T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOMYCES COELİCOLOR A3(2)'DE LON PROTEAZ'IN İKİNCİL METABOLİT ÜRETİMİNE ETKİSİ

ZEYNEP DEMİR ÖKSÜZ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOMYCES COELİCOLOR A3(2)'DE LON PROTEAZ'IN İKİNCİL METABOLİT ÜRETİMİNE ETKİSİ

ZEYNEP DEMİR ÖKSÜZ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE
2019

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

EFFECT OF LON PROTEASE ON SECONDARY METABOLITE PRODUCTION IN STREPTOMYCES COELICOLOR A3(2)

ZEYNEP DEMİR ÖKSÜZ

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE

2019

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/06/2019 tarih ve 2019/27 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/06/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep DEMİR ÖKSÜZ'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI)	: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK
ÜYE	: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ
ÜYE	: Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ
ÜYE	: Prof. Dr. Fatma Neşe KÖK
ÜYE	: Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi ..... Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

ÖZET

Streptomyces'lerde ikincil metabolit üretimi ortamdaki besin kaynakları azalıp stres oluşmaya başladığında tetiklenir. Besin açlığı durumunda bakterilerde protein sentezi dururken protein yıkım işlemleri artar. Bakterilerde protein yıkımında, ATP bağımlı Lon proteazların önemi büyüktür. Lon proteazın ikincil metabolizmaya herhangi bir etkisinin olup olmadığı bilinmediğinden, bu tez çalışması kapsamında, *Streptomyces coelicolor*'da Lon proteazı üretemeyen ve normalden fazla üreten 2 ayrı mutant suş oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *lon* geninin kromozomdan silinmesi için "PCR temelli" bir metod kullanılmış ancak farklı denemelerin hepsinde çok yavaş ve zor büyüyen olası mutant hücreler elde edilmiş ve bu hücreleri alt kültürlemek mümkün olmamıştır. Bunun üzerine *lon* geninin *S. coelicolor*'ın yaşayabilmesi için oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın devamında, *S. coelicolor* genomuna bir ekstra kopya *lon* geni entegre edilerek Lon proteazı normalden fazla üreten Sco-pRAlon rekombinant suşu elde edilmiştir. Rekombinant suşta öncelikle *lon*'un fazla ifade edildiği transkripsiyonel düzeyde gösterilmiş, daha sonra ikincil metabolizma üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Yapılan antibiyotik ölçümleri sonucunda ekstra bir kopya *lon* geninin antibiyotik üretimini dramatik bir biçimde arttırdığı gösterilmiştir. Rekombinant suşta α-amilaz aktivitesi de ölçülmüş, ekstra bir kopya *lon* geninin birincil metabolizmayı çok fazla etkilemediği belirlenmiştir. Farklı *Streptomyces* türlerinde *lon*'un aynı etkiyi gösterip göstermediğini araştırmak için sefamisin C üreticisi *Streptomyces clavuligerus*'a da ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilmiş, ancak antibiyotik üretiminde sadece 1.5 katlık bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, Lon proteazın *Streptomyces* ikincil metabolit üretimine etkisini gösteren ilk çalışma olması bakımından temel bilime katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda, yüksek antibiyotik üreticisi Sco-pRA*lon* suşunun endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek olması bakımından biyoteknolojik açıdan da değerlidir.

Anahtar Kelimeler: Lon proteaz, *Streptomyces*, Antibiyotik Üretimi, İkincil metabolizma.

SUMMARY

The production of secondary metabolites in *Streptomyces*, is triggered when the nutrients in the environment are reduced and stress begins to form. In case of nutrient starvation, protein synthesis in bacteria stops and protein degradation processes increase. ATP dependent Lon proteases're important proteases in protein degradation in bacteria. Since it isn't known whether Lon protease has any effect on secondary metabolism, the aim of this thesis is to produce two different mutant strains that don't produce Lon protease and produce excess than normal in *Streptomyces coelicolor*. For this purpose, a "PCR-based method" was used for deletion of the *lon* gene from the chromosome, however, in different experiments, possible mutant cells were grown slowly and it wasn't possible to subculture these cells. It was concluded that the *lon* gene is important for the survival of *S. coelicolor* A3(2).

One extra copy *lon* gene was integrated into the *S. coelicolor* A3(2) genome to obtain the Sco-pRA*lon* recombinant strain that overexpress *lon* gene. As a result of antibiotic measurements, it was shown that extra one copy of *lon* gene dramatically increased antibiotic production. α-amylase activity was also measured in the recombinant strain and it was determined that an extra copy *lon* gene didn't affect primary metabolism so much. To investigate whether *lon* has the same effect in different *Streptomyces* species, one copy of *lon* gene was also integrated into cefamycin C producer *Streptomyces clavuligerus*, but only 1.5-fold increase in antibiotic production was observed. The results of these studies contribute to the basic science since it's the first study showing the effect of Lon protease on secondary metabolite production in Streptomyces. At the same time the results are also biotechnologically valuable in that the high antibiotic producer Sco-pRA*lon* strain can be used in industrial applications.

Keywords: Lon protease, *Streptomyces*, Antibiotic Production, Secondary Metabolism.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp, sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e,

Çalışmamda bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve beraber omuz omuza çalıştığım Dr. Öğr. Gör. Tuğrul DORUK'a,

Deney yapmayı eğlenceli hale getiren, sağladıkları huzur ortamı sayesinde laboratuvara her gün mutlulukla ve heyecanla gelmeme katkıda bulunan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Arş. Gör. Halil YILMAZ, Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Buse ÇINAR, Nagihan GENEL, Ğarip DEMİR, Mouktar BARKAD'a,

Aynı laboratuvarı paylaştığımız, bizden içtenlik ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili hocam Dr. Öğr. Gör. İnci ÖZDEMİR ve ekibindeki tüm arkadaşlarıma,

Eğitimimin her döneminde maddi manevi beni destekleyen, beni yetiştiren, büyük fedakarlıkla tüm vakitlerini bize ayırıp oğlumu emanet ettiğim annem Sibel DEMİR ve babam Şemsettin DEMİR'e,

Tüm hayatım boyunca manevi destekleriyle yanımda olan kardeşlerim Gamze DEMİR ve Oğuzhan DEMİR'e,

Son olarak bu zor süreçte her türlü nazımı çeken, anlayışı ve sabrıyla yanımda olan ve ne zaman ümitsizliğe düşsem güler yüzü ve bana olan inacıyla beni motive eden hayattaki en iyi arkadaşım sevgili eşim Melik ÖKSÜZ'e ve bir gülüşüyle tüm sıkıntıları unutturan canım oğlum Cihangir ÖKSÜZ'e en içten duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLOLAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Bilime Katkısı ve Literatürdeki Yeri	2
2.ENERJİYE BAĞLI PROTEİN YIKIMI	3
2.1. ATP-bağımlı Proteazlar	3
2.1.1. ATP-bağımlı Lon Proteaz	4
2.1.1.1. Lon Proteazın Substrat Tanıması	7
2.1.1.2. Lon Ekspresyonunun Düzenlenmesi	7
2.1.1.3. *lon* Geninin Transkripsiyonel Seviyede Düzenlenmesi	7
2.1.1.4. Lon Aktivitesinin Düzenlenmesi	8
2.1.1.5. Lon Proteazın Hücresel Süreçlere Katılımı	9
2.1.1.6. Lon Proteazın Hücre Döngüsü ve Farklılaşmadaki Rolü	10
2.1.1.7. Lon Proteazın Patojenite Üzerindeki Rolü	11
2.1.1.8. Lon Proteazın Stres Cevabındaki Rolü	11
3. STREPTOMYCES	13
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
4.1. Gereçler	19
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19

4.1.2. Kullanılan Enzimler 19
4.1.3. Kullanılan Kitler 20
4.1.4. Kullanılan Moleküler Belirteçler 20
4.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları 21
4.1.6. Kullanılan Kozmit/Plazmitler 21
4.1.7. Kullanılan Çözeltiler 25
4.1.8. Kullanılan Besiyerleri 29
4.1.8.1. Luria Bertani Besiyeri (LB) 29
4.1.8.2. 2xYT Broth 29
4.1.8.3. Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME) 29
4.1.8.4. Tripton Soya Besiyeri (TSB) 30
4.1.8.5. Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS) 30
4.1.8.6. SOB Besiyeri 30
4.1.8.7. R2YE Besiyeri 30
4.1.8.8. TBO Besiyeri (pH 6.5) 31
4.1.9. Kullanılan Antibiyotikler 32
4.1.10. Kullanılan Cihazlar 32
4.1.11. Hazırlanan Primer Çiftleri 33
4.2. Yöntemler 35
4.2.1. *S. coelicolor* A3(2)'den Kromozomal DNA İzolasyonu 35
4.2.2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin PCR ile Çoğaltılması 36
4.2.3. *E .coli*'den Plazmit İzolasyonu 37
4.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri 38
4.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi 38
4.2.6. DNA Fragmanlarının Agaroz Jelden Geri Kazanılması 38
4.2.7. Ligasyon 38
4.2.8. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması 39
4.2.9. *E. coli* Elektrokompetan Hücrelerinin Hazırlanması 39
4.2.10. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Kimyasal Yöntemle Transformasyonu 40

4.2.11. *E. coli* Hücrelerinin Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu 40
4.2.12. Hızlı Mini Plazmit İzolasyonu Yöntemi 40
4.2.13. *E. coli* Hücrelerinden Protein İzolasyonu 41
4.2.14. Lon Proteazı Üretemeyen Mutant Suşun Oluşturulması 42
4.2.14.1. λ/Red Rekombinasyon Yöntemiyle Δlon Mutant Suşun Oluşturulması 43
4.2.14.2. Kaset Mutagenez Yöntemiyle Δlon Mutant Suşun Oluşturulması 43
4.2.14.2.1. Apramisin Mutasyon Kasetiyle Δlon Mutant Suşun Oluşturulması 43
4.2.14.2.2. Streptomisin Mutasyon Kasetiyle Δlon Mutant Suşun Oluşturulması 48
4.2.15. *S. coelicolor* A3(2)'ye Konjugasyon ile Plazmit Transferi 49
4.2.16. Mutant Hücrelerin PCR ile Doğrulanması 49
4.2.17. Lon Proteazı Normalden Fazla Üreten Mutant Suşun Oluşturulması 50
4.2.18. Southern Blot 50
4.2.18.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon 50
4.2.18.2. Prop DNA'ların Hazırlanması 51
4.2.19. Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Antibiyotiklerinin Ölçümleri 52
4.2.20. Sefamisin C Antibiyotiğinin Ölçümü 53
4.2.21. α-amilaz Aktivitesinin Ölçümü 53
4.2.22. Konfokal Mikroskop İncelemesi 54
4.2.23. Transkripyonel Analiz 54
5. SONUÇLAR 57
5.1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin *E. coli'de* İfade Edilmesi 57
5.1.1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin *E. coli*'de İfade Edilmesi İçin Yapılan Klonlama Çalışmaları 57
5.1.2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin Farklı *E. coli* Hücrelerinde İfade Edilmesi 59

5.2. Lon Proteazı Üretemeyen Mutant Suşun Oluşturulması 61
5.2.1. *S. coelicolor* A3(2) Genomundan *lon* Geninin λ/Red Rekombinasyon Yöntemiyle Silinmesi 61
5.2.2. *S. coelicolor* A3(2) Genomundan *lon* Geninin Kaset Mutagenez Yöntemiyle Silinmesi 64
5.2.2.1. Apramisin Mutasyon Kaseti 64
5.2.2.2. Streptomisin Mutasyon Kaseti ile Yapılan Çalışmalar 68
5.3. Lon Proteazı Normalden Fazla Üreten Mutant Suşun Oluşturulması 71
5.3.1. *lon* geninin *S. coelicolor* A3(2) Genomuna Entegrasyonunun Southern Hibridizasyon ile İspatlanması 73
5.3.2. Sco-pRAlon Rekombinant Suşunda *lon* Geninin Transkripsiyonel Analizi 74
5.3.3. Sco-pRAlon Rekombinant SuşundaAktinorhodin ve *Undesilprodigiosin* Antibiyotiklerinin Ölçümü 75
5.3.4. Sco-pRAlon Rekombinant Suşunda α-Amilaz Üretimi 78
5.3.5. Sco-pRAlon Rekombinant Suşun Konfokal Mikroskopta Görüntülenmesi 79
5.3.6. lon Geninin Fazla İfadesinin S. clavuligerus'ta Sefamisin C Üretimine Etkisi 81
6. TARTIŞMA 82

KAYNAKLAR 86
ÖZGEÇMİŞ 97
EKLER 98

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
α	:	alfa
Ω	:	Ohm
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µF	:	Mikrofarad
E	:	Molar absorbans katsayısı
rpm	:	Dakikada devir sayısı
nm	:	Nanometre
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
M	:	Molar
G	:	Gram
°C	:	Santigrat
dk	:	Dakika
Amp	:	Ampisilin
Apr	:	Apramisin
*Bam*HI	:	*Bacillus amyloliquefaciens* H endonükleaz
bç	:	Baz çifti
$CaCl_2$	:	Kalsiyum klorür
Chl	:	Kloamfenikol
CTAB	:	Setil trimetil amonyum bromür
dH_2O	:	Deiyonize su
*Eco*RI	:	*Escherichia coli* endonükleaz I
*Eco*RV	:	*Escherichia coli* endonükleaz V
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
$FeCl_3.6H_2O$	:	Demir klorür hekzahidrat
HCl	:	Hidroklorik asit
kb	:	Kilobaz

KCl	:	Potasyum klorür
K_2HPO_4	:	Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	:	Monopotasyum Fosfat
Kn	:	Kanamisin
KOH	:	Potasyum hidroksit
K_2SO_4	:	Potasyum Sülfat
*Kpn*I	:	*Klebsiella pneumoniae* endonükleaz I
LB	:	Luria Bertoni
$MgCl_2.\ 6H_2O$	:	Magnezyum klorür hekzahidrat
$Na_2B_4O_7.10H_2O$	:	Sodyum tetraborat dekahidrat
NaCl	:	Sodyum Klorür
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NA	:	Nalidilik asit
*Not*I	:	*Nocardia otitidis-caviarum* endonükleaz I
pSK	:	pBluescript II SK
*Pst*I	:	*Providencia stuartii* endonükleaz I
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
*Sph*I	:	*Streptomyces phaeochromogenes* endonükleaz I
Str	:	Streptomisin
Tris	:	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
$ZnCl_2$	:	Çinko klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		**Sayfa**
2.1:	ATP-bağımlı proteazlar.	4
2.2:	Lon proteazın halka şeklindeki hekzamer yapısı.	4
2.3:	Lon proteazın her bir alt birimini oluşturan üç alt bölümün şematik görünümü.	5
2.4:	Bir substratın proteaz tarafından tanınma ve degredasyon basamakları.	6
2.5:	Lon proteazın substrat çeşitliliği ve biyolojik fonksiyonları.	9
2.6:	Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında PoliP-Lon kompleksi	12
3.1:	*Streptomyces*'lerin hayat döngüsü.	13
3.2:	*Streptomyces coelicolor* A3(2) tarafından üretilen antibiyotikler	16
3.3:	*S. coelicolor*'ın ürettiği ikincil metabolitlerin tekstil boyası olarak denendiği ürünler.	17
4.1:	DNA ve protein belirteçleri.	20
4.2:	pIJ790, λ RED rekombinasyon plazmitinin haritası.	22
4.3:	pIJ773 plazmitinin haritası.	23
4.4:	pIJ778 plazmitinin haritası.	24
4.5:	pBluescript II-SK (pSK) plazmitinin haritası.	24
4.6:	*E. coli-Streptomyces* mekik vektörü pRA haritası.	25
4.7:	Apramisin mutasyon kasetinin şematik görünümü.	43
4.8:	pSK*lon* plazmitinin haritası.	44
4.9:	pSK*lonKn* plazmitinin haritası.	44
4.10:	Apramisin mutasyon kasetiyle Δlon mutant suşun oluşturulması için hazırlanmış rekombinant plazmit.	46
4.11:	pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin farklı bir şekilde hazırlanması.	47
4.12:	Streptomisin Mutasyon Kasetinin şematik görünümü.	48
4.13:	*lon* probunun kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.	52
5.1:	2424 bç *lon* geninin PCR sonucu.	57

5.2:	pSK vektörünün *Not*I endonükleaz enzimi ile kesimi (A) ve kesimin jelden saflaştırma (B) sonucu.	58
5.3:	pSK*lon* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması.	59
5.4:	LB besiyerinde, farklı konsantrasyonlarda IPTG ile uyarılarak ve uyarılmadan üretilen pSKlon içeren *E. coli* hücrelerinin eşit konsantrasyondaki (60 µg) total protein üretimlerinin karşılaştırılması.	60
5.5:	LB besiyerinde, farklı konsantrasyonlarda IPTG ile uyarılarak ve uyarılmadan üretilen pSK*lon* plazmitini taşıyan *E. coli* BL21 hücrelerinin, eşit konsantrasyondaki (60 µg) total protein üretimlerinin ve eşit miktardaki hücrenin patlatılmasıyla açığa çıkan protein miktarlarının karşılaştırılması.	60
5.6:	StCB12 kozmit izolasyon sonucu.	61
5.7:	Apramisin mutasyon kasetinin hazırlanması.	62
5.8:	Olası StCB12 Δ*lon* mtant kozmitin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması.	63
5.9:	StCB12 kozmitinin *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI-*Pst*I, *Pst*I endonükleazlar ile kesilerek doğrulanması.	63
5.10:	StCB12 kozmitinin Johnes Innes Center tarafından *Bam*HI ve *Pst*I endonükleazlar ile kesilerek doğrulanma çalışması.	64
5.11:	Farklı bağlanma sıcaklıklarında *lon* geninin ön ve arka kısmıyla birlikte çoğaltan (5658 bç) PCR sonucu	65
5.12:	pSK*lon* rekombinant plazmitinin *Apa*I ve *Bam*HI endonükleaz enzimleriyle kesilerek doğrulanması.	66
5.13:	PCR sonucunda elde edilen kanamisin direçlilik geni.	67
5.14:	pSK*lonKn* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması.	68
5.15:	Streptomisin mutasyon kasetinin hazırlanması.	69
5.16:	pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin sırasıyla *Bam*HI, *Eco*RI ve *Not*I endonükleaz enzimleriyle kesilerek doğrulanması.	70
5.17:	Olası pSKΔ*lonKn* plazmitinin Streptomisin primerleriyle çoğaltılarak PCR ile doğrulanması.	70

5.18: Promotor ve terminator bölgeleri içinde olacak şekilde PCR ile çoğaltılan *lon* genine ait 3397 bç bandın jelden saflaştırılması. 71
5.19: pRA*lon* rekombinant plazmitinin *Pst*I endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması. 72
5.20: *S. coelicolor* A3(2)'de ekstra bir kopya *lon* geninin varlığının Southern Blot ile ispatlanması. 73
5.21: 48. saatte *lon* ekspresyon düzeyleri. 74
5.22: Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının kuru ağırlıklarının karşılaştırılması. 75
5.23: Sco-pRA*lon* rekombinant suşu, Sco-pRA kontrol suşu ve yaban suş *S. coelicolor* A3(2)'nin TBO, MS ve TSA besiyerlerindeki üremelerinin karşılaştırılması. 76
5.24: Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının aktinorhodin üretimlerinin karşılaştırılması. 77
5.25: Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının undesilprodigiosin üretimlerinin karşılaştırılması. 77
5.26: Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarındaki amilaz enziminin varlığının nisaştalı besiyerinde gösterilmesi. 78
5.27: Sco-pRA*lon*, Sco-pRA ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarındaki amilaz aktivitelerinin (U/ml) karşılaştırılması. 79
5.28: *S. coelicolor* A3(2) yaban suş (A,B,C,D,E) ve *S. coelicolor*+pRA*lon* rekombinant suşun (F,G,H,I,J) sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki konfokal mikroskop görüntüleri. 82
5.29: Lon proteaz enzimini normalden fazla üreten *S. clavuligerus* rekombinant suşu ve yaban tip suşlarının sefamisin C üretimlerinin karşılaştırılması. 81

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		**Sayfa**
4.1:	Çalışmalarda kullanılan bakteri soyları.	21
4.2:	Bu çalışmada kullanılan kozmit ve plazmitler.	22
4.3:	Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	25
4.4:	Kullanılan antibiyotikler.	32
4.5:	Deneylerde kullanılan tüm primer çiftleri.	33
4.6:	*lon* geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR protokolleri ve programları.	36
4.7:	SDS jeli için gerekli kimyasallar ve oranları.	42
4.8:	Taq DNA polimeraz PCR bileşenleri.	55
4.9:	Taq DNA polimeraz reaksiyon koşulları.	55
5.1:	*E. coli* transformatlarından elde edilen plazmitlerin, restriksiyon endonükleaz kesimleri sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.	58
5.2:	Kozmit ve mutant kozmitin *Bam*HI enzim kesim sonucu beklenen bantlar.	62
5.3:	Rekombinant pSK*lon* plazmitinin, *Bam*HI ve *Apa*I restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimleri sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.	65
5.4:	pSKl*onKn* rekombinant plazmitinin, *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonucunda beklenen DNA fragman büyüklükleri.	68
5.5:	pSKΔ*lonKn* plazmitinin , *Bam*HI, *Eco*RI ve *Not*I restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimleri sonucunda beklenen DNA fragman büyüklükleri.	69
5.6:	pRA*lon* plazmitinin, *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.	72

1. GİRİŞ

Medikal ve biyoteknolojik değeri tartışılamayan antibiyotiklerin %75 gibi büyük oranını üreten *Streptomyces*'ler, bu yeteneklerinden dolayı en dikkat çekici mikroorganizmalardandır. Bu bakterilerde ikincil metabolit üretimi büyümenin durağan evresine denk gelen süreçte kültür ortamındaki besiyerinin azalması, pH'nın değişmesi gibi etkenlerin hücrede stres yaratmasıyla tetiklenmektedir. Kompleks bir yaşam döngüsüne sahip bu canlıların yaşam döngüsünü etkileyen herhangi bir değişikliğin de sekonder metabolit üretimini etkilediği bilinmektedir [1-6].

Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, stres koşullarına adaptasyon gibi en önemli fizyolojik proseslerde görevleri bulunan Lon proteazın, aynı zamanda bakterilerin hücresel faklılaşma süreçlerinde rol alması ve önemli bir stres cevap regülonunun bir parçası olması, ikincil metabolit üretimini de etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bilgimiz dahilinde, *Streptomyces*'lerde Lon proteazın ikincil metabolit üretimini nasıl etkilediğine dair bir çalışma bulunmamamaktadır. Bildiğimiz kadarıyla, Lon proteazı antibiyotik üretimi ile ilişkilendiren tek bir çalışma bulunmaktadır. Whistler'in yaptığı bu çalışmada, Lon proteazın, pyoluteorin biyosentetik gen transkripsiyonu için gerekli olan bir sigma faktörünü veya antibiyotik üretiminin pozitif bir regülatörünü degrede ederek antibiyotik üretimini baskılayabileceği öne sürülmektedir [7].

Bucca ve arkadaşları *Streptomyces lividans* ile yaptıkları çalışmada, hücre içinde yüksek seviyede ifade edildiğinde Lon proteazın toksik etki yaratabileceği çıkarımını yapmışlardır [8]. Sobczyk ve arkadaşları *S. lividans*'ın *lon* genini klonlamış ve içine hygromisin direnç geni yerleştirerek ifadesini bozmuşlar ve Lon mutantının yaban tipten daha yavaş büyüdüğünü ve spor çimlenmesinin etkilendiğini göstermişlerdir [9]. Ayrıca *lon* geninin HspR/HAIR stres cevap regülonunun bir parçası olduğunu da aynı çalışmada göstermişlerdir. Diğer bir ATP-bağımlı proteaz olan Clp ile yapılan çalışmalarda ise *clp*X geninin yüksek ifadesinin *S. coelicolor*'da aktinorhodin üretimini arttırdığı, normalde çok az miktarda antibiyotik üreten *S. lividans*'ta da aktinorhodin üretimini başlattığı gösterilmiştir [10]. Bütün bu çalışmalar incelendiğinde Lon proteazın *Streptomyces*'lerde ikincil metabolizma üzerindeki etkisi merak uyandırmaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Bilime Katkısı ve Literatürdeki Yeri

Bütün canlılarda çok önemli fizyolojik proseslerde görevleri bulunan Lon proteazın, *Streptomyces*'lerde ikincil metabolit üretimini nasıl etkilediği bilinmediğinden, bu tez çalışması kapsamında, Lon'u üretemeyen ve normalden fazla üreten iki ayrı *S. coelicolor* mutant suşu oluşturularak, bu soruya cevap bulunması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonuçları, temel bilimdeki bu konudaki boşluğu dolduracak olması bakımından önem taşımaktadır.

Aktinorhodin'in ve Streptomyces'ler tarafından üretilen diğer renkli metabolitlerin doğaya zarar veren sentetik boyalara alternatif olarak bazı alanlarda denendiği bilinmektedir [11, 12]. Scott Chimileski tarafından "Bacterial Dyes In Fashion" isimli bir yazı "American Society For Microbiology" nin sayfasında 4 Kasım 2017'de yayımlanmıştır. Bu yazıda, tasarımcı Natsai Audrey Chieza'nın "Ginkgo Bioworks" bünyesinde *S. coelicolor*'ın ürettiği ikincil metabolitleri tekstil boyası olarak denediği çalışmalar özetlenmiştir. *S. coelicolor* ile ilgili çalışmalarını Natsai Audrey Chieza yaklaşık 15 dakikalık bir TED Talk konuşmasıyla kendisi de özetlemiştir.

Bu tür endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek yüksek antibiyotik üreticisi suşun bu tez çalışmasıyla elde edilmiş olması da tez çalışmasının biyoteknolojik önemini oluşturmaktadır.

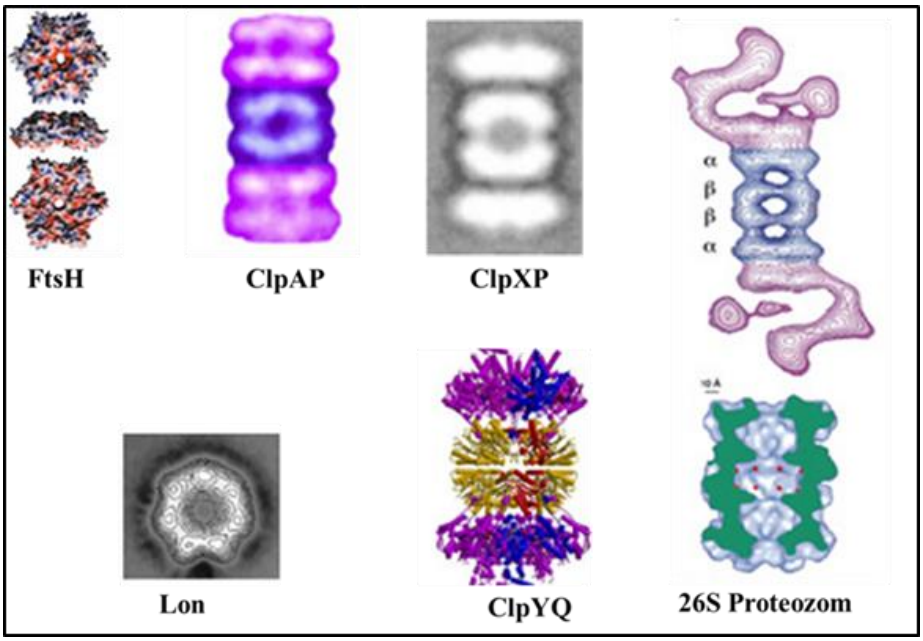
2. ENERJİYE BAĞLI PROTEİN YIKIMI

Enerjiye bağlı protein parçalanmasında yer alan ATP-bağımlı üç sistem tanımlamıştır. İlk olarak, tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan, proteolitik aktivite için ATP'nin bağlanmasını ve hidrolizini gerektiren “proteazlar”; ikincisi, sadece ökaryotik hücrelerde görülen, “ubikuitinasyon” ile yıkılacak proteinlerin işaretlenmesi ve daha sonra ATP-bağımlı en az bir proteaz tarafından yıkılması; üçüncü sistem ise ısı şoku protein ailelerinin üyeleri olan “moleküler şaperonlardır”. Şaperonların da ATP'ye bağlı bir şekilde polipeptitlerin katlanmasını veya açılmasını desteklediği bilinmektedir.

2.1. ATP-bağımlı Proteazlar

ATP-bağımlı proteazlar AAA+ protein ailesi (ATPase Associated with Diverse Cellular Activity) grubuna dahildirler ve bakteriler, arkealar ve ökaryotlar arasında oldukça yaygındır. Katlanmamış, yanlış katlanmış veya doğal olarak stabil olmayan proteinleri yıkarak proteinlerin kalite kontrolünde rol oynamaktadır. Bu enzimler, belirli koşullar altında düzenlenmiş proteoliz ile hücre için büyük bir öneme sahipken, bazı düzenleyici proteinleri veya enzimleri parçalayarak büyüme durumuna yanıt olarak hücresel proteomu da şekillendirmektedir. Bu durum, post translasyonel seviyede hızlı bir adaptasyona izin vermektedir.

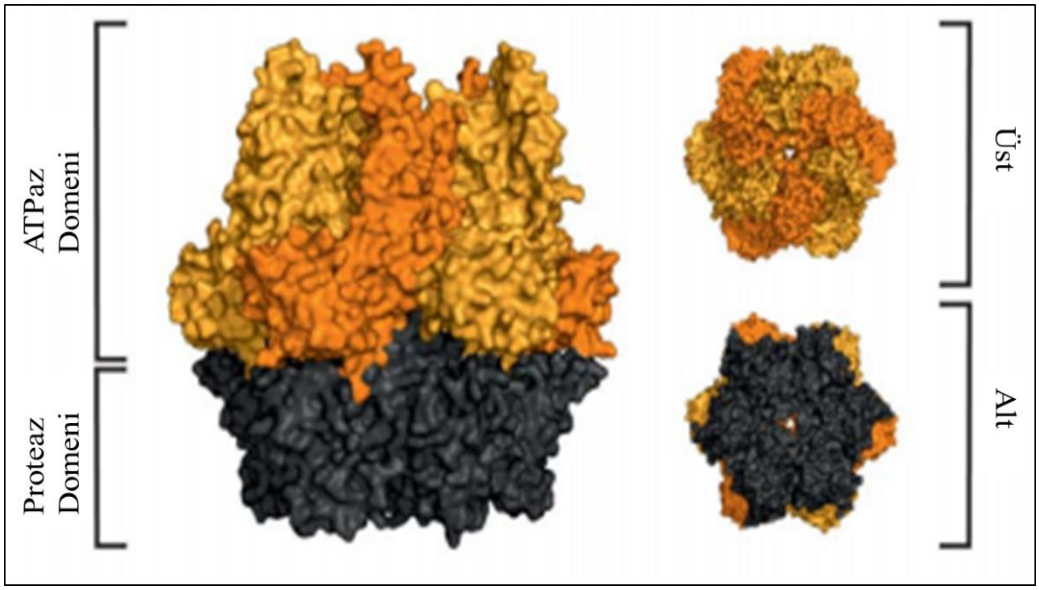
Diğer birçok bakteri gibi *Escherichia coli*’de beş adet ATP-bağımlı proteaz kodlanmaktadır. Bu ATP-bağımlı proteazlar; Lon [13], HsIVU (ClpYQ), FtsH (HfIB) [14], ClpAP ve ClpXP [15] proteazlardır [16, 17] (Şekil 2.1). Ökaryotlarda ise hücre içinde temel protein yıkımından sorumlu olan 26S proteozom dışında [18] (Şekil 2.1), sitoplazma, kloroplast ve mitokondrilerinde prokaryotik ATP-bağımlı proteazların homologları bulunmaktadır [19, 20].



Şekil 2.1: ATP-bağımlı proteazlar.

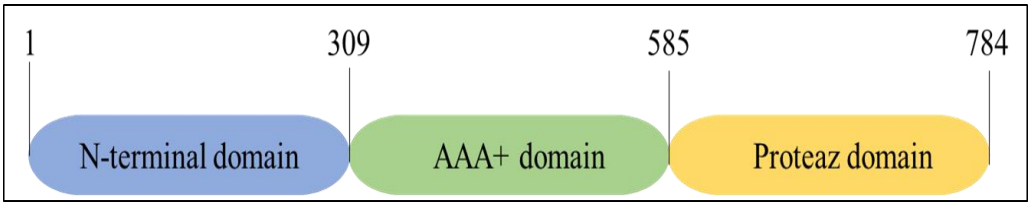
2.1.1. ATP-bağımlı Lon Proteaz

Bakterilerden insana kadar bütün canlılarda bulunan ATP-bağımlı Lon proteaz, ilk kez *E. coli'*de tanımlanmıştır. Bütün proteinin kristal yapısı henüz bilinmemesine rağmen, *E. coli* Lon proteazın karboksi-terminal alanının kristalizasyonu, Lon'un halka şeklinde bir hekzamer oluşturduğunu göstermektedir [21] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Lon proteazın halka şeklindeki hekzamer yapısı.

Her bir alt birim üç alt bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.3). Bu bölgeler; substrat tanıma ve bağlama [22] ile ilişkili amino-terminal bölge, ATP bağlanma (Walker) motifini [23] içeren ve polifosfat ve DNA'ya bağlanmadan sorumlu olan merkezi ATPaz alanı (A alanı) [24] ve bir serin-lizin katalitik dyadının oluşturduğu proteolitik aktif bölgeyi içeren karboksi-terminal bölgesidir (P bölgesi) [25]. A ve P bölgeleri arasında yer alan SSD bölgesi (sensör ve substrat ayırma) ise substrat tanımada rol oynamaktadır [26].

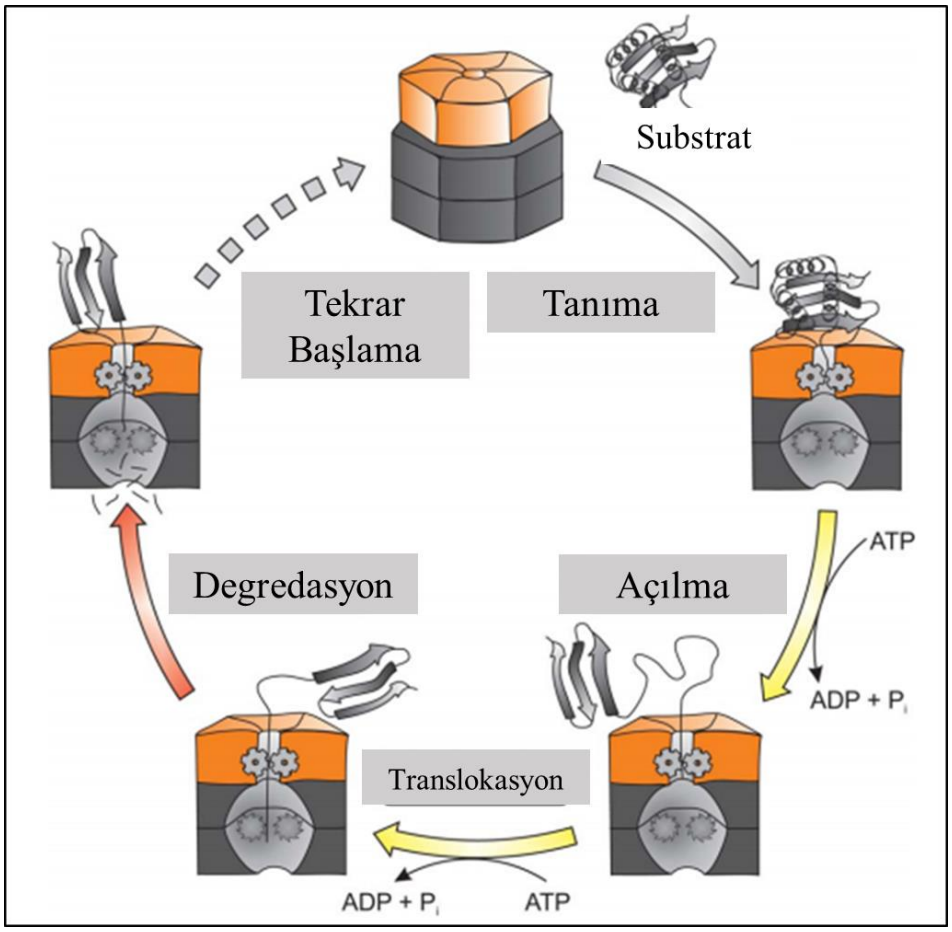


Şekil 2.3: Lon proteazın her bir alt birimini oluşturan üç alt bölümün şematik görünümü.

Lon proteaz, hem ATPaz hem de proteolitik aktif bölgeleri aynı polipeptit zinciri içinde taşımaktadır. Bu organizasyon HflB (FtsH) proteazında da bulunurken, Clp ailesinde her iki fonksiyon, ayrı polipeptit zincirleri tarafından kodlanmaktadır. ClpP alt birimi proteolitik aktif bölgeyi taşır ve ClpA veya ClpX ATPaz alt birimleri ile birlikte bir kompleks oluşturmaktadır. Aynı şekilde, ClpQ (veya HslV) proteolitik alt birimi, ClpYQ (HslUV) aktif proteazı [27] oluşturmak üzere ClpY (veya HslU) ATPaz alt birimi ile birleşmektedir.

Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Streptococcus ve *Lactobacillus* gibi bazı bakterilerin genomlarında *lon* geninin bir ortoloğu bulunmazken, *Bacillus subtilis* ve *Myxococcus xanthus* gibi diğer bakteri türlerinin genomlarında *lon* geninin iki kopyası bulunmaktadır.

ATP-bağımlı Lon proteazlar diğer tüm proteazlar gibi ATP'de depolanan kimyasal enerjiyi, substrat bozulmasının başlatılması için gereken mekanik kuvvete dönüştürmektedir [16, 17]. Bir substratın proteaz tarafından yıkılması, dört ayrı basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4:Bir substratın proteaz tarafından tanınma ve degredasyon basamakları.

Tanıma aşamasında, substrat ve proteaz birbirleriyle etkileşime girmektedir. Bu olay genel olarak ATP'den bağımsızdır ve adaptör proteinlerin aracılık ettiği doğrudan veya dolaylı yoldan olabilir. Tanınmayı kolaylaştırmak için, substrat proteinleri, proteinin çeşitli kısımlarında bulunabilen, degron denilen tanıma motiflerini içermektedirler. Genellikle, degronlar bir proteinin yapılandırılmamış terminal uçlarında bulunmakla beraber, bazı degronlar proteinin iç bölgelerinde bulunabilmektedirler [16, 17, 28].

Tanıma gerçekleştikten sonra, ATPaz alanı açılmaya başlar ve substratı proteaz bölgesinin proteolitik odasına yerleştirir. Bu işlem sırasında, birkaç kez ATP bağlanması ve hidrolizi gerçekleşmektedir. Son olarak, ATP'den bağımsız olarak küçük peptid fragmanlarına parçalanma (~5-25 amino asit kadar), proteolitik odadaki proteaz bölgesi tarafından gerçekleştirilmektedir [28, 29].

2.1.1.1. Lon Proteazın Substrat Tanıması

Lon proteaz, çok çeşitli biyolojik işlemlerde yer alan, doğal olarak kararlı olmayan ve yanlış katlanmış proteinleri parçalayarak, protein kalite kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Lon'un bu iki tip substratı nasıl tanıdığına dair mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Her ne kadar Lon, bazı substratların belirli anahtar amino asitlerini veya anahtar bölgelerini (örneğin, SulA'nın karboksi-terminal histidini, UmuD'nin ilk 24 amino-terminal amino asidi, SoxS [128] ve MarA'nın amino-terminal bölgesi) tanıdığı tespit edilmiş olsa da [30-32], özellikle Lon tarafından tanınan bir motif veya motiflerin kombinasyonu henüz tanımlanmamıştır. Bunun yerine, substrat seçiminin protein yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yanlış katlanmış proteinler ve doğal olarak kararsız olan proteinlerin ortak özelliği, bunların nonglobüler konformasyona sahip olmalarıdır [33, 34]. Bir proteinin tanınması ve ardından Lon tarafından parçalanması, protein yüzeyinde, normalde protein çekirdeğinde gizlenen hidrofobik yamaların veya yapısal motiflerin açığa çıkmasından kaynaklanabilmektedir.

2.1.1.2. Lon Ekspresyonunun Düzenlenmesi

E. coli [13, 35] ve *S. lividans'*ta [9], *lon* geninin aşırı ekspresyonu, hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle, çeşitli hücresel işlemlerin normal ilerlemesini sağlamak için uygun miktarda proteaz hücrede tutulmalıdır. Bu nedenle Lon ekspresyonu ve aktivitesinin düzenlenme mekanizmaları oldukça önemlidir.

