TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARINDA PROTEİN PROFİLİNİN ANTİJENİK GLİKOPROTEİNLER YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gülay ÇİFTCİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hamdi UYSAL

2006- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENTEROCOCCUS FAECALIS SUŞLARINDA PROTEİN PROFİLİNİN ANTİJENİK GLİKOPROTEİNLER YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gülay ÇİFTCİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hamdi UYSAL

2006- ANKARA

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan ve agregasyon maddesi, jelatinaz ve sitolizin virülens faktörleri yönünden çeşitlilik gösteren *Enterococcus faecalis* suşlarında tüm hücre protein profilinin saptanması, antijenik proteinlerin belirlenmesi ve glikoprotein varlığının araştırılması amaçlanmıştır. En önemli üç farklı virülens faktörü yönünden çeşitlilik gösteren *E. faecalis* suşlarına ait proteinlerin Poliakrilamid jel Elektroforezi ile belirlenmesi ve antijenik özelliklerinin gösterilmesi daha ileri çalışmalara ışık tutacaktır. Özellikle şimdiye kadar literatürde rastlanmamış olan *E. faecalis*'e ait glikoprotein varlığının belirlenmesi de temel bulgu olma niteliğinin dışında, ileride bu alanda yapılacak olan çalışmalara önemli bir katkı sağlayacaktır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen başta Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekan Yardımcısı ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hilal KARAGÜL'e bu ilginç ve orijinal konunun seçilmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hamdi UYSAL'a, çalışmalarım boyunca katkılarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ, Sayın Prof. Dr. Ulvi Reha FİDANCI, Sayın Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Tevhide SEL'e, tez izleme komitesindeki Sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalar süresince yardımlarından dolayı Araş. Gör. Serap Ünübol AYPAK'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma, Ankara Üniversitesi ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri/elemanlarına ve bugüne ulaşmamda sonsuz özveri ile yanımda olan sevgili eşim Alper ÇİFTCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
Önsöz iii
İçindekiler iv
Şekiller v
Çizelgeler vi

1.GİRİŞ 1
1.1. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması 2
1.1.1. İçerdikleri Bağ Tipine Göre 2
1.1.2. Bulundukları Yere Göre 3
1.2. Bakteriyel Glikoproteinler 4
1.2.1. S-Tabaka Glikoproteinleri 10
1.2.2. Membran ile İlişkili Glikoproteinler 12
1.2.3. Yüzey ile İlişkili Glikoproteinler 17
1.2.4. Salgısal Glikoproteinler 19
1.2.5. Hücresel Glikoproteinler 21

2.GEREÇ VE YÖNTEM 27
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar 27
2.2 Enterokok Suşları 27
2.3. Besiyerlerleri ve Çözeltiler 28
2.4. Enterokokların İdentifikasyonu 32
2.5. Enterokok Suşlarının Virulens Faktörlerinin Belirlenmesi 32
2.6. İmmun Serum Eldesi 34
2.7. Tüm Hücre ve Virülens Faktörlerine Spesifik Protein Profilinin Belirlenmesi 36
2.8. Antijenik Yapının Analizi 37
2.9. Glikoprotein Varlığının Analizi 38

3.BULGULAR 40
3.1. Enterokok Suşlarının İdentifikasyon Bulguları 40
3.2. Enterokok Suşlarının Virulens Faktörlerinin Belirlenmesi 40
3.3. İmmun Serum Eldesi ve Antikor Miktarının Belirlenmesi 41
3.4. Tüm Hücre ve Virülens Faktörlerine Spesifik Protein Profilinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi 43
3.5. Antijenik Yapının Analizi 44
3.6. Glikoprotein Varlığının Analizi 48

4.TARTIŞMA 53

5.SONUÇ VE ÖNERİLER 62

ÖZET 64

SUMMARY 65

KAYNAKLAR 66

ÖZGEÇMİŞ 74

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Oligosakkarid zincirinin proteine N-glikozidik bağ ile bağlanması.	2
Şekil 1.2.	Oligosakkarid zincirinin proteine O-glikozidik bağ ile bağlanması..	3
Şekil 3.1.	Enterokok suşlarına karşı oluşan antikor seviyeleri.	42
Şekil 3.2.	Enterokok suşlarının tüm hücre protein bant profilleri.	44
Şekil 3.3.	*E.faecalis* OG1X (pAM944) ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.	45
Şekil 3.4.	*E.faecalis* OG1RF ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.	45
Şekil 3.5.	*E.faecalis* OG1X (pAM9058) ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.	45
Şekil 3.6.	Negatif kontrol grubunda yer alan tavşan serumları kullanılarak yapılan immunblot analiz sonuçları.	46
Şekil 3.7.	Enterokok suşlarının immunblotting ile Antijenik yönden karakterizasyonu.	47
Şekil 3.8.	PAS boyama yöntemi ile glikoprotein analizi sonuçları.	49
Şekil 3.9.	Glikan Tayin Kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	50
Şekil 3.10.	Glikan Ayırtedici Kit kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.	51

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Prokaryotik Glikoproteinler. 14

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *E.faecalis* suşlarının sahip oldukları virulens faktörleri. 41

Çizelge 3.2. Enterokok suşlarına karşı oluşan antikor miktarları. 42

Çizelge 3.3. Enterokok suşlarının immunblotting ile antijenik karakterizasyonunda görülen bant ağırlıkları. 48

Çizelge 3.4. Çalışmada elde edilen sonuçların toplu sunumu. 52

1. GİRİŞ

Polipeptid iskeletine kovalan olarak bağlı oligosakkarit zincirlerini içeren proteinler olarak tanımlanan glikoproteinler (Çağlayan ve ark., 1997; Elbein, 1999; Akman, 2002), glikokonjugatlar veya karma karbonhidratların alt sınıfında yer alırlar (Feizi, 1991; Faillard, 1998). Kompleks karbonhidratlar; glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipidler olarak üç sınıfa ayrılmakta ve her üç sınıf "glikokonjugat" olarak adlandırılmaktadır. Glikoproteinler çok değişik miktarda karbonhidrat içerirler ve karbonhidrat zincirleri çoğunlukla dallanmış yapıdadır. Örneğin; immunglobulin G kütlesinin %4'ü kadar, kollagen genellikle %1'den az, ribonükleaz B %8, eritrosit zarında bulunan glikoforin %20'den fazla, gastrik glikoprotein olan müsin ise %60'dan fazla, kan grubu maddeleri ise %85'e kadar, mukopolisakkaritler ise %100'e yakın karbonhidrat içermektedirler (Allen ve Kisailus, 1992; Champe ve Harvey, 1994). Glikoproteinlerin karbonhidrat kısmında başlıca 7 çeşit monosakkarid bulunur. Bu monosakkaridler değişik sıralama ve farklı bağ yapıları ile bir araya gelirler ve sonuçta çok sayıda karbonhidrat zincir yapısı ortaya çıkar. Oligosakkarit zincirleri glikoproteinlerin peptid omurgasına 5 amino asit artığından biriyle bağlanırlar. Bunlar Asparajin (Asn), Serin (Ser), Treonin (Thr), Hidroksilizin (Hyl) veya Hidroksipirolin (Hyp)'dir. Glikoproteinlerin oligosakkarit zincirlerinin çok önemli fonksiyonları vardır. Bunlar öncül proteinlerin daha küçük ürünlere proteolitik işlemlenmesinde etkilidir. Fizikokimyasal nitelikleri (çözünürlük, akışkanlık, yük ve denatürasyon) değiştirirler. Biyolojik etkinliğe katılırlar (koriyonik ganadotropin). Zarlara yerleşmeyi, hücre içi göçü, salgılamayı, embriyonik gelişmeyi ve farklılaşma ile kanser hücreleri tarafından seçilen metastaz noktalarını etkilerler (Murray ve ark., 1996).

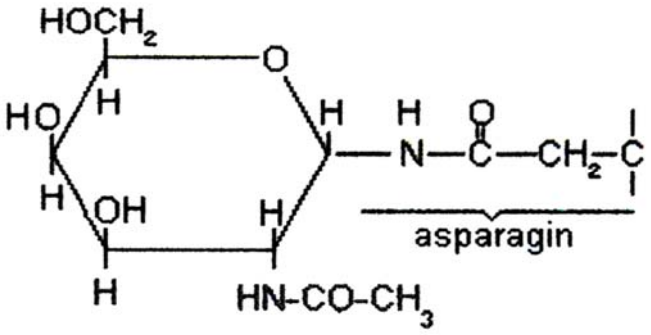
1.1. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması

Glikoproteinler içerdikleri bağ tiplerine göre ve bulundukları yerlere göre sınıflandırılırlar:

1.1.1. İçerdikleri bağ tipine göre

1.1.1.1. N-glikozidik bağı içerenler

N-asetilglukozamin molekülünün ß-N-glikozidik bağ ile polipeptid zincirinde bulunan Asparagin aminoasidinin amid grubu azotuna bağlanması söz konusudur (Şekil 1.1). Ovalbumin ve immunglobulinler başlıca N bağlı glikoproteinlerdir (Nigam ve Cantero, 1973; Akman, 2002).

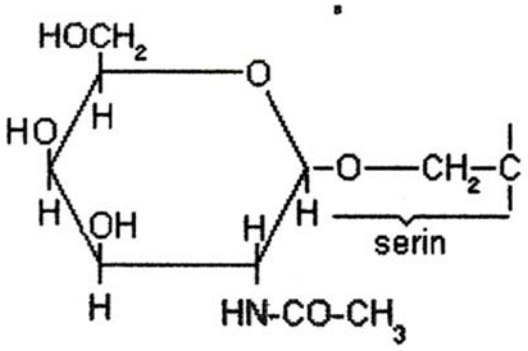


Şekil 1.1. Oligosakkarid zincirinin proteine N-glikozidik bağ ile bağlanması (N-asetil glikozaminin asparagine bağlanması).

1.1.1.2. O-glikozidik bağı içerenler

O-glikozilasyon, N asetil galaktozaminin oligosakkarit zincirindeki ilk monosakkarid O-glikozidik bağla polipeptid zincirindeki Serin/Treonin amino asitlerinde bulunan oksijen molekülüne bağlanması işlemidir (Şekil 1.2.).

Birçok membran proteini, müsinler, proteoglikanlar, kollagenler başlıca O bağlı glikoproteinlerdir (Anumula, 2000).



Şekil 1.2. Oligosakkarid zincirinin proteine O-glikozidik bağ ile bağlanması (N-asetil galaktozaminin serine bağlanması).

1.1.2. Bulundukları yere göre (Faillard, 1998)

1.1.2.1. Memeli Glikoproteinleri

a. Gastrointestinal kanal glikoproteinleri

i. Mide-bağırsak sıvısının mukus materyali

b. Diğer Glikoproteinler

i. Solunum yolu glikoproteinleri

ii. Genital kanal glikoproteinleri

iii. Amniyon sıvısı glikoproteinleri

iv. Eklem sıvısı glikoproteinleri

c. Kan Plazması Glikoproteinleri

d. Konnektif Doku Glikoproteinleri

e. Üriner Glikoproteinler

f. Muhtelif glikoproteinler

1.1.2.2. Balık ve İntervertebralı Glikoproteinleri

1.1.2.3. Bitki Glikoproteinleri

1.1.2.4. Viral Glikoproteinler

1.1.2.5. Bakteriyel Glikoproteinler

1.2. Bakteriyel Glikoproteinler

Ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan glikoproteinler, prokaryotlarda da bulunabilmektedir. Geçmişte protein glikozilasyonunun ökaryotlar ile sınırlı olduğu düşünülmekte iken, son yıllarda prokaryotik glikoproteinlerin yapısı, fonksiyonu ve biyosentezi üzerinde yapılan çalışmalar bakterilerde de proteinlerin glikozile olabildiğini göstermiştir. Üzerinde en fazla çalışılan prokaryotik glikoproteinler, arkeobakterlerin S-tabaka glikoproteinleridir. Prokaryotik mikroorganizmalarda S-tabaka glikoproteinleri dışında, membran ile ilişkili glikoproteinler, yüzey ile ilişkili glikoproteinler, salgısal glikoproteinler ve ekzoenzim glikoproteinlerin varlığı, mekanizması ve fonksiyonları konularında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, prokaryotların da yapılarında glikoproteinleri bulundurduklarını göstermiştir (Upreti ve ark., 2003).

Prokaryotlar, hücre yapılarını oluşturan bir çok farklı karbonhidrata sahiptirler. Bu karbonhidratlar ya lipidlere eklenmiş halde glikolipid olarak bulunurlar, ya da uzun glikan zincirlerinin bir parçasını oluştururlar. Geçmişte; protein ya da peptitlere bağlı olarak bulunan ve ribozomal translasyonal mekanizması ile oluşturulan glikokonjugatların prokaryotlarda bulunmadığı ve glikozilasyonun sadece ökaryotlarda gerçekleşen bir fenomen olduğu düşünülmüş ve bu düşüncenin temelini prokaryotların ömürlerinin kısa olması ve ökaryotik glikoprotein biyosentezi için gerekli olan hücresel organellerin prokaryotlarda bulunmaması oluşturmuştur. Prokaryotik glikoproteinlerin varlığı ilk olarak *Halobakterlerde* bildirilmiş (Upreti ve ark., 2003) ve izleyen yıllarda yaklaşık 70 kadar bakteriyel glikoprotein keşfedilmiştir (Moens ve Vanderleyden, 1997; Schaffer ve ark., 2001; Upreti ve ark., 2003). Glikoproteinlere sahip olduğu bildirilen bakterilerin çoğu arkeobakterlere dahildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda öbakterlerde de glikoprotein varlığına ait kanıtlar mevcuttur (Upreti ve ark., 2003).

Glikoprotein yapısı ve biyosentezinin kimyası, temel olarak prokaryotlar ve ökaryotlarda benzerdir; fakat, prokaryotlar glikozilasyon için gerekli olan hücresel organellerden yoksundur. Bundan dolayı, prokaryotik glikoproteinlerin biyosentez yolunun ökaryotlarda tanımlananlardan daha farklı olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber, oligosakkarit zincirinin oluşturulması için nükleotit ile aktive olan şeker kalıntılarından yararlanma, şeker kısalma reaksiyonlarının varlığı ve taşıyıcı bir lipide (dolikol fosfat) bağlanma gibi benzer mekanizmalar da hem ökaryotik hem de prokaryotik glikozilasyon aşamalarında gözlenmiştir (Kornfeld ve Kornfeld, 1985). Nukleosit difosfat bağlı oligosakkaritlerin varlığı ise prokaryotik ve ökaryotik glikozilasyon mekanizmaları arasındaki farklılık olarak bildirilmiştir. Ayrıca, ökaryotik glikoproteinlerin fonksiyonları hakkında literatürde ayrıntılı bilgi olmasına rağmen, prokaryotik glikoproteinlerin fonksiyonları hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Upreti ve ark., 2003).

Glikoprotein yapısının ökaryotlarda ve prokaryotlarda aynı olduğu düşünülmesine rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler prokaryotik glikoproteinlerin yapılarının ökaryotiklerden çok farklı olduğunu göstermiştir. Buna rağmen bazı özellikler ise her ikisinde de ortak olarak bulunmaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik glikoproteinlerde, şeker zincirlerinin protein çekirdeklerine eklenmesi ya Asn kalıntılarının amid azotuyla (N-glikozilasyon) (Brockl ve ark.,1991; Messner ve Sleytr, 1991) ya da Ser veya Thr kalıntılarının hidroksil gruplarıyla (O-glikozilasyon) (Mescher ve ark., 1974; Mescher ve Strominger, 1976) oluşur. Bununla beraber, bazı bakterilerde farklı dizilimler de bildirilmiştir. Örneğin, Asp-Ser ve Asp-Thr *Chryseobacterium meningosepticum*'da, Val-Tyr ise *Thermoanaerobacter kivu*i'de farklı olan dizilimler içerirler (Peters ve ark.,1992; Sandercock ve ark., 1994). Hem prokaryot hem de ökaryotlarda glikanlar heterojen yapıdadır veya protein birden fazla tip glikanı taşıyabilmektedir .

Glikozilasyonun hem ökaryotik hem de prokaryotik proteinlerin fonksiyonlarında etkili olduğu bilinmektedir. Glikozilasyonun proteinlerin

fonksiyonlarına etkileri çoğunlukla ökaryotik proteinler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Ökaryotik glikoproteinlerin glikan kısımlarının bazı olaylarda önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. Protein yapısının ve stabilitesinin korunması, yüzey ya da hücre içinin tanınması ve hücre adhezyonu, çözünürlük ve vizkozite gibi bir çok fizikokimyasal özelliklerin düzenlenmesi, polipeptitlerin kontrolsüz parçalanmasında proteolitik işlemler ve çözünülürlük düzenlenmesi, biyolojik aktivitenin düzenlenmesi, hücre içinin bölümlendirilmesi, glikoproteinlerin eksternalizasyonu, embriyonik gelişim ve farklılaşma bu fonksiyonlardan bazılarıdır (Messner, 1997; Upreti ve ark., 2003). Ökaryotik proteinlerin bir çok fonksiyonunun keşfedilmesine rağmen, prokaryotik glikoproteinlerin fonksiyonlarına ilişkin literatürde sınırlı bilgi bulunmakta ve benzer fonksiyonlarının olduğuna inanılmaktadır.

Prokaryotik glikozilasyonun öneminin ve fonksiyonel rolünün belirlenmesi için çeşitli analizler kullanılmaktadır. Bu amaçla, glikandan yoksun mutantlar ile yabancı-tip suşların karşılaştırmalı analizi, deneysel koşullarda şekerlerle yarışmaya sokarak ya da sokmaksızın karşılaştırmalı analiz, kültür ortamındaki besinlerin çıkarılması ya da tanıtılması gibi analizler yapılmaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisi de bu amaç için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda protein glikozilasyonunun immunojeniteyi T-hücrelerine peptitlerin MHC ile sunumunu inhibe ederek değiştirebildiği görülmüştür. Buna kanıt olarak *Mycobacterium smegmatis*'ten elde edilen glikoproteinler gösterilmiştir (Garbe ve ark., 1993). Glikozil taşıyan proteinlerin kovalent modifikasyonlarının da immunojeniteyi ve patojeniteyi değiştirdiği bilinmektedir. Örneğin, gram negatiflerin proteinlerinin sahip olduğu aktivitelerden birisinin sitotoksik T-lenfositlerini olgunlaştırma yeteneği olduğu bildirilmiştir (Zellner ve ark., 1989). Ayrıca, B-lenfositlerin aktivasyonuna, fagositozun uyarılmasına ve makrofajlar tarafından sitokin üretimine (Hauschildt ve ark., 1990) neden oldukları da belirlenmiştir. T-lenfositlerinin MHC sınıf 1 ve sınıf 2 ile sunulan kısa antijenik peptitleri tanıma yeteneğinde olmaları, peptit moleküllerin glikozilasyonunun MHC molekülleri

tarafından modifiye peptitler ile T-lenfosit etkileşimini düzenlemelerini sağlamaktadır. Hem glikanların, hem de peptitlerin T-lenfosit reseptörlerinin bağlanma bölgeleri ile ilişki kurdukları bilinmektedir. Böylece glikoproteinlerin demannozilasyonunun azaldığı ve peptitlerin T-lenfositleri stimule etme gücünü azaltarak, hücresel immun yanıtın bozulmasına neden oldukları saptanmıştır. Bu olay *Mycobacterium tuberculosis* antijen kompleksinde de gösterilmiştir (Messner, 1997).

Bakteriyel hücrelerin yüzeyindeki glikoproteinlerin bakteri ve ökaryotik hücreler arasındaki hücre-hücre etkileşimine karışabildikleri bildirilmiştir. Örneğin; Meningokokal pili glikanlarının yok edilmeleri durumunda, bakterinin endoteliyal ya da epiteliyal hücrelere yapışmadan etkilenmediği, ancak *Neisseria meningitidis* pilisine ait glikanların pilusun sialize olmasına neden oldukları ve böylece ölüme karşı direnç sağladıkları rapor edilmiştir (Messner, 1997). Benzer sialilasyonun *Neisseria gonorrhoea* LPS'inde de meydana geldiği ve komplemente karşı direnç sağladığı raporlarda mevcuttur (Upreti ve ark., 2003). Mikroorganizmanın sialik asit molekülü (aynı zamanda konak eritrositlerinin de yüzey komponentidir) self antijen olarak adlandırılmakta ve mikroorganizmanın immun sistemden kamuflajını sağlamaktadır. Bunun aksine *Pseudomonas aeruginosa*'nın *flic* genlerinde olduğu gibi, glikozil gruplarının flagellin proteinlerinin antijenitesinde rol oynadığı ve immunodominant epitop olarak görev yaptığı saptanmıştır (Castric, 1995). Glikozile flagellin monomerlerinin antijeniteye etkisinin *Campylobacter* ve *Mycobacterium* türlerinde görüldüğü bildirilmiştir (Dobos ve ark.,1996; Doig ve ark., 1996; Guerry ve ark., 1996).

Konak organizmanın patojenite ve immunojenitesi için glikozile proteinlerinin kilit rol oynadığı bir çok çalışmada belirtilmiştir (Kupcu ve ark., 1984; Zhu ve ark., 1995). *Campylobacter, Streptokok* ve *Neisseria* gibi bir çok patojende glikoproteinler virulenste rol oynamaktadır. *Campylobacter fetus* gibi mikroorganizmalar antifagositik komponentler üretirken, diğer bakterilerde patogenezin artışını konak hücreye adhezyonu kolaylaştırmak ve

invazyonu sağlamak suretiyle gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Messner, 1997). Glikoproteinlerin membrana ya flagella ya da pilus gibi lokalize olarak adhezif faktör olarak görev yaptığı, böylece konak ve bakteri arasında kapalı bir temas sağladığı raporlarda mevcuttur (Castric, 1995). Benzer olarak *Escherichia coli*'nin enterotoksijenik TibA glikoproteini konak ile ilişkili adhezyon faktörü olarak nitelendirilmiştir (Messner, 1997). *Bacillus thuringiensis subsp.* larvisidal glikoprotein toksininin kovalent olarak ilişkili aminoşekerler içerdiği ve bunların larval sivrisinek bağırsaklarında lektin reseptörleri olarak görev yaptığı ve böylece entomotoksik aktiviteyi sağladığı bildirilmiştir (Upreti ve ark., 2003).

