phy	1.054	2.08	0.0467	SW 2.6	Metabolism	utilization of inositol hexakisphosphate (phytate)	S	41946	4.936	+	
BSU09190	Endonuclease YhcR	yhcR	2.381	5.21	0.0014	SW 3.2	Genetics	utilization of nucleic acids	S	132686	4.693	+	
BSU15300	Bacillopeptidase F	Bpr	2.042	4.12	0.0041	SW 3.3	Genetics	protein degradation	S	154578	4.976	+	
BSU38090	Minor extracellular protease vpr	Vpr	1.648	3.13	0.0013	SW 3.3	Genetics	protein degradation	S	85608	5.773	+	
BSU39940	Uncharacterized protein YxaL	yxaL	1.650	3.14	0.0029	SW 3.3	Genetics	unknown	S	43877	6.379	+	
BSU35410	Flagellar hook-associated protein 1	flgK	-2.208	0.22	0.0000	SW 4.1	Lifestyles	motility and chemotaxis	S	54355	4.375		
BSU35360	Flagellin	Hag	2.148	4.43	0.0008	SW 4.1	Lifestyles	motility and chemotaxis	S	32626	4		
BSU24620	Spore coat-associated protein N	tasA	1.472	2.77	0.0034	SW 4.1	Lifestyles	biofilm formation	S	28305	5	+	
BSU18800	Beta-lactamase	penP	2.374	5.18	0.0066	SW 4.3	Coping with stress	resistance to beta-lactam antibiotics	S	33446	9.208	+	
BSU12610	Phage-like element PBSX protein XkdG	xkdG	2.415	5.33	0.0017	SW 5.1	Prophages and mobile genetic elements	unknown	S	34614	5.193	+	
BSU25890	Uncharacterized protein Yqxl	yqxl	2.282	4.86	0.0003	SW 5.1	Prophages and mobile genetic elements	unknown	S	16000	5.4		
BSU36460	Uncharacterized protein YwoF	ywoF	2.094	4.27	0.0033	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	S	51452	4.792	+	
BSU39230	rRNA nuclease WapA	wapA	1.471	2.77	0.0309	SW 1.1	Cellular processes	intercellular competition	S, CW	258162	6	+	

BSU07840	Trifunctional nucleotide phosphoesterase protein YfkN	yfkN	2.803	6.98	0.0007	SW 2.6	Metabolism	probably phosphate acquisition	S, CW	159706	5	+
BSU34520	Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase YvdP	yvdP	1.755	3.38	0.0023	SW 4.2	Sporulation and Germination	protection of the spore	SW	50085	6.101	
BSU40530	Spore coat protein F	cotF	1.730	3.32	0.0005	SW 4.2	Sporulation and Germination	resistance of the spore	SW	18725	7.374	
BSU02310	Putative hydrolase YbfO	ybfO	2.415	5.33	0.0013	SW 4.3	Coping with stress	unknown	S	51788	6.678	+
BSU02040	Uncharacterized protein YbdN	ybdN	2.260	4.79	0.0017	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	S	31503	8.804	+
BSU18780	Uncharacterized protein YoaW	yoaW	2.818	7.05	0.0035	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	S	16609	5.159	+
BSU07270	Probable glucose-1-phosphate cytidylyltransferase	yfnH	2.383	5.22	0.0037	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	U	28671	5	
BSU12280	Uncharacterized protein YjlC	yjlC	1.509	2.85	0.0000	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	U	15583	4.262	
BSU33540	FMN-dependent NADH-azoreductase 2	azoR2	2.273	4.83	0.0001	SW 4.2	Coping with stress	resistance to 2-methylhydroquinone	U	23272	5.114	

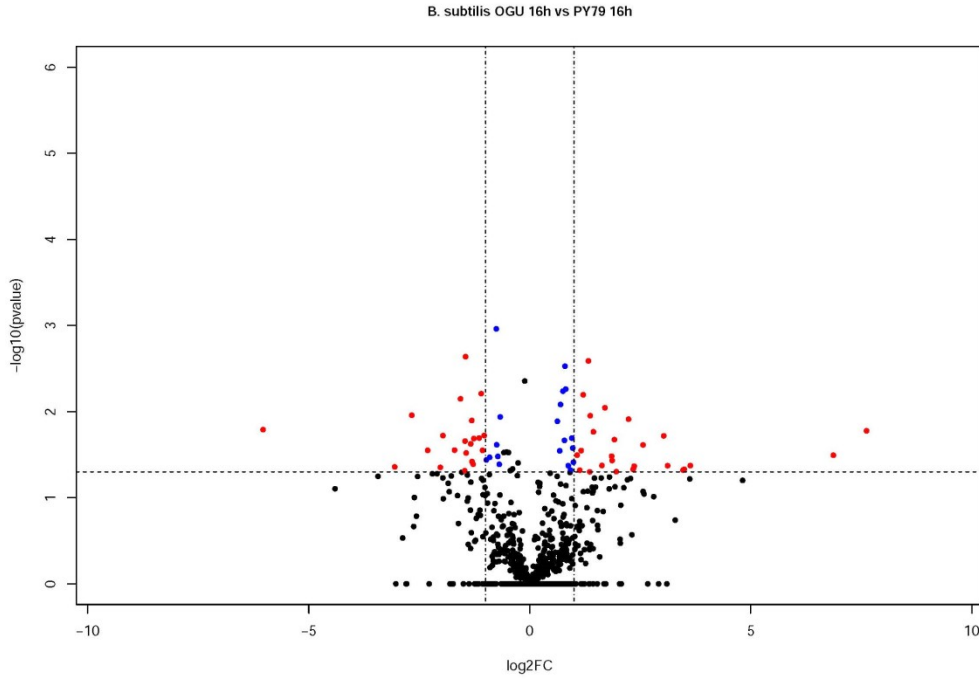
SSL: PSORTb and Uniprot kullanılarak belirlenen alt hücresele lokasyonlar C: Sitoplazma, CM: Sitoplazmik membran, CW: Hücre Duvarı, S: Dışarı salgılanan; ekstraselüler U:Bilinmeyen. SP: Sinyal peptit SignalP programı ile belirlenmiştir.

Subtiwiki veritabanı referans alınarak 12. saatte ifade farklılığı gösteren proteinler fonksiyonlarına göre kategorize edilmiş ve Şekil 8'deki dağılım elde edilmiştir. Bu dağılıma göre, ifade farklılığı gösteren proteinlerin büyük kısmı %35'lik dilimle başta Metabolizma (Metabolism) gelmek üzere Bilgi yolları (Information pathways), Stresle başa çıkma (Coping with stress) ve Sporulasyon ve jermantasyon (Sporulation and germination) kategorilerinde yer almaktadır. Fonksiyonu bilinmeyen proteinler veya putatif enzimler toplamda diferensiyel ekspresyon gösteren proteinlerin %5'ini oluşturmaktadır.



Şekil 8. 12. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı

Basilisin üretiminin maksimal seviyede olduğu zaman aralığına karşılık gelen **16. saat sekretom örneklerinin LC-MS/MS analizi** sonucunda toplamda 46 proteinin OGU1 mutant suşda ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu proteinlerden 27'si sitoplazmik protein olup bunların yarısı mutant suş OGU1'da artış göstermiştir. Ek olarak, 5 sitoplazmik membran proteininden 4'ü basilisin KO mutantında daha fazla ekspres edilmektedir. Ekstraselüler proteinler göz önünde bulundurulduğunda ise 9 proteinde ifade farklılığı gözlenmiştir. Geriye kalan ifade farklılığı gösteren 5 protein ise fonksiyonu henüz tanımlanmamış proteinler kategorisine girmektedir. Tanımlanan proteinlerin dağılımı volkan çizimi (volcano plot) kullanılarak Şekil 9' da gösterilmiştir.



Şekil 9. *Bacillus subtilis*'te PY79 ve OGU1 suşlarında 16 saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları. İfadelerinde en az iki kat fark gösteren ve p değeri 0.05'ten küçük olanlar "diferensiyonel" kabul edilmiş olup kırmızı noktalar olarak işaretlenmiştir. Şemada x ve y eksenini, sırasıyla p değerleri (-log₁₀ tabanında) ve kat artış (log₂ tabanında)'a karşılık gelmektedir. Yatay kesik çizgili hat p=0.05 (-log 0.05=1.3)değerine karşılık gelmekte olup bu hattın üstünde kalan noktalar p<0.05'e, altında kalan noktalar ise p>0.05'e karşılık gelmektedir. Dikey kesik çizgili hat log 2=1 değerine karşılık gelip bu alandaki proteinlerin ifadesinde bir değişim olmadığını belirtmektedir ve ilgili proteinler siyah noktalar kullanılarak gösterilmiştir. Kırmızı noktalar ise ifadesinde farklılık olan proteinlere karşılık gelmekte olup eksi ve artı değerler mutant suşta standard suşa göre azalış ve artış gösteren proteinlere işaret eder.

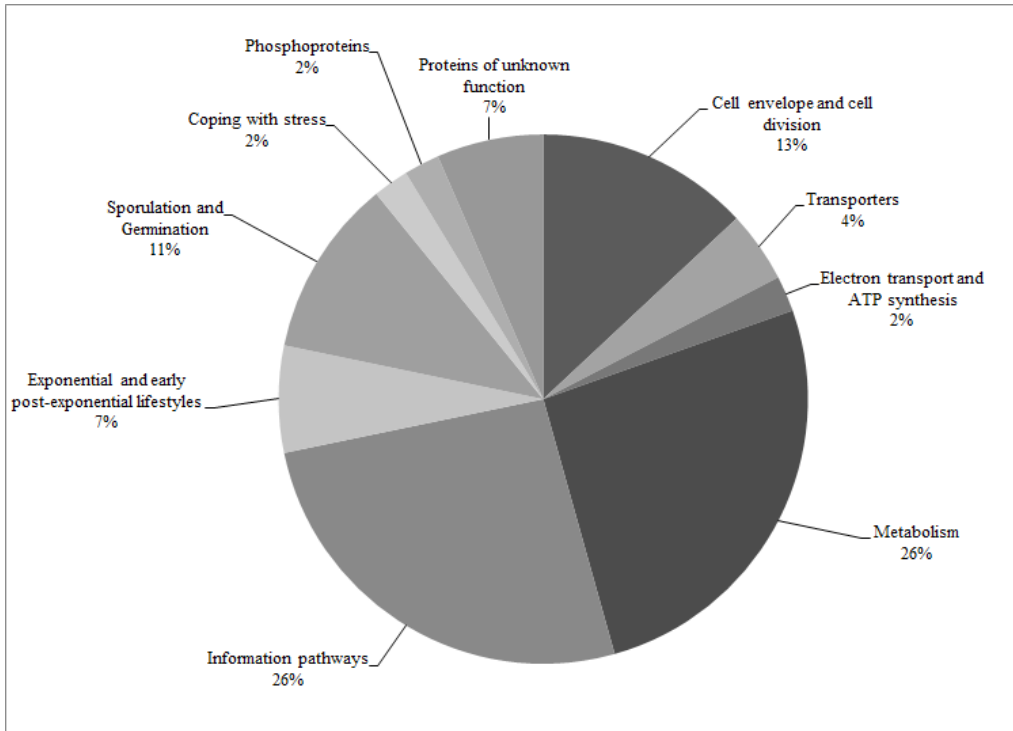
Tablo 3. 16. saat sekretom örneklerinde OGU1 'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Protein	Gen	log2FC	Kat Artış	P Değeri	Fonksiyonel Kategori Kodu	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	Kütle (Da)	pI	SP
BSU01150	30S ribosomal protein S10	<i>rpsJ</i>	-2,310	0,20	0,0282	SW 3.3	Genetics	translation	C	11666	10	
BSU01420	30S ribosomal protein S11	<i>rpsK</i>	-1,031	0,49	0,0189	SW 3.3	Genetics	translation	C	13925	12	
BSU01220	30S ribosomal protein S3	<i>rpsC</i>	-1,567	0,34	0,0071	SW 3.3	Genetics	translation	C	24323	10	
BSU01440	50S ribosomal protein L17	<i>rplQ</i>	-1,438	0,37	0,0302	SW 3.3	Genetics	translation	C	13751	10	
BSU01320	50S ribosomal protein L18	<i>rplR</i>	-1,311	0,40	0,0127	SW 3.3	Genetics	translation	C	12969	10	
BSU01210	50S ribosomal protein L22	<i>rplV</i>	-1,701	0,31	0,0280	SW 3.3	Genetics	translation	C	12460	11	
BSU27940	50S ribosomal protein L27	<i>rpmA</i>	-1,068	0,48	0,0282	SW 3.3	Genetics	translation	C	10372	10	
BSU13180	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate--homocysteine methyltransferase	<i>metE</i>	-1,263	0,42	0,0205	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of methionine	C	86806	4	
BSU23250	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>ribH</i>	1,367	2,58	0,0112	SW 2.6	Metabolism	riboflavin biosynthesis	C	16287	5	
BSU23070	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>serA</i>	-2,023	0,25	0,0444	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of serine	C	57129	5,617	
BSU14600	Dihydropyridoxyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	<i>pdhC</i>	-1,146	0,45	0,0203	SW 2.2	Metabolism	links glycolysis and TCA cycle	C	47539	4	
BSU19360	Dihydropyridoxyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	<i>odhB</i>	-2,669	0,16	0,0110	SW 2.2	Metabolism	TCA cycle	C	46003	4,859	
BSU00780	Dihydroneopterin aldolase	<i>folB</i>	1,864	3,64	0,0370	SW 2.6	Metabolism	biosynthesis of folate	C	13517	5,228	
BSU16740	Dipicolinate synthase subunit B	<i>dpaB</i>	2,338	5,06	0,0467	SW 4.2	Sporulation and Germination	dipicolic acid production	C	21869	6,148	
BSU01780	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	<i>glmS</i>	-3,054	0,12	0,0439	SW 1.1	Cellular processes	cell wall synthesis	C	65338	4	
BSU00090	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>guaB</i>	1,070	2,10	0,0320	SW 2.5	Metabolism	biosynthesis of GMP	C	52991	6	
BSU13190	Major intracellular serine protease	<i>isp</i>	2,235	4,71	0,0122	SW 3.3	Genetics	protein degradation	C	33849	4,522	
BSU35770	Putative major teichoic acid biosynthesis protein C	<i>tagC</i>	1,702	3,25	0,0090	SW 1.1	Cellular processes	biosynthesis of teichoic acid	C	50826	7,338	
BSU16090	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	<i>sucC</i>	-1,306	0,40	0,0380	SW 2.1	Metabolism	TCA cycle	C	41372	4	
BSU12410	Uncharacterized protein YjoA	<i>yjoA</i>	1,633	3,10	0,0423	SW 6.4	Proteins with unknown functions	unknown	C	17793	5,808	
BSU36660	Urease subunit gamma	<i>ureA</i>	1,914	3,77	0,0211	SW 2.3	Metabolism	utilization of urea as alternative nitrogen source	C	11455	4,98	
BSU25550	30S ribosomal protein S20	<i>rpsT</i>	-1,335	0,40	0,0237	SW 3.3	Genetics	translation	C	9599	11	
BSU16160	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	<i>clpY</i>	1,439	2,71	0,0172	SW 3.3	Genetics	protein degradation	C	52586	5	

BSU03050	L-lactate dehydrogenase	<i>ldh</i>	3,030	8,17	0,0191	SW 2.2	Metabolism	pyruvate fermentation to lactate	C	34802	5,394	
BSU01490	50S ribosomal protein L13	<i>rplM</i>	-1,473	0,36	0,0486	SW 3.3	Genetics	translation	C	16375	10	
BSU01170	50S ribosomal protein L4	<i>rplD</i>	-1,281	0,41	0,0408	SW 3.3	Genetics	translation	C	22391	10	
BSU23370	Uncharacterized protein YpuA	<i>ypuA</i>	1,162	2,24	0,0283	SW 4.3	Coping with stress	unknown	C	31295	4,515	
BSU27440	ABC transporter glutamine-binding protein GlnH	<i>glnH</i>	1,957	3,88	0,0498	SW 4.2	Sporulation and Germination	glutamine uptake	CM	29756	8	+
BSU03420	DNA-entry nuclease inhibitor	<i>nin</i>	1,327	2,51	0,0026	SW 4.1	Lifestyles	genetic transformation, DNA uptake	CM	14997	4,922	
BSU11430	Oligopeptide-binding protein OppA	<i>oppA</i>	1,210	2,31	0,0064	SW 4.1	Lifestyles	initiation of sporulation, competence development	CM	61525	5	+
BSU24990	Phosphate-binding protein PstS	<i>pstS</i>	3,495	11,28	0,0467	SW 2.6	Metabolism	high-affinity phosphate uptake	CM	31684	4,845	+
BSU03610	L-cystine-binding protein TcyA	<i>tcyA</i>	-1,464	0,36	0,0220	SW 1.2	Transporters	cystine uptake	CM	29514	9,118	+
BSU14700	Bacillolysins	<i>nprE</i>	-6,033	0,02	0,0162	SW 2.3	Metabolism	degradation of proteins	S	56522	7	+
BSU35860	Gamma-DL-glutamyl hydrolase	<i>pgdS</i>	2,343	5,07	0,0462	SW 1.1	Cellular processes	polyglutamic acid degradation	S	45247	8,52	+
BSU25750	Sporulation-specific extracellular nuclease	<i>nucB</i>	2,362	5,14	0,0430	SW 2.5	Metabolism	DNA degradation after mother cell lysis	S	14968	5,173	+
BSU03830	Uncharacterized ABC transporter solute-binding protein YclQ	<i>yclQ</i>	1,851	3,61	0,0329	SW 1.2	Transporters	acquisition of iron	S	34792	6,628	+
BSU18630	Expansin-Yoaj	<i>yoaj</i>	3,467	11,06	0,0478	SW 4.4	Lifestyles	interaction with plant roots	S, CW	25638	9	+
BSU09420	Probable peptidoglycan endopeptidase LytE	<i>lytE</i>	-1,098	0,47	0,0062	SW 1.1	Cellular processes	major autolysin, cell elongation and separation	S, CW	35455	10	+
BSU27580	Putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase YrvJ	<i>yrvJ</i>	-1,965	0,26	0,0190	SW 1.1	Cellular processes	cell wall metabolism	S, CW	55501	5,192	+
BSU39230	tRNA nuclease WapA	<i>wapA</i>	-1,451	0,37	0,0023	SW 1.1	Cellular processes	intercellular competition	S, CW	258162	6	+
BSU05730	Uncharacterized protein YdhF	<i>ydhF</i>	1,132	2,19	0,0479	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	S	26525	6,155	+
BSU01650	Uncharacterized protein YbbC	<i>ybbC</i>	3,118	8,68	0,0424	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	U	46036	7,374	+
BSU12280	Uncharacterized protein YjlC	<i>yjlC</i>	2,562	5,90	0,0243	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	U	15583	4,262	
BSU14750	Uncharacterized protein YlaE	<i>ylaE</i>	6,867	116,71	0,0321	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	U	22454	4,131	+
BSU36730	Uncharacterized protein YwmD	<i>ywmD</i>	7,618	196,40	0,0167	SW 6.7	Proteins with unknown functions	unknown	U	23965	4,684	+
BSU18280	UPF0748 protein YngK	<i>yngK</i>	3,632	12,40	0,0424	SW 4.2	Sporulation and Germination	unknown	U	58868	8,346	+

SSL: PSORTb and Uniprot kullanılarak belirlenen alt hücresel lokasyonlar C: Sitoplazma, CM: Sitoplazmik membran, CW: Hücre Duvarı, S: Dışarı salgılanan, ekstraselüler,U:Bilinmeyen. SP: Sinyal peptit SignalP programı ile belirlenmiştir

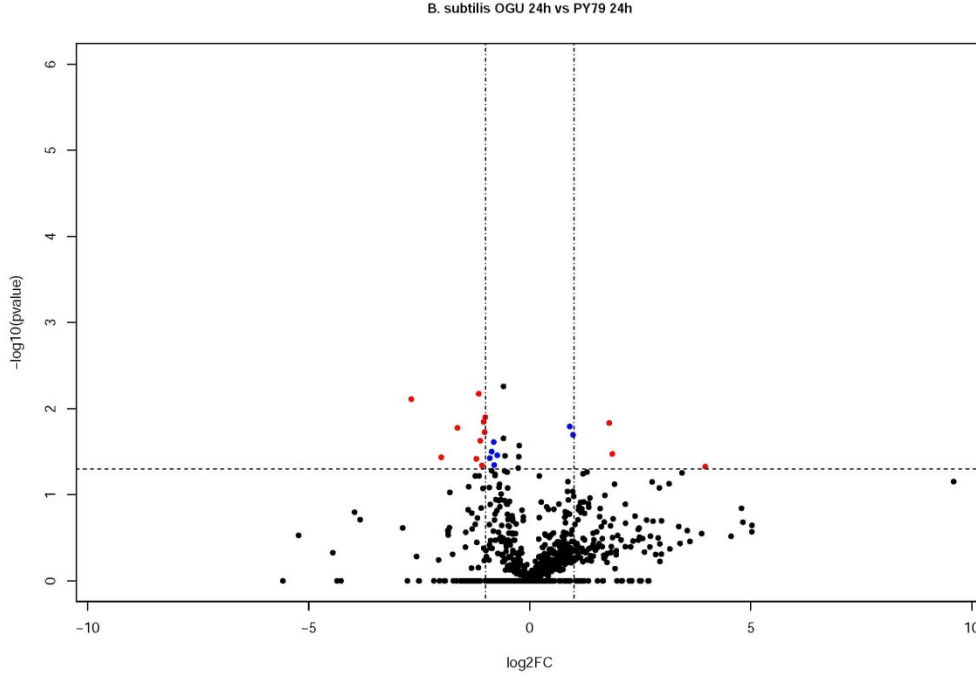
Subtiwiki veritabanı referans alınarak 16. saatte ifade farklılığı gösteren proteinler fonksiyonlarına göre kategorize edilmiş ve Şekil 10'daki dağılım elde edilmiştir. Bu dağılıma göre, ifade farklılığı gösteren proteinlerin büyük kısmı (% 26'sı) Metabolizma (Metabolism) ve % 26'sı Genetik yolları (Information pathways) kategorilerinde yer almaktadır. Sporulasyon ve jermantasyon (Sporulation and germination) ve Stresle başetme (Coping with stress) kategorileri ise ifade farklılığı gösteren proteinlerin sırasıyla % 11 ve % 2 lik kısmını oluşturmaktadır. Diferensiyal ekspresyon gösteren tüm proteinlerin % 7'sini fonksiyonu bilinmeyen proteinlerden oluşmaktadır ve bunlardan ikisi (YlaE ve YwmD) en yüksek ifade farklılığına sahip proteinler olarak bulunmuştur.



