



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**WILLIAMSİA MARIANENSİS KAYNAKLI
KOLESTEROL OKSİDAZIN E. COLİ'DE
HETEROLOG İFADESİ**

ALAA KADHİM SHAREEF

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2022



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**WILLIAMSİA MARIANENSİS KAYNAKLI
KOLESTEROL OKSİDAZİN E. COLİ'DE
HETEROLOG İFADESİ**

ALAA KADHİM SHAREEF

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Belgin ERDEM

İKİNCİL DANIŞMAN

Assistant Prof. Ahmed Jasim NEAMAH

KIRŞEHİR / 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

ALAA KADHIM SHAREEF



20.07.2022 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans ders ve tez sürecimde sürekli desteği, sabrı, motivasyonu için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belgin ERDEM'e büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışmasında eş danışmanım olan Al-Qadisiyah Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'inde öğretim üyesi Sayın Assistant Prof. Ahmed Jasim NEAMAH 'a araştırmam boyunca değerli yorumları ve desteği için teşekkür ederim. Bunun yanı sıra tüm üniversite hocalarıma iki yıllık üniversite hayatım boyunca bilgi birikimlerini benimle paylaşarak gelecekteki akademik çalışmalarına katkı sağladıkları için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca varlığı ile gücünü hissettiğim ve beni yetiştiren, geliştiren ülkeme, IRAK Devleti'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak bu tezi araştırma ve yazma sürecim boyunca bana sürekli destek ve teşvik sağlayan aileme çok derin şükranlarımı sunarım.

Aralık, 2022

ALAA KADHIM SHAREEF

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	2
1.2. Çalışmanın Önemi	2
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. <i>Williamsia</i> spp.'nin Karakterizasyonu.....	3
2.2. <i>Williamsia</i> 'nın Tanımlanması	3
2.3. Kolesterol Oksidaz.....	4
2.4. Kolesterol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Membran Etkileri.....	8
2.5. Kolesterol Oksidaz Kaynakları	9
2.6. Kolesterol Oksidaz Membran Etkileşimleri.....	10
2.7. Enzim Substrat Özgüllüğü	12
2.8. Biyokatalizde Kolesterol Oksidaz Kullanımı	12
2.9. Kolesterol Oksidazın Klinik Kullanımları	12
2.10. Virülansta Kolesterol Oksidaz	14
2.11. Antifungal Sensör Olarak Kolesterol Oksidaz	14
2.12. Moleküler Klonlama	14
2.13. Plazmidler.....	16
2.14. pET-28a (+) Vektörü.....	17
2.15. BL21 (DE3) Rosetta Dönüşümü	17

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal	18
3.1.1. Ekipman ve Cihazlar	18
3.1.2. Kimyasal Malzemeler.....	20
3.1.3. Kitler.....	21
3.1.4. Besiyerleri.....	21
3.1.5. Bakteriyel Şuşlar ve Vektörler	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kolesterol Oksidaz Deneyi.....	22
3.2.2. Sterilizasyon Yöntemleri.....	23
3.2.3. Kimyasal Çözeltiler	24
3.2.4. Kimyasal Tamponlar	24
3.2.5. Primer Hazırlama ve Saklama.....	24
3.2.6. Protein Saflaştırma Tamponları ve Çözeltiler	24
3.2.7. Besiyeri Ortamının Hazırlanması	25
3.2.8. <i>E. coli</i> BL21' nin Çeşitli Metal İyon Ortamlarında Üretilmesi <i>W. marianensis</i> Suşu DSM 44944'ten Kolesterol Oksidaz Kodlayan.....	25
3.2.9. Genin Klonlanması	25
3.2.10. Elde Edilen Agaroz Jelden Gen Örneğinin Saflaştırılması.....	25
3.3.0. pET-28a (+)/Cox-william'ın <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerine Dönüştürülmesi	26
3.3.1. PCR Termo Döngü Koşulları	27
3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.3.3. Hücre Hasadı ve Bozulması	29
3.3.4. Cox-william Proteininin Saflaştırılması	29
3.3.5. Agaroz Jelden Gen Örneğinin Saflaştırılması	30
3.3.6. Rekombinant Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32
3.3.7. Cox-William Aktivitesinin Belirlenmesi ve Protein Tayini	32
4.BULGULAR.....	34
4.1. Kolesterol Oksidaz Deneyi	34
4.2. pET-28a (+)/Cox-William Yapısının Dizisi	35
4.3. MluI ve XhoI ile pET-28a (+)/Cox-william Yapısının Çift Kısıtlamalı Sindirim Modeli.....	40
4.4. Cox Protein Dizisinde Sinyal Peptidinin Varlığının Tespiti	40

4.5. SDS-PAGE Prokaryotik sistemde heterolog ifadenin analizi ve pET-28a (+)/Cox-william Yapısının Saflaştırılması.....	52
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR.....	57
EKLER	69
ÖZGEÇMİŞ	71



ŞEKİL LİSTESİ

	Page No
Şekil 1. Kolesterol Oksidazın Oksidasyon ve İzomerizasyon Reaksiyon Şeması	7
Şekil 2. Sınıf I COX	8
Şekil 3. <i>Brevibacterium sterolicum</i> Kaynaklı Sınıf II Kolesterol Oksidaz	8
Şekil 4. Aktif Bölge Döngüsünü Aydınlatan COX'in Üç Boyutlu Yapısı	11
Şekil 5. Termal Cycler Cihazı	20
Şekil 6. Termal Cycler Cihazı	20
Şekil 7. Kolesterol Oksidazın Bir Substrat Olarak Kolesterol Üzerindeki Etkisinin mekanizması.....	23
Şekil 8. <i>W. marianensis</i> Suşu DSM 44944'ün Kolesterol Oksidaz Geninin Aktarılma Yöntemini Gösteren pET-28a (+) Haritası.....	27
Şekil 9. Sığır Serum Albümin Konsantrasyonunun Standart Eğrisi	33
Şekil 10. COX -Willimansia Gen Amplifikasyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi	35
Şekil 11. Snap Gene Yazılımı Tarafından Oluşturulan, Gen Script Co. Tarafından Sentezlenen Rekombinant Yapı pET-28a (+)/Cox-william'ın Haritası.	39
Şekil 12. pET-28a (+)/Cox-william'ın MluI ve XhoI ile Kısıtlama Sindirimi Modelinin Agaroz Jel Elektrofrezisi (%1).	40
Şekil 13. Protein Dizisi ID: PVY31316.1'de Sinyal Peptid Varlığının Tespiti	41
Şekil 14. <i>W. marienesis</i> 'in Kolesterol Oksidaz Protein Dizisinin Üç Boyutlu Yapısı (Protein ID: PVY31316.1)	41
Şekil 15. PVY31316.1'in (<i>W. marienesis</i> 'ten Kolesterol Oksidaz) Transmembran Bölgesinin Saptanması	42
Şekil 16. <i>W. marianensis</i> 'in Kolesterol Oksidazı (Protein ID: PVY31316.1) ve Diğer Türlerden Diğer Kolesterol Oksidazlar Arasındaki Genetik İlişkiyi Gösteren CLC Dizisinin Filogenetik Ağacı.	43
Şekil 17. M: protein Markerı Gösteren SDS-PAGE (%10)	53

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Table 1. Bu Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler ile Firmalar ve Ülke	19
Table 2. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ile Firmalar ve Ülke	21
Table 3. Bu Çalışmada Kullanılan Tüm Kitler	21
Table 4. Bu Çalışmada Kullanılan Kültür Besiyerleri	22
Table 5. PCR reaksiyon Karışımı Hacimlerinin Protokolü	28
Table 6. Kolesterol Oksidaz Geninin Tespiti İçin PCR Isıl Döngü Koşulları Programları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Table 7. COX -Williamsia Genlerinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primer Dizileri	29

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
LB	: Luria- Bertani
IPTG	: İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit Isopropyl
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Mg/ml	: Miligram /Mililitre
g	: Gram
mM	: Mikromol
mL	: Mirkolitre
mM	: Millimol
mL	: Mililitre
H	: Saat
°C	: Santigrat derece
DW	: Distile water
Kda	: Kilodalton
bp	: Baz çift
NaCl	: Sodyum klorit
OD	: Optik yoğunluk
PDB	: Protein Veri Bankası
IMAC	: İmmobilize Metal Afinite kromatografisi
W/v	: Ağırlık/Hacim
v/v	: Hacim/hacim
UV	: Ultraviyole
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
MgCL₂	: Magnezyum klorür
DNA	: Deoksiribonükleik asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

WILLIAMSIA MARIANENSIS KAYNAKLI KOLESTEROL OKSİDAZIN E. COLI'DE HETEROLOG İFADESİ

ALAA KADHIM SHAREEF

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Belgin ERDEM

II. Danışman: Assist. Prof. Ahmed Jasim NEAMAH

En yaygın tedavi protokollerinin sınırlamaları ve sakıncaları vardır. Bu nedenle, etkili tedaviler bulmak birçok araştırmacının amacıdır. Terapötik peptitler, proteinler ve antikolar dahil olmak üzere geleneksel farmasötiklere göre çok sayıda fayda sunan umut verici bir ilaç sınıfıdır. *Williamsia marianensis*'ten üretilen Kolesterol oksidaz'ın terapötik faydaları olduğu gösterilmiştir. Yanık ve kulak örnekleri, yara sürüntüleri, balgam ve idrar örnekleri önceden tanımlanmış izolatların geleneksel biyokimyasal tahlillerle tanımlandığını doğrulamak için alındı. Bu çalışmada, bir ekspresyon vektörüne (pET28b) özgü primerler ile PCR kullanarak kolesterol oksidaz genini klonlayabildik ve IPTG ile tanımladıktan sonra bunu *E. coli* (BL-21/DE3) Rosetta'da eksprese edildi. Gyncholesterol oksidaz (~500 bp), bir cox dizisi sağlamak üzere dizilendi ve Genscript Corporation, ABD tarafından sentez için gönderildi. Çift kısıtlı bir sindirim modeli gösterildi. pET-28a(+) cox-william elde edilen desen iki şeritten oluşmaktadır: bunlardan biri bir taşıyıcı plazmit (4200 bp) idi ve 2800 baz çiftinden oluşan bir iplik, kolesterol oksidaz genini taşıyordu. Sonuç olarak, kolesterol oksidaz geni başarıyla klonlandı ve eksprese edildi. *Williamsia marianensis*'ten üretilen kolesterol oksidaz, gelecekteki terapötik sonuçlarda kullanılacaktır.

Aralık 2022, 72 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Kolesterol oksidaz, Moleküler klonlama, Siliko dizi analizi, Heterolog ifade, *Williamsia marianensis*

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF WILLIAMSONIA MARIANENSIS INDUCED CHOLESTEROL OXIDASE IN E. COLI

ALAA KADHIM SHAREEF

Kirsehir Ahi Evran University

Graduate School of Sciences and Engineering

Department of Advanced Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Belgin ERDEM

II. Supervisor: Assist. Prof. Ahmed Jasim NEAMAH

Most common treatment protocols have limitations and drawbacks. Thus, finding effective treatments is the goal of many researchers. Therapeutic peptides are a promising class of drugs that offer numerous benefits over conventional pharmaceuticals including proteins and antibodies. Cholesterol oxidase, produced from *Williamson marianensis*, has been shown to have therapeutic benefits. Burn and ear samples, wound swabs, sputum and urine were obtained to confirm the identification of previously identified isolates by conventional biochemical assays. In this study, we were able to clone the cholesterol oxidase gene using PCR with primers specific to an expression vector (pET28b) and express it in *E. coli* (BL-21/DE3) Rosetta after identification with IPTG. Gyncholesterol oxidase (~500 bp) was sequenced to provide a cox sequence and submitted for synthesis by Genscript Corporation, USA. A double restriction digestion pattern was demonstrated pET-28a(+) cox-william. The obtained pattern consisted of two strands: one of them was a carrier plasmid (4200 bp) and a strand of 2800 base pairs carried the cholesterol oxidase gene. As a result, the cholesterol oxidase gene was successfully cloned and expressed. Cholesterol oxidase derived from *Williamson marianensis* will be used in future therapeutic outcomes.

December 2022, 72 Pages

Keywords: Cholesterol oxidase, Molecular cloning, In silico sequence analysis, Heterologous expression, *Williamson marianensis*

1. GİRİŞ

Williamsia cinsi aerobik Aktinomisetlerdir [1,2] ve bu cins insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. *Williamsia* cinsindeki DNA G+C içeriği %64-65 [3] olup, hücre duvarı yapısında mikolik asit bileşenleri içeren, dallanmayan kısa çubuklu, sporsuz, hareketli olmayan aerobik organizmalardır.

Williamsia cinsi, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella* ve *Turicella* cinslerini de içeren *Corynebacterineae* alt takımında yer alan aktinomisetlerin içinde ayrı bir grup oluşturur. *Williamsia* sp. dokuz türü belirlenmiştir (*Williamsia deligens*, *Williamsia faeni*, *Williamsia limnetica*, *Williamsia marianensis*, *Williamsia maris*, *Williamsia muralis*, *Williamsia phyllosphaerae* , *Williamsia serinedens* ve *Williamsia sterculiae*) [3].

Williamsia, sazlıklar, derin deniz çökeltlerinde , çimen, iç mekan yapı malzemelerinden, insan kanı ve akciğer enfeksiyonları, petrolle kirlenmiş ve Antarktika topraklarından , buzul ve nadir toprak biyosferi dahil olmak üzere çeşitli yerlerden izole edilmiştir.

Kolesterol oksidaz biyosensörleri, farklı serum ve gıda örneklerinde kolesterol seviyesini belirlemek için kullanılmıştır. Mikrobiyal kolesterol oksidazın çok çeşitli endüstriyel ve klinik uygulamaları nedeniyle, kolesterol oksidazın yeni bir mikrobiyal kaynağının/kaynaklarının izolasyonu ve tanımlanması çok önemlidir.

Oksido-redüktaz ailesinin FAD'a bağımlı bir enzimi olan kolesterol oksidaz (COX), çok sayıda patojen ve apatojen bakteri türleri tarafından üretilir ve aktinomisetler en üretken gruptur. Patojenik olmayan bakteriler kolesterol oksidazı, kolesterol ayrışmasından karbon kaynakları elde etmek için metabolik bir araç olarak kullanırken, patojenik bakteriler, membran kolesterolünün oksidasyonu yoluyla konakçı makrofajları enfekte etmek için enzimi kullanma eğilimindedir.

Ticari değeri yüksek bir enzim olan COX, çeşitli klinik ve gıda numunelerinde kolesterol seviyesinin belirlenmesinde kullanılması ve biyosensörlerdeki yeni uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür . Ek olarak, COX, bakteriyel patogeneze ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklarda ve diğer kalp hastalıklarında da yer alır. Bu uygulamalar ve patolojik süreçler, yeni COX'un taranması ve izole edilmesi ve bunun yapısal ve işlevsel yönleri hakkında bilginin artırılması ihtiyaç duyulmaktadır [4]. Ayrıca kolesterol oksidazın Alzheimer hastalığı, HIV ve tüberkülozun belirlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir.Son zamanlarda *Bordetella* sp.'den elde edilen mikrobiyal kolesterol oksidaz

akciğer kanseri tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle, kolesterol oksidaz, yeni bir anti-tümör tedavisi için umut verici bir enzim olabilir.

İnsanlarda *Williamsia*'nın neden olduğu enfeksiyonlar ve hastalıklar bildirilmiştir. Çevresel etkenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak enfeksiyon meydana gelebilir [5]. Yaşlı bir kadında akciğer enfeksiyonunun nedeni olarak *W. muralis*'i ilk kez bildirilen bir vakadır [6].

Patojenik bakteriler, konak makrofajın enfeksiyonu için kolesterol oksidaz gereklidir; kolesterol ayrıca bu organizmalarda enzimin ekspresyonunu da düzenlemiştir [7]. Enzimin patogenezdaki rolünün, kolesterolü kolest-4-en-3-one'ye dönüştürerek lipid membranın fiziksel yapısını değiştirmek olduğu varsayılmıştır [8]. Kolesterol oksidaz, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için ilginç bir farmasötiktir. *R. equi*, konakçının makrofajlarında bulunan ve bu enzimi virülans olarak kullanan bir Gram pozitif kokobasil örneğidir [9].

Birçok bilim adamı, çeşitli mikroorganizmaların düşük üretimi nedeniyle kolesterol oksidaz verimini artırmaya çalıştı. Kolesterol oksidaz üretimi, sıcaklık, inkübasyon süresi, pH, inokulum boyutu ve ajitasyon hızı dahil olmak üzere ortamın ve kültür koşullarının çözünür bileşeninden büyük ölçüde etkilenir [10].

1.1. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, *E. coli*'de *Williamsia marianensis*'ten kolesterol oksidazı kodlayan geni klonlamak ve eksprese etmektir; ve kolesterol oksidazı kodlayan diziyi in silico analiz etmektir.

1.2. Çalışmanın Önemi

Bu çalışmada *W. marianensis*'in kolesterol oksidaz protein dizisinin üç boyutlu yapısını ortaya konuldu. Filogenetik ağaç ile *W. marianensis*'in kolesterol oksidazı ile diğer türlerden gelen diğer kolesterol oksidazları arasındaki genetik ilişkiyi göstererek, bir bakteri olarak *W. marianensis*'den kolesterol oksidaz enziminin çözünür ve aktif olarak klonlanması ve ekspresyonu başarıyla sağlayarak üretilebilen Kolesterol oksidaz'ın terapötik faydaları bu araştırmada önem taşımaktadır.

Çocuklarda lösemide tedavi amaçlı kullanılmak üzere lokal rekombinant kolesterol oksidazın enziminin üretimi önem taşımaktadır. Bu nedenle bu enzim şu anda çocuklarda lösemi tedavisinde kullanıldığından rutin olarak kullanılması gerekmektedir.

Enzimin fiyatı pahalı olduğu için pek çok hasta bunun maliyetini karşılayamamaktadır.

Dolayısıyla, kolesterol oksidazın dünya çapındaki enzim pazarı, bu tür enzimlerin farmasötik talepleriyle başa çıkmak için yeni kolesterol oksidazın aramaya acil ihtiyaç duyulmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Williamsia* spp'nin Karakterizasyonu

Williamsia, hücre duvarı yapısında mikolik asit bileşenleri içeren, dallanmayan kısa çubuklara sahip, sporsuz, hareketli olmayan aerobik organizmalardır. Tindall [11] Corynebacteriales adının Mycobacteriales ile değiştirilmesini önermiştir. *Williamsia*, mezo-2,6-diaminoheptandioat (C₇H₁₄N₂O₄), dokuz izopren üniteli hidrojeni giderilmiş menakinon [12], difosfatidilgliserol, tüberkülostearik asitler, fosfatidilgliserol, , N-glikolil muramik asit, fosfatidilinositol ve mikolik asitleri içermektedir [3]. Sayrıca, *Williamsia*'nın yağ asitleri heksadekenoik asit oleik asit, palmitik asit ve tüberkülostearik asittir [3]. *Williamsia*'da zincir mikolik asitlerdeki bazı karbonlar C50–C56'dır [13]. *W. marianensis*'in büyümesi için sıcaklık aralığı 4 ila 30 °C'dir, Ayrıca, büyüme için pH aralığı *W. aurantiacus* ve *W. spongiae* için 4.0 ile 10.0 arasındadır [14] ve *W. sterculiae* için 8.0 olarak belirlenmiştir [15].

2.2. *Williamsia*'nın Tanımlanması

Williamsia'nın farklı kültür ortamları tarafından tanımlanması için, *Williamsia*'nın insan klinik örneklerinden izolasyonu için belirlenmiş özel bir ortam yoktur. *Williamsia* izolasyonu için çeşitli kaynaklardan çok sayıda besi ortamı kullanılmıştır. Bununla birlikte, iyi büyümesi için veya morfolojik inceleme için en uygun olan ortamlar %5 koyun kanlı agar ilave edilmiş Columbia agar ve beyin kalp infüzyonu (BHI) agardır. Bunlara ek olarak, Sikloheksimid ve nistatin ile desteklenmiş M3 agar [16], glikoz/maya özütü agar (GYEA) [17], sikloheksimid ve nistatin ile desteklenmiş rafinoz-histidin agar [17], triptik soya agar [14] ve sikloheksimid ile takviye edilmiş nişasta-kazein agar [18], da iolasyon da kullanılabilir. Bu besi yerlerine nalidiksik asit, novobiyosin ve nistatin ilave edilmelidir [19].

Williamsia'nın fenotipik karakterizasyonlarına göre, *Williamsia aurantiacus* [14], *W. deligens* [12], *Williamsia faeni* [19], *Williamsia herbipolensis* [5], *Williamsia limnetica* [18] ve *Williamsia maris* [16], *Williamsia marianensis* [16], *Williamsia muralis* [2],

Williamsia phyllosphaerae [3] , *Williamsia serinedens* [16], *Williamsia spongiae* [14] ve *Williamsia sterculiae* [15] türleri bulunmaktadır. Bu cinsin türleri farklı ortamlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte, klinik örneklerden de izole edilmişlerdir [12]. *Williamsia* spp.'de koloni morfolojinin farklı özellikleri ve pigment renkleri sarı ila turuncu veya kırmızı olarak belirlenmiştir [20]. Gram boyama (*Williamsia* cinsi Gram-pozitif) ve aside dayanıklı boyama görülebilir [3, 21]. *Williamsia*'nın tanımlanması ve taksonomik özelliklerin değerlendirilmesinde doğru yöntem moleküler dizilemeye dayalı moleküler tanımlardır. 16S rRNA gen dizilimi, yeni bakterilerin ve ortaya çıkan patojenlerin cins ve tür seviyelerinde doğru bir şekilde tanımlanması için etkili bir standart yöntemdir [22].

Montoya-Porras ve ark., (2018), *Williamsia* cinsini, 16S rRNA geninin değişken bölgesi için 454 pirosekanslama ile tanımladı. Bakteri türlerini ayırt etmek için altın standart yöntem DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) yöntemi olarak belirlenmiştir [23, 24]. Ancak bu yöntem klinik laboratuvarlarda bakteri tanımlaması için kullanılmamıştır. Diğer bir moleküler yöntem ise, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nde (NCBI) beş *Williamsia* türü için biriktirilmiş olan tüm genom dizilimidir (WGS).

Williamsia marianensis şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Üst alem: Bakteri

Şube: Posibakteriler

Sınıf: aktinobakteriler

Alt sınıf: Actinobacteridae

Takım: Corynebacterineae

Familya: Nocardiaceae

Cins: *Williamsia*

Tür: *Williamsia marianensis* [16].

2.3. Kolesterol Oksidaz

Kolesterol oksidaz (COX, EC 1.1.3.6), monomerik, iki işlevli FAD içeren (flavoenzim) bir enzim, oksidoredüktazlar ailesine aittir, özellikle alıcı olarak oksijenle vericinin CH-OH grubu üzerinde etkilidir. COX, 3 β -hidroksi-steroidlerin oksidasyonunu ve 3-4-ene- 3 β -ketosteroid (kolest) üretmek için 5-6-en-3 β -ketosteroidin (kolest-5-en-3-on) izomerizasyonunu katalize eder.

Bu enzim sınıfının sistematik adı kolesteroldür: oksijen oksidoredüktazlar ve kullanımda olan diğer yaygın isimler kolesterol-O₂ oksidoredüktazlar, 3β-hidroksi steroid oksidoredüktazlar ve 3β-hidroksisteroid de oksijen oksidoredüktazlardır. COX ilk olarak *Rhodococcus erythropolis*'ten izole edilmiş ve karakterize edilmiştir [24]. Daha sonra hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif birçok bakteri tarafından üretildiği bulundu, ancak Aktinomisetler en üretken COX grubu olarak bildirilmiştir. Kolesterol oksidaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) kofaktörünü bağlayan 55 kDa salgılanan bir bakteriyel enzimdir [25]. Form I'de FAD kofaktörü proteine kovalent olmayan bir şekilde bağlanırken, form II'de FAD grubu His121'e kovalent olarak bağlanır [26].