Hücre yüzey glikoproteinleri (CSG), bakterilere şekil vermede ve şekle bağlı fonksiyonlarda önemli olarak kabul edilmektedir. Basitrasin gibi antibiyotik uygulaması sulfatlanmış glikozaminoglikanların polipeptit zincirlerine bağlanmasını inhibe etmekte ve çomak şekilli halobakter hücrelerinin yuvarlak şekle dönüşmesine neden olmaktadır (Upreti ve ark., 2003). Bu olay glikozaminoglikanların çomak şekilli mikroorganizmaların yapısal bütünlüğünü sağladığını göstermektedir. Benzer bir durum *Streptococcus mutans'*ın 60 kDa'luk glikoproteininde de görülmüştür. *Thermoplasma acidophilum*'un membran glikoproteinleri tarafından oluşturulan karbonhidrat tabakasının su moleküllerinin oluşumuna engel olduğu, bunları tespit ettiği ve ağ benzeri iletişimi sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca, plazma membran sınırının sertliğinde de rol oynadıkları düşünülmektedir (Yang ve Haug, 1979). Bu kompleksler membranın bütünlüğünü sağlamaktadır. Bazı organizmalarda glikoproteinlerin bakteriyel hücrelerin şeklini verdiği ve bütünlüğünü sağladığı gözlenirken, *Bacillus megaterium*'un polipeptit faktör PG I'i peptidoglikan sentezini uyarmak suretiyle yardım ettiği bildirilmiştir (Upreti ve ark., 2003).

Glikoproteinlerin biyolojik fonksiyonlarından en önemlilerinin O-glikozilasyon ile meydana geldiği bilinmektedir. Bu modifikasyonun S-tabaka yapısında, konakta ve organizmanın yaşama yeteneğinde direkt olarak rol

oynadığı belirlenmiştir (Upreti ve ark., 2003). Glikanlar ağır glikozile yapılar olarak kümelenmiş halde bulunurlar ve bu kümelerin protein kıvrımları da sınırlıdır. Böylece dağınık bir yapı olarak nitelendirilmişlerdir (Altman ve ark., 1992). Burada, prolin kalıntılarının etrafındaki glikozil ünite kombinasyonları proteinlerin sert ve dağınık olmasına yol açmaktadır (Mescher ve Strominger, 1976). Bu durum *Mikobakterlerde, Clostridium symbiosum* HB25 ve *Flavobacterium meningosepticum*'da da gözlenmiştir (Messner ve ark., 1990).

Birçok bakteriyel enzim glikozile formdadır fakat glikozilasyon enzimatik aktivitede direkt olarak rol oynamamaktadır. Örneğin, *Bacillus spp.* ve *Flavobacterium meningosepticum*'un glukanazlarından glikanların çıkarılması aktivitelerini etkilememektedir. Bununla beraber, *Enterococcus faecium* muramidazında karbonhidratların varlığının, enzime substrata bağlanmada yüksek afinite sağlamak gibi kabul edilmiş bazı fonksiyonları vardır (Kawamura ve Shockman, 1983).

Bu fonksiyonlar dışında, *Azospirillum brasiliense'nin* polar flagellumundaki glikozilasyonun bitki köklerine adsorbsiyonda artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bitki kökü lektininin ya flagellanın glikan zincirlerine bağlanarak, ya da flagellin proteinlerinin kendileri lektin gibi davranarak bitki şekerlerini tanımada rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, O-glikozilasyonun *Trichoderma reesei*'nin proteinlerinin hücre dışına çıkarılmasının artışında da önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Upreti ve ark., 2003).

Sonuç olarak, glikozilasyonun hem prokaryot hem de ökaryotların proteinleri tarafından gerçekleştirilen bir posttranslasyonel modifikasyon olduğu kabul edilmektedir.

Bildirilen tüm prokaryotik glikoproteinler, S tabaka içeren ve S tabaka içermeyen olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. S tabaka içeren prokaryotik glikoproteinler de lokalizasyonlarına bağlı olarak 6 ana tipte sınıflandırılırlar.

Bunlar; membran ile ilişkili glikoproteinler, yüzey ile ilişkili glikoproteinler, intraselüler glikoproteinler, ekstraselüler glikoproteinler, hücresel glikoprotein ve sentetik glikoproteinler ve glikopeptitlerdir (Çizelge 1.1).

1.2.1. S- tabaka glikoproteinleri

Birçok arkeobakter ve öbakterlerde yüzey tabaka (S-tabaka), hücrenin yüzey komponenti olarak ya benzer proteinlerden ya da glikoprotein alt ünitelerinden oluşmuştur (Herscovics ve Orlean, 1993; Messner, 1997). Arkeobakterler S-tabakalarının çoğu glikozile formdadır (Messner ve ark., 1990; Altman ve ark., 1991). Öbakteriler içinde ise glikozile S-tabaka proteinleri sadece Bacillaceae ailesi içerisinde bulunan türlerde (*Bacillus sp., Paenibacillus sp., Clostridium sp., Thermoanaerobacter sp., Desulfotomaculum sp*.) ve *Lactobacillus sp*.'de tanımlanmıştır (Messner, 1997; Upreti ve ark., 2003). Karbonhidrat-protein bölgeleri arasındaki bağlantı kompozisyonunun analizi ile tüm S-tabaka glikoproteinlerinin glikan yapısı incelenmiş ve ökaryotik glikoproteinler ile karşılaştırılınca, bilinen prokaryotik glikoproteinlerin sayısının daha az olduğu saptanmıştır (yaklaşık 20 farklı S-tabaka glikanı). Bu sınırlı sayıya rağmen, S-tabaka glikan zincirlerinin yapısı düşünüldüğünde bazı genellemeler yapmak da mümkün olmuştur. Bir istisna hariç, bilinen tüm arkeobakteriyel S-tabaka glikanları az sayıda (yaklaşık 10 kadar) şeker kalıntılarının küçük düz zincirlerini kapsamaktadır (Brockl ve ark.,1991; Karcher ve ark., 1993). İçerdikleri tek uzun glikan, ağır sulfatlanmış heteropolisakkarittir ve *Halobacterium halobium*'da tespit edilmiştir (Lechner ve Wieland, 1989; Messner, 1997). Arkeobakterlerdeki glikan zincirlerinin çoğu S-tabaka polipeptidine Glc-Asn (Erickson ve Herzberg, 1993), GalNac-Asn (Garbe ve ark.,1993; Espitia ve ark., 1995) ve Rha-Asn gibi N-glikozidik bağlantılar ile direkt olarak bağlanmıştır (Hauschildt ve ark., 1990). Diğer taraftan, Threonin yolu ile O-glikozidik bağlantılar da yaygın olarak bulunmaktadır (Messner ve Sleytr, 1988; Bisaria ve Mishra, 1989; Dobos ve ark., 1996). Öbakteriyel S-tabaka

glikoprotein glikanları genellikle benzer tekrarlayan ünitelerden oluşan uzun homo- ya da heteropolisakkarit zincirlerinden oluşur (Messner, 1997). S-tabaka polipeptitleri ile tekrarlayan üniteler arasında çekirdek yapılarına sahip olabildikleri de bildirilmiştir (Messner ve ark., 1995). Şu ana kadar kısa oligosakkaritlerden tanımlanmış olan sadece iki örnek mevcuttur (Kluepfel ve ark., 1990; Messner ve ark., 1992). Buna rağmen, öbakteriyel S-tabaka glikoproteinlerinde apoproteinlere O-glikozidik bağlantılar ile bağlanma sıklığı, N-glikozidik bağlantılardan daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Rha-Asn arasında sadece bir N-glikan tanımlanmıştır (Messner ve Sleytr, 1988). Benzer bağlantı tipi *Archaeobacterium methanosaeta'*da da bildirilmiştir (Upreti ve ark., 2003). Ser vasıtası ile O-glikozidik bağlantıların iyi tanımlanmış olmasının yanı sıra bazı öbakteriyel S-tabaka glikoproteinlerinde O-glikanlar ve polipeptit zincirler arasında yeni bağlantı tipleri de bulunmuştur. Bu yeni tiplere örnek olarak tirozin-glukoz (Messner ve ark.,1992) ve tirozin-galaktoz (Yang ve Haug, 1979; Messner ve Sleytr, 1988) verilmektedir.

S-tabaka glikanlarının biyosentezi ve glikoprotein genlerinin karakterizasyonu hakkındaki çalışmalar çoğunlukla arkeobakterlerde yoğunlaşmıştır. *Haloferax volcanii*'nin glikan zincirlerinin biyosentezi floresan ile işaretli substrat kullanılarak incelenmiştir (Faguy ve ark., 1994). Bu yaklaşım kullanılarak, glikozil transferinde rol oynayan bir transferaz enzimi belirlenmiştir. *Methanothermus fervidus'*un S-tabaka glikoproteini üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *Methanothermus fervidus*'un heterooligosakkaritinin biyosentezi için nükleotit ile aktive olmuş monosakkarit ve oligosakkarit ara ürünlerinden oluştuğu bildirilmiştir (Messner, 1997). Undekaprenolun yaygın prokaryotik taşıyıcı lipit olmasının yanı sıra dolikollerin de 11 ya da 12 izopren ünitelerinden oluştuğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, dolikollerin S-tabaka glikoproteinlerinin glikan biyosentezinden sorumlu olduğunu ve undekaprenolün pseudomurein biyosentezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca, nükleotit ile aktive olan oligosakkaritler ve dolikol-C_{55}'lerin *Bacillus alvei* CCM 2051'in S-tabaka

glikoprotein biyosentezinde aktive olarak görev aldıkları saptanmıştır (Hartmann ve ark., 1993).

1.2.2. Membran ile ilişkili glikoproteinler

Glikozilasyon, ökaryotik glikokonjugatlarda olduğu gibi prokaryotlarda da membran ile ilişkili bir reaksiyon olarak düşünülmektedir (Lechner ve ark., 1985; Moens ve Vanderleyden, 1997). Bu nedenle, membran preparatlarından birçok prokaryotik glikoprotein izole edilmiş olması araştırmacılar tarafından sürpriz olarak değerlendirilmemiştir. Arkeobakterlerde bulunan az sayıdaki membran ile ilişkili glikoproteinlerinden biri, glikozilenmiş ağır bir protein olan *Thermoplasma acidophilum*'un plazma proteinidir. Bu protein fenol-su ekstraksiyonu ile purifiye edilmiş ve karbonhidrat içeriği %10 (w/w)'dan az olduğu durumlarda toplam membran proteinlerinin %32 (w/w)'sini oluşturduğu saptanmıştır. Glikan bölümlerinin sayısının fazla olmasına rağmen hepsinin temel olarak mannoz kalıntılarını içerdiği bildirilmiştir. Asn ve GlcNAc arasındaki N-glikozidik bağlantının varlığının gösterilmesi için endoglikozidaz H'ye maruz bırakmak gibi bir çok teknik kullanılmıştır (Yang ve Haug, 1979).

S-tabaka glikoproteinlerinin gram pozitif öbakterilerden *Micrococcus luteus*'tan hazırlanan membran preparatlarında da bulunduğu ileri sürülmüş ve bu düşünceye neden olarak GDP-[^{14}C]-mannoz ile inkubasyonu takiben [^{14}C]-mannozil kalıntıları gibi bir çok radyoaktif işaretli maddelerin elde edilmesi gösterilmiştir (Messner, 1997).

Periferal membran glikoproteini (VGP) *Myxococcus xanthus'*un vejetatif hücrelerinden izole edilmiştir (Maeba, 1986). Bu glikoproteinin molekül ağırlığının 74000 Da olduğu ve yaklaşık %13.5 oranında şeker içerdiği belirlenmiştir. Glikan kısmının çoğunluğunu doğal şekerlerin oluşturduğu ve az miktarda hekzoaminler ve uronik asit içerdiği de

bildirilmiştir. VGP'nin concanavalin A-agaroz kolonlarına bağlanma reaksiyonunun ise negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Bununla beraber bu proteinin lektin-affinite kolonlarına bağlanması terminal GalNAC kalıntılarını içerdiğini göstermektedir.

Prokaryotik glikoproteinler içerisinde en fazla bulunan glikoprotein olarak sellulolitik bakteriler olan *Clostridium thermocellum* ve *Bacteriodes cellulosolvens*'ten izole edilen sellüloz-indirgeyen multiprotein kompleksin (sellulozom) spesifik altüniteleri gösterilmiştir (Messner, 1997). Bu glikoproteinin analizi için proteolitik aktivitenin ardından glikopeptit fraksiyonlarının monosakkarit analizi, aminoasit analizi, metilen analizi ve ^{1}H-NMR spektroskopi kullanılmıştır (Gerwig ve ark., 1989). Farklı *Clostridium thermocellum* suşlarında sellulozomların hücreden serbest formlarının toplam karbonhidrat içeriğinin %5-7(w/w) olduğu ve bunların O-bağlı glikan zincirleri içerisinde bulunduğu bildirilmiştir. Bu sonuç, glikoproteine dirençli materyallerin peptit-N^{4}-(N-asetil-beta-glikozaminil) aspargine amidaz F(endohlikosidaz F)'ye dirençli olduğunu kanıtlamıştır. Glikopeptitler içerisinde galaktopiranoz ve galaktofuranoz formlarındaki galaktoz kalıntıları olarak 3-O-Me-GalNAc ve GlcNAc bildirilmiştir (Gerwig ve ark., 1991; Zeitler ve ark., 1998; Schaffer ve ark., 2000). Predominant amino asitin Thr olduğu, bunu Pro'in takip ettiği ve az miktarda da Ser bulunduğu belirlenmiştir (Schaffer ve ark., 2000). *Clostridium thermocellum*'daki glikanların çoğunun Thr kalıntıları yolu ile bağlandığı, *Bacteriodes sellulosolvens*'te ise bağlantı bölgelerinde Ser'in de bulunduğu rapor edilmiştir (Messner, 1997; Upreti ve ark., 2003). Sellulozomal altünitelerin oligosakkarit kısımlarının bir çok biyolojik rolü olduğu düşünülürken fonksiyonel rolleri hakkında yeterli kanıtlar elde edilememiştir.

Çizelge 1. 1. Prokaryotik Glikoproteinler (Messner ve Schaffer, 2002)

Mikroorganizma	Bağlantı Bölgesi
1. S-Tabaka Glikoproteinleri	
Bakteri	-
Aneurinibacillus thermoaerophilus L420-91	-
Aneurinibacillus thermoaerophilus DSM 10155	βGalNAc-Thr/Ser
Aneurinibacillus thermoaerophilus GS4-97	βGalNAc-Thr
Bacillus smithii	-
Clostridium difficile	-
Clostridium sp.	-
Corynebacterium glutamicum	-
Deinococcus radiodurans	-
Desulfotomaculum nigrificans	-
Geobacillus stearothermophilus NRS 2004/3a	-
*Geobacillus stearothermophilus*ATCC 12980, mutant	αGlc-Ser
Lactobacillus buchneri	-
Paenibacillus alvei	βGal-Tyr
Sulfobacillus thermosulfidooxidans	-
Thermoanaerobacter kivui	-Tyr
Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus DSM 568	βGal-Tyr
Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus L77-66	-Tyr?
Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus L111-69	βGal-Tyr
Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus S102-70	βGlc-Tyr
Thermoanaerobacterium thermsaccharolyticum D120-70	βGlc-Tyr
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum E207-71	-Tyr
Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1	-
Archaea	-
Archaeoglobus fulgidus	-
Haloarcula japonica	-
Halobacterium halobium	β Glc-Asn, GalNAc-Asn
Haloferax volcanii	β Glc-Asn, Gal-Thr
Hyphomonas jannaschiana	-
Methanocorpusculum spp.	-
Methanoculleus liminatans	-
Methanoculleus marisnigri	-
Methanoculleus palmoleii	-
Methanoculleus olentangyi	-
Methanoculleus bourgensis	-
Methanoculleus thermophilus	-
Methanolacinia paynteri	-
Methanoplanus limicola	-
Methanosaeta soehngenii	Rha-Asn
Methanothermus fervidus	GalNAc-Asn
Methylobacter alcaliphilus 20Z	-
Methylobacter modestohalophilus 10S	-
Methanothermus sociabilis	-
Pyrodictium abyssi	-
Staphylothermus marinus	-
Sulfolobus acidocaldarius	-
Sulfurococcus mirabilis	-
Thermococcus stetteri	-

Çizelge 1. 1. Prokaryotik Glikoproteinler (Devamı)

Mikroorganizma	Bağlantı Bölgesi
2. S- Tabaka İçermeyen Glikoproteinler	
a) İntraselüler Glikoproteinler	
Bakteri	-
Cellulomonas fimi	β-mannosidase
Streptomyces lividans, β-glucosidase	-
b) Membranla İlişkili Glikoproteinler	
Bakteri	-
*Bacillus thuringiensis*subsp. *kurstaki*, kristal toksin	*N*-glycan
Bacteroides cellulosolvens, cellulosome kompleks	α Gal-Thr/Ser
Bacteroides nodosus, OMP	-
Borrelia burgdorferi, OMP	GlcNAc-Asn
Cellulomonas fimi, mannanase	(Man26A)
Chlamydia trachomatis, OMP	GlcNAc-Asn
Chloroflexus aurantiacus, blue copper protein	-
Ehrlichia canis, OMP	Glc-Ser?
Ehrlichia chaffeenis, OMP	Glc-Ser?
Escherichia coli, OMP	-
Fibrobacter succinogenes, cellulose-bağlayıcı protein	-
Micrococcus luteus, membran glikoproteini	-
Myxococcus xanthus, periferal membran glikoproteini	-
Pseudomonas syringae, lipoglikoprotein	*O*- and *N*-glycans
Staphylococcus aureus, hücre duvarı glikoproteini	-
Archaea	-
Thermoplasma acidophilus, plazma membrane glikoproteini	GlcNAc-Asn
c) Yüzey ile İlişkili Glikoproteinler	
Bakteri	-
Azospirillum brasilense, flagellin	-
Burkholderia pseudomallei, hücre yüzey fosfataz	-
Campylobacter coli, flagellin	-
Campylobacter fetus, flagellin	-
Campylobacter jejuni, flagellin	Pse5Ac7Ac- Ser/Thr
Clostridium thermocellum, cellulosome kompleksi	Gal-Thr
Clostridium tyrobutyricum, flagellin	-
Escherichia coli, pilin	-
Escherichia coli, ototransporter adhesin	6-deoxy-Tal-Thr
Mycobacterium smegmatis, glikofosfolipid	-
Myxococcus xanthus, fimbria	-
Neisseria gonorrhoeae, pilin	GlcNAc-Ser
Neisseria meningitidis, pilin	2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose-Ser
Phormidium uncinatum, oscillin	-
Pseudomonas aeruginosa, flagellin	-
Pseudomonas aeruginosa 1244, pilin	β FucNAc-Ser
Rhodococcus erythropolis, hücre yüzey glikoproteini	-
Serpulina hyodysenteriae, flagellin	-
Spirochaeta aurantia, flagellar filament glikoproteini	-
Streptococcus salivarius, hücre yüzey fibrilleri	-
Streptococcus salivarius, mutant A37, fimbria	-
Streptococcus sanguis, hücre yüzey fibrilleri	-
Streptomyces coelicolor, hücresel glikoprotein	-

Çizelge 1. 1. Prokaryotik Glikoproteinler (Devamı)

Mikroorganizma	Bağlantı Bölgesi
Treponema pallidum, flagellin	-
Archaea	
Halobacterium halobium, flagellin	Glc-Asn
Methanococcus deltae, flagellin	-
Methanococcus voltae, flagellin	-
Methanospirillum hungatei, flagellin	-
Methanothermus fervidus, flagellin	-
Natronobacterium magadii, flagellin	-
Sulfolobus acidocaldarius, flagellin	-
Sulfolobus shibatae, flagellin	-
Thermoplasma volcanium, flagellin	-
d) Ekstraselüler Glikoproteinler	
Bakteri	
Actinobacillus actinomycetemcomitans, 37-kDa antijen	-
Bacillus circulans, β-mannanase	-
Bacillus sp., cellulase and xylanase komponenti	-
Cellulomonas fimi, exoglucanase (Cex)	Man/Gal-Thr
Cellulomonas fimi, exoglucanase (CenA)	-
Cellulomonas sp., cellulase	-
Corynebacterium sepedonicum, fitotoksin	Man-Thr
Cytophaga sp., adhezyon inhibitörü	-
Erysipelothrix rhusiopathiae, antijen	-
Fibrobacter succinogenes, cellobiosidase	-
Flavobacterium meningosepticum, endoglycosidase	Man-Ser/Thr
Mycobacterium bovis,several antigens	GlcNAc-Asn
Mycobacterium tuberculosis, 55-kDa antijen	-
Mycobacterium tuberculosis, 45-kDa antijen	α Man-Thr
Mycobacterium tuberculosis, 32 kDa antijen	-
Mycobacterium tuberculosis, 19 kDa antijen	-
Mycoplasma hyopneumoniae, adhesin-benzeri gikoprotein	-
Pseudoalteromonas antarctica NF3, ekzopolimer	-
Pseudomonas putida,antifreeze protein	-
Streptomyces lividans, cellulase	Man/Gal-Thr
Streptomyces lividans, xylanase	-
Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus, α-glucosidase	-
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, ekstraselüler protein kompleksi	-
Thermomonospora fusca,cellulase	-
Vibrio sp., β-mannanse	-
Archaea	
Methanobacterium bryantii	-
e) Hücresel Glikoproteinler	**-**
Bakteri	
Actinomyces naeslundii, agregasyon faktörü	-
Bacillus megaterium, protein faktör PG-1	-
Bacillus thuringiensis, sporangia glikoproteinleri	*O*-glycans-Ser
*Bacillus thuringiensis*subsp. *israelensis*, toksin	GlcNAc-Asn
Campylobacter jejuni,different glycoproteins	-
Clostridium acetobutylicum, otolizin	-
Enterococcus hirae,N-acetylmuramoylhydrolase	*O*-glycan

Çizelge 1. 1. Prokaryotik Glikoproteinler

Mikroorganizma	Bağlantı Bölgesi
Flexibacter columnaris,60-kDa antijen	-
Klebsiella pneumoniae,glycoprotein P1	-
Lactobacillus reuteri, invertaz	-
Mycobacterium vaccae,kaynar su ekstraktı	-
Prevotella intermedia, glikoprotein PGP	-
Streptococcus pyogenes , SAGP	-
Streptococcus pyogenes, SAGP	-
Streptococcus sanguis	GlcNAc-Asn
Archaea	
Methanosarcina mazei, tüm hücre ekstraktı	-
f) Sentetik Glikoproteinler ve Glikopeptitler	
Yüksek-mannoz-tip glikopeptit analogları	Glc-Asn
Bacillus lentus, modifiye subtilisin	-
Geobacillus stearothermophilus NRS 2004/3a	βGlcNAc-PPMurNAc
Paenibacillus alvei CCM 2051	βGlcNAc-PPMurNAc

*Borrelia burgdorferi'*de glikoprotein varlığı PAS boyama ve endoglikozidaz F testi ile birlikte digoksigenin işaretleme ile tespit edilmiştir (Wieland ve ark., 1985). [^{14}C]-N-asetilglikozamin ile metabolik işaretleme OMP glikanlarının aminoşeker ile birleşmesi ile sonuçlanmış ve Borrelia hücrelerinin endoglikosidaz F ile muamelesini takiben karbonhidrat reaksiyonunun negatif sonuç verdiği görülmüştür. Bu olayın glikoproteinin kitobioz kısmının asparagin ile bağlantısı varlığında gerçekleştiği ve N-bağlı glikanların varlığını gösterdiği bildirilmiştir(Messner, 1997).