Şekil 10. 16. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı

OGU1 mutant suşu ve standart suş PY79 ile karşılaştırıldığında, **24. saat sekretom örneklerinin LC-MS/MS analizi** ile toplamda sadece 12 protein ifadesinde farklılık belirlenmiştir. Bu saatte kültür sıvılarında basilisin miktarı ve aktivitesinin artık iyice azaldığı bilinmektedir. 24. saatte tanımlanabilen proteinler volkan çizimi (volcano plot) ile Şekil 11'de

gösterilmiş, ilgili proteinlerin listesi de Tablo 4’de verilmiştir. İnkübasyonun bu geç saatinde diferensiyel ekspresyon gösteren bu 12 protein için proteinlerin fonksiyon dağılımları da Şekil 12’de gösterilmektedir. Az sayıdaki bu proteinlerin çoğunu metabolizma (%42) ve stresle baş etme (%42) kategorisinde yer alan proteinlerin oluşturduğu görülmektedir (Şekil 12).



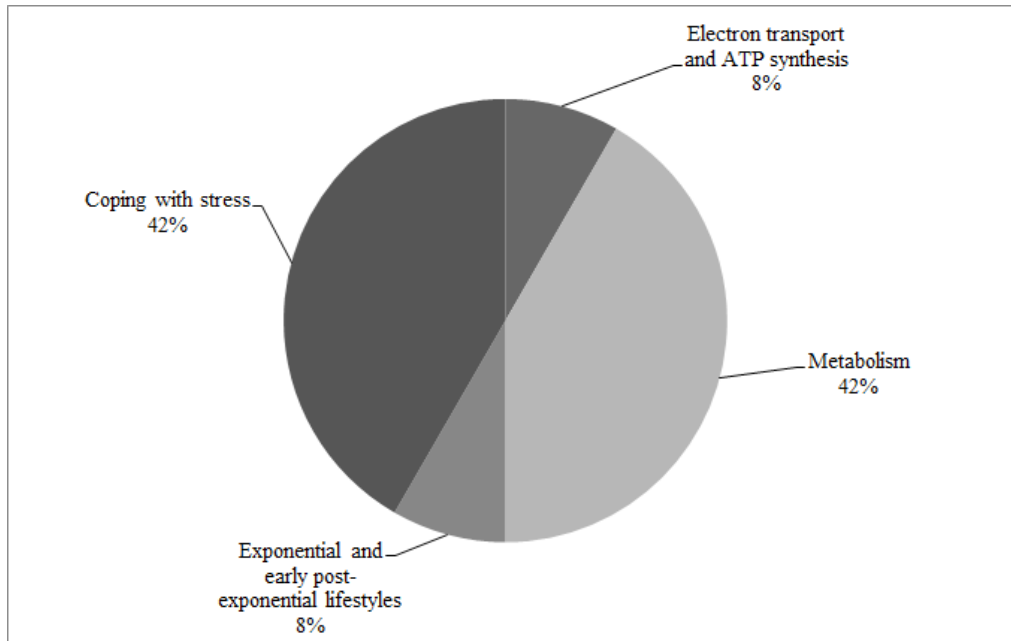
Şekil 11. *Bacillus subtilis*'te PY79 ve OGU1 suşlarında 24. saatte tanımlanan proteinler arasında ifade farklılığı gösterenlerin volkan çizimi ile dağılımları. İfadelerinde en az iki kat fark gösteren ve p değeri 0.05'ten küçük olanlar “diferensiyonel” kabul edilmiş olup kırmızı noktalar olarak işaretlenmiştir. Şemada x ve y eksenini, sırasıyla p değerleri (-log10 tabanında) ve kat artış (log2 tabanında)'a karşılık gelmektedir. Yatay kesik çizgili hat p=0.05 (-log 0.05=1.3)değerine karşılık gelmekte olup bu hattın üstünde kalan noktalar p<0.05'e, altında kalan noktalar ise p>0.05'e karşılık gelmektedir. Dikey kesik çizgili hat log 2=1 değerine karşılık gelip bu alandaki proteinlerin ifadesinde bir değişim olmadığını belirtmektedir ve ilgili proteinler siyah noktalar kullanılarak gösterilmiştir. Kırmızı noktalar ise ifadesinde farklılık olan proteinlere karşılık gelmekte olup eksi ve artı değerler mutant suşta standard suşa göre azalış ve artış gösteren proteinlere işaret eder.

Tablo 4. 24. saat sekretom örneklerinde OGU1 'da PY79'a göre ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Protein	Gen	log2FC	Kat Artış	P Değeri	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	Kütle (Da)	pI	SP

						Kodu						
BSU02910	Uncharacterized protein YceE	<i>yceE</i>	-2,678	0,16	0,0077	SW 4.3	Coping with stress	required for survival of ethanol stress and at low temperatures	C	20948	4,391	
BSU18440	Glutamate synthase [NADPH] small chain	<i>gltB</i>	-1,208	0,43	0,0383	SW 2.3	Metabolism	glutamate biosynthesis	C	54862	7	
BSU01370	Adenylate kinase	<i>adk</i>	-1,043	0,49	0,0143	SW 2.5	Metabolism	ADP formation	C	24119	4,449	
BSU22600	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	<i>aroA</i>	-2,004	0,25	0,0368	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of aromatic amino acids	C	45240	6	
BSU23070	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>serA</i>	-1,155	0,45	0,0067	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of serine	C	57129	5,617	
BSU29750	Protein AroA(G)	<i>aroA</i>	-1,121	0,46	0,0236	SW 2.3	Metabolism	biosynthesis of aromatic amino acids	C	39539	5,341	
BSU03510	Surfactin synthase subunit 3	<i>urfAC</i>	-1,635	0,32	0,0167	SW 4.3	Coping with stress	antibiotic synthesis	C	143872	4,97	
BSU33410	Stress response protein YvgO	<i>yvgO</i>	-1,080	0,47	0,0457	SW 4.3	Coping with stress	survival of ethanol stress	CM	17602	4,853	+
BSU03420	DNA-entry nuclease inhibitor	<i>nin</i>	-1,006	0,50	0,0126	SW 4.1	Lifestyles	genetic transformation, DNA uptake	CM	14997	4,922	
BSU37280	Nitrate reductase alpha chain	<i>narG</i>	3,970	15,67	0,0471	SW 2.1	Metabolism	nitrate respiration, nitrogen assimilation	CM	139099	6,061	
BSU33770	Sporulation delaying protein C	<i>sdpC</i>	1,799	3,48	0,0147	SW 4.3	Coping with stress	killing of non-sporulating sister cells	S	22221	9	+
BSU38260	Probable deferrochelatase/peroxidase EfeN	<i>efeN</i>	1,869	3,65	0,0336	SW 4.3	Coping with stress	ferrous iron conversion	S	45693	8	+

SSL: PSORTb and Uniprot kullanılarak belirlenen alt hücresele lokasyonlar C: Sitoplazma, CM: Sitoplazmik membran, CW: Hücre Duvarı, S: Dışarı salgılanan, ekstraselüler, U: Bilinmeyen. SP: Sinyal peptit SignalP programı ile belirlenmiştir



Şekil 12. 24. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerin fonksiyonlarına göre dağılımı

12. 16. ve 18. saatlerin tümünde, bir diğer deyişle 3 ayrı zaman noktasında yapılan ölçümlerin tümünde ifade farklılığı gösteren bir protein bulunamamıştır. tümünde birden belirlenen bir protein olmamıştır. Bu zaman noktalarının ikisinde ortak olan proteinler belirlenmiş ve Tablo 5'de verilmiştir. İfadesinde artış tespit edilen 8 protein 12. ve 16. saatte ortak iken birisi azalma göstermek üzere sadece 2 protein 16. ve 24. saatte ortaktır.

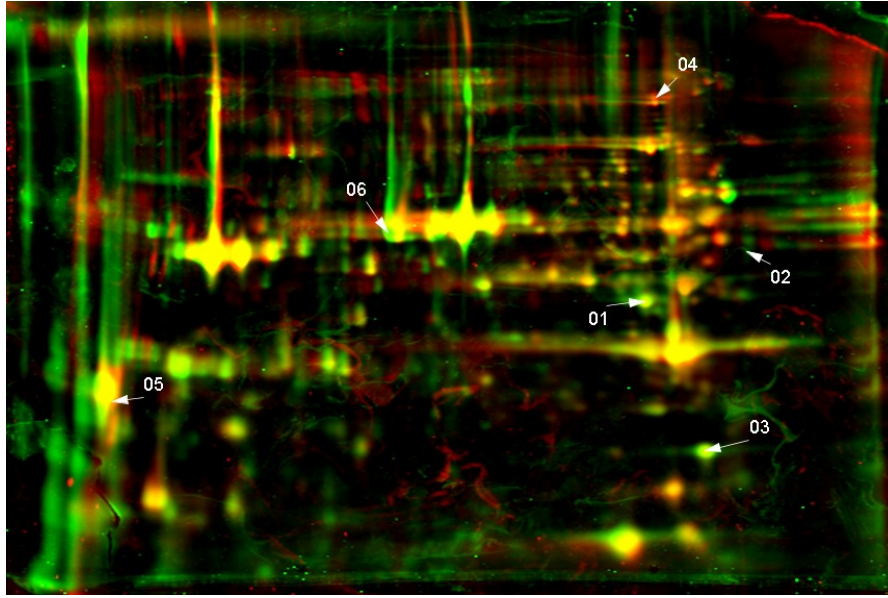
Tablo 5. İnkübasyonun 12., 16., ve 24. saatlik zaman noktalarının ikisinde ifade değişimi gösteren (ortak) proteinlerin listesi

Lokus Adı	12. saat Değişim	16. saat Değişim	24. saat Değişim	Protein	Gen	Fonksiyonel Kategori Kodu	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	Kütle (Da)	pI	SP
BSU35770	2.25	3.25	-	Putative major teichoic acid biosynthesis protein C	tagC	SW 1.1	Cellular processes	Biosynthesis of teichoic acid	C	50826	7.3	
BSU13180	4.38	0.42	-	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate--homocysteine methyltransferase	metE	SW 2.3	Metabolism	Biosynthesis of methionine	C	86806	4	
BSU16160	3.55	2.71	-	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY	clpY	SW 3.3	Genetics	Protein degradation	C	52586	5	
BSU12410	2.5	3.1	-	Uncharacterized protein YjoA	yjoA	SW 6.4	Proteins with unknown functions	Unknown	C	17793	5.8	
BSU11430	7.31	2.31	-	Oligopeptide-binding protein OppA	oppA	SW 4.1	Lifestyles	Initiation of sporulation, competence development	CM	61525	5	+
BSU27440	5.02	3.88	-	ABC transporter glutamine-binding protein GlnH	glnH	SW 4.2	Sporulation and Germination	Glutamine uptake	CM	29756	8	+
BSU39230	2.77	0.37	-	tRNA nuclease WapA	wapA	SW 1.1	Cellular processes	Intercellular competition	S, CW	258162	6	+
BSU12280	2.85	5.9	-	Uncharacterized protein YjIC	yjIC	SW 6.7	Proteins with unknown functions	Unknown	U	15583	4.3	
BSU23070	-	0.25	0.45	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	serA	SW 2.3	Metabolism	Biosynthesis of serine	C	57129	5.6	
BSU03420	-	2.51	0.5	DNA-entry nuclease inhibitor	Nin	SW 4.1	Lifestyles	Genetic transformation, DNA uptake	CM	14997	4.9	

SSL: PSORTb and Uniprot kullanılarak belirlenen alt hücresel lokasyonlar C: Sitoplazma, CM: Sitoplazmik membran, CW: Hücre Duvarı, S: Dışarı salgılanan, ekstraselüler,U:Bilinmeyen. SP: Sinyal peptit SignalP programı ile belirlenmiştir

4.3 Karşılaştırmalı 2DE MALDI-TOF/MS analizleri

12. saat sekretom örneklerinde MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucunda mutant suş OGU1 ve ana suş PY79 arasında ifade farklılığı gösteren 6 protein tanımlanmış olup bu proteinler Şekil 13 ve Tablo 6'da verilmektedir. Mutant suş OGU1'da ifadesinde artış saptanan ve fajla ilişkili iki protein XkdG ve XkdM, FlgK flagellar hook filament protein ve CitB (aconitate hidrataz) olup bunlar aynı zamanda 12. saat sekretom örneklerinin LC-MS/MS analizi ile de artış gösteren diferansiyel proteinler arasında gösterilmişti (Alt Bölüm 4.2).



Şekil 13. *B. subtilis* PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 12. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü. Çakışan proteinler sarı renkte gösterilmiştir. İfade farklılığı gösteren ve tanımlanabilen proteinler numaralandırılmıştır. pI aralığı 3-10.

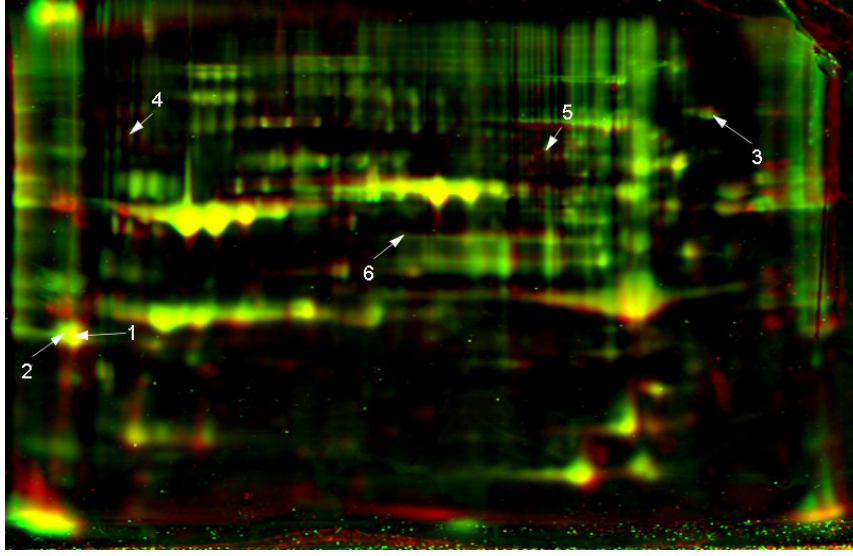
Tablo 6. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 12 saatlik kültürlere ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Kütle KDa	PI	OGU1/PY79 Oranı 24h	P değeri	Spot No	Protein	Gen	Fonksiyonel Kategori Kodu	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	SP
BSU12610	34.59	5.19	2.64	0.01	1	putative capsid protein of PBSX prophage	<i>xkdG</i>	SW 5.1	Prophages and mobile genetic elements	unknown	S	+
BSU35410	54.32	4.38	0.52	0.05	2	flagellar hook-filament junction	<i>flgK</i>	SW 4.1	Lifestyles	motility and chemotaxis	S	
BSU12660	16.35	4.58	4.29	0.05	3	conserved hypothetical protein; PBSX phage	<i>xkdM</i>	SW 5.1	Prophages and mobile genetic elements	unknown	S	
BSU18000	99.27	4.90	3.30	0.02	4	aconitate hydratase	<i>citB</i>	SW 3.4	Genetics	TCA cycle	C	

						(aconitase)						
BSU17690	26.58	9.97	0.39	0.03	5	conserved hypothetical protein	<i>yncM</i>	SW 6.7	Proteins with unknown functions	Proteins with unknown functions	S	+
BSU02310	51.76	6.68	2.31	0.03	6	putative exported hydrolase	<i>ybfO</i>	SW 4.3	Coping with stress	unknown	S	+

SSL: alt hücresele lokasyon; SP: sinyal peptid varlığı

16. saat sekretom örneklerinde MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde de mutant suş OGU1 ve ana suş PY79 arasında ifade farklılığı gösteren 6 protein tanımlanmış olup bu proteinler Şekil 14 ve Tablo 7'da gösterilmektedir. Bu proteinlerden sadece bir tanesi GlnA (glutamine sentetaz) sitoplazmik lokasyona sahip olup diğerleri ekstraselüler proteinlerdir. OGU1'da Bpr (Basillopeptidaz F)'in ana suşa kıyasla 4 misli fazla ifade edildiği, hem 2DE MALDI-TOF MS yöntemi, hem de LC-MS/MS yöntemi ile gösterilmiş bulunmaktadır. Fonksiyonu bilinmeyen bir protein olan YncM 2DE MALDI-TOF MS yöntemi ile analiz edilen örneklerde hem 12. saatte hem de 16. saatte önemli bir azalış göstermiş olup azalış seviyesi 16. saatte 5 misli bir değere ulaşmıştır. Yine fonksiyonu bilinmeyen, ancak bitkilerde fosfor kaynağı fitat yokluğunda ifadesi artan, Sec-tipi sinyal peptid peptid içeren ve Spo0A tarafından pozitif kontrolü gerçekleşen YrpD'nin seviyesi 16. saat OGU1 sekretom örneklerinde 2 kat azalış göstermiştir. Bu azalışı 12 saatlik sekretom örneklerinde yükselen miktarlarını gördüğümüz fitaz Ekstraselüler nükleotidlerin kullanılmasını sağlayan YhcR (nonspesifik endonükleaz)'nin 12 saatlik OGU1 sekretomunda 5 misli artış gösterdiği LC-MS/MS yöntemiyle gösterilmişti (Alt Bölüm 4.2). MALDI-TOF MS analizleri de, 16 saatlik kültür sekretomlarında bu proteinin seviyesinde 4 misli artış olduğunu ortaya koyarak YhcR'nin OGU1'de pozitif regüle edilen bir protein olduğunu doğrulamıştır.



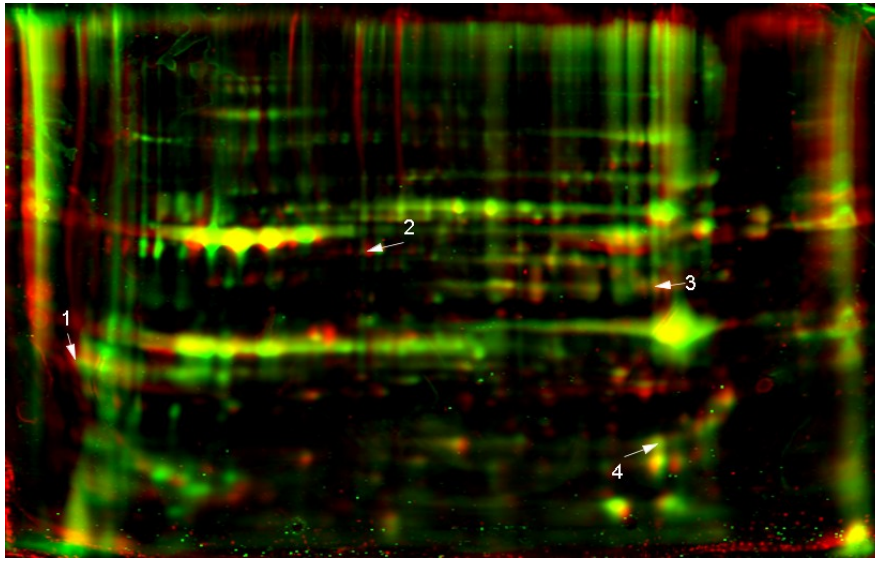
Şekil 14. *B. subtilis* PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 16. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü. Çakışan proteinler sarı renkte gösterilmiştir. İfade farklılığı gösteren ve tanımlanabilen proteinler numaralandırılmıştır. pI aralığı 3-10.