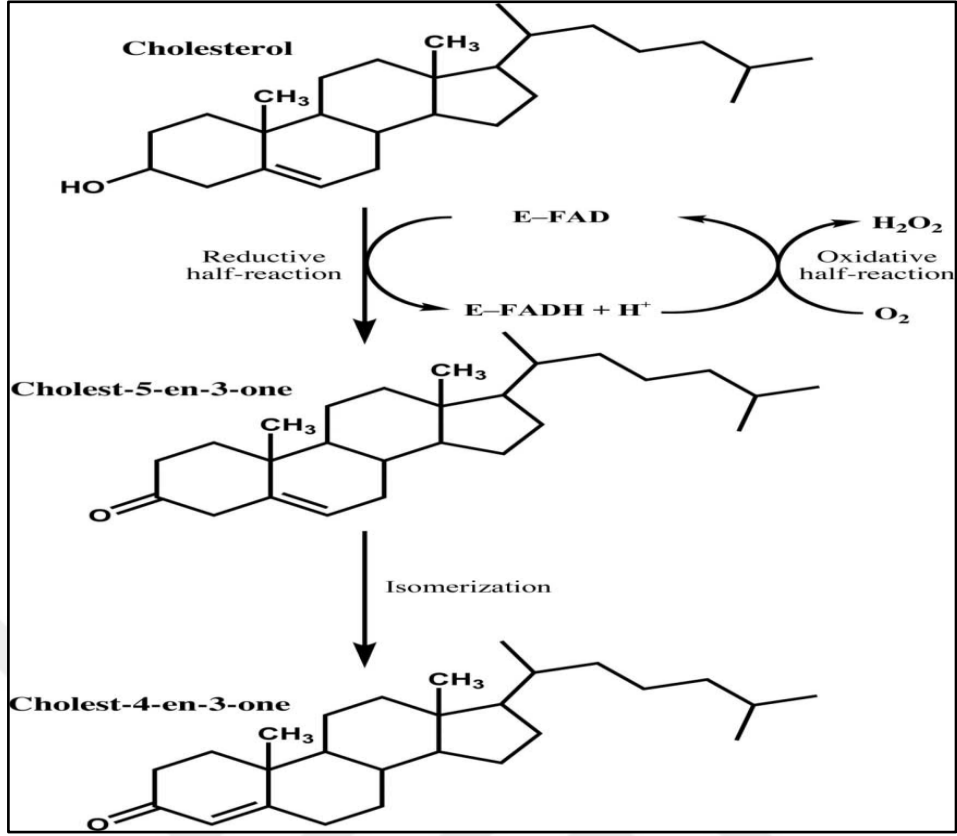
COX, aşağıdakileri kullanan yararlı bir biyoteknolojik araçtır:

1. Serum ve diğer biyolojik numunelerin kolesterol düzeylerinin belirlenmesinde,
 2. Farmasötik endüstrisinde endüstriyel steroid ve sterol olmayanlar için değerli ara ürünler sağlayan biyokatalizör olarak,
 3. Coeloptera'ya karşı bir insektisit olarak geliştirilmiş olan larvisidal protein olarak,
 4. Ayrıca COX, patojen bakteri *Rhodococcus equi*'nin ve *Mycobacterium* sp neden olduğu enfeksiyonlarda virülans faktör olarak rol aldığı [34, 35]. Bu enzimatik aktivite bakterilere özgü olduğundan, antibiyotik keşfi için yeni bir moleküler hedefi temsil edebilir.
 5. COX ayrıca *Streptomyces natalensis*'te polien makrolid pimarisinin biyosentezi için sinyal proteini görevini yerine getirmektedir [4, 36, 37].
 6. Protein mühendisliği titiz çalışmaları sonucunda önemli bir strateji sağlayarak, biyoteknolojik uygulamalar için yeni enzimlerin elde edilmesini ortaya koymuştur [38].
- Gıdalardaki kolesterol seviyesini düşürmek için pek çok deneme yapılmıştır; enzimatik yöntemlerle gıda kolesterol düzeyleri azaltılması da gerçekleştirilmiştir [39].

Kolesterol oksidaz kullanarak süt ve yumurta sarısı kolesterol seviyelerini düşürmek için de çok sayıda deney yapılmıştır. Ayrıca, diğer araştırmalar COX'ın haşerelerin kontrol edilmesin de önemli bir rolü olduğunda bildirmişlerdir [16]. FAD kofaktörü ile apoenzim arasındaki bağın doğasına göre iki tip kolesterol oksidaz (CO) vardı. Tip I'de FAD

kofaktörü proteine kovalent olmayan bir bağ yoluyla bağlanırken, tip II'de kofaktör apoenzime kovalent olarak bağlanmıştır [25]. Kolesterol oksidaz, klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan ikinci enzimdir [36]. Benzer şekilde, yapılan çalışmalarda ChOA geni klonlanmsı ve gen dizilimi yapılmıştır [45, 46]. Yapılan diğer bir çalışmada *E. coli*'deki ChOA geni pozitif olarak eksprese edilmiştir. Ayrıca, bu enzimin HIV, Alzheimer hastalığı ve tüberkülozun ortaya çıkmasında rol oynadığıda bildirilmiştir [47]. Bu enzime kolesterol, hormon ve steroid ilaç ara ürünlerinin sentezi için önemli bir öncü olarak ihtiyaç duyulmuştur [48]. Buna ilave olarak, *Borodetella* sp'den gelen COX enzimi akciğer adenokarsinomunda ve meme kanserinde hücre apoptozuna yol açtığı için yeni bir anti-tümör tedavisi için umut verici bir aday olarak gösterilmiştir [49].

Birçok bakteri patojeniteleri için bu enzime ihtiyaç duyar. Hücre zarını oksidaz ederler ve kolesterolü kolest-4-en-3-one'a dönüştürme ve H₂O₂ üretme yeteneğine sahiptirler [50]. Daha önce bahsedildiği gibi, CHO birkaç bakteriden izole edilmiştir. Son zamanlarda aşağıdakiler dahil birçok bakteriden CHO geninden daha fazlası izole edilmiştir: *Brevibacterium sterolicum* ATCC21387, *Arthrobacter simplex*, *Streptomyces* SA-COO ve *Rhodococcus* sp. PTCC1633 ve uygun konakçılara klonlanmıştır [51]. Steroid substrat üzerindeki hidroksil grubunun oksidasyonu, eşzamanlı olarak azaltılan bir FAD kofaktörü gerektirir (Şekil 1) [52].

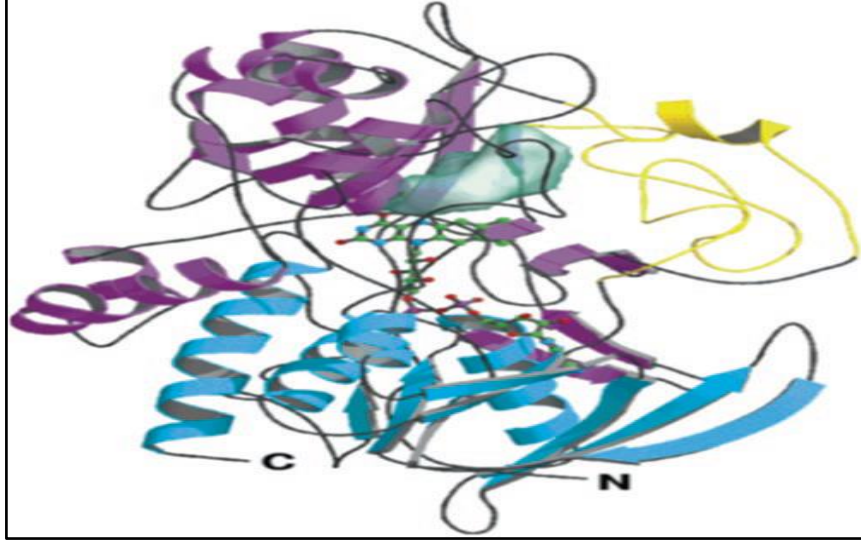


Şekil 1. Kolesterol oksidazın oksidasyon ve izomerizasyon reaksiyonları [52]

Önemli bir dizi homolojisi olmayan farklı protein ailelerine ait olan ve dolayısıyla yapı, katlanma ve kinetik ve termodinamik özellikler açısından da farklılık gösteren iki farklı COX tipi vardı [53].

1. Sınıf I COX

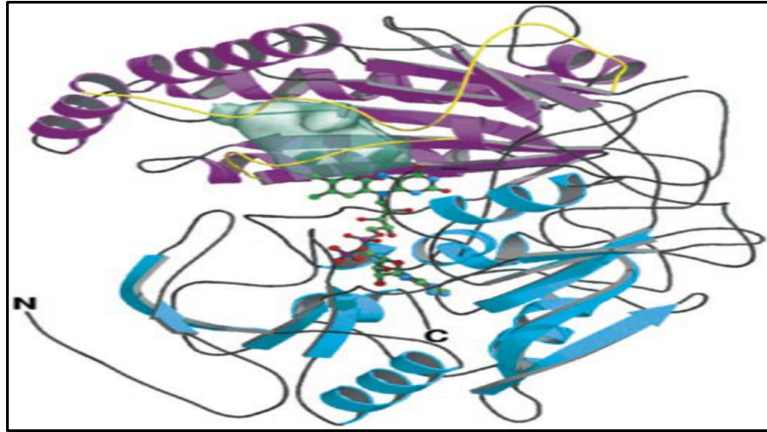
Bu enzime kovalent olmayan bir şekilde bağlı olan ve glukoz-metanol-kolin (GMC) oksidoredüktaz ailesine ait olan FAD redoks kofaktörü içermektedir. Çoğunlukla, Sınıf I COX, *Streptomyces* sp. gibi aktinomisetlerde bulunmaktadır (Şekil 2). Aktinomisetlerdeki dizi analizi, His447 ve Glu361 kalıntılarının izomerizasyon ve oksidasyon gibi çeşitli kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [54,7]. *Streptomyces* sp., *Rhodococcus* sp. ve *Mycobacterium* sp.'den elde edilen sınıf I enzimlerden amino asit dizilerinin bir karşılaştırmasını ve Gly-X-Gly-X-X-Gly'nin COX'teki FAD bölgesinin N-ucunda korunan dizi olduğunu bildirmişlerdir [55]. Kofaktörlerin yanı sıra, GXGXG glisin ile korunan kalıntıların bulunduğu N-terminaline yakın ilk a-sarmalda difosfat grupları mevcuttur [25].



Şekil 2. Sınıf I COX [26]

2. Sınıf II COX

Sınıf II enziminde, FAD kofaktörü enzime kovalent olarak bağlanmıştır [26]. Bu enzim *Rhodococcus erythropolis* ve *Brevibacterium sterolicum* ve *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp. ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerde bulunmuştur. X-ışını kristalografisi ile *B. sterolicum* COX yapısının, kovalent bağları nedeniyle en dayanıklı olduğu bulunmuştur (Şekil 3) [27]. FAD'ın kovalent bağı, enzimin stabilitesine katkıda bulunmakta ve redoks potansiyelinde önemli bir rol oynamaktadır [28].



Şekil 3. *Brevibacterium sterolicum* kaynaklı Sınıf II kolesterol oksidaz [29]

2.4. Kolesterol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Membran Etkileri

Genel olarak, lipid çift katmanları, kolesterol yokluğunda bir jel fazında veya bir sıvı fazda bulunur. Erime sıcaklıklarının üzerindeki lipidler, lipid çift tabakası içinde daha fazla yanıl hareketliliğe sahiptir ve bu nedenle katılardan daha çok sıvılar gibi davranırlar. Doymuş açıl zincirli lipidlerden oluşlan zarlarda, örneğın dipalmitoilfosfatidilkolin, kolesterolün sıvı faza katılması, zarda bir artışa neden olarak hala sıvı olan bir faz oluşturur, yani lipidler hala yanıl hareketliliğe sahiptir, ancak daha yüksek bir düzen derecesi. Bu kolesterol, doymuş lipid açıl zincirlerini, lipid çift tabakasının merkezindeki düzensizliğı sınırlayan bir S-trans konformasyonuna sınırlar. Bu sıvı düzenli durum, kolesterol içermeyen sıvı düzensiz durumdan ayrılır ve iki faz bir arada bulunabilir [30]. Ek olarak, kritik kolesterol mol fraksiyonlarında meydana gelen çok cisimli moleküler etkileşimler nedeniyle, COX aktivitesi, tek fazlı bir bölge içindeki mol fraksiyonu ile orantısız olarak azalabilir veya artabilir [31]. Bu nedenle, kolesterolün mol fraksiyonunun arttırılması, zarın fiziksel durumunu bozabilir ve zarın kolesterol için afinitesini değıştirebilir. Bu nedenle, enzimin görünen substrat spesifikliğı, enzim aktivitesinin belirlendiğı lipid kompozisyonuna ve substrat mol fraksiyonuna bağılı olacaktır. Kolesterolün deterjanla etkileşiminin serbest enerjisi, enzimin görünen katalitik aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. Örneğın, setiltrimetilamonyum bromür/kolesterol miselleri ile herhangi bir devir tespit edilmedi, oysa aynı konsantrasyon, pH ve sıcaklıkta Triton X-100/kolesterol miselleri kolaylıkla oksitlenebilmiştir [32].

2.5. Kolesterol Oksidaz Kaynakları

COX aktivitesi, farklı ortamlarda bulunan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmiştir. *Arthrobacter*, *Rhodococcus equi*, *Nocardia erythropolis*, *Mycobacterium ve Nocardia rhodochrous* gibi mikroorganizmalar bir hücre içi-membran COX üretirken, *Pseudomonas*, *Schizophyllum commune*, *Brevibacterium sterolicum*, *Streptoverticillum kolesterolicum* ve *Streptomyces* bir hücre dışı enzim üretirler. Genel bir kural olarak, COX enzimleri aktiviteleri için prostetik grup FAD'yi ihtiyaç duymaktadır (hem kovalent hem de kovalent olmayan bir şekilde bağılı bir kofaktör olarak). Bunun bir istisnası, kofaktör olarak kovalent olarak bağılı FMN içerdiğı bildirilen *c-Proteobacterium* Y-134'ten izole edilen COX olabilir [33]. Bu enzim ayrıca bilinen diğler COX'lerle karşılaştırıldığında substrat spesifikliğı bakımından da farklılık göstermektedir. Bu enzim, choE geninin ürünü olup , *Streptomyces* spp.'de tanımlanan ve salgılanan COX'lerle homologdur.

Bu protein ayrıca *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ve *Rhodococcus erythropolis* tarafından kodlanan COX'lerle önemli benzerlikler sergilemektedir. [34].

2.6. Kolesterol Oksidaz Membran Etkileşimleri

Genel olarak, lipit çift katmanları, kolesterol yokluğunda bir jel fazında veya bir sıvı fazında bulunurlar. Erime sıcaklıklarının üzerindeki lipidler, lipit çift tabakası içinde daha fazla lateral hareketliliğe sahiptirler ve bu nedenle katılardan çok sıvılar gibi davranırlar. Dipalmitoilfosfatidilkolin gibi doymuş açil zincirlere sahip lipitlerden oluşan zarlarda, sıvı faza kolesterol eklenmesi, zar düzeninde bir artışa neden olur, yani lipitler lateral hareketliliğe sahiptir.

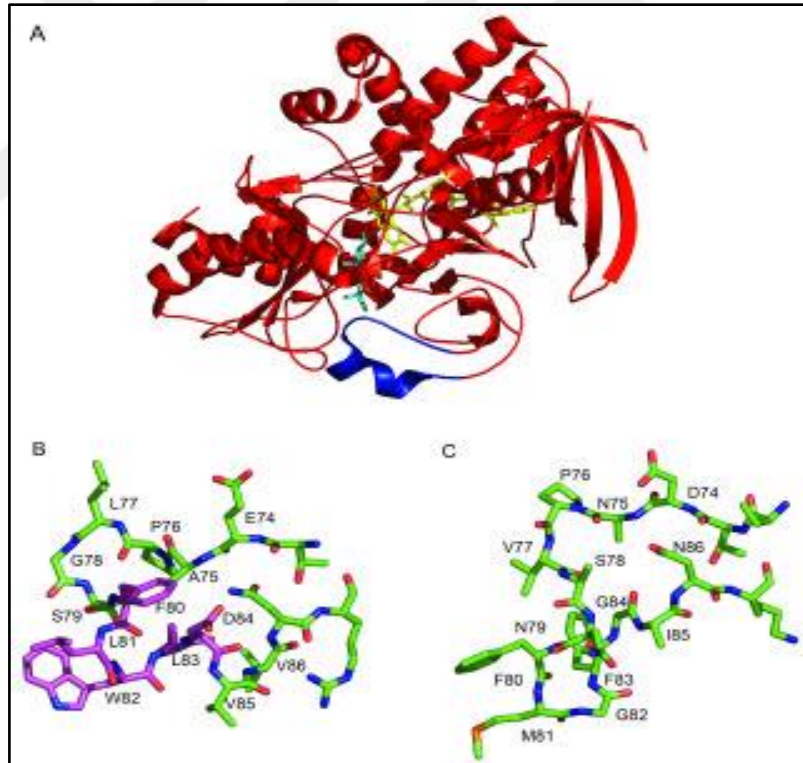
Ek olarak, kolesterolde meydana gelen moleküler etkileşimler nedeniyle, COX aktivitesi, tek fazlı bir bölge içinde orantısız bir şekilde azalabilir veya artabilir. Bu nedenle, kolesterolün mol fraksiyonunun artırılması, zarın fiziksel durumunu bozabilir ve zarın kolesterol için afinitesini de değiştirebilir [35].

Streptomyces ve *Rhodococcus equi* 'daki kolesterol oksidaz enzimi, ekspresyon, mutagenез ve yüksek çözünürlüklü kristalografiye uygun oldukları için bilimsel çalışmaların odak noktası olmuştur. Bu iki bakterideki enzimin mekanizmaları ve yapıları hemen hemen aynıdır [26]. Bu nedenle yüzeylerindeki, substrat bağlama boşluğu, 79-83 kalıntılarını içeren bir protein halkası ile çözücülerden korunurlar. Bu protein halkasının ucundaki 5 amino asit kalıntısı olan Ser 79, Phe 80, Leu 81, Trp 82 ve Leu 83 silinerek yüzey döngüsünün rolü böylece belirlenmiştir [29] (Şekil 4).

X ışını ile kristal yapılar gözden geçirilerek model membranlara (lipid veziküller) bağlanma ve sonraki aktif bölge döngüsünün nerede olacağını tahmin etmek için floresan ışık çalışmalarda kullanılmıştır [36]. Diğer bir çalışmada Sistein aminoasidi, *R. equi*'nin (*Brevibacterium sterolicum*) COX'nın 81. pozisyonundaki ilmeğine dahil edildi ve çevreye duyarlı bir floresan probu olan akrilodan ile etiketlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Akrilodan etiketli sisteinin, halkanın uzatılmış bir zinciri olarak modellenmesi gerçekleştirilmiş ve bu halka omurgasının lipit çift tabakasına nüfuz etmediğini, ancak lipit çift tabakasının baş grupları ile etkileşime girdiği yapılan bu çalışma ile ortaya konulmuştur [37]. Ayrıca bu çalışma ile tetrametilrodamin etiketli COX'ın kolesterol/dimiristolilfosfatidilkolin tek tabakası ile ilişkili olduğunu da göstermiştir. Bu

enzimin membran yüzeylerine bağlanmasının membranı bozmadığını gösteren vezikül liziz çalışmaları ile de tutarlı olduğu bildirilmiştir [38]. COX'in lipid çift tabakaları ile birlikte kolesterolün aktif bölgesine bölünmesi, çift tabaka da gözenek oluşumuna ve bunun sonucunda veziküllerde kapsüllemiş ve boya sızıntısına izin verecek boyutta olmadığı da bildirilmiştir.

Bununla birlikte, kolesterolün kolest-4-en-3-one'ye dönüştürülmesi, lipid çift tabakasının genişlemesi (aslında yoğunlaşma) ile zar geçirgenliğini de artırmaktadır. Floresanla işaretlenmiş enzim kullanılarak, çeşitli lipid veziküllerine bağlanma da izlenmiştir. Membrana enzim bağlanması, hidrofobik etkileşimler tarafından yönlendiriliyor olarak görünmektedir [36]. Anyonik membranlara bağlanan fosfolipaz A2 ile karşılaştırıldığında, COX'in bağlanma afinitesinin çok zayıf olması membran yüzeyinin enzimle doyumadan yapıldığı anlamına gelir ve substrat preparasyonları arasındaki farklılıklar basitçe bağlanma afinitesindeki farklılıkları yansıtabilir.



Şekil 4. Aktif bölge döngüsünü aydınlatan COX'in üç boyutlu yapısı

(a) Aktif bölgeye modellenmiş epiandrosteronlu *Streptomyces* COX (1MXT [35]) görüntüsü. FAD kofaktörü sarı renkle gösterilmiştir. Alt tabaka bağlanmasına izin vermek

için hareket etmesi gereken aktif site döngüsü mavi renkte gösterilmiştir. (b) (a)'daki *Streptomyces* COX aktif bölge döngüsünün aynı yönelimde atomik temsili. (c) *Rhodococcus equi* COX (1COY)'den aktif bölgesi [39]. Tüm *Rhodococcus* COX yapısı, *Streptomyces* COX yapısı ile kaplanmıştır ve (b) ve (c)'deki halkalar aynı enzim yönelimlerinde gösterilmiştir. Elektron yoğunluğunun olmadığı yan zincirler alaninler olarak modellenmiştir [26, 40].

2.7. Enzim Substrat Özgüllüğü

Enzim membran yüzeyine bağlandıktan sonra sterolün katalize olması için enzimin aktif bölgesine bağlanabilir. Aktivite için steroid üzerinde 3 β -hidroksi grubunun olması gerekmektedir. Yan zincirsiz 5-androsten-3 β -ol'den dallı bir yan zincir olan sitosterol'e kadar değişen kolesterol yan zincirinin modifikasyonunda, steroidler tek tabakalı olduğunda [41] veya dioleoilfosfatidilkolin/sterol tek lamelli olduğunda veziküller substrat üzerinde çok az etkiye sahiptir [42]. Bu eksiklik, deterjan misellerinde, sitosterol ve androsten-3 β -ol ilgili steroid yapılarıdaki kolesterol için özgüllük gösteren propan-2-ol çözücüsü ile yapılan substrat çalışmalarında bir zıt durum ortaya konmuştur [43].

2.8. Biyokatalizde Kolesterol Oksidaz Kullanımı

Çok sayıda *Aktinobakteri*, D5 fi D4 izomerizasyonuna bağlı D5-hidroksisteroidlerin 3-OH grubunu oksitlemede oldukça etkili olmuştur. Böylece endüstriyel steroid ilaç üretimi için değerli ara ürünler sağlanmıştır. Örneğin, *R. equi* DSM 89-133, kolesterol ve diğer steroller androst-4-en-3,17-dion ve androsta-1,4-diene-3,17-dion'a dönüştürmek için kullanılmıştır [44]. Büyüme ortamı asetat ile desteklendiğinde kolesterol %82'ye kadar dönüştürülmüştür [56]. Benzer şekilde, kolesterolün safra asitlerine biyolojik dönüşümünde, 3 β ,7 α -kolest-5-en-3'nin 7-diol'ü 7 α -hidroksikolest-4-en-3-one'ye dönüştürmek için ReCOX kullanılarak %90'dan daha yüksek bir verim elde edilmiştir [57]. *R. erythropolis* COX, siklik alilik, bisiklik (ör. 10 β -metil-D1(9)-2 β -oktalo)l'un hazırlayıcı oksidasyonu için kullanıldı ve trisiklik alkollerin yanı sıra birkaç ergot alkaloidini de sentezlemiştir [58].

2.9. Kolesterol Oksidazın Klinik Kullanımları

COX, çeşitli numunelerde kolesterolü belirlemek için yararlı bir analitik araçtır:

(a) Toplam ve esterlenmiş serum; (b) Düşük yoğunluklu lipoproteinlerden yüksek yoğunluklu lipoproteinlere; (c) Eritrositlerin (ve diğer hücrelerin ve hücreSEL bölmelerin) hücre zarı üzerinde; ve (d) Safra taşlarında ve insan safrasında kullanımıştır. Normal insan kan serumu 5,2 mm'den (200 mg.dL⁻¹) daha az kolesterol içerir; plazmada lip Ateroskleroz ve diğer lipid bozuklukları gibi bir dizi hastalığın değerlendirilmesi ve ayrıca tromboz, miyokard enfarktüsü vb. riskinin tahmini, serum kolesterol içeriğinin bilinmesine bağlıdır. Oksidatif stres, hiperkolesterolemi ve Alzheimer hastalığı riskini içeren mekanizmalar aracılığıyla bağlantılıdır. Alzheimer hastalığı, beyinde oksidatif hasarla bağlantılı olan 39-43 amino asitlerinin bir peptidi olan amiloid β -peptidin birikmesiyle tanımlanır. oproteinler kolesterol içerir ve yaklaşık %70'i yağ asitleri tarafından esterleştirilir [4].

Amiloid β -peptid, Cu²⁺ iyonları ile kompleksler oluşturarak, kolesterolü kolest-4-en-3-one'a oksitleyerek COX'un işlevini taklit eder. Aslında, Alzheimer hastalarının beyin dokularındaki kolest-4-en-3-one seviyeleri, kontrol grubuna göre iki kat daha fazladır [59].