2.1.1.3. *lon* Geninin Transkripsiyonel Seviyede Düzenlenmesi

*E. coli, B. subtilis ve S. lividans'*ta *lon* geni, ısı şoku (HS) regulonuna aittir ve ısıyla indüklenmektedirler. Ancak *M. xanthus*'un iki *lon* geninden biri (*lon*V) ve *Bacillus brevis*'in *lon* geni ısı ile indüklenmemektedir [36, 37].

Bakteriyel türlere bağlı olarak, ısı şoku genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesi ya pozitif ya da negatif kontrol altında bulunmaktadır [38]. *E. coli'*de, ısı şoku regulonunun transkripsiyonel aktivasyonuna σ^{32} faktörü aracılık etmektedir. Normal koşullar altında, DnaK moleküler şaperon sistemi ve ATP-bağımlı proteazlar, σ^{32}'yi kararsızlaştırarak düzenlemektedir. Bu olay prokaryotlarda genel

bir özellik değildir. Bakteriyel türlerin çoğunda, ısı şoku genleri normal şartlar altında spesifik baskılayıcılar tarafından negatif olarak düzenlenmektedir. Moleküler şaperonlar ve ATP-bağımlı proteazlar, kendi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle ederek kendi sentezlerini düşürmektedirler.

Sobczyk ve arkadaşları, *S. lividans*'ta *lon* geninin HspR/HAIR ısı şoku cevap regülonunun bir parçası olduğunu göstermişlerdir [9]. HspR regülatör proteininin *lon* geninin promotorunda bulunan HAIR benzeri DNA motifi ile etkileşime girdiği ve normal koşullar altında *lon*'un HspR ve DnaK şaperonu tarafından negatif olarak düzenlendiği gözlenmiştir. Isı şoku durumunda ise DnaK şaperonu katlanmış proteinlere bağlandığı için HspR ile kompleks oluşturamadığından *lon* geninin ekspresyonu uyarılmaktadır. Normal büyüme koşulları altında, *lon ve hsp*R mutantları bir arada elde edilirken, *hsp*R delesyon mutantları tek başına elde edilememektedir. Bu durum, yüksek düzeyde bir Lon seviyesinin *S. lividans* için muhtemelen toksik olduğunu göstermektedir [9].

B. subtilis'te, *lon*A geni (iki *lon* geninden biri), *clp*X ve *hfl*B genleri sınıf VI ısı şoku genlerindendir [39]. Isı şoku genlerine ek olarak, *B. subtilis lon*A'nın ekspresyonu diğer birçok stres (tuz, etanol, H_20_2 ve puromisin) tarafından da indüklenmektedir [40]. Bu gen sınıfının indüksiyonundan sorumlu mekanizmalar hala bilinmemektedir. Bilinen, transkripsiyonel aktivasyonun, normalde beklendiği gibi, global stres yanıt sigma faktörü σ^B tarafından değil vejetatif σ^A faktörü tarafından sağlandığıdır [40].

Isı şoku yanıtına ek olarak, *lon* geninin diğer transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarına dair çok az örnek bulunmaktadır. Bunlardan biri, *Streptomyces* türlerinde görülmektedir. *S. lividans'*ta *lon* geni HspR'ın negatif kontrolü altında olmasının yanı sıra, ClgR'nin pozitif kontrolü altındadır [41].

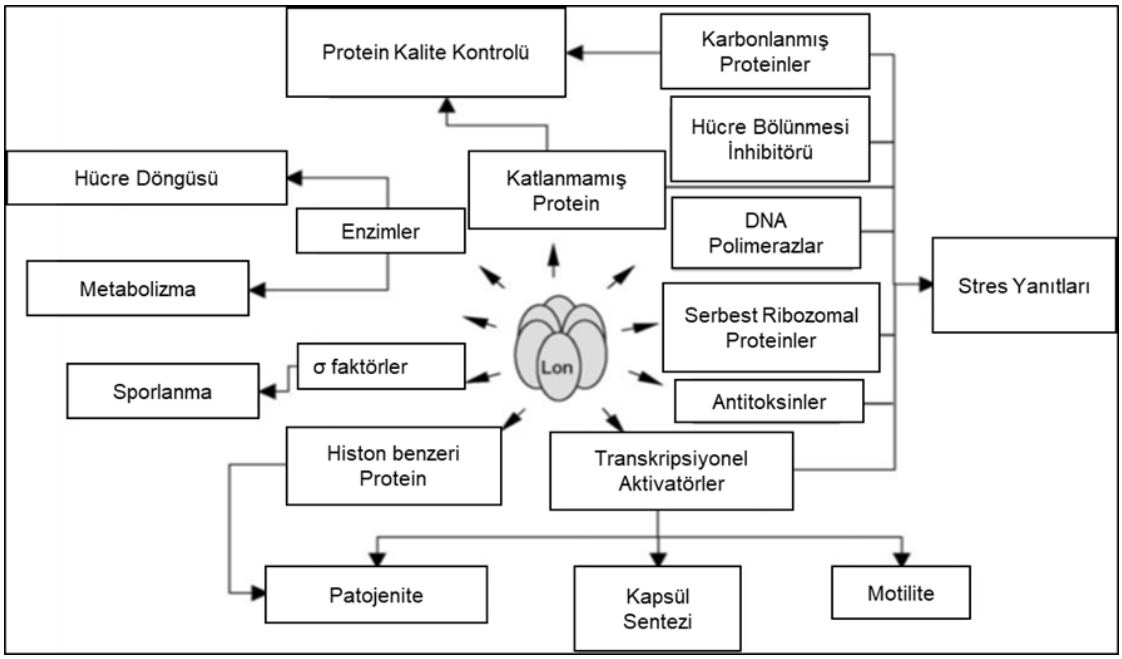
2.1.1.4. Lon Aktivitesinin Düzenlenmesi

lon geninin transkripsiyonel düzenlemesine ek olarak, Lon'un proteolitik aktivitesinin belirli bir inhibitör tarafından modüle edildiği başka bir düzenleme mekanizması da bulunmaktadır. *E. coli*'nin T4 faj enfeksiyonu, buna örnek verilebilmektedir. T4 fajı ile enfeksiyondan sonraki ilk birkaç dakika içinde, Lon aktivitesini, T4 fajı tarafından kodlanan PinA proteini inhibe etmektedir. PinA, Lon ile tersinir şekilde etkileşime girerek, ATP hidrolizine müdahale etmekte ve proteinin

parçalanmasını engellemektedir [42, 43]. Böylelikle, anormal protein bozulması da inhibe olmaktadır [44, 45].

2.1.1.5. Lon Proteazın Hücresel Süreçlere Katılımı

Lon, diğer iki proteaz (ClpAP ve ClpXP) ile birlikte, *E. coli*'deki enerjiye bağımlı protein bozulmasının %70-80'inden sorumludur [41]. Bu enzim, doğal olarak katlanmış regülatör proteinlerini parçalayarak hücre bölünmesi [46], DNA replikasyonu [47], stres koşullarına adaptasyon [48] gibi fizyolojik işlemlerin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Lon proteazın proteolitik aktivitesiyle düzenlediği hücresel süreçler Şekil 2.5'te özetlenmektedir.



Şekil 2.5: Lon proteazın substrat çeşitliliği ve biyolojik fonksiyonları.

Lon normal büyüme koşullarında çoğu bakteri türü için hayati bir enzim değildir, ancak yokluğu hücrelerde bir takım fonksiyon bozuklukları ile sonuçlanmaktadır. *E. coli*'de yapılan çeşitli çalışmalarda *lon* mutantlarında, UV radyasyonuna karşı hassasiyet kazanımı, filament oluşumu, mukozit ve çeşitli anarmol ya da normal yapıdaki proteinlerin yıkımının azalması gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda farklılıklar gözlemlenmiştir [46, 49, 50]. *E. coli*'de Lon ve Clp proteaz mutantlarında besin sınırlamasının ardından normalden uzun süren bir lag

fazı görülürken *lon, clp* ikili mutantında bu durumun daha şiddetli yaşandığı gözlemlenmiştir.

E. coli'nin aksine, *M. xanthus*'taki *lon* genlerinden biri olan *lon*V'nin canlılık için gerekli olduğu gösterilmiştir [37]. Ancak *lon*V'nin aksine, *M. xanthus*'un sahip olduğu diğer *lon* geni olan *lon*D (*bsg*A) geninin delesyonu başarılmış ve sonuçta elde edilen mutantlar yaşayabiliyorken, sporlanamadıkları gösterilmiştir [37, 51].

B. subtilis'te *lon*A ve *lon*B olmak üzere 2 ayrı *lon* geni bulunmaktadır. Bu *lon* genlerinin ikisinin de, canlılık için gerekli olmadığı ve delesyonları durumunda sporlanmada da bir sorun oluşmadığı gösterilmiştir [40, 52, 53]. *B. subtilis* ile yapılan bir başka çalışmada ise SMC (Structural Maintenance of Chromosomes protein) kompleksinin doğru lokalize olmasının ATP-bağımlı Lon proteaz aktivitesine bağlı olduğu ve doğru lokalizasyonun da DNA replikasyonunu etkilediği gösterilmiştir [47].

2.1.1.6. Lon Proteazın Hücre Döngüsü ve Farklılaşmadaki Rolü

Bazı bakteriler, yaşam döngüleri boyunca, belirli düzenleyici faktörlerin de yönlendirmesiyle farklılaşma geçirmektedirler. ATP-bağımlı proteoliz ile, hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmalarıyla, bu düzenleyici faktörlerin miktarı ve kullanılabilirliği düzenlenmektedir.

Lon proteazın bakteriyel farklılaşmada kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, *B. subtilis*'te Lon, sigma faktörünü $\sigma^{H'}$nin [54] konsantrasyonunu düşürerek sporulasyonu etkilemektedir. *M. xanthus*'un *lon* geninin (*lon*D) de [37] gelişim döngüsü için gerekli olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, *Vibrio parahaemolyticus'*taki hücre farklılaşmasının, Lon proteini tarafından düzenlendiği gösterilmiştir [55]. LonB proteazının ekstremofilik arkea *Haloferax volcanii* içindeki karotenogeneziyi düzenlediği gösterilmiştir.

Caulobacter crescentus ile yapılan bir çalışmada elde edilen *lon* mutantlarında, hücre bölünmesindeki kusurlara ek olarak, DNA replikasyonunun başlatılmasında da sorunların meydana geldiği gösterilmiştir [56]. Bu nedenle, Lon'un, hücre döngüsüne bağlı metilasyon düzenlemesi ve dolayısıyla hücre bölünmesinin doğru bir şekilde tamamlanması ve hücre döngüsünün normal ilerlemesi için gerekli olduğu ortaya çıkmaktadır. *E. coli* Lon proteazının, DNA metilasyonunun kontrolünde rol oynadığı,

RepFIC miniplazmidinin replikasyonu ile ilgili yapılmış olan çalışmalarla da gösterilmiştir [57, 58].

2.1.1.7. Lon Proteazın Patojenite Üzerindeki Rolü

Lon proteaz, patojenik Gram negatif bakterilerin çoğunda, virülans proteinleri (efektörleri) konak hücrelere iletmek için kullanılan tip III salgılama sistemlerinin (TTSS) transkipsiyonel düzenlenmesine katılmaktadır.

Lon proteaz, transkripsiyon faktörü HilA'nın bozulmasını düzenleyerek *Brucella abortus* ve *Salmonella enterica*'da virülans genlerinin ekspresyonunu da kontrol etmektedir [59]. *Pseudomonas syringae*'da Lon mutantlarının patojenitesinde ve hareketliliğinde ciddi eksiklikler olduğu gösterilmiştir [60].

Son zamanlarda, Lon proteazın, elmanın enterobakteriyel patojeni olan *Erwinia amylovora*'nın virulans özelliklerini değiştirdiği belirtilmiştir [61]. Bütün bu örneklerin aksine *Yersinia pestis*'te ise Lon proteazın virülansı arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [62].

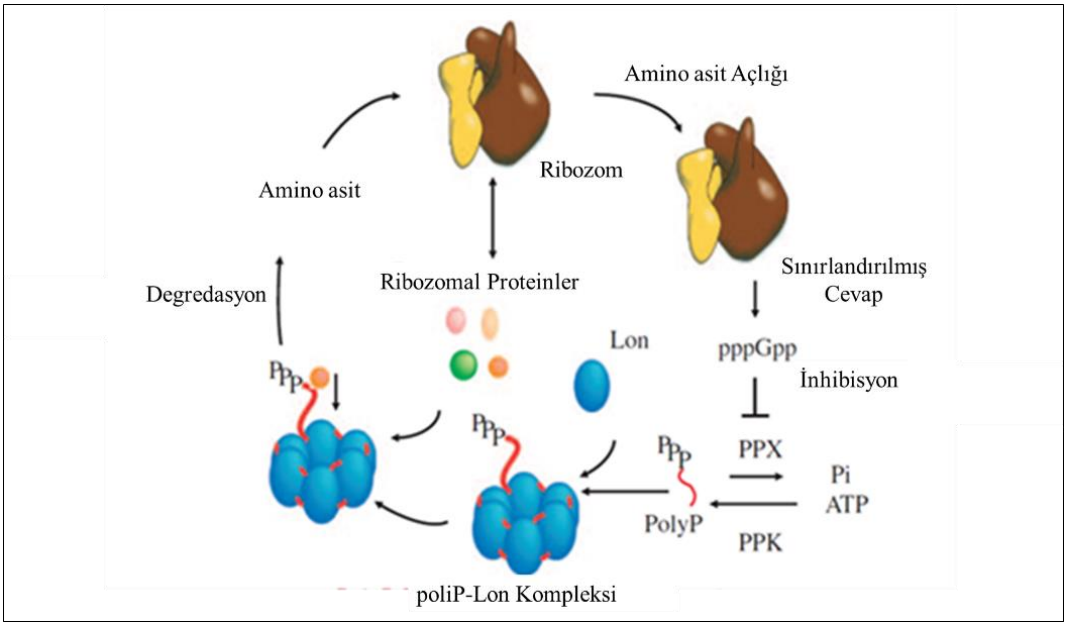
2.1.1.8. Lon Proteazın Stres Cevabındaki Rolü

Besin açlığı durumunda bakterilerin devreye soktuğu en önemli stres cevap mekanizması "Sınırlandırılmış cevaptır". Özellikle amino asit açlığı durumunda sınırlandırılmış cevabın tetikleyicileri olan guanozin tetrafosfat (ppGpp) ve guanozin pentafosfat (pppGpp) hücre içinde hızlı bir şekilde birikirler. Alarmonlar olarak da bilinen ppGpp ve pppGpp'nin sentezinden sorumlu olan proteinlerden en önemlileri "RelA" ve "SpoT" dir [63]. Hücrenin yeni çevresel koşullara uyumunu sağlamak için bu alarmonlar tRNA ve rRNA sentezi ile protein sentezini durdururken protein yıkım işlemlerini arttırmaktadır. Protein yıkımıyla oluşan yeni amino asitler, açlığa uyum sürecinde gerekli olan yeni enzimlerin sentezi için kullanılmaktadır. Açlık kaynaklı proteolisis ise ATP'nin hidrolizini gerektiren enerji bağımlı bir prosestir [27]. Lon proteazlar protein yıkımında görev alan en önemli proteazlardandır.

Sınırlandırılmış cevap aynı zamanda hücre içinde inorganik polifosfatın (poliP) birikmesine de neden olmaktadır. Hücrelerin fiziksel ve kimyasal streslere karşı direnç göstermesinde önemli rol oynayan poliP, "polifosfat kinaz" (PPK) enzimi tarafından ATP'nin terminal fosfatının substrat olarak kullanılmasıyla sentezlenir

[64], endopolifosfataz (PPN) ve eksopolifosfataz (PPX) enzimleriyle de inorganik fosfata parçalanır [65].

Stres durumunda ortamda biriken ppGpp ve pppGpp'ler PPX aktivitesini neredeyse durdurarak poliP birikimine sebep olmaktadır [66]. Daha sonra poliP, Lon proteaza bağlanarak PoliP-Lon kompleksini oluşturmakta ve spesifik bazı proteinleri özellikle serbest ribozomal proteinleri yıkması için Lon'u tetiklemektedir [67]. Bu çalışma ağı Şekil 2.6'da özetlenmiştir. Lon proteaz, özellikle serbest ribozomal proteinleri yıkarak, strese karşı cevapta rol alacak proteinlerin yapımında kullanılmak üzere amino asit havuzunu oluşturmaktadır. Lon'un bu aktivitesi için de poliP'nin önemi büyüktür. PoliP ve Lon arasındaki bu etkileşim bugüne kadar sadece *E. coli*'de gösterilmiş olup, diğer mikroorganizmalarda böyle bir ilişkinin varlığı bilinmemektedir.

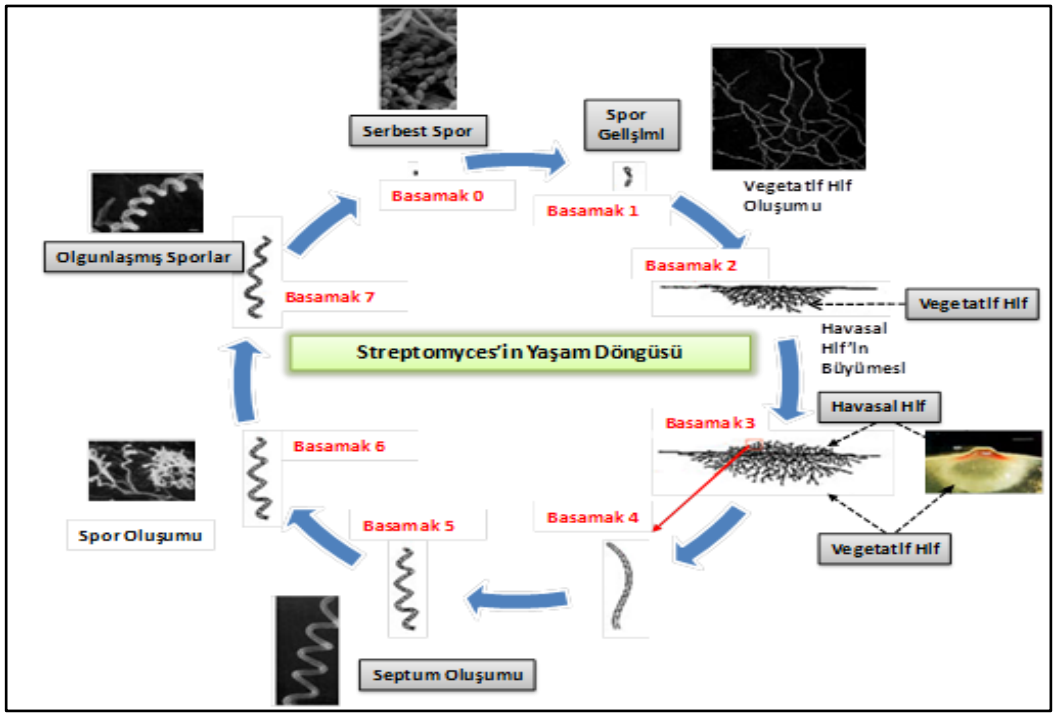


Şekil 2.6: Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında PoliP-Lon kompleksi.

3. STREPTOMYCES

Streptomyces'ler, actinomycetales ordosuna ait, toprakta yaşayan Gram pozitif filamentli bakterilerdir. Morfolojik değişim gösteren kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan bu grup bakteriler G+C oranı yüksek (%70-74) uzun lineer bir kromozoma (~8 Mb) sahiptir [68].

Sıcaklık, pH, CO_2, O_2 ve nem gibi diğer çevresel faktörler topraktaki *Streptomyces*'lerin hayat döngüsünü etkiler [69]. Bu bakterilerin katı besiyerindeki hayat döngüsü Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Katı besiyerinde büyütülen *Streptomyces* hücrelerinin yaşam döngüleri boyunca iki farklı misel yapısı (substrat miselyumu ve havasal miselyum) gözlenmektedir [70]. Sporun çimlenmesinin ardından genç miselyumların (MI) bir bölümü programlı hücre ölümüne uğrar. Bu miselyumun kalan canlı segmentleri çok sayıda nükleoid içeren ikincil miselyumu (MII) meydana getirir [71, 72]. MII, besiyerinin içine doğru büyüyerek substrat miselyumunu oluşturur ve bu yapı da yüzeye ve agarın içine doğru büyümeye devam eder [70, 71, 73].



Şekil 3.1. *Streptomyces*'lerin katı besyerindeki hayat döngüsü.