Tablo 7. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 16 saatlik kültürlerle ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Kütle KDa	PI	OGU1/PY79 Oranı 16h	P değeri	Spot No	Protein	Gen	Fonksiyonel Kategori Kodu	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	SP
BSU17690	26.45	9.97	0.52	0.01	1	Uncharacterized protein YncM	<i>yncM</i>	SW 6.7	Proteins with unknown functions	Proteins with unknown functions	S	+
BSU26820	24.73	9.96	0.52	0.01	2	Uncharacterized protein YrpD	<i>yrpD</i>	SW 6.7	Proteins with unknown functions	Proteins with unknown functions	S	+
BSU15300	154.34	4.98	5.80	0.04	3	Bacillopeptidase F	<i>bpr</i>	SW 2.3	Metabolism	Protein degradation	S	+
BSU17460	50.11	4.87	0.30	0.02	4	Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	SW 3.4	Genetics	Glutamine biosynthesis, control of <i>tnra</i> and <i>glnr</i> activity	C	
BSU09190	132.47	4.69	4.09	0.05	5	Endonuclease YhcR	<i>yhcR</i>	SW 2.5	Metabolism	Utilization of nucleic acids	S	+
BSU39940	43.72	6.38	5.78	0.03	6	Uncharacterized protein YxaL	<i>yxaL</i>	SW 3.3	Genetics	Similar to ser/thr kinase, increases the processivity of the <i>pcra</i> helicase	S	+

SSL: alt hücresele lokasyon; SP: sinyal peptid varlığı

24. saat sekretom örneklerinde MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde mutant suş OGU1 ve ana suş PY79 arasında ifade farklılığı gösteren sadece 4 protein tanımlanmış olup bu proteinler Şekil 15 ve Tablo 8'de verilmektedir. Bunlardan YwmD (putatif eksport edilen protein) mutant suş OGU1'da yaklaşık 3.5 kat artmışken GlnA (glutamin sentetaz), Ndh (NADH dehidrogenaz) ve YncM (hipotetik korunmuş protein) ifadelerinde azalış saptanmıştır. YwmD'deki artışın ve YncM'deki azalışın bu araştırmamızda LC-MS/MS yöntemi ile de (Bölüm 4.2) tespit edilmiş olması, çalışmamızda önemli bir diğer karşılıklı doğrulamayı sağlamıştır.



Şekil 15. *B. subtilis* PY79 (kırmızı) ve OGU1 (yeşil) 24. saat sekretom örneklerinden elde edilen 2DE jellerin iki kanallı karşılaştırmalı görüntüsü. Çakışan proteinler sarı renkte gösterilmiştir. İfade farklılığı gösteren ve tanımlanabilen proteinler numaralandırılmıştır. pI aralığı 3-10.

Tablo 8. 2DE MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak 24 saatlik kültürlerle ait proteom örneklerinde ifade farklılığı gösteren proteinler

Lokus Adı	Kütle KDa	pI	OGU1/PY79 Oranı 24h	P değeri	Spot No	Protein	Gen	Fonksiyonel Kategori Kodu	Fonksiyonel Kategori	Fonksiyon	SSL	SP
BSU17690	26.45	9.97	0.22	0.04	1	conserved hypothetical protein	<i>yncM</i>	SW 6.7	Proteins with unknown function	Unknown	S	+
BSU12290	41.79	6.29	0.16	0.00	2	NADH dehydrogenase	<i>ndh</i>	SW 2.1	Metabolism	Respiration	CM	
BSU17460	50.11	4.87	0.37	0.05	3	glutamine synthetase	<i>glnA</i>	SW 3.4	Genetics	Glutamine biosynthesis, control of TnrA and GlnR activity	C	
BSU36730	23.82	4.68	3.48	0.03	4	putative exported protein	<i>ywmD</i>	SW 6.7	Proteins with unknown function	Unknown	U	

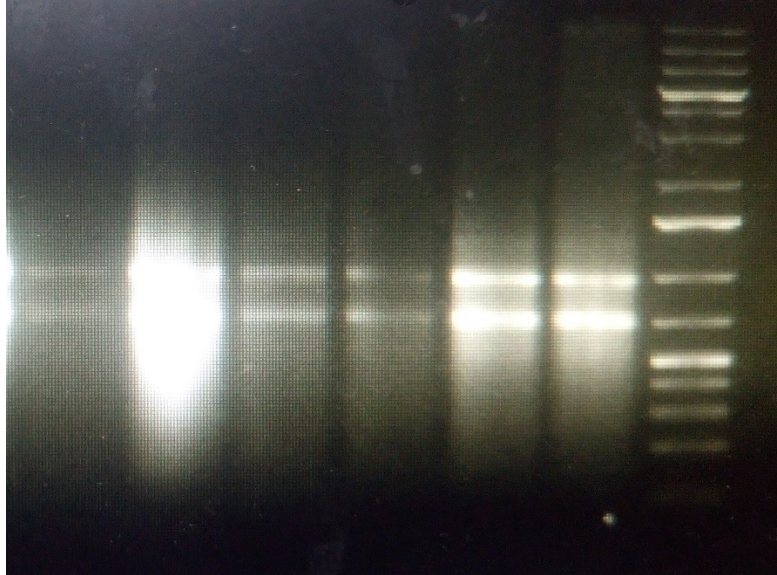
SSL: alt hücreseel lokasyon; SP: sinyal peptid varlığı

4.4 Seçilen Genler Seviyesinde Kantitatif Transkript analizleri

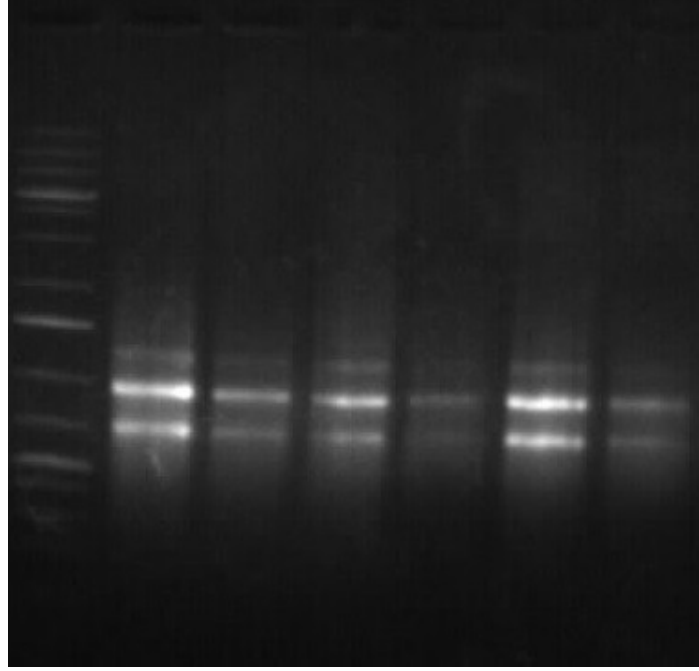
Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) analizi ile seçilen toplam 19 adet proteinin mRNA düzeyinde ifade seviyesi incelenmiş olup proteom bulgularımız, bu analizlerle daha ileri test edilmiştir.

4.4.1 RNA örneklerinin kontrolü

Proteom bulgularımız, seçilen bazı genler için yürütülen qRT PCR analizleri ile daha ileri test edilmiştir. Total RNA örneklerinin bütünlüğü; gen ifadesi analizinin tekrarlanabilirliğini ve bütün aşamalarını etkileyebileceğinden kontrol edilmesi gereken ilk faktördür. Bu yüzden, RNA izolasyonundan sonra örneklerin bir kısmı agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütülen 12. ve 16. saat total RNA örnekleri Şekil 16 ve 17'deki gibidir. Bu jel fotoğrafları total RNA örneklerinin bütünlüğü hakkında genel bir fikir vermektedir. Bilindiği üzere bakteriyel total RNA havuzunda en çok bulunan RNA'lar, 16S ve 23S ribozomal RNA'larıdır. Bu RNA örnekleri, yüksek kopya sayılarından ve parçalanmamış olmalarından ötürü jel fotoğraflarında keskin bantlar olarak gözlemlenmiştir.

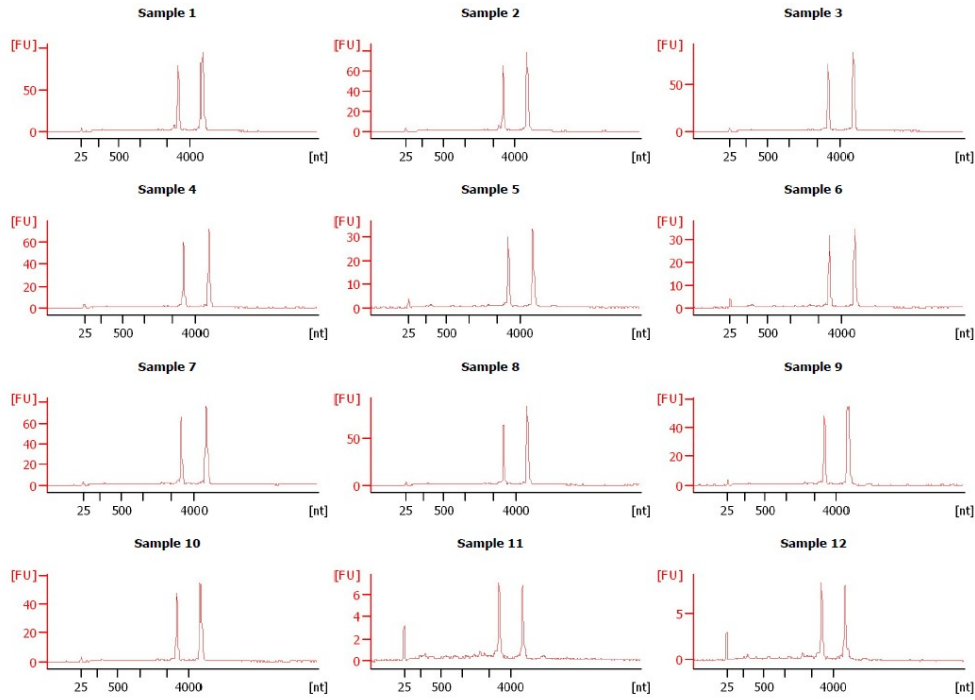


Şekil 16. Agaroz jelde yürütülen 12. saat total RNA örnekleri (soldan sağa: *B. subtilis* OGU1 (3 replika), *B. subtilis* PY79 (3 replika) ve GeneRuler 1kb plus DNA ladder).



Şekil 17. Agaroz jelde yürütülen 16. saat total RNA örnekleri (soldan sağa: GeneRuler 1kb plus DNA ladder, *B. subtilis* PY79 (3 replika ve *B. subtilis* OGU1 (3 replika).

Agaroz jel elektroforezi bütün RNA örneklerinin yeterli bütünlüğe sahip olduğunu işaret etmiş, fakat bu yöntem kantitatif olmadığı için örnekler Agilent® 2100 Bioanalyzer aleti ile de detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu detaylı analizin sonuçları Şekil 18'deki gibidir.



Şekil 18. Total RNA örneklerinin biyoanaliz sonuçları (Sırasıyla: 12. saat *Bacillus subtilis* PY79 (3 replika), 16. saat *Bacillus subtilis* PY79 (3 replika), 12. saat *Bacillus subtilis* OGU1 (3 replika) ve 16. saat *Bacillus subtilis* OGU1 (3 replika))

Biyoanaliz sonuçları; RNA havuzunda bulunan 16S ve 23S ribozomal RNA miktarını, bu RNA'ların birbirine oranını (23S/16S) ve diğer okumalara göre RNA bütünlük numarasını (RIN) verebilmektedir. Tamamen kantitatif olan bu yöntemle göre, elimizdeki bütün RNA örneklerinin 23S/16S rRNA oranı ve RIN değeri elde edilmiştir. 23S/16S rRNA oranı 1'den ve RIN değeri 7'den büyük olduğu takdirde total RNA örnekleri sağlam sayılmaktadır (Jahn vd, 2008). Yaptığımız analize göre rRNA oranı için ölçülen en küçük değer 1.2, RIN için en küçük değer ise 7.2 olmuştur. Bütün bu analizler sonucunda, bütün RNA örneklerimizin RT-qPCR analizi için kullanılabilir kadar bütünlük içerisinde olduğu kanıtlanmıştır.

4.4.2 Optimize RT-qPCR Koşulları, Standart Eğriler, Verimlilik Hesaplamaları ve RT-qPCR Analiz Sonuçları

RT-qPCR analizinde optimize olmayan tek koşul primer konsantrasyonu olduğu için, bütün primer setleri çeşitli konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200 ve 300 nM) teker teker denenmiştir. Yapılan deneylere göre, referans gen *rpoB* de dahil olmak üzere bütün genler için en uygun primer konsantrasyonunun 200 nM olduğu ortaya çıkmıştır. Optimize koşullarda elde edilen C_t ve T_m değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Optimize koşullardaki eğrilere göre elde edilen C_t ve T_m değerleri

Gen	C_t (amplikon)	C_t (cDNA olmayan kontrol)	T_m (amplikon) (°C)
<i>rpoB</i>	21.63	37.75	83.00
<i>abn2</i>	23.27	34.21	82.00
<i>csn</i>	22.47	33.50	82.00
<i>sacC</i>	22.53	36.31	83.50
<i>phy</i>	23.60	33.75	79.50
<i>lipA</i>	23.13	32.95	85.50
<i>yhcR</i>	22.97	34.54	81.50
<i>bpr</i>	23.33	33.80	83.83
<i>vpr</i>	23.56	34.92	87.00
<i>yxbC</i>	18.14	33.38	78.50
<i>resD</i>	19.22	N/A	82.00
<i>luxS</i>	19.54	38.16	81.00
<i>cheV</i>	19.45	35.15	85.50
<i>albE</i>	19.53	35.15	85.50
<i>dnaK</i>	20.28	32.08	82.00
<i>yugl</i>	18.25	38.06	79.50
<i>yceE</i>	19.39	31.92	83.50
<i>oppD</i>	19.35	N/A	82.00
<i>ispA</i>	18.63	38.39	80.00
<i>gerE</i>	20.06	30.50	79.00

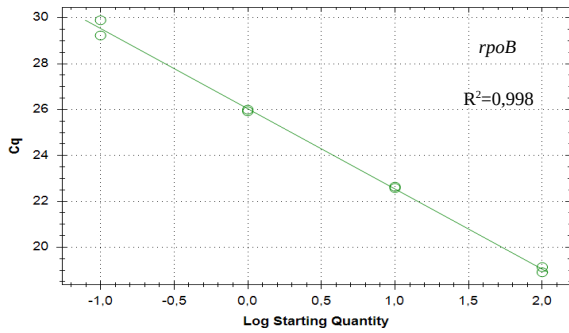
Optimize koşullarda gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerine göre, bütün genler için amplikon T_m 'i (ergime sıcaklığı) yaklaşık olarak 82°C olarak ölçülmüştür. Hedeflenen amplikon uzunluğunun ortalama 100 bp uzunluğunda olduğu göz önünde bulundurulacak olursa, bu ergime sıcaklığının hedeflenen amplikonlara ait olduğu anlaşılabilir. Başka bir deyişle, optimize koşullardaki RT-qPCR reaksiyonunda hedeflediğimiz amplikonlar başarıyla

çoğaltılmıştır. Ayrıca, cDNA konulmayan kontrol reaksiyonlarında C_t değerleri yüksek değerler olarak ölçülmüş ve hatta bazı genler için ölçülememiştir. Bunun sebebi, primerlerin sadece cDNA'ları hedefleyecek şekilde tasarlanmış olması ve ortamda herhangi bir genomik DNA kirliliğinin bulunmamasıdır.

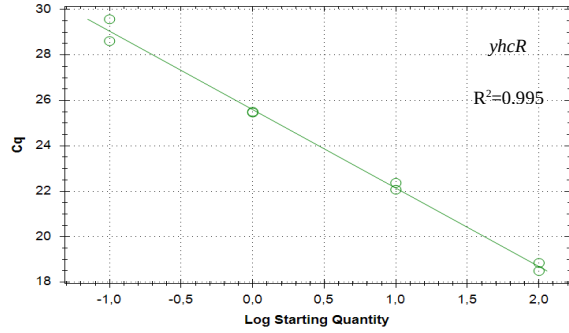
Yöntemler kısmında da bahsedildiği gibi, RT-qPCR analizi primerlerin verimliliği de hesaba katılarak gerçekleştirilmiştir. Primerlerin çalışma verimliliği, çeşitli dilüsyonlardaki *B. subtilis* PY79 cDNA'sı kullanılarak oluşturulan standart eğrilerden yola çıkılarak hesaplanmıştır. Bu verimlilik hesaplaması, aşağıda verilen formüle göre gerçekleştirilmiştir (Pfaffl, 2001):

$$\text{Verimlilik (E)} = 10^{[-1/\text{standart eğrinin eğimi}]}$$

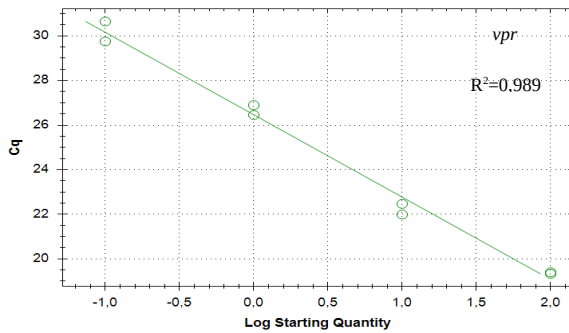
B. subtilis PY79 cDNA'sının 1x,10x, 100x ve 1000x dilüsyonları kullanılarak hazırlanan standart eğriler Şekil 19'daki gibidir. Daha önceki araştırmalara göre, RT-qPCR analizi için kullanılacak primer verimlilik değerlerinin sınırları 1.6'dan 2.1'e uzanacak şekilde belirlenmiştir (Pfaffl, 2004). Tablo 10'da da görülebileceği gibi tasarlanan bütün primerlerin verimlilik değerleri bu iki sınır değeri arasındadır.



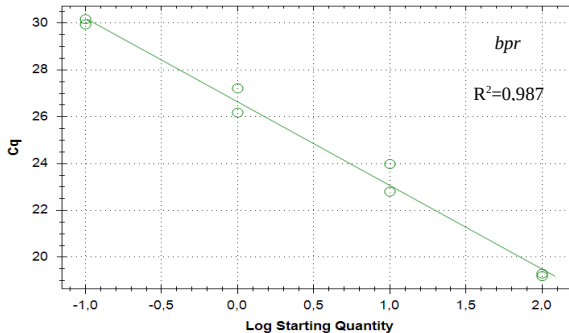
i) *rpoB*



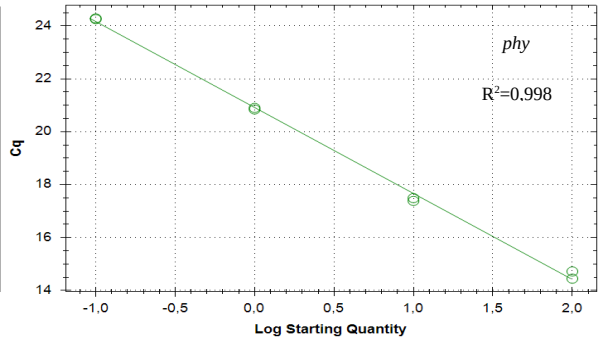
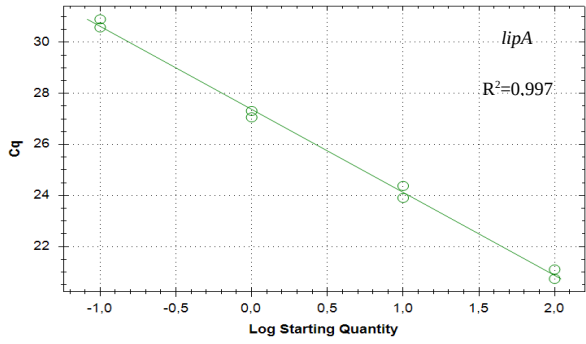
ii) *yhcR*



iii) *vpr*

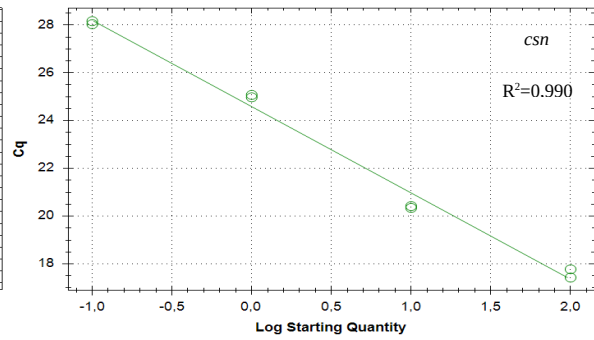
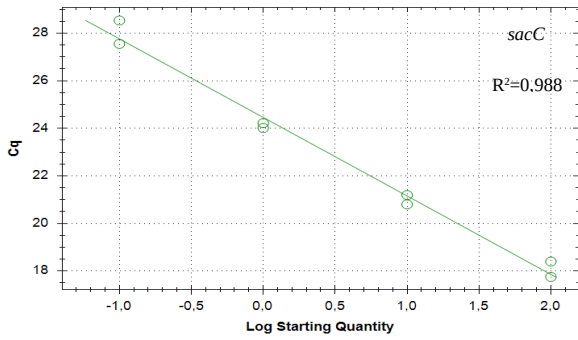