Fibrobacter succinogenes'in dış membranında bir çok selüloz bağlayıcı protein (CBP) bulunmaktadır 180 kDa'luk CBP'e periodate muamelesinin antikor bağlanmasının inhibisyonu ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Bu gözleme dayanarak, doğal olarak kendi epitopunun karbonhidrat olduğu ve CBP'nin de glikoprotein olduğu ileri sürülmüştür (Messner, 1997) .

1.2.3. Yüzey ile ilişkili glikoproteinler

İlk tanımlanan yüzey ile ilişkili glikoproteinler flagellinlerdir. İlk olarak ta *Halobacterium halobium'da* saptanmıştır (Wieland ve ark., 1985). Flagellar

proteinlerin hepsinde benzer olarak sulfatlanmış sakkarit kısımlarının bulunduğu ve bunların glikoz aracılığı ile apoproteinin asparagin kalıntılarına bağlanmış halde bulundukları bildirilmiştir (Altman ve ark., 1992). N-bağlı glikopeptitlerin Asn-X-Ser/Thr yapısını içerdikleri de belirlenmiştir.

Glikozile arkeobakteriyel flagella içeren diğer prokaryotlar olarak termoasidofilik türlerden *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus shibatae* ve *Thermoplasma volcanium* ile metan üreten türlerden *Methanospirillium hungatei, Methanococcus deltae* ve *Methanotermus* fervidus gösterilmiştir. Bu türlerde flagellin glikoproteinleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi *(*SDS-PAGE) takiben Periodik Asit Schiff (PAS) boya ya da timol-sülfirik asit boyama ile belirlenmiştir. *Methanococcus deltae*'nin üremekte olan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda basitrasin muamelesi sonucunda *Methanococcus deltae* flagellasının düzgün biçimde oluşması için glikozilasyonun gerekli olduğu saptanmıştır (Paul ve ark., 1993).

Öbakterler içinde yer alan gram negatif bakterilerden *Azospirillum brasilense* ve *Campylobacter coli*'nin glikozile proteinleri ise ancak son yıllarda ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. *Azospirillum brasilense'*nin polar flagellasının flagellin glikoproteininin yapısının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, anhidre triflorometanosulfonik asit kullanılmış ve kimyasal deglikozilasyonu takiben molekül ağırlığında düşüş görülmüştür. Ayrıca, glikoproteinlerin blotting'i ile periodat oksidasyonu sonucu PAS boyama ya da digoksigenin ile işaretleme de yapılmıştır. Karbonhidrat spesifik monoklonal antikorlar ile işaretleme ve transmission elektron mikroskopi ile gözlem de bu amaç için kullanılan diğer tekniklerdir (Upreti ve ark., 2003)..

Yapılan çalışmalarda doğal flagellinin glikan yapısında farklılık gösteren iki mutant flagellin de belirlenmiştir (Messner, 1997). Doig ve ark. (1996), *Campylobacter coli'*ye ait flagellinin posttranslasyonal modifikasyon analizini ve posttranslasyonal modifikasyon için gerekli olan genlerin identifikasyonunu ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu çalışma

sonucunda, biotin hidrazit ile periodat oksidasyonu ve reaksiyonunu takiben *Campylobacter spp*. flagellinlerinin glikozile oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, *Limax flavus*'un lektin ile işaretlenmesi sonucunda sialik asit varlığı da gösterilmiştir (Guerry ve ark., 1996). Flagellinlerin posttranslasyonal modifikasyonu için gerekli olan genlerden birinin CMP-N-asetilnöraminik asit sentetaz ile önemli derecede benzerlik gösterdiği de aynı çalışmada belirlenmiştir.

Uzun zaman önce yapılan çalışmalar *Neisseria meningitidis* pilusunun pilin (PilE) proteininin glikozile olduğunu göstermekte iken, meningokokkal pilinin tekrar incelenmesi ile PilE'nin temel altünite yapısında kovalent bağ içeren karbonhidrat zincirlerinin varlığı tespit edilmiş ve glikanın öğelerinin terminal 1-4-bağlı digalaktoz ünitesinin 2,4-diasetoamido-2,4,6-trideoksihekzoz olduğu belirlenmiştir (Stimson ve ark., 1995). Bu trisakkaritin indirgeyici eliminasyon ile serbest hale gelebildiği ve böylece Ser ya da Thr eklendiği görülmüştür. 2,4-diasetoamido-2,4,6-trideoksihekzoz şekeri normalin dışında bağlı şeker olarak dikkat çekmiştir. Çünkü, glikokonjugatlar arasında bu şekere nadir olarak rastlanmaktadır.

1.2.4. Salgısal glikoproteinler (Ekzoenzimler)

Yapılan çalışmalarda henüz salgısal arkeobakteriyel glikoproteinlere rastlanmamıştır. Öbakterlerden izole edilen glikoproteinlerin çoğu enzimatik aktivite göstermektedir ve bu glikoproteinler biyoteknolojik olarak öneme sahiptir.

Daha önceleri, aerobik gram pozitif bakteri olan *Cellulomonas sp*.'den ekstrasellüler selülaz karakterize edilmiştir (Messner, 1997). Selüloz bağlayıcı proteinlerden ikisinin (selülaz CA ve CB) analizi için PAS boyama ve concanavalinA-sepharoz kolon kullanılmış ve bunların glikoprotein oldukları saptanmıştır. Ong ve ark. (1994), *Cellulomonas fimi*'nin sellulazını

incelemişlerdir. Bu sellulazlardan ikisinin (endo-beta-1,4-glukanaz A (Cen A) ve beta-1,4-ksilanaz/ekzo-beta-1,4-glukanaz (Cex)) glikoprotein olduklarını belirlemişlerdir. Bu selülazların Schiff ayıracı ile reaksiyona girebildikleri ve concanavalin A'ya bağlanabildikleri bildirilmiştir. Glikanlarının mannozdan zengin oldukları ve Threonin kalıntılarına mannoz ve galaktoz kalıntıları vasıtasıyla prolin-threoninden zengin bağlantı bölgelerine O-bağ ile bağlandıkları görülmüştür. Benzer tipteki glikozilasyon *Streptomyces lividans* 66 tarafından Cex üretimi sırasında da gözlenmiştir (Ong ve ark., 1994; Sandercock ve ark., 1994). Diğer *Streptomyces lividans* 66 suşlarının da glikozile ekstraselüler ksilanaz (ksilanaz B) ürettikleri bildirilmiştir (Kluepfel ve ark., 1990).

*Clostridium thermosaccharolyticum'*dan pektin metilesteraz ve poligalakturonat hidrolaz aktivitesi yardımı ile ekstraselüler glikozile protein kompleksi izole edilmiştir. Bu proteinin iki alt üniteden oluştuğu ve büyük alt ünitesinin 230 kDa molekül ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Bu proteinin %10 (w/w) oranında şeker içerdiği ve bunlara beta-eliminasyon ve endoglikozidaz F ile muamelenin etkili olmadığı anlaşılmıştır (Van Rijssel ve ark., 1993).

Gram-negatif bir bakteri olan *Flavobacterium meningosepticum* tarafından salgılanan bir çok proteinde bulunan ve endo-beta-N-asetilglukozaminidaz F_2 ve F_3 ve P40 proteaz içeren yeni bir tip O-bağlı glikan tanımlanmıştır (Reinhold ve ark., 1995). Bu glikanın detaylı yapısal analizi sonucunda glikan kısmının (2-OMe) Man1-4GlcNAcU1- 4GlcU1-4Glc1- 4(2OMe)GlcU1- 4[(2-OMe)Rha1-2] Man olduğu saptanmıştır. Uçtaki Man kalıntılarının Serin ve Threonin kalıntılarına O-bağlanmıştır. Az rastlanan bu asidik hepatosakkaritin fonksiyonuna dair bir rapor henüz literatürde bulunmamaktadır.

Enzimatik aktivitesi olmayan bir diğer glikokonjugat gram pozitif bir öbakteri olan *Corynebacterium sepedonicum* kültür süpernatantından izole

edilmiştir. Bu glikopeptit purifiye toksinin pronaz ile muamelesi ve asit ile hidroliz edilmesi ile izole edilmiştir. Karbonhidrat kısmı mannoz ve glikoz kalıntıları içerdiği ve mannoz vasıtasıyla apoproteinin Threonin kalıntılarına O-bağlı oldukları bildirilmiştir (Messner, 1997).

Mycobacterium tuberculosis'in subselüler fraksiyonlarındaki glikozile proteinlerin varlığı hakkında birçok rapor vardır (Espitia ve Mancilla, 1989; Fifis ve ark., 1991; Garbe ve ark., 1993; Dobos ve ark., 1995; Espitia ve ark., 1995). *Mycobacterium tuberculosis'in* kültür filtratlarından glikoprotein izole edilmiş ve 45 kDa ağırlığında glikoprotein olarak karakterize edilmiştir. Bu glikoprotein farklı proteazlar ile proteolitik sindirim çalışmalarında kullanılmıştır. Bu glikopeptitler SDS-PAGE ile elde edilmiş ve concanavalin A reaksiyonu ile identifiye edilmiştir (Dobos ve ark., 1995).

1.2.5. Hücresel glikoproteinler

Bu bölümdeki glikokonjugatlar farklı ekstraksiyon yöntemleri ile sağlam veya bozulmuş hücrelerden izole edilmiştir. Sağlam hücrelerde glikoproteinlerin topografik yerleşiminin mümkün olmadığı bildirilmiştir. Glikoproteinlerin bazılarının sitoplazmada yerleşebildiği bildirilmesine rağmen, olaya biyosentetik olarak bakıldığında bunun da mümkün olmadığı görülmektedir. Çünkü bakteriler golgi cisimcikleri gibi glikozil kalıntı aktarımının gerçekleştiği yerlere sahip değildir.

Öbakterlerden *Bacillus megaterium* hücrelerine toluidin ile muamele edilmiş ve lityum klorit ekstraksiyonu ile PG-1 adı verilen protein faktor izole edilmiştir (Upreti ve Kidwai, 1995). *Clostridium acetobutylicum* hücrelerine aseton presipitasyonu sonucunda izole edilen glikoproteinin bir parçası olduğu belirlenmiştir. Bu glikoproteinin SDS ile muamele edilen hücreleri ve hücre duvar preparatlarını parçaladıkları fakat, proteinlere, DNA ya da RNA sentezine etkisi olmadığı görülmüştür (Messner, 1997). *Clostridium*

acetobutylicum suşlarında plazmid tespit edilememiştir ve genin kromozomal olduğu saptanmıştır. Bu konuda ayrıntılı analizler yapan Kawamura ve Shockman (1983), *Enterococcus hirae'*da otolizininin glikoprotein olduğunu tespit etmişlerdir. Siyanojen bromid veya stafilokokkal V8 proteinaz enzimleri ile hidrolizi takiben, concanavalin A-sefaroz ile purifiye edilen bu otolizin, PAS boyamada en az 3 bant göstermiştir. Glikanların beta eliminasyonu ile enzimin glikoz monomerleri ve glikoz oligosakkaritleri gibi O-bağlı şeker içerdikleri tespit edilmiştir. Streptokok suşlarında bulunan diğer glikoproteinlerin *Streptococcus pyogenes* suşlarında antitümör etkisi gösteren streptokokkal asit glikoproteinleri ya da *Streptococcus sanguins* protoplastında platelet-toplanma ile ilişkili protein (PAAP) olduğu bildirilmiştir (Moens ve Vanderleyden, 1997). Bunların glikoprotein oldukları proteaz inhibitörleri kullanılarak belirlenmiştir. Basitrasinin N-glikozilasyon inhibitörü olduğu belirlenmiş fakat monensin ya da arilglikosidlerin glikozilasyonunu inhibe edici etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Pronas bölünme ile PAAP'den glikopeptitler elde edilmiş ve izole edilen bu glikopeptitlerin NMR spektroskopisi sonucu GlcNAc ve Asn arasında N-glikozidik bağlantı bulunduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, Asn ve GalNac arasındaki N-glikozidik bağın da benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bacillus thuringiensis alt tiplerinin kristal proteinlerinde de glikoprotein tespit edilmiştir (Pfannenstiel ve ark., 1987; Kupcu ve ark., 1995) Buna rağmen *Bacillus thuringiensis subsp*. *kurstaki*'deki kristal proteinin glikoprotein olup olmadığı hala açıklığa kavuşmamıştır. Lektin bağlanması ile GlcNac'ye N-glikozidik bağlantı varlığı *Bacillus thuringiensis supsp.* i*sraelensis* kristal toksininde bildirilmiştir (Messner ve ark., 1997).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Enterokokal enfeksiyonlardan *Enterococcus seriolicida* (Alim ve ark., 2001), *Enterococcus hirae* ve *Enterococcus faecium'*da (Kawamura ve Shockman, 1983) O-glikan içeren glikoprotein bulunmasına rağmen *Enterococcus faecalis*'te glikoprotein varlığının araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bugün

Enterococcus olarak bilinen bu mikroorganizmalar daha önceleri fekal streptokok olarak tanımlanmışlardır. Enterokokların kompleks üreme gereksinimleri yoktur ve genel besiyerlerinde aerobik koşullarda ve geniş bir ısı aralığında üreyebilirler. Enterokokların kontamine veya karışık floraya sahip materyallerden izolasyonları için, selektif ve/veya diferensiyel besiyerleri kullanılır (Kaufhold ve Ferrieri, 1993).

Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Çeşitli hayvanların ve insanların gastrointestinal kanalında, ağızda, deride, genital ve üriner sisteminde bulunabilirler (Devrıese ve ark., 1992; Quednau ve ark., 1998). Canlı organizmalar dışında, yüzey sularından, akarsulardan, lağım sularından, topraktan ve çeşitli besin maddelerinden enterokok izolasyonu yapılmıştır (Pinto ve ark., 1999; Harwood ve ark., 2001). Enterokoklar normal bakteriyel floranın bir parçası olarak kabul edilmelerine karşın, özellikle insanların belirli infeksiyonlarındaki rolü ile dikkati çekmektedir. Klinik infeksiyonların büyük çoğunluğu *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* tarafından oluşturulmaktadır (Cetinkaya ve ark., 2000). Enterokoklar insanlarda nosokomial bakteriyemiye, endokardite, peritonite, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonlarına, subdural empiyeme, osteomyelite ve endoftalimite neden olmaktadırlar (Barie, 2000; Sandoe ve ark., 2001). Enterokokal infeksiyonların %80-90'ında bulunan *Enterococcus faecalis*, en sık rastlanan enterokok türüdür (Cetinkaya ve ark., 2000). Veteriner hekimlik alanında enterokoklar üzerindeki ilgi insan hekimliğine göre daha az olmuştur. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda çeşitli hayvanların sporadik infeksiyonlarından, özellikle küçük hayvanların nosokomial infeksiyonlarından enterokoklar izole edilmeye başlanmıştır (Romalde ve ark., 1996; Devriese ve ark., 1999). Köpeklerin diskospondalit, septisemi, alt solunum yolu hastalıkları, karaciğer apseleri ve idrar yolu infeksiyonlarından (Adamo ve Cherubini, 2001), kedilerin pankreatit ve kolangit ile seyreden enterit, kolangiohepatit (Kumar ve ark., 2003) vakalarından enterokoklar izole edilmiştir. İneklerin subklinik mastitislerinden de enterokok izolasyonu literatürde mevcuttur (Devriese ve ark., 1992). Enterokokların hayvanlarda

oluşturduğu en önemli infeksiyon tavuk amiloid arthropatisidir (Landman ve ark., 1998). Tavuklarda amiloid arthropatiye *Enterococcus faecalis*'in jelatinaz virulens faktörü neden olduğu bildirilmiştir (Çiftci ve Diker, 2006). Virulent enterokok suşlarda bu infeksiyonların oluşmasına neden olan faktörlere örnek olarak jelatinaz, sitolizin ve AS verilebilir. Bazı predispozan faktörlerin etkisi altında ortaya çıkan sporadik infeksiyonlardaki şiddetli klinik belirtiler ve yüksek ölüm oranları, enterokokal virulens faktörleri üzerinde çalışmalar yapılmasına yol açmıştır.

Agregasyon substansı (AS), bakteriyel konjugasyon sırasında verici ve alıcı enterokok suşlarının yakın temasa gelmesi için kümelenmelerini sağlayan bir yüzey proteinidir (Clewell, 1993). AS, feromon tarafından uyarılan plazmidlerce kodlanır. Alıcı enterokok tarafından üretilen feromon, verici hücredeki AS plazmidinin ekspresyonunu sağlar ve verici hücre tarafından AS üretilir (Dunny ve ark., 1995; Wendt, 1999). Verici bakterinin hücre duvarındaki AS, çevredeki enterokokları kümelendirerek etkili bir şekilde temas etmelerini sağlar. Elektron mikroskopik incelemelerde, AS bakteri hücre duvarından uzanan saç kümeleri benzeri şekilde görülmüştür (Mundy, 2000). AS ayrıca enterokokların ökaryotik hücrelere bağlanmasını sağlar ve patogenezde önemli rol oynar (Jett ve ark., 1994). AS molekülünde, fibronektine çok benzer şekilde iki Arg-Gly-Asp motifi bulunur ve bu yapı integrin olarak nitelenen ökaryotik hücre reseptörlerine bağlanma özelliğindedir. Enterokokların AS vasıtasıyla kardiak vejetasyonlara, bağırsak ve böbrek epitel hücrelerine bağlanabildiği bildirilmiştir (Shankar ve ark., 1999). AS enterokokal yüzey hidrofobisitesini arttırarak kolestrolün fagozoma yerleşmesini sağlar ve bu da lizozomal vezikülün fagozomla birleşmesini engeller (Hirt ve ark., 2000). AS üreten *Enterococcus faecalis* suşlarının çoğunluğunun sitolizin de üretmesi, endokardit vakalarında da belirlendiği gibi, bu iki özelliğin birlikte çalışması olasılığını gündeme getirmiştir (Chow ve ark., 1993). AS üretimi yapan başlıca enterokok türü *Enterococcus faecalis*'tir (Eaton ve Gasson, 2001).

Sitolizin, sadece. *Enterococcus faecalis* suşlarında bulunan protein yapısında ve hemolitik özellikte bir toksindir. Bu nedenle, hemolizin olarak da adlandırılmaktadır. Enterokok sitolizini çeşitli ökaryotik hücreler üzerinde etkilidir; at ve insan eritrositlerinde beta-hemolize neden olurken, koyun eritrositleri üzerine etkisi yoktur (Mundy ve ark. 2000). Buna dayanarak, enterokoklardaki sitolizin fenotipinin belirlenmesi için, hemoliz testi kullanılmaktadır. Ayrıca, stafilokok, streptokok ve propionobakteriler üzerinde bakteriyosin etkisi göstermektedir (Jett ve ark., 1994). Epidemiyolojik çalışmalar; sitolizin özelliği ile enterokok virulensi arasında bir ilişkinin varlığını göstermektedir. Genel olarak, sağlıklı taşıyıcılardaki sitolitik enterokok oranı %20'nin altında kalırken, klinik izolatlarda bu oran %50'nin üzerine çıkmaktadır (Jett ve ark., 1994, Mundy ve ark., 2000). Japonya'da yapılan bir çalışmada (Ike ve ark., 1987), klinik enterokok izolatlarının %60'nın, çevresel izolatların %17'sinin sitolizin ürettiği saptanmıştır.

Diğer bakteriyel patojenlerde olduğu gibi, proteolitik enzimler enterokokların da virulens faktörleri arasında gösterilmektedir (Mundy ve ark. 2000). Saptanmasında jelatin kullanılması nedeniyle jelatinaz olarak da bilinen enterokokal proteaz, metalloproteinaz özelliğinde (çinko-endopeptidaz) ekstraselüler bir enzimdir (Jett ve ark., 1994). Enterokok suşlarının proteaz aktivitesi, %3 jelatin veya %1.5 süt tozu katılmış yarı-katı besiyerlerinde saptanabilmektedir. Proteazı kodlayan *gelE* geninin baz dizileri saptanmıştır ve jelatinaz negatif suşlara klonlandığında bu özelliği kazandırdığı anlaşılmıştır (Qin ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda; jelatinaz özelliği sadece *Enterococcus faecalis* suşlarında belirlenirken, *Enterococcus faecium*'da bu özelliğe rastlanmamıştır. Jelatinaz aktivitesi ile enterokokal virulens arasındaki ilişki, çeşitli deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Jelatinaz pozitif *Enterococcus faecalis* suşu germ-free ratlarda diş çürüklerine yol açarken, jelatinaz negatif suşlarda bu etki belirlenememiştir (Jett ve ark., 1994). Proteaz özelliği, endokardit vakaları ve nosokomial infeksiyonlardan izole edilen enterokokların %54'ünde bulunurken, sağlıklılardan izole edilen suşlarda %12 olarak bulunmuştur.

Bakteriyemi vakalarından izole edilen suşlar üzerinde yapılan bir çalışmada, jelatinazın *Enterococcus faecalis* suşlarının %55'inde bulunduğu, *Enterococcus faecium* suşlarında ise üretilmediği belirlenmiştir (Elsner ve ark., 2000).

Enterokokların virulens faktörleri ve infeksiyon patogenezi ile ilgili bilgilerin çoğunluğu çeşitli hayvan modelleri ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Maeba, 1986; Schulin ve ark., 1999; Singh ve ark., 2000). Çalışmalarda bu amaçla, izojenik varyant suşlar ve çeşitli rodent sistemleri kullanılmıştır. Enterokok infeksiyonlarının patogenezisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, kullanılan hayvan modelinin elde edilecek sonuçları etkileyebileceği ve herbir virulens faktörü için spesifik bir modelin kullanılmasının uygun olacağı bildirilmiştir (Dupont ve ark., 1998).

Bu çalışmada insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan *Enterococcus faecalis* suşlarının tüm hücre protein profilinin saptanması, agregasyon maddesi (AS), jelatinaz ve sitolizine özgü protein profilleri içerisinden antijenik karekterdeki proteinlerin belirlenmesi ve bunlar arasından glikoprotein yapıdaki spesifik antijenlerin varlığının incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bulunan; vertikal mini jel elektroforezi ve Semi-dry transfer (Blotting) cihazı (Hoeffer), güç kaynağı (Amersham), soğutmalı su banyosu (Amersham), GS-800 dansitometresi (Bio-Rad), ependorf santrifüj (Beckman), pH metre (Hanne), çalkalayıcı (Rock), sonikasyon cihazı (Bandelin) ve derin dondurucu (-80^{o}C) (New brunswick) kullanıldı.