Makromoleküler sentezin baskılanması aracılığıyla kısa süreli büyüme inhibisyonunun (growth arrest phase) ardından, havaya doğru büyüyen özelleşmiş havasal hif yapılarına farklılaşma gerçekleşir [70, 71]. Havasal hif yapıları da aynı substrat miselyumları gibi çok sayıda nukleoid içermektedir ve bu yapılarda septum oluşumu gözlenmektedir. Sporulasyon öncesi hem substrat miselyumunu hem de havasal miselyumu etkileyen bir programlı hücre ölümü daha meydana gelir [72]. *Streptomyces* hücrelerinin yaşam döngüsünde son olarak hidrofobik spor zincirleri oluşturulur [70].

Programlı hücre ölümünü ve sporulasyonu içeren bu yaşam döngüsü sayesinde *Streptomyces* hücreleri "çok hücreli prokaryotik model" olarak görülmektedir [73]. MI, MII ve programlı hücre ölümü mekanizmasının varlığı *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 ve *S. coelicolor* M145 gibi *Streptomyces* türlerinde rapor edilmiştir [71].

Genel bir büyüme davranışı olarak, sıvı besiyerlerinde *S. coelicolor* ve *Streptomyces griseus* gibi *Streptomyces* türleri pelletler ve kümeler (clump) oluşturmaktadır [70] [72]. İlk etapta, çimlenen spor hücreleri misel yapılarını oluşturur. Genç vejetatif miseller, pellet oluşumunu başlatır. Zamanla hücre yoğunluğu artar ve pellet merkezindeki hücreler ölmeye başlar. Bu aşamada hücre yoğunluğunun azaltılması, daha az sayıda ve daha büyük pelletlerin oluşmasına ve ikincil misel oluşumu ve antibiyotik üretimi gibi süreçlerin gecikmesine yol açmaktadır. İkinci çok nukleuslu misel gelişimi, hücrelerin ikinci bir büyüme fazına geçmesini sağlar ve böylece antibiyotik üretimi başlatılmış olur [70].

Aktinobakterilerde morfolojik ve fizyolojik farklılaşma arasındaki ilişki hücresel davranışı belirlemektedir. Bu durum sekonder metabolit üretimi ve morfolojik farklılaşma arasındaki güçlü bağdan da anlaşılabilir [73]. *Streptomyces venezuelae, S. griseus, Streptomyces albidoflavus* SMF301 ve *Streptomyces antibioticus* gibi türler dışında çoğu *Streptomyces* hücresi sıvı besiyerlerinde sporlanmazken, TBO gibi katı besiyerlerinde sporlanma gözlenmektedir [71, 72].

Misel morfolojisi ile sekonder metabolizma üretimi arasında ilişki olduğunu öne süren çalışmalar olsa da (örneğin, *S. olindesis* hücrelerinde retamisin üretimi), bunun tam tersini gösteren çalışmalar da (örneğin, *S. virginiae* hücrelerinde virjinamisin üretimi) literatürde mevcuttur [74]. Katı ve sıvı besiyerlerinde sekonder metabolit üretimi farklı zamanlara denk gelmektedir. Substrat miselyumları, besin kıtlığıyla beraber, sıvı besiyerinde sekonder metabolit üretimini gerçekleştirmekte ve

bu süreç durağan faza rast gelmektedir. Oysa, katı besiyerinde sekonder metabolit üretimi havasal misel gelişimiyle birlikte başlar [1]. Bu morfolojik ve fizyolojik farklılaşma süreçlerin yönetiminde çeşitli anahtar düzenleyiciler rol oynamaktadır [73].

Streptomyces'ler, sahip oldukları farklı metabolik işlevler sayesinde ölü bitki, hayvan ve mantar atıklarını bileşenlerine ayırarak toprak biyodegragasyonunda önemli rol oynarlar [75, 76].

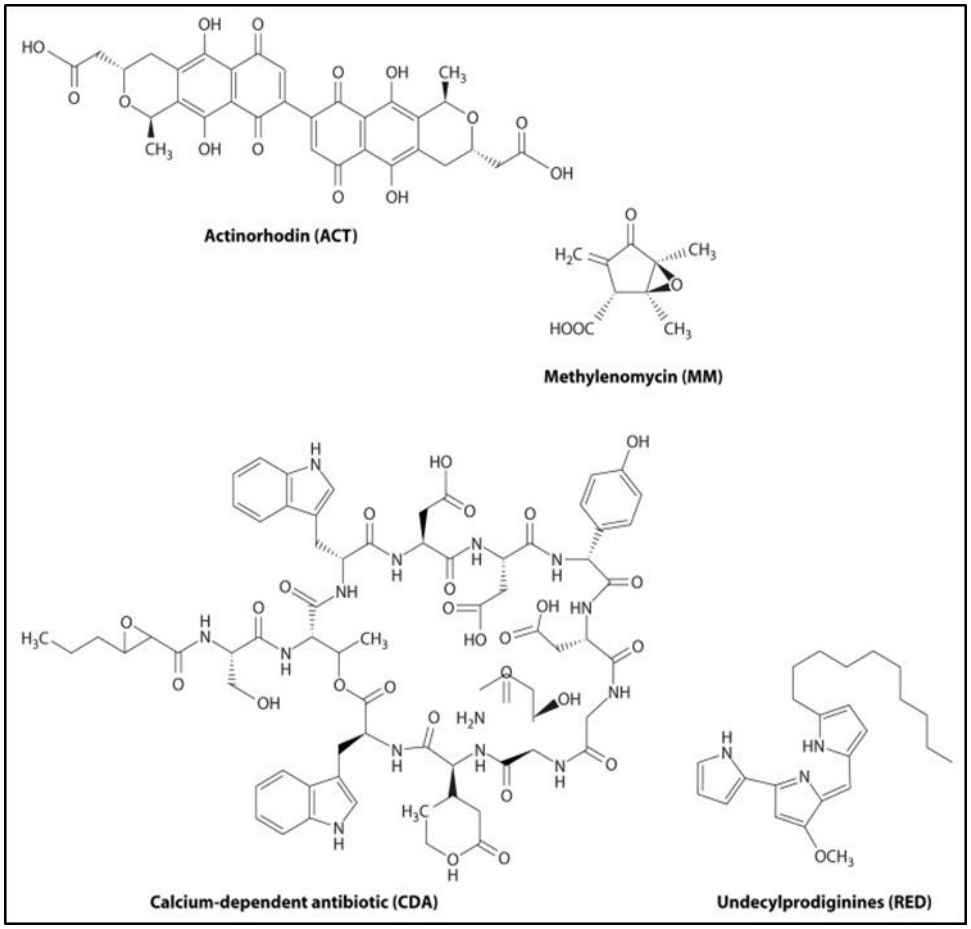
Endüstriyel açıdan oldukça önemli olan *Streptomyces*'ler çok geniş biyoaktivite aralığına sahip çeşitli sekonder metabolitleri yüksek oranda üretmektedirler. Birçok antibiyotik çeşidi, antitümör ilacı olarak kullanılan adriyamisin, African river blindness hastalığının tedavisinde kullanılan ivermectin, immünosupresan siklosporin FK-506 ile rapamisin ve herbisid olarak kullanılan biyolofos, bu sekonder yelpazesinin içinde yer alan ürünlere örnek olarak verilebilir [77].

Streptomycetes'ler, diğer ikincil metabolitlerin yanı sıra ticari antibiyotiklerin %75'ini üretmeleri açısından özellikle önemlidirler [78]. Antibiyotik üretimi, katı ortamda havasal miselyum gelişiminin sonlarında, sıvı ortamda ise durağan faza geçmeden hemen önce görülür [79]. Genellikle kromozom üzerinde toplu halde bulunan antibiyotik biyosentez genlerinin ifadeleri büyüme fazına bağlı olarak koordine edilirler [78].

Streptomyces genetik çalışmaları 1954 yılında David Hopwood tarafından başlatılmıştır. Genetik çalışmalarda, *S. coelicolor* A3(2) bir model organizma olarak günümüze kadar gelmiştir. 1980 yılına kadar yapılan in vivo çalışmalarda antibiyotik biyosentezinde görevli 100'den fazla gen belirlenmiş ve bu cinse ait plazmit ve bakteriyofajların izolasyonları gerçekleştirilmiştir. 1990 yılına kadar olan in vitro çalışmalarda ise ilk gen klonlanması, promotor dizilerinin izolasyonu, antibiyotik sentez yollarının araştırılması ve ilk transpozonun keşfi yapılmıştır. 1990 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalarda ise *S. coelicolor* A3(2) [80] ve *Streptomyces avermitilis*'in [81] genom dizileri belirlenmiştir.

Kromozomunun büyüklüğü 8.667.507 bç olan ve anlamlı ürün verdiği tahmin edilen 7.825 geni bulunan *S. coelicolor*, genetik ve yapısal olarak birbiriyle ilişkili dört adet antibiyotik üretmektedir (Şekil 3.2). Mavi aktinorhodin (Act) biyosentetik yolağı [82], kırmızı undesilprodigiosin (Red) [83, 84] ve kalsiyuma bağlı antibiyotik

(CDA) [85] genleri kromozomda bulunurken, metilenomisin (Mmy) sentezinden sorumlu genler SCP1 plazmidi üzerinde bulunur [86].



Şekil 3.2. *S. coelicolor* A3(2) tarafından üretilen antibiyotikler [78].
A)Aktinorhodin; B) Metilenomisin; C) Undesilprodigiosin; D) CDA.

Aktinorhodin'in biyolojik aktivitesi, Mak and Nodwell [87] tarafından detaylıca çalışılmış ve güçlü, bakteriyostatik, pH duyarlı bir antibiyotik olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca aktinorhodin'in ve *Streptomyces*'ler tarafından üretilen diğer renkli metabolitlerin doğaya zarar veren sentetik boyalara alternatif olarak bazı alanlarda denenmektedir [11, 12]. Scott Chimileski tarafından "American Society For Microbiology" dergisinde "Bacterial Dyes In Fashion" isimliyle 4 Kasım 2017'de yayımlanan yazıda, tasarımcı Natsai Audrey Chieza'nın "Ginkgo Bioworks" bünyesinde *S. coelicolor'*ın ürettiği ikincil metabolitleri tekstil boyası olarak denediği çalışmalar özetlenmiştir. *S. coelicolor* ile ilgili çalışmalarını Natsai Audrey Chieza yaklaşık 15 dakikalık bir TED Talk konuşmasıyla kendisi de özetlemiştir. Bu

denemeler sonucunda elde edilen kumaşlar ve tekstil ürünleri Şekil 3.3'te gösterilmektedir.

Şekil 3.3: *S. coelicolor'*ın ürettiği ikincil metabolitlerin tekstil boyası olarak denendiği ürünler.

Streptomyces'lerde, antibiyotik üretiminin nitrojen, fosfor ve karbon kaynaklarındaki azalmayla tetiklendiği bilinmektedir [88]. Hücredeki enerji eksikliğinin de antibiyotik biyosentezini tetikleyen bir faktör olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir [2, 89].

Antibiyotik biyosentetik genlerinin ekspresyonunun kompleks düzenleyici mekanizmalar ile kontrol edildiği bilinmektedir. Bazı regülatör genleri, genellikle yolak spesifik olup antibiyotik gen kümelerinde biyosentez, sekresyon ve dirençlilik genleriyle birlikte bulunurken diğer regülatör genleri global düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır [90].

Yolak spesifik antibiyotik regülatör genlerinin çoğu, moleküler ağırlığı yaklaşık 25 kDa olan SARP (*Streptomyces* Antibiyotik Regülasyon Proteini) ailesine ait aktivatörleri kodlamaktadır [91]. Örneğin, *S. coelicolor* A3(2)'de, *act* (aktinorhodin) ve *red* (undesilprodigiosin) genlerinin ifadesi SARP grubuna ait olan sırasıyla ActII-ORF4 ve RedD spesifik transkripsiyonel aktivatörlerle düzenlenir [92-94]. Mikroorganizmada, besiyerindeki fosfat, karbon ve nitrojen miktarlarının azalmasına cevap olarak bazı sinyal molekülleri üretilerek SARP kodlayan genlerin ekspresyonu başlatılmaktadır. *Streptomyces*'lerde γ-butirolakton yapılı 15 tane sinyal molekülü bulunmuştur [90].

Streptomyces'lerde ikincil metabolit biyosentezinin kontrolü iki bileşenli sistemler (two-component systems=TCSs) aracılığıyla da gerçekleşmektedir. PhoR-

PhoP iki bileşenli sistemi, *Streptomyces*'lerde en iyi çalışılmış sistemlerden bir tanesidir [90, 95, 96]. *Streptomyces*'lerde antibiyotik biyosentezinin regülasyonu için önemli olan bir diğer iki bileşenli sistem ise AbsA1-AbsA2 sistemidir [90]. Bu iki bileşenli sistemin, S. *coelicolor* A3(2)'nin ürettiği dört antibiyotiğin biyosentezini çok sıkı kontrol ettiği gösterilmiştir [97].

Streptomyces'lerde antibiyotik biyosentezini kontrol eden farklı mekanizmalar tanımlanmış olmasına rağmen, hücredeki bir çok fizyolojik prosesde hayati önemi olan Lon proteazın ikincil metabolizma üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında, Lon proteazın, çok geniş biyoaktivite aralığına sahip çeşitli sekonder metabolitleri yüksek oranda üretebilen *S. coelicolor* A3(2)'de ikincil metabolizma üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gereçler

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında; $CaCl_2$ (Merck), K_2HPO_4 (Merck), K_2SO_4 (Merck), Tris (Merck), Dodesilsülfat (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), L-arabinoz (Merck), EDTA (Merck), Maleik asit (Merck), Pepton (Merck), $MgCl_26H_2O$ (Merck), Agaroz (Sigma Aldrich), L-prolin (Applichem), Agar (Merck), NaOH (Merck), Sükroz (Merck), KOH (Merck), %87 Gliserol (Riedel de Haen), D (+) Glukoz (Merck), KH_2PO_4 (Merck), KCl (Riedel de Haen), PIPES (Fluka), NaCl (Sigma-Aldrich), Magnezyum sülfat heptahidrat (Fluka), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzoamil alkol (Merck), 2-propanol (Merck), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Hidroklorik asit (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), Metanol (Riedel de Haen), CTAB (Merck), TES Buffer (Applichem), Bacto kazamino asit (BD), Mannitol (Merck), Tween 20 (Merck), Sarkozil (Sigma Aldrich), Maya özütü (BactoTM) kimyasalları kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan Enzimler

Bu tez çalışmasında; Q5 High Fidelity DNA Polimeraz (NEB), Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), Taq DNA polimeraz (Fermantas), Pfx® Platinium DNA Polimeraz (Invitrogen), *Eco*RI Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Kpn*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Pst*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Eco*RV Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Sph*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), T4 DNA ligaz (Thermo Scientific), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma), Deoksiribonükleaz I (Thermo Scientific, ABD) enzimleri kullanılmıştır.

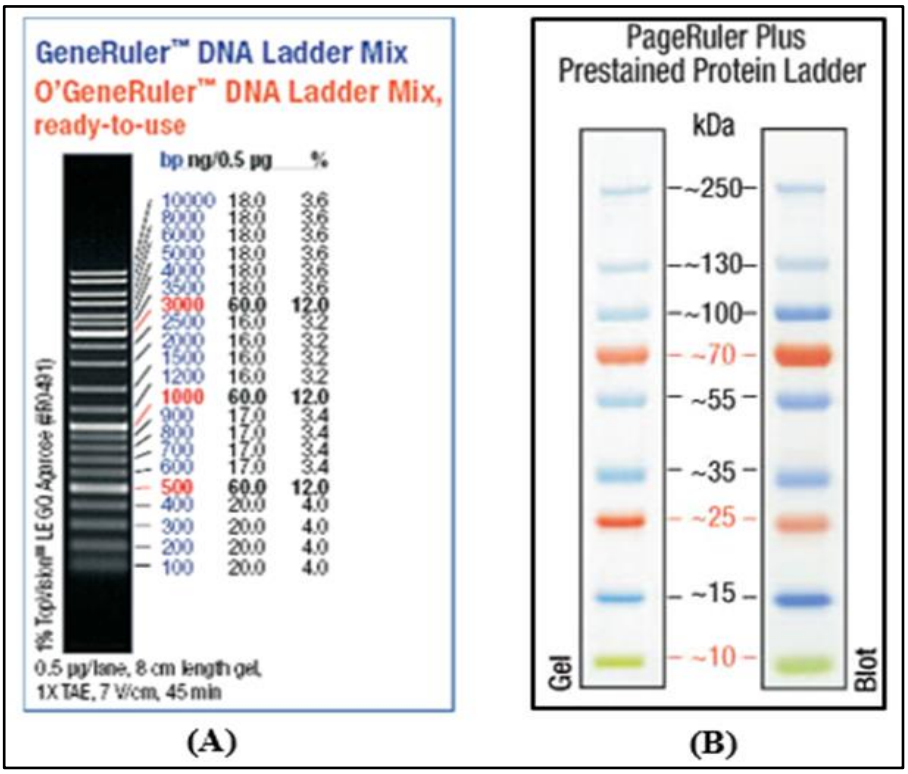
Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarda gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Kullanılan Kitler

Hem kimyasal yöntemle izole edilen plazmitlerin ve PCR ürünlerinin temizlenmesinde hem de DNA'ların jelden saflaştırılması işlemlerinde; PCR Temizleme (clean-up) ve Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel, Almanya (MN), Southern Hibridizasyonunda kullanılan DNA propların işaretlenmesinde; DIG DNA işaretleme ve tespit kiti (Roche), Konfokal mikroskopta bakteri hücrelerini incelenmek için boyamada; "LIVE/DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti (Thermo Scientific), RNA izolasyonu için; RNA izolasyon Kiti (Macherey-Nagel, Almanya (MN), RNA'dan cDNA sentezi için; iScript cDNA Sentez Kiti (Bio-rad, ABD) kullanılmıştır.

4.1.4. Kullanılan Moleküler Belirteçler

İzole edilen ve kesilen DNA bantlarının tespitinde kullanılan 1 kb moleküler DNA belirteci ve protein çalışmalarında kullanılan belirteç Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: DNA ve protein belirteçleri. a) 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas), b) Protein Belirteci (Fermentas).

4.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları

Kullanılan bakteri soyları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Tez çalışması kapsamında kullanılan bakteri soyları.

Bakteri Soyları	Genotip	Kaynaklar
	***E. coli* soyları**	
E. coli DH5α	F– *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17 (rK–, mK+), *sup*44, *rel*A1λ, (σ80 dL*ac*ZAM15), D (*lac*ZYA-*arg*F) U169	[98]
E. coli BL21 (DE3)	Δ*lon*, Δ*omp*T, T7 RNA polimeraz geni, T7 ve T7-lac promotoru, *lac, tac, trc,* ParaBAD, PrhaBAD, T5 promotorları	Stratagene
E. coli ET12567/pUZ8002	*dam, dcm, hsdS, cat, tet*	[99]
E. coli BW25113/pIJ790	K12 derivative: ΔaraBAD, ΔrhaBAD	[100]
	***Streptomyces* soyları**	
S. coelicolor A3(2)	Prototrofik yaban suş	[101]
S. coelicolor A3(2) + pRA	pRA plazmiti taşıyan suş	Bu çalışma
S. coelicolor A3(2) + pRA*lon*	pRA*lon* rekombinant plazmitini taşıyan suş	Bu çalışma
Streptomyces clavuligerus	Yaban suş	ATCC
S. clavuligerus + pRA*lon*	pRA plazmiti taşıyan suş	Bu çalışma

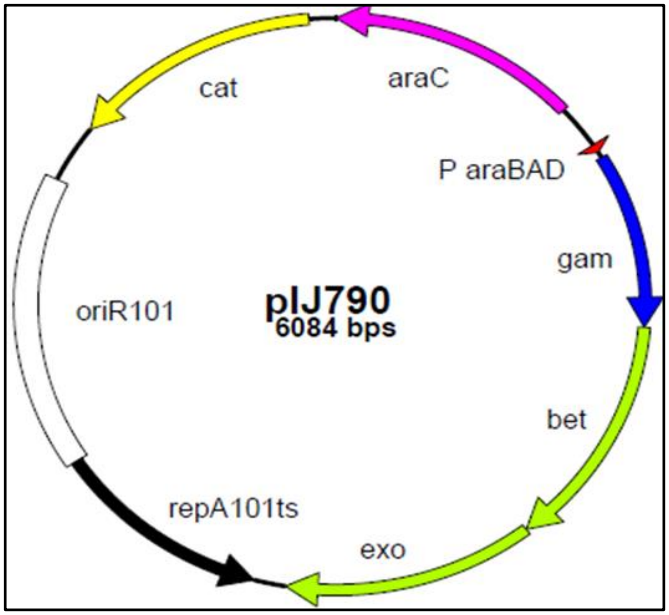
4.1.6. Kullanılan Plazmit/Kozmitler

Kullanılan kozmit ve plazmitler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Tez çalışması kapsamında kullanılan kozmit ve plazmitler.