Richmond [60], 1973'te serum kolesterolü belirlemeye yönelik kimyasal yöntemleri (örneğin, Liebermann-Burchard reaksiyonları) ortadan kaldırdı: Nocardia'dan COX'in, üretilen hidrojen peroksit miktarını ölçerek serum kolesterolünü ölçmek için kullanılabileceğini göstermiştir. Hidrojen peroksit, 550 nm dalga boyuna sahip renkli bir ürün üretmek için dört değerlikli titanyum ve ksilenol turuncu ile reaksiyona sokuldu . Bu yöntemde kolesterol esterlerinin enzimatik olmayan hidrolizi (alkali sabunlaştırma) kullanılmıştır.

Aynı enzim daha sonra, 2 saatlik uzun bir inkübasyon periyodunu takiben ürün ekstraksiyonundan sonra kolest-4-en-3-on ürününün absorpsiyonunun 240 nm'de doğrudan ölçülmesiyle serum kolesterol testi için kullanıldı [61]. Toplam kolesterol, kolesterol esterlerini hidrolize etmek için kolesterol hidrolazın (EC 3.1.1.13) kullanıldığı tamamen enzimatik bir yöntem kullanılarak serumda da (esterler dahil) belirlenebilir [62].

Serbest kolesterolün COX tarafından oksidasyonunun ardından hidrojen peroksit oluşturulur. Bu daha sonra, 4-aminoantipirinin fenol ile oksidatif bağlanmasıyla enzimatik olarak yabanturpu peroksidazı ile ölçülür, bu da bir kinonimin rengi verir (maksimum 500 nm'de absorpsiyon ile). Bu teknik, klinik laboratuvarlarda hala sıklıkla kullanılmaktadır ve basitlik, minimum müdahale ve büyük tekrarlanabilirlik faydaları ile karakterize edilir. Safra kolesterolü, pigmentlerden kaynaklanan girişim nedeniyle kolorimetrik yaklaşım

kullanılarak düzgün bir şekilde ölçülebilse de, COX reaksiyonunun oksijen tüketimine dayalı bir elektrokimyasal yöntem tercih edilmektedir [63].

2.10. Virülansta Kolesterol Oksidaz

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için ilginç bir farmakolojik hedef COX'tir. Konağın makrofajları, Gram-pozitif kokobasil *R. equi*'ye ev sahipliği yapar. En yaygın semptom, apse oluşumu ve kaviter pnömoni ile seyreden kronik süperatif bronkopnömonidir ve genç atları sıklıkla enfekte eden yaygın bir toprak organizmasıdır [9]. 1967'den beri bu bakterinin insanlara bulaşabileceği belgelenmiştir. Genellikle, %70'i HIV pozitif olan bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı bir enfeksiyon olarak tanımlanır [64].

R. equi enfeksiyonlarının çeşitli klinik belirtileri vardır: Şiddetli pirogranülomatöz hastalık pnömonisi en yaygın tiptir. Konak hücrenin *R. equi* enfeksiyonu sırasında ekstraselüler oksidazın indüklenmesinin membran lizisini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür [55]. Mutasyon analizine göre COX, *Listeria ivanovii*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi sfingomiyelinaz üreten bakterilerin varlığında *R. equi* tarafından ortaya çıkarılan sinerjistik hemolitik reaksiyondan sorumlu olan zara zarar veren faktördür [55]. Bakteriyel sfingomiyelinaz C'nin varlığı, *R. equi*'nin zara zarar veren etkinliği için gereklidir [7].

2.11. Antifungal Sensör Olarak Kolesterol Oksidaz

Streptomyces natalensis ChOx, polien makrolid pimarisinin biyosentezi için gereklidir [57]. Bu 26 üyeli tetraenemakrolid antifungal antibiyotik, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (peynir kontaminasyonunu ve mantar keratitini önlemek için), çünkü membran sterollerini ile etkileşime girerek (ergosterol, mantar zarlarında bulunan en bol steroldür), zar yapısının değişmesine ve hücre sızıntısına neden olur. Varsayılan ChOx kodlayan genler, filipin (pteG) ve CE-108 (rimD) dahil olmak üzere antifungal poliketitlerin diğer bilinen biyosentetik gen kümelerinde bulunur. Bu poliketitlerin tümü, zarları ergosterol içeren mantar rakiplerine yanıt olarak toprak bakterileri tarafından üretilir ve bu da üretici bakteriler için seçici bir avantaj sağlar [65].

2.12. Moleküler Klonlama

Klonlama çoğunlukla tüm genleri içeren DNA parçalarını çoğaltmak için kullanıldı, ancak promotörler, kodlamayan diziler ve rastgele parçalanmış DNA gibi herhangi bir DNA

dizisini çoğaltmak için de kullanılabilir. Genetik parmak izinden büyük ölçekli protein üretimine kadar birçok pratik uygulamada ve biyolojik çalışmada kullanılabilir [66].

Klonlama vektörü, bir organizmada stabil olarak depolanabilen ve klonlama amacıyla ona eklenebilen küçük bir DNA parçasıdır [67]. Az sayıda vektör doğal olarak meydana gelirken, diğerleri uygun modifikasyonla bu doğal olarak meydana gelen yollardan elde edilmiştir [68]. Pek çok klonlama vektörü türü vardı, ancak en yaygın olarak kullanılanları genetik olarak tasarlanmış plazmitlerdir. Plazmitler, farklı koşullara adaptasyonu kolaylaştıran yeni genler üreterek bakterilerin oluşumunda büyük rol oynayan genetik unsurlardır [69]. Bu vektörlerdeki klonlanmış genlerin kendilerini transkripsiyon veya translasyon düzeyinde ifade etmeleri pek olası değildir. Bu vektörler, genetik mühendisliği deneylerinde, genomik kütüphaneler oluşturmak veya problemleri veya diğer temel çalışmaları hazırlamak için kullanılmıştır. Klonlama vektörlerinin seçimi, klonlama deneyine, vektör bilgisine, çalışma kolaylığına, uygunluğuna ve güvenilirliğine bağlıdır [70].

Çok sayıda klonlama vektörün seçilmesi aşağıdakiler gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir: ek üzerindeki boyut, kopya sayısı ve klonlama işlemi. Büyük ekler, özellikle çok sayıda kopyaya sahip olanlar için genel bir klonlama vektöründe kararlı bir şekilde muhafaza edilemez [71].

Tipik olarak klonlama, ilk olarak *E. coli* kullanılarak gerçekleştirilir ve *E. coli*'deki vektör klonlama, plazmit, kozmitler, bakteriyofajlar (örneğin faj y) ve bakteriyel yapay kromozomları (BAC'ler) içerir. Bununla birlikte, birkaç DNA *E. coli*'de sağlam bir şekilde korunamaz, örneğin çok büyük DNA fragmanlarında kullanılabilir ve maya gibi diğer organizmalar kullanılabilir [72]. *E. coli*'nin konukçu mikroorganizma olarak kullanılması, hızlı büyüme kinetiği, hızlı yüksek yoğunluklu yetiştirme dahil olmak üzere birçok avantaja sahipti ve genetik manipülasyon kolaylığı, nispeten ucuz yetiştirme, heterolog DNA ile kolay ve hızlı plazmit transformasyonu [73], hızlı ekspresyon, bir günlük bir süre boyunca rekombinant protein üretimi, bilinen metabolik yollar ve fermantasyon yöntemlerinin ve koşullarının geliştirilmesi oldukça başarı sağlanmıştır [74, 75].

B suşları ve K12 arasındaki farklar, BL21'de (DE3) kamçılı bileşen genlerinin, DNA sitozin metilaz dcm'nin ve ompT'nin olmamasını içerir. B suşları, K12'de bulunmayan ek bir tip II salgı sistemine sahip olabilir.

BL21 (DE3) dahil olmak üzere laboratuvarında yaygın olarak bulunan suşlar olan protein ekspresyonu için en yaygın *E. coli* konakçı suşlarından biri. BL21, minimal ortamda hızla büyüebildi [78]. BL21 (DE3), T7 RNA polimerazın kontrolü altında rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan bir türdür [79]. OmpT ve Lon proteazlarını kodlayan genlerdeki eksik BL21. OmpT, saflaştırma sırasında proteinleri bozabileceğinden, rekombinant proteinlerin üretimi için iyi bir sonuca sahipti [80]. Shuffle T7 Yetkili *E. coli*, katlanmaları ve aktiviteleri için *E. coli* sitoplazmasında disülfid bağlarının oluşumunu katalize etmek üzere tasarlanmıştır [81]; bu, aktif sitoplazmik DsbC'yi ifade eden *gor* ve *trxB*'nin kromozomal kopyalarının genetik olarak silinmesiyle sağlandı [82]. XL-1 Blue, klonlama ve protein ekspresyonunda kullanılan K suşlarıdır ve plazmit veya lambda vektörleri kullanan rutin klonlama uygulamaları için harika konakçılardır ve mavi-beyaz tarama için en popüler suştur [83]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin *E. coli* plazmitlerine klonlanması moleküler teknikler için çok önemlidir [84]. Çok sayıda sistem önerildi ve birçoğu PCR ürünlerinin plazmitlere dahil edilmesine izin verecek şekilde ticarileştirildi. Çoğu PCR klonlama vektörü üç temel özelliği paylaşır:

1. PCR ürününün dairesel bir plazmit DNA'sına dahil edilmesi;
2. Plazmidi dahil eden *E. coli* klonlarının seçimi; ve
3. İlgilenilen PCR ürününü içeren klonların seçimi [85].

2.13. Plazmidler

Plazmidler, Bakteriler, Arkealar ve Ökaryotikler alanlarındaki birçok mikroorganizmada bulunan dairesel veya lineer kromozom dışı replikonlardır [86]. Plazmidler konjugasyon yoluyla bulaşabilirler [87]. Smillie ve diğerleri [87], tam dizili plazmitlerin yaklaşık %14'ünün konjugatif olduğunun tahmin edildiğini bildirmiştir. Konjugasyon, genetik elementleri bakteriler arasında yaymak için en etkili mekanizmalardan biridir [88]. Bu nedenle, bakterilerde görülen hızlı evrim ve adaptasyon yeteneklerini kolaylaştıran, genetik bilginin bakteriyel iletişimi için en önemli "araçlardan" biridir [89]. Nükleotid dizileme teknolojisindeki son devrimle birlikte yeni plazmitler rapor edilmiştir; NCBI Plazmit Genom veritabanında 4602 tam plazmit dizisi vardır: 4418'i bakterilerden, 137'si Arkea'dan ve kalan 47'si NCBI veri tabanına dayalı olarak Ökaryot'lardandır .

Plazmidler çoğu bakteri türünde her yerde bulunur. Onlar gen akışının önemli ajanlarıydı. Paradigmatik bir örnek olarak, insan tıbbında giderek daha fazla tanınan bir tehdit olan çoklu antibiyotik direncinin ortaya çıkmasından ve yayılmasından sorumludurlar [90]. Yeni DNA dizilerini birleştirmek için çok sayıda yöntem tanıtılmıştır [91], şimdiye kadar kısıtlama endonükleaz enzimlerinin kullanımı moleküler klonlamada en yaygın olarak kullanılan tekniktir. Hem ekleme hem de vektör DNA dizileri üzerinde uyumlu kısıtlama enzim bölgeleri mevcut olduğunda, klonlama basittir; bununla birlikte, kısıtlama bölgeleri uyumsuzsa veya yerleştirme kasetinin yakınında herhangi bir kısıtlama bölgesi bile yoksa, klonlama daha karmaşık hale gelebilir. Uyumlu kısıtlama enzim sitelerinin gömülü olduğu PCR primerlerinin kullanımı, bu sorunu etkili bir şekilde çözebilir ve çok aşamalı klonlama prosedürlerini kolaylaştırabilir. PCR klonlama biyolojik mühendislikte büyük ölçüde kullanılmasına rağmen, gerekli tüm adımları ve ipuçlarını ardışık bir sırayla açıklayan pratik kılavuzlar az bulunmaktadır [92].

2.14. pET-28a (+) Vektörü

E. coli, iyi çalışılmış özellikleri ve ticari olarak temin edilebilen çok çeşitli vektörlere ve konakçı suşlara erişilebilirliği nedeniyle rekombinant proteinlerin üretimi için yaygın olarak kullanıldı. En popüler ekspresyon sistemlerinden biri, *E. coli* B suşları (örn., BL32(DE3)) ile kombinasyon halinde kullanılan pET vektör sistemidir [93].

2. 15. BL21 (DE3) Rosetta Dönüşümü

Moleküler klonlamadaki çoğu bilimsel araştırma *E. coli*'ye bağlıdır çünkü bu bakteri rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan en profesyonel konaktır. Bu bakteri aynı zamanda genetiği, yüksek transformasyon kapasitesi, basit kültür durumu, hızı ve ucuzluğu ile tanınırdı. *E. coli*'de farklı genler üretebilir ve bu genler farklı proteinlerin ifadesinden sorumludur [94]. Rosetta (DE3) konakçı suşları, bu bakterilerde kullanılan nadir kodonları içeren yüksek frekanslarda ökaryotik proteinlerin ekspresyonunu arttırmak için pRARE plazmitini barındıran mühendislik BL21 türevleriydi. Yaygın olarak kullanılan ek *E. coli* K-12 laboratuvar suşu, rutin klonlama için kritik bir platform sağlayan DH5 α idi. Yüksek verimli transformasyon ve spesifik olmayan endonükleaz I (endA1) eksikliği, yüksek kaliteli plazmit DNA'ya yol açmıştır [95, 96]. Gen, RNA polimeraz ekspresyonu gibi verimli bir şekilde inaktive edebilir, ancak indüksiyonun ardından ekspresyonun derecesi üzerinde doğrudan bir kontrolü yoktur. Kültür ortamı formu,

indükleyici konsantrasyonu, indüksiyon sonrası sıcaklık ve süre gibi indüksiyon koşullarının *E. coli*'de protein ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir [97]. IPTG, 100 uM ile 3.0 mM arasında bir konsantrasyon aralığına sahip etkili bir protein ekspresyonu indükleyiciydi. Kullanılan konsantrasyon, kullanılan hücreler veya plazmit genotipi ile birlikte uygun indüksiyonun yoğunluğuna bağlıdır. IPTG, yapısal bir laktoz analoguydu; ancak hücre içinde *E. coli* metabolik yolunun bir parçası değildi. Metabolik olmayan özellikleri, parçalanmaması nedeniyle laboratuvar deneyleri için ideal olmasını sağlar. Laboratuvar ortamında IPTG'nin birincil kullanımları, mavi/beyaz koloninin taranması ve rekombinant proteinlerin uyarılmasıdır [98]. IPTG, *E. coli*'de lac operon ekspresyonunu indükleyen ve lac represörünün bağlanmasında ve konformasyonunun değiştirilmesinde işlev gören, metabolize edilemeyen bir galaktoz analoguydu. Bu inaktivasyon, β -galaktosidaz için lac kodlayan genin baskılanmasını önlemektedir [99].

Füzyon yöntemi, bağımsız ligasyon klonlamasıydı ve DNA Polimerazın 3'-5' eksonükleaz aktivitesinin benzersiz özelliklerine bağlıydı [100]. Bu şema, Mg^{2+} ve düşük dNTP konsantrasyonlarının varlığında homolog uçlarla inkübe edilen lineer dubleks DNA'lar için gereklidir. Tek iplikli uçlar oluşturmak için 3 uçtan nükleotitleri kaldıran poksvirüsten DNA polimerazın 3'-5' düzeltme okuması işlemidir. Tamamlayıcı bölgeler, çentikli bir hibrit bölge, 1-5 nükleotit boşlukları veya kısa çıkıntılar içeren birleştirilmiş bir molekül oluşturmak için baz eşleşmesi sırasında kendiliğinden bağlandı. Dubleks uçlara kıyasla DNA polimerazın çentikli veya boşluklu DNA uçlarına düşük afinitesi, meta-kararlı yapıların yapılandırılmasına izin vermektedir. Son olarak, transformasyondan sonra *E. coli*, verildiğinde herhangi bir tek iplikli boşlukları onarabilir ve sonuçta , DNA'nın uçlarındaki bir rekombinasyon olayına eşdeğerdir. Bu nedenle In-Fusion klonlama yöntemi, genomdan seçilen kodlama bölgelerini pTriEx1.1 vektörüne klonlamak için en uygun yöntem olarak seçilmiştir [101].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Ekipman ve Cihazlar

Bu çalışmanın prosedüründe kullanılan tüm araç ve gereçler kaynaklarla birlikte aşağıda Tablo 3'de gösterilmiştir.

Table 1. Bu Çalışmada Kullanılan Araç- Gereçler, Şirketler ve Ülke

No.	Ekipman ve Cihazlar	Şirket	Ülke
1	Denge	Kernp	Almanya
2	Kuluçka Makinesi	Memmert	Almanya
3	Su banyosu	Memmert	Almanya
4	Pastör Fırını	Memmert	Almanya
5	hassas terazi	Sartorius	Almanya
5	Mikro-spin Santrifüj	biyosan	Almanya
6	Mikropipetler (10-1000µl)	İnsan	Almanya
7	Termik-manyetik karıştırıcı	Ika-Werk	Almanya
8	Girdap	Digsistemi	Almanya
9	Nanodrp	ThermoScientific®	Almanya
9	Otoklav	Tomy Seiko	Japonya
10	Mikroskop	Olimpos	Japonya
11	Spektrofotometre U-VIS	Shimadzu	Japonya
12	Dijital kamera	kanon	Japonya
13	Santrifüj	Hettich	ABD
14	Jel elektroforez sistemi	Aparat	ABD
15	Diyaliz Torbaları	Sigma	ABD
16	Termal döngü cihazı	Uygulamalı	ABD
17	Çalkalayıcı-İnkübatör	Biyosistem	ABD
18	Eppendorf tezgah santrifüjü	Esnaf Bilimsel	ABD
19	NanoDrop2000	Hettich	ABD
20	Mikrodalga	Termo balıkçı	Çin
21	Dondurucu (-20 ⁰ C)	Gosonik	Çin
22	Derin dondurucu (-80 ⁰ C)	Haier	Çin
23	Su damıtma cihazı	Haier	Çin
24	Ultraviyole ışık	Jrad	İtalya
25	Transillüminatör	Vilberlourmat	Türkiye
26	Brülör	Amal	İspanya
27	Buzdolabı	TEKA	UK
28	Sonikatör	Soniprep	İngiltere
29	Laminer akış başlığı	Gallenkamp	South
30	Nano damla	biyoner	Korea
31	Tek kullanımlık Petri	biyoner	Güney
32	Ultrasonik işlemci UP50H	Hielscher Ultrasonik	Kore
	HisTrap™ HP	GMBH©	Almanya
		SLS Uluslararası	İngiltere



Şekil 5. Thermal Cycler cihazı



Şekil 6. Thermal Cycler cihazı

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada deneyimlerde kullanılan kimyasallar aşağıda Tablo 2'de gösterilmiştir.

Table 2. Bu Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Şirketler ve Ülke

No.	Kimyasallar	Şirket	Ülke
1	MgCl ₂	abm	Kanada
2	Nükleaz içermeyen su	abm	Kanada
3	Etidyum bromür	abm	Kanada
4	Etilen-diamin tetraasetik asit (EDTA)	abm	Kanada
5	Agaroz	abm	Kanada
6	DNA yükleme boyası	abm	Kanada
7	DNA marker (100 bp)	Promega	ABD
8	Primerler	IDT	Kanada
9	Bisakrilamid	abm	Kanada
10	Akrilamid (BDH)	abm	Kanada
11	Sodyum dodesil sülfat	abm	Kanada
9	Metanol	abm	Kanada
10	Buzul asetik asit, Amonyum Persülfat	abm	Kanada
11	TEMED	abm	Kanada
12	NaHCO ₃	abm	Kanada
13	Bromofenol mavisi	abm	Kanada
14	Etanol	abm	Kanada
15	NaOH	BDH	İngiltere
16	Gliserol 20%	BDH	İngiltere
17	Sodyum klorür (NaCl)	BDH	İngiltere
18	İzopropanol	BDH	İngiltere
19	Sefakril S-1000	ROMIL pure	UK
20	Kanamisin	Chemistry	UK
21	IPTG	Sigma	Kore
22	Protein işaretleyici	Aldrich	Kore
23	Agar agar	Interon	Almanya
24	TBE (10X)	Interon	Hindistan
25	Alkali Fosfataz (SAP)	Santacruz	ABD
26	Tris-Asetat-TAE10X	Himedia	ABD
27	Sığır serum albümini (BSA)	Promega	ABD
28	Coomassie-blue G250	Thermo	ABD
29	Tris-baz rCutSmart®Tampon (10X)	Fisher	ABD
30	Triton X100	Promega	ABD
31	PMSF	Promega	ABD

3.1.3. Kitler

Bu çalışmada deneyimlerde kullanılan kitler aşağıda Tablo 3'da gösterilmiştir.

Table 3. Bu Çalışmada Kullanılan Kitler

No.	Kit	Şirket	Ülke
1	Genomik DNA saflaştırma	Promega	ABD
2	GeneJET PCR saflaştırma	Thermo Fisher	ABD

3	dNTP	Scientific GE Healthcare	ABD
---	------	-----------------------------	-----

3.1.4. Besiyerleri

Bu çalışmadaki deneylerde kullanılan besi yerleri aşağıda Tablo 4'te gösterilmiştir.

Table 4. Bu Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

No.	Besiyeri	Şirket	Ülke
1	Laura Bertani Agar	Difco	Hindistan
2	Laura Bertani Broth	Difco	Hindistan
3	Modifiye edilmiş Ezapelc'in dox suyu	interon	Kore

3.1.5. Bakteriyel Şuşlar ve Vektörler

E.coli (BL21) DE3 Rosetta suşu, rekombinant proteinler için ekspresyon konakçıları olarak kullanıldı. pET-28a (+) vektörü, ekspresyon vektörü olarak kullanıldı. Tüm bakteri suşları, %50 (h/h) gliserol stoklarında uzun süreli koruma için muhafaza edildi ve -80oC'de saklandı.

3.2. Yöntemler

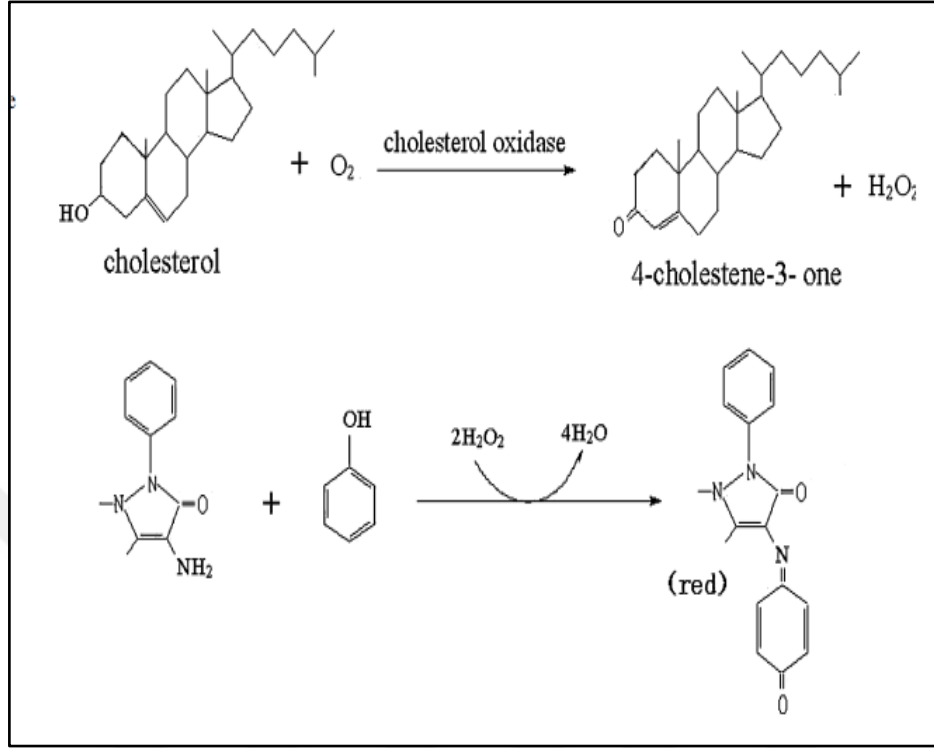
3.2.1. Kolesterol Oksidaz Deneyi

A. Deney Prensibi

Kolesterol oksidaz aktivitesi, daha önce belirtilen prosedüre göre spektrofotometrik olarak değerlendirildi [102].