Bu çalışmada kimyasallar olarak; Anti-rabbit IgG-alkalen fosfataz konjugatı (Sigma, SA9037), nitroseluloz membranlar (Hoypond-ECL), 3,3'-diaminobenzidin (DAB)(Sigma, SD0426), SDS-PAGE'de 205-6,5 kDa protein standart belirteçi (Sigma, S8445), 30-120 kDa Prestained protein belirteci (Sigma, SP8748), PVDF membran (Hypond-P), metabisülfit (Sigma, SS1516), Schiff ayıracı (Sigma, SS5133), Periyodik asit (Sigma, SP0430) Tris-HCl (Sigma, ST1378), Akrilamid-Bis Akrilamid (Sigma, SA3574), Ammonyum Persülfate (Sigma, SA3678), Bromfenol mavisi (Sigma SB5525), Monobazik Sodyum Fosfat Monohidrat (Sigma, SS3522) kullanıldı.

2.2. Enterokok Suşları

Enterococcus faecalis OG1X suşundan köken alan ve virülens faktörleri yönünden (agregasyon maddesi, jelatinaz ve sitolizin) çeşitlilik gösterdiği bilinen 3 adet *E. faecalis* suşu kullanılmıştır. Bu suşlar şunlardır;

1. *E. faecalis* OG1RF (Jelatinaz pozitif)
2. *E. faecalis* OG1X (pAM9058) (Agregasyon maddesi pozitif)

3. E. faecalis OG1X (pAM944) (Sitolizin pozitif)

Söz konusu suşlardan her birisi adı geçen virulens faktörlerinden sadece birisini içermektedir. İzole ve identifiye edilmiş ve virulens faktörleri belirlenmiş olan yukarıda adı geçen suşlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

2.3. Besiyerleri ve Çözeltiler

Monomer çözelti: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)'nde kullanıldı.

1. Akrilamid 58,4 g
2. Bisakrilamid 1,6 g
3. H_2O 200,0 ml

4X Koşturma (Running) Jel Solusyonu (pH 8,8): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. Tris 36,3 g
2. H_2O 200,0 ml

4X Numune Uygulama (Stacking) Jel Solusyonu (pH 6,8): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. Tris 3,0 g
2. H_2O 50,0 ml

%10 Sodyum Dodesil Sülfat *(SDS) Solusyonu :* SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. SDS 10,0 g
2. H_2O 100,0 ml

%10 Amonyum persülfat (APS): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. APS 0,1 g
2. H_2O 1,0 ml

Numune Solusyonu (Sample buffer) (pH 6,8): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. 4X *Numune* Uygulama (Stacking) jel solusyonu 2,5 ml
2. %10 SDS 4,0 ml
3. Gliserol 2,0 ml
4. Merkaptoetanol 1,0 ml

5. H_2O 0,5 ml

N-butanol-su (1:1) çözeltisi: SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. n-Butanol 50,0 ml
2. H_2O 50,0 ml

Tank solusyonu (pH 8,3): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. Tris 12,0 g
2. Glisin 57,6 g
3. SDS 40,0 ml
4. H_2O 4,0 L

Koşturma (Running) Jel Solusyonu: SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. Monomer çözeltisi 5,5 ml
2. 4X Running gel tamponu 5,0 ml
3. %10 SDS 0,2 ml
4. H_2O 8,3 ml
5. APS 100,0 mikrolitre
6. TEMED 6,7 mikrolitre

Numune Uygulama (Stacking) Jel Solusyonu: SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. Monomer çözeltisi 0,9 ml
2. 4X Stacking gel çözeltisi1,6 ml
3. %10 SDS 66,0 mikrolitre
4. H_2O 4,0 ml
5. APS 33,4 mikrolitre
6. TEMED 3,3 mikrolitre

Blue-Silver Stain (Gümüş mavisi boyası): SDS-PAGE'de kullanıldı.

1. % 2 H_3PO_4
2. % 10 $(NH_4)_2SO_4$
3. % 20 metanol
4. % 0,1 Coomassie G-250

Transfer tampon (pH 8,2-8,4): İmmunblotting yönteminde kullanıldı.

1. Tris 6,0 g
2. Glisin 28,8 g
3. SDS 2,0 g

4. Metanol 400,0 ml
5. Distile su 1 600,0 ml

Parçalama tamponu(Lizis buffer) (pH 6,8): Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ‘de kullanıldı.

1. 125 mM Tris-HCl
2. %10 SDS

Tespit (Fikzasyon) çözeltisi*:* SDS-PAGE’de kullanıldı.

1. %40 etanol
2. %10 asetik asit

Tespit (Fikzasyon) çözeltisi *(10:35:55):* Periodic Asit Schiff (PAS) boyamada kullanıldı.

1. Asetik asit
2. Metanol
3. H_2O

Periodat çözeltisi*:* PAS boyamada kullanıldı.

1. Periodik asit 0,7 g
2. %5 asetik asit 100,0 ml

Metabisülfite çözeltisi*:* PAS boyamada kullanıldı.

1.Sodyum meta-bisülfite 0,2 g
2. %5 asetik asit 100,0 ml

Fosfat Buffer saline (PBS) (pH 7,4): İmmunobloting’de kullanıldı.

1. NaCl 8,0 g
2. KCl 0,2 g
3. Na_2HPO_4 1,4 g
4. KH_2PO_4 0,4 g
5. H_2O 1,0 L

Glikan Ayırt Etme Kiti (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche, Cat. No. 11 210 238 001): Enterokok suşlarında glikoprotein bağlanma tiplerini araştırmak amacıyla kullanıldı.

Tris Buffer Saline(TBS) (pH 7,5) : Glikan ayırt etme kitinde kullanıldı.

1.Tris-HCl 6,0 g
2.NaCl 8,7 g

3. H_2O 1,0 L

Tampon1 (pH 7,5): Glikan ayırt etme kitinde kullanıldı.

1.$MgCl_2$ 0,05 g

2.$CaCl_2$ 0,03 g

3.MnCl 0,05 g

4.TBS 250,0 ml

Tampon 2 (pH 9,5): Glikan ayırt etme kitinde kullanıldı.

1.Tris-HCl 12,1 g

2.$MgCl_2$ 10,2 g

3.NaCl 5,9 g

4. H_2O 1,0 L

Glikan Tayin Kiti (DIG Glycan Detection Kit Roche, Cat. No. 11 142 372 001): Enterokok suşlarında glikoprotein varlığının incelenmesi amacıyla kullanıldı.

Membran blocking buffer: Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1. Blocking buffer 5,0 ml

2. TBS 45,0 ml

Sodyum asetat solusyonu (pH 5,5): Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1.Sodyum asetat 8,2 g

2. H_2O 1,0 L

Tris solusyonu (Tris Buffer Saline,TBS)(pH 7,5): Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1.Tris-HCl 7,9 g

2.NaCl 8,8 g

3. H_2O 1,0 L

Fosfat Buffer Tuz Solusyonu (Fosfat Buffer saline, PBS) (pH 6,5) : Glikan tayin kiti ile yapılan glikoprotein analizinde kullanıldı.

1. Potasyum Dihidrojen Fosfat 6,8 g

2.NaCl 8,7 g

3. H_2O 1,0 L

Enterococcus-M buyyon: Enterokok suşlarının selektif zenginleştirilmesi amacıyla kullanıldı.

Enterococcosel agar: Enterokok suşlarının identifikasyonunda selektif zenginleştirme buyyonundan yapılan pasajlarda kullanıldı.

Todd-Hewitt buyyon: Virulens testlerinde kullanılan suşları üretmek için kullanıldı.

N2GT buyyon: Agregasyon substansın saptanmasında kullanıldı.

Sitolizin test ortamı: Todd-Hewitt buyyona % 1.5 agar ve %4 at kanı ilave edilerek hazırlanmış olan kanlı Todd-Hewitt agar sitolizin testinde kullanıldı.

Jelatinaz test ortamı: Jelatinaz testi için Todd-Hewitt buyyon içine %3 jelatin katılarak hazırlanan besiyeri kullanıldı.

Diğer besiyerleri: Enterokok suşlarının pasajlarında Brain-Heart Infusion (BHI) agar, BHI buyyon, suşların saklanması için Nutrient Broth No.2 kullanıldı.

2.4. Enterokokların İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için, seçilen kolonilerden Gram boyama ve katalaz testi uygulandı. Gram pozitif kok şeklinde görülen ve katalaz negatif olan mikroorganizmaların 45^0C'de üreme ve mannitoldan gaz üretme özellikleri incelenerek, bu testlerde pozitif sonuç veren ve *Enterococcus* spp. olarak ayrılan suşların tür düzeyinde identifikasyonu için çeşitli fenotipik ve biyokimyasal özellikleri incelendi. Suşların mannitol, sorboz, arabinoz, sorbitol, raffinoz ve sukroz fermentasyon özelliklerinin saptanması için BHI buyyonda klasik karbonhidrat testleri yapıldı (Kaufhold ve Ferrieri, 1993; Hanson ve Cartwright, 1999).

2.5. Enterokok Suşlarının Virulens Faktörlerinin Belirlenmesi

2.5.1. Agregasyon Substansı (AS)

Enterokok suşlarındaki agregasyon substansın saptanması için kümelenme testi kullanıldı (Ike ve ark., 1998). Kümelenme testinde, feromon kaynağı olarak plazmid taşımayan *Enterococcus faecalis* OG1X suşunun kültür filtratları kullanıldı. Kültür filtratının eldesi için, OG1X suşu 37^0C'de bir gece üretildikten sonra santrifüj edildi ve süpernatant 0,2 μm membran filtreden geçirildi. Elde edilen kültür filtratından 0,5 ml, 0,5 ml N2GT buyyona konuldu ve AS yönünden incelenecek olan suşların Todd-Hewitt buyyondaki bir gecelik kültürlerinden 20 μl N2GT buyyona eklendi. Test karışımı 37^0C'de 4 saat çalkalanarak bekletildi. Süre sonunda test tüplerindeki kümelenme incelendi. Kümelenme görülen suşlar AS pozitif, kümelenme görülmeyenler AS negatif olarak kabul edildi.

2.5.2. Sitolizin

Enterokok suşlarının sitolizin aktivitesi kanlı agarda hemoliz oluşturma özelliğine göre incelendi (Elsner ve ark., 2000). İncelenecek olan suşların Todd-Hewitt buyyondaki bir gecelik kültüründen %4 at kanı içeren Todd-Hewitt agara ekim yapıldı ve besiyerleri 37^0C'de 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda kolonilerin çevresindeki beta hemoliz alanına göre değerlendirme yapıldı.

2.5.3. Jelatinaz

Jelatinaz özelliği incelenecek olan suşların Todd-Hewitt buyyondaki bir gecelik kültüründen %3 jelatin içeren Todd-Hewitt besiyerine ekim yapıldı, 37^0C'de bir hafta inkube edildi. Ekim yapılan besiyerleri hergün 1 saat 4^0C'de bekletildikten sonra kontrol edildi ve jelin yumuşayarak, akışkan hale gelmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi (Arda, 1997).

2.6. İmmun Serum Eldesi

2.6.1. Hayvan materyali

İmmun serum eldesi için 1 aylık yaşta, 12 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2005/19 sayılı Etik Kurul Kararı). Bu amaçla tavşanlar 3'er hayvanlık 4 gruba ayrıldı. Deney süresince tüm hayvanlar ad libitum olarak beslendi.

2.6.2. İnokulum hazırlanması ve immunizasyon

Tavşanlara inokule edilmek üzere *Enterococcus faecalis* suşları BHI buyyonda spektrofotometrik olarak OD_{470}'de 1,0 ($1,7x10^8$ kob/ml) olmak üzere hazırlandı (Eileen ve ark., 1987). 60^oC'de 30 dakika su banyosunda bekletilmek suretiyle suşlar inaktive edildi ve bu inokulumdan deney gruplarına 1'er hafta ara ile 8 hafta süresince 1 ml miktarında derialtı yolla inokule edildi. Negatif kontrol grubuna da aynı miktar ve zamanlarda steril Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) inokule edildi. Hayvanlardan her inokulasyon öncesi ve sonrası kan alınıp, serumları çıkartıldı. Elde edilen serumlar antikor seviyesinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Alınan kanın serumu çıkarıldı ve ufak parçalara bölünerek -80^oC'de bekletildi.

2.6.3. ELISA ile antikor varlığının belirlenmesi

Serumlarda antikor varlığının belirlenmesi amacıyla tüm serumlara ELISA yapıldı (Shorrock ve ark., 1990) ve immunblot testinde kullanılacak olan en uygun serum seçildi. ELISA için *Enterococcus faecalis* suşlarından toplam bakteri antijeni hazırlandı. Bu amaçla katı besiyerinde üretilen bakteriler Fizyolojik Tuzlu Su ile toplandı ve 60^oC'de 30 dakika su banyosunda

bekletilmek suretiyle inaktive edildi. İnaktive edilen bakteriler 10 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pellet tekrar FTS ile süspanse edilip 3 defa yıkandı. Son yıkama sonrasında pellet, parçalayıcı çözeltisi ile süspanse edildi ve 100^0C'de 5 dakika bekletildi. Bu işlem sonrasında süspansiyon 10 000 rpm'de santrifüj edildi ve pellet antijen kaplama solusyonu ile 10 mikrogram/ml olacak şekilde süspanse edildi. Elde edilen süspansiyondan mikropleytlere 100 μl kaplandı. Mikropleytler 2 saat 37^0C'de bekletildi. Süre sonunda 3 defa yıkanıp, kurulandı. Mikropleytlere 250 μl milk diluent eklendi ve 2 saat 37^0C'de bekletilmek suretiyle doyurma işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda 3 defa yıkandı, kurutulan mikropleytlere 1X milk diluent ile 1/100 oranında süspanse edildi serumlar 100 μl eklendi ve 37^0C'de 1 saat bekletildi. Yıkama ve kurutma işlemini takiben 100 μl Anti-rabbit IgG-alkalen fosfataz konjugatı eklendi. Daha önce belirtildiği gibi 1 saat inkübasyon, yıkama ve kurutma işlemi yapıldı. Mikropleytlere 100 μl pNPP substratı (1mg/ml) eklendi. 30 dakika inkübasyon süresi sonunda durdurucu (1N HCl) solusyonu ile reaksiyon sona erdirildi ve ELISA okuyucusunda 405 nm'de serumlardaki antikor miktarı belirlendi.

2.6.4. Dot-Blot Tekniği ile antijenik bağlanmada kullanılacak immunserum dilüsyonunun belirlenmesi

İmmunblot analizi için kullanılacak olan immunserum dilüsyonlarını belirlemek için her 3 etkene için elde edilen immunserumlara Dot-blot analizi uygulandı. Bu yöntem için nitroseluloz membranlar 1 santimetrekare olarak kesildi. Üzerine 5 µl örnekler damlatıldı. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını uzaklaştırmak için %5 süt tozu, %0,05 Tween20, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, (pH 7.5) içeren çözelti içerisinde 1 saat bekletildi. Elde edilen immunserumların blocking buffer ile 1:100, 1:1000, 1:10 000 ve 1:15 000 oranındaki dilüsyonları uygulandı ve 2 saat bekletildi. Daha sonra PBS (pH 7,4) % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile 3 defa 10 dakika ara ile yıkandı. Sekonder antikor (peroksidaze konjugat antirabbit immunoglobulin 1/3 000

(v/v) oranında blocking buffer ile dilue edildi ve oda ısısında 1 saat tutuldu. PBS (pH 7,4) ve % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile 3 defa yıkandı ve 3,3'-diaminobenzidin (DAB)(Sigma, SD0426) çözeltisi kondu. Oluşan reaksiyon sonucu beliren spotlar değerlendirildi.

2.7. Tüm Hücre ve Virülens Faktörlerine Spesifik Protein Profilinin Belirlenmesi Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Enterokok suşlarının protein profilleri %8 Poliakrilamid jel ile incelendi (Laemmli, 1970). Bu amaçla suşlar BHI agar üzerinde 37^0C'de 24 saat üretildikten sonra, koloniler 1 ml fizyolojik tuzlu su ile toplandı. Bakteriler 60^oC'de 30 dakika su banyosunda bekletilmek suretiyle inaktive edildi. İnaktive edilen bakteriler 10 000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüm hücre süspansiyonu 3 defa yıkandıktan sonra 0,01M Tris-HCl (pH 7.4) çözeltisi ile OD_{470}'de 5.0 olacak şekilde spektrototometrede ayarlandı (Eileen ve ark., 1987). Protein miktarı Lowry yöntemi ile ölçüldü (Lowry ve ark., 1951). Örnekler 2:1 oranında sample buffer ile karıştırıldı. Bu karışım 5 dk ses dalgalı su banyosunda parçalandıktan (sonike) sonra 95^0C'de 5 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutularak, proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

Hazırlanan örnekler, kademeli jel sistemine 20 µl miktarında yüklenerek, tris-glisin buffer sisteminde 20 mA sabit amperde izci boya (bromfenol mavisi) jelin sonuna ulaşıncaya kadar tabi tutuldu. İşlem sonunda, jel sırasıyla 6 saat tespit (Fikzasyon) çözeltisini takiben Blue Silver (Candiano ve ark., 2004) boya çözeltisi ile boyandıktan sonra, %25 etanol çözeltisinde tutuldu ve bantlar görünür hale getirildi. SDS-PAGE'de 205-6,5 kDa arasındaki molekül ağırlıklı protein standardı kullanıldı. SDS-PAGE

sonucunda görülen bantların moleküler ağırlıkları Kodak Moleküler İmaj Analiz Yazılımı ile hesaplandı (Şekil 3.2).

2.8. İmmunblotting Tekniği ile Antijenik Yapının Analizi

Analiz edilen suşlardaki antijenik yapının belirlenmesi amacıyla Burnie ve ark. (1987) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak SDS-PAGE uygulandı. Membran belirteci olarak 30-120 kDa Prestained SDS-PAGE belirteci kullanıldı . Daha sonra PVDF membran (Hypond-P) ve jel 10 dk transfer tampon da tutuldu. Yarı-Kuru (semi-dry) blot cihazı kullanılarak 3 filtre kağıdı , PVDF membran, jel ve tekrar transfer tamponla ıslatılmış 3 filtre kağıdı kullanılarak 100V'ta 1 saat tutulmak suretiyle jeldeki proteinlerin membrana transferi sağlandı.

İmmunblotting işlemi ile PVDF membranda antijenik bant varlığı incelendi. Spesifik olmayan protein bağlanmaları için 5 g süt tozu, %0,05 (v/v), Tween-20 ve PBS (pH 7,4) karışımda, oda ısısında 2 saat beklendi. Primer antikor içeren serumlar 1/1 000 (v/v) oranında blocking buffer ile dilusyonu yapılarak oda ısısında 2 saat beklendi. Daha sonra PBS (pH 7,4) % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile 3 defa 10 dakika ara ile yıkandı. Sekonder antikor (peroksidaze konjugat antirabbit immunoglobulin 1/3 000 (v/v) oranında blocking buffer ile dilue edildi oda ısısında 1 saat tutuldu. Daha sonra PBS (pH 7,4) ve % 0,05 Tween-20 (v/v) karışımı ile 3 defa 10 dakika arayla yıkandı.

Son olarak, taze hazırlanmış 3,3'-diaminobenzidin (DAB) çözeltisi kondu. Bu solusyonu takiben gri bantlar belirdi ve reaksiyon PBS ile durduruldu. İmmunblotting sonucunda görülen bantların moleküler ağırlıkları Kodak Moleküler İmaj Yazılımı ile hesaplandı.

2.9. Glikoprotein Varlığının Analizi

2.9.1. Periodik Asit Schiff (PAS) boyama tekniği

PAS boyama yöntemi ile glikoprotein analizi için SDS-PAGE yukarıda belirtildiği gibi uygulandıktan sonra, boyama aşamasında PAS (Fairbanks ve ark., 1971) boya methodu kullanıldı. Jel, 1-2 saat tespit çözeltisinde bırakıldı. Daha sonra Periodat solusyonunda 1 saat inkube edildi. Distile su ile yıkandı. 50 ml metabisülfit çözeltisine kondu. Jelin rengi beyazdan sarıya döndü. Daha sonra bu dökülerek 50 ml metabisülfit kondu. Renk tekrar beyazlaştıktan sonra, Schiff ayıracına tabi tutuldu . Jelde 30 dakika ile 2 saat arasında görülen pembe-kırmızı bantlar glikoprotein olarak değerlendirildi.

2.9.2. Glikan tayin kiti

Glikan tayin kiti (DIG Glycan Detection Kit) kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntem, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Membran 10 dakika arayla iki kez 40 ml PBS (pH 6,5) ile yıkandı. Membran 10 ml Sodyum asetat buffer'da hazırlanmış Sodyummetaperiodat ile oda ısısında 20 dk inkübe edildi ve tekrar 10 dk süreyle 2 kez 40 ml PBS (pH 6,5) ile yıkandı. Membran 5 ml sodyum asetat içerisinde 1µl D,G-succinly-ε aminocaproid asit hidrazid içeren solusyonda 1 saat süreyle oda ısısında bırakıldı ve 10 dk süreyle 3 kez 50 ml TBS ile yıkandı. Membran blocking solusyonunda en az 30 dakika tutuldu ve 10 dakika süreyle 3 kez 50 ml TBS ile yıkandı. 15 µl anti-DIG alkaline fosfataz içeren 15 ml TBS (pH 7,5) içerisine konarak, 1 saat bekletildi ve 10 dakika süreyle 3 kez 50 ml TBS ile yıkandı. Membran hareket ettirilmeden substrat (x-fosfat –NBT içerisinde TBS pH 9,5) konuldu ve bantlar belirgin hale gelince bol distile su ile yıkandı. Oluşan bantların moleküler ağırlıkları Kodak Molekül İmaj Yazılımı ile hesaplandı.

2.9.3. Glikan ayırtedici (Diferensiasyon) kit

Glikan ayırtedici kiti (DIG Glycan Differantiation Kit) kullanılarak yapılan bu yöntem, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, ilgili kısımda anlatıldığı şekilde yapılan SDS-PAGE ve membrana transfer sonrasında, membran 5 ml Bloklama ayıracı ve 45 ml TBS (pH 7,5) içerisinde en az 30 dakika bekletildi. 2 defa 10'ar dakika süreyle 50 ml TBS ve bunun sonrasında da 1 kez Tampon 1 solusyonu ile yıkandı. Bu işlemi takiben bağlanma tiplerini araştırmak amacıyla *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) Sialik asit alfa (2-3) ile galaktoz arasında, *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA) mannoz, alfa (1-3), alfa (1-6) yada (1-2) ile mannoz arasında, *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz arasında, *Peanut agglutinin* (PNA) galaktoz beta (1-3) ile N-acetyigalaktozamin arasında ve *Datura stramonıum agglutinin* (DSA) galaktoz beta (1-4) ile N-acetilgalaktozamin lektinleri uygulandı. 10 ml Tampon 1 ile karıştırılıp membranların üzerine kondu ve 1 saat beklendi. Lektin çözeltisinden çıkartılan membran, 3 defa TBS (pH 7,5) ile yıkandı, anti-Digoxigenin-AP 10 µl alınarak, 10 ml TBS ile karıştırıldı ve membranların üzerine uygulandı. 1 saat beklendi. Membran 3 defa 10 dakika süreyle TBS (pH 7,5) ile yıkandı. 10 ml Tampon-2 ve 200 µl substrat (NBT X-fosfat) karışımı membranın üstünü kaplayacak şekilde uygulandı. Bantlar oluşunca, reaksiyon distile su ile yıkanarak durduruldu ve bant oluşumu değerlendirildi.