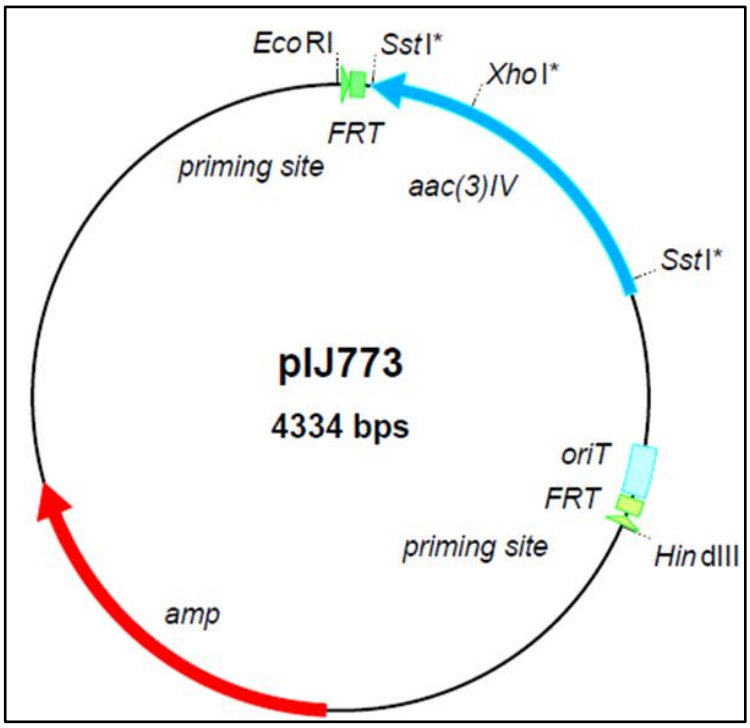
Plazmit/Kozmit	**Genotip**	**Referans**
	Plazmitler	
pUZ8002	*tra, neo,* RP4	[102]
pRA	pSET152'den türevlenen integratif ve konjugatif plazmit	[103]
pIJ773	*aac*(3)IV, RP4	[104]
pIJ778	*aad*A, RP4	[104]
pIJ790	*araC, bet, cat, exo, gam, exonuclease* V, *ori*R101, P*ara*BAD, *rep*A101ts	[100]
pBluescript II SK (-)	*lac* ve T7 promotoru, *bla*	Stratagene
	Kozmit	
StCB12	*bla, neo*	Johnes Innes Center

pIJ790 plazmiti, Supercos1'den türetilmiş kozmitlerin varlığında seçimine izin vermek için, bir λ RED rekombinasyon plazmiti olan pKD20 plazmitinde ampisilin dirençlilik geninin kloramfenikol dirençlilik geniyle değiştirilerek modifiye edilmesiyle elde edilmiştir (Şekil 4.2).



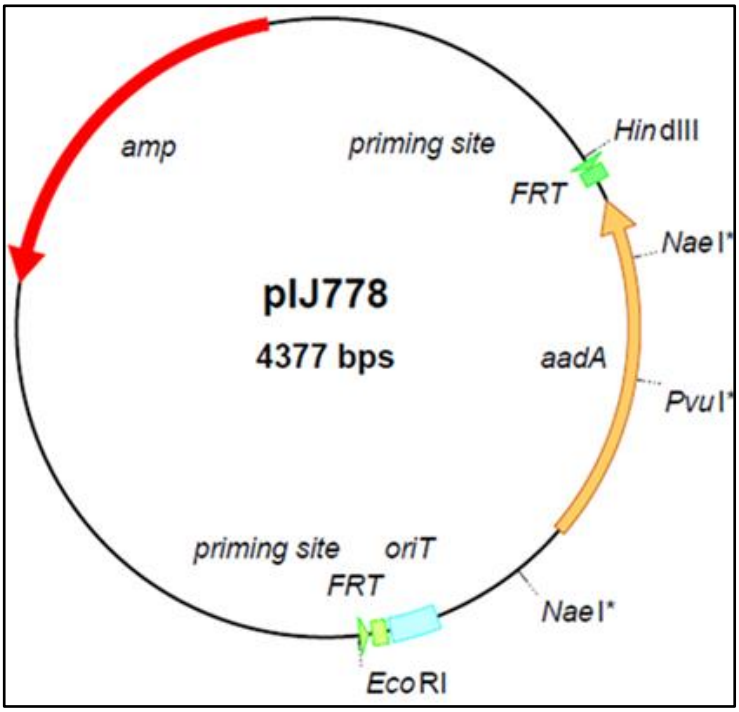
Şekil 4.2: pIJ790, λ RED rekombinasyon plazmitinin haritası.

pIJ773 plazmiti (Şekil 4.3) üzerinde, iki FLP rekombinaz hedef bölgesinin (FRT) içinde yer alan *aac*(3)IV (apramisin direnç geni) ve RP4 plazmidinin oriT bölgesi bulunmaktadır. Bu plazmitin, *Eco*RI-*Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle elde edilen apramisin dirençlilik geni, apramisin mutasyon kasetini oluşturmak için yapılan PCR'da kalıp olarak kullanılmıştır.



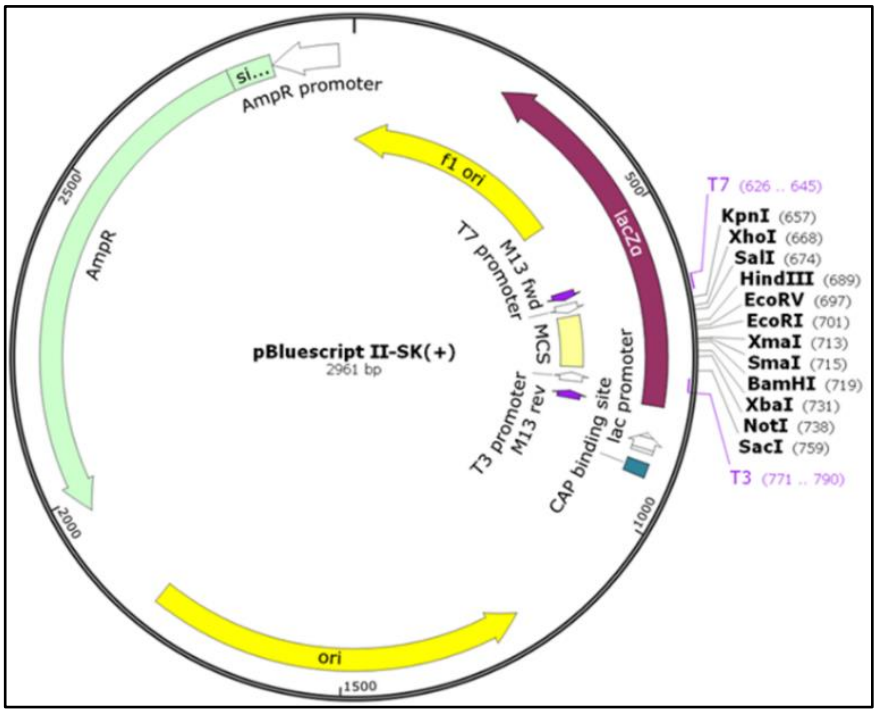
Şekil 4.3: pIJ773 plazmitinin haritası.

pIJ778 plazmiti (Şekil 4.4) üzerinde, iki FLP rekombinaz hedef bölgesinin (FRT) içinde yer alan *aad*A (streptomisin direnç geni) ve RP4 plazmidinin oriT bölgesi bulunmaktadır. Bu plazmitin, *Eco*RI-*Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle elde edilen streptomisin dirençlilik geni, streptomisin mutasyon kasetini oluşturmak için yapılan PCR'da kalıp olarak kullanılmıştır.



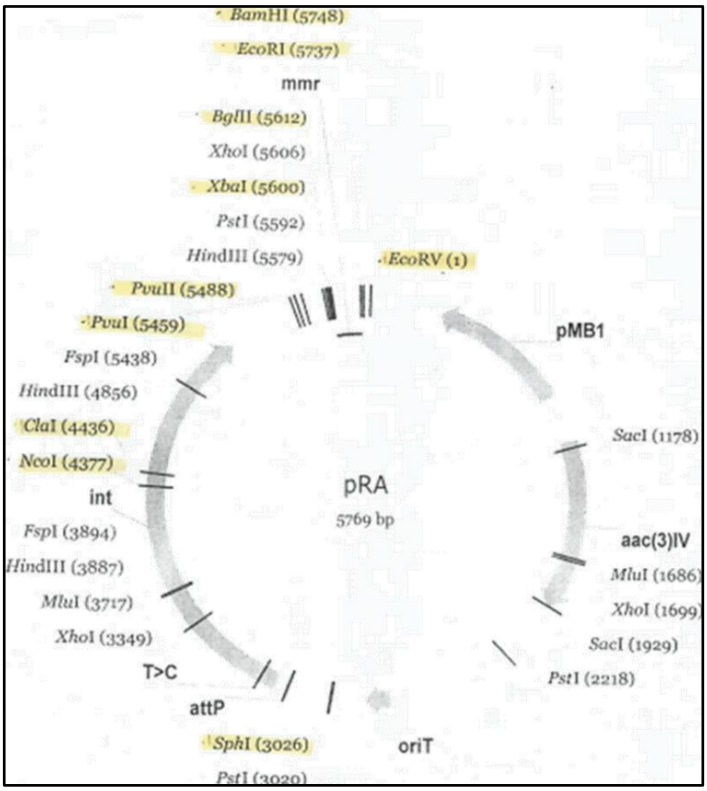
Şekil 4.4: pIJ778 plazmitinin haritası.

Bir klonlama vektörü olan pBluescript II-SK üzerinde, *lac* promotorunun yanısıra çoklu klonlama bölgesinin her iki ucunda faj T3 ve T7 promotor bölgeleri de bulunmaktadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: pBluescript II-SK (pSK) plazmitinin haritası.

pRA (5769 bç) plazmiti, kromozoma entegre olabilme yeteneğine sahip olan ve bu sayede aktarılmak istenen genin tek kopyasının kromozoma yerleşmesini sağlayan bir *E. coli-Streptomyces* mekik vektörüdür (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü pRA'nın haritası.

4.1.7. Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında deneysel yöntemlerde kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Tüm sterilizasyon işlemleri yüksek basınç altında 121 °C'ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3: Tez çalışması kapsamında kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti	İçeriği
Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X)	242 g Tris Baz 57.1 ml Glasiyal asetik asit 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)
Tris-EDTA (TE) Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1mM EDTA (pH 8)

Tablo 4.3: Devam.

Çözelti	**İçeriği**
20x SSC (pH 7)	3 M NaCl 0.3 M Sodyum sitrat
Solüsyon I	25 mM Tris (pH 8) 10 M EDTA (pH 8) 50 mM Glukoz
Solüsyon II	0.2 N NaOH % 1 SDS
Solüsyon III	%60 5 M Potasyum asetat % 11.5 Glasiyal asetik asit
Lizis Solüsyonu	0.3 N NaOH %2 SDS
$CaCl_2$ Solüsyonu	60 mM $CaCl_2$ % 15 Gliserol 10 mM PIPES
CTAB/NaCl Solüsyonu	% 10 CTAB 0.7 M NaCl
Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)	0.1 M Maleik asit 5 M NaCl
Depürinizasyon Solüsyonu	0.25 M HCl
Denötralizasyon Solüsyonu	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Nötralizasyon Solüsyonu	1.5 M NaCl 0.05 M Tris-HCl pH 7.2 1 mM EDTA
Prehibridizasyon Solüsyonu	5x SSC % 1 Bloklama solüsyonu % 0.1 Sarkozil % 0.02 SDS

Tablo 4.3: Devam.

Çözelti	İçeriği
Hibridizasyon Solüsyonu	Prehibridizasyon solüsyonu DIG ile işaretlenmiş prop
Yıkama Tamponu I	2xSSC % 0.1 SDS
Yıkama Tamponu II	% 0.1 SSC % 0.1 SDS
Belirleme (detection) Tamponu (pH 9.5)	0.1 M Tris-HCl 0.1 M NaCl
Yıkama Tamponu	30 ml Maleik asit tamponu 90 µl Tween 20
Bloklama Solüsyonu	0.5 g bloklama ajanı/ 50 ml maleik asit tamponu
Antikor Solüsyonu	Bloklama solüsyonu kullanılarak 5000 defa seyreltilen Anti Digoksigenin-AP
Renk Oluşturan Substrat	Deteksiyon tamponu içinde seyreltilen NBT/BCIP solüsyonu
SDS Ayırma Jeli (%12'lik) (4 ml)	1.28 ml dH_2O 1.6 ml %30 Akrilamid 1.04 ml 1.5 M Tris 40 µl %10 SDS 40 µl %10 APS 5 µl TEMED
SDS Yoğunlaştırma jeli (%12'lik) (1.5 ml)	1.28 ml dH_2O 1.6 ml %30 Akrilamid 1.04 ml 1.5 M Tris 40 µl %10 SDS 40 µl %10 APS 5 µl TEMED

Tablo 4.3: Devam.

SDS jeli boyama solüsyonu	% 50 Metanol % 0.05 Commasie Blue % 10 Asetik asit % 40 dH_2O
Destaining Solüsyonu (SDS PAGE için)	% 50 Metanol % 10 Asetik asit % 40 dH_2O
2X Yürütme tamponu (1 L)	28.8 gr Glisin 6.04 gr Tris 2 g SDS 1.8 L dH_2O
4X SDS Yükleme Tamponu	2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.8 g SDS 4 ml % 100 gliserol 0.4 ml β-merkaptoetanol 0.5 M EDTA 8 mg bromofenol mavisi 2.6 ml dH_2O
TfbI (4 °C)	5 M KOAc 1 M $MnCl_2$ 1 M KCl 1 M $CaCl_2$ % 75 Gliserol
TfbII (4 °C)	1 M Na-MOPS 1 M $CaCl_2$ 1 M KCl % 75 Gliserol
STET (4 °C)	8 g Sükroz % 0.5 Triton X-100 1 M Tris-HCl 0.5 M EDTA

Tablo 4.3: Devam.

% 40 Gliserol (50 ml) (4 °C)	23 ml % 87 gliserol 27 ml dH_2O
0.5 M HCl (200 ml)	9.85 ml %37'lik HCl 190.15 ml dH_2O
0.5 M Methanol-HCl (200 ml)	9.85 ml %37'lik HCl 190.15 ml methanol

4.1.8. Kullanılan Besiyerleri

4.1.8.1. Luria Bertani Besiyeri (LB)

- 10 g NaCl
- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika steril edilir [104].

4.1.8.2. 2xYT Broth

- 16 g Difco Bacto tripton
- 10 g Difco Bacto maya özütü
- 5 g NaCl

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır [104].

4.1.8.3. Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME)

- 3 g Difco maya özütü
- 5 g Difco Bacto-pepton
- 3 g Oxoid malt özütü
- 10 g Glukoz
- 340 g Sükroz

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır [104]. Otoklavlandıktan sonra; 5 mM $MgCl_2.6H_2O$ ve % 0.5 Glisin ilave edilir.

4.1.8.4. Tripton Soya Besiyeri (TSB)

- % 3 Oxoid Tripton Soya besiyeri

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika steril edilir [104].

4.1.8.5. Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)

- 20 g Mannitol
- 20 g Agar
- 20 g Soya unu

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır. Mannitol çeşme suyunda çözülür ve 2 g agar, 2 g soya unu içeren 250 ml'lik erlenlere 100'er ml olacak şekilde bölünür. İki defa 115 °C'ta 15 dk otoklavlanır [104].

4.1.8.6. SOB Besiyeri

- 20 g Pepton
- 5 g Maya özütü
- 0.5 g NaCl
- 10 ml 250 mM KCl

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır. 5 N NaOH ile pH 7'ye ayarlanır. Otoklavlandıktan sonra 2 M $MgCl_2$'den 5 ml eklenir [105].

4.1.8.7. R2YE Besiyeri

- 103 g Sükroz
- 0.25 g K_2SO_4
- 10.12 g $MgCl_2.6H_2O$

- 10 g Glukoz
- 0.1 g Kazamino asit
- 22 g Agar (% 2.2)

dH_2O ile 800 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlandıktan sonra her 160 ml besiyeri içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir [106].

- 2 ml KH_2PO_4 (% 0.5)
- 16 ml $CaCl_2.2H_2O$ (% 3.68**)**
- 3 ml L-prolin (% 20)
- 20 ml TES Tampon (% 5.73, pH 7.2)
- 0.4 ml iz element solüsyonu
- 1 ml NaOH (1N)

İz Element Solüsyonu:

- 40 mg $ZnCl_2$
- 200 mg $FeCl_3.6H_2O$
- 10 mg $CuCl_2.2H_2O$
- 10 mg $MnCl_2.4H_2O$
- 10 mg $Na_2B_4O_7.10H_2O$
- 10 mg $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$

4.1.8.8. TBO Besiyeri (pH 6.5)

- 20 g Salça
- 20 g Yulaf
- 25 g Agar

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır [107].

4.1.9. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Tez çalışması kapsamında kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	**Stok konsantrasyonu** (mg/ml)	***E. coli*'de kullanılan konsantrasyon** (µg/ml)	***Streptomyces*'te kullanılan konsantrasyon** (µg/ml)
Apramisin (Apr)	50	50	50
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Kanamisin (Kn)	50	50	50
Streptomisin (Str)	50	50	50
Kloramfenikol[1] (Chl)	50	25	-
Nalidiksik asit[2] (NA)	25	-	25

[1]Çözücü: %100 Etanol, [2]Çözücü: 0.15 M NaOH

4.1.10. Kullanılan Cihazlar

4 °C Buzdolabı (Samsung), - 20 °C derin dondurucu (Ariston), -80 °C derin dondurucu (ESCO, UUS-714B-1-5D), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, Mını-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BECKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (Nüve OT-90L ve HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübator (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Samsung), Spektrofotometre (BIO-

RAD, Smartspec 3000), Econo Gradient Pompa (BIO-RAD), Econo UV Monitör (BIO-RAD), Blotlama sistemi (Amersham), Hibridizasyon fırını (Amersham), PCR (Applied Biosystems), Konfokal Mikroskop (Zeiss, LSM 880), Sonikasyon Cihazı (Branson, Digital Sonifier), Nano Drop (Shimadzu, Biospecnano), Real-Time Q-PCR (Applied Biosystem, Step One Plus), Elektroparotör (Bio-Rad, GenePulser II)

4.1.11. Hazırlanan Primer Çiftleri

Genom üzerinde (erişim numarası: AL645882), 5756807-5759230 bç'leri arasında yer alan *lon* geninin sekansı NCBI veritabanı üzerinden indirilmiş ve primerler uzunluk, GC/AT oranı, dimer oluştuma eğilimi ve erime sıcaklığı (Tm) değeri gibi özellikleri dikkate alınarak Primer Select (DNASTAR) programı yardımıyla tasarlanmıştır.

Bu bilgiler ışığında *S. coelicolor* A3(2) *lon* genini sırasıyla; başlangıç kodonu ve bitiş kodonunu içine alacak şekilde çoğaltan, promotor ve terminatör bölgelerini dahil edecek şekilde ve başlangıç ve bitiş kodonlarının ~1500 bç üst ve alt bölgelerini çoğaltacak şekilde *lon*1, *lon*2ve *lon*3 olmak üzere 3 farklı primer çifti tasarlanmıştır. *lon* geninin ön ve arka bölgeleri ile uyumlu 39 nükleotit ve mutasyon kasetiyle uyumlu sırasıyla 20 veya 19 nükleotitlik kısmı içine alan *lon* uzun primer çifti ve *lon* genini iç kısmından çoğaltan *lon* prop primer çifti ve RT-qPCR'da kullanılacak primer çifti (*lon*4) de tasarlanmıştır.

Genomda SCO3798, SCO3873 ve SCO5820 numaralarıyla bulunan sırasıyla *att*B, *gyr*A ve *hrd*B genlerinin dizilerine NCBI veritabanından ulaşılarak RT-qPCR için uygun primerler tasarlanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm primer çiftleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Tez çalışması kapsamında kullanılan primer çiftleri.

Primerin Adı	**Primerin Dizisi 5'→3'**	**Kullanım Yeri**
lon 1 İleri Primer	ATGGCTGCTGAGTCCGCCGC	PCR
lon 1 Geri Primer	TCACGCTGCGACCGGAACCT	PCR
lon Uzun İleri Primer	TCGATGTAACTCAACTTGACTGCCGAAGGGGAGAT CATG**ATTCCGGGGATCCGTCGACC**	PCR

Tablo 4.5: Devam.