Bu yöntemde, substrat olarak kolesterolün kolesterol oksidaz tarafından enzimatik sindirimi nedeniyle serbest kalan hidrojen peroksit, yaban turpu peroksidaz tarafından katalize edilen fenol 4-aminoantipirinin oksidatif bağlanmasıyla saptanabilmektedir.

İkinci reaksiyon, 500 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilen kinonimin kırmızı boyasının oluşumu ile sonuçlanacaktır (Şekil 3).



Şekil 7. Kolesterol oksidazın substrat olarak kolesterol üzerindeki etki mekanizması[103]

B. Test Prosedürü

1 mL %1 Triton X-100 içinde 3 μ M kolesterol, 100 μ L enzim solüsyonu, 300 μ M potasyum fosfat tamponu pH 7.0, 1,2 μ M 4-aminoantipirin, 21 μ M fenol ve 20 U yabancı peroksidazından oluşan reaksiyon karışımı son hacmi 3 mL olacak şekilde hazırlandı.

Enzim reaksiyonu, inkübasyon periyodu sırasında hafif çalkalama ile 37 °C'de 10 dakika boyunca gerçekleştirildi. Reaksiyon, 100 °C'de 3 dakika kaynatılarak durduruldu. Reaksiyon tüplerinin oda sıcaklığına soğutuldu. Daha sonra gelişen renk spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçüldü. Bir birim enzimatik aktivite (U): belirtilen test koşulları altında 37 °C'de dakikada bir mikromol H_2O_2 serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.2. Sterilizasyon Yöntemleri

Laboratuvarında Tercih Edilen Proses İçin Sterilizasyon Yöntemi

- **Otoklav:** Sterilize edilecek eşyaları ısıtmak için basınçlı buhar kullanılması, suyun varlığında yoğun ısı ile verimli bir şekilde elde edilen kültür sterilizasyonu için çok

etkili bir yöntemdir. Sıkıştırılmış buharın yüksek bir gizli ısı vardır; 121°C'de 15 dakikada sterilizasyon gerçekleştirilir.

- **Kuru Isı:** Cam eşyaların kuru ısı ile etkin bir şekilde sterilizasyonu için daha yüksek sıcaklıklar gerektirir, bu da genellikle 180°C'lik bir sıcaklık gerektirir.

3.2.3. Kimyasal Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan tüm çözeltiler üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki gibi hazırlandı:

1. Normal Tuzlu Su (NaCl) (%0,85); (0.85 gm) NaCl (10 ml) distile su içinde çözülerek son hacim distile su ile (100 ml)'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti otoklavlanarak sterilize edilmiştir.
2. Etidyum Bromür; (0.25 gr) Ethidium bromür boyasını (50 ml) distile su içinde çözüldü ve son konsantrasyonda (5 mg/ml) çözelti elde edildi ve 4°C'de saklandı.
3. Sodyum Hidroksit (NaOH)/(10N); 40 gr NaOH 60 ml distile suda çözülerek hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
4. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA)/(50 mm); (1.86 gm) Na₂-EDTA'nın (10 ml) Distile su içinde çözülmesi, ardından hacmi (100 ml) Distile su ile tamamlandı, ardından pH (8.0)'a ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

3.2.4. Kimyasal Tamponlar

Bu çalışmada kullanılan tüm tamponlar (IDT) Kanada 'dan temin edilmiş ve üreticilerin talimat protokolüne göre aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

1. Tris Borat EDTA Tamponu 1X (TBE 1X); 1000 ml TBE (1X) elde etmek için (900 ml) distile su eklenerek bir litreye kadar stok TBE solüsyonunun (10X) seyreltilmesi (100 ml) yapılmıştır.

3.2.5. Primer Hazırlama ve Saklama

Liyofize primerler (IDT/DNA Company) nükleaz içermeyen su ile stok çözelti olarak 100 picomol/μl olacak şekilde hazırlandı. 10 pikol/μl'lik primer solüsyonu, 90 μl nükleaz içermeyen suya 10 μl stok solüsyonu eklenerek hazırlandı ve sonrasında dondurucuda -20 °C'de saklandı.

3.2.6. Protein Saflaştırma Tamponları ve Çözümleri

- Lizis Tamponu: 25 mM Tris HCl ve 2 mM EDTA (pH 7,6)ile hazırlanmıştır.
- Elution Tamponu: 300 mM NaCl, %5 lik Gliserol ve 400 mM İmidazol'den pH 8'de 50 mM Tris ile hazırlanmıştır.
- Yıkama Tamponu: (NaCl'den 300 mM'de pH 8'de 50 mM Tris, İmidazol'den %5 Gliserol ve 20 mM) ile hazırlanmıştır.
- Tris-HCl Tamponu (0,05M, pH=8,0): Bu çözelti, 6.057g Tris-HCl'nin 900 ml distile suda çözülmesi, pH'ı 8'e ayarlanması ve ardından tam hacmi distile su ile 10000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Bradford Solüsyonu: 0,1 g Commasie Brilliant Blue G250'nin 50 ml %95 etanol içinde çözülmesi, ardından 100 ml fosforik asit (%85) solüsyonunun soğutulması ve karıştırılarak ilave edilmesi ve ardından distile su ile altlık hacmine tamamlanması ile hazırlanmıştır. Leke whatman filtre kağıdından iki kez süzüldü ve kullanıma kadar koyu renkli şişede 4°C'de saklandı.

3.2.7. Besiyerlerinin Hazırlanması

Laurie-Bertani (LB) broth ve LB agar, bu çalışmada kullanılan *E. coli* (BL21) DE3 Rosetta suşu yetiştirmek için kullanıldı [104].

- 10 g Tripton veNaCl ve 5g Maya ekstraktı 1 litre Distile suda çözdürüldü.
- LB Agar için %1,5 son konsantrasyona agar eklenmiştir.
- Karışımı kaynatarak agar ve diğer bileşenler çözdürülmüştür.
- Sterilizasyon, 121°C'de 15 dakika otoklav kullanılarak yapılmıştır.
- Son olarak sterilizasyonu kontrol etmek için kültür ortamını 37 °C'de 24 saat inkübe ettik.

3.2.8. *E. coli* BL21' nin Çeşitli Metal İyon Ortamlarında Üretilmesi

E. coli BL21 (DE3) Rosetta suşu bakteri suşu, MgCl₂ (0,1 M) ve CaCl₂ (0,1 M) tuzlu çözeltileri ile strese sokularak kimyasal işleme tabi tutulmuştur.

- İzole kolonilerden suşun ön aşuları, antibiyotik içermeyen Luria Bertani Broth (LB) ortamında, 5 mL'lik hacimlerde hazırlandı ve gece boyunca 37°C'de (200 rpm) altında inkübe edildi.
- 300 mL antibiyotik içermeyen LB'ye 5 mL ön inokulum eklendi ve 37°C ve 200 rpm'de 600 µm 0,4'te optik yoğunluğa (OD) ulaşana kadar (yaklaşık 3 saat) inkübe edildi.

- Bir kez O.D. ulaşıldığında, bakteri kültürü hacmi 4°C'de 10 dakika boyunca 5000 x g'de santrifüjlendi ve 40 mL soğuk MgCl₂ ile hücre yeniden süspansiyonu için sadece hücre peleti (pellet) saklı tutuldu.
- Bunu 4°C'de 3000 x g'de 10 dakika boyunca yeni bir santrifüj izledi ve ardından süpernatant atıldı.
- Pelet, bu sefer 2 mL soğuk CaCl₂ ile yeniden süspansiyon edildi, bakteriler 20 dakika buz üzerinde dinlenmeye bırakıldı, ardından 1 mL %50 gliserol ilave edildi.
- MgCl₂ ve CaCl₂ ortamında üreyen *E. coli* hücrelerinin gliserol stokunu içeren eppendorf tüplerine 100 µL'lik yerleştirildi ve -80 °C'de saklandı.

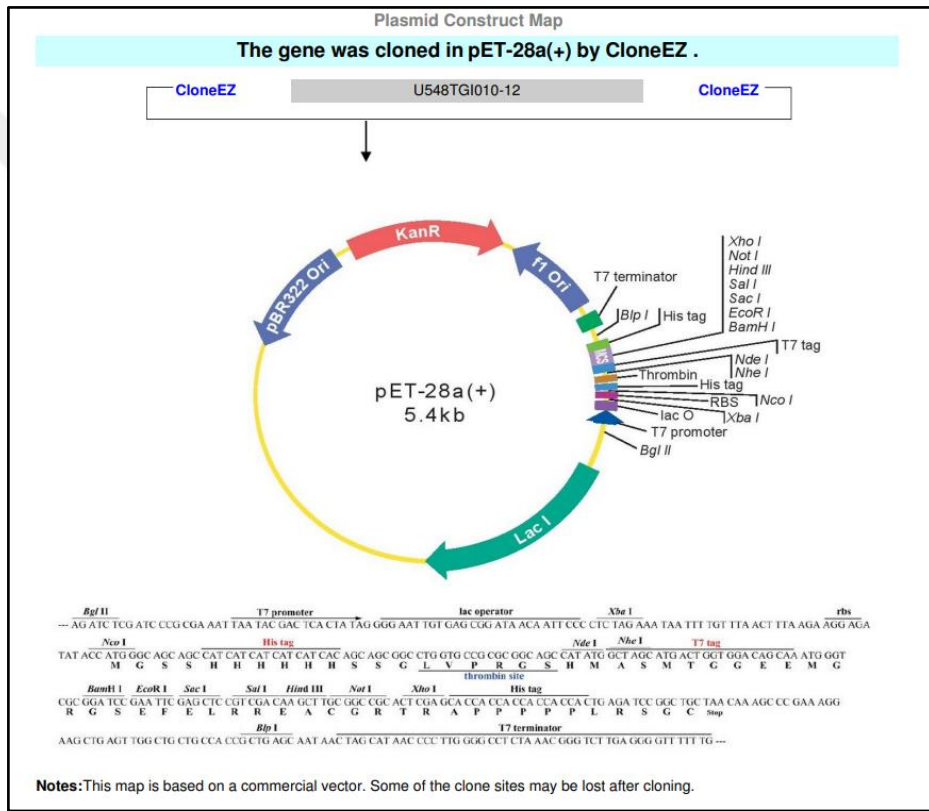
Yukarıda bahsedilen *E.coli* suşunun yetkin hücreleri, CaCl₂ kullanılarak daha önce anlatıldığı gibi [105] hazırlandı. Kısaca, 250 mL'lik bir Erlenmeyer şişesi içinde 100 mL LB'yi aşılama için 1 mL *E.coli* kültürü kullanıldı. Aşılama LB, 600 nm'de 0.4'lük bir optik yoğunluğa ulaşana kadar 37°C'de 200 rpm'lik bir çalkalama hızı ile 2-3 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra bakteri üremesi buz üzerinde 30 dakika durduruldu. Hücreler 4,500 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra bakteri peleti 20 mL soğuk 0,1 M CaCl₂ içinde süspansiyon edildi ve 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Hücrelerin toplanması 4,500 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek elde edildi. Bakteri peleti 2 mL soğuk 0,1 M CaCl₂ içinde süspansiyon edildi ve bu bakteri süspansiyonu eppendorf tüplerine dağıtıldı, Her tüp 100 uL bakteri süspansiyonu ve 100 µL %100 (h/h) gliserol içermektedir. *E.coli* hücrelerinin gliserol stoğunu içeren eppendorf tüpler -80°C'de saklanmıştır.

Eppendorf tüpteki (100 uL) kimyasal ortamda üreyen *E.coli* hücreleri, 2-3 uL (50 ng) vektör (plazmit) ile karıştırıldı. Karışım buz üzerinde 40 dakika tutuldu. Daha sonra hücreler su banyosunda 42°C'de 45 saniye ısı şokuna tabi tutuldu ve ardından eppendorf tüp 5 dakika buza daldırıldı. Daha sonra eppendorf tüpe 900 µL LB broth ilave edildi ve 37°C'de 180 rpm çalkalama hızı ile 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, bu 1 mL'lik kültür, kanamisin içeren LB agar plakalarının yüzeyine yayıldı. Daha sonra aşılama agar plakaları 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.2.9. *Williamsia marianensis* Suşu DSM 44944'ten Kolesterol Oksidaz Kodlayan Genin Klonlanması

W. marianensis suşu DSM 44944'ten kolesterol oksidaz genini kodlayan açık okuma çerçevesi GenBank'tan alındı. Bu açık okuma çerçevesi, QEOM01000003.1 erişim

numarası ile *W. marianensis* suşu DSM 44944'ün genomundaki c248375-246561 nükleotidlerinden oluşmaktadır. Kolesterol oksidaz lokusu için protein kimliği PVY31399.1'dir. Kolesterol oksidaz geninin (PVY31399.1) elde edilen nükleotid dizisinin uzunluğu 1834 bp'dir. Kolesterol oksidaz geninin bu nükleotid dizisi, Genscript Co., ABD tarafından sentezlendi. Daha sonra, ligasyondan bağımsız klonlama (LIC) olarak adlandırılan EZ Clone yöntemiyle pET-28a(+) ekspresyon vektörü üzerinde klonlandı. Şekil (2-4), *W. marianensis* suşu DSM 44944'ten kolesterol oksidaz genini taşımak için GenScript tarafından sentezlenen pET-28a(+)'nın vektör haritasını temsil ediyordu. Yapı, pET-28a (+)/Cox-william olarak adlandırıldı.



Şekil 8. *W. marianensis* suşu DSM 44944'ün kolesterol oksidaz geninin sokulma yöntemini gösteren pET-28a (+) haritası.

pET-28a (+)/Cox-william yapısı, yukarıda bahsedildiği gibi *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta'nın MgCl₂ ve CaCl₂ ortamlarında da üretilmiştir.

3.3.0. pET-28a (+)/Cox-william'ın *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerine Dönüştürülmesi

pET-28a (+)/Cox-william yapısını taşıdığı varsayılarak transformant hücrelerden rastgele seçilen beş tek koloni, 50 mL falkon tüplerde ayrı ayrı 15 mL LB/kanamisin'e aktarıldı. İnoküle edilen broth'lar 16 saat 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, GeneJET plazmit miniprep kiti (Thermo Fisher Co., ABD) kullanılarak on kültürden plazmit mini hazırlık yapıldı. İzole edilen plazmitler, pET-28a (+) vektörü üzerinde kolesterol oksidaz geninin varlığını kanıtlamak için PCR şablonları olarak kullanıldı. Tek bir koloniden kaynaklanan saf bir kültürden izole edilen her plazmit, MluI ve XhoI restriksiyon enzimi kullanılarak restriksiyon endonükleaz etkinliğine tabi tutuldu.

Reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1 µg plazmit, 4 U MluI, 4 U XhoI, 1 µL (10X kısıtlama sindirim tamponu), 3µL nükleaz içermeyen su karışımı, gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün restriksiyon endonükleaz aktivitesi agaroz jel kullanılarak gözlemlendi.

Table 5. PCR Reaksiyon Karışımı Hacimlerinin Protokolü

PCR Reaksiyon Karışımı	Son Hacim (25 µl)
2X Taq PCR MasterMix/boya ile	5
İleri Primer	1.5
Geri Primer	1.5
Plazmit DNA şablonu	4
Nükleaz içermeyen H ₂ O	13

3.3.1. PCR Termo Döngü Koşulları

PCR tüpleri termocycle içine yerleştirildi ve Tablolar 6'da belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

Table 6. Kolesterol Oksidaz Geninin Tespiti için PCR Isıl Döngü Koşulları Programları

Genler	Adım	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Kolesterol oksidaz	İlk denatürasyon	95.0 C ⁰	5 dk	1
	Denatürasyon	95.0 C ⁰	30 sn	35
	Primerlerin Bağlanması	63.0 C ⁰	1 dk	
	Primerlerin Uzaması	72.0 C ⁰	1 dk	

	Son Uzatma	72.0C ⁰	10 dk	1
	Tutmak	4.0 C ⁰	Daima	

Bu çalışmada kullanılan COX -*Willimansia* primeri Tablo 7'de listelenmiştir.

Tablo 7. COX *Willimansia* genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Dizileri (5' - 3')	Ürün Boyutu
COX- <i>Willimansia</i>	F*: ATGTACGATGGCGTGGTGTCTGTA R*: GCTCACACCGTCGGTCTTGGT	1809bp

3.3.2. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez daha önce bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir [105]. Kısaca, 100 mL TAE tamponuna (1X) 1,0 g agaroz ilave edildi (bakınız Ek I). Karışım, agaroz karışımını tamamen eritmek için ısıtıldı. Daha sonra, 0,5 ug/mL'lik bir nihai konsantrasyonda erimiş agaroz etidyum bromür ilave edildi. Erimiş agaroz, jel elektrofrez ünitesinin (Clever Scientific Co., UK) döküm tepsisine döküldü, ardından katılaştırılmış jelde kuyucuklar oluşturmak için tarak sokuldu. Jel katılaşmasından sonra döküm tepsi elektrofrez tankına daldırıldı. TAE tamponu (1X), jel tamamen tampon yüzeyinin altına daldırılana kadar ilave edildi. Her DNA numunesi, jele yüklenmeden önce 1X jel yükleme boyası (bakınız Ek I) ile karıştırılmıştır. Elektrofrez işlemi, anot ile katot arasında 5-8 Voltaj/cm'de 45 dakika süreyle gerçekleştirildi. Elektrofrezin sona ermesinden sonra, agaroz jel, bir UV transillüminatör (Clever Scientific Co., UK) kullanılarak ultraviyole (UV) ışık altında görüntülendi.

3.3.3. Hücre Hasadı ve Bozulması

Hücre lizisi, Hielscher Ultrasonics GMBH©'den bir ultrasonik işlemci UP50H kullanılarak sonikasyon yoluyla (genlik %50, döngü 1) mekanik olarak gerçekleştirildi. Pellete yaklaşık

10 ml lizis tamponu (20 mM İmidazol (pH 7,6) içeren 50 mM Tris ve 300 mM NaCl), 20 ul Triton X100 ve 100 ul PMSF (0,03 mM) ilave edildi. *E. coli*, nazıkçe yeniden süspanse edilen ve prosedür boyunca bir buz banyosunda dinlendirilen pET-28a (+)/Cox-william ile dönüştürülmüştür. Örnek, homojen bir hücre karışımı elde edilene kadar 30 saniyelik döngüler ve 20 tekrar ile sonikasyon aşamasına geçti. Hücre lizatı, hücre kalıntılarını ayırmak ve protein ekstraktını (çözünür fraksiyon) kurtarmak için 4 °C'de 30 dakika boyunca 10,000 xg'de santrifüjlendi ve lizatan 100 µL alınarak ayrı olarak santrifüjlendi, sonra -20°C'de saklanana kadar saklandı. Çözünürlüğü değerlendirmek için elektroforezde (SDS-PAGE) kullanılır.

3.3.4. Cox-william Proteininin Saflaştırılması

A. Metaller için Afinite Kromatografisi (IMAC)

Rekombinant Cox-william'ın saflaştırma işlemi için 3 yıkama tamponu (25, 50, 100 mM imidazol içeren 300 mM NaCl ve 50 mM Tris) ve elüsyon tamponu (300 mM NaCl, 50 mM Tris) hazırlandı. Tris ve 250 mM imidazol), her ikisi de pH 8.0'da. Nikel iyonu (Ni⁺) ile konjuge edilmiş agarozdan oluşan HisTrap™ HP kolonunun yaklaşık 2 mL'si, içinde saklandığı kalıntı alkolü çıkarmak için 5 mL Milli Q su ile yıkandı ve daha sonra lizis tamponu ile dengelendi ve yaklaşık 10 mL protein özü ile 1 saat, bir buz banyosunda ve yörüngesel çalkalama altında 100 rpm'de inkübe edildi.

Daha sonra bu hacim plastik bir desteğe yerleştirilerek kromatografik işlem başlatıldı, ilk olarak, 25, 50 ve 100 mM imidazol yaklaşık 35 mL yıkama tamponu ve 250 mM imidazol ile elüsyon, burada yaklaşık 7 mL saflaştırılmış fraksiyon kurtarıldı ve denatüre edici poliakrilamid jelde uygulamaya kadar 4 °C'de saklandı. 300 mM imidazol içeren tampon içindeki elüsyon fraksiyonu, 50 mM Tris tamponu ve 300 mM NaCl (pH 8.0) içinde diyalize edildi ve yaklaşık 5 mL'de konsantre edildi, 10 kDa membranlı Vivaspin (GE Healthcare®) yardımıyla -80°C'de saklanmaktadır.

B. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE analizi)

SDS-Polyacrylamide Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) [106]:

- %30 Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu; 29,2 gr akrilamidin (BDH) 70 ml dist.H₂O içinde 0,8 gr bisakrilamid ile çözülmesiyle hazırlanmış ve hacim distile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, ardından Millipore filtre (0,45 mm) ile süzölmüştür ve steril opak

kapta 1 gün süreyle saklanmıştır, en az 30 gün ve kullanımdan 15 dakika önce kabarcıklar vakumlandı.

- Alt tampon (Tris –HCl tamponu 1,5 M), pH =8,8; 17,15 g Tris-baz 80 ml distal suda çözülerek hazırlandı, pH 8,8'e ayarlandı, ardından hacim 100 ml distal suya tamamlandı ve süzme ile sterilize edildi ve 4°C'de saklandı.
- Üst tampon (Tris –HCl tamponu 0,5 M), pH =6,8; 0,7 g Tris-baz 60 ml distal suda çözülerek hazırlandı. pH 6,8'e ayarlandı ve hacim dist., H₂O yoluyla 100 ml'ye tamamlandı, daha sonra süzüldü ve 4°C'de saklandı.
- %10 Sodyum –dodesil sülfat (SDS); 10 gr SDS (BDH) distal suda çözülerek hazırlandı ve kuvvetlice karıştırılarak hacmi distile H₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.
- %10 Amonyum persülfonat (APS); 10 gm APS distile H₂O içinde çözülerek hazırlandı ve kuvvetlice karıştırıldı ve dist., H₂O ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- SAB; (%1 SDS+%10 β-markapto etanol + %10 gliserol + 0,6 Tris, pH 6,8 içinde %0,05 Bromofenol mavisi).
- 10X Çalışan tampon elektrot, 6 gm Tris-baz 28,8 gm Glisin ve 2 g SDS ile 200 ml distile su ile çözülerek hazırlanır, sonra her 25 ml çalışan tampondan Elektrot ünitesi ile çalışmak için 250 ml distal suya tamamlanır, 4°C'de saklandı. (Çökelti görülürse, kullanmadan önce tampon ısıtılabilir).
- Coomassie Blue Boyama Solüsyonu; (Metanol, 300 ml; Glasiyel asetik asit, 100 ml; Distile su, 600 ml) karıştırılarak hazırlanır.
- Yürütme Tamponu; 10 ml %12 çözücü jel ilk olarak aşağıdaki bileşenler kullanılarak hazırlandı: (3,3 ml damıtılmış su; 4,0 ml Akrilamid/bisakrilamid (%30); 2,5 ml Tris-HCl tamponu (1,5 M, pH 8,8); 0,1 ml Sodyum dodesil sülfat (SDS %10);0,1 ml Amonyum persülfonat (APS) %10;0,006 ml Tetrametiletildiamin (TEMED).
- Toplama (Staking) jeli aşağıdaki bileşenleri içeriyordu; (2,1 ml damıtılmış su; 0,5 ml Akrilamid/ bisakrilamid (%30); 0,38 ml Tris-HCl tamponu (1M, pH 6,8); 0,03 ml Sodyum dodesil sülfat (SDS %10); 0,03 ml APS (%10); 0,005 ml TEMED).