iv) *bpr*



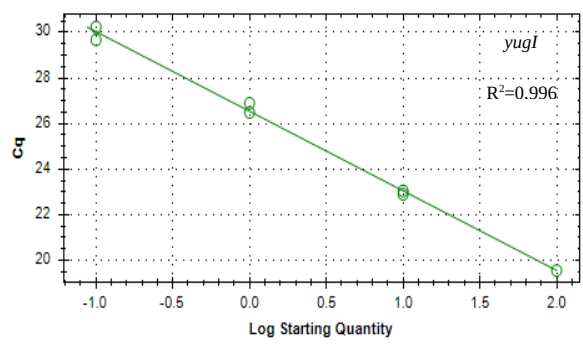
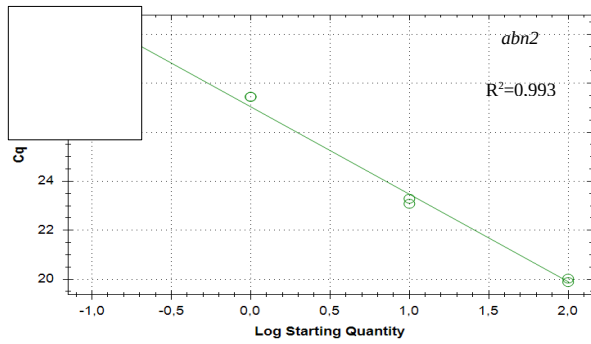
v) lipA

vi) phy



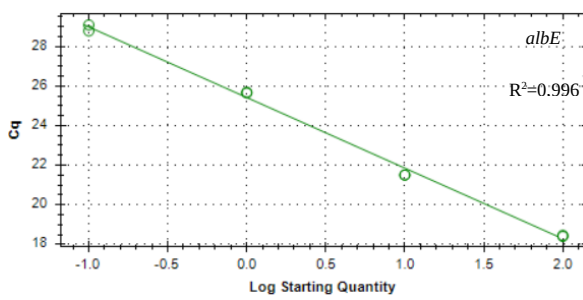
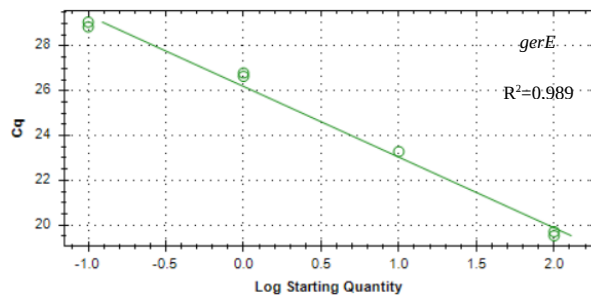
vii) sacC

viii) csn



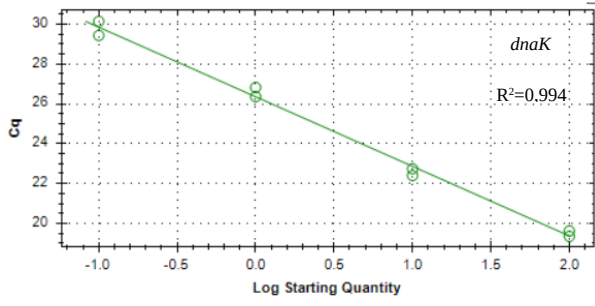
ix) abn2

x) yugI

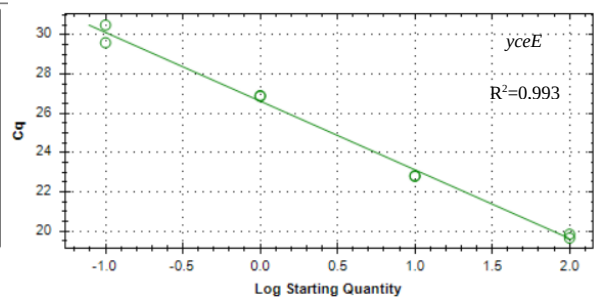


xi) gerE

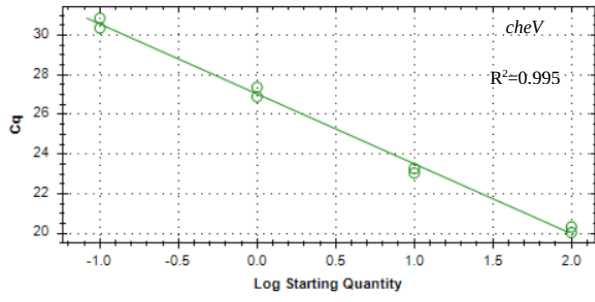
xii) albE



xiii) *dnaK*



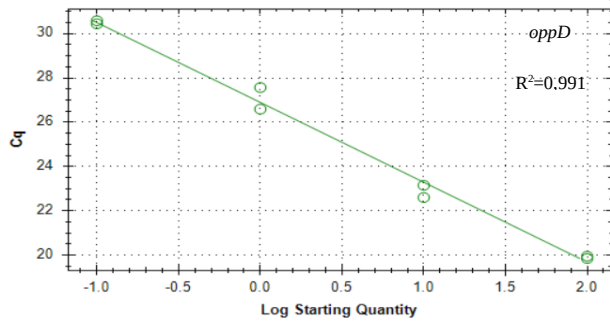
xiv) *yceE*



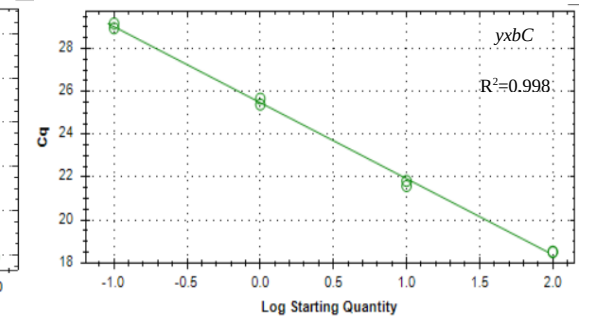
xv) *cheV*



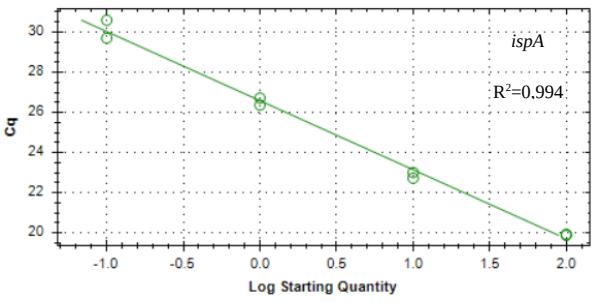
xvi) *luxS*



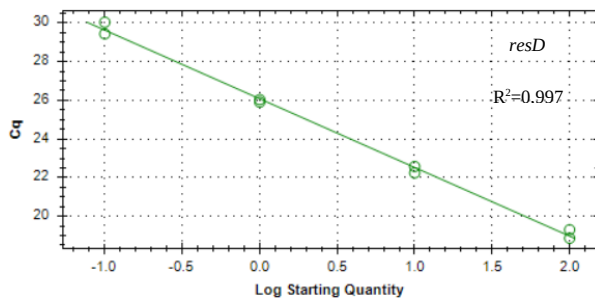
xvii) *oppD*



xviii) *yxBc*



xix) *ispA*



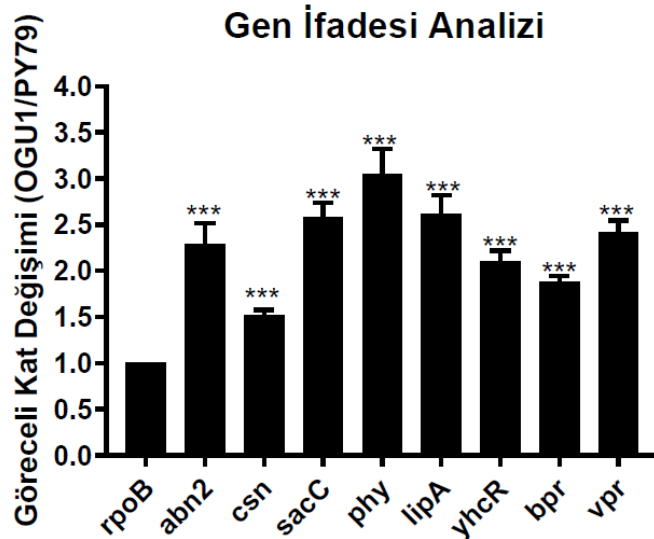
xx) *resD*

Şekil 19. *Bacillus subtilis* PY79 cDNA'sı kullanılarak oluşturulan standart eğriler

Tablo 10. Tasarlanan tüm primer setlerinin verimlilik (E) değerleri

Gen İsmi	Verimlilik Değeri
<i>gerE</i>	2.09
<i>albE</i>	1.82
<i>dnaK</i>	1.87
<i>yceE</i>	1.86
<i>cheV</i>	1.84
<i>luxS</i>	1.79
<i>oppD</i>	1.79
<i>yxbC</i>	1.83
<i>ispA</i>	1.91
<i>resD</i>	1.82
<i>Phy</i>	2.06
<i>sacC</i>	2.02
<i>Csn</i>	1.78
<i>abn2</i>	1.81
<i>yugI</i>	1.87
<i>yhcR</i>	1.89
<i>Vpr</i>	1.73
<i>Bpr</i>	1.81
<i>lipA</i>	2.06
<i>Bpr</i>	1.81
<i>rpoB</i>	1.86

Verimlilik değeri hesaplamalarından sonra, her bir genin mRNA ifadesi analizi için 3'ü biyolojik 2'si teknik olmak üzere 6 replika ile RT-qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen C_t değerleri referans gene göre standardize edilmiş ve yöntemler kısmında bahsedilen formülle her gen için kat değişimi hesabı yapılmıştır. Bulunan kat değişimlerinin istatistiksel analizi ve grafik haline getirilmesi GraphPad Prism programı ile yapılmıştır. 12 saat inkübasyon sonucu mRNA ifade seviyesi değişen genler Şekil 20'de, 16 saat inkübasyon sonucu mRNA ifade seviyesi değişen genler ise Şekil 21, 22 ve 23'de gösterilmiştir.

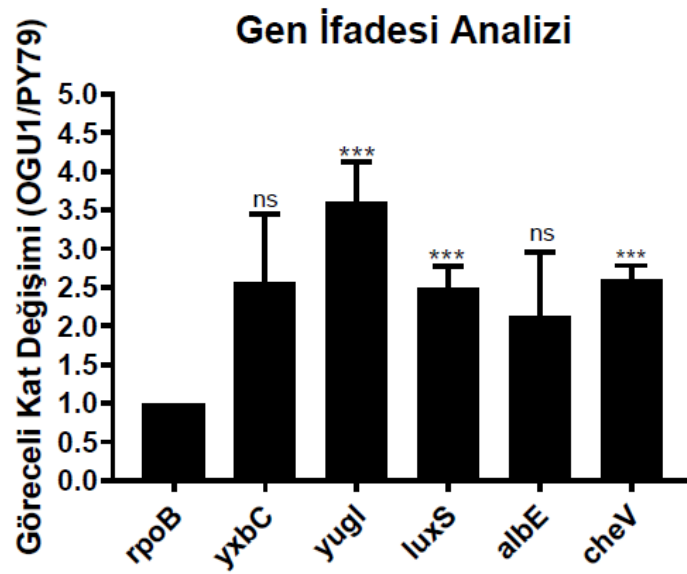


Şekil 20. *B. subtilis* OGU1'da 12 saat inkübasyon sonucunda ifadesi değişen ekstraselüler hidrolitik enzimlere ait genlerin kantitatif transkript analizleri.

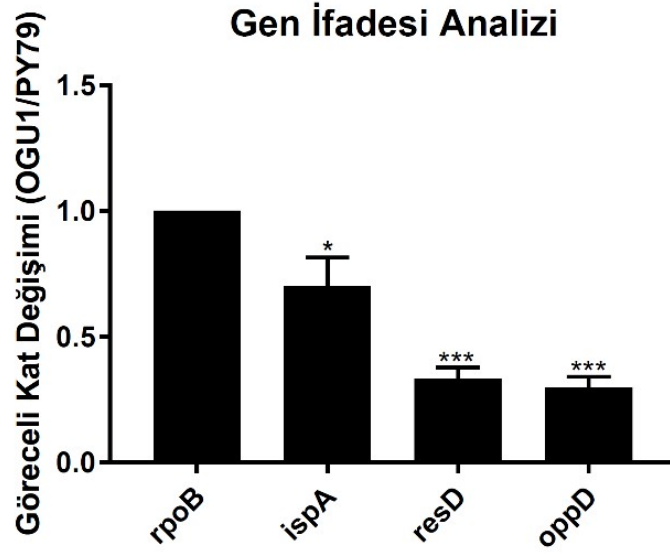
Proje kapsamında gerçekleştirilen sekretom analizleri, 12 saat inkübasyon sonucunda toplam 108 adet proteinin mutant OGU1 suşunda farklı ifade edildiğini göstermişti. Bu proteinler

içerisinde ekstraselüler lokasyona sahip olanlar arasından RT-qPCR analizi için seçilen 8 adet proteinin her birisi birer hidrolitik enzim olup, endüstriyel açıdan öneme sahip oldukları bilinmektedir.

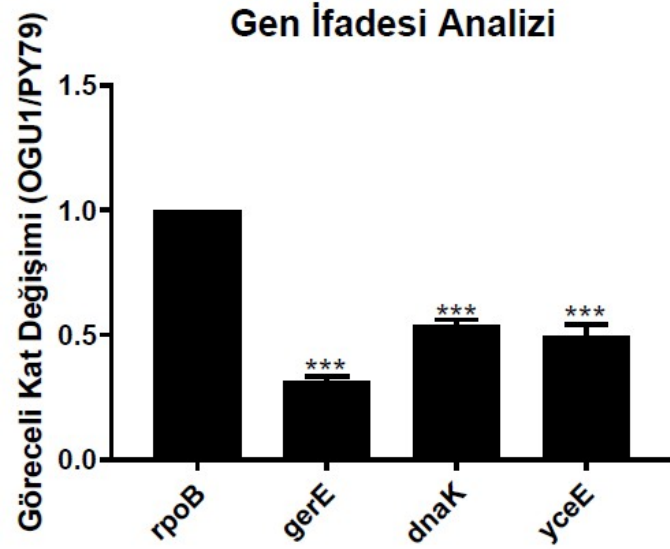
RT-qPCR analizine alınan diğer proteinler, hem önceki sitozolik proteom araştırmamız, hem de şimdiki projemiz kapsamında düzenleyici proteinler oldukları netleştirilmiş protein adayları için hazırladığımız listemiz içerisinden seçilmiş ve bu proteinlerin en fazla rol oynayabileceği regülasyonların anlaşılabilmesi için durağan faz ve sporlanma için regülasyonların sonuçlarının görülebileceği 16. saatlik kültürler temel alınmıştır:



Şekil 21. *B. subtilis* OGU1 suşunda 16 saatlik inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen *yxbC*, *yugI*, *luxS*, *albE* ve *cheV* gen ifadeleri.



Şekil 22. *B. subtilis* OGU1 suşunda 16 saat inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen *ispA*, *resD* ve *oppD* gen ifadeleri.



Şekil 23. *B. subtilis* OGU1 suşunda 16 saat inkübasyon sonucunda ifadesi ana suşa göre değişen *gerE*, *dnaK* ve *yceE* gen ifadeleri.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Sonuç raporumuzda 4.1 alt başlığı altında açıklandığı üzere, parental suş PY79 ve onun *bac* operonunun hedefli biçimde inaktive edildiği türevi olan OGU1 suşu için elde edilen “tüm genom dizileme ve direkt sekanslama” analizleri, bu iki suş için gözlenen proteomik farklılıkların sadece basilisin biyosentetik operonunun bozulmasından kaynaklandığını doğrulamış ve proteomik ve kantitatif transkript analizleri için oldukça sağlam bir temel oluşturmuştur.

Araştırmamızda, sekretom örneklerinin sitoplazmik proteinleri de içeriyor olması pek beklenen bir olgu gibi görünmüyorsa da, hem prokaryot, hem de ökaryotlarla yapılan sekretom çalışmalarında bu sorunla oldukça yaygın bir biçimde karşılaşılmaktadır (Ebner vd., 2014). Durumla ilgili birçok farklı açıklama bulunmaktadır. İlki ve en çok kabul göreni örneklerin hazırlanması sırasında hücrelerin çeşitli içsel nedenlerle otolize uğrayarak parçalanmasıdır (Hirose vd., 2000; Antelmann vd., 2006; Voigt et al., 2009; Krishnappa vd., 2013). Yang ve arkadaşları (2011) sinyal peptidi olmayan sitoplazmik proteinlerin salımı için alternatif bir mekanizma olabileceğini öne sürmüşlerdir. Olası bir diğer mekanizma da, bakterilerde membran kesecikleri (vesicle) ile proteinlerin salımıdır (Tjalsma vd., 2004; Mashburn-Warren vd., 2006; Lee vd., 2009; Kim vd., 2016). Yine, “moonlighting” olarak adlandırılan bazı sitoplazmik proteinlerin asıl görevleri dışında ikinci bir görevleri olduğu, bu nedenle de birden fazla alt hücresel lokasyonda bulunabilecekleri ileri sürülmektedir. Örneğin, sitoplazmik bir enzim olan enolaz, 2- fosfogliseratın fosfoenolpirüvata geri dönüşümlü olarak çevrilmesinde görev alır. Enolaz enziminin sinyal peptid içermemesine rağmen prokaryot ve ökaryotlarda hücre yüzeyine ve hücre dışına transport edildiği gözlenmektedir (Yang et al., 2014). Dolayısıyla, logaritmik üreme fazını takiben sinyal peptid içermeyen sitoplazmik proteinlerin otoliz haricinde de hücre dışına salımının genel bir olgu olması kuvvetle muhtemeldir. Diğer yandan, *Staphylococcus aureus* sekretomunun %25'inin henüz bilinmeyen (prediction algoritmaları ile kestirilemeyen) bir çeşit sinyal peptidi içeren sitoplazmik proteinlerden oluştuğu düşünülmektedir (Ebner et al., 2014). Şimdiki çalışmamızda, özellikle durağan faza geçişi temsil eden 12. saatte, *bac(-)* suşumuz OGU1 ve onun ana suşu PY79 arasında sekretom farklılıklarını temel alan bu çalışmamızda, özellikle 12. saat için OGU1'de bu derece fazla sitozolik protein çokluğu gözlenmesinin nedeni mevcut hedefli mutasyonun bir yan etkisi olarak ortaya çıkan hücre dışına aşırı geçirgenlik problemi olabilir. Bu bir hipotezdir ve gerekli deneysel analizler yapılmaksızın kanıtlanamaz.

LC MS MS analizlerinde mutant suş OGU1 ve standard suş PY79 arasında ilk ölçüm saati olan 12. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlerden ekstrasellüler lokasyona sahip

olan proteinler incelendiğinde, toplam 18 proteinin farklı ifade edildiği belirlenmiş olup bunlardan flagellar hook komponenti FlgK dışındakiler mutant suşta daha fazla bulunmaktadır. Bu proteinlerden kitosanaz, ekstrasellüler endo-1,5 alfa arabinaz, levanaz, ekstrasellüler lipaz, fitaz, YhcR endonükleaz, bacillopeptidaz ve minor ekstrasellüler serin proteaz mutant suşta ifadesinde artış gösteren katabolik enzimlerdir. İfade artışı gösteren stress proteinlerin çoğunun *sigB* regulonun değil de *sigA* (vejetatif sigma faktör), AbrB, SigH, DegU, CcpA, PhoP, LevA, CodY ve WalR regulonlarının elemanı olduğu görülmektedir. Genel olarak, basilisin yokluğunun bir çeşit stress olarak algılanıp 12. saatte makromolekül parçalayıcı enzimlerin mutant suşta artış göstermesi bir çeşit savunma ve/veya stresle başa çıkma mekanizması olarak yorumlanabilir. Sekretomun komponentleri olan flagella ve faj ile ilgili proteinler de basilisin yokluğunda ifade farklılığı göstermektedir. Flajella hook protein FlgK'nın ifadesinde belirgin bir azalış görülürken flagellin monomerini kodlayan Hag protein'in ifadesinde artış belirlenmiştir. Her ikisi de motilite ve kemotaksis ile alakalı (Mirel vd. 1994) olmalarına rağmen farklı regülasyonlara maruz kalmaktadırlar.

Mutant suş OGU1'da artış gösteren proteinlerden biri de TasA olup, bu protein hem biofilm oluşumunda önemli rolü olan, hem de antimikrobiyal aktiviteye sahip bir proteindir (Strauch vd., 2007; Dragos vd., 2017). Mutant suşta artış gösteren TasA proteininin antimikrobiyal aktivitesi ile muhtemelen basilisin yokluğunu kompanse etmede önemli bir rol oynuyor olabileceği düşünülmüştür. Aynı şekilde, beta-laktamaz proteinin de ifadesi mutant suşta artış göstermektedir. Bu proteinlere ek olarak, profaj PBSX proteini, putatif eritromisin esteraz, fonksiyonu bilinmeyen, ancak detoksifikasyonla alakalı olduğu düşünülen bir protein de OGU1'da artış gösteren proteinler arasında yer almaktadır.