Primerin Adı	**Primerin Dizisi 5'→3'**	**Kullanım Yeri**
lon Uzun Geri Primer	ACGGGACCCGGGCCCTGCCTCATCCGGCC GCGTCCGTCA**TGTAGGCTGGAGCTGCTT C**	PCR
lon 2 İleri Primer	TGTTCGCCAGGCAGACCA	PCR
lon 2 Geri Primer	AGTTGTGAGACGGACGGA	PCR
Kanamisin İleri Primer	GTGCTGACCCCGGATGAATGT	PCR
Kanamisin Geri Primer	AGCGGGGCAGGATAGGTGAAGTA	PCR
Streptomisin İleri Primer	TGATGTGTAGGCTGGAG	PCR
Streptomisin Geri Primer	TGATTTGCTGGTTACGGTGA	PCR
lon Prop İleri Primer	CGAGCTGGTGAAGGAGT	PCR
lon Prop Geri Primer	CTTCTCGTCCTCCGTGT	PCR
lon 3 İleri Primer	CGATGAGCAGGTGCGGAGCG	PCR
lon 3 Geri Primer	CTCCTACAACGTCGGCATGAT	PCR
*hrd*B İleri Primer	CTCTTCCTGGACCTCATCCA	PCR

Tablo 4.5: Devam.

Primerin Adı	Primerin Dizisi 5'→3'	Kullanım Yeri
*hrd*B Geri Primer	GTACACCTTGCCGATCTCGT	PCR
lon 4 İleri Primer	AGCTGGTGAAGGAGTACA	RT-qPCR
lon 4 Geri Primer	TCAGGAACGGCGAGTAG	RT-qPCR
*gyr*A İleri Primer	GGTACACCGAGTGCAAGAT	RT-qPCR
*gyr*A Geri Primer	GTCGTAGTTGTCCGTGAAGT	RT-qPCR

4.2. Yöntemler

4.2.1. *S. coelicolor* A3(2)'den Kromozomal DNA İzolasyonu

S. coelicolor A3(2) genomik DNA'sı Hopwood ve arkadaşlarının geliştirdikleri yönteme göre izole edilmiştir [101]. 50 ml YEME besiyerine stok spor solüsyonundan 100 µl inoküle edilerek, 2 gün boyunca 30 °C'ta 220 rpm'de üretilmiştir. 100 ml YEME besiyerine bu ön kültürden 1/10 oranında ekim yapılarak hücreler 48 saat 30 ºC'ta inkübe edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve 10 ml TE tamponunda çözülen pelletin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Karışımın 1.7 ml'si steril bir tüpe ayrıldıktan sonra geri kalanı -20 °C'ta saklanmıştır. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl (10mg/ml) RNaz eklendikten sonra, 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 300 µl 5 M NaCl ve 240 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24:1) solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 11000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz fenol:CIA (25:24:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 0.6 hacim izoproponal eklenerek 11000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Pellet kurutulduktan sonra, 2ml dH_2O'da çözülmüştür. Üzerine eşit hacimde fenol:CIA

(25:24:1) solüsyonu eklenmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 3 katı miktarda soğuk %100 EtOH eklenmiş ve en az 2 saat -20 °C'ta inkübe edilmiştir.2 saatin sonunda 11000 rpm'de, +4 °C'ta, 30 dk santrifüj edilmiştir. Pellet kurutulduktan sonra, 50 µl dH_2O'da çözülmüştür.

4.2.2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin PCR ile Çoğaltılması

S. coelicolor A3(2) genomundaki *lon* geni, uygun primerler ile (Tablo 4.5'te *lon*1 primer çifti) PCR'da çoğaltılmıştır. PCR deneylerinde; Phusion polimeraz, Pfx polimeraz ve Q5 High Fidelity polimeraz olmak üzere 3 farklı polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimler sahip oldukları "proof-reading" özelliği sayesinde PCR reaksiyonu sırasında meydana gelebilecek hatalı baz yerleşimini azalttıkları ve sahip oldukları GC tamponlarıyla, GC oranı yüksek *S. coelicolor* A3(2) genomu için daha yüksek performans sağladıkları için tercih edilmişlerdir. *S. coelicolor* A3(2)'nin genomundaki *lon* geninin PCR ile çoğaltılması yüksek GC oranı nedeniyle oldukça zor olmuştur. *S. coelicolor* A3(2)'nin Lon proteaz geninin çoğaltılması ancak reaksiyonların optimizasyonuyla sağlanmıştır.

Kullanılan PCR protokolleri ve programları Tablo 4.6'da özetlenmiştir. Aşağıdaki tabloda gri renkli işaretlenmiş kısımlar 35 tekrarlı olacak şekilde polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuştur.

Tablo 4.6: *lon* geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR protokolleri ve programları.

Phusion Polimeraz (Thermo)	**Pfx Polimeraz (Invitrogen)**	**Q5 High Fidelity DNA Polimeraz**
	Reaksiyon karışımı (50 µl)	
5X Phusion HF Tamponu: 10 µl	50 mM $MgSO_4$: 1 µl	5X Q5 reak. Tamponu:10 µl
10mM dNTP: 1 µl	10X Amp. Tamponu: 5 µl	10mM dNTP: 1 µl
10 µM F primer : 2 µl	10X Enhc. Tamponu: 5 µl	10 µM F primer: 2.5 µl
10 µM F primer : 2 µl	Kalıp DNA : 2 µl	10 µM R primer: 2.5 µl
Kalıp DNA: 2 µl	10 mM dNTP : 1,5 µl	Kalıp DNA: 2 µl

Tablo 4.6: Devam.

Phusion Polimeraz (Thermo)	**Pfx Polimeraz (Invitrogen)**	**Q5 High Fidelity DNA Polimeraz**
Reaksiyon karışımı (50 µl)		
DMSO: 3 µl	10 µM F primer: 1,5 µl	5X Q5 High GC Enhancer: 10 µl
Phusion Polimeraz: 0.5 µl	10 µM R primer: 1,5 µl	Q5 High Fidelity DNA Polimeraz: 1 µl
ddH_2O: 32.5 µl	Pfx Polimeraz.... 0.5 µl	ddH_2O: 21 µl
	dH_2O: 32 µl	
Reaksiyon koşulları		
98 ºC: 3 dakika	94 ºC: 2 dakika	98 ºC: 1 dakika
98 ºC: 10 saniye	94 ºC: 15 saniye	98 ºC: 10 saniye
55/67 ºC: 30 saniye	57-71 ºC : 30 saniye	60-72 ºC: 30 saniye
72 ºC: 30 saniye/kb	68 ºC: 1 dakika/kb	72 ºC: 1 dakika/kb
72 ºC: 10 dakika	68 ºC: 10 dakika	72 ºC: 2 dakika
4 ºC: ∞	4 ºC: ∞	4 ºC: ∞

4.2.3. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

E. coli'den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirdikleri yöntem ile yapılmıştır [105]. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB'de 37 °C'ta 12-16 saat büyütülmüş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pellet üzerine 200 µl solüsyon I (TEG) eklenmiş, vortekslenmiş ve ependorf tüpüne alınmıştır. 5 dk sonunda üzerine 400 µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dk'da bir karıştırılarak 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 5 dk buzda bekletildikten sonra 300 µl Solüsyon III eklenip, her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka bir tüpe alınarak, 0.6 hacim izopropanol eklenip, karıştırılmıştır. En az 15 dk kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 11000 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, pellet dH_2O'da çözülmüştür. Solüsyon üzerine RNaz (10mg/ml) eklendikten

sonra 1 saat 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon ile (MN) saflaştırılmıştır.

4.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

Restriksiyon endonükleazlar, klonlama ve doğrulama çalışmalarında kullanılmıştır. Saflaştırılan gen ve plazmitlerin kesimi, uygun restriksiyon enzimi/enzim kombinasyonları aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar, enzimlerin üretici firmaları tarafından uygun görülen tampon çözeltiler, önerilen konsantrasyon ve koşullar göz önünde bulundurularak kurulmuştur. Kesim reaksiyonunun süresi kesilen plazmit veya PCR ürününün yoğunluğuna bağlı olarak 2-24 saat arasında değişmektedir.

4.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Nükleik asitleri, büyüklüklerine göre ayırmak için agaroz jel elektroforezi yöntemine başvurulmuştur. % 0.8-1'lik (w/v) agaroz jel, 1X TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve 100 ml agaroz jel üzerine 5 µl of RedSafe^{TM} Nükleik asit boyama solüsyonundan (20,000x) ilave edilmiştir. Jel kasete dökülüp, donduktan sonra yükleme tamponu ilave edilen DNA örnekleri 1/10 hacminde 6X yükleme boyası eklenip, karıştırılarak jele yüklenmiştir. Daha sonra örnekler, içinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankında 90-95 Volt'ta 45-50 dk yürütülmüştür.

4.2.6. DNA Fragmanlarının Agaroz Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmanları agaroz jelden, 'PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon (MN) kitiyle üretici firmanın sağladığı kullanım talimatına uyularak saflaştırılmıştır.

4.2.7. Ligasyon

Ligasyon Sambrook ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntem ile yapılmıştır [105]. Bu prosedüre göre, öncelikle ligasyonda kullanılacak plazmit (vektör) ve genin (insört) konsantrasyonları Eşitlik 4.1 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$ng\ (vektör) = \frac{\left(ng\ (vektör) \times kb(insert)\right)}{kb(vektör)} \times \frac{(insert)}{(vektör)} \quad (4.1)$$

Genel olarak reaksiyonlarda vektör: insört oranı, 1:3, 1:5 ve 1:10 olacak şekilde ayarlanmaya çalışılmıştır. Ligasyon reaksiyonları, T4 DNA ligaz enzimi üreticisinin önerdiği prosedüre uygun olarak kurulmuş ve hazırlanan karışım 16 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.8. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli kompetan hücrelerinin hazırlanmasında Sanders Laboratuvarı'nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır [108]. Hücreler 10'ar ml LB besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta 180 rpm'de gece boyunca çoğaltılmıştır. Bu ön kültürlerden 1:100 oranında, 50 ml uygun antibiyotikli LB besiyerine ekim yapılmış ve kültürler 37 °C'ta, 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Hücre yoğunluğu, 600 nm dalga boyunda absorbans değeri (OD_{600}) 0.4-0.5 aralığına ulaştığında, kültürler 4 °C'ta, 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pelletler buza alınıp 40 ml TfbI solüsyonunda çözünmüştür. Buzdaki 10 dk'lık inkübasyonun ardından 4 °C'ta, 3000 rpm'de, 8 dk santrifüj edilmiştir. Pelletler tekrar buza alınıp, 1 ml TfbII ile çözünmüştür. Daha sonra hücreler, her birinde 100'er µl olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılıp, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak hemen -80 °C'a kaldırılmıştır.

4.2.9. *E. coli* Elektrokompetan Hücrelerinin Hazırlanması

Elektroporasyonda kullanılacak *E. coli* elektrokompetan hücreleri Gust ve arkadaşlarının [104] yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. LB besiyerinde üretilen *E. coli* hücrelerinden ertesi sabah, 1 ml alınıp 100 ml sıvı LB besiyerine ekim yapılmıştır. Hücreler 200 rpm'de uygun sıcaklıkta OD_{600} 0.4 olana kadar çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. OD_{600} 0.4 olunca hücreler 50 ml'lik falkona aktarılıp 4000 rpm'de 10 dk 4 °C'ta santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, üst sıvı kısım atılarak hücre pelleti 50 ml soğuk %10 gliserolde çözülmüştür. Karışım 4000 rpm'de 10 dk +4 °C'ta santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp hücre pelleti tekrar soğuk 25 ml soğuk %10 gliserolde çözülmüştür. Karışım 4000 rpm'de 10 dk +4 °C'ta santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak hücre pelleti 1 ml soğuk %10 gliserolde çözülerek, soğuk

ependroflara 50'şer µl bölüştürülmüştür. Hücreler sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak, hemen -80 °C'a kaldırılmıştır.

4.2.10. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Kimyasal Yöntemle Transformasyonu

Plazmit/kozmitler, *E. coli* kompetan hücrelerine Sambrook ve arkadaşlarının geliştirdikleri transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır [105]. 50-80 ng arasında farklı konsantrasyonlarda plazmit/kozmit, kompetan hücrelerle birleştirilerek buzda 30 dk bekletilmiştir. Hücrelere, 42 °C'ta 45 sn ısı şoku uygulanmış ve ardından yine buzda 2 dk bekletilmiştir. Steril koşullarda üzerine 800 µl LB eklenen hücreler, uygun sıcaklıkta, 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler, uygun antibiyotik içeren LB katı besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.11. *E. coli* Hücrelerinin Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu

Üzerinde istenilen gen bulunan plazmit/kozmit, *E. coli* elektrokompetan hücrelerine Gust ve arkadaşlarının [104] elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. 50 µl hücre süspansiyonunun üzerine ~100 ng plazmit/kozmit DNA eklenip, karıştırılmıştır. 200 Ω, 25 µF ve 2,5 kV'ye ayarlanmış bir BioRad GenePulser II cihazı kullanılarak, buzda soğutulmuş 0.2 cm'lik elektroporasyon küvetinde elektroporasyon yapılmıştır. Beklenen zaman sabiti 4.5 - 4.9 ms'dir. Steril koşullarda üzerine 1 ml LB eklenen hücreler, uygun sıcaklıkta, 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler, uygun antibiyotik içeren LB katı besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.12. Hızlı Mini Plazmit İzolasyonu Yöntemi

Transformasyon/elektroporasyon sonucunda oluşan kolonilerin doğruluğunu ispatlamak için *E. coli* soylarından plazmid izole ederken Sambrook ve arkadaşlarının kaynatma yöntemi kullanılmıştır [105].

1 ml besiyeri içeren ependorf tüplerinde 1 gece inkübasyona bırakılan hücreler 13000 rpm'de 2-3 dakika santrifüjlenip ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 250 µl STET-lizozim karışımından konularak vortex ile iyice karıştırılmıştır. Kaynayan su içerisinde 45 saniye bekletilen tüpler 13000 rpm'de 15 dakika sanrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernetant atılıp, pellet kurutulduktan sonra 20 µl dH_2O'da çözülmüştür. Plazmidler jele yüklenirken yükleme tamponu içerisine son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde RNaz eklenmiştir.

Elde edilen plazmit DNA'lar uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek, doğrulanmıştır.

4.2.13. *E. coli* Hücrelerinden Protein İzolasyonu

Total protein izolasyonu Donovan ve arkadaşlarının yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [109]. Gecelik bakteri kültüründen 1/50 oranında alınarak uygun antibiyotikli yeni besiyerine inoküle edilmiştir. Bu işlem 2 set halinde gerçekleştirilmiştir. Bakteri kültürleri OD 0.4'e gelinceye kadar 37ºC'de inkübe edilmiştir. OD 0.4'e ulaşınca bir bakteri kültürü IPTG (0.5mM- 2 mM) ile uyarılırken, diğeri uyarılmamıştır. Bakteri kültürleri 37 ºC'de 4 saat inkübasyonun ardından +4 ºC, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında pellet 2 kez 2.5 ml TE'de (10mM Tris pH:7.5, 1mM EDTA) yıkanmıştır. Daha sonra 1'er ml liziz tamponunda (pH 7.4) çözülen pelletler, mekanik yollarla parçalanmak üzere ilk etapta 20 sn süreyle ve %30 genlikte (amplitude) sonikasyona maruz bırakılmıştır. Sonikasyon zamanı 15 sn'ye düşürülerek aynı işlem 3 kez daha tekrarlanmıştır. Fazla ısınmayı engellemek ve proteinleri korumak amacıyla tüm süreç buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon sonrasında 1µl DNaz (1mg/ml) eklenerek, +4 ºC'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında +4 ºC'de, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar steril ependorflarda toplanıp, içerdikleri protein miktarını belirlemek için 'Commassie Plus (Bradford) Assay' yöntemi kullanılmıştır. Bradford deneyi örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Mikroplaka kuyucuklarına 20'şer µl dH2O eklenmiş ve üzerine farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarından (250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml ve 2000 µg/ml) 10'ar µl yüklenmiştir. Sonikasyon sonucu elde edilen protein örnekleri ise 1:5 oranında dilüe edilerek her bir kuyucuğa 2'şer µl konulmuştur. Mikroplaka içerisindeki her bir örneğe 200'er µl 'Coomassie Plus

Reagent' eklenip, mikroplakalar en az 30 dk karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 595 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Eşit konsantrasyondaki örnekleri jele yüklemek için hesaplanan miktarda protein SDS yükleme boyası ile karıştırılmıştır. Karışım kaynar su içinde 5 dakika bekletilmiştir. Karışımın oda sıcaklığına kadar soğuması beklendikten sonra önceden hazırlanmış SDS jellerine her bir kuyuda 60 µg protein olacak şekilde yüklenmiştir. Jel 110-120 V'ta yürütüldükten sonra boyama çözeltisinde hafifçe çalkalanarak boyanıp ve ardından jel boyası arıtma çözeltisi içine alınmıştır.

SDS jeli için gerekli kimyasallar ve oranları Tablo 4.7'de belirtilmiştir.

Tablo 4.7: SDS jeli için gerekli kimyasallar ve oranları.

Kimyasal	**Derişim jeli (Üst faz) (%5)**	**Ayırma jeli (Alt Faz) (%12)**
H_2O	1.4 ml	1.6 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.3 ml
1 M Tris-HCl. pH 6.8	250 µl	-
10% (w/v) SDS	20 µl	50 µl
Akrilamid solüsyonu (%30)	330 µl	2 ml
10% (w/v) (APS)	20 µl	50 µl
TEMED	2 µl	5 µl

4.2.14. Lon Proteazı Üretemeyen Mutant Suşun Oluşturulması

4.2.14.1. λ/Red Rekombinasyon Yöntemiyle Δ*lon* Mutant Suşun Oluşturulması

Lon proteaz enzimini üretemeyen *S. coelicolor* A3(2) mutant suşu oluşturmak için PCR temelli bir yöntem kullanılmıştır [104]. Bu yöntemde kullanılmak üzere Lon proteaz enzimini kodlayan gen bölgesinin delesyonu için uzun (59 ve 58 bp) primerler

tasarlanmıştır (Tablo 4.5'te *lon* uzun primer çifti). İleri ve Geri primerleri sırasıyla *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin ön ve arka bölgeleri ile uyumlu 39 nükleotite ve mutasyon kasetiyle uyumlu sırasıyla ile 20 veya 19 nükleotite (koyu renkli gösterilmiştir) sahiptir.

Kalıp olarak pIJ773'ten elde edilen apramisin direnç geni ve uzun primerler kullanılarak Q5 High Fidelity DNA polimeraz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiş ve apramisin mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 4.7).

Şekil 4.7: Apramisin mutasyon kasetinin şematik görünümü. Yeşil renkli kısımlar *lon* geninin önü ve arkasıyla uyumlu bölgeleri gösterirken, sarı renkli kısım ise apramisin dirençlilik genini göstermektedir.

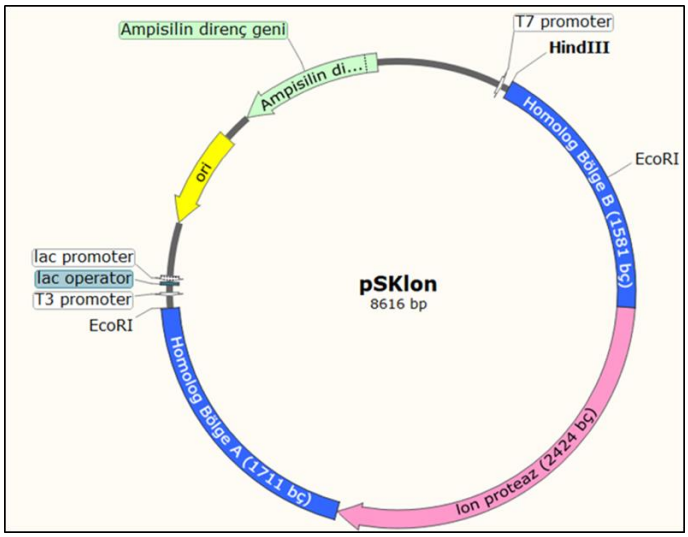
Üzerinde *lon* genini taşıyan StCB12 kozmiti *E. coli* BW25113/pIJ790 elektrokompetan hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Elektroporasyon sonucunda elde edilen *E. coli* BW25113/pIJ790+StCB12 hücrelerine apramisin mutasyon kaseti elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır.