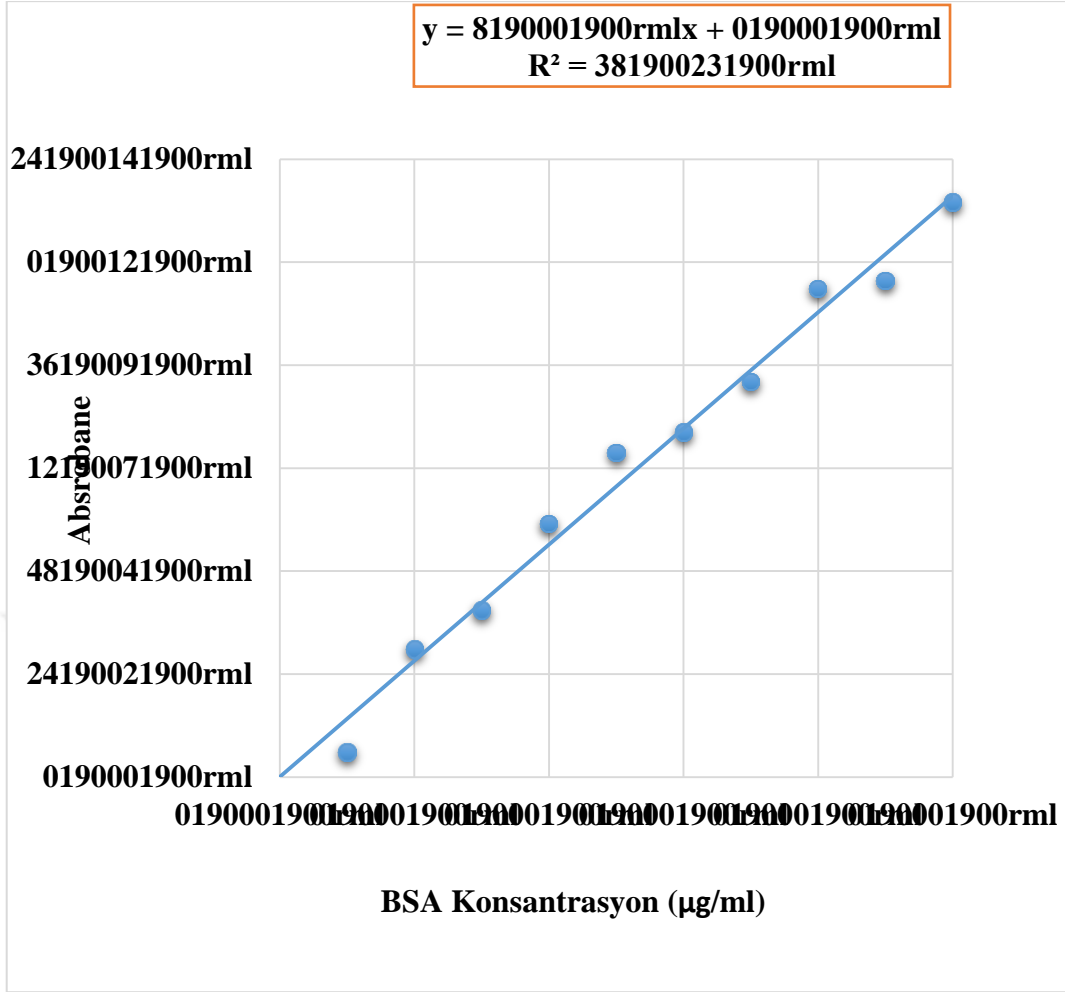
Havuzlanmış sonikasyonlu plazmit pET-28a (+)/Cox_william yaklaşık (5 mg/ml), 3X numune uygulama tamponu (SAB) ile karıştırıldı, ardından 3 dakika kaynatıldı ve oyuklara yüklendi. Çalışma, boya sabitleme jelini geçene kadar 15 mA'da başlatıldı, daha sonra akım, çözücü jelin dibine hazır olana kadar 30 mA ve 120 volt'a yükseltildi. Jel daha sonra çıkarıldı ve commassie parlak mavi solüsyonu kullanılarak gece boyunca boyandı, ardından boya giderme solüsyonu kullanılarak boya giderme yapıldı.

3.3.5. Elde Edilen Agaroz Jelden Gen Örneğinin Safaştırılması

Elde edilen %1'lik bir agaroz jelinde veya bir amplifikasyon sonrası solüsyonda bulunan gen fraksiyonunun safaştırılması, GeneJET PCR safaştırma (ThermoScientific®), DNA Temizleme ve Konsantrasyon Sisteminin ticari kitinin üreticisinin talimatlarına göre yapıldı. Safaştırılmış numuneler, Nanodrop ekipmanı (ThermoScientific®) kullanılarak spektrofotometri ile ölçülmüştür.

3.3.6. Rekombinant Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bradford yöntemine göre protein konsantrasyonu, standart protein olarak Coomassie-brilliant blue G250 ve bovin serum albümini (BSA) kullanılarak 0,5µg/mL konsantrasyonda standart olarak BSA kullanılarak belirlendi [107].



Şekil 9. Sığır Serumu Albümin Konsantrasyonunun Standart Eğrisi

3.3.7. Cox-William Aktivitesinin Belirlenmesi ve Protein Tayini

A. Modifiye edilmiş ezapalc'in Dox suyu

Cox-william enzimi üreten bakterilerin zenginleştirilmesi için kullanılan modifiye ezapalc'in dox broth yolu. Ortam, substrat olarak 0,01 M Cox-william ve bir gösterge olarak fenol kırmızısı (etanol içinde 2,5y) ile desteklenmiştir / Cox-william L-asparagin üzerinde etki gösterdiğinde, amonyak açığa çıkar ve alkalide fenol kırmızısındaki sarı rengin pembeye dönüşümüne yol açar şart. Ezapalc'in dox ortamı, aşağıdaki bileşiğin (g/L); (di-potasyum1; Potasyum dihidrojen fosfat 0,5; Magnezyum Sülfat heptahidrat 0,5; Sodyum klorür 5; Cox-william 3; Glikoz 10), pH 6,8, 25oC fenol kırmızısı 0,0094. ve 121C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

B. Silico Dizi ve Filogenetik Analizi

Nükleotidin sekansları, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tarafından elde edilen BLAST kullanılarak sekans veritabanı ile analiz edilmek ve karşılaştırılmak üzere elde edildi ve ClustalW, Jalview kullanılarak hizalandı ve kümelendi, BioEdit ve DNASTar programları.

W. marianensis Cox-william amino asidi dizisi, nükleotid dizisinin ExPASy sunucusundaki (<http://web.expasy.org/translate/>) çeviri aracı kullanılarak çevrilmesiyle elde edildi. Bu nedenle, Phylogeny.fr Yazılımı (<http://www.Phylogeny.fr>) kullanılarak ve [107] Liolios ve diğerleri'e göre, *Williamsia marianensis* Cox-william geninin Phylogenetic ağacı oluşturulmuştur.

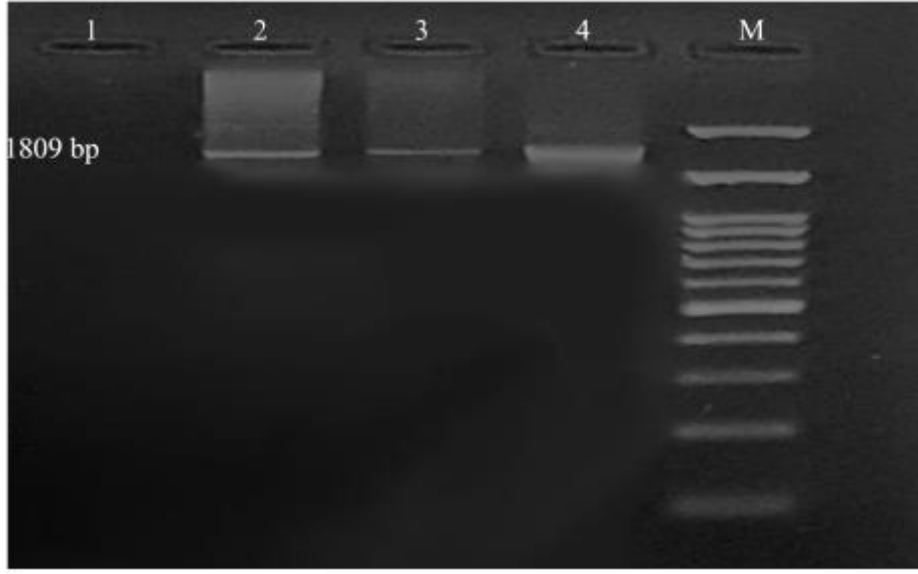
İkincil yapının tahmini, SAS çevrimiçi programına (yapıya göre açıklamalı dizi) göre yapıldı (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>). Daha sonra, verileri elde etmek için proteinin sekansı İsviçre model sunucusuna gönderilerek boyutsal yapı beklentisi yapılmış ve 3 boyutlu yapısal tahmin, PDB görüntüleyici programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Son olarak, protein 3D yapısının modellenmesi, TASSER ve LOMET yinelemeli montaj simülasyonu kullanılarak çoklu iş parçacığı hizalamalarına göre tasarlandı ve *Williamsia marianensis* Cox-william'ın moleküler kütle ve teorik (pI) değerleri, ProtParam aracı kullanılarak belirlendi [107].

4. BULGULAR

4.1. Kolesterol Oksidaz Deneyi

Testten sonra elde edilen enzim birimleri 4,5 U/mL dir. Şekil 10, yaklaşık olarak 1809bp olan COX -Willimansia geninin boyutunu göstermektedir.



Şekil 10. COX- Williamsonia gen amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi, M: Marker,

2-4: pozitif sonuçlar; 1: olumsuz sonuç

4.2. pET-28a (+)/CoxWilliam Yapısının Dizisi

pET-28a (+)/Cox-william yapısının tam dizisi aşağıda fasta formatında Şekil 11 gösterilmiştir. Ayrıca vektör yapısı, Şekil 11'de gösterildiği gibi SnapGene programı ile görselleştirildi.

> pET-28a (+)/Cox-william

```

tggcgaatgggacgcgcctgtagcggcgcaataagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactgcca
gcgcctagcgcctccttcgctttctccctcctttctcgccacgttcgccggttccccgtcaagctctaaatcgggggctc
ccttaggggttcgatttagtgccttacggcacctcgaccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggcatcgcct
gatagacggtttctgcctttgacgttgagtcacgttcttaataaggactcttgttccaaactggaacaactcaacctatctc
ggtctattctttgattataaggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaatatacgcgaatttaa
caaatattaacgtttacaattcaggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttattttctaaatacattcaaatat
gtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaatacatatttt
gaaaaagccgtttctgtaataagagaaaaactcaccgagcagttccataggatggcaagatcctggatcggctctgcgattccg
actgtccaacatcaatacaacctattaattccctcgtcaaaaataagggtatcaagtgagaaatcaccatgagtacgactgaatc
cggtagaatggcaaaagttatgcatttcttccagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcataca
ccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcagacgaaatacgcgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaat
gcaaccggcgcaggaactgccagcgcatacaaatatttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgtttccc
ggggatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggagaggcataaattccgtcagc

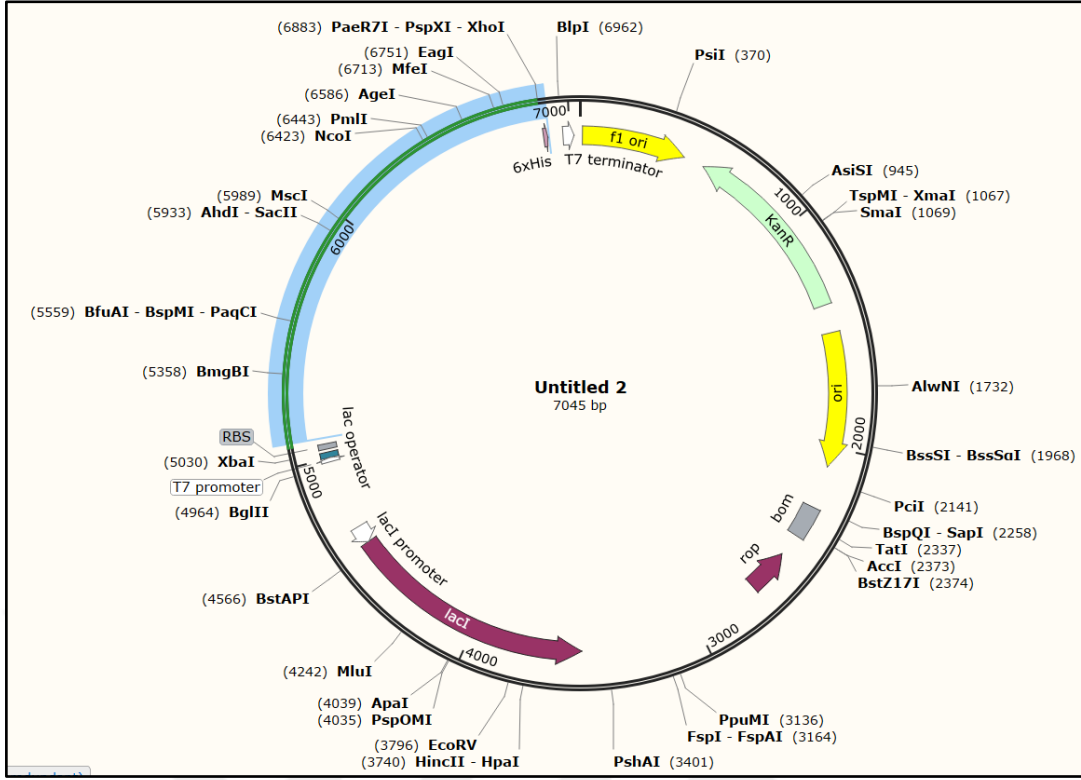
```


cagtttagctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttcagaaacaactctggcgcacgggcttccca
tacaatcगतगattgtcgcacctgattgcccगacattatcgcगagcccattataccatataaatcगacatccatgttगgaattaat
cgcggcctगagगcaगacgttcccgttगaatगgctcataacccccttगtattactgtttगtaगcगacगtttattgttcatg
acaaaaatcccctaacgtगagtttctgctcactगagcgtcगacccccगtagaaaगatcaaगगतcttctगगतccctttttctg
cgcgtaatctgctgcttगcaaaaaaaaccaccgctaccगcगgtggtttgttgcgगatcaगagctaccaactcttttccग
गgtaactggttगcगagगcगगataccaaactgtccttctगtगagccगtagttगgcccacttcaगaaactctगtag
caccgctacatacctcगctctgctaactctgttaccगtggctgctgcccगtggcgataagtcgtgcttaccgggtgactcaग
acगतगttaccggataगgcगcगcगgtcgggctगaacggggggtcgtgacacगcccगcttggगcगaacगacctaca
ccगaaactगगतacctacगcgtगगतatगगaaगcगccacgctcccगaaगगगaaगgcगगacगगतccगgtaगc
ggcगgggtcगgaacगगगagcगcगcगगggगgcttccगgggggaaacgcctggtatctttatगtctctgctgggttccac
ctctगacttगagcgtcगttttgtगतgctcगtccggggggcगgagcctatगaaaaacgcगcaacgcggccttttacगgtt
ctggccttttctggttcttctcगतatccctgattctgtgataaccगtattaccgctttgगतगतगत
accgctcgcgcगcगaacगaccगagcगcगcगगतगतगagcगगgaगcगgaगgcctगतgcggtattttctct
tacगतctgtgcggtatttcacaccगतatgtgctcctcगतacaatctgctगतgccगतगttaगccगतatacctc
cgctatcगतcगतgctggttgcggtcgcccccगacaccgccaacaccgctगcगcgcctगcगggcttगतगतccc
ggcatccgttacगacaगctgtगaccgtcctccgggगतगतगतगaggtttaccगतcaccgaaacgcgcगग
cगctgcggtaaगctcatcगcगgtgctggaगcगattcacगतगतctgctgttcatccgcgtccगctcgttगतtttcca
gaगcgttaatgtctgcttctgataaगcgggctatgtaगggcggttttctgttggctactगतgcctccgttaगggggg
tttctgttcatgggggtaatगतaccगतgaaacगगगगतगतctcacगतacgggttactगतगतgaaatgcccgttactg
gaacgttगतgagggtaaacactggcggatgगतgcggcgggaccगagaaaaatcactcगgttcaatgcगcगcttctgt
aatacगतगतगgttccacगggtगccगcगcगतctcगतgcगतccggaacataatggtgcगggcगctgacttcc
gcgttccगactttacgaaacगgaaaccgaगaccattcatgttgttgcगaggtcgcगacगttttgcगcगcगctcgttca
cgttcgtcgcगतcgggtattctgctaaccगtaगggaaccccgcगcctगagccgggtcctaacगcगgगcगcग
atcatgcgcaccctggggccgctatccggcgataatggcctgcttctcgcgaaacgttgggtggcgggaccगतगcगaaग
gcttगagcगggcgtgcaगattccgaataccgcaगcगacगggcगतcatcgtcgcgtccगcगaaगcggctcctcgc
gaaatgaccगagcगctgcggcactgtcctacगgttगतgataaगaaगacगतcataगtgcggcगcगतगतatg
ccccgcgccaccggaगgगतgactgggtgaaगgtctcaगggcगतcggtcगगतcccgggtgcctaगतगतgactaa
cttacattaattgcgttgcgtcactgcccgttccगtccgggaaacctgtcgtgccगctgcattaगतaatgcgccaacgcgcg
gggगगगggcgttgcgtattgggcgccगggtggttttctttcaccगतगagacgggcaacगctgattgccttaccgctg
gcctगगगगgttgcगcaगcgtccacgtggttgcgccगcगgaaatcctgttगतggtggttaacggcgggata
taacगतगतcttctggfatcgtगतtcccactaccगतatccgcaccaacgcgcगccccगactcggtaatggcgcगत
tgcgccगcgcctatगतctgttggcaaccगctcgcगतgggaacगतgcctcattcगcattगतggttgtgaaacc
ggगतggcactccगctgccttcccgttccगतatcggctgaattgattgcगगतगतatttatgcगccगccगcगcग
acgcgccगगacगaaactaatgggcccगtaacगcgcगatttctggtgacctaatgcगaccगतgtccacggccगctc

cgtaccgtctcatgggagaaaataataactgttgatgggtgtctggcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtcagg
cagctccacagcaatggcatcctggcatccagcggatagttaatgatcagcccactg
acgcgttgccgcgagaagattgtgcaccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacc
cagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcag
caacgactgtttgcccgccagttgttgccacgcggtgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttttcccgcgttt
cgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcatactctcgacatcgtataacgtt
actggtttcacattcaccacctgaattgactctctccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattc gatggtgc
cgggatctcgacgctctcccttatcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgagggcgttgagcaccgccgcgc
aaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcg
ctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgctggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccg
gtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgaactcactataggggaattgtg
agcggataacaattcccctctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatacc**ATGTACGATGGCGTGGT**
GTCTGTATCACGCGGTAACAGCTACTCCAGCCGAGCAGCCGGCCACTC
GCGAGAAGCACGATTACGACGTATTGATCGTCGGATCGGGCTTCGGTGGG
AGTGTCAGCGCCTTACGGCTGGTCGAGAAGGGCTACAAGGTGGGTGTCGT
CGAAGCGGGCCGACGGTACGCCGACGACCAGTTCGCCAAAACCAGTTGG
CGACTGCACAAGTGGCTGTGGGCTCCCAAGCTCGGGATGTTCCGGCATCCA
ACGCATCCATCTGCTCAAAGACGTGATGGTGTGATGGCCGGTGC GGGCGTCCG
GCGGGCGGGTCACTGAACTATGCCAACACTCTCTACAAACCGCCGACACCG
TTCTTCCGAGATCCACAGTGGGAGCACATCACCGACTGGGAGAGCGAGCT
GTCGCCGTACTACGACCAGGCCAGCCGCATGCTGGGTGTGGTCAGCACCC
CGATCGTCACCCACGCCGACCGCGTCATGCGGCAGGTGGCCGACGAGAT
GGGGGTGGGTGACACCTTCGGGCCGACCCCCGTGGGCGTCTTCTTCGGT
GAGAAGTCCGGTGGCACAGGAACTCCGGGCGAGCGGGTGGCCGATCCGT
ACTTCGGGGGCGCAGGCCCCGACCGGACGGTGTGTGTCGAGTGTGGCGC
CTGCATGACCGGATGCCGGTACGGCGCGAAGAACACCCTGCTGAAGAACT
ACCTTGGTCTGGCCGAATCACGCGGGGCGACGATTCTCGACCGCACCCAG
GTCACCGGGCTGGATCCGCAGGCAGACGGCAGCTGGAAGGTGCACACGG
CTCGGTCCGGCGGCCTGGGGCCGGATCGGTGCCCGCCGCCGGACCCTGAC
CGCGGGTCAAGTGTGTCGCCCGCGGTACGTTCAACACCCAGAAGATCA
TGCATCTGGCCAAGGACAGGGGTTTCGCTGCCGGAACCTTCCGAGACGTTG
GGTGTGCTGACCCGCACCAACTCCGAATCGATCTTGGGTGCGATGCGCCG
TTCTACGATCCGGCACAGGATTTCTCCGAGGGCATCGCGATCACCTCGT
CCTTCCACCCGTCGCCCCGACACGCACATCGAACCAGTCCGATATGGCAAG

GGATCCAACGCCATTGCGGCGCTGCAGACATTCCTCACCGACGACAAGCC
GGGTCGGTCGAGGCGGCTCAAGCTGCTCGACAAGGCCCGTGAAGAGGGC
TGGCGGGGCGTTCTGCAGCTGATCTGGTTGCGGCATTGGAGTCAGCGCAC
GGTGATCCTGCTGGTGATGCAGAACCGGAACAATTCGCTCACCACTTCG
TGAAGAAGTTCGGGCGGTGGCGTCTGGTCACCACCAAACAGGGCCATGG
GGAGCCCAACCCACGTGGATCCCTGCGGGTAACGAAGCCACCGAGCGT
GCGGCGAAACAGTTCGACGGTCTGCCCCGGCGGAACCTGGGGAGATGTGT
TCAACATGCCGCTCACCGCTCACTACCTCGGCGGGTGTGTGATCTCCGAC
AGTCCCGACACCGGTGTGATCGACCCCTACCACCGGGTGTGGAATTACCC
GACCCTGCACATCACCGATGGTGCGGCCATCTCGGCGAACCTTGGTGTCA
ATCCCTCGCTGTCGATCTGTGCCAGGCCGAGCGCGCAATTGCGTTGTGG
CCCAACAAGGGTGAGCGCGACATCCGGCCGCGCAAGGCGAACCCCTACG
AGCGGATCTCGCCGACGCCGCCCAAGGCGCCGGTGGTTCCGGCGGATGC
GCCCGGTGCGCTTCGGCTGCCACTGACGGTGATCACCAAGACCGACGGT
GTGAGCGCCctcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaagcccgaaaggaagctgagttggc
tgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttgctgaaaggaggaactat
atccggat

Şekil 12: Fasta formatında pET-28a (+)/Cox-william'ın tam dizisi. Küçük harflerle dizi: pET-28a (+) vektörü. Büyük harflerle yazılan kalın harflerle dizilim: kolesterol oksidaz geni. Kırmızıyla vurgulanan dizi: kolesterol oksidaz geninin başlangıç kodonu. Soluk maviyle vurgulanan dizi: 6-His etiketleri. Menekşe rengiyle vurgulanan dizi: durdurma kodonu. Sarı ve yeşille vurgulanan diziler: sırasıyla MluI ve XhoI için tanıma bölgeleri.

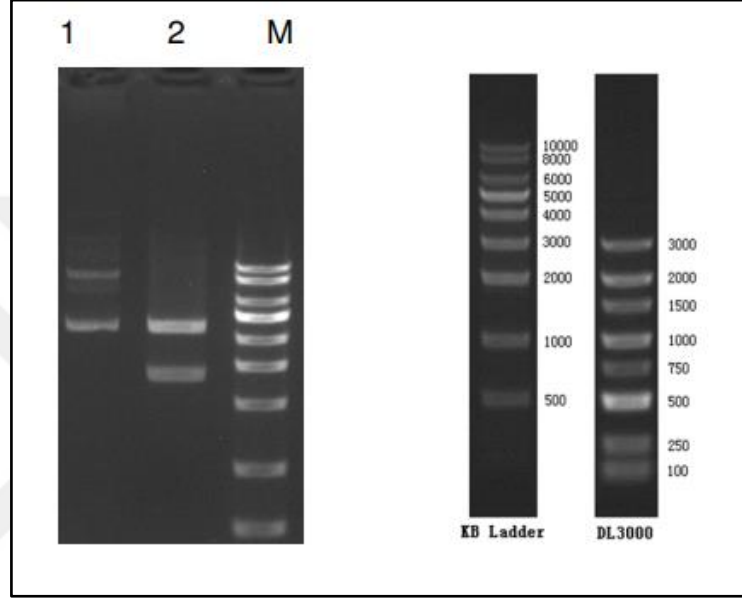


Şekil 11. SnapGene yazılımı tarafından oluşturulan, GenScript Co. tarafından sentezlenen rekombinant yapı pET-28a (+)/Cox_william'ın haritası. Kolesterol oksidaz geninin eklenmesinden sonra rekombinant plazmitin tam uzunluğu 7045 bp'dir

Gösterildiği gibi, tam uzunluk 7045 bp'dir. Şekil 13'de gösterildiği gibi, beklenen rekombinant protein kolesterol oksidaz, nükleotid seviyesi ve protein seviyesi açısından sırasıyla 1821bp ve 69,3 kDa moleküler ağırlığa sahip olmalıdır. Kolesterol oksidaz geninin uzunluğu 1821bp idi. 6-His etiketi, rekombinant kolesterol oksidaz proteinine 18 ekstra amino asit katacaktır. Ayrıca, XhoI'nin tanıma bölgesi iki ekstra amino asit ekleyecektir. Ayrıca, XhoI'nin tanıma bölgesi iki ekstra amino asit ekleyecektir. Böylece, rekombinant kolesterol oksidaz proteinine 23 ekstra amino asit eklenecek ve bu da 630 amino asitli bir rekombinant kolesterol oksidaz proteininin ekspresyonu ile sonuçlanacaktır. Durdurma kodununun çıkarılmasından sonra, nihai rekombinant protein 629 amino asitten oluşacaktır. Rekombinant proteinin beklenen moleküler ağırlığı 69,3 kDa'dır.