3.BULGULAR

3.1. Enterokok Suşlarının İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada kullanılan standart Enterokok suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları yapıldı ve her 3 suşun da Gram pozitif kok şeklinde, katalaz negatif olduğu belirlendi. Mikroorganizmaların 45^0C'de üredikleri ve mannitoldan gaz ürettikleri görüldü. BHI buyyonda karbonhidrat fermentasyon testleri yapılarak, suşların mannitol, sorbitol ve sukrozu fermente ettikleri belirlendi. Sorboz, arabinoz ve rafinoz fermentasyon özelliklerinin ise negatif olduğu belirlendi. Bu özelliklere göre değerlendirilen suşların tümü *E. faecalis* olarak identifiye edildi.

3.2. Enterokok Suşlarının Virulens Faktörlerinin Belirlenmesi

3.2.1. Agregasyon Substansı (AS)

Tüm enterokok suşlarına kümelenme testi uygulanarak, suşların *E. faecalis* OG1X feromonunun uyarımı sonucunda agregasyon maddesi üretip üretmedikleri belirlendi. Kümelenme testi sonucunda OG1X kökenli suşlardan *E. faecalis* OG1X (pAM9058) suşunun agregasyon maddesi ürettiği belirlendi (Çizelge 3.1).

3.2.2. Sitolizin

Sitolizin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla enterokok suşlarına uygulanan hemoliz testinde, %4 at kanlı BHI agarda beta-hemoliz oluşturan suşlar sitolizin pozitif olarak kabul edildi. Hemoliz testi sonucunda *E. faecalis* OG1X (pAM944)'in sitolitik özellikte olduğu belirlendi. İncelenen suşlardan

E. faecalis OG1RF ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarının sitolizin üretmedikleri belirlendi (Çizelge 3.1).

3.2.3. Jelatinaz

Enterokok suşlarının proteolitik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan jelatin hidroliz testi sonucunda *E. faecalis* OG1RF suşunun jelatinaz ürettiği belirlendi. İncelenen suşlardan *E. faecalis* OG1X (pAM9058) ve *E. faecalis* OG1X(pAM944) suşları jelatinaz üretimi yönünden negatif olarak bulundu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *E. faecalis* suşlarının sahip oldukları virulens faktörleri.

Etken Adı	Virulens Faktörü		
	AS	Jelatinaz	Sitolizin
E. faecalis OG1X (pAM944)	-	-	+
E. faecalis OG1RF	-	+	-
E. faecalis OG1X (pAM9058)	+	-	-

3.3. İmmun Serum Eldesi ve Antikor Miktarının Belirlenmesi

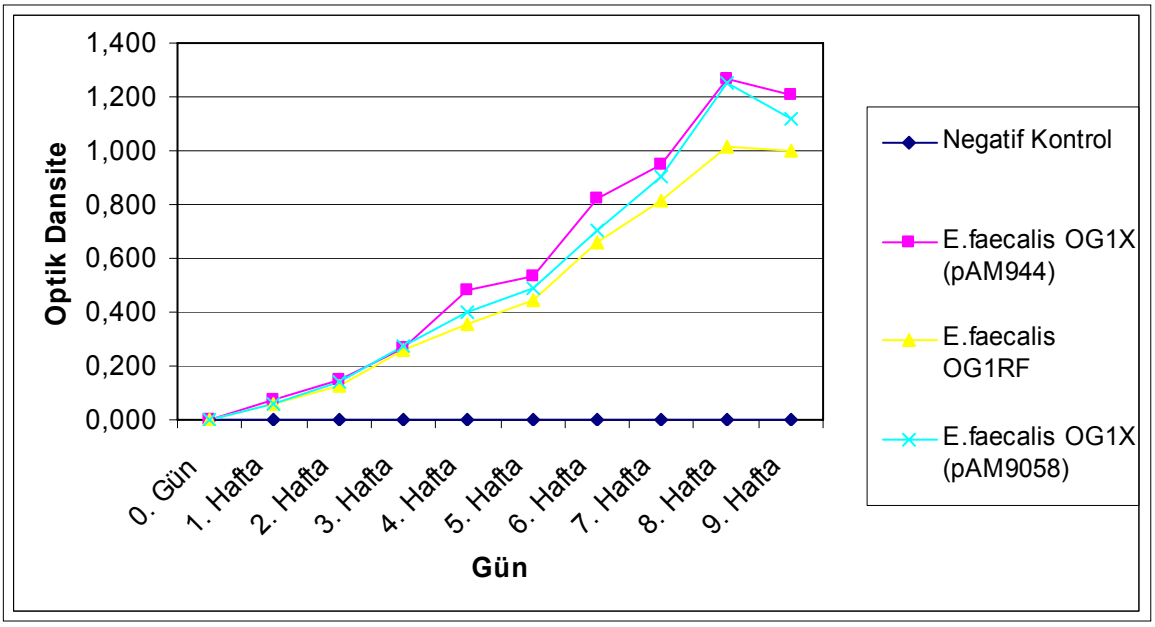
Serumlarda antikor varlığının belirlenmesi amacıyla tüm serumlara ELISA uygulandı ve tavşanlarda immun serum oluşumu değerlendirildi. ELISA testi sonuçlarına göre immunblot testinde kullanılacak olan en uygun serum seçildi.

Deney başlangıcında negatif kontrol ve deney gruplarında yer alan tüm tavşanlarda *E. faecalis*'e spesifik antikor miktarının sıfır (0) olduğu görüldü. İlk etken inokulasyonundan 1 hafta sonra alınan kanlarda antikor titrelerinin arttığı belirlendi ve 8. hafta sonunda antikor titrelerinin pik yaptığı saptandı (Şekil 3.1 ve Çizelge 3.2). Bu sonuçlar doğrultusunda, immunblot

testinde kullanılmak üzere 8. hafta sonunda alınan kanlar seçildi ve bu kanların serumları kullanılıncaya kadar -80^{0}C'de bekletildi.

Çizelge 3.2. Enterokok suşlarına karşı oluşan antikor seviyeleri (405 nm'deki absorbans).

	Negatif Kontrol	*E.faecalis* OG1X (pAM944)	*E.faecalis* OG1RF	*E.faecalis* OG1X (pAM9058)
0. Gün	0,000	0,000	0,000	0,000
1. Hafta	0,000	0,074	0,059	0,062
2. Hafta	0,000	0,148	0,123	0,141
3. Hafta	0,000	0,265	0,257	0,273
4. Hafta	0,000	0,482	0,357	0,401
5. Hafta	0,000	0,534	0,446	0,489
6. Hafta	0,000	0,821	0,656	0,705
7. Hafta	0,000	0,951	0,812	0,903
8. Hafta	0,000	1,268	1,013	1,254
9. Hafta	0,000	1, 207	1,002	1, 122

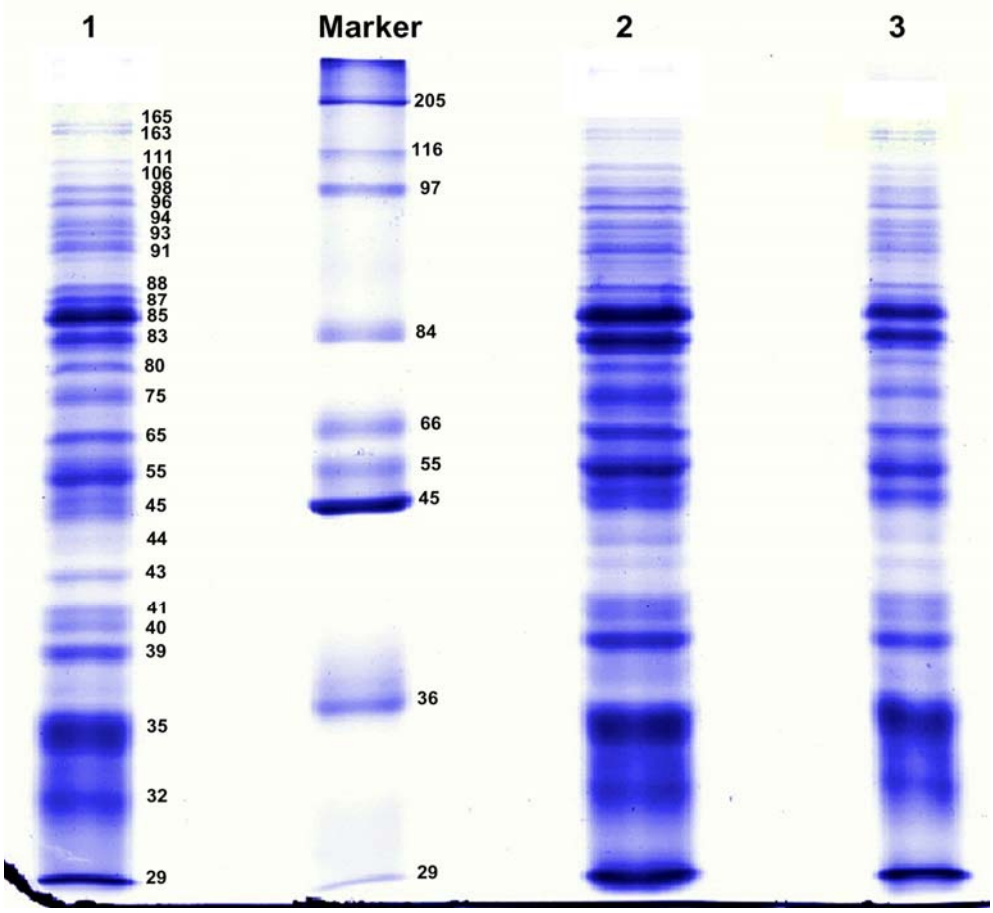


Şekil 3.1. Enterokok suşlarına karşı oluşan antikor seviyeleri (405 nm'deki absorbans).

3.4. Tüm Hücre ve Virülens Faktörlerine Spesifik Protein Profilinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Belirlenmesi

Protein miktarları Lowry yöntemi ile *E. faecalis* OG1X (pAM944) için 0.214 g/dl, *E. faecalis* OG1RF için 0.240 g/dl ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058) için 0.203 g/dl olarak bulundu. Protein profillerini belirlemek amacıyla denatüre koşullarda ve kademeli jel sistemi ile vertikal elektroforez yapıldı. SDS-PAGE üzerinde 205-29 kDa (Sigma, S8445) arasında molekül ağırlığına sahip protein standartları kullanıldı.

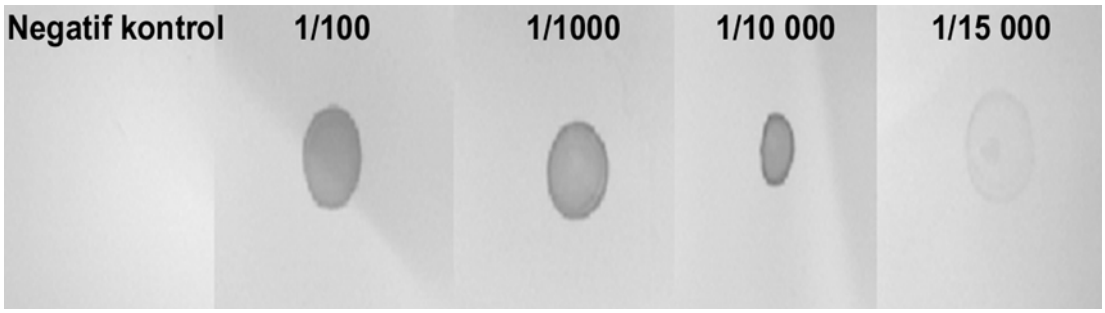
SDS-PAGE sonucunda her üç enterokok suşunda da 165-29 kDa arasında protein bantları saptandı ve etkenlerin hepsinde bantların ortak olduğu görüldü. Bu bantların molekül ağırlıkları sırasıyla 165, 163, 111, 106, 98, 96, 94, 93, 91, 88, 87, 85, 83, 80, 75, 65, 55, 45, 44, 43, 41, 40, 39, 35, 32 ve 29 kDa olarak hesaplandı. Sitolizin, jelatinaz ve AS virülens faktörlerine spesifik bant varlığı görülmedi (Şekil 3.2). *E. faecalis* OG1RF ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 44 ve 83 kDa ağırlığındaki protein bantları diğer suşlara göre daha belirgin bant olduğu, *E. faecalis* OG1X(pAM944)'te ise bu bantların az belirgin bant olduğu görüldü. *E. faecalis* OG1X(pAM944)'te 43kDa ağırlığındaki bant diğer suşlara göre en belirgin bant olduğu ve diğer etkenlerde ise bu bantın az belirgin bant olduğu belirlendi(Şekil 3:2).



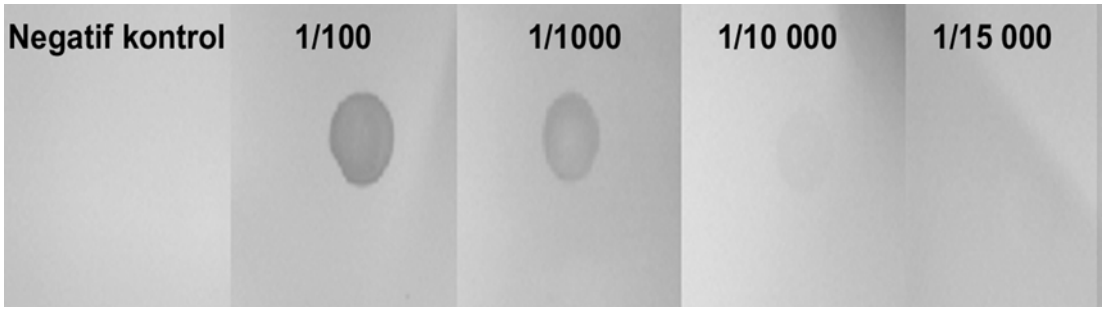
Şekil 3.2. Enterokok suşlarının tüm hücre protein bant profilleri. 1 numara *E. faecalis* OG1X (pAM944), 2 numara *E. faecalis* OG1RF, *3 numara E. faecalis* OG1X (pAM9058).

3.5. Antijenik Yapının Analizi (İmmunblotting)

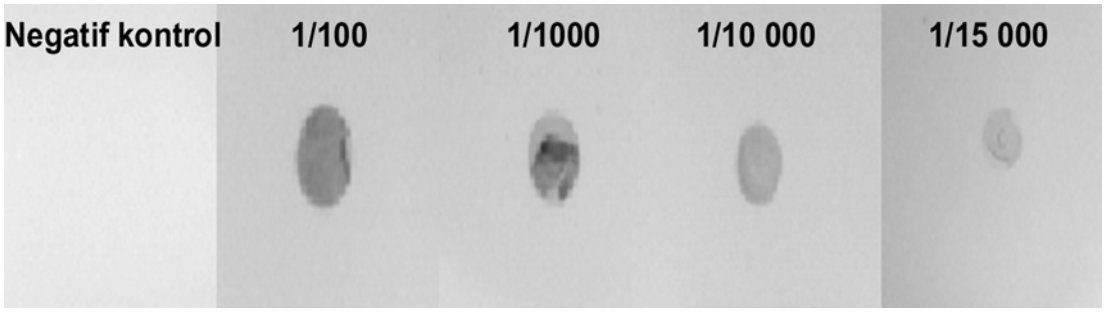
İmmunblot yönteminde kullanılacak serum dilüsyonunu belirlemek amacıyla (Dot-Blot) yapıldı. *E. faecalis* OG1X (pAM944) ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 1/100'den 1/15 000'e kadar primer antikor bağlanması görülmesine rağmen, *E. faecalis* OG1RF'nin primer antikorla olan bağlantısının 1/100'den 1/1 000 'e kadar olduğu ve 1/10 000 'de çok hafif bir bağlanma gösterdiği görüldü (Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5). Dot blot sonucunda; her üç etken için de spesifik bağlanma gösteren 1/1 000 oranındaki serum dilüsyonunun immunblot yönteminde kullanılmasına karar verildi.



Şekil 3.3. *E. faecalis* OG1X (pAM944) ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.



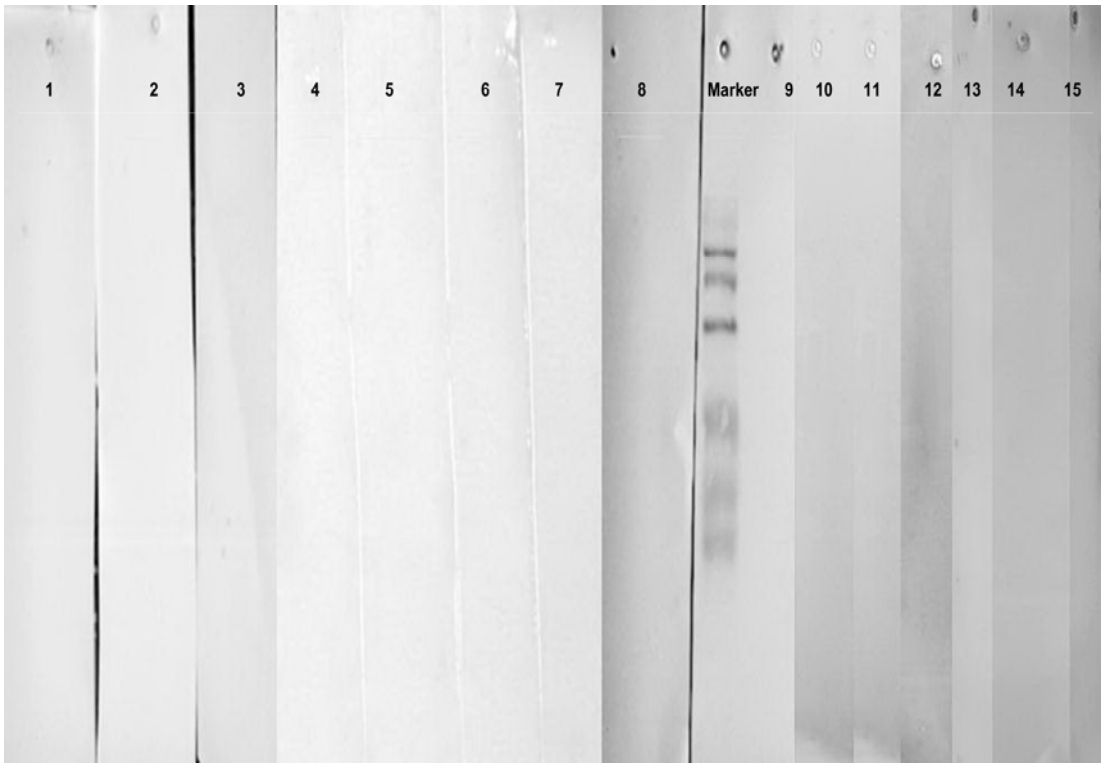
Şekil 3.4. *E. faecalis* OG1RF ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.



Şekil 3.5. *E. faecalis* OG1X (pAM9058) ile yapılan Dot-Blot Analizi sonuçları.

Analiz edilen suşlardaki antijenik yapının belirlenmesi amacıyla yapılan immunblot yönteminde membran marker'ı olarak 31,4-126 kDa arasında bantlar veren önceden proteinleri boyanmış (prestained) SDS-PAGE belirteçi kullanıldı .

Negatif kontrol gurubundaki tavşan serumları kullanılarak yapılan immunblot yönteminde herhangi bir antijenik bağlantı gösteren bant görülmedi (Şekil 3.6).

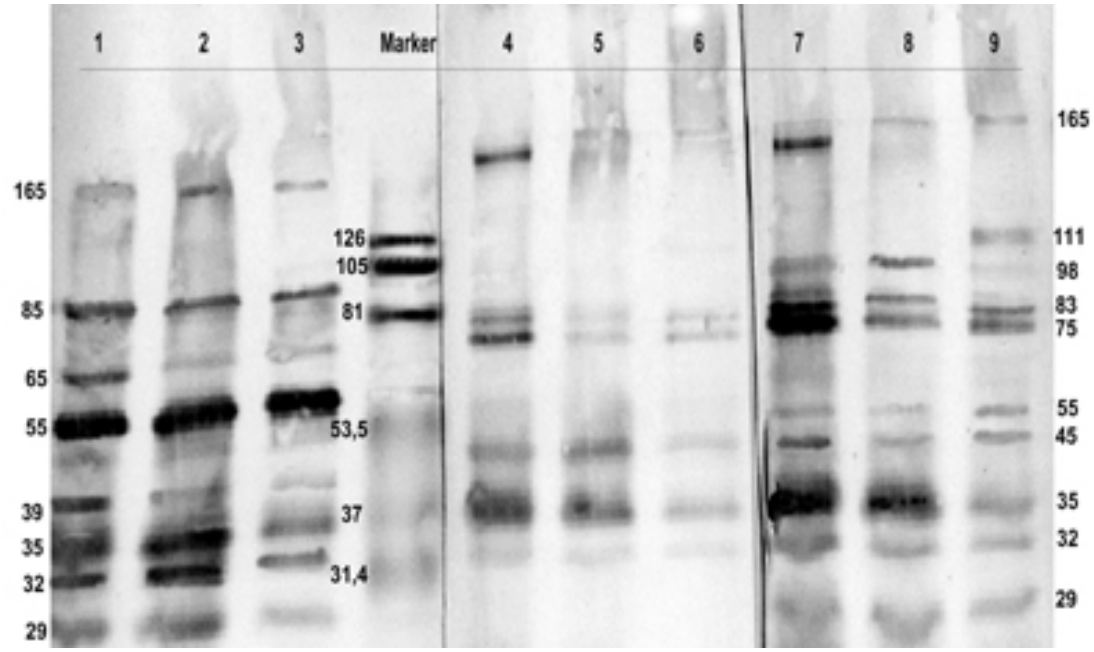


Şekil 3.6. Negatif kontrol grubunda yer alan tavşan serumları kullanılarak yapılan immunblot analiz sonuçları. 1, 2 ve 3 numaralı stripler *E. faecalis* OG1X (pAM944) inokule edilen grupta yer alan 3 tavşanı; 4, 5 ve 6 numaralı stripler *E. faecalis* OG1RF inokule edilen grupta yer alan 3 tavşanı; 7, 8 ve 9 numaralı stripler *E. faecalis* OG1X (pAM9058) inokule edilen 3 tavşanı göstermektedir. Nagatif kontrol grubundan 0. gün alınan serumları 10, 11, 12 numaralı stripler ve 8. hafta sonunda alınan serumları 13, 14 ve 15 numaralı stripler göstermektedir.