4.2.14.2. Kaset Mutagenez Yöntemiyle Δ*lon* Mutant Suşun Oluşturulması

4.2.14.2.1. Apramisin Mutasyon Kasetiyle Δ*lon* Mutant Suşun Oluşturulması

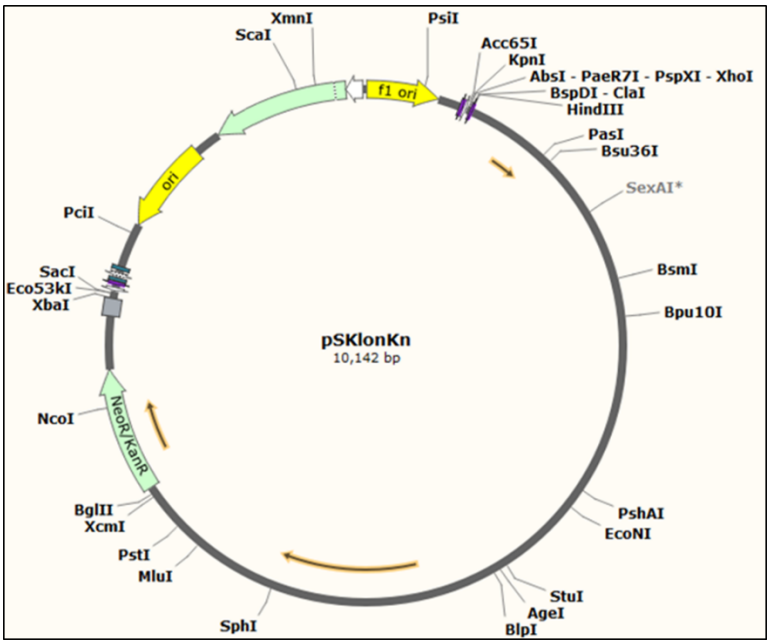
Lon proteaz enzimini üretemeyen *S. coelicolor* A3(2) mutant suşu oluşturmak için *lon* geninin üst ve arka kısmından yaklaşık 1500 bazlık bölgeyi içine alacak primerler, *S. coelicolor* A3(2) genom dizisine (http:// strepdb.streptomyces.org.uk) birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır (Tablo 4.5'te *lon2* primer çifti).

Bu primerler, kalıp olarak *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sı ve Q5 High Fidelity polimeraz enzimiyle PCR kurulmuştur. PCR sonucunda elde edilen 5658 baz çiftlik ürünün, pSK plazmitinin *Eco*RV kesim bölgesine klonlanmasıyla, Şekil 4.8'de görülen vektör elde edilmiştir.



Şekil 4.8: pSK*lon* plazmitinin haritası.

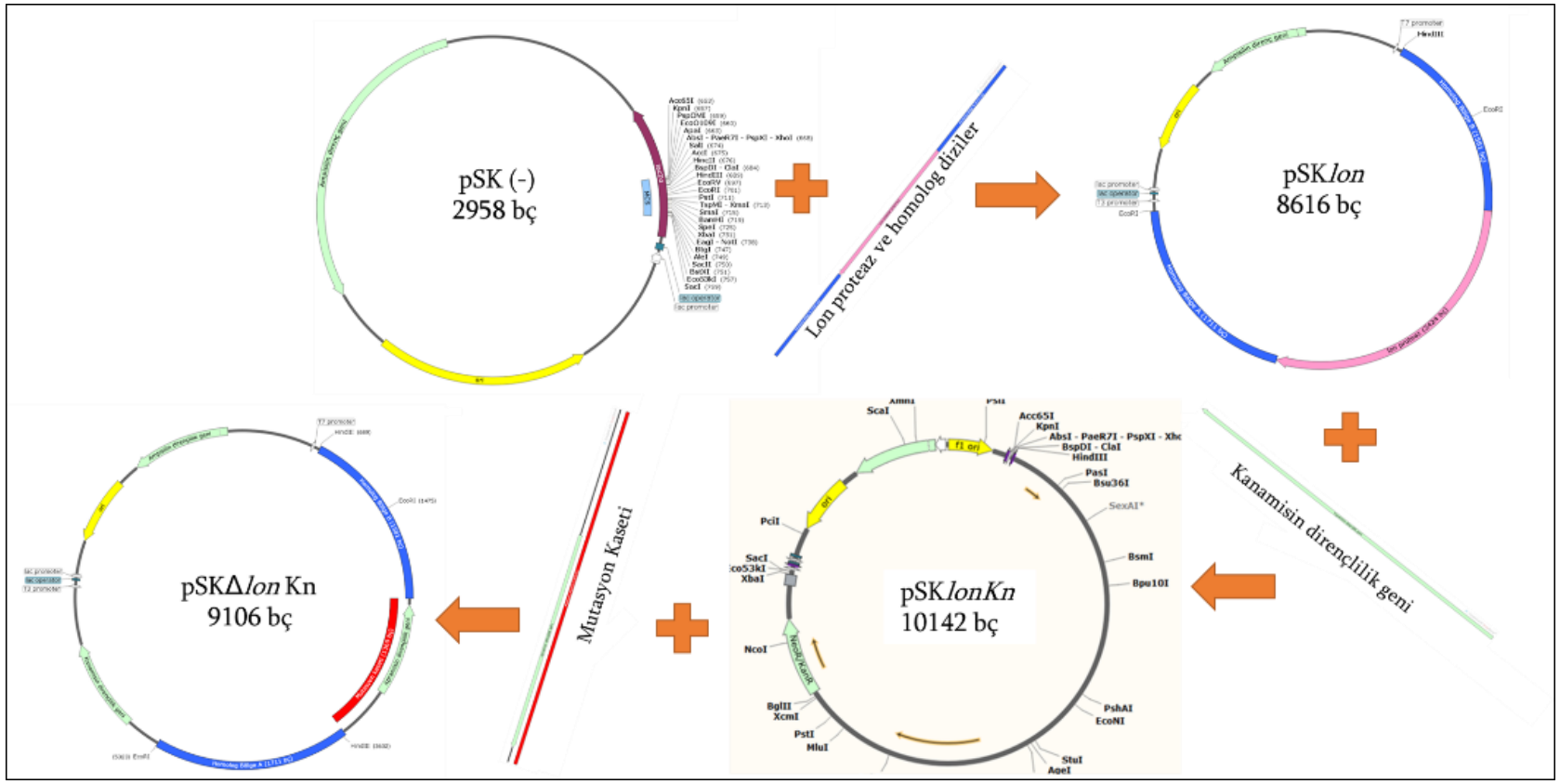
S. coelicolor A3(2)'de çift yönlü rekombinasyonun gerçekleştiği mutantları seçebilmek için gerekli olan ikinci bir antibiyotik dirençlilik geni olarak kanamisin seçilmiştir. Kanamisin dirençlilik genini laboratuvarımızda bulunan pSK*Kn* plazmitinin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonda uygun primerler (Tablo 4.5'te kanamisin primer çifti) ile PCR'da elde edilmiştir (Şekil 5.33). Daha sonra bu dirençlilik geni, pSK*lon* plazmitine klonlanarak pSK*lonKn* vektörü elde edilmiştir (Şekil 4.9).



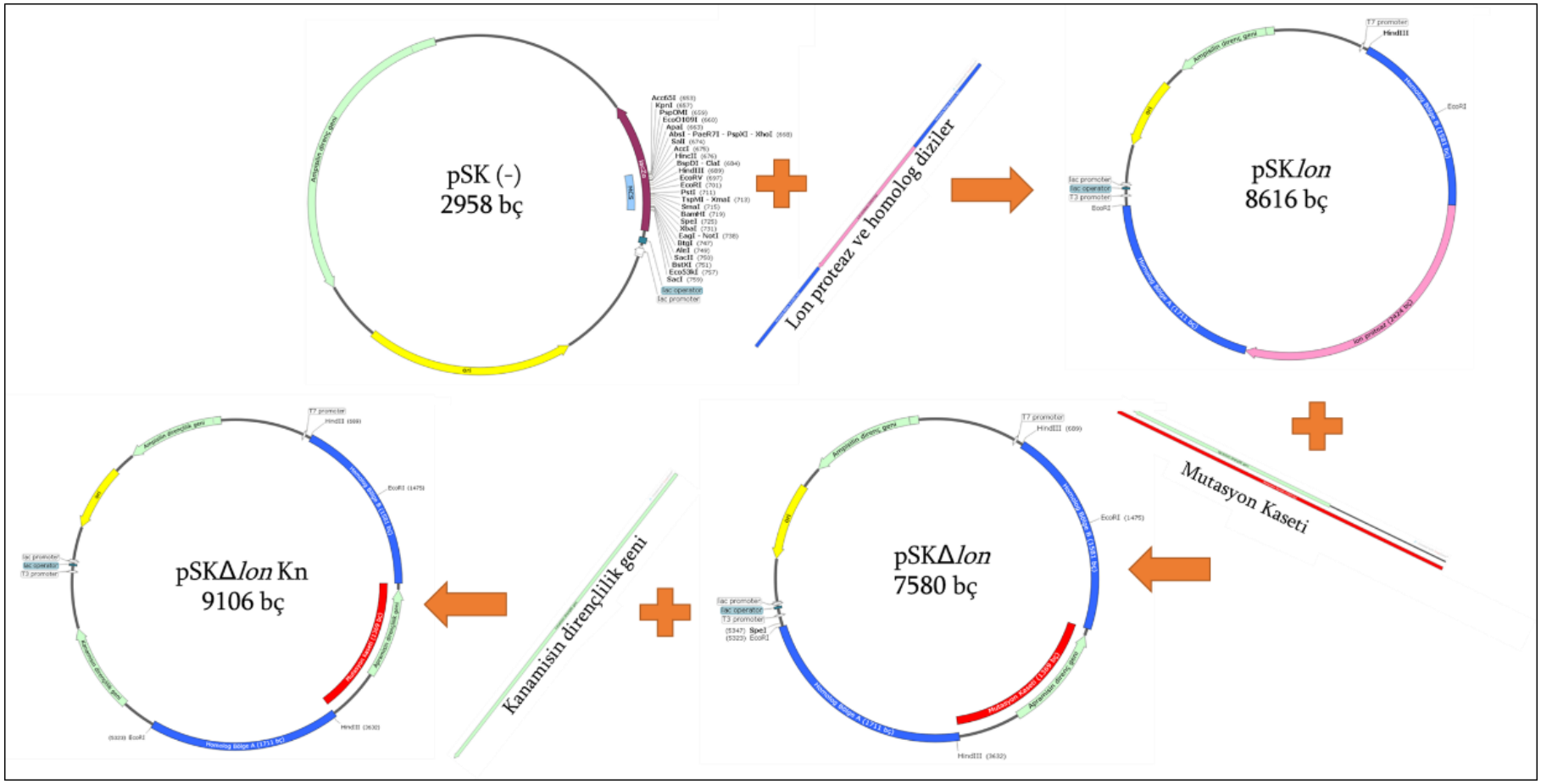
Şekil 4.9: pSK*lonKn* plazmitinin haritası.

pSK*lonKn* plazmiti *E. coli* BW25113/pIJ790 elektrokompetan hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır [104]. Elektroporasyon sonucunda elde edilen *E. coli* BW25113/pIJ790+pSK*lonKn* hücrelerine apramisin mutasyon kaseti de (Şekil 4.7) elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış ve pSKΔ*lonKn* vektörü elde edilmiştir.

Sanders Laboratuvarı'nın yöntemi ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri, pSKΔ*lonKn* plazmiti ile transform edilmiştir [108]. pSKΔ*lonKn* plazmiti taşıyan transformanlar, Apr (50 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerinde seçilmişlerdir. Şekil 4.10'te bu yöntem şematize edilmiştir.



Şekil 4.10: Apramisin mutasyon kasetiyle Δ*lon* mutant suşun oluşturulması için hazırlanmış rekombinant plazmit.



Şekil 4.11: pSKΔ*lon*Kn rekombinant plazmitinin farklı bir şekilde hazırlanması.

Apramisin mutasyon kasetiyle Δ*lon* mutant suşu elde etmekte sorun yaşanınca yöntem revize edilmiştir. Bu revizyonda öncelikle, elimizde bulunan pSK*lon* plazmiti, *E. coli* BW25113/pIJ790 elektrokompetan hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır [104]. Elektroporasyon sonucunda elde edilen *E. coli* BW25113/pIJ790+pSK*lon* hücrelerine apramisin mutasyon kaseti (Şekil 4.7) elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış ve pSKΔ*lon* vektörü elde edilmiştir. *S. coelicolor* A3(2)'de çift yönlü rekombinasyonun gerçekleştiği mutantları seçebilmek için gerekli olan ikinci bir antibiyotik dirençlilik geni olarak kullandığımız kanamisin dirençlilik geni pSKΔ*lon* plazmitine klonlanarak pSKΔ*lonKn* vektörü elde edilmiştir. Şekil 4.11'de bu yöntem şematize edilmiştir.

4.2.14.2.2. Streptomisin Mutasyon Kasetiyle Δ*lon* Mutant Suşun Oluşturulması

Kalıp olarak pIJ778'den elde edilen streptomisin direnç geni ve uzun primerler kullanılarak Q5 High Fidelity DNA polimeraz enzimi ile PCR gerçekleştirilmiştir ve streptomisin mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 4.12).

Şekil 4.12:Streptomisin Mutasyon Kasetinin şematik görünümü. Mavi renkli kısımlar *lon* geninin önü ve arkasıyla uyumlu bölgeleri gösterirken, kırmızı renkli kısım ise Streptomisin dirençlilik genini göstermektedir.

pSK*lonKn* plazmiti *E. coli* BW25113/pIJ790 elektrokompetan hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır [104]. Elektroporasyon sonucunda elde edilen *E. coli* BW25113/pIJ790+pSK*lonKn* hücrelerine streptomisin mutasyon kaseti yine elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış ve pSKΔ*lonKn* vektörü elde edilmiştir.
Sanders Laboratuvarı'nın yöntemi [108] ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri, pSKΔ*lonKn* plazmiti ile transform edilmiştir. pSKΔ*lonKn* plazmiti taşıyan transformanlar, Apr (50 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerinde seçilmişlerdir.

4.2.15. *S. coelicolor* A3(2)'ye Konjugasyon ile Plazmit Transferi

pSKΔ*lon*Kn plazmiti taşıyan *E. coli* ET12567/pUZ8002 ön kültüründen, Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren 55 ml LB besiyerine, 1/10 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda abzorbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler iki kez antibiyotik içermeyen LB ile yıkanarak, 5 ml LB'de çözülmüştür. Bu sırada, her bir konjugasyon denemesi için 500µl 2xYT besiyerine 10^8 sayıda *S. coelicolor* A3(2) sporu ilave edilerek, sporlara 50 °C'ta 10 dk sıcaklık şoku uygulanmış ve sonrasında oda sıcaklığında soğumaya bırakılmışlardır. 0.5 ml *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri ile 0.5 ml *S. coelicolor* A3(2) sporları karıştırılarak, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve sıvının büyük bir kısmı dökülerek, hücreler kalan ~50 µl sıvıda çözülmüştür. Hücrelerden, 10^{-1}-10^{-4} aralığında seri dilüsyonlar hazırlanarak, her dilüsyondan 100'er µl antibiyotik içermeyen MS + 10 mM $MgCl_2$ agar besiyerine ekilmiştir. 30 °C'ta, 16-20 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerleri, besiyerindeki son konsantrasyon 25 µg/ml NA ve 50 µg/ml apramisin olacak şekilde antibiyotik içeren 1 ml dH_2O ile kaplanarak inkübasyona devam edilmiştir.

Konjugasyon sonucunda NA ve apramisin içeren MS besiyerinde üreyen hücreler arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği (apramisine dirençli, kanamisine hassas) hücreleri seçebilmek için konjugantlar hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren TSA besiyerlerine ekilerek taranmıştır. Bunlar içinden NA+Apr besiyerinde üreyip de NA+Apr+Kn besiyerinde üremeyen *S. coelicolor* A3(2) konjugantları, olası çift rekombinasyon mutantları olarak seçilmişlerdir.

4.2.16. Mutant Hücrelerin PCR ile Doğrulanması

Lon proteazı üretemeyen olası mutant hücreleri PCR ile ispatlanmak için Streptomisin mutasyon kasetini bir primer çifti ve *lon* genini çoğaltan başka bir primer çifti (Tablo 4.5'te streptomisin ve *lon*3 primer çiftleri) ile reaksiyonlar kurulmuştur.

4.2.17. Lon Proteazı Normalden Fazla Üreten Mutant Suşun Oluşturulması

Lon proteaz enzimini normalden fazla üreten *S. coelicolor* A3(2) mutant suşu oluşturmak için Lon proteaz enzimini kodlayan gen bölgesinin promotor ve terminatör bölgelerini içine alacak primerler, *S. coelicolor* A3(2) genom dizisine (http:// strepdb.streptomyces.org.uk) birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır (Tablo 4.5'te *lon*3 primer çifti).

Bu primerler, kalıp olarak *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sı ve Q5 High Fidelity polimeraz enzimiyle PCR kurulmuştur. PCR sonucunda elde edilen 3397 baz çiftlik ürünün, pRA plazmitinin *Eco*RV kesim bölgesine klonlanmasıyla pRA*lon* vektörü elde edilmiştir.

pRA*lon* vektörü konjugasyonla *S. coelicolor* A3(2) ve *S. clavuligerus'*a aktarılarak, *S. coelicolor*+pRA*lon* ve *S. clavuligerus*+pRA*lon* rekombinant suşları elde edilmiştir.

4.2.18. Southern Blot

Southern blot yöntemi Sambrook ve arkadaşlarının geliştirdikleri yönteme göre yapılmıştır [105]. Öncelikle kromozomal DNA örnekleri *Eco*RI-*Sph*I restriksiyon endonükleaz ile kesilerek %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA fragmanlarının jelden membrana aktarımı blotlama sistemi (Amersham) ile sağlanmıştır. 2xSSC solüsyonu ile yıkanan membranın üzerinde bulunan agaroz jelden DNA'ların aktarımı 40-50 mbar ile vakum altında gerçekleşmiştir. Agaroz jelin yüzeyi, sırası ile 30'ar dk süreyle depürinizasyon solüsyonu, denötralizasyon solüsyonu, nötralizasyon solüsyonu ile kaplanmış ve son olarak 90 dk süreyle 20xSSC solüsyonu ile kaplanmıştır. Membrana transfer edilmiş DNA fragmanları UV ışığı ile (4 dk) membrana sabitlenmişlerdir. Membran 2xSSC ile yıkanarak adi filtre kağıdı arasında 4 °C'ta saklanmıştır.

4.2.18.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

*Eco*RI-*Sph*I ile kesilmiş kromozomal DNA örneklerini taşıyan membranlar prehibridizasyon solüsyonu içinde 42 °C'ta 5 saat hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, *lon* probu ile gece boyunca 42 °C'ta hibridizasyon

fırınında inkübe edilmiştir. İçinde prop bulunan hibridizasyon solüsyonları daha sonraki kullanıma kadar -20 °C'ta saklanmıştır. Hibridizasyondan sonra membran, yıkama tamponu I ile oda sıcaklığında 2 defa 15'er dk çalkalanarak ve yıkama tamponu II ile 42 °C'ta 2 defa 25'er dk çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkamalardan sonra membran, maleik asit yıkama tamponunda 5 dk durulanıp, 100 ml bloklama solüsyonunda 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk blotlama solüsyonuyla inkübasyonun ardından, en az 2 saat süreyle 20 ml antikor solüsyonunda inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 ml maleik asit yıkama tamponunda 2 defa 15'er dk yıkanan membran, 20 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Membran, taze hazırlanmış 10 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta bekletilmiştir. Renk reaksiyonu membranın dH_2O ile yıkanmasıyla durdurulmuştur.