4.3. MluI ve XhoI ile pET-28a (+)/Cox-william Yapısının Çift Kısıtlamalı Sindirim Modeli

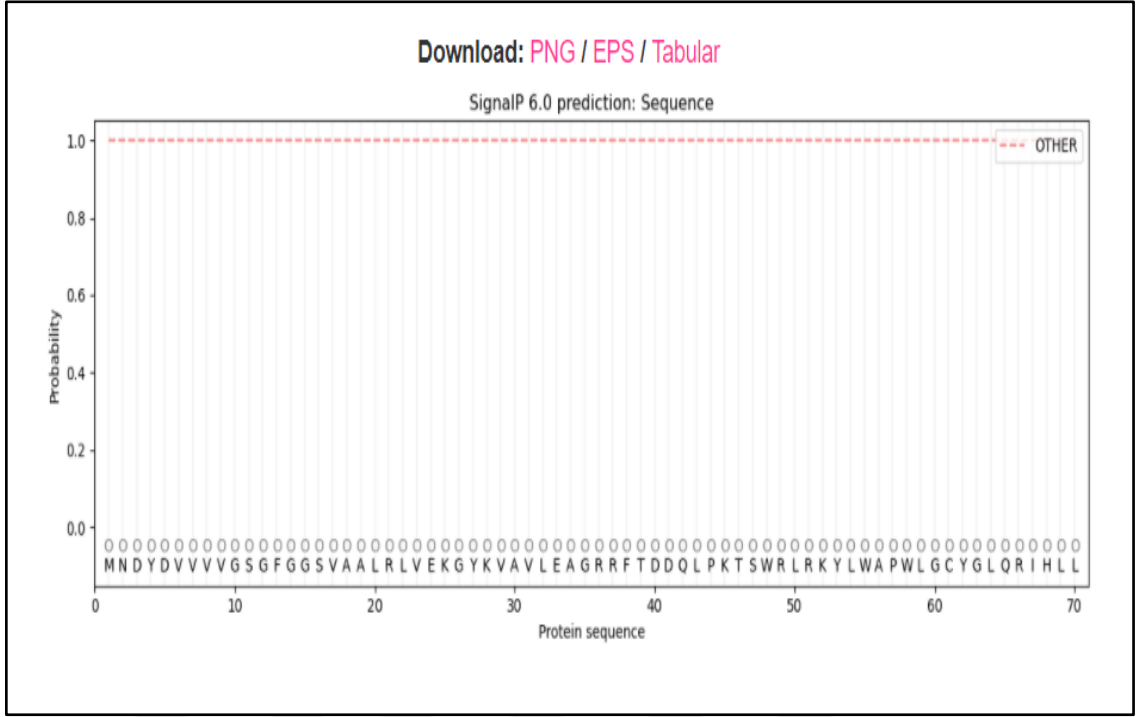
pET-28a (+)/Cox-william'ın çift kısıtlamalı sindirim modeli Şekil 12'te gösterildi. Elde edilen model iki banttı: biri plazmit vektörü için (~4200 bp) ve kolesterol oksidaz genini taşıyan 2800 bp bandı.



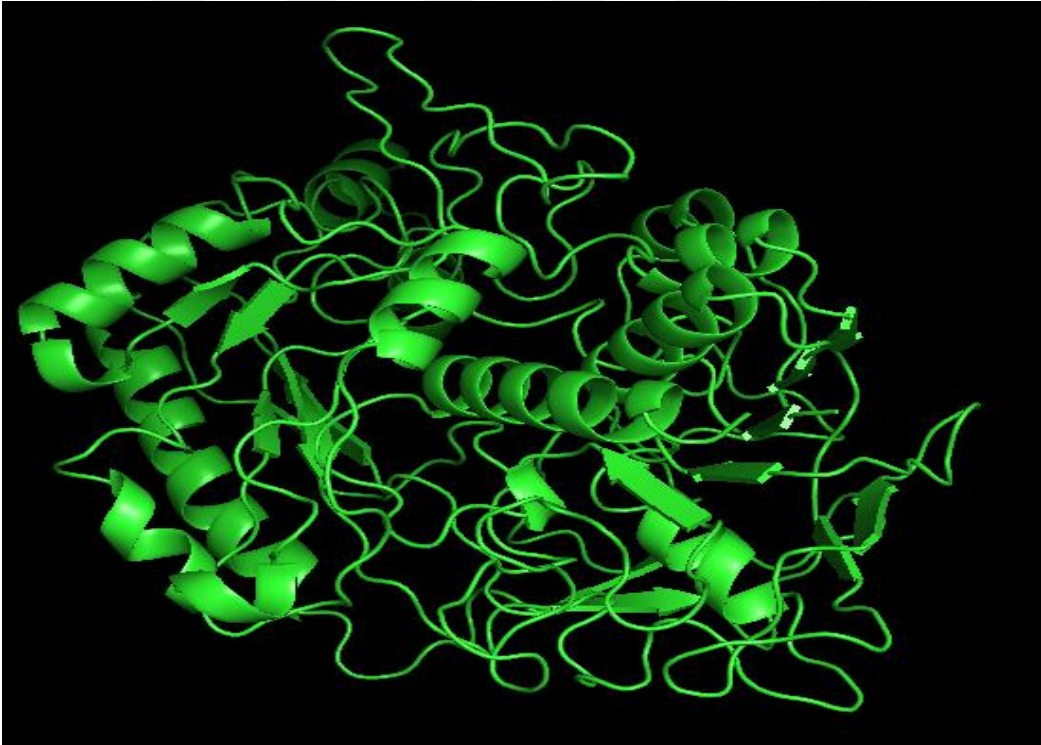
Şekil 12. pET-28a (+)/Cox-william'ın MluI ve XhoI ile kısıtlama sindirimi modelini gösteren agaroz jel elektroforezi (%1). Üst bant: plazmit vektörünün 4200 bp'si. Alt bant: 2800 bp: ek kolesterol oksidaz dahil. M: 1kbp DNA markerı

4.4. Cox Protein Dizisinde Sinyal Peptidinin Varlığının Tespiti

W. marianensis 'ten kolesterol oksidazı kodlayan PVY31316.1 protein kimliği için hiçbir sinyal peptidi saptanamadı.

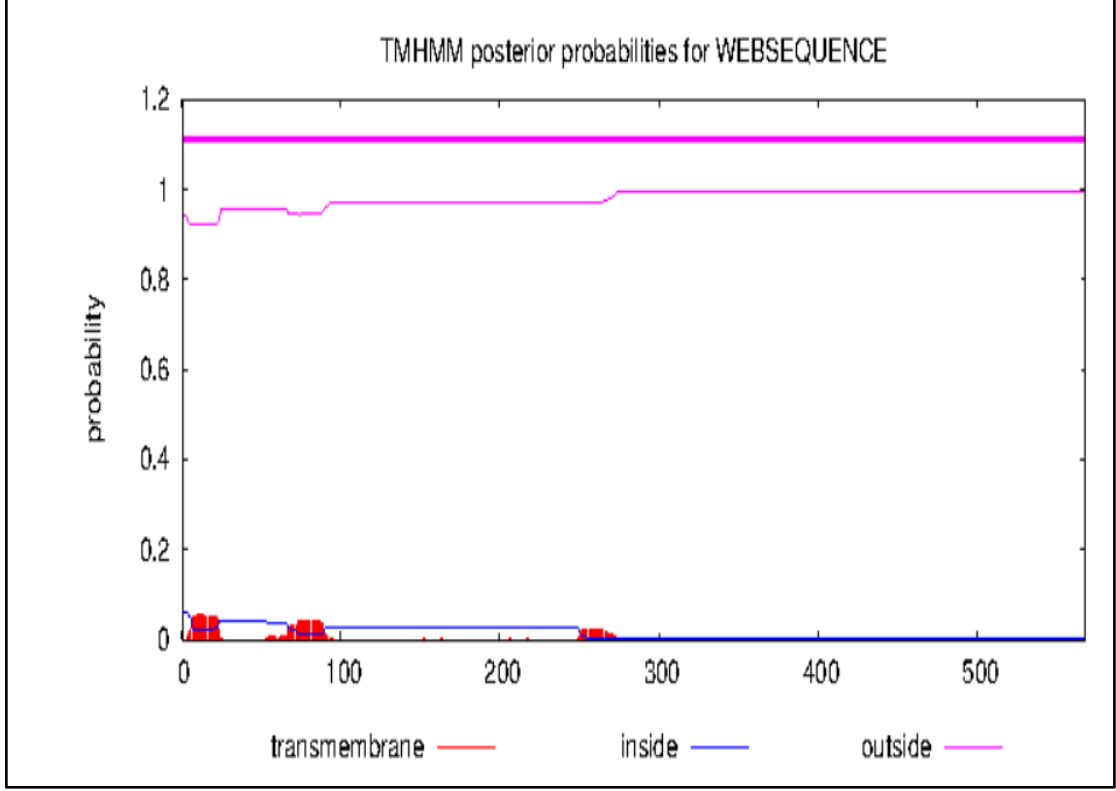


Şekil 13. Protein dizisi ID: PVY31316.1'de sinyal peptidi varlığının tespiti için sinyal sunucusu 6.0'dan çıktının diyagramı.

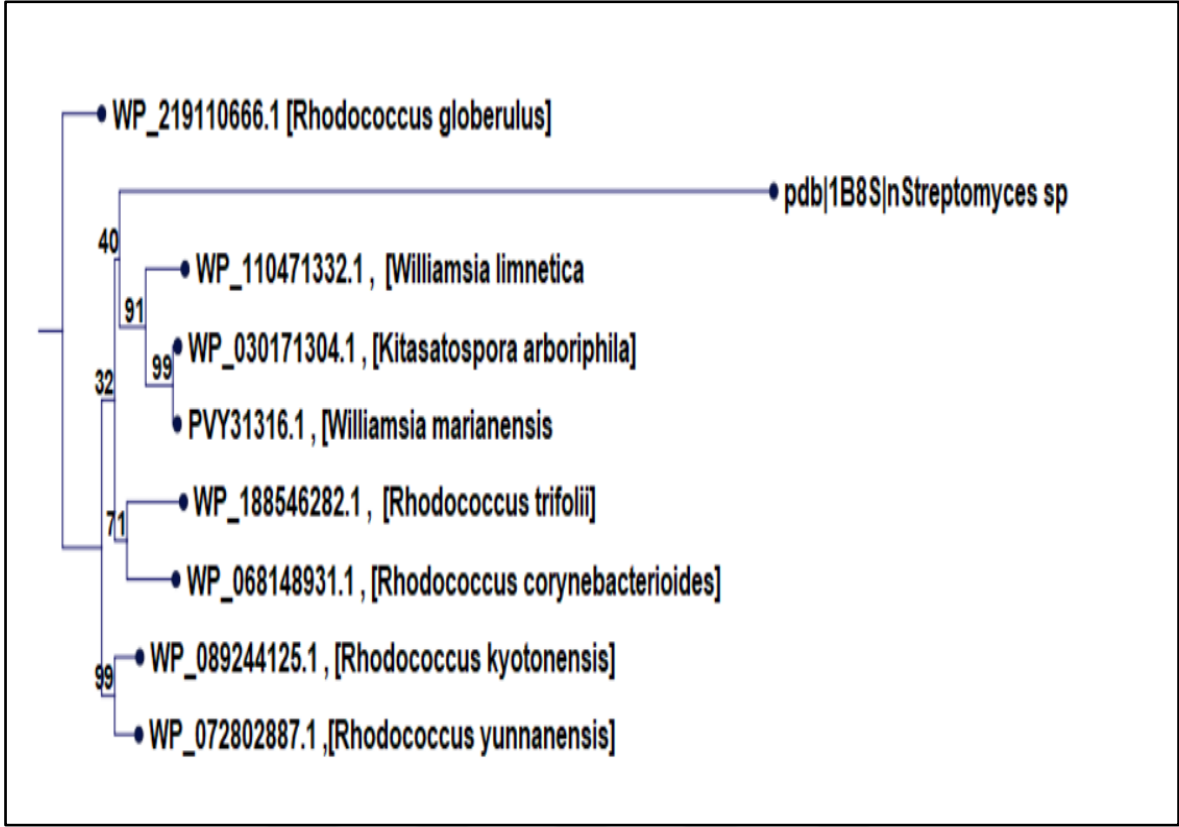


Şekil 14. *W. marianensis*'in kolesterol oksidaz protein dizisinin tahmini üç boyutlu yapısı (Protein ID: PVY31316.1)

Üç boyutlu yapı, SWISS-Model çevrimiçi sunucusu tarafından tahmin edildi. Kullanılan şablon 6a2u.1.B'dir (Burkholderia cepacia FAD glikoz dehidrojenazdan gama-alfa alt birim kompleksinin kristal yapısı). PVY31316.1 ve 6a2u.1.B arasındaki dizi özdeşliği %23.09'dur. Öngörülen üç boyutlu yapı PyMOL programı ile görselleştirilmiştir. Sorgu protein dizisinde herhangi bir transmembran bölgesi tespit edilemedi.



Şekil 15. PVY31316.1'in (*W. marianensis* 'ten oksidaz) transmembran bölgesinin varlığının saptanması için TMHMM-2.0 programından çıktı diyagramı



Şekil 16. *W. marianensis*'in kolesterol oksidazı (Protein ID: PVY31316.1) ve diğer türlerden diğer kolesterol oksidazlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren CLC Dizisi tarafından oluşturulan komşu birleşen Filogenetik ağaç.

MNDYDVVVVSGFSGSVAALRLVEKGYKVAVLEAGRRFTDDQLPKTSWRLRKY
LWAPWLG CYGLQRIHLL

PDVLVMAGAGVGGGSLNYANTLYQPPKRFFEDPQWGHITDWQDELNPYYDQAR
RMLGVVDNPLVTAADKV

MREVADDMGVGDTFTTTPVGVFFGNGTEREADPFFGGVGPERTACTECGSCMTG
CRVGAKNTLVKNYLHL

AENAGVTVLPLTTVRAVRPAAEGYELVTRRTGAKLRRKDRSIFAGQVVFAAGTY
GTQKLLLAMKETGELP

ELSDQLGSVVRTNSEAVLAATARDREVDYTGIAITSSFHPDDHTHIEPVRYGKGS
NAIGLLQTVLSDGG

GPVPRVFKTIGVALRHPAAFFRSLSVRHWSEKTVIALVMQTDDNSLELGSKRTIFG
RQLTSRRGAGDPPP

SWIPQGHKAI RLLADKIDGDPGGSIAEVVNIPMTAHFLGGCVIGADADHGVVDPY
HRIYGHPGLHVVDGS

AVSANLGVNPSLTITAQAERAIAMWPNKGEQDKRPGLGEPYRRVAATAPRSPVVP
ESAPGALRLPLFVTM

PESAKGAC

>WP_030171304.1 GMC family oxidoreductase [*Kitasatospora arboriphila*]

MNDYDVVVVVGSGFGGSVAALRLAEKGYKVAVLEAGRRFTDDQLPKTSWRLRKY
LWAPWLGCYGLQRIHLL

PDVLVMAGAGVGGGSLNYANTLYQPPKRFFEDPQWGHITDWQDELNPYYDQAR
RMLGVVDNPLVTAADKV

MREVADDMGVGDTFTTTPVGVFFGNGTERESDPFFGGVGPERTACTECGSCMTG
CRVGAKNTLVKNYLHL

AENAGVTVLPLTTVRAVRPSADGYEVVTRRTGAKLRRKDTSIFAGQVIFAAGTYG
TQKLLAMKETGELP

ELSDQLGSVVRTNSEAVLAATARDRKVDYQTQGIATSSFHPDDHTHIEPVRYGKGS
NAIGLLQTVLSDGG

GPVPRVFKTIGVALRHPAAFIRSLSVRHWSEKTVIALVMQTDDNSLELGSKRTIFG
RQLTSRRGAGDPPP

SWIPQGHEAIRLLADKIDGDPGGSIAEVVNIPMTAHFLGGCVIGADADHGVVDPYH
RIYGHPGLHVVDGS

AVSANLGVNPSLTITAQAERAIAMWPNKGEQDKRPGLGEPYRRVPATAPRSPVVP
ESAPGALRLPLFVTM

PESAKGAC

>WP_110471332.1 GMC family oxidoreductase [*Williamsia limnetica*]

MNDYDVVIVVGSGFGGSVAALRLAEKGYKVAVLEAGRRFADDELPKTSWRLRKYL
WAPWMGCYGVQRIHLL

PDVLVMAGAGVGGGSLNYANTLYKPPTRFFEDPQWGHITDWHDELTPYYDQARR
MLGVVDNPSVTPADKV

MREVADDMGVGSTFTTTPVGVLFGNPGEQVADPFFGGAGPERTACTECGSCMTG
CRVGAKNTLVKNYLHL

AEEAGVTVLPLTTVRAVRPAGDDYEIVTRRTGAKIRREKSIFAGQVVFAAGTYGT
QKLLLAMKETGQLP

HLSDPLGSVVRTNSEAVLAATARDRKTDTYQGIAITSSFHPDDHTHIEPVRYGKGS
NAIGLLQTVLSDGG

GKVPRILKTAGVAVRKPGAFMRSLSVRHWSEKTVIALVMQTDDNSLELGSKRGIF
GRQLTSRAGAGDPPP

AWIPQGHEAIRLLADKIGGDPGGMAEIVNIPMTAHFIGGCVIGADPGEGVVDPYH
RMFGHPGLHVVDGS

AVSANLGVNPSLTIAAQAERAIAFWPNKGEIDERPDLGADYRRISPIRPLAPAVPEQ
APGALRLPLFVRD

RPNP

>WP_089244125.1 GMC family oxidoreductase [*Rhodococcus kyotonensis*]

MSDFDVLVIGSGFGGSVAALRATEKGYRVGVLESGRRFADDELPKTSWRLRKYL
WAPALGCYGVQRIHLL

PDVLVMAGAGVGGGSLNYANTLYQPPKRFFEDPQWGHITDWHRELAPYYDQAK
RMLGVETNPTITPSDKV

MKEVADDMGVGETFTSTPVGVFFGEAGKTSPDFFGGVGPARTGCTECGSCMTG
CRVGAKNTLVKNYLYL

AEQAGAEVFPLTTVTAVRPAEGGGYQVVTRRTGGKVRRAETVMTADQVVFAAG
TYGTQKLMLAMKETGQL

PGLSDRIGSLVRTNSEAVLAATARGREVDYTEGVAITSSFHPDDHTHIEPVRYGKG
SNAIGLLQTVLSDG

GGRTPRILKTLGVALRHPGAAMRSLSVRRWSERTVIALVMQTDDNSLELGSKKGL
FGRTLTSRPGAGDPP

PEWIPQGHTAIRLLADKIGGDAGGSIADVVDIPMTAHFLGGCAIGDSAERGVVDAY
HRVFGYDGLHVVDG

SAVSANLGVNPSLTITAQAERAMALWPNKGEKDARPGVGEPYRETTPTQPSRPVV
PAAAPGALKLPLLQR

GSSCGA

>WP_072802887.1 GMC family oxidoreductase [*Rhodococcus yunnanensis*]

MSDYDVLVIGSGFGGSVAALRATEKGYRVGVLESGRRFADDELPKTSWRLRKYL
WAPAIGCYGVQRIHLL

PDVLVMAGAGVGGGSLNYANTLYQPPKRFFDDPQWGNITDWHRELGPYYDQAK
RMLGVEKNPTITQSDKV

MKEVADDMGVGETFTSTPVGVFFGTAGEKSPDPFFGGVGPSRTGCTECGSCMTGC
RVGAKNTLVKNYLYL

AEHAGAQVFPLTTVTAVRPATGGGYEVVTRRTGGKLRRRTETVMTADQVVFAAGT
YGTQKLLLAMKETGRL

PALSERIGSLVRTNSEAVLAATARGRDVDYTQGVAITSSFHPDDHTHIEPVRYGKG
SNAIGLLQTVLSDG

GGRTPRLLKTVGVALRHPGAALRSLSVRRWSERTVIALVMQTDDNSLELGSTKGL
FGRHLTSRPGPGDPP

PQWIPQGHEAIRLLADKIGGDPGGSIAEIVNIPMTAHFLGGCAIGDSARTGVVDAY
HRVYGYEGLHVVDG

SAVSANLGVNPSLTITAQAERAMALWPNKGELDARPALGSEYREIVPHTPARPVV
PVAAPGALRLPLTAL

GGSTCGA

>WP_188546282.1 GMC family oxidoreductase [*Rhodococcus trifolii*]

MSFDYDVLVVGSGFGGSVSALRLTEKGYRVGVLEAGRRFEDDELPKTSWRLRKY
LWAPALGCYGIQRIHL

LPDVLVMGGAGVGGGSLNYANTLYQPPSSVFEDDQWADITDWEELTPYYDQAR
RMLGVEDNPTITPADK

VMSDIANEMGVGDTFTTTPVGVFFGEGQRGKDIADPYFGGAGPGRTACTECGSC
MTGCRVGAKNTLVKNY

LYLAEKAGAQVPLTTVVRTVRPRPGGGYDVVTRRTGAKLRRKETVLTAEQVIFAA
GTYGTQKLMLHAKAI

GDLPKLSDKLGSVVRTNSEAVLAATAHNRDIDYTEGVAITSSFHPDDHTHVEPVR
YGKGSNAIGLLQTVL

SDGGGRVPRPLKTLGVAVRHPVAAFRLSVRNWSERTVIALVMQTDDNSLELGTK
RGRLTSRKGPDP

SWIPQGHTVVRKAAEKIGGDPGGSFADVVNIPMTAHFLGGCVIGSSSERGVIDGYQ
RAYGYEGLHVVDGS

SVSANLGVNPSLTITAQAERAMALWPNKGEVDSRPPVGAGYRPTKAVKPDRPVV
PEHASGALRLPLFVVN

K

>WP_219110666.1 GMC family oxidoreductase [*Rhodococcus globerulus*]

MTATHYDVVVIGSGFGGSVAALRLTEKGYRVGVLESGRRFADDELPELTSWRLRK
YLWAPWIGCYGVQRIH

LLPDVLVMAGSGVGGGSLNYANTLYQPPKRFFEDRQWEHITDWHDELAPYYDQA
KRMLGVRTNPSFTPAD

AVMKEVAEEMGVGETFTSTPVGVFFGDAGVSVDPFFGGKGPRTGCTECGGCM
TGCRVGAKNTLVKNYL

HLAEHAGARVHPLTTVRELPRKGGGYQLLARRTDGIRKREQIFTADQVVVAAGT
YGTARLLLGMKESGA

LPHLSNALGTVVRTNSEAVLAATSKSRRRDFTQGVAITSSFHPDDHTHIEPVRYGK
GSNAIGLLQTVLSD

GGGKVPRVLKTLAVAARHPSAFARSLSVRNWSERTVIALVMQTDDNSLELSKNTR
RFGRSLTSRPGPGDP

PPTWIPQGHATAIRKVAQKIDGDPGGSIAEIVNIPMTAHFLGGCAIGDSPSTGVVDPY
LRAYGHNGLHVMD

GSVVSANLGVNPSLTITAQAERACALWPNAGRDDARPAVGDPYVRLVPTPPSNPV
VPEHASGALRLPLIF

PTEKVPDVERP

>WP_068148931.1 GMC family oxidoreductase [*Rhodococcus corynebacterioides*]

MKDTYDVIVIGSGFGGSVAALRATEKGYRVGVLESGRRFEDHELPKTSWRLRKYL
WAPLIGCYGLQRIHL

LPNVLMAGAGVGGGSLNYANTLYQPPTPFFRDPQWGDITDWEKEMAPYYDQA
KRMLGVEDNPTITPADK

IMRDIAEEMGVGDTFGTTPVGVFFGAPGQK GKDVDPYFGGVGPTRTGCTECGSC
MTGCRVGAKNTLVKN

YLHLAERAGATVHPLTTVTSVRPRAGGGYEVRRRTGAKLRRRETVMASQVVF
AAGTYGTQKLMLAMKE

SGELPRLSDKLGSVVRTNSEAVLAATARDRQIDFTEGVAITSSFHPNDHTHIEPVRY
GKGSNAIGLLQTV

LSDGGGRLPRPLKTLGVAVRHPAATLRSLSVRNWSERTVIALVMQTDDNSLELGS
KKGRFGRRLTSRPGG

GTPPPKWIPGHVAIRKAADKIGGDPGGSFADVFDIPMTAHFLGGCVIGATPERGVI
DPYHRVYGYEGLH

VVDGSAVSANLGVNPSLTITAQAERALALWPNKGEEDRRPPMQGEYVALPPQSPA
APVVPVHAPGALRLP

LTVVGQDR

>pdb|1COY|A Chain A, CHOLESTEROL OXIDASE

APSRTLADGDRVPALVIGSGYGGAVAALRLTQAGIPTQIVEMGRSWDTPGSDGKIF
CGMLNPKRSMWLA

DKTDQPVS NFMGFGINKSIDRYVGVLDSERFSGIKVYQGRGVGGSLVNGGMAV
TPKRNYFEEILPSVDS

NEMYNKYFPRANTGLGVNNIDQAWFESTEWEYKFARTGRKTAQRSGFTTAFV
PNVYDFEYMKKEAAGQVTK

SGLGGEVIYGNAGKSLDKTYLAQAAATGKLTITTLHRVTKVAPATGSGYSVT
MEQIDEQGNVVATKVV

TADRVFFAAGSVGTSKLLVSMKAQGHLPNLSSQVGEWGNGNIMVGRANHMW
DATGSKQATIPTMGIDN

WADPTAPIFAEIAPLPAGLETYVSLYLAIKTNPERARFQFNSGTGKVDLTWAQSQN
QKGIDMAKKVFDKI

NQKEGTIYRTDLFGVYYKTWGDDFTYHPLGGVLLNKATDNFGRLPEYPGLYVVD
GSLVPGNVGVNPFVTI

TALAERNMDKIISSDIQ

>pdb|1B8S|A Chain A, Protein (cholesterol Oxidase),*Streptomyces* sp.