Özetle, 12. saatte mutant suş OGU1'da standard suş PY79'a göre ifade farklılığı gösteren ekstrasellüler proteinler incelendiğinde artış gösteren proteinlerin katabolik enzimler, antimikrobiyal proteinler, flagella ile alakalı proteinler ve stresle başa çıkmada görev alan proteinler olduğu görülmekte ve bunlardaki değişimin muhtemelen basilisin yokluğunu telafi etmek üzere oluşturulan yeni bir düzenleme açısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sekretom örneklerinin analizi ile, sitoplazmik membranda lokalize olan ve ifade farklılığı gösteren proteinler de belirlenmiştir. Amino asit ABC stransport sistemi elemanlarını kodlayan *yqiXYZ* operonuna ait genler tarafından kodlanan ArtP (YqiX) proteini yüksek affiniteli arginin ABC transport proteini olup şimdiki sekretom çalışmasında mutant suş OGU1'da artış göstermektedir. Fosfoenol piruvata bağımlı fosfotransferaz sisteminde (PTS)

yer alan LevG protein (fruktoz permeaz IID komponenti) şekerlerin hücre membranından transportları için fosforile edilmelerinden sorumludur. Aynı operondan kodlanan SacC de LevG ile birlikte levanaz ekspresyonunun regülasyonunda görev almaktadır (Reizer vd., 1999; Pereira vd., 2001). Nedeni tahmin edilememekle birlikte, hem LevG hem de SacC mutant suş OGU1'da ifadesinde artış görülen proteinler arasındadır. Mangan iyonlarının (Mn II) transportu, eksponensiyal büyüme sırasında sıkı regülasyonlar altında olup sporulasyonun başlangıcı sırasında da bu regülasyon devam etmektedir (Que and Helmann, 2000). Mangan transportunda görev alan MntA'nın (Mangan bağlanma protein) aynı zamanda soğuk stresi altında artış gösterdiği bulunmuştur (Kaan vd. 2002). Diğer yandan, daha önceki yıllarda tamamladığımız 16. saat sitozolik proteom çalışmamızda aynı suşlar karşılaştırıldığında MntA seviyelerinde herhangi bir değişim saptanmamıştı (Demir, 2013). Ayrıca, birçok sporulasyon protein ve spor kılıf proteinlerinin mutant suş OGU1'da ya hiç bulunmadığı, ya da seviyelerinde bariz bir düşüş olduğu belirlenmiş olmasına rağmen PY79 ve OGU1 suşlarının sporulasyon frekansının aynı seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Yayın için gönderilmiş davetli makale). Şimdiki çalışmamızda, MntA protein ifadesinde OGU1 mutant suşunda PY79'a göre 6 kat artış tespit edilmiş olup bu artışın mutant suşa sporulasyona başlama aşamasında fayda sağlama olasılığı vardır. Mutant suş OGU1'da ifadesinde artış görülen diğer proteinlerden biri de SkfA sporulasyon öldürücü faktörüdür. SkfA sporulasyon sürecinde Spo0A'nın aktif olduğu hücrelerden sentezlenip Spo0A'nın inaktif olduğu hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. SkfA, fosfat açlığı koşulunda da *B. subtilis*'te artış gösteren proteinler arasındadır (Molle vd., 2003). Bunun yanısıra SkfA bilinmeyen bir mekanizma ile ekstraselüler proteaz LipA'nın da proteolizden korunmasını sağlamaktadır. Çalışmamızda LipA proteininin ifadesinde mutant suş OGU1'da artış görülmüştür.

PrsA (peptidylprolyl cis-trans isomerase lipoprotein) ekstraselüler proteinlerin katlanması (folding) ve kalite kontrolünde önemli rolü olan bir proteindir. *B. subtilis*'te PrsA'nın aşırı ekspres edilmesi durumunda heterolog protein sekresyonunda artış gözlenmiştir (Kontinen vd., 1993; Krishnappa vd., 2014). PrsA posttranslokasyon fazında ekstraselüler proteinlerin membran ve hücre duvarı arayüzünde stabil ve uygun katlanması için gereklidir (Wahlström vd., 2003). Bunun yanı sıra hücrede PrsA seviyesi belirli seviyenin altına (200 molekül/hücre) düştüğünde hücre parçalanmasına neden olur (Vitikainen vd., 2004). 16. saatte yapılan sitoplazmik proteom çalışmamızda PrsA ifadesinin mutant suş OGU1 ve PY79'da benzer seviyede olduğu bulunmuştu (Demir, 2013). Diğer yandan, şimdiki sekretom çalışmamızda, PrsA seviyesi OGU1'da 4.2 kat artış göstermektedir. Bu artış mutant suşta artan protein sekresyonu ile uyumludur.

OppA (oligopeptid bağlanma), OpuAC (glisin betain bağlanma), GlnH (glutamin bağlanma) ve YltC (henüz karakterize edilmemiş) OGU1 sekretomunda da ifadesinde artış gösteren ABC transport bağlanma proteinleridir. Bunlardan özellikle OppA sporulasyon ve kompetans için gerekli hücre yoğunluğu sinyallerinin transportunda görev almaktadır (Antelmann vd., 2001). *OppA* geninin Tn917 transposon mutasyonu sonucu basilisin ekspresyonunun yok olduğu ilk kez grubumuzca rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, basilisin biyosentezinin ComA ve PhrC ile Spo0K'ya bağımlı olduğu, hedefli mutajenez ile oluşturulan *phrC*, *comA* ve *spo0K* mutantları ile yapılan deneylerle gösterilmiştir. Sonuç olarak, oligopeptid permeaz fonksiyonu bozulduğunda basilisin sentezi gerçekleşmemektedir (Yazgan vd., 2001). Diğer yandan, *oppA* geninin CodY kontrolünde olduğu bilinmektedir ve durağan fazın başında görülen bu artış beklenmeyen bir sonuçtur (Gilois vd., 2007). 16. saatte PY79 ve OGU1 ile yapılan karşılaştırmalı sitoplazmik proteom sonucuna göre OppD (oligopeptid ABC transporter protein) dahil CodY tarafından regüle edilen genlerin ifadesinde mutant suş OGU1'da azalış belirlenmişti (Taşkın 2010; Demir, 2013). Şimdiki sekretom çalışmamızda, OppA'nın ifadesi 12. saat örneklerinde mutant suшта artış, 16. saate gelindiğinde ise mutant suшта azalış şeklinde ortaya çıkmaktadır.

CotF proteini öncül bir molekül olarak sentezlenmekte ve spor kılıfının oluşumu sırasında proses edilerek olgun hale gelmektedir. Olgun formu, Sigma K' ya bağımlı olan sentezlenen 5 ve 8 kDa'luk spor kılıf komponentleri tarafından temsil edilir. (Lai vd., 2003; Abhyankar vd., 2011). 16. saatte yapılan PY79 ve OGU1 ile yapılan karşılaştırmalı sitoplazmik proteom çalışmamızda CotF'in ifadesinde değişim olmamasına rağmen diğer spor kılıf proteinlerinde CotE, CotA, CotB, CotI, CotSA, CotU ve spore kılıf proteinlerinin sentezi ile alakalı diğer proteinlerin (SpoVR, SpsB, SpsJ, SpsK) ifadesinde OGU1'da belirgin düşüşler saptanmıştı (Demir, 2013). Bu proteinlerin ve özellikle de CotA'nın yok olması, buna bağlı olarak da spor kılıfının kahverengi pigmentasyonun mutant suş OGU1'da kaybolması ve olgun sporlarda lizozim ve kloroform dirençliliğindeki azalış biraraya getirildiğinde basilisinin spor kılıfı yapılanmasındaki rolüne işaret etmişti. Şimdiki 12. saat sekretom çalışmamızda CotF'in ifadesinde artış gözlenmekte, bu da 12. saatin bu değişimler için erken olduğunu düşündürmektedir.

OxdC (okzalit dekarboksilaz) bakteri hücre duvarında yoğun olarak bulunan ve asit stresi altında artış gösteren bir proteindir (Makela vd., 2010). OxdC protein ifadesinde 16. saat sitoplazmik proteom çalışmamızda farklılık saptanmazken 12. saat sekretomunda mutant suş OGU1'da bu proteinde 3.7 kat artış gözlenmiştir.

Sitoplazmik proteinlere bakıldığında, 12. saat sekretom analizi sonucunda toplam 63 adet sitoplazmik protein hedefli mutant suş OGU1'da miktar farklılığı göstermiştir. 16 ve 24 saatlerle kıyaslandığında, 12. saatte çok daha fazla sayıda sitoplazmik proteinin miktar farklılığı gösterdiği saptanmıştır. Bu proteinlerin 31'i Metabolizma kategorisinde yer alırken 12'si enformasyon işlemlerinde (replikasyon, translasyon, DNA kondense olması) yer almaktadır. Geriye kalan 4'ü sporulasyon ve germinasyon, 8'i stresle başa çıkma ve 3'ü de hücresel faaliyetler, hücre duvarı ve fonksiyonu henüz bilinmeyen proteinlerden oluşmaktadır. İfade farklılığı gösteren sitoplazmik proteinlerden DapA (dihidrodiplikolinat sentaz) ve Asd (aspartat semialdehit dehidrogenaz) spor maturasyonu ve dirençliliği için önemli dipikolinik asit (DPA) sentezinde rol alan proteinlerdir. Sporulasyonla ilgili diğer proteinler ise PepF (YjbG) oligopeptidaz ve Spo0M (sporulasyon kontrol proteini) olup bahsi geçen dört protein de mutant suş OGU1'de artış göstermiştir. Bunlardan DapA, hem vejetatif büyüme, hem de durağan fazda sentezlenir ve yokluğu sporda DPA eksikliğine neden olur (Chen vd., 1993; Orsburn vd., 2010). Mutant suş OGU1 ile yapılan 16. saatlik sitoplazmik proteom çalışmamızda SpoVFA ve SpoVFB'nin yanı sıra DapG'nin ifadesinin de mutant sušta azalma gösterdiği bulunmuştu (Taşkın, 2010; Demir, 2013). Prokaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun çok hızlı değiştiği gözönüne alındığında bu proteinlerin ifadesinin 12. saatte artış gösterip 16. saatte düşüşe geçmesi oldukça mümkündür. Spo0M bir diğer sporulasyon proteini olup sporulasyonun 0. saatinde rol alır ve ekspresyonu sigma H ve sigma W'ya bağlıdır (Cao vd., 2002). Yapılan bir çalışmada, Spo0M-susturulmuş bir mutant türev oluşturulmuş ve bu mutant suşun hücre parçalanmasına yatkın olduğu ve sporulasyonun 0. saatinde bloklandığı bulunmuştur. Mutant suşun sporulasyon frekansı, hücrelerdeki Spo0M miktarına bağlı olarak değişmektedir (Nguyen ve Schumann, 2012). Bunların yanı sıra Spo0M'in birçok protein ile etkileşim içerisinde olduğu düşünülmektedir (Vega-Cabrera vd., 2017). PepF proteinin büyük ihtimalle protein turnover ve sporulasyonla ilgili görevleri olduğu düşünülmektedir. PepF aşırı ekspresyon edildiğinde sporulasyonu baskıladığı ve kompetans gelişiminde rol aldığı kuvvetle muhtemeldir (Kanamaru vd., 2002). 12. saat sekretom örneklerinde hem Spo0M, hem de PepF proteinlerinin ifadesi mutant suş OGU'da sırasıyla 5.5 ve 3 kat artmıştır.

İfadesinde değişim görülen diğer bir sitoplazmik protein de acotinat hidrataz (CitB) TCA döngüsünün bir elemanıdır ve sporulasyon için gerekli bir protein olduğundan seviyesi sporulasyonda da artış gösterir (Fouet and Sonenshein, 1990). Aynı zamanda CitB, CodY'nin etkileşim içinde olduğu transkripsiyonel birimler arasındadır (Molle vd., 2003). CitB, 12 saatlik sekretom örneklerinde mutant sušta 2.3 kat artış göstermiş olup bu artış 16 saatlik sitoplazmik proteomda daha önce kaydedilen 2.9 katlık artış ile uyumludur (Taşkın, 2010).

Stresle baş etme kategorisinde yer alan ve ifadeleri artan 8 proteinden GroEL (şaperonin), diğer proteinlerin nihai yapılar oluşturmaya, katlanmasına ve translokasyonuna yardımcı olarak hücrelerin zindelik ve uyumuna katkı sağlar. Kısa süreli etanol stresi altında DnaK ve GroEL proteinlerinin hücre membranına toplandığı bulunmuştur (Seydlova vd., 2012). Genel stress proteini Dps (miniferritin) sigma B regülununun bir elemanı olup demir detoksifikasyonu için önemli bir protein olmasının yanısıra DNA'ya bağlanabilme ve koruma özelliği vardır. *dps* mutantlarının etanol, paraquat ve düşük sıcaklıklara maruz kalma gibi stress koşullarında stresle baş etmede yetersiz olduğu gözlemlenmiştir (Chiancone vd., 2004; Höper vd., 2005; Reder vd., 2012). İnkübasyonun 16. saatinde mutant OGU1 ile yapılan sitoplazmik proteom çalışmamızda GroEL, DnaK ve Dps proteinlerin ifadelerinde PY79'a göre bir fark görememiştik (Demir, 2013); bu da basilisin biyosentetik operonunun susturulmasının bu yöndeki etkilerinin daha erken saatlerde gerçekleşmekte olduğuna işaret etmektedir. NadE (NH₃'e bağımlı NAD⁺ sentetaz) sigma B bağımlı genlerdendir ve deamido-NAD'nın amidasyonunu sağlar. NadE ifadesinin etanol ve tuz stresi altında artış gösterdiği makroarray yöntemi ile saptanmıştır (Petershon vd., 2001). Bununla birlikte, NadE, özellikle de membranı hedef alan çeşitli antibiyotikler tarafından indüklenir ve bu sebeple de membran stres markörü olarak kullanılır (Wenzel vd., 2012). SodA (Süperoksit dismutaz) serbest radikallerin detoksifikasyonunda görev alır. SodA mutant suşu etanol stresi ile başa çıkma konusunda yetersiz kalmıştır (Casillas-Martinez ve Setlow; 1997). SodA ifadesi bakımından 16. saatlik sitoplazmik proteom çalışmasında PY79 ve OGU1 arasında fark bulunmamışken SodF ve katalaz KatX ifadeleri OGU1'da azalış göstermiştir (Demir, 2013). Fakat SodA şimdiki sekretom çalışmamızda 2.7 kat artış göstermektedir. TrxA (thioredokson) thio-disulfat oxidoredüktazdır ve indirgeyici ajan olarak sitoplazmada görev alır (Scharf vd., 1998). TrxA'nın yokluğunda defektif spor oluşumu ve sitokrom C sentezi saptanmıştır. TrxA'nın etanol, tuz ve sıcak stresi altında indüklendiği bilinmektedir (Möller ve Hederstedt, 2008). TrxA seviyesi şimdiki sekretom çalışmamızda 9.6 kat gibi önemli bir artış göstermiştir.

Fonksiyonu bilinen proteinlerin yanı sıra fonksiyonu henüz bilinmeyen birçok proteinin de ifadesinde mutant suşta farklılıklar gözlenmiştir. Bunlardan YbdN, AbrB ile regüle edilen genler arasında olup *B. amyloliquefaciens* ile yapılan bir çalışmada YbdN'nin sinyal peptid sekansı kullanılarak subtilisin sekresyonunu artırılmıştır (Degering vd., 2010). Bu proteinin sekretom örneklerindeki seviyeleri karşılaştırıldığında mutant suşta 5 kat artış görülmektedir. Diğer bir protein, YoaW, fonksiyonu bilinmemekle beraber yine AbrB ile regüle edilmektedir ve büyük ihtimalle biyofilm oluşumunun son süreci olan ekstraselüler matris formasyonunda rol aldığı ve biyofilmin derinliğini etkileyen proteinlerden birisi olduğu düşünülmektedir (Hamon vd., 2004). KO mutant suşa ait sekretom örneklerinde bu protein 7 kat artış göstermiştir. AzoR2, NAD(P)H dehidrogenaza benzerlik gösteren bir proteindir ve MarR tipi

bir repressor olan YkvE ile regüle edilmektedir. Azoreduktazlar flavin içerir ve NADH'e bağımlı quonin redüksiyonlarını kataliz ederek hücreyi serbest radikallerden ve reaktif oksijen türlerinden korur (Töwe vd., 2007). AzoR2'nun sekretom örneklerindeki miktarı mutant suşta standard suşa kıyasla 5 kat fazladır. *yfnH* muhtemelen glukoz-1-fosfat e sitidiltrasferaz enzimini kodlamaktadır ve *yfnHGF* operonu sigma K and gerE regülonlarının bir üyesidir (Eichenberger vd., 2004). YnfH, OGU1'da artış gösteren bir başka protein olarak bulunmuştur. Anaerobik koşullar altında *yjCD* operonu ifadesinde azalış görülmektedir ve *yjC* gen ifadesi yüksek NADH/NAD⁺ oranı ile indüklenmektedir (Ye vd., 2000; Gyan vd., 2006; Chumsakul vd., 2017). 12 saatlik sekretom örneklerimizde YjC'nin ifadesinde OGU1'de standard suşa göre 2 kat artış bulunmuştur.

"Ekspansiyonel hücre çoğalması ve ekspansiyonel fazdan durağan faza geçişteki süreci de temsil eden" 12. saatteki bulgularımız" özel bir önem arz etmektedir. Bu çalışmamızı takip eden araştırmalarımızda, yukarıda tartışılan bulgular üzerine yoğunlaşılması amaçlanmaktadır.

LC MS MS analizlerinde 16. saatte mutant suş OGU1 ve standard suş PY79 arasında ifade farklılığı gösteren proteinlerden ekstraselüler lokasyona sahip toplam 9 protein mevcuttur. Bu proteinlerden ekstraselüler nötral proteaz (bacillolisin, NprE) *B. subtilis*'te bulunan major ekstraselüler enzimlerdendir. NprE büyüme fazı boyunca baskılanır ve ekspresyonu CodY, AbrB ve ScoC tarafından kontrol edilir (Chumsakul vd., 2010; Barbieri vd., 2016). NprE başka bir ekstraselüler enzim olan AprE ile birlikte durağan fazda hücre parçalanmasını (otolisis) önlemede rol alır (Barbieri vd., 2016). LytE vejetatif *B. subtilis* hücrelerinde bulunan major otolisinlerden biridir. MreBH (aktin-benzeri protein), FtsZ ve PBP2b (penisilin bağlanma proteini) ile LytE nin etkileşimde bulunması bu proteinin hücre duvarı dönüşümünde görev aldığı izlenimini uyandırır. Dahası, inaktivasyonunun ise beta-laktam direncinin artmasına neden olduğu iddia edilmektedir (Luo ve Helman, 2012; Dominguez-Cuevas vd., 2013). Ekspresyonu Spo0A (negatif regülasyon) ve WalR (pozitif regülasyon) regülasyonları altındadır (Schirner and Errington, 2009). WalR 12. saat sekretom örneklerinde daha önce basedildiği üzere mutant suş OGU1'da daha fazla ekspres edildiği bulunmuştur. 16. saat sekretom örneklerinde NprE (yaklaşık 7 kat), LytE (2 kat) ve WapA (2.7 kat) proteinlerinin ifadelerinde azalış gösterdiği bulunmuştur. OGU1 ile yapılan 16. saat sitoplazmik proteom çalışmasında, WapA ve LytE seviyeleri PY79 ile aynı bulunmuştur (Demir, 2013). Özellikle LytE ifadesindeki azalış hücre parçalanmasını engelleme ve hücresel fitness artırma açısından önemlidir. Majör sporulasyon-spesifik ekstraselüler nükleaz NucB ana hücreye spesifik sigma E tarafından regüle edilir ve *nucB* mutantları ile yapılan çalışmalar NucB'nin sporulasyonun geç fazında salındığını gösterir. *nucB*'nin

indüklenmesinin ana hücrenin parçalanmasından hemen önce gerçekleşmesi, sporlanmayan hücrelerin NucB tarafından parçalanmış nükleotidleri büyüme için kullanması ile ilgili olabilir (Hosoya vd., 2007). Nükleik asit parçalayan enzimlerin stres ve açlık durumlarında artış gösterdiği bulunmuştur (Voigt vd., 2006). 16. saat sekretom örneklerinde mutant suş OGU1'da ana suşa göre NucB'nin ifadesinde 5 kat artış saptanmıştır. Bu artış, hali hazırda sporulasyon sürecine girmemiş hücrelere nükleotid sağlama açısından önemli olabilir. PgdS proteini gama-DL-glutamil hidrolaz enzimidir ve poly-g-glutamati (PGA) parçalar. PGA'nın *B. subtilis*'te bir çok görevi vardır; değişen çevre koşullarında direnci artırır, açlık koşullarında ise glutamatin ana besin kaynağı olarak kullanılmasını sağlar (Candela ve Fouet, 2006). Bu enzim, 16. saat sekretomunda mutant suş OGU1'da 5 kat artış göstermiş olup bu artış OGU1'in olası bir adaptasyon gereksinimi için önemli olabilir. YlcQ ise ABC tipi transporter çözünür madde bağlanma proteini olup demir transportunda görev alır ve hücrel zindelik ve uyumu artırır (Zawadzka vd., 2009; Miethke vd., 2013). Bu proteinin mutant suş OGU1'da yaklaşık 4 kat artış gösterdiği bulunmuştur.