Çalışmada her 3 etkenin yan yana bulunduğu 3 gurup oluşturularak yapılan immunoblot analizinde, birinci guruba *E. faecalis* OG1X (pAM944)'den elde edilen immun serum, ikinci guruba *E. faecalis* OG1RF'den elde edilen immun serum ve üçüncü guruba da *E. faecalis* OG1X (pAM9058)'den elde edilen immun serumun 1/1 000'lik dilusyonu uygulandı. Böylece her üç etkenin, hem kendisine karşı elde edilen spesifik immunserumlar ile hem de diğer suşlara karşı elde edilen spesifik immun serumlar ile antijenik bağlantıları belirlendi.

İmmunblot sonucunda 1. gurupta yer alan etkenlere her üç etken için spesifik immunserumlarla muamale sonucunda oluşan tüm bantların ortak olduğu görüldü. Oluşan bantlar 165, 85, 65, 55, 39, 35, 32 ve 29 kDa olarak hesaplandı. İkinci gurupta yer alan etkenlere her üç etken için spesifik

immunserumlarla muamale sonucunda oluşan tüm bantların ortak olduğu görüldü. Bu bantlar 165, 83, 75, 45, 35 ve 32 kDa olarak hesaplandı. Üçüncü grupta immunblot sonucunda yer alan etkenlere her üç etken için spesifik immunserumlarla muamale sonucunda 165, 98, 83, 75, 55, 45 35, 32 ve 29 kDa'luk bantların ortak olduğu görüldü. *E. faecalis* OG1X (pAM9058) için oluşturulan spesifk immunserum muamelesinde ise diğerlerinden farklı olarak 111 kDa'luk bir bant belirlendi. Her üç gurupta 165, 35 ve 32 kDa'luk ortak bantlar saptandı (Şekil 3.7 ve Çizelge 3.3).



Şekil 3.7. Enterokok suşlarının immunblotting ile antijenik karakterizasyonu. 1, 4 ve 7 numaralı etken *E. faecalis* OG1X (pAM944), 2, 5 ve 8 numaralı etken *E. faecalis* OG1RF, 3, 6 ve 9 numaralı etken *E. faecalis* OG1X (pAM9058)'dir. 1, 2 ve 3 numaralar 1. gurubu, 4, 5 ve 6 numaralar 2. gurubu, 7, 8 ve 9 numaralar 3. gurubu göstermektedir.

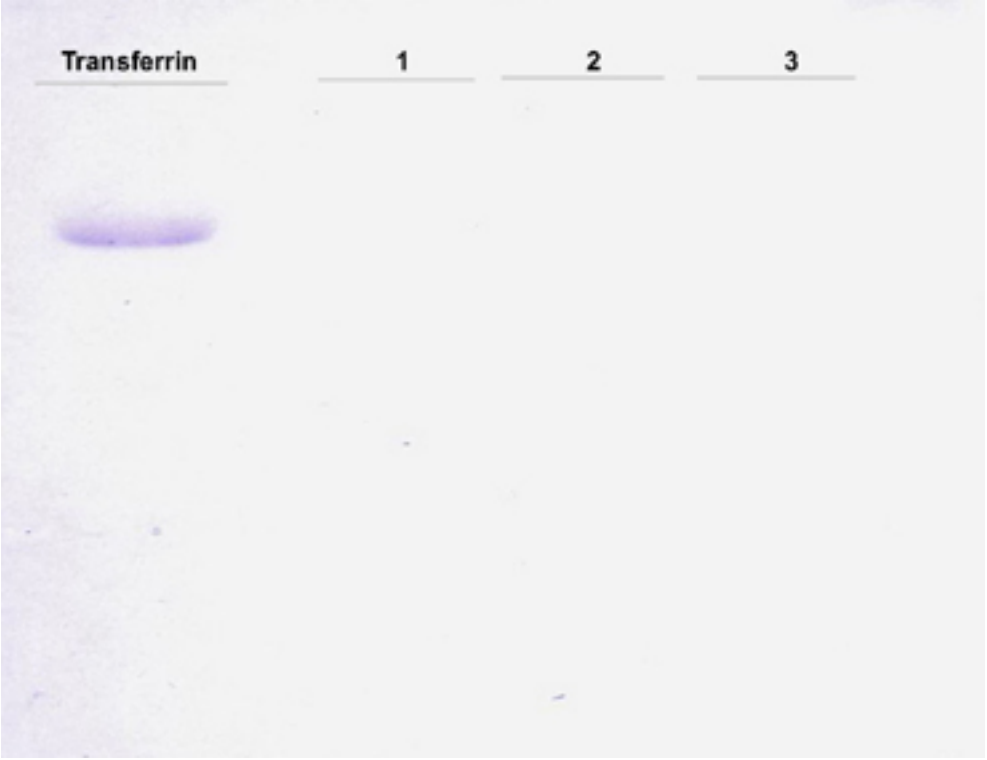
Çizelge 3.3. Enterokok suşlarının immunblotting ile antijenik karakterizasyonunda görülen bant ağırlıkları. 1 numara *E. faecalis* OG1X (pAM944)'e karşı elde edilen immun serumu, 2 numara *E. faecalis* OG1RF'e karşı elde edilen immun serumu ve 3 numara *E. faecalis* OG1X (pAM9058) 'e karşı elde edilen immun serumu göstermektedir.

Etken Adı	***E. faecalis* OG1X (pAM944)**			***E. faecalis* OG1RF**			***E. faecalis* OG1X (pAM9058)**		
İmmunserum	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Bant ağırlığı (kDa)	165	165	165	165	165	165	165	165	165
									111
							98	98	98
	85	85	85						
				83	83	83	83	83	83
				75	75	75	75	75	75
	65	65	65						
	55	55	55				55	55	55
				45	45	45	45	45	45
	39	39	39						
	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	29	29	29				29	29	29

3.6. Glikoprotein Varlığının Analizi

3.6.1. Periodik asit schiff (PAS) boyama

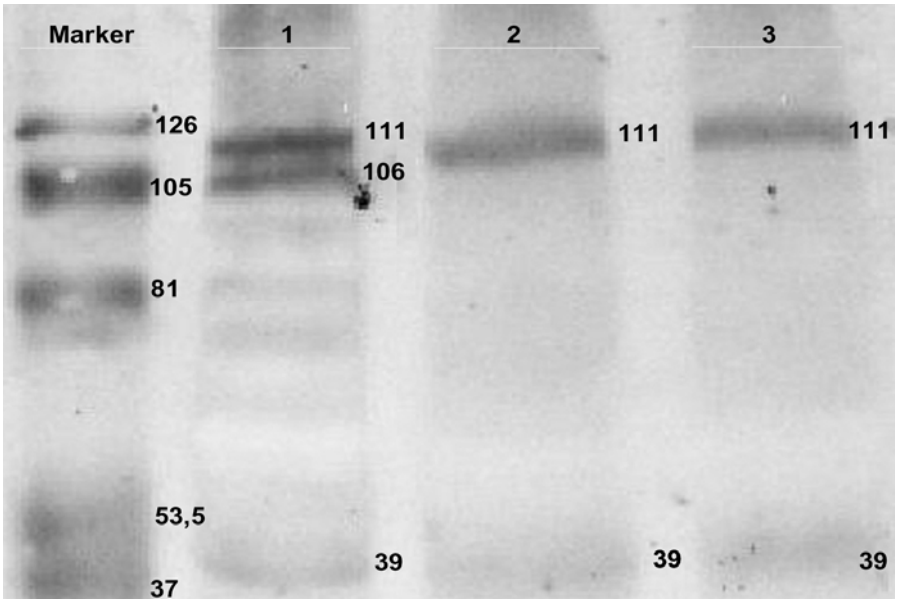
PAS boyama yöntemi ile glikoprotein analizinde SDS-PAGE uygulanan jel, PAS boyası ile boyandı ve 2 saat sonra değerlendirildi. Bu süre sonunda jelde glikoprotein standartı olan transferrin de bant belirlenmesine rağmen çok duyarlı bir yöntem olmadığı için *E. faecalis* suşlarında glikoprotein varlığı belirlenemedi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. PAS boyama yöntemi ile glikoprotein analizi sonuçları. Bir numaralı etken *E. faecalis* OG1X (pAM944), 2 numaralı etken *E. faecalis* OG1RF ve 3 numaralı etken *E. faecalis* OG1X (pAM9058)'dir.

3.6.2. Glikan tayin kiti

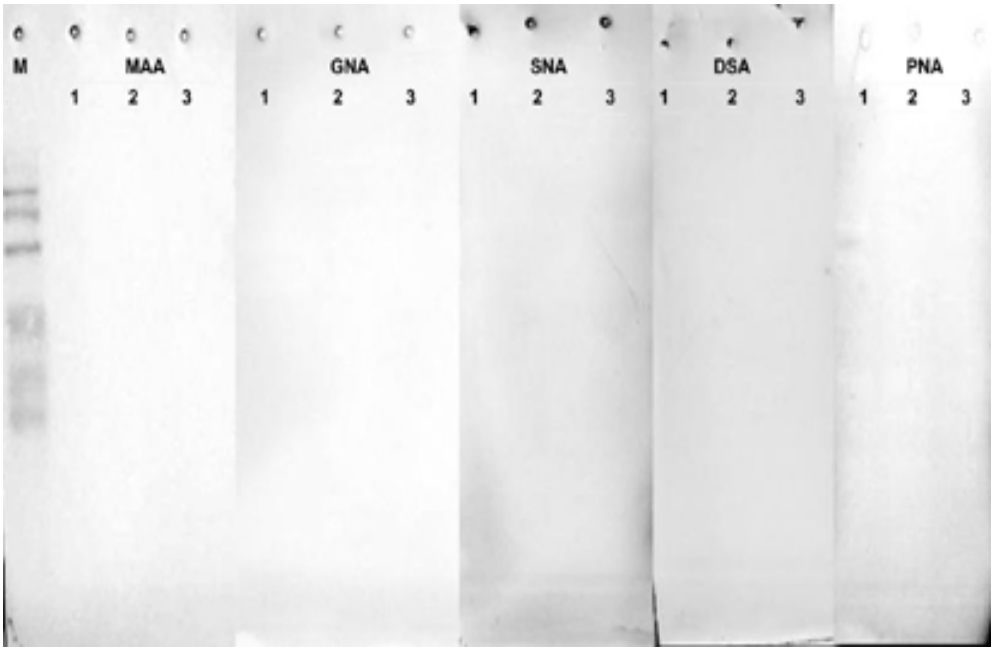
Glikan tayin kiti kullanılarak ve üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilen bu yöntem sonucunda, *E. faecalis* OG1X (pAM944)'te 111, 106 ve 39 kDa ağırlığındaki bantların, *E. faecalis* OG1RF ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058)'te ise 111 ve 39 kDa ağırlığındaki bantların glikoprotein olduğu görüldü (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Glikan tayin kiti kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları.

3.6.3. Glikoproteinlerde tip tayini

Enterokok suşlarında görülen glikoproteinlerin şeker ve bağlantı tiplerinin belirlenmesi için Glikan ayırtedici kiti (Glikan Diferensiasyon Kiti) kullanılarak yapılan bu yöntemde, üretici firmanın direktifleri uygulandı. Test sonucunda belirlenen glikoproteinlerin, MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) sialik asit alfa (2-3) ile galaktoz arasında, GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) mannoz alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz arasında, SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz arasında, PNA (*Peanut agglutinin*) galaktoz beta (1-3) ile N-acetilgalaktozamin arasında), DSA (*Datura stramonıum agglutinin*) (galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin içeren spesifik Lektinler kullanıldı. Çalışmamızda da belirlenen glikoproteinlerin, kullanılan kitin belirleyebildiği bağlantı tiplerini içermediği görüldü.



Şekil 3.10. Glikan ayırtedici kit kullanılarak yapılan glikoprotein analizi sonuçları. MAA (*Maackia amurensis agglutinin*): Sialik asit alfa (2-3), galaktoz; GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*): Mannoz, alfa (1-3), alfa(1-6) yada (1-2) ile mannoz; SNA (*Sambucus nigra agglutinin*): Sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz; PNA (*Peanut agglutinin*):Galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin; DSA (*Datura stramonıum agglutinin*): Galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin.

Çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesi Çizelge 3.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Çalışmada elde edilen sonuçların toplu sunumu.

	***E. faecalis* OG1X (pAM944)**			***E. faecalis* OG1RF**			***E. faecalis* OG1X (pAM9058)**		
Bantlar (kDa)	**SDS-PAGE**	**İmmun-blotting**	**Gliko-protein**	**SDS-PAGE**	**İmmun-blotting**	**Gliko-protein**	**SDS-PAGE**	**İmmun-blotting**	**Gliko-protein**
	165	165		165	165		165	165	
	163			163			163		
	111		111	111		111	111	111	111
	106		106	106			106		
	98			98			98	98	
	96			96			96		
	94			94			94		
	93			93			93		
	91			91			91		
	88			88			88		
	87			87			87		
	85	85		85			85		
	83			83	83		83	83	
	80			80			80		
	75			75	75		75	75	
	65	65		65			65		
	55	55		55			55	55	
	45			45	45		45	45	
	44			44			44		
	43			43			43		
	41			41			41		
	40			40			40		
	39	39	39	39		39	39		39
	35	35		35	35		35	35	
	32	32		32	32		32	32	
	29	29		29			29	29	

4. TARTIŞMA

Geçmişte streptokoklar içerisinde sınıflandırılan ve D-grubu streptokoklar olarak bilinen enterokokların, bakterilerin sınıflandırılmasında DNA baz dizilerinin temel alınması ile streptokoklardan genetik düzeyde farklı olduğu ortaya konmuştur. Bunun sonucunda *Enterococcus* cinsinin oluşumu kabul görmüştür. Enterokokların cins ismi değişmiş ve tür takıları ise aynen korunmuştur. Günümüzde *Enterococcus* cinsi içerisinde 21 tür bulunmaktadır (Çiftci ve Diker, 2006).

İnsan ve hayvanların bağırsak, vagina ve uretrasının normal florasında bulunabilen enterokoklar, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadırlar. İnsanlarda bakteriyemi, endokardit, peritonit vakaları, üriner sistem infeksiyonları ve irinli yumuşak doku lezyonlarından enterokoklar izole edilmiştir. İnsan enterokok infeksiyonlarında hayvanların bulaşma kaynağı olduğunun anlaşılmasından sonra, enterokokların hayvan infeksiyonlarındaki rolü de gündeme gelmiştir. Enterokoklar hayvanlarda, köpeklerin alt solunum yolu infeksiyonlarından, karaciğer apselerinden, sığırlarda subklinik mastitislerden, tatlı su balıklarında septisemi ve tavşanlarda artritis vakalarından, kanatlı hayvanlarda omfalit, yumurta kesesi yangısı, endokardit, meningitis, artritis, tenosinovitis ve amiloid artropati vakalarından izole edilmiştir (Gross ve Domermuth, 1962; Landman ve ark., 1998).

Enterokokal infeksiyonların oluşumu, diğer bakterilerde de olduğu gibi, virulens faktörlerinin varlığına bağlıdır. Enterokok infeksiyonlarının oluşumunda rol oynadığı düşünülen virulens faktörleri olarak agregasyon maddesi (AS), sitolizin, jelatinaz, lipoteikoik asit, hyaluronidaz, lipaz, hemaglutinin, yüzey karbohidratları, ekstraselüler yüzey proteini ve ekstraselüler süperoksit dizmutazlar gösterilmektedir (Jett ve ark., 1994).

Bunlar arasında üzerinde en çok durulan virulens faktörleri AS, sitolizin ve jelatinaz'dır.

Geçmişte protein ya da peptitlere bağlı olarak bulunan ve ribozomal translasyonal mekanizması ile oluşturulan glikokonjugatların prokaryotlarda bulunmadığı ve glikozilasyonun sadece ökaryotlarda gerçekleşen bir fenomen olduğu düşünülmekte iken, ilk olarak Mescher ve ark. (1974) tarafından *Halobacterium salinarium*'da glikoprotein varlığı belirlenmiş ve son yıllarda yaklaşık 70 kadar bakteriyel glikoprotein keşfedilmiştir (Moens ve Vanderleyden, 1997; Schaffer ve ark., 2001; Upreti ve ark., 2003). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *Enterococcus seriolicida* (Alim ve ark., 2001) *Enterococus hirae* ve *Enterococcus faecium* (Kawamura ve Shockman, 1983)'da glikoprotein bulunmasına rağmen; *Enterococcus faecalis'*e ait glikoprotein varlığının araştırıldığı ya da bildirildiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Enterokokal infeksiyonlardan en fazla izole edilen enterokok türü olan *Enterococcus faecalis*'in antijenik karakterizasyonunu ve glikoprotein varlığının araştırılmasını hedef alan bu çalışmada, antijenik karakterizasyonda immunblot analizinde kullanılacak olan primer antikor elde edebilmek için deney hayvanlarının immunizasyonu gerçekleştirildi. Deney hayvan düzeneğinin kurulmasında Eileen ve ark. (1987) tarafından yapılan hayvan deneyi örnek alındı ve çalışmamıza uyacak şekilde modifiye edildi. İmmunizasyon amacıyla deney hayvanlarına *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) (Sitolizin pozitif), *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) (Agregasyon maddesi pozitif) ve *Enterococcus faecalis* OG1RF (Jelatinaz pozitif) inokule edildi. İmmunizasyon amacıyla 1 aylık tavşanlar kullanıldı ve tavşanlar 3'er hayvanlık 4 gruba ayrıldı. Tavşanlara inokule edilecek olan *E. faecalis* suşları BHI buyyonda spektrofotometrik olarak OD_{470}'de 1,0 ($1,7x10^8$ kob/ml) olmak üzere hazırlandı. Bu suşların inaktivasyonunu takiben, inokulumdan deney gruplarına 1'er hafta ara ile 8 hafta süresince 1 ml miktarında derialtı yolla inokule edildi. Hayvanlardan her inokulasyon öncesi

ve sonrası kan alınıp, serumları çıkartıldı ve bu serumlar kullanılıncaya kadar -80^{o}C'de saklandı.

İmmunizasyon ile elde edilen immunserumlarda spesifik antikor oluşumu ELISA ile kontrol edildi ve ELISA sonuçlarına göre immunblot testinde kullanılacak olan antikor titresi bakımından en uygun immunserum seçildi. Deney başlangıcında negatif kontrol ve deney gruplarında yer alan tüm tavşanlarda *Enterococcus faecalis*'e spesifik antikor miktarının sıfır (0) olduğu görüldü. İlk etken inokulasyonundan 1 hafta sonra alınan kanlarda antikor titrelerinin artmaya başladığı ve 8. hafta sonunda antikor titrelerinin en üst seviyede olduğu saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda, immunblot testinde kullanılmak üzere 8. hafta sonunda alınan kanlar seçildi. Çalışmamızda ELISA için antijen hazırlanması ve testin uygulanışı Shorrock ve ark. (1990) tarafından bildirilen yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Çalışmada ELISA antijeni olarak tüm hücre antijeni kullanıldı. Negatif kontrol grubunda bulunan tavşanlarda antikor titre artışının saptanmaması ve deney gruplarında her immunizasyon sonrası belirgin antikor titre artışlarının saptanabilmesi ELISA testinin çalıştığını ve izlenen yolun amaç doğrultusunda olduğunu gösterdi. Böylece, her ne kadar daha spesifik ve özel bir antijen ile hazırlanabilecek antijenin spesifiteyi ve sensitiviteyi arttıracağı bir gerçekse de, modifiye ettiğimiz ve *E. faecalis* tüm hücre antijeninin kullanıldığı ELISA testinin, enterokokal enfeksiyonlarının belirlenmesinde ya da enterokoklar ile immunizasyon takibinde kullanılabileceği görüldü. Bu çalışmanın amaçlarından biri de, daha önce de belirtildiği üzere, belirlenecek *Enterococcus faecalis* glikoproteinin ELISA antijeni olarak kullanılmasına yolunu açmaktır. Dolayısı ile çalışmamızda *Enterococcus faecalis* suşlarında saptanan glikoproteinlerin diğer *Enterococcus faecalis* suşlarında da bulunma durumu araştırılmalı ve bu glikoproteinlerin tüm *Enterococcus faecalis* suşlarında bulunduğu saptanırsa ELISA antijeni olarak kullanılma durumu gündeme getirilmelidir.

ELISA ile antikor düzeyi belirlenen ve immunblot yönteminde kullanılmak üzere seçilen serumun bu testte kullanılacak dilüsyonunu belirlemek amacıyla Dot-Blot yapıldı. *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) ve *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 1/100'den 1/10 000'e kadar primer antikor bağlanması görülmesine rağmen, *Enterococcus faecalis* OG1RF'nin primer antikorla olan bağlantısının 1/100'den 1/1 000'e kadar olduğu ve 1/10 000'de çok hafif bir bağlanma gösterdiği belirlendi. Çalışmamızda yapılan ELISA sonucunda da *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) ve *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşları ile immunizasyon sonucunda oluşan antikor titresinin, *Enterococcus faecalis* OG1RF ile immunizasyona göre daha fazla olduğu saptanmıştı. Böylece, ELISA sonuçlarımız ile Dot-Blot sonuçlarının parallellik gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda da, her üç etken için en yüksek titrede spesifik bağlanma gösteren 1/1 000 oranındaki serum dilüsyonunun immunblot yönteminde kullanılmasına karar verildi.

Çalışmada Enterokok suşlarının protein profilleri belirlendi. Enterokok suşlarının protein profilinin belirlenmesi amacıyla her üç suşa ait proteinler SDS-PAGE ile incelendi. SDS-PAGE sonucunda enterokok suşlarında 29-165 kDa arasında protein bantları saptandı. Jelatinaz pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1RF ve AS pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 44 ve 83 kDa ağırlığındaki protein bantlarının diğer suşlara göre daha belirgin (majör bant) olduğu, sitolizin pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te ise bu iki bantın az belirgin (minör bant) olduğu gözlendi. *Enterococcus faecalis* OG1X(pAM944)'te ise 43kDa ağırlığındaki bantın diğer suşlara göre daha belirgin (major) olduğu ve diğer etkenlerde ise bu bantın az belirgin (minör) bant olduğu belirlendi. Her üç etken için bantlarda major-minör farklılığı görülmesine rağmen, SDS-PAGE ile protein bant profili bakımından farklılık saptanmadı. Pfeffer ve ark. (2006) tarafından enterokokal virülens faktörlerinden birisi olan otolizinin araştırılması için yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE sonucunda 105, 90.2, 88.0, 79.7 ve 66.8 kDa'luk bantların otolizin'e ait bantlar olduğu bildirilmiştir.

Çiftci ve Diker (2006) *Enterococcus faecalis*'in jelatinaz, sitolizin ve AS pozitif virulens faktörlerine ait proteinleri SDS-PAGE ile incelemişler ve bu üç suşa ait protein profilleri arasında bir fark olmadığını rapor etmişlerdir bu sonuç bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir. Georgopapadakou ve Liu (1980) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise *Enterococcus faecalis*'e ait 105 ve 79 kDa'luk bantların beta laktam antibiyotiklere karşı direnci sağlayan penisilin bağlayıcı proteinler olduğu bildirilmiştir.