DNGGYVPAVVIGTGYGAAVSALRLGEAGVQTLMLEMGQLWNQPGPDGNIFCGM
LNPDKRSSFKNRTEAP

LGSFLWLDVVNRNIDPYAGVLDLVNYDQMSVYVGRGVGGSLVNGGMAVEPKR
SYFEEILPRVDSSEMYD

RYFPRANSMLRVNHIDTKWFEDTEWEYKFARVSREQAGKAGLGTVFV
PNVYDFGYMQREAAGEVPKSALAT

EVIYGNNHGKQSLDKTYLAAALGTGKVTIQTLHQVKTIRQTKDGGYALTVEQKD
TDGKLLATKEISCRYL

FLGAGSLGSTELLVRARDTGTLPNLNSEVGAGWGPNGNIMTARANHMWNPTGAH
QSSIPALGIDAWDNSD

SSVFAQIAPMPAGLETWVSLYLAIKPNPQRGTFVYDAATDRAKLNWTRDQNAPA
VNAAKALFDRINKANG

TIYRYDLFGTQLKAFADDFCYHPLGGCVLGKATDDYGRVAGYKNLYVTDGSLIPG
SVGVPFVTITALAE

RNVERIIKQDVTAS

>pdb|1KDG|A Chain A, cellobiose dehydrogenase, *Phanerodontia chryso sporium*

PTVSATPYDYIIVGAGPGGIIAADRLSEAGKKVLLERGGPSTKQTGGTYVAPWAT
SSGLTKFDIPGLFE

SLFTDSNPFWWCKDITVFAGCLVGGGTSVNGALYWYPNDGDFSSSVGWPSWTN
HAPYTSKLSRLPSTD

HPSTDGQRYLEQSFNVVSQLLKGQGYNQATINDNPNYKDHVFGYSAFDLNGKR
AGPVATYLQTALARPN

FTFKTNVMVSNVVRNGSQILGVQTNTPDLGPNGFIPVTPKGRVILSAGAFGTSRILF
QSGIGPTDMIQTV

QSNPTAAAALPPQNQWINLPVGMNAQDNPSINLVFTHPSIDAYENWADVWSNPRP
ADAAQYLANQSGVFA

GASPKNFWRAYSGSDGFTRYAQGTVRPGAASVNSSLPYNASQIFTITVYLSTGIQ
SRGRIGIDAALRGT

VLTPPWLVNPVDKTVLLQALHDVVSNIGSIPGLTMITPDVTQTLEEYVDAYDPAT
MNSNHWSSTTIGSS

PQSAVVDSNVKVFGTNNLFIVDAGIIPHLPTGNPQGTLMSSAAEQAAAKILALAGGP

>sp|P22637.2|CHOD_BREST RecName: Full=Cholesterol oxidase; Short=CHOD;

AltName: Full=Cholesterol isomerase; Flags: Precursor, *Brevibacterium sterolicum*

MTDSRANRADATRGVASVSRRRFLAGAGLTAGAIALSSMSTSASAAPSRTLADGD
RVPALVIGSGYGGAV

AALRLTQAGIPTQIVEMGRSWDTPGSDGKIFCGMLNPDKRSMWLADKTDQPVS
FMGFGINKSIDRYVGV

LDSERFSGIKVYQGRGVGGSLVNGGMAVTPKRNYFEEILPSVDSNEMYNKYFPR
ANTGLGVNNIDQAWF

ESTEWEYKFARTGRKTAQRSGFTTAFVPNVYDFEYMKKEAAGQVTKSGLGGEVIY
GNNAGKKSLLDKTYLAQ

AAATGKLTITTLHRVTKVAPATGSGYSVTMEQIDEQGNVVATKVVTADRVFFAA
GSVGTSKLLVSMKAQG

HLPNLSSQVGEGWGNNGNIMVGRANHMWDATGSKQATIPTMGIDNWADPTAPIF
AEIAPLPAGLETYVSL

YLAIKTNPERARFQFNSGTGKVDLTWAQSQNQKIDMAKKVFDKINQKEGTIYRT
DLFGVYFKTWGDDFT

YHPLGGVLLNKATDNFGRLEPEYPLYVVDGSLVPGNVGVNPFVTITRLAERNMD
KIISDIQ

>sp|P9WMV8.1|CHOD_MYCTO RecName: Full=Cholesterol oxidase; AltName:

Full=Cholesterol isomerase

MKPDYDVLIIGSGFGGSVTALRLTEKGYRVGVLEAGRRFSDEEFAKTSWDLRKFL
WAPRLGCYGIQRIHP

LRNVMILAGAGVGGGSLNYANTLYVPPEPFFADQQWSHITDWRGELMPHYQQAQ
RMLGVVQNPTFTDADR

IVKEVADEMFGDTWVPTPVGVFFGPDGKTPGKTVDPYFVGAGPARTGCLEC
GCCMTGCRHGAKNTLV

KNYLGLAESAGAQVIPMTTVKGFERRSDGLWEVRTVRTGSWLRRDRRTFTATQL
VLAAGTWGTQHLLFKM

RDRGRLPGLSKRLGVLTRTNSESIVGAATLVNPDLDLTHGVAITSSIHPTADTHIE
PVRYGKGSNAMGL

LQTLMTDGSQPQGTDVPRWRQLLQTASQDPRGTIRMLNPRQWSERTVIALVMQH
LDNSITTFTKRGKLG I

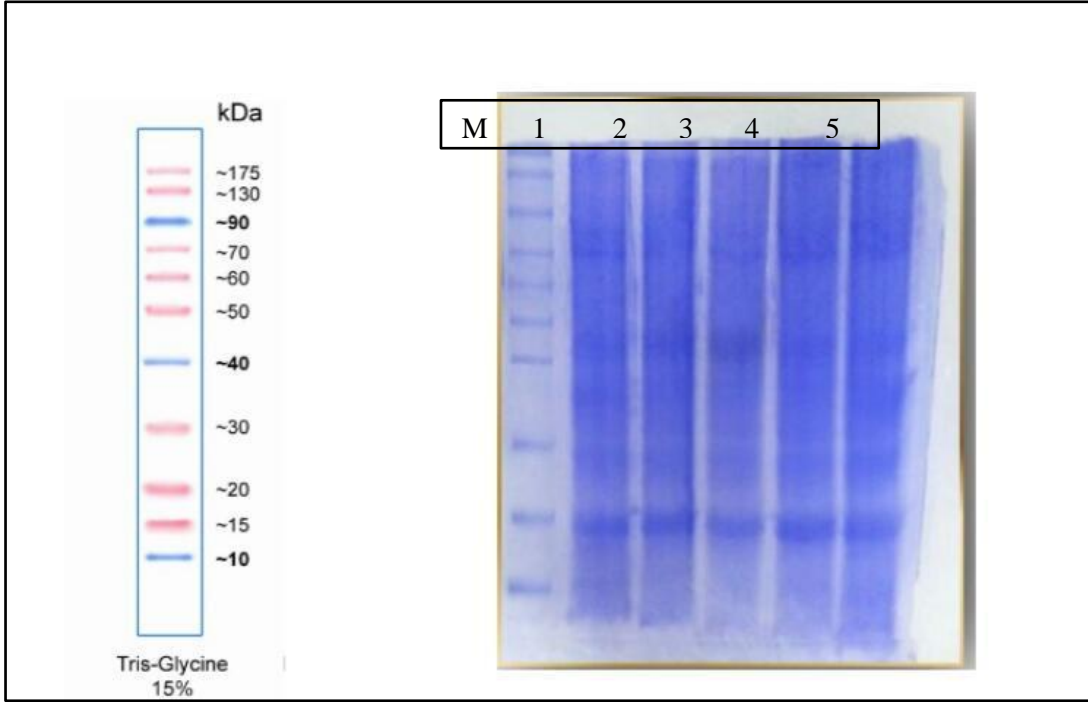
RWYSSKQGHGEPNPTWIPIGNQVTRRIA AKIDGVAGGTWGELFNIPLTAHFLGGA
VIGDDPEHGVIDPYH

RVYGYPTLYVVDGAAISANLGVNPSLSIAAQAERAASLWPNKGETDRRPPQGEPEY
RRLAPIQPAHPVPA

DAPGALRWLPIDPVSNA G

4.5. SDS-PAGE Prokaryotik Sistemde Heterolog İfadenin Analizi ve pET-28a (+)/Cox-william Yapısının Saflaştırılması

Cox-william geninin rekombinant *W. marianensis* suşu, *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta Suşunda eksprese edildi; konakçı suşu, Şekil 17'da gösterildiği gibi 30°C'de 18 saat boyunca (bir mM IPTG) ile indüklemeye üzerine elde edilen uygun bir gen ekspresyonu seviyesini tespit eder; daha sonra hücre lizisinden sonra rekombinant proteinin protein özütü (çözünür fraksiyon) IMAC Kromatografisi ile saflaştırıldı, daha sonra proteinin çözünürlüğünü değerlendirmek ve ayrıca rekombinantın moleküler ağırlığını (M.W) belirlemek için SDS-PAGE ile analiz edildi.



Şekil 17. M: protein Markeri Gösteren SDS-PAGE (%10)

Bandlar (16, 17) 1 mM IPTG kullanılarak Cox-william barındıran indüklenmiş *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta'nın rekombinant Cox-william çözümlü fraksiyon proteinlerinin ifadesidir. ve şeritler (1;2;3), indüklenmemiş *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta / Cox-william'ın çözümlenmeyen fraksiyon proteinlerini temsil etmektedir.

Cox-william enzimi proteininin tahmin edilebilir M.W'si 69.3 kDa'dır. burada SDS analizi, protein bandının boyutunun 61,0 kDa'da olduğunu ortaya koymaktadır.

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, sonuç, *W. marianensis* Cox-william'ın sitozolde yerleşik Cox-william için belirgin bir şekilde spesifik olan ve çözelti içinde homodimer olarak hareket eden Cox-william tipine oldukça benzer olduğunu gösterir. Bu homodimer, etki alanı formülasyonu için oldukça gereklidir ve sırayla kataliz için gereklidir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolesterol oksidaz tamamen prokaryotik mikroorganizmalar (patojenik ve patojenik olmayan bakteriler) tarafından üretilmiştir. Patojenik bakteriler, bu enzimi, membran kolesterolünün oksidasyonu ile konakçı makrofajların enfeksiyonu için kullanırken, patojenik olmayan bakteriler, kolesterol ayrışmasından karbon kaynakları elde etmek için ChO'yu metabolik bir araç olarak kullanma eğilimindedir [4]. Şimdiye kadar orijinal mikroorganizmalardan ChO elde etmek için birçok çaba sarf edildi. Bununla birlikte, bu yaklaşım, zor büyüme koşulları ve orijinal mikroorganizmaların düşük üretkenliği gibi bazı zorluklardan muzdariptir [108, 27]. Farklı bakteri kaynaklarından elde edilen ChO genleri klonlanmış ve enzim üretiminin ticari uygulaması için etkili olabilecek ifade edilmiştir [109]. Moleküler klonlama, genomik DNA'dan spesifik DNA dizilerinin hızlı amplifikasyonu ve izolasyonu için tercih edilen yöntemdir [119]. Bununla birlikte, karmaşık PCR ürün karışımları, örneğin prob olarak kullanım için belirli ürünlerin izolasyonu için hala klonlamayı gerektirir [120].

Bu "rekombinant" formlar, *E. coli*'yi çok verimli bir şekilde dönüştürmek için kullanıldı; Prosedür, %100 rekombinant klonlarla sonuçlanıyor gibi görünüyor. Başka bir LIC prosedürü [121] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, PCR ürününün ve vektörün denatürasyonunu ve heterolog bağlanmada kullanır ve kontrol edilmesi zordur.

Mevcut çalışmanın sonuçları, pET-28a (+)/Cox-william'ın çift kısıtlamalı sindirim modelinin kullanılmasını; elde edilen bu desen iki banttı: biri plazmit vektörü (~4200 bp) ve kolesterol oksidaz genini taşıyan 2800bp bandı bulunmaktadır.

Tam uzunluk 7045 bp idi, beklenen rekombinant protein kolesterol oksidaz, nükleotid seviyesi ve protein seviyesi açısından sırasıyla 1821 bp ve 69.3 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olmalıdır. Kolesterol oksidaz geninin uzunluğu 1821 bp'dir.

Bu enzimler genellikle 4-8 baz çiftinden oluşan DNA dizilerini tanır ve DNA'yı çift sarmallı, tek bir yapışkan uç bırakarak veya her bir zincirde aynı pozisyonda kör bir ucu keserek şaşırtabilir [122]. Bakteri üremesi için kullanılan besiyerinin içeriği çok önemliydi ve etkisi büyüktür; Luria Bertani, bakteri üremesinin ifade amaçları için kullanıldı, ayrıca bu ortam, IPTG ilavesiyle ifadenin indüklendiği basit bir ortamdır [123].

Aritmanın kolaylaştırılması için füzyon etiket(ler)i başka bir anahtar faktördür. Polihistidin (His) etiketi, protein saflaştırma amacıyla kullanılan en yaygın etikettir. Bu etiket nispeten

küçüktür, genel yapı üzerinde küçük bir etkiye sahiptir ve çoğu durumda protein yapısına müdahale etmezler [124].

Bu çalışmanın sonuçları, *W. marianensis*' in kolesterol oksidaz protein dizisinin üç boyutlu yapısını göstermiştir. Yapı ve fonksiyon ilişkilerine dayalı tasarım, enzimatik performansı iyileştirmede önemli başarılar elde etmişti [126].

Toyama ve diğerleri (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları, substrat spesifikliğini ve afinitesini araştırmak için bölgeye yönelik mutajenez ve yapısal karşılaştırmalar kullanarak *Streptomyces* kolesterol oksidazına amino asit dahil etmiştir [127].

R. equi enziminden Q145E mutanı, gelişmiş bir termal stabilite göstermiştir [116]. *Brevibacterium* sp. kolesterol oksidaz, yapısal analize dayalı olarak termal stabiliteyi ve aktiviteyi geliştirmek için tasarlandı, oysa Q153E/F128L mutanı, vahşi tip enzimden daha üstün termal stabilite ve enzimatik aktivite göstermiştir [128, 129]. Toplam serum kolesterolünü ölçmek için bir enzim elektrotu olarak potansiyel endüstriyel uygulaması için kolesterol oksidaz varyantlarının rasyonel tasarımı zordur.

Pimelobacter simplex (*Arthrobacter simplex* olarak da adlandırılır), organik çözücülere karşı yüksek toleransı nedeniyle steroid transformasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [130] ve *Pimelobacter simplex*'ten yeni bir varsayılan kolesterol oksidaz geni, PsChO tanımlanmıştır [120]. Mevcut sonuçlar, mevcut protein (PVY31316.1) ve 6a2u.1.B arasındaki sekans özdeşliğinin %23,09 olduğunu kaydetti.

Brevibacterium sterolicum'dan elde edilen kolesterol oksidazın kristal yapısı (PDB ID: 1COY, 1.8Å), α -sarmallar arasına sıkıştırılmış bir β -kıvrımlı tabakadan oluşan karakteristik nükleotid bağlayıcı kata (Rossmann kıvrımı) sahiptir ve %66 sekans özdeşliğine sahiptir. Hedef protein PsChO, şablon olarak seçilmiştir. Daha sonra, her model ilk önce eşlenik gradyanlarla değişken hedef fonksiyon yöntemiyle optimize edilmiştir[131].

Filogenetik ağaç, gözlemlenen nükleik asit varyasyonlarına dayanan bu çalışmada oluşturulmuştur. Bu ağaç, *W. marianensis* 'in kolesterol oksidazı ile diğer türlerden gelen diğer kolesterol oksidazları arasındaki genetik ilişkiyi gösterdi. Filogenetik ağacın sonuçları, ağaç içinde ana birleşik PVY31316.1'i temsil edilen olarak gösterildi.

Kitasatospora abroriphilia'yı temsil etmek üzere mevcut kapsayıcı ağaca diğer yüksek düzeyde ilişkili organizmalar da dahil edildi ve incelenen örnek %99 özdeşliğe sahipti ve Kitasatospora abroriphilia dizileri içinde yalnızca bir dalda kümelendi (Şekil 3.7).

W. marianensis ve Kitasatospora abroriphilia arasında bağlanan dal, WP110471332.1 *Williamsia limnetica* ile tek dalda %91 oranında bağlanır. Mevcut sonuçlara göre, son dalın Pdp 1B8S *Streptomyces* ile %40 özdeşliği olduğu kaydedilmiştir.

WP-188546282.1 *Rhodococcus trifolii*, WP-06814893.1 ile %70 özdeşliğe sahipti. *Rhodococcus corynebacterioides*; bu suşlar, Pdp 1B8S *Streptomyces* ile %40 özdeşliğe sahipti.

16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik analiz, *Rhodococcus kyotonensis* sp. suşu, en yakın filogenetik komşuları olarak *Rhodococcus yunnanensis* YIM 70056(T) ve *Rhodococcus fascians* DSM 20669(T) ile *Rhodococcus* cinsi içinde yeni bir alt çizgi oluşturur (sırasıyla %98,2 ve %97,8 dizi benzerliği) [132].

İzolatu MT8T, yalnızca *Williamsia* cinsi tarafından işgal edilen evrimsel radyasyon bölgesi içinde yer almakla kalmaz, aynı zamanda *W. muralis* türü suşu ile birlikte ayrı bir filetik çizgi oluşturur. Tüm ağaç yapma algoritmaları ve komşu birleştirme analizindeki %100 önyükleme değeri tarafından desteklenen bir ilişkilendirme. İki organizma, 16S rRNA gen benzerliğinin %99'unu paylaşır. Hizalama için mevcut 1450 konum üzerinden 7 nt farka karşılık gelen bir değer [16].

E. coli BL21 (DE3) Rosetta suşunda ifade edilen rekombinant Cox-william yapısının başlangıç seviyesi; pET-28a (+)/Cox-william yapısını barındıran 4,5 U/mL idi. Uygulanan optimize edilmiş strateji, LB büyüme ortamının ikame edilmesi üzerine rekombinant Rosetta suşunun hücre lizatında izlenen Cox-william yapı aktivitesini başarılı bir şekilde geliştirmiştir. Daha sonra (IMAC) Kromatografisi ile protein saflaştırması, çözünürlüğü değerlendirmek ve aynı zamanda rekombinant proteinin moleküler ağırlığını (M.W) belirlemek için SDS-PAGE ile analiz edildi.

W. marianensis 'in Cox-william yapı enziminin beklenen M.W'si 69.3kd idi, burada SDS analizi, protein bandının boyutunu ortaya çıkardı. Bu nedenle, *W. marianensis* 'in rekombinant proteini, çözünür fraksiyonda eksprese edildi ve enzimatik aktivitesini korudu. Kolesterol oksidaz, 501.05 U/ml toplam aktiviteye sahip DEAE Sepharose CL-6B

ve 31,15 mg protein içeren iyon değiştirme kolonu ayırımından sonra homojenliğe saflaştırıldı. Enzim, 16.08 U/mg proteinin spesifik aktivitesi ile saflaştırıldı [133].

Kolesterol oksidazların moleküler ağırlıkları 47-61 kDa aralığında rapor edilmiştir [39].

Fiksasyonla ilgili öneriler değişkenlik gösterir, ancak iyi sonuçlar alınabilir. Elektroforez jelinin çoğu SDS'yi boya çözeltilisinden çıkarmak için suda yıkandıktan sonra basit bir prosedürle elde edilir [134].

Sonuç olarak, bu çalışma, yeni bir bakteri *W. marianensis* klonlamasından ve kolesterol oksidazın *E. coli*'deki heterolog ekspresyonundan ilk kez Kolesterol oksidazını başarıyla üretti, gelecekte tedavi edici özelliklerini incelemeye hazır hale gelmiştir.

Ayrıca bu çalışmanın bulgusu, sitozolde yer alan ve çözeltilide homodimer olarak hareket eden kolesterol oksidaza belirgin şekilde spesifik olan *E. coli*'nin tip kolesterol oksidazına oldukça benzemektedir.

Son olarak, bir Novel-bakteriyel *W. marianensis* kolesterol oksidaz enziminin çözüdür ve aktif olarak klonlanması ve ekspresyonu başarıyla sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Butler, WR., Floyd, MM.; Brown, JM.; Toney, SR., Daneshvar, MI., Cooksey, RC. et al. 2005, Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. Nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov., *Int J Syst Evolut Microbiol.*, 55(4): 1615–24.
- [2] Fatahi-Bafghi M. 2021, Role of *Williamsia* and *Segniliparus* in human infections with the approach taxonomy, cultivation, and identification methods. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 20 (1): 1-10.
- [3] Kämpfer, P. *Williamsia*. In: Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. New York: Springer. p. 1–7, 2015.
- [4] Pollegioni, L.; Piubelli L. and Molla, G. 2009, Cholesterol oxidase: Biotechnological applications. *FEBS. J.*, 276:6857-6870.