16. saat sekretom örneklerinin analizi ile sitoplazmik membranda lokalize olan ve ifade farklılığı gösteren proteinlerden 3 adeti [ABC transporter bağlanma proteini OppA (oligopeptid permeazA), GlnH (ABC tipi transporter glutamine-bağlanma proteini) ve PtsS (fosfat-bağlanma proteini)] mutant suş OGU1'da artış gösterirken bir adeti [TycA (L-sistein-bağlanma protein)] azalış göstermektedir. OppA ve GlnH 12. saat sekretom örneklerinde de artış göstermişti. PtsS'nin elemanı olduğu *pst* operonu fosfat açlığı, alkalın stresi koşulunda indüklenmektedir (Antelmann vd., 2000; Atalla ve Schumann, 2003). NucA membran ile ilintili nükleaz olup ComK tarafından regüle edilir ve transformasyon sırasında görev alır (Proveddi vd., 2001). Nin, NucA'nın inhibitörüdür ve azot açlığı koşulunda indüklendiği belirlenmiştir (Jarmer vd., 2002). 16. saat sekretom örneklerinde Nin 2.5 kat artış göstermiştir bu artış OGU1 suşunun transformasyon verimliliğini etkilemiş olabilir. Bitkilerde bulunan ekspansinlere benzyen YoaJ proteini *B. subtilis*'te bitki kök kolonizasyonunu bilinmeyen bir mekanizma ile destekler (Kim vd., 2013). *yoaJ* mutant suşu standart suşla karşılaştırıldığında YoaJ'nin bakteriyel hidrolazlarla sinerjik aktivite içerisinde olduğu ve hücrelerde etkin otolize neden olduğu saptanmıştır (Kerff vd., 2008). OGU1'e ait 16. saat sekretom örneklerinde YoaJ'nin ifadesinde 11 kat artış belirlenmiştir.

16. saatlik sekretom örneklerinin analizi sonucunda OGU1 ve PY79 karşılaştırıldığında ifade farklılığı gösteren toplam 27 adet sitoplazmik protein bulunmuştur. Bunlardan 9'u ribozomal protein subunit ve biyosentetik proteinler MetE (metiyonin biyosentetik enzim 5-metiltetrahidropteril triglutamat--homosistein metiltransferaz) ve SerA (D-3-fosfogliserat dehidrojenaz)'dır. Bu proteinleri kodlayan genlerin tümü sigma A regulonuna ait olup mutant

suş OGU1'da 16. saat sekretom örneklerinde azalış göstermiştir. Bu ribosomal proteinler 16. saat sitoplazmik proteom çalışmasında da bulunmuş, fakat ifadelerinde değişim saptanmamıştı (Demir, 2013). TCA ve glikoliz ile bağlantılı PdhC (pürivat dehidrogenaz E2 subunit)'yi kodlayan genin ait olduğu operon *pdhABCD* olup *pdhC* operona ait olmayan ayrı bir promotora sahiptir. *phdC* mutantlarının standart suşa göre sporulasyon fenotipinin azaldığı görülmüştür (Gao vd., 2002). Bu proteinin miktarı daha önce gerçekleştirdiğimiz 16. saat sitoplazmik proteomu analizinde iki suş arasında farklılık göstermemesine rağmen şimdiki sekretom çalışmamızda 2 kat azalış göstermiştir. Diğer TCA döngüsü proteinleri SucC (süksinil-CoA sentetaz beta subunit), OdhB (of 2-oksoglutarat dehidrogenaz E2 subunit) ve Ldh (laktat dehidrogenaz) enzimlerinden Ldh hariç hepsi mutant suşta 16. saat sekretom örneklerinde azalış göstermiştir. Farklılık gösteren diğer bir protein de UreA (ureaz), üreyi alternatif enerji kaynağı olarak kullanamada görev alır. Önceki sitoplazmik proteom çalışmasında 2DE-MALDI yöntemi ile UreC'nin ifadesi OGU1'de farklılık gösterirken (Taşkın, 2010), LC-MS/MS yöntemi ile UreA ve UreC için iki suş arasında bir fark saptanamamıştı. (Demir, 2013). UreA miktarı, şimdiki sekretom çalışmamızda 16. saatte yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. RibH (riboflavin), FolB (folate), GuaB (GMP) gibi biyosentetik enzimlerin de OGU1 sekretomunda artış gösterdiği kaydedilmiştir. *B. subtilis*'te IspA major intraselüler proteaz enzimidir ve CodY regülasyonu altındadır (Belitsky ve Sonenshein, 2013). GeLC-MS/MS yöntemi ile yapılan sitoplazmik proteom analizinde belirlenememiş (Demir, 2013) olmasına karşın LC-MS-MS yönteminin kullanıldığı şimdiki çalışmamızda tam 5 misli daha fazla miktarda elde edilmiştir. ClpY şaperon benzeri aktiviteye sahip olan ATP-bağımlı bir proteazın alt elemanlarından biridir ve ClpYQ kompleksi anormal proteinlerin elimine edilmesi ve regülatör proteinlerin parçalanmasında görev alır (Kang vd., 2003). Şimdiki sekretom çalışmasında ClpY yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. Endospor oluşumunda çok önemli bir bileşik olan dipikolinik asiti (DPA) oluşturan SpoVFA ve SpoVFB proteinlerinin miktarı, daha önceki sitoplazmik proteomanalizimizde azalmış bulunurken (Taşkın, 2010; Demir, 2013) şimdiki sekretom çalışmamızda SpoVFB'nin 5 misli arttığı tespit edilmiştir. Laboratuvarımızca yapılan bir başka çalışmada, OGU1 ve PY79 DPA seviyeleri karşılaştırılmış ve bir fark bulunmamıştır (yayına gönderilmiş makale). DPA seviyelerinde spor popülasyonunda her bir spor hücresinde bile diğerlerine göre farklılık gösterdiği yapılan bir başka çalışmada ortaya konmuştur (Jamroskovic vd., 2016). GlmS (glutamin fruktoz 6-fosfat amidotransferaz) hücre duvarı biyosentezinde görev alır ve glikoz açlığı durumunda Clp'ye bağımlı biçimde proteolize uğrar (Winkler vd., 2004; Gerth vd., 2008). GlmS için 16. saat sekretom örneklerinde mutant suş OGU1'da azalış bulunmuştur. YpuA hücre duvarı ile ilgili streslere karşı duyarlıdır ve indüklenir (Wenzel vd., 2014). Bu proteinin miktarı 16. saat sekretom örneklerinde mutant suşta yaklaşık 2 kat artış göstermiştir.

16. saat sekretom analizi sonucunda ifade farklılığı gösteren 6 adet fonksiyonu ve lokasyonu bilinmeyen protein bulunmuştur ve tümünün ifadesi mutant suş OGU1'da artmıştır. Bunlardan 3'ü YdhF, YbbC ve YngK'nın fonksiyonları tam bilinmemekle birlikte Subtiwiki veritabanına göre sporulasyon ve germinasyon kategorisinde yer almaktadır. YdhF bir lipoproteindir ve Pho regulonuna ait, hücre dışına salınan bir proteindir (Antelmann vd., 2000). YbbC geç büyüme fazı ve erken durağan faz başlangıcında ekspres edilir ve *E. coli*'deki ortologu NagZ hücre duvarı dönüşümünde görev almaktadır (Litzinger vd., 2010; Nicolas vd., 2012). YngK yeni tanımlanmış bir sporulasyon ve germinasyon proteindir (Nicolas vd., 2012). YwmD ve YlaE mutant suшта çok yüksek artış gösteren proteinler olarak belirlenmiştir.. YwmD'yi kodlayan gen licR-gerBC bölgesinde yer almaktadır ve hücre dışına aşırı sekresyon yapan hücrelerde (*degU32* mutanı) aşırı ekspres edildiği bulunmuştur (Antelman vd., 2003). YlaE'nin AbrB ve Abh tarafından negatif biçimde regüle edildiği bilinmektedir (Chumsakul vd., 2010).

LC MS MS analizlerinde 24. saatte ifade farklılığı gösteren proteinlere bakıldığında, ekstraselüler proteinlerden biri olan EfeB (hem peroksidaz), EfeUOB transporter ailesinin bir üyesi olup Tat yolağı tarafından hücre dışına atılır (Jongbloed vd., 2004). EfeB'nin yetersiz olduğu hücrelerde, düşük tuzluluk koşullarında, demir açlığı ve durağan faza geçmek yerine hücre parçalanması prosesinin yaşandığı saptanmıştır (Van Der Ploeg vd., 2011). EfeB aynı zamanda stres sigma faktörleri tarafından kontrol edilen ek promotor bölgesine sahip olduğundan, aşırı sentezi stres koşullarının belirteci olarak görülür (Miethke vd., 2013). Bu çalışmamızda 24. saatte EfeB'nin seviyesi 4 kat artış göstermektedir. SdpC sporulasyon sürecinde salgılanan bir toksik proteindir ve sporulasyonun inaktif olduğu hücrelerde proton motif gücü bozarak hedef hücrede otolizi tetikler (Ellermeier vd., 2006; Strauch vd., 2007). Kannibalistik aktivite gösteren bu diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde de etkilidir (Lamsa vd., 2012). Şimdiki sekretom çalışmamızda, 24. saatte OGU1'de SdpC seviyesi 3.5 kat artış göstermektedir.

İfade farklılığı gösteren sitoplazmik membran proteinlerden NarG (nitrat redüktaz) azot seviyesinin sınırlı olduğu zamanlarda aktive olur (Richardson vd., 2001; Yoshida vd., 2003; Reents vd., 2006). Anaerobik solunumda son elektron tutucu olan nitrat bileşikleri de NarG'nin yer aldığı *narGHJ* operonunun indükleyicisidir (Nakano vd., 1990; Yoshida vd., 2003). Sekretom çalışmamızda NarG proteini mutant suş OGU1'da 15 kat gibi çok yüksek bir artış göstermiştir. SrfAC (surfaktin sentaz subunit B) surfaktin biyosentezinde rol alır (Tanovic vd., 2008). Surfaktin bir lipopeptit olup biofilm oluşumunda rol oynamaktadır (Marvasi vd., 2010). Surfaktin biyosentetik operonunun basilisin üretiminde önemli rolü olduğu ve basilisin biyosentezinin de surfaktin sentezinin bloklandığı durumlarda

gerçekleşmediği bizzat grubumuzca gösterilmişti (Yazgan Karataş vd., 2003). 24. saat sekretomunda mutant suş OGU1'da SrfAC'nin ifadesinde 3 kat azalış bulunmuş olması özellikle ilginçtir ve muhtemelen her iki peptid antibiyotik biyosentezi ile ilgili regülasyonların karşılıklı olduğunu düşündürmüştür.. YvgO etanol stresi ile baş etmede rol alan, sitoplazmik membranda lokalize olan ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen proteinlerdendir (Höper vd., 2005; Chumsakul vd., 2010). Transkripsiyonu alternatif sigma factor σ^B ile kontrol edilir ve AbrB tarafından baskılanır. Bu proteinin OGU1'deki seviyesinin 24. saatte ana suşa kıyasla 6 misli azaldığı saptanmıştır.

İfade farklılığı gösteren sitoplazmik proteinlerin tümünün seviyelerinin 24. saat sekretomunda azaldığı kaydedilmiştir.. Bu proteinlerden 3'ü aromatik amino asit sentezinde görev alan SerA, AroA ve AroE olup sistein rezidülerinde S-basillitilyolasyon bölgelerini içermekte ve hipoklorit stresi altında *B. subtilis*'te okside oldukları bilinmektedir (Chi vd., 2013). YceE hem etanol, hem de düşük sıcaklık stresi ile savaşmada önemli bir proteindir (Höper vd., 2005; Chumsakul vd., 2010). Bu protein, OGU1'in 24. saat sekretomunda 2 kat azalmıştır.

Farklı zaman noktaları ve aralıklarında etkilenen proteinler gözönüne alındığında, *bac* operonu delesyonundan kaynaklanan pleiotropik etkileri yansıtan en güçlü diferensiyel protein ekspresyonunun 12. saatte ortaya çıktığı ve 16. ve 24. saatlerde giderek azaldığı sonucuna varılmıştır.

12. saat sekretom örneklerinde 2DE MALDI-TOF/MS yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucunda mutant suş OGU'da ifadesinde artış saptanan XkdG ve XkdM (*xpf* regulonuna ait proteinler)'nin yüksek tuz konsantrasyonu koşullarında azalış gösterdikleri bilinmektedir (Nagler vd., 2016). İfade farklılığı (artış) gösteren diğer iki proteinin (YbfO ve YncM) fonksiyonları henüz bilinmemekle birlikte YncM, Sec yolağı ile hücre dışına atılır ve *B. subtilis* sekretomunun major komponentlerinden olduğu bilinmektedir. YncM ifadesinin fosfat açığı durumunda arttığı Antelmann vd.(2000) tarafından rapor edilmişti (Antelmann vd., 2000). Bu proteinin, ayrıca, *B. subtilis* *wapA* mutant suşunun ekstraselüler proteomunda ana suşa kıyasla azaldığı gösterilmişti (Antelmann vd., 2002; Voigt vd., 2009). WapA, hücre duvarına bağlı ve kontakt aracılığı ile hücre çoğalmasını inhibe eden ve farklı türlerin hücreleriyle rekabeti sağlayan bir proteindir. Bu protein kodlayan gen, yüksek tuz konsantrasyonu koşulunda DegU-P tarafından baskılanır. DegS/DegU çifti gibi bir diğer iki komponentli yanıt regülatörü ve OmpR ailesi üyesi bir protein olan ve hücre duvarı metabolizmasını kontrol eden WalR tarafından da baskılanırken yine bir diğer iki komponentli yanıt regülatörü ve OmpR ailesi üyesi olan ve hücre yüzeyinin korunmasından sorumlu YvrHb tarafından aktive edilir (Dartois vd., 1998; Serizawa vd., 2005). *wapA* promotoruna ayrıca fosfat

metabolizmasının iki komponentli yanıt regülatörü PhoP'nin (yine ompR ailesi üyesi) fosforile formunun bağlandığı gösterilmiştir, ancak regülasyonun tam mekanizması henüz bilinmemektedir (Salzberg vd., 2015). Bu bakımdan oldukça ilginç bir bulgumuz, WapA'nın 12 saatlik kültürlerin LC-MS/MS ile belirlenen sekretomundaki seviyesinin 2.8 kat artmış olmasıdır. Bu durum, daha sonraki fonksiyonel çalışmalarda yukarıda adı geçen iki komponentli yanıt regülatörlerini ayrıca incelemeye almamızı gerektirmektedir.

16. saat sekretom örneklerinde 2DE MALDI-TOF/MS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde tanımlanabilen 6 proteinden sitoplazmik lokasyona sahip olan GlnA (glutamine sentetaz) dışında kalanların tümü ekstraselüler proteinlerdir. Ekstraselüler proteinlerden Bpr (Basillopeptidaz F)'in ana suşa kıyasla oldukça fazla ifade edildiği, hem 2DE MALDI-TOF MS yöntemi, hem de LC-MS/MS yöntemi ile doğrulanmış bulunmaktadır. Fonksiyonu bilinmeyen bir protein olan YncM, 2DE MALDI-TOF MS yöntemi ile analiz edilen örneklerde hem 12. saatte, hem de 16. saatte önemli bir azalış göstermiş olup bu azalış, 16. saatte 5 misli kadar yüksek bir değere ulaşmıştır. Yine fonksiyonu bilinmeyen, ancak bitkilerde fosfor kaynağı fitat yokluğunda ifadesi artan, Sec-tipi sinyal peptid peptid içeren ve Spo0A tarafından pozitif kontrolü gerçekleşen YrpD'nin seviyesi 16. saat OGU1 sekretom örneklerinde 2 kat azalmıştır. YrpD'nin fonksiyonu hiç bilinmemekle birlikte, bunun sebebi, muhtemelen, 12 saatlik sekretom örneklerinde fitaz enzimi seviyesinde tespit ettiğimiz yüksek artış, bir diğer deyişle hücrelerde basilisin yokluğunda gerçekleşen yeni regülasyon ağının artık fitat yoksunluğuna verdiği farklı yanıt nedeniyle YrpD'nin ifadesine gerek kalmamasıdır. Ekstraselüler nükleotidlerin kullanılmasını sağlayan YhcR (nonspesifik endonükleaz)'nin 12 saatlik OGU1 sekretomunda 5 misli artış gösterdiği LC-MS/MS yöntemiyle gösterilmiştir (Alt Bölüm 4.2). MALDI-TOF MS analizleri de, 16 saatlik kültür sekretomlarında bu proteinin seviyesinde 4 misli artış olduğunu ortaya koyarak YhcR'nin OGU1'de pozitif regüle edilen bir protein olduğunu doğrulamıştır.

24. saat sekretom örneklerinde 2DE MALDI-TOF/MS yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde ifade farklılığı gösterip tanımlanabilen sadece 4 proteinden birisi olan, mutant suşta artış gösteren, ancak "putatif eksport edilen protein" olarak tanımlanıp henüz fonksiyonu bilinmeyen bir protein olan YwmD'yi kodlayan gen, DegU tarafından regüle edilen genlerden birisidir (Antelmann vd., 2004; Kobayashi, 2007). Buna karşın bir hücre membranı GlnA (glutamin sentetaz), Ndh (NADH dehidrogenaz) ve YncM (hipotetik korunmuş protein) seviyeleri azalmıştır. Ndh gibi hücredeki NADH/NAD⁺ oranını dengede tutmada görev aldığı bilinen bir proteinin çoğalma aktivitesini çoktan tamamlamış 24 saatlik kültürlerde azalmış olması gayet doğalken, DegU gibi hücre fizyolojisinde çok kritik fonksiyonları olan bir iki komponentli yanıt regülatör tarafından sentezi düzenlenen YwmD ve durağan faza geçiş

sürecinde çok önemli bir repressor olan AbrB (Hoch, 2017) tarafından yönetilen YncM genleri için yapılabilecek fonksiyonel analizler bir sonraki araştırma listemize alınmıştır.

Araştırma sonuçlarımızın önemli bir bölümünün proteomiğin iki ayrı yaklaşımı olan ve birbirine göre farklı avantaj ve dezavantajlar taşıyan jele bağımlı- ve jelden-bağımsız yöntemlerle paralel biçimde desteklenmesi, sonuçlarımızın güvenilirliği açısından önemli olmuştur. Jele bağımlı yöntem, uygun bilgisayar yazılımları ile sonuçta tek jel fotoğrafına indirgenmiş karşılaştırmalı renklendirme sağlayarak doğrudan görsel bir karşılaştırma olanağı sunarken, kullanılan pl aralığına girmeyen asidik ve bazik proteinler, moleküler ağırlığı çok küçük veya çok büyük-sonuçta jele girmeyen proteinlerin teşhisi için dezavantajlar taşır. LC-MS MS yöntemi ise çok daha yüksek “kesin belirleyicilik avantajına” mukabil, yüksek operasyonel maliyeti yanısıra “background peaks”, yani selektivite yönünden bazı sorunlar taşıyabilir. Araştırmamızda her iki yöntem de paralel biçimde kullanılarak sonuçların güvenilirliğini artırılması hedeflenmiş, ve bu raporda görüleceği üzere, *bac* operonunu hedefli biçimde inaktive ettiğimiz suşla onun parental suşu arasında yaptığımız karşılaştırma için her iki yöntemi de kullandığımız araştırmamızın sonuçları açıklanmış, pek çok noktada birbirlerini destekledikleri gösterilmiştir.