Analiz edilen enterokok suşlarının antijenik olarak karakterizasyonu amacıyla immunblot tekniği uygulanmış ve bu teknikte kullanılacak immunserum ve bu serumun teknikte kullanılacak olan dilüsyonu daha önce de belirtildiği üzere ELISA ve Dot-Blot ile belirlenmiştir. Bu analizde her üç etkenin, hem kendisine karşı elde edilen spesifik immunserumlar ile hem de diğer suşlara karşı elde edilen spesifik immun serumlar ile antijenik bağlantıları belirlenmiştir. Her üç gurupta 165, 35 ve 32 kDa'luk bantların ortak olduğu saptanmıştır. Sitolizin pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) suşuna karşı her üç etken için oluşturulan immunserumlar uygulandığı zaman, 85, 65, 55, 39 ve 29 kDa'luk bantlar görüldü. Jelatinaz pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1RF suşuna karşı ise 83, 75 ve 45 kDa'luk bantlar belirlendi. AS pozitif olan *Enterococcus E. faecalis* OG1X (pAM9058) için yapılan analizde ise 98, 83, 75, 55, 45 ve 29 kDa'luk bantların ortak olduğu görüldü. *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) için yapılan analizde bulgulardan farklı olarak, kendisi için oluşturulan immunserum ile muamele sonucunda 111 kDa'luk bir bant belirlendi. Bu sonuçlar bize AS pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058)'in çalışmada kullanılan diğer iki suşa oranla daha antijenik olduğunu gösterdi. Georgopapadakou ve Liu (1980) tarafından yapılan çalışmada *Enterococcus faecalis*'e ait 105 kDa ve 79 kDa'luk bantların beta laktam antibiyotiklere karşı direnci sağlayan penisilin bağlayıcı proteinleri olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde Al-obeid ve arkadaşları (1990) tarafından yapılan bir çalışmada da 39 kDa ağırlığındaki proteinin vankomisin ve teikoplanine karşı dirençlilikte rol oynadığı belirlenmiştir. Söz konusu bantlar çalışmamızda SDS-PAGE

üzerinde tespit edilmişken, immunblot'ta sadece sitolizin pozitif olan E. faecalis OG1X (PAM944)'te görülmüştür. Dolayısı ile bu etkenin antijenitisinde rol oynadığı, diğer etkenlerde ise antijenitede rol oynamadığı belirlenmiştir. Aitchison ve ark. (1987) ve Shorrock ve arkadaşlarının (1990), immunblot tekniğini kullanarak endokarditli hastalardan izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarınının antijenik karakterizasyonunu yapmışlar ve 73, 40 ve 37 kDa'luk bantları göstermişlerdir. Çalışmamızda kullanılan suşlar bu bantlardan bir ya da ikisini oluşturmuşken, suşların hiçbirisi 3 bantı birden içermemektedir. Bu sonuç bizde kullanılan suşların endokardit oluşturma özelliğinde olmadığı kanısını uyandırmaktadır.

Bu çalışma ile protein profili belirlenen ve antijenik karakterizasyonu yapılan enterokok suşlarında glikoprotein varlığı araştırıldı. Bu güne kadar 70 kadar bakteriyel glikoprotein varlığı çeşitli araştırmalarda saptanmıştır. Yoshida ve ark. (1985) tarafından *Streptococcus pyogenes*'te glikoprotein varlığı bildirilmiştir. *Streptococcus sanguis* (Morris ve ark., 1987) ve *Streptococcus salivarius* (Haselbeck ve Hösel, 1993) hücre yüzey fibrillerinin de glikoprotein yapıda oldukları belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* hücre duvarı glikoproteini de Zaidi ve ark. (1995) tarafından gösterilmiştir. *Campylobacter coli, C. fetus, C. jejuni*'ye ait flagellinlerin de glikoprotein içerdikleri görülmüştür (Doig ve ark., 1996). *Mycobacterium tuberculosis*'e ait 19, 32, 45, 55 kDa'luk antijenlerin glikoprotein yapıda oldukları Dobos ve ark. (1996) tarafından saptanmıştır. Lindenthal ve Elsinghorst (1999) da *Escherichia coli* dış membranında glikoprotein varlığını bildirmiştir. Literatürde *Enterococcus seriolicida* (Alim ve ark., 2001), *Enterococus hirae* ve *Enterococcus faecium* (Kawamura ve Shockman, 1983) da glikoprotein varlığı bildirilmesine rağmen *Enterococcus faecalis'*de glikoprotein varlığının araştırıldığı veya bildirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Periodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemi çok duyarlı olmadığı için her üç etkende de glikoprotein belirlenememesine karşın, daha duyarlı olan glikan tayin kiti ile *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te 111, 106 ve 39 kDa'luk, *E. faecalis* OG1RF ve *Enterococcus. faecalis* OG1X

(pAM9058)'te ise 111 ve 39 kDa'luk ağırlığında glikoprotein olduğu görüldü. Böylece *Enterococcus faecalis*'te glikoprotein varlığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiş oldu.

Çalışmada elde edilen protein profili, antijenik karakterizasyon ve glikoprotein analizi sonuçları değerlendirildiğinde, *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te 111, 106 ve 39 kDa'luk glikoproteinlerden sadece 39 kDa'luk proteinin antijenik olduğu diğer iki glikoproteinin antijenik olmadığı saptandı. *Enterococcus faecalis* OG1RF'de tespit edilen 111 ve 39 kDa ağırlığındaki glikoproteinlerin de antijenik olmadığı görüldü. Her iki bant da protein profilinde belirlendi. *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058)'te belirlenen 111 ve 39 kDa ağırlığındaki glikoproteinlerden 111 kDa'luk proteinin antijenik olduğu saptandı. Böylece glikoprotein bantlarında ve glikoproteinlerin antijenitelerinde suşlar arasında farklılık olduğu belirlendi.

Genel olarak biyolojik doku, hücre ve vücut sıvılarında glikoprotein varlığının araştırılması için kullanılan bir çok yöntem bulunmaktadır. Çalışmamızda *Enterococcus faecalis*'e ait glikoprotein varlığının araştırılmasında PAS boyama yöntem ve glikan tayin kiti kullanılmıştır. Bu iki yöntem glikoprotein tayinininde sıklıkla kullanılmaktadır. PAS boyama glikoproteinlerin şeker kalıntılarını SDS-PAGE kullanarak yapılan pratik ve ekonomik bir metottur. Bu teknik ile glikoproteinlerdeki doğal karbonhidratlar ve glikozile olan proteinler belirlenebilmektedir. Glikan tayin kiti ise membran üzerindeki glikozile proteinleri göstermek için kullanılmaktadır. Bu yöntemde ; PVDF membran üzerine ilave edilen sodyum metaperiodat, glikoproteinlerin oligosakkarit zincirlerindeki yan hidroksil gruplarını oksitleyerek, aldehid guruplarına dönüştürür ve ilave edilen digoxigenin (DIG) hidroksil grupları ile aldehid guruplarına kovalan olarak bağlanır. Alkalen fosfataz işaretli DIG spesifik antikor, DIG ile bağlanarak glikoproteinleri belirler. Yaptığımız çalışmada; PAS boyama yöntemiyle glikozile proteinler belirlenememesine rağmen, daha hassas olan Glikan Tayin kiti ile 3 farklı glikoprotein belirlenmiştir. Bu sonuç, bakteriyel glikoprotein varlığının araştırılmasında

PAS boyama yöntemine göre maliyeti daha fazla olmasına rağmen glikan tayin kitinin daha hassas ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde, daha önce Çiftci ve Uysal (2004) tarafından glikoprotein tespitinde kullanılan yöntemlerin değerlendirildiği çalışmada da glikan tayin kitinin daha hassas olduğu bildirilmiştir. Lindenthal ve Elsinghorst (2001) *Escherichia coli* TibA glikoproteinini belirlediği ve Schirm ve arkadaşları (2004) da *Listeria monocytogenes* flagellar glikoproteinini belirlediği çalışmalarda glikan tayin kitini kullanılmıştır ve bu kitin hassas ve güvenilir olduğunu bildirilmişlerdir. Bu sonuçlar; bakteriyel glikoprotein varlığının araştırılmasında farklı firmalar tarafından farklı isimler ile piyasada bulunan glikan tayin kitlerinin kullanımın sensitiviteyi ve spesifiteyi arttıracağını göstermektedir.

Enterococcus faecalis suşlarında belirlenen glikoproteinlerin, lektinlerin karbonhidrat zincirlerinine spesifik bağlanmasındaki yapısal karakterizasyonunu yani bağlantı tiplerini belirlemek için de bu çalışmada Glikan Ayırtetme Kiti kullanıldı. Bu kit yardımıyla, MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) sialik asit alfa (2-3) ile galaktoz arasında, GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) mannoz, alfa (1-3), alfa (1-6) yada (1-2) ile mannoz arasında, SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) sialik asit alfa (2-6) ile galaktoz arasında, PNA (*Peanut agglutinin*) galaktoz beta (1-3) ile N-asetilgalaktozamin arasında, DSA (*Datura stramonıum agglutinin*)galaktoz beta (1-4) ile N-asetilgalaktozamin arasında bu bağlanma tiplerini içeren glikoproteinler belirlenebilmektedir. Literatürde bakteriyel glikoproteinlerin olarak bir çok bağlantı tipleri gösterilmektedir. Kumar ve ark. (1998) *Bacillus thuringiensis* subsp. glikoproteinin N- glikan bağlantı tipini içerdiğini bildirmişlerdir. *Borrelia burgdorferi* (Sambri ve ark., 1992) ve *Chlamydia trochamitis* (Swanson ve Kuo, 1991) dış membran proteininin de N-glikan bağlantı tipinde olduğu da araştırıcılar tarafından saptanmıştır. *Enterococcus hirae* ve *Enterococcus faecium* glikoproteinlerinin de O-glikan içerdikleri belirlenmiştir (Kawamura ve Shockman, 1983). Belirlenen glikoprotein bağlantı tiplerinin yanı sıra, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus salivarius*'ta da glikoproteinler bildirilmesine rağmen, bu glikoproteinlerin

içerdiği bağlantı tipleri literatürde açıklığa kavuşmamıştır (Haselbeck ve Hösel, 1993; Zaidi ve ark., 1995; Degnan ve ark, 1998). Çalışmamızda da belirlenen glikoproteinlerin, kullanılan kitin belirleyebildiği bağlantı tiplerini içermediği görüldü.

Bu çalışma ile *Enterococcus faecalis*'te ilk kez glikoproteinlerin varlığı belirlenmiş oldu. Özellikle şimdiye kadar literatürde rastlanmamış olan *E. faecalis*'e ait glikoprotein varlığının belirlenmesi, temel bulgu olma niteliğinin dışında, ileride yapılabilecek aşı geliştirme ve bakterilerde protein karakterizasyonu gibi çalışmalara temel teşkil edeceği kanısındayız.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan *Enterococcus faecalis* suşlarının tüm hücre protein profilinin saptanması, agregasyon maddesi (AS), jelatinaz ve sitolizine özgü protein profilleri içerisinden antijenik karekterdeki proteinlerin belirlenmesi ve bunlar arasından glikoprotein yapıdaki spesifik antijenlerin varlığının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlara varıldı.

Enterococcus faecalis suşlarının protein profilleri belirlendi ve çalışmada kullanılan her üç suşta da 165-29 kDa arasında protein bantları saptandı. Jelatinaz pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1RF ve AS pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 44 ve 83 kDa ağırlığındaki protein bantlarının en belirgin bant olduğu, sitolizin pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te ise bu iki bantın az belirgin karakterde olduğu buna karşın 43 kDa ağırlığındaki bantın diğer etkenlerdekinden daha belirgin olduğu ve diğer etkenlerde ise bu bantın az belirgin band olduğu gözlendi.

Enterokok suşlarının antijenik olarak karakterizasyonu amacıyla suşlara uygulanan immunblot analizi sonucunda her üç suşta da 165, 35 ve 32 kDa'luk bantların ortak olduğu saptandı. Sitolizin pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) suşuna karşı her üç etken için oluşturulan immunserumlar uygulandığında 85, 65, 55, 39 ve 29 kDa'luk bantlar görüldü. Jelatinaz pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1RF suşuna karşı ise 83, 75 ve 45 kDa'luk bantlar belirlendi. AS pozitif olan *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) için yapılan analizde ise 111, 98, 83, 75, 55, 45 ve 29 kDa'luk bantlar görüldü.

Çalışmamızda, glikoprotein varlığının araştırılması amacıyla Glikan Tayin Kiti ve Periodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemleri kullanıldı. PAS

boyama ile her üç etkende de glikoprotein belirlenedi. Glikan tayin kiti ile yapılan analizde *E. faecalis* OG1X (pAM944) için 111, 106 ve 39 kDa'luk glikoprotein bantları belirlendi ve bunlardan 39 kDa'luk bantın antijenik olduğu, diğer glikoprotein bantlarının ise antijenik olmadığı görüldü. *E. faecalis* OG1RF'de 111 ve 39 kDa ağırlığındaki bantların glikoprotein olduğu, bunların antijenik karakterde olmadığı ve *E. faecalis* OG1X (pAM9058)'te ise 111 ve 39 kDa ağırlığındaki bantların glikoprotein olduğu görüldü. Bu bantlardan 111 kDa glikoprotein bantının antijenik olduğu ve 39 kDa glikoprotein bantının ise antijenik olmadığı belirlendi.

Bakteriyel glikoproteinlerin mevcut bilgilerinden faydalanarak veteriner ve tıb alanlarında bakteriyel kökenli hastalıkların moleküler düzeyde anlaşılması bakterilerin yapılarının ve etki şekillerinin aydınlatılması ile ancak mümkün olabilecektir. Gelecekte yapılacak çalışmalar ile bakteriyel glikoproteinlerin yapı, fonksiyon ve biyolojik aktivitelerinin daha iyi anlaşılması günümüzdeki mevcut çalışmaların sayılarının artırılması ile mümkün olabilecektir.

Özellikle şimdiye kadar literatürde rastlanmamış olan *E. faecalis*'e ait glikoprotein varlığının belirlenmesi, temel bulgu olma niteliğinin dışında, ileride yapılabilecek aşı geliştirme ve bakterilerde protein karakterizasyonu gibi çalışmalara temel teşkil edecektir.

ÖZET

Enterococcus faecalis Suşlarında Protein Profilinin Antijenik Glikoproteinler Yönünden Değerlendirilmesi

Bu araştırmada Agregasyon Maddesi (AS), jelatinaz ve sitolizin varlığı yönünden çeşitlilik gösteren *Enterococcus* faecalis suşlarının antijenik yapısının belirlenmesi, karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi ve bu suşlarda glikoprotein varlığının araştırılması amaçlandı.

Enterococcus faecalis suşlarının protein profillerinin belirlenmesi için yapılan Sodyum Dodesil Poliakrilamid Jel Elektroforez'i sonucunda çalışmada kullanılan her üç suşta da 165-29 kDa arasında protein bantları saptandı. *E.faecalis* OG1RF ve *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşlarında 44 ve 83 kDa ağırlığındaki protein bantlarının belirgin bant olduğu, *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te ise 43 kDa ağırlığındaki bantın belirgin bant olduğu gözlendi.

Enterokok suşlarının antijenik olarak karakterizasyonu amacıyla suşlara immunblot analizi uygulandı. Her üç suşta da 165, 35 ve 32 kDa'luk bantların ortak olduğu saptandı. *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944) suşuna karşı 85, 65, 55, 39 ve 29 kDa'luk bantlar, *Enterococcus faecalis* OG1RF suşuna karşı 83, 75 ve 45 kDa'luk bantlar ve *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058) suşuna karşı ise 111, 98, 83, 75, 55, 45 ve 29 kDa'luk bantların antijenik karakterde olduğu görüldü.

Çalışmamızda, glikoprotein varlığının araştırılması amacıyla Glikan Tayin Kiti ve PAS boyama yöntemleri kullanıldı. PAS boyama ile her üç etkende de glikoprotein belirlenemedi. Glikan tayin kiti ile *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM944)'te 111, 106 ve 39 kDa *Enterococcus faecalis* OG1RF ve *Enterococcus faecalis* OG1X (pAM9058)'te ise 111 ve 39 kDa'luk ağırlığındaki bantların glikoprotein olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu çalışma ile sitolizin, AS ve jelatinaz yönünden farklılık gösteren *Enterococcus* faecalis suşlarının tüm hücre protein profilleri arasında farklılık olmadığı, fakat bantların antijenitesinin değişiklik gösterdiği belirlendi. Ayrıca *Enterococcus* faecalis suşlarında glikoprotein varlığı ilk defa bu çalışma ile ortaya kondu.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecalis*, glikoprotein, antijenik karakterizasyon.

SUMMARY

Evaluation of Protein Profiles of Enterococcus faecalis Strains in Relation to Antigenic Glycoproteins

The aim of this research is the determination of the specific antigenic glycoproteins and comperative analysis of antigenic protein profiles of *Enterococcus faecalis* strains distinguished with aggregation substance(AS), gelatinase and cytolysine.

For the determination of the whole cell protein profiles of *Enterococcus faecalis*, the Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Analysis(SDS-PAGE) was made. The protein bands of 44 and 83 kDa were determined as major band in *E.faecalis* OG1RF and *E.faecalis* OG1X(pAM9058). On the other hand; *E.faecalis* OG1X(pAM944) showed a 43 kDa major band.

For the antigenic characterization, the immunblot analysis was performed. All of the three strains of *E.faecalis* showed common antigenic protein bands which were 165, 35 ve 32 kDa. The other antigenic protein bands of *E.faecalis* OG1X(pAM944), *E.faecalis* OG1RF and *E.faecalis* OG1X(pAM9058) were determined as 85, 65, 55, 39, 29 kDa; 83, 75, 45 kDa; 111, 98, 83, 75, 55, 45, 29 kDa; respectively.

In this research, the Glycan Detection Kit and PAS staining were used for investigation of glycoproteins. In PAS staining, no glycoprotein band was shown. In the Glycan Detection Kit, *E.faecalis* OG1RF and *E.faecalis* OG1X (pAM9058) showed a glycoproteins which were 111 and 39 kDa. *E.faecalis* OG1X(pAM944) showed glycoproteins which were 111, 106 and 39 kDa.

In conclusion; no difference was determined for the protein profiles among the tested strains of *Enterococcus faecalis*. The antigenic profiles of the glycoproteins and the other proteins of *E.faecalis* was found as varied among these strains. It was the first study that suggested *E.faecalis* strains include the glycoproteins.

Key Words: *Enterococcus faecalis*, glycoprotein, antigenic characterization.

KAYNAKLAR

ADAMO, P.F, CHERUBINI, G.B. (2001). Discospondylitis associated with three unreported bacteria in the dog. *J. Small Anim. Pract*., **42**: 352-355.

AITCHISON, E.J., LAMBERT, P.A., SMITH, E.G., FARRELL, I.D. (1987). Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunblotting of surface protein antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 211-215.

AKMAN, Ş. (2002). Prion Hastalıklarının Patogenezine Biyokimyasal Yaklaşım., *Gülhane Tıp Dergisi*, **44**(2): 230-239.

ALIM, S.R., ANWAR, M., HOSSAIN, E.K., KUSUDA, R. (2001). G1 antigen: a cell-surface immunoprotective 96 kDa glycoprotein from the virulent *Enterococcus seriolicida*, pathogen its purification and characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**: 357-361.

ALLEN, H.J., KISAILUS, E.C. (1992). Glycoconjugates: Composition, Structure and Function. New York: Marcell Dekker Inc.

AL-OBEID, S., COLLATZ, E., GUTMANN, L. (1990). Mechanisms of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **34**: 252-256.

ALTMAN, E., BRISSON, J.R., MESSNER, P., SLEYTR, U.B. (1991). Structure of the glycan chain from the surface layer glycoprotein of *Bacillus alvei* CCM 2051. *Biochem. Cell Bio.,* **69**:72-78.

ALTMAN, E., BRISSON, J.R., GAGNE, S.M., KOLBE, J., MESSNER, P., SLEYTR, U.B. (1992). Structure of the glycan chain from the surface layer glycoprotein of Clostridium thermohydrosulfuricum L77-66. *Biochim. Biophys. Acta,* **1117**:71-77.

ANUMULA, K.R. (2000). High-Sensitivity and High-Resolution Methods for Glycoprotein Analysis. *Anal. Biochem*., **283**:17-26.

ARDA, M. (1997). Bazı önemli biyokimyasal testler. *Temel Mikrobiyoloji*, 1.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s.:300-301

BARIE, P. S. (2000). Enterococcus in perspective. *Surg. Infect.*, **1**: 91-93.

BISARIA, V.X., MISHRA, S. (1989). Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Crit. Rev. Biotechnol.,* **9**:61-103.

BROCKL, G., BEHR, M., FABRY, S., HENSEL, R., KAUDEWITZ, H., BIENDL, E., KONIG, H. (1991). Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens Methanothermus fervidus and Methanothermus sociabilis. *Eur. J. Biochem.,* **199**:147-152.

BURNIE, J.P., HOLLAND, M., MATTHEWS, R.C., LEES, W. (1987). Role of immunblotting in the diagnosis of culture negative nd enterococcal endocarditis. *J. Clin. Pathol.*, **40**: 1149-1158.

CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERİ, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L., RIGHETTI, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis ,* **25**: 1327–1333.

CASTRIC, P. (1995). pilO, a gene required for glycosylation of Pseudomonas aeruginosa 1244 pilin. *Microbiol.,* **141**:1247-1254.

CETINKAYA, Y., FALK, P., MAYHALL, C.G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**: 686–707.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. (1994). Lippincott's İllustrated Review's Serisinden Biyokimya. Çeviri Editörü: Tokullugil, A. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

CHOW, J.W., THAL, L.A., PERRI, M.B., VAZQUEZ, J.A., DONABEDIAN, S.M., CLEWELL, D.B., ZERVOS, M.J. (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agent Chemother.*, **37**: 2474–2477.

CLEWELL, D. B. (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, **73**: 9–12.

ÇAĞLAYAN, O., ERSÖZ, B., MENTEŞ, G., OSMANOĞLU, N. (1997). Gastrointestinal malignitelerde fukoz ve fukozidaz. *Genel Tıp Derg.*, **7**(2): 89-93.

ÇİFTCİ, G. ve UYSAL, H. (2004). Denatüre jel elektroforezi ile glikoproteinlerin tayin yöntemleri. II. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi. 9-11 Eylül 2004, Elazığ.

ÇİFTCİ, A. ve DİKER, K.S. (2006). Tavukların deneysel amiloid artropatisinde enterokok virulens faktörlerinin rolü. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı),25-28 Eylül 2006, Antalya.

DEGNAN, B.A., PALMER, J.M., ROBSON, T., JONES, C.E.D., FISCHER, M., GLANVILLE, M., MELLOR, G.D., DIAMOND, A.G., KEHOE, M.A., GOODACRE, J.A. (1998). Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes c*ell extracts is associated with arginine deaminase activity. *Infect. Immun.,* **66**: 3050-3055.