- [5] Kampfner, P.; Busse, H-J.; Horn, H.; Abdelmohsen, UR.; Hentschel, U. Glaeser, SP., 2016, *Williamsia herbipolensis* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana*, *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 66(11): 4609–13.
- [6] Woods, G.L., Brown-Elliott, B.A., Conville, P.S., Desmond, E.P., Hall, G.S., Lin, G., Pfyffer, G.E., Ridderhof, J.C., Siddiqi, S.H., Wallace, R.J. Jr, Warren, N.G., Witebsky, F.G., 2011, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes, 2nd ed. Wayne (PA): *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- [7] del Mar Tomas, M., Moure, R., Saez Nieto, J.A., Fojon, S., Fernandez, A., Diaz, M., Villanueva, R., Bou, G., 2005, *Williamsia muralis* pulmonary infection, *Emerg Infect Dis.* 11(8): 1324-5.
- [8] Navas, J.; Gonzalez-Zorn, B.; Ladron, N.; Garrido, P.; Vazquez-Boland, J.A., 2001. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*, *J. Bacteriol.*, 183: 4796–4805.
- [9] Shen, Z. Corbin, D. R. Greenplate, J. T. Grebenok, R. J. Galbraith, D. W. and Purcell, J. P., (1997). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 429–442.
- [10] Gigue`re, S. and Prescott, J.F., 1997, Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foal., *J. Vet. Microbiol.*, 56: 313–334.
- [11] Sota, M., and Top, E., 2008. Horizontal gene transfer mediated by plasmids, in *Plasmids: Current Research and Future Trends*, ed G. Lipps (Norfolk, VA: Caister Academic Press; Horizon Scientific Press), 111–181.
- [12] Tindall, B., 2019, On the status of the names *Corynebacteriales* Goodfellow and Jones 2015, *Mycobacteriales* Janke 1924 (Approved Lists 1980) and *Mycobacteriales* Cavalier-Smith 2002. *Int J Syst Evolut Microbiol.*, 69 (10):3310–2.
- [13] Yassin A. and Hupfer, H., 2006, *Williamsia deligens* sp. nov., isolated from human blood, *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 56(1):193–7.
- [14] Marrakchi, H.; Lanéelle, M-A.; Daffé, M., 2014, Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond, *Chem Biol.*, 21 (1): 67–85.
- [15] de Menezes, CBA.; Afonso, RS.; de Souza, WR.; Parma, M.; de Melo, IS.,;Zucchi, TD, et al., 2017, *Williamsia spongiae* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Amphimedon viridis*. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 67(5): 1260–5.
- [16] Fang, J.; Shen, Y.; Qu, D. and Han, J., 2019, Antimicrobial resistance profiles and characteristics of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from a large scale

- centralized swine slaughterhouse and its downstream markets in Zhejiang, China, *J. Food. Control.* 95: 215–222.
- [17] Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2004, *Williamson maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evolut Microbiol.*, 54(1): 191–4.
- [18] Pathom-Aree, W. Nogi, Y. Sutcliffe, I., Ward, A., et al. 2006, *Williamsia marianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1123–1126.
- [19] Sazak, A. and Sahin, 2012, N. *Williamsia limnetica* sp. nov., isolated from a limnetic lake sediment, *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 62(6):1414–8.
- [20] Jones, A.; Payne, G. and Goodfellow, M., 2010, *Williamsia faeni* sp. nov., an actinomycete isolated from a hay meadow, *Int J Syst Evolut Microbiol.*, 60(11):2548–51.
- [21] Mochon, A.B.; Sussland, D. and Saubolle MA. Aerobic actinomycetes of clinical significance. *Microbiol Spectr.*, 2016.
- [22] Procop, G.W., Church, D., Hall, G., Janda, W., 2017, *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic*. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- [23] Schlaberg, R., Simmon, K.E. and Fisher, M.A., 2012, A systematic approach for discovering novel, clinically relevant bacteria, *Emerg Infect Dis.*, 18 (3): 422.
- [24] Fatahi-Bafghi, M., 2018, Nocardiosis from 1888 to 2017, *Microb Pathog.*, 114: 369–84.
- [25] Montoya-Porras, L.M., Omar, T-C. Alzate, JF.i, Moreno-Herrera, CX., Cadavid-Restrepo, GE., 2018. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of *Actinobacteria* in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculate* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia, *Acta Trop.*, 178: 327–32.
- [26] Moradpour, Z. and Ghasemian, A., 2016, Protein engineering of microbial cholesterol oxidases: a molecular approach toward development of new enzymes with new properties., *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(10): 4323–4336.
- [27] Vrielink, A. and Ghisla, S. 2009, Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features, *FEBS. J.*, 276(23): 6826–6843.
- [28] Sampson, NS. and Vrielink, A. 2003, Cholesterol oxidases: a study of nature's approach to protein design, *J. Acc. Chem. Res.* 36: 713–722.

- [29] Coulombe, R., Yue, KQ., Ghisla, S., Vrieling, A., 2001, Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *J. Biol. Chem.*, 276: 30435-30441.
- [30] Caldinelli, L.; Iametti, S., Barbiroli, A., Bonomi, F.; Fessas, D.; Molla, G., Pilone, MS., Pollegioni, L., 2005, Dissecting the structural determinants of the stability of cholesterol oxidase containing covalently bound flavin, *J. Biol. Chem.*, 280: 22572–22581.
- [31] Sampson, NS.; Kass, IJ.; Ghoshroy, KB., 1998, Assessment of the role of an Ω loop of cholesterol oxidase: a truncated loop mutant has altered substrate specificity. *Biochemistry.*, 37:5770–5778.
- [32] Kämpfer, P. 2015, *Williamsia*. In: Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. New York: Springer. p. 1–7.
- [33] Sankaram, M.B. and Thompson, T.E., 1990, Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin, *Biochemistry.*, 29:10670–10675.
- [34] McConnell, HM. and Radhakrishnan, A., 2003, Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta.*, 1610:159–173.
- [35] De Martinez, SG. and Green, C., 1979, The action of cholesterol oxidase on cholesterol in vesicles and micelles, *Biochem Soc Trans.*, 7:978–979.
- [36] Isobe, K., Shoji, K., Nakanishi, Y., Yokoe, M., Wakao, N., 2003, Purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents from c-Proteobacterium Y-134. *J Biosci Bioeng* 95, 257–263.
- [37] Sojo, M.; Bru, R., Lopez-Molina, D., Garcia-Carmona, F., Arguelles, J. C. 1997, Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis*. Isolation and physiological characterization, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 583–589.
- [38] Lario, PI., Sampson, N., Vrieling, A. 2003, Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity, *J Mol Biol.*, 326:1635–1650.
- [39] Yao, K., Wang, F.-Q., Zhang, H.-C., Wei, D.-Z. 2013, Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in *Mycobacterium neoaurum*, *J. Metab. Eng.*, 15: 75–87.

- [40] Chen, X., Wolfgang, D.E., Sampson, N.S., 2000, Use of the parallax-quench method to determine the position of the active-site loop of cholesterol oxidase in lipid bilayers, *Biochemistry*, 39: 13383–13389.
- [41] Doukyu, N., Shibata, K., Ogino, H., Sagermann, M., 2009, Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 82 (3): 479–490.
- [42] Kreit, J. and Sampson, N.S., 2009, Cholesterol oxidase: physiological functions, *FEBS. J.*, 276: 44-6856.
- [43] Slotte, J.P., 1995, Direct observation of the action of cholesterol oxidase in monolayers, *Biochim Biophys Acta.*, 1259: 180–186.
- [44] Ghoshroy, KB.; Zhu, W. and Sampson, NS. 1997, Investigation of membrane disruption in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase, *Biochemistry*, 36: 6133–6140.
- [45] Kiss, G., Çelebi, Ölçüm, N., Moretti, R., Baker, D., Houk, K., 2013, Computational enzyme design *Angew. J. Chem. Int. Ed.*, 52, 5700–5725.
- [46] Li, J., Vrielink, A., Brick, P., Blow, D.M., 1993, Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases, *Biochemistry.*, 32:11507–11515.
- [47] Yehia, H.M., Hassanein, W.A., Ibraheim, S.M., 2015, Purification and characterization of the extracellular cholesterol oxidase enzyme from *Enterococcus hirae*, *J. BMC Microbiol.*, 15(1): 178.
- [48] DeLano, W.L. 2002, The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA.
- [49] Slotte, J.P., 1992, Cholesterol oxidase susceptibility of cholesterol and 5-androsten-3 β -ol in pure sterol monolayers and in mixed monolayers containing 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, *J. Biochim. Biophys. Acta.*, 1124:23–28.
- [50] Xiang, J., Sampson, N.S., 2004, Library screening studies to investigate substrate specificity in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase, *Prot Eng Design & Select.*, 17: 341–348.
- [51] Brooks, C.J.W. and Smith, A.G., 1975, Cholesterol oxidase: Further studies of substrate specificity in relation to the analytical characterisation of steroids, *J. Chromatog.*, 112:499–511.

- [52] Ahmad, S., Roy, P.K., Khan, A.W., Basu, S.K., Johri, B.N., 1991, Microbial transformation of sterols to C19-steroids by *Rhodococcus equi*, *World J Microbiol Biotechnol.*, 7, 557–561,
- [53] Ishizaki, T., Hirayama, N., Shinkawa, H., Nimi, O., Murooka, Y., 1989, Nucleotide sequence of the gene for cholesterol oxidase from a *Streptomyces* sp., *J. Bacteriol.*, 171(1): 596–601.
- [54] Nomura, N., Choi KP., Yamashita M., Yamamoto H., Murooka, Y. 1995, Genetic modification of the *Streptomyces* cholesterol oxidase gene for expression in *Escherichia coli* and development of promoter-probe vectors for use in enteric bacteria, *J. Ferment. Bioeng.*, 79(5): 410–416.
- [55] Kumari, L. and Kanwar, S.S., 2012, Cholesterol oxidase and its applications, *J. Adv. Microbiol.*, 2, 49–65.
- [56] Ahmad, S. and Goswami, P., 2014, Application of chitosan beads immobilized *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 cholesterol oxidase for cholestenone production, *J. Process Biochem.*, 49, 2149–2157.
- [57] El-Naggar, N. E.A., Soliman, H. M., El-Shweihy, N.M., 2018, Extracellular cholesterol oxidase production by *Streptomyces aegyptia*, in vitro anticancer activities against rhabdomyosarcoma, breast cancer cell-lines and in vivo apoptosis, *J. Sci. Rep.* 8: 2706.
- [58] Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X.; Liu, F., Feng, L., Wang, L. 2010, A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections, *J. Microbio. Meth.*, 82: 71–77.
- [59] Kulkarni, N.S., Lokhande, A.P. ,Pachori, R.R., Agrawal, P.N. M. 2013, Screening of the Cholesterol Degrading Bacteria from Cow's Milk, *J. Curr Res Microbiol Biotechnol.*, 1: (3), 4 -92.
- [60] Zarychta, B., Lyubimov, A., Ahmed, M., Munshi, P., Guillot, B., Vrielink, A., Jelsch, C., 2015, Cholesterol oxidase: ultrahigh-resolution crystal structure and multipolar atom model-based analysis, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 71(Pt 4):954-68.
- [61] Chen, L., Lyubimov, AY., Brammer, L., Vrielink A., Sampson, N.S., 2007, The binding and release of oxygen and hydrogen peroxide are directed through a hydrophobic tunnel in cholesterol oxidase, *Biochemistry*, 47: 5368–5377..
- [62] Yue, Q.K., Kass, I.J., Sampson, N.S., Vrielink, A., 1999, Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants, *Biochemistry*, 38: 4277–4286.

- [63] Ohta TS Fujishiro K, Yamaguchi K, Tamura Y, Aisaka K, Uwajima T, Hasegawa M. 1991, Sequence of gene choB encoding cholesterol oxidase of *Brevibacterium sterolicu*, m: comparison with choA of *Streptomyces* sp. SA-COO. *Gene* 103:93–96.
- [64] Labaree, D. Hoyte, RM. and Hochberg, RB. 1997, A direct stereoselective synthesis of 7b-hydroxytestosterone. *Steroids* 62, 482–486.
- [65] Alexander DL. and Fisher JF. 1995, A convenient synthesis of 7a-hydroxycholest-4-en-3-one by the hydroxypropyl- β -cyclodextrin-facilitated cholesterol oxidase oxidation of 3b,7a-cholest-5-ene-3,7-diol. *Steroids* 60, 290–294.
- [66] Biellmann, J-F. 2001, Resolution of alcohols by cholesterol oxidase from *Rhodococcus erythropolis*: lack of enantiospecificity of the steroids. *Chirality* 13, 34–39.
- [67] Puglielli, L.; Friedlich, AL.; Setchell, KDR.; Nagano, S.; Opazo, C.; Cherny, RA.; Barnham, KJ.; Wade, JD.; Melov, S. Kovacs, DM. et al. 2005, Alzheimer disease β -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J. Clin. Invest.* 115: 2556–2563.
- [68] Richmond, W. 1973, Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19: 1350–1356.
- [69] Flegg, HM. 1973, An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymic method. *J. Ann. Clin. Biochem.*, 10: 79–84.
- [70] Allain, CC.; Poon, LS.; Chan, CSG.; Richmond, W. and Fu, PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 20: 470–475, 1974.
- [71] Cheillan, F.; Lafont H.; Termine, E.; Hamann, Y. and, Lesgards G. 1989, Comparative study of methods for measuring cholesterol in biological fluids. *J. Lipids.*, 24, 224–228.
- [72] Weinstock, DM. and Brown AE. 2002, *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. *Clin Infect Dis* 34, 1379–1385.
- [73] Mendes, MV.; Recio E.; Anton, N.; Guerra, SM.; Santos-Aberturas, J.; Marti'n, JF. and Aparicio, JF. 2007, Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimaricin. *Chem Biol* 14, 279–290.
- [74] Peter, J. and Russel., *Cloning Genetics: A Molecular Approach*. San Francisco, California, United States of America: Pearson Education. ISBN 0-8053-4665-1, 2005.
- [75] Esposito, D.; Garvey, L. A. and Chakiath, C. S. 2009, Gateway cloning for protein expression. In *High Throughput Protein Expression and Purification*. Pp: 31-54. Humana Press.

- [76] Weibel, P.; Ender, M.; Madon, J.; Zinkernagel, A. S., and Schuepbach, R. A. 2013. Selection vector for direct cloning of proof reading polymerase chain reaction products based on the lethal *ccdB* gene in *Escherichia coli*. *Advances in Microbiology.*, 3(01): 14.
- [77] Wang, Z.; Jin, L.; Yuan, Z.; Węgrzyn, G. and Węgrzyn, A. 2009, Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria. *J. Plasmid.*, 61(1): 47-51.
- [78] Shintani, M. Sanchez, Z. K. and Kimbara, K. 2015, Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology.*, 6: 242.
- [79] Casali, N. and Preston, A. (Eds.). 2003, *E. coli* plasmid vectors: methods and applications (Vol. 235). Springer Science & Business Media.
- [80] Giraldo, P. and Montoliu, L. 2001, Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals, *J. Transgenic Research.*, 10(2): 83-103.
- [81] Pope, B. and Kent, HM. 1996, High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, 24:536-537.
- [82] Sezonov ,G., Joseleau-Petit, D, D'Ari, R., 2007, *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol.* Dec; 189(23) :8746-9.
- [83] Kang, T.H and Seong, B.L. 2020, Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms. *Front. Microbiol.* 11: 1927.
- [84] Sandomenico, A.; Sivaccumar JP. and Ruvo, M. 2020, Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing a ntibody recombinant fragments, *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 1-39.
- [85] Jeong, H.; Kim, HJ. And Lee, SJ. 2015, Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *J. Geno. Announc.*, 3: e00134-00115.
- [86] Jeong, H.; Barbe, V.; Lee, CH.; Vallenet, D.; Yu DS, Choi, S-H.; Couloux A, Lee S-W, Yoon SH. and Cattolico, L. 2009, Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3), **J. Molec. Biol.**, 394:644-652.
- [87] Sørensen, HP. and Mortensen, KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechn.* 115:113-128, 2005.
- [88] Studier, F.W., 1990, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes *Methods Enzymol.*, 185: 60-89.

- [89] Grodberg, J. and Dunn, J.J., 1988, OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification, *J. Bacteriol.*, 170:1245-1253.
- [90] Lobstein, J., Emrich, CA., Jeans C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M. S., Huffle, 2012, A novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microbial Cell Factories.*, 11:753.
- [91] Ren, G., Ke, N. and Berkmen, M., 2016, Use of the Shuffle strains in production of proteins, *Current Protocols in Protein Science.* 85: 5.26.
- [92] Bullock, W., Blue, XL., 1987, A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection *Biotechniques.*, 5:376-379.
- [93] Cohen, S. N. 1993, Bacterial Plasmids: Their Extraordinary Contribution to Molecular Genetics *J. Gene.*, 135 (1-2): 67-76.
- [94] Tolmachov, O. 2009, Designing Plasmid Vectors,” *Methods in Molecular Biology*, 542: 117-129.
- [95] Funnell B, and Phillips G. 2004, Preface, in *Plasmid Biology*, eds Funnell B., Phillips G. (Washington, DC: ASM Press;), xi.
- [96] Frost, L.S. and Koraimann, G. 2010, Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *J. Future Microbiol.* 5: 1057–1071.
- [97] Smillie, C.; Garcillán-Barcia, M.P.; Francia, M.V.; Rocha, E.P. and delaCruz, F. 2010, Mobility of plasmids. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74,434–452,.
- [98] Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M.P., delaCruz, F., Rocha, E. P. 2011, The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *J. PLoS Genet.* 7:e1002222.
- [99] Aminov, R.I. 2011, Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2:158.
- [100] Boucher, HW.; Talbot, GH.; Bradley, JS. et al. 2009, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *J. Clin. Infect. Dis.*, 48: 1–12.
- [101] Hughes, RA., Miklos, A.E., Ellington, A.D., 2011, Gene synthesis: methods and applications. *J. Metho. Enzymol.*, 498: 277–309.
- [102] Radeck, J.; Kraft K, Bartels, J.; Cikovic, T.; Durr F.; Emenegger, J. et al. 2013, The Bacillus BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Eng.*, 7:29.

- [103] Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5): 411–421.
- [104] Saida, F, Uzan, M., Odaert, B., Bontems, F., 2006, Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools, *Current Protein and Peptide Science.*, 7(1): 47-56.
- [105] Anton, B.P. and Raleigh, E.A.J.G.A., 2016, Complete genome sequence of NEB 5-alpha, a derivative of *Escherichia coli* K-12 DH5- α . *Genome Announc.* 4:e01245-01216.
- [106] Song, Y.; Lee B-R.; Cho S, Cho Y-B.; Kim, S-W.; Kang TJ.; Kim SC. and Cho, B-K. 2015, Determination of single nucleotide variants in *Escherichia coli* DH5 α by using short-read sequencing. *J. FEMS. Microbio. Letters.*, 362:fnv073.
- [107] Papanephytous, C.P., and Kontopidis, G., 2014, Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review, *Protein Expression and Purification.*, 94: 22-32.
- [108] Ramos, C.R.R., Abreu, P.A.E., Nascimento, A.L.T.O., Ho, P.L., 2004, A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37(8): 1103-1109.
- [109] Sambrook, J. and Russel, D., 2001, *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Gold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [110] Zhu, B., Cai, G., Hall, E.O., Freeman, G.J. 2007, In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations, *J. Biotechniques.*, 43(3): 354-359
- [111] Hamilton, M. D., Nuara, A. A., Gammon, D.B., Buller, R.M., Evans, D.H. 2007, Duplex strand joining reactions catalyzed by vaccinia virus DNA polymerase. *J. Nucleic Acids Research.*, 35(1): 143-151.
- [112] Sasaki, I., Goto, H., Yamamoto, R., Tanaka H, Takami KI., Yamashita, KJ., Horio, T., 1982, Hydrophobic ionic chromatography: its application to microbial glucose oxidase, hyaluronidase, cholesterol oxidase and cholesterol esterase, *J. Biochem.*, 5:1555–61,.
- [113] Wang, C., Cao, Y., Sun, B. et al. 2008, Preparation and some properties of cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. R14-2 . *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2149–2157.

- [114] Williams, R.J. 2003, Restriction Endonucleases Classification, Properties, and Applications, *J. Molecular biotechnology.*, 24: 225-243.
- [115] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. P.A. 12 Cold spring Harbor Laboratory press. Cold spring Harbor, New York. P: 68.
- [116] Laemmli, U.K. 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- [117] Bradford, M. M. 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [118] MacLachlan, J., Wotherspoon, A., Ansell, R., Brooks, C., 2000, Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72 (5): 169–195.
- [119] Nishiya, Y., Harada, N., Teshima, S.I., Yamashita, M., Fujii I, Hirayama, N., Murooka, Y., 1997, Improvement of thermal stability of *Streptomyces* cholesterol oxidase by random mutagenesis and a structural interpretation. *Protein. J. Eng.*, 10(3): 231–235.
- [120] Brooks-Wilson, A.R., P.N. Goodfellow, S., Povey, H.A., Nevanlinna, Jong, P.J., de Goodfellow, P.J., 1990, Rapid cloning and characterization of new chromosome 10 DNA markers by Alu element-mediated PCR, *J. Genomics* 7, 614-620.
- [121] Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S., Stoffel, S.J., Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, Erlich, H.A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *J. Scien.*, 239: 487-491.
- [122] Shuldiner, A.R., K. Tanner, L.A., Scott, C.A., Moore Roth, J., 1991. Ligase-free subcloning: A versatile method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products in a single day. *J. Anal. Biochem.*, 194: 9-15.
- [123] Pingoud, A., Wilson, G. G., Wende, W., 2014, Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. *Nucleic acids research.*, 42(12): 7489-527.
- [124] Luria, S.E. and Burrous, J.W. 1995, Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*, *J. Bacteriol.*, 74: 461-476.
- [125] Mason, A. B., He, Q. Y., Adams, T. E., Gumerov, D. R., Kaltashov, I. A., Nguyen, V., MacGillivray, R. T. 2001, Expression, purification, and characterization of recombinant nonglycosylated human serum transferrin containing a C-terminal hexahistidine tag, *Protein expression and purification*, 23(1): 142-150.

- [126] Qin, H M.; Zhu, Z.; Zhng MaZ.; Xu, P. et al. 2017, Rational design of cholesterol oxidase for efficient bioresolution of cholestane skeleton substrates, *SCIENTIFIC Reports*, 7: 16375.
- [127] Ghasemian, A., Yazdi, M. H., Sepehrizadeh, Z., 2008, Construction of a thermally stable cholesterol oxidase mutant by site-directed mutagenesis, *J. Biotechno.*, 7: 826–829.
- [128] Sun, Y., Yang, H., Wang, W., 2011, Improvement of the thermostability and enzymatic activity of cholesterol oxidase by site-directed mutagenesis, *J. Biotechnol. Lett.*, 33, 2049–2055.
- [129] Sun, J., Kawakami, H., Zech, J., Speck, C., Stillman, B., Li, H., 2012, Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to origin DNA revealed by cryo-electron microscopy. *Structure*, 20(3), 534-544.
- [130] Chen, Y. R., Huang, H. H., Cheng, Y. F., Tang, T. Y., Liu, W. H., 2006, Expression of a cholesterol oxidase gene from *Arthrobacter simplex* In *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J. Enzyme. Microb. Technol.* 39, 854–860.
- [131] Shtratnikova, V. Y. et al. 2015, Complete genome sequence of steroid-transforming *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D , *J. Genome. announc.* 3, e01406–01414.
- [132] Li, B.; Furihata, K.; Ding, L.-X. and Yokota, A. *Rhodococcus kyotonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:1956-1959, 2007.
- [133] El-Naggar, N., Deraz, S F., Soliman, H M., El-Deeb, N. ,M. El-Shweihy, N. M., 2017, Purification, characterization and amino acid content of cholesterol oxidase produced by *Streptomyces aegyptia* NEAE, *J. B.M.C. Microbiology.*, 17:76.
- [134] Westermeier, R., 2006, Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels, *Proteomics*, 6(S2 1), 61-64.



وزارة الصحة / البينة
دائرة صحة ذي قار
مركز التدريب والتنمية البشرية
العدد / ٩٨٨
التاريخ ٢٠٢١/٨/٢٥

الى / مستشفى سوق الشيوخ العام

م / تسهيل مهمة

تحية طيبة..

بناء على الطلب المقدم من قبل الباحث (البيولوجي علاء كاظم شريف) بتاريخ ٢٠٢١/٨/١٥ و بناءً على موافقتكم المبدئية على استمارة مشروع البحث المقدمة من قبل الباحث، تم عرض الاستمارة على لجنة البحوث في دائرتنا خلال جلستها الاسبوعية و كان قرار اللجنة:

" الموافقة على تنفيذ مشروع البحث بصيغته المقدمة و لا مانع من تنفيذه في مؤسسات الدائرة "

نرفق رباطاً قرار لجنة البحوث ذي العدد (٢٠٢١/١٧) و لا مانع لدينا من تسهيل مهمته، على ان لا تتحمل دائرتنا اي تبعات مالية او قانونية و ان تلتزم الباحث بالاعتبارات الاخلاقية اثناء اجراء البحث

تم استيفاء رسوم تسهيل المهمة بموجب الوصل ذي العدد (٠١٧٠٢٦١) في ٢٠٢١/٨/٢٤

للتفضل بالاطلاع مع الاحترام

المرفقات // قرار لجنة البحوث


الدكتور

مشعل زوري جبار

مدير القسم

٢٠٢١/٨/٢٥

الشربيت، النخوير
اجازة للدراسة

نسخه منه الى :-
قسم التدريب و التنمية البشرية / شعبة ادارة البحوث و المعرفة ... مع الاوليات

البريد الالكتروني thiqrhealthtraining@yahoo.com

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	ALAA KADHİM SHAREEF
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	thi Qar University
Fakülte	College of Science
Bölümü	Biologiy
Mezuniyet Yılı	2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	KIRŞEHİR AHİ EVRAN UNIVERSITY
Enstitü Adı	FEN BİLİMLERİ
Anabilim Dalı	İleri Teknolojiler
Programı	
Mezuniyet Tarihi	2022

Makale ve Bildiriler
Shareef SHAREEF, A. K., ERDEM, B. NEAMAH, A.J.& AL-ADBAN, A.S.H.(2022)Heterologous Expression and Molecular Cloning from Williamsia Marianensis. International Journal of Computational and Experimental Science and Engineering, (3), 69 - 73.