Proteom bulgularımız, RT-qPCR analizleri ile çok daha ileri bir seviyede desteklenmiştir. 12. saatte mutant suş OGU1’de standard suş PY79’a göre ifade farklılığı gösteren ekstrasellüler proteinler incelendiğinde artış gösteren proteinlerin 8’inin biyoteknolojik öneme sahip hidrolitik enzimler olduğu görülmüş ve bunlardaki değişimin muhtemelen basilisin yokluğunu telafi etmek üzere oluşturulan yeni bir düzenleme ağından kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan RT-qPCR analizleri, değişimin sadece protein seviyesinde değil, transkripsiyon düzeyinde de gerçekleştiğini göstermiştir. OGU1’de 3 kat artış gösteren *Abn2* (bir endo-1,5- α -L-arabinanaz) arabinan polimerlerinin içteki interior 1 \rightarrow 5 arabinozil bağlarını hidroliz eder. *abn2* geni hem σ H, hem de σ A-ya bağımlı promotordan transkribe edilir ve pleiotropik karbon katabolit regülatör proteini CcpR tarafından baskılanır (Blencke vd., 2003). OGU1’deki seviyesi 4.4 kat artmış bulunan *SacC*, *B. subtilis* tarafından üretilen ve fruktan degrade eden üç ayrı enzimden birisi olup (diğerleri intraselüler sukraz ve ekstraselüler levansükrazdır. Diğerlerinden farklı olarak, *SacC* levanaz inülini de hidroliz edebilir (Martin vd., 1987). *sacC* geni *B. subtilis*’de levanaz operonunda (*levD-levE-levF-levG-sacC*) yer alır ve σ L-ye bağımlı olarak transkribe edilir. Levanaz operonu için LevR pozitif, CcpA ise negatif transkripsiyonel regülatörlerdir (Martin-Verstraete vd., 1995; Débarbouillé vd., 1991). *Csn*, OGU1’de artış gösteren (5 kat) bir diğer hidrolitik enzim olup kitosan moleküllerini, yani 1,4- β -bağlı D-glukozamin polisakkaritlerini parçalayan kitosanaz enzimidir. *csn* promotörü σ A promotörlerine homoloji gösterir. *csn* regülatör bölgesi region CRE elementlerini

içermediğinden, bu genin ifadesinin katabolit represyonla düzenlenmediği düşünülmekte (Rivas vd., 2000), fakat durağan faza geçiş regülatörü AbrB proteini tarafından baskılandığı bilinmektedir (Chumsakul vd., 2010). 3-Phy nötral pH aralığında optimum biçimde çalışan bir alkalın fitaz enzimi olup is OGU1 sektotomunda 2.08 kat fazla miktarda bulunmakta olduğu bu çalışmamızda gösterilmiştir. Fitazlar, ana inositol kaynağı olarak inositol ve fosforun en önemli depo formunu içeren hububat tohumlarında ve legüm bitkilerinde mevcut fitatları (miyo-inositol heksakifosfat) hidroliz eder (Rao vd., 2008). Csn'de olduğu gibi, *phy* ekspresyonu da AbrB ile baskılanır (Chumsakul vd., 2010). LipA and LipB *B. subtilis* tarafından üretilen iki iki ekstraselüler lipazdır. Araştırmamızın ilk kısmını oluşturan proteom çalışmamızda bunlardan LipA (EstA) 'nın ana suşa kıyasla OGU1'de 3.67 misli fazla bulunduğu gösterilmiştir. Bu enzim, hem nitrofenol esterlerine, hem de triasilgliserollere aktivite gösterir (Lesuisse vd., 1993); standard koşullarda Sec yolağı ile, aşırı üretildiğinde ise Tat yolağı ile salgılanır (Kouwen vd., 2009). *lipA* geninin de vejetatif üreme boyunca AbrB global regülatörü tarafından baskılandığı bilinmektedir (Banse vd., 2008).

Basillopeptidaz F (BpF), *B. subtilis* tarafından salgılanan proteazlardan olup hem serin-proteaz, hem de esteraz aktivitelere sahiptir. OGU1'de 4.12 kat fazla bulunan bu protein, organizma tarafından üretilen diğer proteazlarla karşılaştırıldığında daha büyük bir kütleyle, 4.98 gibi asidik bir pI değerine, yüksek bir esterolitik/proteolitik değere ve geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir. (Mantsala ve Zalkin, 1980). *bpr* geni, promotor bölgesindeki doğrudan tekrarlarla bağlanan DegU tarafından pozitif biçimde kontrol edilir (Tsukahara ve Ogura 2008). DegU ise, önceki sitozolik proteom analizlerimizde OGU1'de 2.7 kat arttığı gösterilmiş bir iki-komponentli regülatör proteindir (sunulmuş makale).

Şimdiki çalışmamızda OGU1'de 3.13 kat fazla seviyede bulunduğu gösterilen bir diğer serin proteaz, Vpr (Kho et al. 2005), OGU1'de ana suşa göre 3.13 misli daha fazla bulunmuştur PhoP, fosfat açlığı durumunda Vpr'ın, σ^H 'e bağlı *vpr* transkripsiyonunu regüle eder (Allenby et al. 2005). Vpr ekspresyonunun, σ^H 'e bağlı genler için pek rastlanmayan biçimde CodY global regülatörü tarafından da düzenlendiği (Barbieri et al. 2015), aynı zamanda LexA (Au et al. 2005) ve DnaA (Smith and Grossman 2015) tarafından da kontrol edildiği gösterilmiştir.

OGU1'de 5.21 kat artış göstermiş bir diğer protein de şeker-spesifik olmayan YhcR, *B. subtilis* özelinde çok önemli ve Ca^{2+} ile aktive olan bir nükleazdır (Fasehee et al. 2011). Bu protein, hücre duvarına bağlanma ve sortaz tanıma motiflerine sahip olup sortaz (YhcS) için bir substrattır. *yhcR* and *yhcS* genleri aynı operonun üyeleri olup *yhcR*'nin stop kodonu *yhcS*'nin start kodonu ile örtüşmektedir (Oussenko et al. 2004). Bir YhcR paraloğu olan YfkN de, bir YhcS sortaz substratıdır. (Fasehee et al. 2011). YfkN seviyesinin OGU1'de PY79'a

kıyasla 6.98 misli arttığı bu çalışmamızda gösterilmiştir YfkN'nin, 2', 3' cyclic nükleotid fosfodiesteraz, 5' nükleotidaz ve 2' (veya 3') nükleotidaz aktivitelerine sahip bir protein olarak inorganik fosfat kazanımında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu proteinin, aynı organizmanın ürettiği subtilisin tarafından parçalandığı da rapor edilmişti (Chambert et al. 2003).

Regülasyon mekanizması iyi bilinen bir diğer önemli ekstrasellüler proteaz ise *vpr* geni tarafından kodlanan proteindir. CodY, LexA ve DnaA tarafından negatif olarak (Barbieri vd., 2015), PhoP tarafından ise pozitif olarak (Allenby vd., 2005) regüle edilen Vpr proteinin OGU1'deki ifade seviyesinin 3.13 kat arttığı sekretom analiziyle gösterilmiştir. Bu projemizde dönemde gerçekleştirilen RT-qPCR analizine göre, ilgili genin transkript seviyesindeki artış yaklaşık 2.5 kat olarak bulunmuştur.

Durağan faza geçiş sürecinde aktiviteleri en net biçimde 16. saatte görülebilecek pek çoğu regülatör proteinlerden (geçiş aşaması regülatörleri ve iki komponentli yanıt regülatörleri) oluşan kritik elemanların (YxbC, Yugi, LuxS, AlbE, CheV, IspA, ResD, OppD, GerE, DnaK, ve YceE) transkript seviyelerinde belirlenen değişimler de proteom bulguları ile büyük bir uyum içerisinde beklenen artış ve azalışları doğrudan göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada iki ayrı proteomik yöntemle elde edilmiş sekretom analizi bulgularımız, seçilen genler için QRT PCR analizleri ile de birlikte ele alınarak, dipeptid antibiyotik basilisin biyosentetik operonunun bloke edilmesi ile elde edilen basilisin-negatif mutant suşta etkilenen çok önemli yeni fonksiyonlara işaret etmiştir. Sekretom bulgularımız, daha önce tamamladığımız ve yorumunu yaptığımız sitozolik proteom çalışmamıza yeni hedefler göstermekle kalmamış Mutant suşta farklı ifade edilen proteinlerin transport ve metabolizma, genetik prosesler, yaşam biçimi, strese uyum, sporulasyon ve jermantasyon gibi fonksiyonel kategorilere ait olduğu gösterilerek, öne sürmüştüğümüz "basilisinin üretici organizmanın hücresel fizyolojisi üzerine pleiotropik etkileri" olduğu yönündeki hipotezimizi ileri seviyede desteklemiştir.

Şimdiki bulgularımızı takip edecek çalışmalarımız komplementasyon analizlerini içerecektir. *bac* operonunun OGU1'de klonlanması, ekspresyonu ile komplementasyonu bu projemiz özelinde teklif edilmemiş de olsa, klonlama ve ekspresyon projemiz boyunca laboratuvarımızda defalarca denenmiş, ancak muhtemelen operonun büyüklüğü veya sekonder yapı oluşumu nedeniyle bu deneyler pozitif bir sonuca ulaşamamıştır. Henüz denemediğimiz bir diğer rasyonel yaklaşım olarak, basilisinin kimyasal sentezi ve seçilecek

inkübasyon aralıklarında OGU1 kültürlerine dışarıdan ilavesinin ardından mikroarray'i temel alan karşılaştırmalı bir global transkriptom analizi planlanmaktadır.

Kaynaklar:

- Abhyankar, W., Beek, A. T., Dekker, H., Kort, R., Brul, S., and de Koster, C. G. (2011). Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. *Proteomics*, *11*(23), 4541-4550.
- Aebersold, R. and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, *422*(6928), 198-207.
- Allenby NE, O'Connor N, Prágai Z, Ward AC, Wipat A, Harwood CR (2005) Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 187:8063-8080.
- Antelmann, H., Darmon, E., Noone, D., Veening, J. W., Westers, H., Bron, S., Van Dijk, J. M. 2003. "The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions", *Molecular Microbiology*, *49*(1), 143-156.
- Antelmann, H., Scharf, C., Hecker, M. 2000. "Phosphate starvation inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis", *Journal of Bacteriology*, *182*, 4478-4490.
- Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijk, J. M., Hecker, M. 2001. "A proteomic view on genome-based signal peptide predictions", *Genome Research*, *11*(9), 1484-1502.
- Antelmann, H., Töwe, S., Albrecht, D., Hecker, M. 2007. "The Phosphorus Source Phytate Changes the Composition of the Cell Wall Proteome in *Bacillus subtilis*", *Journal of Proteome Research*, *6*(2), 897-903.
- Arocho, A., Chen, B., Ladanyi, M., & Pan, Q. (2006). Validation of the 2- $\Delta\Delta$ Ct calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagnostic Molecular Pathology*, *15*(1), 56-61.
- Atalla, A., and Schumann, W. (2003). "The *pst* operon of *Bacillus subtilis* is specifically induced by alkali stress". *Journal of Bacteriology*, *185*(16), 5019-5022.
- Au N, Kuester-Schoeck E, Mandava V, Bothwell LE, Canny SP, Chachu K, Colavito SA, Fuller SN, Groban ES, Hensley LA, O'Brien TC, Shah A, Tierney JT, Tomm LL, O'Gara TM, Goranov AI, Grossman AD, O'brien TC (2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol*. 187:7655-7666.
- Ball, M. S., & Karuso, P. (2007). Mass spectral compatibility of four proteomics stains. *Journal of Proteome Research*, *6*(11), 4313-4320.
- Banse AV, Chastanet A, Rahn-Lee L, Hobbs EC, Losick R (2008) Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* 105:15547-15552.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Danchin, A. 2009. "From a consortium sequence to a unified sequence: The *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later", *Microbiology*, *155*, 1758-1775.
- Barbieri, G., Albertini, A. M., Ferrari, E., Sonenshein, A. L., and Belitsky, B. R. 2016. "Interplay of CodY and ScoC in the regulation of major extracellular protease genes of *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, *198*(6), 907-920.
- Becher, D., Büttner, K., Moche, M., Heßling, B., Hecker, M. 2011. "From the genome sequence to the protein inventory of *Bacillus subtilis*", *Proteomics*, *11*(15), 2971-2980.
- Belitsky, B. R. and Sonenshein, A. L. 2013. "Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), 7026-7031.
- Bernhardt, J., Weibezahn, J., Scharf, C., Hecker, M., 2003. "*Bacillus subtilis* during feast and famine: Visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis", *Genome Research*, *13*, 224-237.
- Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, Mäder U, Hecker M, Stülke J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering*. 2003. *5*(2):133-49
- Brown, K. J., Formolo, C., Seol, H., Marathi, R. L., An, E., Pillai, D., Rood, B. R. 2012. "Advances in the proteomic investigation of the cell secretome". *Expert Review Proteomics*, *9*(3), 337-345.
- Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Völker U., Bremer, E. 2006. "Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*", *152*(3), 831-853.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, *34*(3), 597-601.

Büttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R., Mäder, U., Eymann, C., Hecker, M. 2001. "A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*", *Electrophoresis*, 22(14), 2908-2935.

Candela, T. and Fouet, A. 2006. "Poly-gamma-glutamate in bacteria". *Molecular Microbiology*, 60(5), 1091-1098.

Cao, M., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Wu, M. F. W., Paddon, C., and Helmann, J. D. 2002. "Defining the *Bacillus subtilis* σ W regulon: A comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches", *Journal of Molecular Biology*, 316(3), 443-457.

Casillas-Martinez, L., and P. Setlow. 1997. "Alkyl hydroperoxide reductase, catalase, MrgA, and superoxide dismutase are not involved in resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat or oxidizing agents", *Journal of Bacteriology*, 179, 7420-7425.

Chambert R, Pereira Y, Petit-Glatron MF (2003) Purification and characterization of YfkN, a trifunctional nucleotide phosphoesterase secreted by *Bacillus subtilis*. *J Biochem* 134:655-660.

Chen, L., James, L. P., and Helmann, J. D. 1993. "Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions", *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5428-5437.

Chi, B. K., Roberts, A. A., Huyen, T. T. T., Bäsel, K., Becher, D., Albrecht, D., ... and Antelmann, H. 2013. "S-bacillithiolation protects conserved and essential proteins against hypochlorite stress in firmicutes bacteria", *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(11), 1273-1295.

Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F., and Stefanini, S. 2004. "Iron and proteins for iron storage and detoxification". *Biometals*, 17(3), 197-202.

Chumsakul, O., Anantsri, D. P., Quirke, T., Oshima, T., Nakamura, K., Ishikawa, S., and Nakano, M. M. 2017. "Genome-Wide Analysis of ResD, NsrR, and Fur binding in *Bacillus subtilis* during anaerobic fermentative growth by in vivo footprinting", *Journal of Bacteriology*, 199(13), e00086-17.

Chumsakul, O., Takahashi, H., Oshima, T., Hishimoto, T., Kanaya, S., Ogasawara, N., and Ishikawa, S. 2010. "Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation", *Nucleic Acids Research*, 39(2), 414-428.

Dartois V, Débarbouillé M, Kunst F, Rapoport G. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 1998. 180(7):1855-61

Débarbouillé M, Martin-Verstraete I, Arnaud M, Klier A, Rapoport G. Positive and negative regulation controlling expression of the sac genes in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*. 1991. 142(7-8):757-64

Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K. H., and Jaeger, K. E. 2010. "Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6370-6376.

Demir, M. 2013. "Proteome-Wide Analysis Of The Role Of Expression Of Bacilysin Operon On Idiophase Physiology Of *B. subtilis*" Yüksek Lisans Tez, ODTÜ, ANKARA.

Domínguez-Cuevas, P., Porcelli, I., Daniel, R. A., and Errington, J. 2013. "Differentiated roles for MreB-actin isologues and autolytic enzymes in *Bacillus subtilis* morphogenesis", *Molecular Microbiology*, 89(6), 1084-1098.

Dragoš, A., Kovács, Á.T., Claessen, D. 2017. "The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria", *Biomolecules*, 7(3), 60.

Ebner, P., Prax, M., Nega, M., Koch, I., Dube, L., Yu, W., ... , Götz, F. 2015. "Excretion of cytoplasmic proteins (ECP) in *Staphylococcus aureus*". *Molecular Microbiology*, 97(4), 775-789.

Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S. T., Conlon, E. M., Rudner, D. Z., Wang, S. T., ... and Losick, R. 2004. "The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*", *PLoS Biology*, 2(10), e328.

Ellermeier, C. D., Hobbs, E. C., Gonzalez-Pastor, J. E., and Losick, R. 2006. "A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin", *Cell*, 124(3), 549-559.

Eymann, C., Dreisbach, A., Albrecht, D., Bernhardt, J., Becher, D., Gentner, S., Tam, L. T., Büttner, K., Buurman, G., Scharf, C., Venz, S., Völker, U., Hecker, M. 2004. "A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells". *Proteomics*, 4(10), 2849-2876.

Fasehee H, Westers H, Bolhuis A, Antelmann H, Hecker M, Quax WJ, Mirolohi AF, van Dijl JM, Ahmadian, G. (2011) Functional analysis of the sortase YhcS in *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 11:3905-3913.

Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 126-139.

- Fouet, A., Sonenshein, A. L. 1990. "A target for carbon source-dependent negative regulation of the *citB* promoter of *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 172(2), 835-844.
- Gao, H., Jiang, X., Pogliano, K., and Aronson, A. I. 2002. "The E1 β and E2 subunits of the *Bacillus subtilis* pyruvate dehydrogenase complex are involved in regulation of sporulation", *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2780-2788.
- Garti-levi, S., Eswara, A., Smith, Y., Fujita, M., Ben-Yehuda, S. 2013. "Novel modulators controlling entry into sporulation in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 195(7), 1475-1483.
- Gerth, U., Kock, H., Kusters, I., Michalik, S., Switzer, R. L., and Hecker, M. 2008. "Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 190(1), 321-331.
- Gilois, N., Ramarao, N., Bouillaut, L., Perchat, S., Aymerich, S., Nielsen-LeRoux, C., Gohar, M. 2007. "Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome", *Proteomics*, 7(10), 1719-1728.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M. J. 2004. "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics", *Proteomics*, 4(12), 3665-3685.
- Greenbaum, D., Luscombe, N. M., Jansen, R., Qian, J., Gerstein, M. 2001. "Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: oming in on function", *Genome Research*, 11(9), 1463.
- Griebel, A., Obermaier, C., Westermeier, R., Moche, M., Büttner, K. (2013). Simplification and Improvement of protein detection in two-dimensional electrophoresis gels with SERVA HPE™ Lightning Red. *Archives of physiology and biochemistry*, 119(3), 94-99.
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M., and Sato, T. 2006. "Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD⁺ ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7062-7071.
- Hamon, M. A., Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D., and Lazazzera, B. A. 2004. "Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*". *Molecular Microbiology*, 52(3), 847-860.
- Hecker, M., Reder, A., Fuchs, S., Pagels, M., and Engelmann, S. (2009) Physiological proteomics and stress/starvation responses in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol* 160(4):245-258.
- Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. Yamane, K. 2000. "Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study", *Microbiology*, 146, 65-75.
- Hoch, J. A. (2017). A life in *Bacillus subtilis* signal transduction. *Annual review of microbiology*, 71, 1-19.
- Höper, D., Bernhardt, J. Hecker, M. 2006. "Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: A physiological proteomics approach", *Proteomics*, 6, 1550-1562.
- Hosoya, S., Lu, Z., Ozaki, Y., Takeuchi, M., and Sato, T. 2007. "Cytological analysis of the mother cell death process during sporulation in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2561-2565.
- Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Ochi, K. 2003. "Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP cooperatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*". *Journal of Biology and Chemistry*. 278, 2169-2176.
- Inaoka, T., Wang, G., & Ochi, K. (2009). ScoC regulates bacilysin production at the transcription level in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7367-7371.
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O., & Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of microbiological methods*, 75(2), 318-324.
- Jamroskovic, J., Chromikova, Z., List, C., Bartova, B., Barak, I., and Bernier-Latmani, R. (2016). Variability in DPA and Calcium Content in the Spores of *Clostridium* Species. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., and Saxild, H. H. 2002. "Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions", *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 197-200.
- Jongbloed, J. D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., and Van Dijl, J. M. 2004. "Two minimal Tat translocases in *Bacillus*". *Molecular Microbiology*, 54(5), 1319-1325.
- Kaan, T., Homuth, G., Mäder, U., Bandow, J., and Schweder, T. 2002. "Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response", *Microbiology*, 148(11), 3441-3455.
- Kaffarnik, F. A., Jones, A. M., Rathjen, J. P., and Peck, S. C. 2009. "Effector proteins of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* alter the extracellular proteome of the host plant, *Arabidopsis thaliana*", *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(1), 145-156.