DEVRIESE, L.A., CRUZ-COLQUE, J.I., DE HERDT, P., HAESEBROUCK, F. (1992). Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 421-425.

DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., LAEVENS, H., POT, B., VANDAMME, P., HAESEBROUCK, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.*, **70**: 87-94.

DOBOS, K.M., SWIDEREK, K., KHOO, K.H., BRENNAN, P.J., BELISLE, J.T. (1995). Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.,* **63**:2846-2853.

DOBOS, K.M., KHOO, K.H., SWIDERED, K.M., BRENNAN, P.J., BELISLE, J.T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.,* **178**:2498-2506.

DOIG, P., KINSELLA, N., GUERRY, P., TRUST, T.J. (1996). Characterization of a post-translational modification of Campylobacter flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol. Microbiol.,* **19**:379-387.

DUNNY, G.M., LEONARD, B.A.B., HEDBERG, P.J. (1995). Pheromone-inducible conjugation in Enterococcus faecalis: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol.*, 177: 871–876.

DUPONT, H., MONTRAVERS, P., MOHLER, J., CARBON, C. (1998). Disparate findings on the role of virulence factors of Enterococcus faecalis in mouse and rat models of peritonitis. *Infect. Immun.*, **66**: 2570–2575.

EATON, T.J., GASSON, M.J. (2001). Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1628–1635.

EILEEN, J., PETER, A., LAMBERT, E., GRACE, S., FARRELL, D. (1987). Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* Endocarditis by Immunoblotting of Surface Protein Antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **25:** 211-215

ELBEIN, A. (1999). Complex Carbonhydrates: Glycoproteins. In: Crowe L ed. Medical Biochemistry Bynes. Mosby Publishing. England

ELSNER, H.A., SOOTTKA, I., MACK, D., CLAUSSEN, M., LAUFS, R., WIRTH, R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., **19**: 39–42.

ERICKSON, P.R., HERZBERG, M.C. (1993). Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from Streptococcus sanguis. *J. Biol. Chem.,* **268**:23780-23783.

ESPITIA, C., ESPINOSA, R., SAAVEDRA, R., MANCILLA, R., ROMAIN, F., LAQUEYRERİE, A., MORENO, C. (1995). Antigenic and structural similarities between Mycobacterium tuberculosis 50- to 55-kilodalton and Mycobacterium bovis BCG 45- to 47-kilodalton antigens. *Infect. Immun.,* **63**:580-584.

ESPITIA, C., MANCILLA, R. (1989). Identification, isolation and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol.,* **77**:378-383.

FAGUY, D.M., KOVAL, S.F., JARRELL, K.F. (1994). Physical characterization of the flagella and flagellins from Methanospirillum hungatei. *J. Bacteriol.,* **176**:7491-7498.

FAILLARD, H. (1998). The early history of sialic acids, in proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic acids.(Eds. Schauer R., Tamakawa T.),pp.:6-18.

FAIRBANKS G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H.(1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry,* **10:**2606-2616.

FEİZİ, T. (1991). Cell-cell adhesion and membrane glycosilation. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1**: 766-770

FIFIS, T., COSTOPOULOS, C., RADFORD, A.J., BACIC, A., WOOD, P.R. (1991). Purification and characterization of major antigens from a Mycobacterium bovis culture filtrate. *Infect. Immun.,* **59**:800-807.

GARBE, T., HARRIS, D., VORDERMEIER, M., LATHIGRA, R., IVANYI, J., YOUNG, D. (1993). Expression of the Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton antigen in Mycobacterium smegmatis: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect. Immun.,* **61**:260-267.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. ve LIU, F.Y. (1980). Binding of beta lactam antibiotics to penicillin binding proteins of *S.aureus* and *S. faecalis*: Relation to antibacterial activity. *Antimicrob. Agent. Chemother*., **18**: 834-836.

GERWIG, G.J., DE WAARD, P., KAMERLING, J.P., VLIENGENTHART, J.F.G., MORGENSTERN, E., LAMED, R., BAYER, E.A. (1989). Novel O-linked carbohydrate chains in the cellulase complex (cellulosome) of Clostridium thermocellum. 3-O-Methyl-N-acetylglucosamine as a constituent of a glycoprotein. *J. Biol. Chem.,* **264**:1027-1035.

GERWIG, G.J., KAMERLING, J.P., VLIENGENTHART, J.F.G., MORAG, E., LAMED, R., BAYER, E.A. (1991). Primary structure of O-linked carbohydrate chains in the cellulosome of different Clostridium thermocellum strains. *Eur. J. Biochem.,* **196**:115-122.

GROSS, W. B., DOMERMUTH, C. H. (1962). Bacterial endocarditis of poultry. *Am. J. Vet. Res.,* **23**:320-329

GUERRY, P., DOIG, P., ALM, R.A., BURR, D.H., KINSELLA, N., TRUST, T.J. (1996). Identification and characterization of genes required for post-translational modification of Campylobacter coli VC167 flagellin. *Mol. Microbiol.,* **19**:369-378.

HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P. (1999). Comparison of simple and rapid methods for identifying enterococci intrinsically resistant to vancomycin. *J. Clin. Microbiol*., **37**: 815–817.

HARTMANN, E., MESSNER, P., ALLMAIER, G., KONIG, H. (1993). Proposed pathway for biosynthesis of the S-layer glycoprotein of Bacillus alvei. *J. Bacteriol.,* **175**:4515-4519.

HARWOOD, V.J., BROWNELL, M., PERUSEK, W., WHITLOCK, J.E. (2001). Vancomycin-resistant Enterococcus spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl. Environ. Microbiol*., **67**:4930-4933.

HASELBECK, A. ve HÖSEL, W. (1993). Immunological detection of glycoproteins on blots based on labeling with digoxigenin. In: Hounsell EF (ed) Glycoprotein Analysis in Biomedicine. Humana Press, Totowa, NJ, p 161

HAUSCHILDT, S., HOFFMANN, P., BEUSCHER, H.U., DUFHUES, G. (1990). Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis and Ia expression. *Eur. J. Immunol.,* **20**:63-68.

HERSCOVICS, A., ORLEAN, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**:540-550.

HIRT, H., ERLANDSEN, S.L., DUNNY, G.M. (2000). Heterologous inducible expression of Enterococcus faecalis pCF10 aggregation substance asc10 in Lactococcus lactis and Streptococcus gordonii contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. *J. Bacteriol*., **182**: 2299–2306.

IKE, Y., HASHIMOTO, H., CLEWELL, D. B. (1987). High incidence of hemolysin production by Enterococcus faecalis strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 1524–1528.

IKE, Y., TANIMOTO, K., TOMITA, H., TAKEUCHI, K., FUJIMOTO, S. (1998). Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gmr) (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J. Bacteriol.*, **180**: 4886–4892.

JETT, B., HUYCKE, M., GILMORE, M. **(**1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev*., **7:** 462–478.

KARCHER, U., SCHRODER, H., HASLINGER, E., ALLMAIER, G., SCHREINER, R., WIELAND, F., HASELBECK, A., KONIG, H. (1993). Primary structure of the heterosaccharide of the surface glycoprotein of Methanothermus fervidus. *J. Biol. Chem.,* **268**:26821-26826

KAUFHOLD, A., FERRIERI, P. (1993). The microbiologic aspects, including diagnosis, of beta-hemolytic streptococcal and enterococcal infections. *Infect. Dis. Clin. North Am*., **7**: 235-256.

KAWAMURA, T., SHOCKMAN, G.D. (1983). Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.,* **258**:9514-9521.

KLUEPFEL, D., VATS-MEHTA, S., AUMONT, F., SHARECK, F., MOROSOLI, R. (1990). Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by Streptomyces lividans 66. *Biochem. J.,* **267**:45-50.

KORNFELD, R., KORNFELD, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.,* **54**:631-664.

KUMAR, N.S., REDDY, S.T., VENKATESWERLU, G. (1998). Effect of sodium dodecyl sulfate on concanavalin A-sepharose during affinity chromatography of high-affinity binding toxin protein of *Bacillus thuringensis* subsp. *kurstaki*. *Anal. Lett*., **31**: 1677-1681.

KUMAR, M., MİSHRA, N., UPRETİ, R.K. (2003). A novel membrane glycoprotein of Escherichia coli. *J. Basic Microbiol.,* **43**:28-35.

KUPCU, S., SARA, M., SLEYTR, U.B. (1995). Liposomes coated with crystalline bacterial cells surface protein (S-layer) as immobilization structures for macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta,* **1235**:263-269.

KUPCU, Z., MARZ, L., MESSNER, P., SLEYTR, U.B. (1984). Evidence for the glycoprotein nature of the crystalline cell wall surface layer of Bacillus stearothermophilus strain NRS2004/3a. *FEBS Lett.,* **173**:185-190.

LAEMMLI, K**.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680–685**.**

LANDMAN, W.J.M., GRUYS, E., GIELKENS, A.L.J. (1998). Avian amyloidosis. *Avian Pathol*., **27:** 437-449.

LECHNER, J., WIELAND, F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.,* **58**:173-194.

LECHNER, J., WIELAND, F., SUMPER, M. (1985). Biosynthesis of sulfated saccharides N-glycosidically linked to the protein via glucose. Purification and identification of sulfated dolichyl monophosphoryl tetrasaccharides from halobacteria. *J. Biol. Chem.,* **260**:860-866.

LINDENTHAL, C., ELSINGHORST, E.A. (1999). Identification of a glycoprotein produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.,* **67**: 4084-4090.

LINDENTHAL, C., ELSINGHORST, E.A. (2001). Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect. Immun.,* **69**: 52–57.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., AND RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. **193**:265-275

MAEBA, P.Y. (1986). Isolation of a surface glycoprotein from Myxococcus xanthus. *J. Bacteriol.,* **166**: 644-650.

MESCHER, M.F., STROMINGER, J.L. (1976). Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of Halobacterium salinarium. *J Biol Chem,* **251**: 2005-2014.

MESCHER, M.F., STROMINGER, J.L., WATSON, S.W. (1974). Protein and carbohydrate composition of the cell envelope of Halobacterium salinarium. *J Bacteriol,* **120**: 945-954.

MESSNER, P. (1997). Bacterial glycoproteins. *Glycoconj J,* **14**:3-11

MESSNER, P., ALLMAIER, G., SCHAFFER, C., WUGEDITSCH, T. (1997). Biochemistry of S-layers. *FEMS Microbiol Rev,* **20**:25-46.

MESSNER, P., BOCK, K., CHRISTIAN, R., SCHULZ, G., SLEYTR, U.B. (1990). Characterization of the surface layer glycoprotein of Clostridium symbiosum HB25. *J Bacteriol,* **172**:2576-2583.

MESSNER, P., CHRISTIAN, R., KOLBE, J., SCHULZ, G., SLEYTR, U.B. (1992). Analysis of a novel linkage unit of O-linked carbohydrates from the crystalline surface layer glycoprotein of Clostridium thermohydrosulfuricum S102-70. *J Bacteriol,* **174**:2236-2240.

MESSNER, P., CHRİSTIAN, R., NEUNINGER, C., SCHULZ, G. (1995). Similarity of "core" structures in two different glycans of tyrosine-linked eubacterial S-layer glycoproteins. *J Bacteriol,* **177**:2188-2193.

MESSNER, P., SCHAFFER, C. (2003). Procaryotic glycoproteins.In: Progress in the chemistry of Organic natural products. Vol.: 85, pp.: 51-124, Springer, Verlag, Wien.

MESSNER, P., SLEYTR, U.B. (1988). Asparaginyl-rhamnose: a novel type of protein-carbohydrate linkage in a eubacterial surface-layer glycoprotein. *FEBS Lett,* **228**:317-320.

MESSNER, P., SLEYTR, U.B. (1991). Bacterial surface layer glycoproteins. *Glycobiol,* **1**:545-551.

MOENS, S., VANDERLEYDEN, J. (1997). Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol,* **168**:169-175.

MORRIS, E.J., GANESHKUMAR, N., SONG, M., McBRIDE, B.C. (1987). Identification and preliminary characterization of a *Streptococcus sanguis* fibrillar glycoprotein. *J. Bacteriol.,* **169**:164-169.

MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GİLMORE, M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**: 513–522.

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W., (1996). Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler: DİKMEN, N., ÖZGÜNEN T. Barış Kitabevi, İstanbul

NIGAM, V.N., CANTERO, A. (1973). Polisaccarides in cancer: Glycopro-teins and glycolipids. *Adv. Cancer Res.*, **17**: 1-80.

ONG, E., KILBURN, D.G., MILLER, J.R.C., WARREN, R.A.J. (1994). Streptomyces lividans glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from Cellulomonas fimi. *J Bacteriol,* **176**:999-1008.

PAUL, P., LUTZ, T.M., OSBORN, C., KYOSSEVA, S. (1993). Synthesis and characterization of a new class of inhibitors of membrane-associated UDP-glycosyltransferases. *J Biol Chem,* **268**:12933-12938.

PETERS, J., RUDOLF, S., OSCHKINAT, H., MENGELE, R., SUMPER, M., KELLERMANN, J., LOTTSPEICH, F., BAUMEISTER, W. (1992). Evidence for tyrosine-linked glycosaminoglycan in a bacterial surface protein. *Biol Chem Hoppe Seyler,* **373**:171-176.

PFANNENSTIEL, M.A., MUTHUKUMAR, G., COUCHE, G.A., NICKERSON, K.W. (1987). Amino sugars in the glycoprotein toxin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. *J Bacteriol,* **169**:796-801.

PFEFFER, J. M, STRATING, H., WEADGE, J. T., CLARKE, A. J. (2006). Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.,***188:** 902–908.

PINTO, B. , PIEROTTI, R. , CANALE, G., REALI, D. (1999). Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett. Appl. Microbiol*., **29**: 258–263.

QIN, X., SINGH, K.V., WEINSTOCK, G.M., MURRAY, B.E. (2000). Effects of Enterococcus faecalis fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.*, **68**: 2579–2586.

QUEDNAU, M., AHRNE, S., PETERSSON, A. C., MOLIN, G. (1998). Antibiotic resistant strains of Enterococcus isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 1163-1170.

REINHOLD, B.B., HAUER, C.R., PLUMMER, T.H., REINHOLD, V.N. (1995). Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote Flavobacterium meningosepticum. *J Biol Chem,* **270**:13197-13203.

ROMALDE, J.L.. MAGARINOS, B., NUNEZ, S., BARJA, J.L., TORANZO, A.E. (1996). Host range susceptibility of Enterococcus sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl. Environ. Microbiol*., **62**: 607–611.

SAMBRI, V., STEFANELLI, C., CEVENINI, R. (1992). Detection of glycoproteins in *Borrelia burgdorferi*. *Arch. Microbiol.,* **157**: 205-210.

SANDERCOCK, L.E., MACLEOD, A.M., ONG, E., WARREN, R.A.J. (1994). Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. *FEMS Microbiol Lett,* **118**:1-7.

SANDOE, J.A.T., WITHERDEN, I.R., SETTLE, C. (2001). Vertebral osteomyelitis caused by Enterococcus raffinosus. *J. Clin. Microbiol*., **39**: 1678–1679.

SAVAŞAN, S. (2001) Hayvan kökenli enterokok suşlarının virulens faktörleri, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

SCHAFFER, C., DIETRİCH, K., UNGER, B., SCHEBERL, A. (2000). A novel type of carbohydrate-protein linkage region in the tyrosine-bound S-layer glycan of Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum D120-70. *Eur J Biochem,* **267**:5482-5492.

SCHAFFER, C., GRANINGER, M., MESSNER, P. (2001). Prokaryotic glycosylation. *Proteomics,* **1**:248-261.

SCHIRM, M., KALMOKOFF, M., AUBRY, A., THIBAULT, P., SANDOZ, M., LOGAN, S.M. (2004). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with O-Linked *N*-Acetylglucosamine. *J. Bacteriol.,* **186:** 6721–6727.

SCHULIN, T., THAUVIN-ELIOPOULOS, C., MOELLERING, R.C., ELIOPOULOS, G.M. (1999). Activities of the oxazolidinones linezolid and eperezolid in experimental intraabdominal abscess due to Enterococcus faecalis or vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **43**: 2873–2876.

SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A., HUYCKE, M., LINDAHL, G., GILMORE, M. (1999). Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.,* **67**: 193–200.

SHORROCK, P.J., LAMBERT, P.A., AITCHISON, E.J., SMITH, E.G., FARRELL, I.D., GUTSCHIK, E.G. (1990). Serological response in *Enterococcus faecalis* endocarditis determined by ELISA. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 195-200.

SINGH, K.V., ZSCHECK, K.K., MURRAY, B.E. (2000). Efficacy of telithromycin (HMR 3647) against enterococci in a mouse peritonitis model. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **44**: 3434–3437.

STIMSON, E., VIRJI, M., MAKEPEACE, K., DELL, A., MORRIS, H.R., PAYNE, G., SAUNDERS, J.R., JENNINGS, M.P., BARKER, S., PANICO, M., BLENCH, I., MOXON, E.R. (1995). Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol,* **17**:1201–1214.

SWANSON, A.F., KUO, C.C. (1991). Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. *Infect. Immun*., **59**: 2120-2125.

UPRETI, R.K., KIDWAI, A.M. (1995). A step towards developing the expertise to control hunger and satiety: regulatory role of satiomem--a membrane proteoglycan. *Neurochem Res,* **20**:375-384.

UPRETİ, R.K., KUMAR, M., SHANKAR, V. (2003). Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications. *Proteomics,* **3**:363-379

VAN RIJSSEL, M., GERWIG, G.J., HANSEN, T.A. (1993). Isolation and characterization of an extracellular glycosylated protein complex from Clostridium thermosaccharolyticum with pectin methylesterase and polygalacturonate hydrolase activity. *Appl Environ Microbiol,* **59**:828-836.

WENDT, C., KRAUSE, C., FLOSS, H. (1999). Validity of screening procedures for glycopeptide-resistant enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., **18** : 422–427.57

WIELAND, F., PAUL, G., SUMPER, M. (1985). Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins. *J Biol Chem,* **260**:15180-15185.

YANG, L.L., HAUG, A. (1979). Purification and partial characterization of a procaryotic glycoprotein from the plasma membrane of Thermoplasma acidophilum. *Biochim Biophys Acta,* **556**:265-277.

YOSHIDA, J., YOSHIMURA, M., TAKAMURA, S., KOBAYASHI, S. (1985). Purification and characterization of an antitumor principle from *Streptococcus hemolyticus*, Su strain. *Jpn. J. Cancer Res.,* **76**: 213

ZAIDI, S.I.A., SINGH, K.P., RAISUDDIN, S., JAFRI, A., SAXENA, A.K., CHOUDHARY, S., RAY P.K. (1995). Modulation of primary antibody response by protein A in tumor-bearing mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*., **17**: 759-763.

ZEITLER, R., HOCHMUTH, E., DEUTZMANN, R., SUMPER, M. (1998). Exchange of Ser-4 for Val, Leu or Asn in the sequon Asn-Ala-Ser does not prevent N-glycosylation of the cell surface glycoprotein from Halobacterium halobium. *Glycobiol,* **8**:1157-1164.

ZELLNER, G., STACKEBRANDT, E., MESSNER, P., TINDALL, B.J., CONWAY DE MACARIO, E., KNEIFEL, H., SLEYTR, U.B., WINTER, J. (1989). Methanocorpusculaceae fam. nov., represented by Methanocorpusculum parvum, Methanocorpusculum sinense spec. nov. and Methanocorpusculum bavaricum spec. nov. *Arch Microbiol,* **151**:381-390.

ZHU, B.C.R., DRAKE, R.R., SCHWEINGRUBER, H., LAINE, R.A. (1995). Inhibition of glycosylation by amphomycin and sugar nucleotide analogs PP36 and PP55 indicates that Haloferax volcanii beta-glucosylates both glycoproteins and glycolipids through lipid-linked sugar intermediates: evidence for three novel glycoproteins and a novel sulfated dihexosyl-archaeol glycolipid. *Arch Biochem Biophys,* **319**:355-364.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Gülay ÇİFTCİ
Doğum Tarihi : 25 Mart 1977
Doğum Yeri : Tekirdağ/Merkez
Medeni Hali : Evli
İletişim adresi ve Telefonu: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurupelit/SAMSUN – 0362 312 19 19/2814

II. Eğitim-Öğretim

Üniversite : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,1994-1999
Doktora :Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003-2006
Doktora Tez Konusu : *Enterococcus faecalis* Suşlarında Protein Profilinin Antijenik Glikoproteinler Yönünden Değerlendirilmesi

Doktora Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hamdi UYSAL

III. Akademik Yükselmeler

Araştırma Görevlisi : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ocak- Ağustos 2005
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005-2007
Yabancı Dil : İngilizce
Yabancı Dil Sınavı : ÜDS- 61.5

IV. Yayınlar

Science Citation Index Kapsamındaki Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Nisbet C, Yarım GF, **Çiftçi G,** Arslan HH, Çiftçi A. (2006). The effects of trichophytosis on serum zinc levels in calves. Biological Trace Element Research . (BASKIDA)

2. Çakıroğlu D ., Meral Y., Sancak A. A., **Çiftci G.** Relationship Between Serum Serotonin and Serum Lipid Levels and Aggressivity in horses .*Journal of Veterinery Science*. (BASKIDA)

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Nisbet C, Yarım GF, **Çiftçi G** (2006). Sağlıklı Karayaka ırkı koyunlara ait bazı serum biyokimyasal değerleri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 53 (1), 57-59.

2. Yarım GF, Nisbet C, Öcal N, **Çiftçi G,** Coşkuner A (2006). Şap hastalıklı danalarda plazma monosit kemoatraktan protein-1 ve İnterlökin-1α düzeylerinin ve bu düzeylerle kan lenfosit ve monosit sayıları arasındaki ilişkilerin incelenmesi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 53 (2), 91-95.

Uluslararası Kongrelerdeki Bildirileri:

1. Yarım GF, Nisbet C, Ocal N, **Ciftci G,** Coskuner A. (2006). The investigation of the plasma monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-1α levels and the relationship between these levels and number of blood lymphocytes and monocytes in calves with foot and mouth disease. XIIth Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry. 22-25 May 2006, Istanbul, p. 103.

2. H. Uysal, Nalbantoğlu S., Sel T, **Çiftci G.**, Altınsaat Ç. (2005). Glycosylated Proteins of Erythrocytes and Lymphocytes of Cattlewith Tropical TheileriosisTürk-Alman Tarım ve Tabii Bilim Araştırıcıları Derneği Verband Deutsch-Türkischer Agrar-und Naturwissenschaftler e.V.Association of Agricultural and Natural Science Researchers 8. Symposium 03-09. October 2005. Braunschweig / Deutschland.

Ulusal Kongrelerdeki Bildirileri:

1. **Çiftci G.** , Uysal H. (2004): Denatüre Jel Elektroforezi ile glikoproteinlerin tayin yöntemleri. II. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi. 9-11 Eylül 2004, Elazığ.