- Kanamaru, K., Stephenson, S., and Perego, M. 2002. "Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 184(1), 43-50.
- Kang, M. S., Kim, S. R., Kwack, P., Lim, B. K., Ahn, S. W., Rho, Y. M., ... and Chung, C. H. (2003). Molecular architecture of the ATP-dependent CodWX protease having an N-terminal serine active site. *The EMBO journal*, 22(12), 2893-2902.
- Karatas, A.Y., Cetin, S. and Ozcengiz, G. (2003). The effects of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *srfA*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1626(1), 51-56.
- Kenig, M. ve Abraham, E.P. 1976. "Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin", *Journal of General Microbiology*, 94, 37-45.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., ... and Cosgrove, D. J. 2008. "Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16876-16881.
- Kho CW, Park SG, Cho S, Lee DH, Myung PK, Park BC (2005) Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 39:1-7.
- Kim, D., Yu, B. J., Kim, J., Lee, Y. J., Choi, S. G., Kang, S., and Pan, J. G. (2013). "The acetylproteome of gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*", *Proteomics*, 13(10-11), 1726-1736.
- Kim, Y., Edwards, N., and Fenselau, C. 2016. "Extracellular vesicle proteomes reflect developmental phases of *Bacillus subtilis*", *Clinical Proteomics*, 13(1), 6.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8(6), 257-260.
- Kobayashi, K. (2007). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 66(2), 395-409.
- Kontinen, V. P., Sarvas, M. 1993. "The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion". *Molecular Microbiology*, 8(4), 727-737.
- Köroğlu, T., Öğülür, I., Mutlu, S., Yazgan-Karataş, A., Ozcengiz, G. 2011. "Global regulatory systems operating in bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 144-155.
- Kouwen TR, van der Ploeg R, Antelmann H, Hecker M, Homuth G, Mäder U, van Dijl JM (2009) Overflow of a hyper-produced secretory protein from the *Bacillus* Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics. *Proteomics* 9:1018-1032.
- Krishnappa, L., Dreisbach, A., Otto, A., Goosens, V. J., Cranenburgh, R. M., Harwood, C. R., ..., van Dijl, J. M. 2013. "Extracytoplasmic proteases determining the cleavage and release of secreted proteins, lipoproteins, and membrane proteins in *Bacillus subtilis*". *Journal of Proteome Research*, 12(9), 4101-4110.
- Krishnappa, L., Monteferrante, C. G., Neef, J., Dreisbach, A., and van Dijl, J. M. 2014. "Degradation of extracytoplasmic catalysts for protein folding in *Bacillus subtilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1463-1468.
- Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. 2014. "Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells", *Nature Methods*, 11(3), 319-324.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V. 1997. "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*", *Nature*, 390, 249-256.
- Lai, E. M., Phadke, N. D., Kachman, M. T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J. A., ... and Driks, A. 2003. "Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*", *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1443-1454.
- Lamsa, A., Liu, W. T., Dorrestein, P. C., and Pogliano, K. 2012. "The *Bacillus subtilis* cannibalism toxin SDP collapses the proton motive force and induces autolysis". *Molecular Microbiology*, 84(3), 486-500.
- Larralde, R., Robertson, M. P., & Miller, S. L. (1995). Rates of decomposition of ribose and other sugars: implications for chemical evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8158-8160.
- Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., ... , Gho, Y. S. 2009. "Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus* derived membrane vesicles", *Proteomics*, 9(24), 5425-5436.
- Lesuisse E, Schanck K, Colson, C (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* 216: 155-160.

- Litzinger, S., Duckworth, A., Nitzsche, K., Risinger, C., Wittmann, V., and Mayer, C. 2010. "Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase", *Journal of Bacteriology*, 192(12), 3132-3143.
- Luo, Y., and Helmann, J. D. 2012. "Analysis of the role of *Bacillus subtilis* σ M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis", *Molecular Microbiology*, 83(3), 623-639.
- Mahlstedt SA, Fielding EN, Moore BS, Walsh CT. Prephenate decarboxylases: a new prephenate-utilizing enzyme family that performs nonaromatizing decarboxylation en route to diverse secondary metabolites. *Biochemistry* 2010; 49:9021–3.
- Mahlstedt SA, Walsh CT. Investigation of anticapsin biosynthesis reveals a four-enzyme pathway to tetrahydrotyrosine in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 2010;49:912–23.
- Mäkelä, M. R., Hildén, K., and Lundell, T. K. 2010. "Oxalate decarboxylase: biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 801-814.
- Mäntsälä P, Zalkin H (1980) Extracellular and membrane-bound proteases from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 141:493-501.
- Mariappan, A., Makarewicz, O., Chen, X. H., Borriss, R. 2012. "Two-component response regulator DegU controls the expression of bacilysin in plant-growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 114-125.
- Martin I, Débarbouillé M, Ferrari E, Klier A, Rapoport G (1987) Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Mol Gen Genet* 208:177-184
- Martin-Verstraete I, Stülke J, Klier A, Rapoport G (1995) Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* 177:6919-692
- Marvasi, M., Visscher, P. T., and Casillas Martinez, L. 2010. "Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis", *FEMS Microbiology Letters*, 313(1), 1-9.
- Mashburn-Warren, L. M., & Whiteley, M. 2006. "Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes", *Molecular Microbiology*, 61(4), 839-846.
- Miethke, M., Monteferrante, C. G., Marahiel, M. A., and van Dijl, J. M. 2013. "The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(10), 2267-2278.
- Mirel, D. B., Estacio, W. F., Mathieu, M., Olmsted, E., Ramirez, J. and Marquez-Magana, L. M. 2000. "Environmental regulation of *Bacillus subtilis* sigma(D)-dependent gene expression", *Journal of bacteriology*, 182(11), 3055-3062
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. and Sonenshein, A.L. 2003. "Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis", *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1911-1922.
- Möller, M. C. and Hederstedt, L. 2008. "Extracytoplasmic processes impaired by inactivation of *trxA* (thioredoxin gene) in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4660-4665.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M. Homuth, G. 2004. "Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress", *Microbiology*, 150, 497-512.
- Nagler, K., Krawczyk, A. O., De Jong, A., Madela, K., Hoffmann, T., Laue, M., ... and Moeller, R. (2016). Identification of differentially expressed genes during *Bacillus subtilis* spore outgrowth in high-salinity environments using RNA sequencing. *Frontiers in microbiology*, 7
- Nakano, M. M. and Zuber, P. 1990. "Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*". *Critical Reviews in Biotechnology*. 10(3), 223-240.
- Nel, A. J., Garnett, S., Blackburn, J. M., and Soares, N. C. (2015). Comparative reevaluation of FASP and enhanced FASP methods by LC-MS/MS. *Journal of proteome research*, 14(3), 1637-1642.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube D, Ehrhardt W. 1988. "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250", *Electrophoresis* 9, 255-62.
- Newton GGF. Antibiotics from a strain of *B. subtilis*: bacilipin A and bacilipin-B and bacilysin. *Br J Exp Pathol* 1949;30:306–19.
- Nguyen, H. B. T. and Schumann, W. 2012. "The sporulation control gene *spo0M* of *Bacillus subtilis* is a target of the FtsH metalloprotease", *Research in Microbiology*, 163(2), 114-118.
- Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., ... and Becher, D. 2012. "Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*", *Science*, 335(6072), 1103-1106.

- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- Orsburn, B. C., Melville, S. B., and Popham, D. L. 2010. "EtfA catalyses the formation of dipicolinic acid in *Clostridium perfringens*", *Molecular Microbiology*, 75(1), 178-186.
- Oussenko IA, Sanchez R, Bechhofer DH (2004) *Bacillus subtilis* YhcR, a high-molecular-weight, nonspecific endonuclease with a unique domain structure. *J Bacteriol* 186:5376-5383.
- Özcengiz, G. ve Alaeddinoglu, N. G. 1991. "Bacilysin production by *Bacillus subtilis*: effects of bacilysin, pH and temperature", *Folia Microbiologica*, 36, 522-526.
- Özcengiz, G., Alaeddinoglu, N. G., Demain, A. L. 1990. "Regulation of biosynthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis*", *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 91-100.
- Özcengiz, G., ve Öğülür, İ. 2015. "Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic", *New Biotechnology*, 32(6), 612-619.
- Parker JB, Walsh CT. Action and timing of BacC and BacD in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. *Biochemistry (NY)* 2013; 52:889–901.
- Parker JB, Walsh CT. Olefin isomerization regiochemistries during tandem action of BacA and BacB on prephenate in bacilysin biosynthesis. *Biochemistry* 2012;51:3241–51.
- Parker JB, Walsh CT. Stereochemical outcome at four stereogenic centers during conversion of prephenate to tetrahydrotyrosine by BacABGF in the bacilysin pathway. *Biochemistry* 2012;51:5622–32.
- Pereira, Y., Petit-Glatron, M. F., and Chambert, R. 2001. "yveB, encoding endolevanase LevB, is part of the sacB–yveB–yveA levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*", *Microbiology*, 147(12), 3413-3419.
- Perry, D. ve Abraham, E. P. 1979. "Transport and metabolism of bacilysin and other peptides by suspensions of *Staphylococcus aureus*", *Journal of General Microbiology*, 115, 213-221
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., and Hecker, M. 2001. "Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5617-5631.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaffl, M. W. (2012). Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction. *Quantitative real-time PCR. Appl Microbiol*, 53-62.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
- Provvedi, R., Chen, I., and Dubnau, D. 2001. "NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*", *Molecular Microbiology*, 40(3), 634-644.
- Que, Q. and Helmann, J. D. 2000. "Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins", *Molecular Microbiology*, 35(6), 1454-1468.
- Rajavel M, Gopal B. Analysis of multiple crystal forms of *Bacillus subtilis* BacB suggests a role for a metal ion as a nucleant for crystallization. *Acta Crystallogr D* 2010;66:635–9.
- Rajavel M, Mitra A, Gopal B. Role of *Bacillus subtilis* BacB in the synthesis of bacilysin. *J Biol Chem* 2009;284:31882–92.
- Rajavel M, Perinbam K, Gopal B. Structural insights into the role of *Bacillus subtilis* YwfH (BacG) in tetrahydrotyrosine synthesis. *Acta Crystallogr D* 2013;69:324–32.
- Ramagli, L. S. ve Rodrigez, L. V. 1985. "Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer", *Electrophoresis*, 6, 559-563.
- Rao DECS, Rao KV, Reddy VD (2008) Cloning and expression of *Bacillus* phytase gene (phy) in *Escherichia coli* and recovery of active enzyme from the inclusion bodies. *J Appl Microbiol* 105:1128-1137
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71.
- Reder, A., Höper, D., Gerth, U., and Hecker, M. 2012. "The contribution of individual σB-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*, JB-00528.

- Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Härtig, E. 2006. "The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1103-1112.
- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier Jr, M. H., and Stülke, J. 1999. "Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis—the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*", *Microbiology*, 145(12), 3419-3429.
- Richardson, D. J., Berks, B. C., Russell, D. A., Spiro, S., and Taylor, C. J. 2001. "Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases", *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(2), 165-178.
- Rivas LA, Parro V, Moreno-Paz M, Mellado RP (2000) The *Bacillus subtilis* 168 csn gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiol* 146:2929-2936
- Rogers HJ, Lomakina N, Abraham EP. Observations on the structure of bacilylsin. *Biochem J* 1965;97:579–86.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37(6), e45-e45.
- Sakajoh, M., Solomon, N. A., Demain, A. L. 1987. "Cell-free synthesis of the dipeptide antibiotic bacilylsin", *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 201-208.
- Salzberg LI, Botella E, Hokamp K, Antelmann H, Maaß S, Becher D, Noone D, Devine KM. Genome-wide analysis of phosphorylated PhoP binding to chromosomal DNA reveals several novel features of the PhoPR-mediated phosphate limitation response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2015. 197(8):1492-506.
- Sansinenea, E., and Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33(8), 1523-1538.
- Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., and Hecker, M. 1998. "Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1869-1877.
- Schirner, K. and Errington, J. 2009. "The cell wall regulator σ I specifically suppresses the lethal phenotype of *mbi* mutants in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1404-1413.
- Schroeder, J. W., & Simmons, L. A. (2013). Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain PY79. *Genome announcements*, 1(6), e01085-13.
- Serizawa M, Kodama K, Yamamoto H, Kobayashi K, Ogasawara N, Sekiguchi J. Functional analysis of the YvrGHb two-component system of *Bacillus subtilis*: identification of the regulated genes by DNA microarray and northern blot analyses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2005. 69(11):2155-69.
- Seydlová, G., Halada, P., Fišer, R., Toman, O., Ulrych, A., and Svobodová, J. 2012. "DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress", *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 765-774.
- Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15(4), 532-535.
- Smith JL, Grossman, AD (2015) In vitro whole genome DNA binding analysis of the bacterial replication initiator and transcription factor DnaA. *PLoS Genet*. 11: e1005258.
- Solomon, J. M. ve Grossman, A. D. 1996. "Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria", *Trends in Genetics*, 12, 150-155.
- Stein, T. 2005. "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses, and specific functions", *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.
- Steinborn, G., Hajirezaei, M. R., Hofemeister, J. 2005. "bac genes for recombinant bacilylsin and anticapsin production in *Bacillus* host strains", *Archives of Microbiology*, 183, 71-79.
- Strauch, M. A., Bobay, B. G., Cavanagh, J., Yao, F., Wilson, A., and Le Breton, Y. 2007. "Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression". *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7720-7732.
- Tam, L. T., Antelmann, H., Eymann, C., Albrecht, D. Bernhardt, J., Hecker, M. 2006. "Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach", *Proteomics*, 6, 4565-4585.
- Tanovic, A., Samel, S. A., Essen, L. O., and Marahiel, M. A. 2008. "Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase", *Science*, 3215889, 659-663.
- Taşkın, A. 2010. "*Proteome-wide analysis of the functional roles of bacilylsin biosynthesis in Bacillus subtilis*", Yüksek Lisans Tez, ODTÜ, ANKARA.

- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G. 2004. "Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 207-33.
- Töwe, S., Leelakriangsak, M., Kobayashi, K., Duy, N.V., Hecker, M., Zuber, P., and Antelmann, H. 2007. "The MarR-type repressor MhqR (YkvE) regulates multiple dioxygenases/glyoxalases and an azoreductase which confer resistance to 2-methylhydroquinone and catechol in *Bacillus subtilis*", *Molecular Microbiology*, 65: 40–54.
- Tsukahara K, Ogura M (2008) Characterization of DegU-dependent expression of bpr in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*. 280:8-13.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- Van Der Ploeg, R., Mäder, U., Homuth, G., Schaffer, M., Denham, E. L., Monteferrante, C. G., ... and Hecker, M. (2011). Environmental salinity determines the specificity and need for Tat-dependent secretion of the YwbN protein in *Bacillus subtilis*. *PLoS One*, 6(3), e18140.
- van Dijl, J., & Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory.
- Van, Dijl, J. M., Braun, P. G., Robinson, C., Quax, W. J., Antelmann, H., Hecker, M., Jongbloed, J. D. H. 2002. "Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion", *Journal of Biotechnology*, 98(2-3), 243-254.
- Vega-Cabrera, L. A., Guerrero, A., Rodríguez-Mejía, J. L., Tabche, M. L., Wood, C. D., Gutiérrez-Rios, R. M., ... and Pardo-López, L. 2017. "Analysis of Spo0M function in *Bacillus subtilis*", *PLoS One*, 12(2), e0172737.
- Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., ... and Kontinen, V. P. 2004. "Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*", *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19302-19311.
- Voigt, B., Antelmann, H., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Maurer, K. H., Evers, S., ... and Hecker, M. 2009. "Cell physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2), 53-68.
- Voigt, B., Schweder, T., Sibbald, M. J. B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Bernhardt, J., Feesche J., Maurer K. H., Gottschalk, G., Van Dijl J. M., Hecker, M. 2006. "The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions", *Proteomics*, 6(1), 268-281.
- Wahlström, E., Vitikainen, M., Kontinen, V. P., and Sarvas, M. 2003. "The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*", *Microbiology*, 149(3), 569-577.
- Walker, J. E. ve Abraham, E. P. 1970. "The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*", *Biochemistry Journal* 118, 563-570.
- Walton, R. B., Rickes, E. L. 1962. "Reversal of the antibiotic, bacillin, by N-acetylglucosamine", *Journal of Bacteriology*, 84, 1148-1151.
- Wenzel, M., Chiriack, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., ... and Erdmann, R. 2014. "Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 1409-1418.
- Wenzel, M., Kohl, B., Münch, D., Raatschen, N., Albada, H. B., Hamoen, L., ... and Bandow, J. E. 2012. "Proteomic response of *Bacillus subtilis* to antibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5749-5757.
- Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., DeAngelis, P. L., Weigel, P. H., Brown S. 2005. "Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3747-3752.
- Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., and Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 428(6980), 281.
- Wipat, A. ve Harwood, C. R. 1999. "The *Bacillus subtilis* genome sequence: The molecular blueprint of a soil bacterium", *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1), 1-9.
- Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. 2009. "Universal sample preparation method for proteome analysis", *Nature methods*, 6(5), 359.
- Yamane, K., Bunai, K., Kakeshita, H. 2004. "Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(10), 2007-2023.
- Yang, C. K., Zhang, X. Z., Lu, C. D., Tai, P. C. 2014. "An internal hydrophobic helical domain of *Bacillus subtilis* enolase is essential but not sufficient as a non-cleavable signal for its secretion", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 901-905.

Yang, C.-K., Ewis, H. E., Zhang, X., Lu, C.-D., Hu, H.-J., Pan, Y., Tai, P. C. 2011. "Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis", *Journal of Bacteriology*, 193(20), 5607-15.

Yazgan, A., Özcengiz, G. Marahiel, M. H. 2001. "Tn 10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin", *Biochimica et Biophysica Acta* 1518:87-94.

Ye, W. R., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. 2000. "Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions", *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4458-4465.

Yoshida, K. I., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y. H., Nakaura, Y., and Fujita, Y. 2003. "Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box", *Molecular Microbiology*, 49(1), 157-165.

Zawadzka, A. M., Kim, Y., Maltseva, N., Nichiporuk, R., Fan, Y., Joachimiak, A., & Raymond, K. N. 2009. "Characterization of a *Bacillus subtilis* transporter for petrobactin, an anthrax stealth siderophore", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21854-21859.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. GÜLAY ÖZCENGİZ
Proje No:	116Z351
Proje Başlığı:	Bacillus Subtilis Standart Suş (Py79) ile Basilisinin Bloke Edildiği Suşun (Ogu1) Karşılaştırmalı Dinamik Sekretom Analizi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	18
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. BIYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ BIYOTEKNOLOJİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/02/2017 - 15/08/2018
Onaylanan Bütçe:	459449.0
Harcanan Bütçe:	403627.39
Öz:	<p>Bacillus türleri, antimetabolik ve farmakolojik aktiviteye sahip çok çeşitli ikincil metabolitler üretmektedir. B. subtilis'e ait biyoaktif peptidlerin etkilerinin sadece antimikrobiyal aktivite ile sınırlı olmadığı bilinmektedir. B. subtilis tarafından üretilen basilisın, N-terminalinde L-alanine and C-terminalinde non-proteinojenik bir amino asit olan L-anticapsin'den oluşan dipeptid yapısı ile bilinen en küçük antibiyotiktir. Basilisın biyosentezinin dinamikleri ve moleküler regülasyonu ile ilgili literatür bilgilerinin çoğu grubumuz tarafından rapor edilmiştir.</p> <p>Biyosentezin hücre yoğunluğu sinyali global kontrol mekanizmasının bir parçası olduğu, transpozon mutajenez kütüphanesinin taranmasıyla gen düzeyinde anlaşılmış ve bu [Spo0K (Opp)]'ye dayalı regülasyon ağı içerisinde ComQ/ComX, PhrC (CSF), Comp/ComA elementleri ve transkripsiyon faktörler ComA, Spo0A, AbrB ve CodY'nin bac operonu üzerine etkileri, transkripsiyonal füzyon ve EMSA analizleri ile tarafımızca doğrulanmıştır. Önceki araştırmalarımızda basilisın üreticisi standart suş PY79 ve bunun basilisın operonunu bloke ederek oluşturduğumuz derivatifi OGU1'a ait sitozolik proteomların oldukça detaylı bir analizi yapılmıştır.</p> <p>Bu çalışmada, jele dayalı ve jelden bağımsız iki ayrı yaklaşım kullanılarak sekretom analizi ve bu suretle ulaşılabilen proteinlerin sayısının artırılmasıyla B. subtilis'de basilisın üretimi yokluğunda ortaya çıkan sekretom değişimlerinin zaman ve mekan olarak dinamik bir analizi amaçlanmıştır. Kültivasyonun 12., 16. ve 24. saatlerinde mevcut sekretom bileşenleri tanımlanmış ve PY79 ve basilisın üretemeyen türevi OGU1 arasında farklılık gösteren proteinler ve seviyeleri nicel olarak belirlenmiştir. LC-MS/MS analizlerinde toplam 2075 protein tanımlanabilmiştir. Tanımlanabilen proteinlerin 166'sının iki suş arasında farklı ifade edilen proteinler olduğu gösterilmiştir. Beklenildiği üzere, 2DE MALDI TOF/MS yaklaşımı ile elde edilen protein sayıları çok daha düşük olmuşsa da, sonuçlar LC-MS/MS analiz bulguları ile uyumludur. Yine seçilen genler özelinde gerçekleştirilen qRT PCR çalışmaları da proteomik bulguları çok büyük ölçüde desteklemiştir. Bütününü ele alındığında, OGU1'de farklı ifade edilen proteinlerin transport ve metabolizma, genetik prosesler, yaşam biçimi, strese uyum, sporulasyon ve jerminasyon gibi fonksiyonel kategorilere ait olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız, basilisın yokluğunda sekretom kompozisyonundaki değişimlerin kapsamlı biçimde anlaşılmasını ve bu değişimlerde basilisın operonunun muhtemel rolünün değerlendirilmesi gerekliliğine işaret etmiş olup mevcut bulguların daha ileri fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi hedeflenmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Bacillus subtilis, basilisın, proteom, sekretom, LC-MS/MS, 2DE MALDI TOF/MS, qRT PCR
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Dynamic comparative secretome analysis of Bacillus subtilis PY79 and its bacilisın blocked mutant (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),