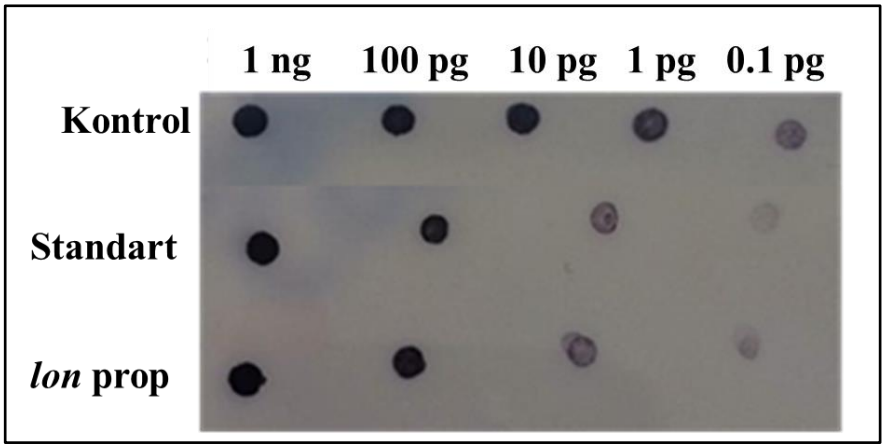
4.2.18.2. Prop DNA'ların Hazırlanması

Southern hibridizasyonunda prop olarak kullanılacak olan *lon* geni, *S. coelicolor* A3(2) genomunun kalıp olarak kullanılmasıyla kurulan Q5 polimeraz enzimi ve *lon* genine uygun kısa primerler (Tablo 4.5'te *lon* prop primer çifti) ile PCR sonucunda elde edilmiştir. 1141 bç'lik *lon* genine ait PCR ürünü agaroz jelden, DNA ve Jel Bant Pürifükasyon Kiti (Macherey-Nagel (MN)) kullanılarak elde edilmiştir.

DIG DNA işaretleme ve tespit kiti (Roche) ile, üreticilerin önerdiği şekilde işaretlenen *lon* probunun seri dilüsyonları hazırlanarak (1 ng, 100pg, 10 pg, 1 pg ve 0.1 pg) 1'er µl'si pozitif yüklü naylon membrana sırasıyla emdirilmiş ve UV ışığı altında membrana sabitlenmiştir. Membran, öncelikle 20 ml maleik asit tamponunda 15-25 °C'ta çalkalanarak 2 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, sırası ile 10 ml bloklama solüsyonunda ve 10 ml antikor solüsyonunda 30'ar dk bekletilmiştir. Membran, 10 ml yıkama tamponunda 2 kez 15'er dk yıkandıktan sonra, 10 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Bütün inkübasyonlar düşük rpm'de gerçekleştirilmiştir.

5 dk inkübasyondan sonra membran, taze hazırlanmış 2 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için membran 1 dk steril dH_2O ile yıkanmıştır.

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında, prop olarak kullanılan *lon* geni digoksijenin ile başarılı bir şekilde işaretlenmiştir.



Şekil 4.13: *lon* probunun kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.

4.2.19. Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Antibiyotiklerinin Ölçümleri

Ekstra bir kopya *lon* genini taşıyan rekombinant ve yaban suşlar ile 168 saatlik bir fermentasyon yapılmıştır. Rekombinant suş antibiyotik eklenmemiş R2YE besiyerinde üretilmiştir. Fermantasyonun 24., 48., 72., 96., 120, 144. ve 168. saatlerinde her bir suştan 5 ml örnek alınmış, bunun 1 ml'si antibiyotik ölçümü için -20 °C'a, 4 ml'si kuru ağırlık ölçümü için 2 kez dH_2O ile yıkandıktan sonra -20 ºC'a kaldırılmıştır.

Undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotikleri Keiser ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüştür [78]. -20 ºC'den alınan 1 ml'lik örnekler eritilerek, her birine 250 µl 5M KOH ilave edilip karıştırıldıktan sonra gece boyunca 4 ºC'de inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek, pellet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Aktinorhodin, süpernatantta 640 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Pellet 0.5 M HCl ile 2 kez yıkanmış ve 1 ml 0.5 M metanol-HCl karışımında 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışım, 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra undesilprodigiosin süpernatantta 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Antibiyotik aktiviteleri, Abs = ε x [M] formülü ile hesaplanmıştır. Formülde, aktinorhodin için saf örneğin ε değeri 25230, undesilprodigiosin için saf örneğin ε değeri ise 100500 olarak alınmıştır.

Spesifik aktivite hesabı için hücrelerin kuru ağırlıkları kullanılmıştır. Kuru ağırlık ölçümü için -20 ºC'a kaldırılan pelletler eritilerek kurutma kaplarına alınmış

ve 4 gün boyunca 80 ºC'de kurutulduktan sonra ağırlıkları (mg/ml) ölçülmüştür. Antibiyotik aktiviteleri (nmol) kuru ağırlığa (mg) bölünerek spesifik aktiviteleri elde edilmiştir.

4.2.20. Sefamisin C Antibiyotiğinin Ölçümü

pRA*lon* plazmitini taşıyan *S. clavuligerus* ve yaban tip *S. clavuligerus* suşları ile R2YE besiyerinde 120 saatlik bir fermentasyon yapılmıştır. Fermentasyon boyunca her 24 saatte bir 1 ml örnek alınarak 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'a kaldırılmıştır. Ayrıca deneyde kullanılacak Sefalosporin C standartı (1 mg/ml) 1M MOPS (pH: 6) çözeltisi içerisinde, 10 µg/ml,7.5 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1.25 µg/ml ve 0.625 µg/ml olacak şekilde hazırlanıp -20 °C'ye kaldırılmıştır.

İndikatör mikroorganizma *E. coli* ESS 22-35 suşu 10 ml LB besiyerine -80 °C'ta bulunan stok bakteriden 100 µl olacak şekilde ekilmiş ve 30 °C'ta 200 rpm'de 14-16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından *E. coli* ESS 22-35 suşundan, 100 ml LB besiyerine 2 ml ekim yapılarak, 30 °C'ta 200 rpm'de, OD_{600} değeri: 0.9-1 aralığına gelinceye dek bakteri kültürü inkübe edilmiştir. Bakteri OD değeri 0.9-1 aralığında tespit edildiğinde, 45 °C'a getirilmiş TSA besiyerinin içerisine; 100 ml TSA besiyerine 3.3 ml olacak şekilde, bakteri kültüründen ekim yapılmış ve çalkalanarak kültürün homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Hızlı bir şekilde petri kaplarına 25 ml olacak şekilde dökülmüş ve donması beklenmiştir. Steril edilmiş olan cam pipetin arka kısmı kullanılarak besi ortamlarına 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. -80 °C'ta muhafaza edilen süpernatantlar buz içinde çözdürüldükten sonra vortekslenmiş ve kuyucuklara 40 µl koyulmuştur. Örneklerin eklenmesinin ardından petriler +4 °C'ta 2 saat bekletilmiştir. Ardından 30 °C'ta 16 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası zon ölçümleri yapılmıştır.

4.2.21. α-amilaz Aktivitesinin Ölçümü

Sco-pRA*lon,* Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşunun α-amilaz aktivitesi Miller ve arkadaşlarının geliştirdikleri spektrofotmetrik yöntemin modifiye edilmesiyle ölçülmüştür [110]. Öncelikle 20 ml TSB besiyerine stok spor solüsyonundan 50 µl inoküle edilerek, 2 gün boyunca 30 °C'ta 220 rpm'de üretilmiştir. 50 ml TSB+%1'lik nişasta besiyerine, bu ön kültürden 1/10 oranında

ekim yapılarak hücreler 48 saat 30 °C'ta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 1 ml kültür alınarak 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve 1ml süpernatant elde edilmiştir. Üzerine 1 ml %1'lik nişasta solüsyonu eklenerek 35 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için 2 ml Dinitrosalisilik asit (DNS) eklenerek 10 dk 100 °C'ta tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Ardından buzda oda sıcaklığına soğutulmuş ve üzerine 6 ml dH_2O eklenerek 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

4.2.22. Konfokal Mikroskop İncelemesi

S. coelicolor+pRA*lon* rekombinant suşu ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarına ait stok spor solüsyonundan R2YE besiyerine 100 µl inoküle edilerek, 2 gün boyunca 30 °C'ta 220 rpm'de üretilmiştir. 100 ml R2YE besiyerine bu ön kültürden eşit yaş ağırlıkta hücre pelletiyle ekim yapılarak hücreler 120 saat 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Bakterilerin inokülasyonlarını takiben her 24 saatte bir 1 ml örnek alınmıştır. Daha sonra "LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits" kullanılarak, içeriğindeki SYTO 9 nükleik asit boyasını içeren bileşen A ve Propidium iodide (PI) nükleik asit boyasını içeren bileşen B eşit hacimde karıştırılarak bir boya karışımı elde edilmiştir. Bu boya karışımından örnek üzerine 3 µl eklenerek, karanlıkta 15 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde boyanan hücreler lam, lamel arasında konfokal mikroskopta incelenmiştir.

4.2.23. Transkripyonel Analiz

S. coelicolor+pRA*lon, S. coelicolor*+pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarına ait 200'er µl spor TSB besiyerinde 30 °C'ta iki gün boyunca büyütülmüştür. Elde edilen ön kültürlerden eşit miktarda yaş ağırlığa sahip hücre pelletleri alınarak TSB besiyerine inoküle edilmiştir. Bakterilerin inokülasyonlarını takiben 24., 36., 48., 60., 72., 96. saatlerde total RNA izolasyonu için 5'er ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler +4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra iki kez TE tamponu ile yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından hücre pelletleri sıvı azot ile muamele edilip daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'ta muhafaza edilmiştir.

RNA ekstraksiyonu için hücre pelletleri, TE çözeltisinde 75 µl lizozim ile yeniden süspanse edilerek, 37 °C'ta 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Toplam RNA izolasyonu üretici firmanın talimatlarına göre RNA İzolasyon Kiti (Macherey-Nagel, Almanya) ile küçük modifikasyonlarla yapılmıştır. Olası DNA kirliliği, Deoksiribonükleaz I (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak elimine edilmiştir. RNA numunelerinin DNA ile kontamine olup olmadığı, ters transkriptaz olmadan, Taq DNA polimeraz ve *hrd*B genine özgü primer çiftleriyle PCR reaksiyonları ile doğrulanmıştır (Tablo 4.5'te *hrd*B primer çifti). PCR bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da verilmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve OD 260/280 oranları ''NanoDrop Lite'' spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. RNA örnekleri ependorf tüplerine bölüştürülerek, daha sonra kullanılmak üzere -80 ° C'ye kaldırılmıştır.

Tablo 4.8: Taq DNA polimeraz PCR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	**Kullanılan Hacim**
10X Taq Tamponu	2.5 µl
25 mM $MgCl_2$	2 µl
dNTP karışımı	2.5 µl
Primer F (10 µM)	1.25 µl
Primer R (10 µM)	1.25 µl
Kalıp DNA	1 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	Son hacim 25 µl'ye tamamlanır.

Tablo 4.9: Taq DNA polimeraz reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Basamağı	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer bağlanma	60	30 saniye	40
Uzama	72	30 saniye	
Son uzama	72	3 dakika	1
Saklama	4	∞	

cDNA, 300 ng toplam RNA kullanılarak "iScript cDNA Synthesis Kit" (Bio-rad, ABD) ile sentezlenmiştir. Üreticinin önerilerine göre hazırlanan reaksiyon karışımları ilk önce 70 ° C'de 5 dakika inkübe edilmiş, ardından firkete oluşumunu ve primer dimer oluşumunu ortadan kaldırmak için buzda 2-3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. cDNA sentezi koşulları aşağıdaki gibidir:

- 5 dakika boyunca 25 ° C'de,
- 60 dakika boyunca 46 ° C'de ve
- 5 dakika boyunca 85 ° C'de inkübasyon.

Elde edilen cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarında *lon* geninin mRNA seviyeleri ölçülürken, kontrol olarak (housekeeping gen) *gyr*A genine özgü primerler kullanılmıştır (Tablo 4.5'te *gry*A primer çifti).

Kantitatif RT-PCR için StepOnePlus ™ Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Applied Biosystems) ve SYBR Green qPCR ana karışımı (Bio-rad Laboratories, ABD), 500 nM primer (her biri) ve 25 ng cDNA kullanılmıştır. Reaksiyon aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

- 98 ° C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonu
- 95 ° C'de 15 saniyelik 40 döngü ve
- 60 ° C'de 1 dakika

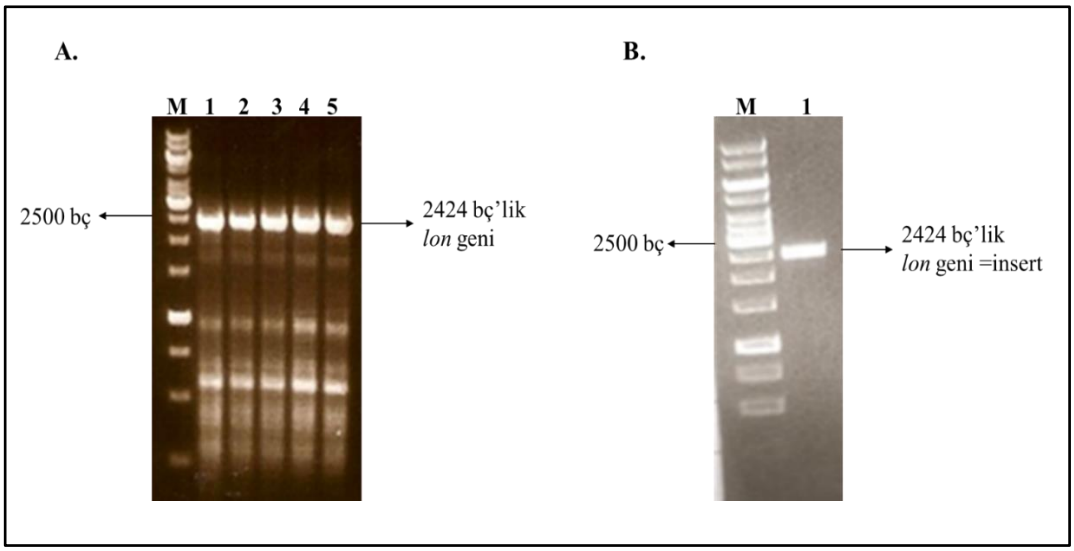
Her bir cDNA örneği bağımsız deneylerde üç kez ölçülmüştür. Transkripsiyonel analiz için kullanılan primerler, web tabanlı bir program olan primer 3 ile tasarlanmıştır (Tablo 4.5'te *lon*4 primer çifti). Gen ifadesindeki değişim $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır ve hata çubukları, üç bağımsız biyolojik kopyadan elde edilen standart sapmaları temsil etmektedir.

5. SONUÇLAR

5.1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin *E. coli*'de İfade Edilmesi

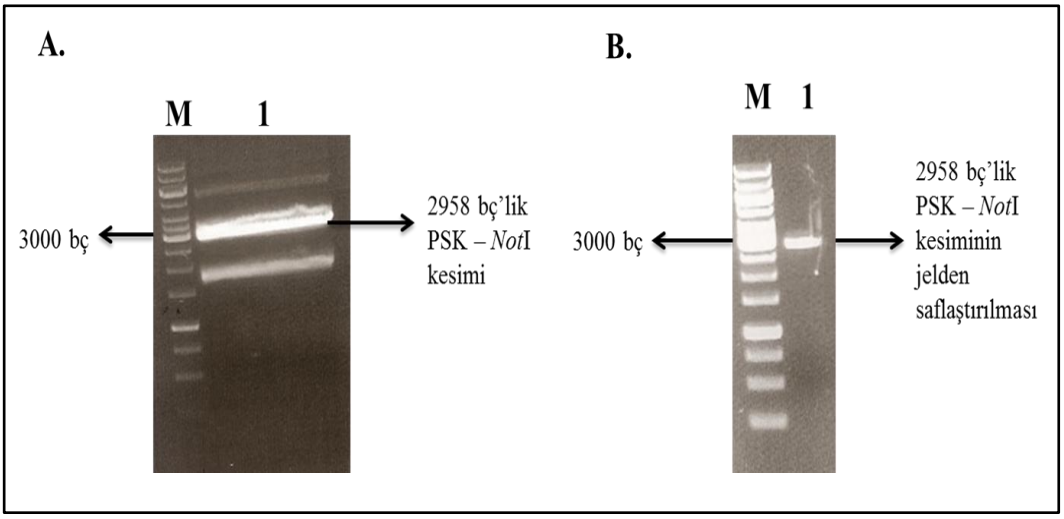
5.1.1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin *E. coli*'de İfade Edilmesi İçin Yapılan Klonlama Çalışmaları

lon genine ait 2424 bç'lik DNA fragmanı Q5 high fidelity polimeraz enzimiyle kurulan PCR ile çoğaltılmış (Şekil 5.1A) ve ligasyonda kullanılmak üzere jelden saflaştırılmıştır (Şekil 5.1B).



Şekil 5.1: 2424 bç'lik *lon* geninin PCR sonucu a) Farklı bağlanma sıcaklıklarında *lon* genine (2424 bç) ait PCR sonucu, b) PCR sonucunun jelden saflaştırılması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); a) 1: 60ºC; 2: 64 ºC; 3: 68 ºC; 4: 69 ºC; 5: 72 ºC primer bağlanma sıcaklıkları. b) 1: Lon proteaz genine ait 2424 bç'lik bandın jelden saflaştırılması.

pSK plazmiti *Not*I endonükleaz enzimi ile kesilerek jelden saflaştırılmış (Şekil 5.2), ardından yapışkan uçlar Klenow enzimiyle doldurulmuştur. pSK vektörü ve *lon* geni arasındaki ligasyon reaksiyonu, Bölüm 4.2.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır.

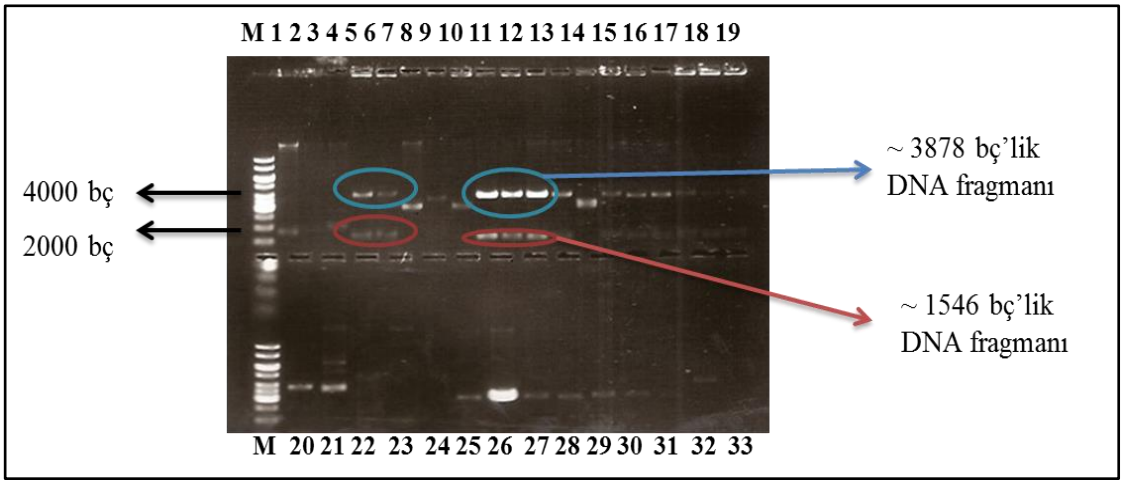


Şekil 5.2: a) pSK vektörünün *Not*I endonükleaz enzimi ile kesimi, b) pSK *Not*I fragmanının jelden saflaştırma sonucu. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); a) 1: pSK vektörünün *Not*I endonükleaz enzimi ile kesim sonucu. b) 1: pSK *Not*I fragmanının jelden saflaştırma sonucu.

Transformasyon sonuçları Xgal, IPTG ve ampisilin içeren besiyerlerine ekilmiş ve beyaz renkli 13 tane koloni seçilmiştir. Bu kolonilerden plazmidler izole edilerek *Bam*HI enzimiyle kesilmiş ve Lac promotorunun altına doğru yönlü yerleşmiş *lon* genini içeren rekombinant plazmidler tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Kullanılan enzimler ve kesimler sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri Tablo 5.1'de verilmiştir. Promotorun altına doğru yönlü yerlemiş *lon* genini içeren plazmidlerden (Şekil 5.3; 6, 7, 11, 12 ve 13. kuyulardaki plazmidler) bir tanesi DNA dizi analiziyle de doğrulanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmide bu çalışmada pSK*lon* (5424 bç) adı verilmiştir.

Tablo 5.1: *E. coli* transformatlarından elde edilen plazmitlerin, restriksiyon endonükleaz kesimleri sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.

Plazmit	pSK*lon* (5424 bç)	
Enzim	*Bam*HI	
Kesim Sonucunda	Doğru Yönlü	Ters yönlü
Beklenen DNA Fragman Büyüklükleri	1546 bç 3878 bç	878 bç 4546 bç

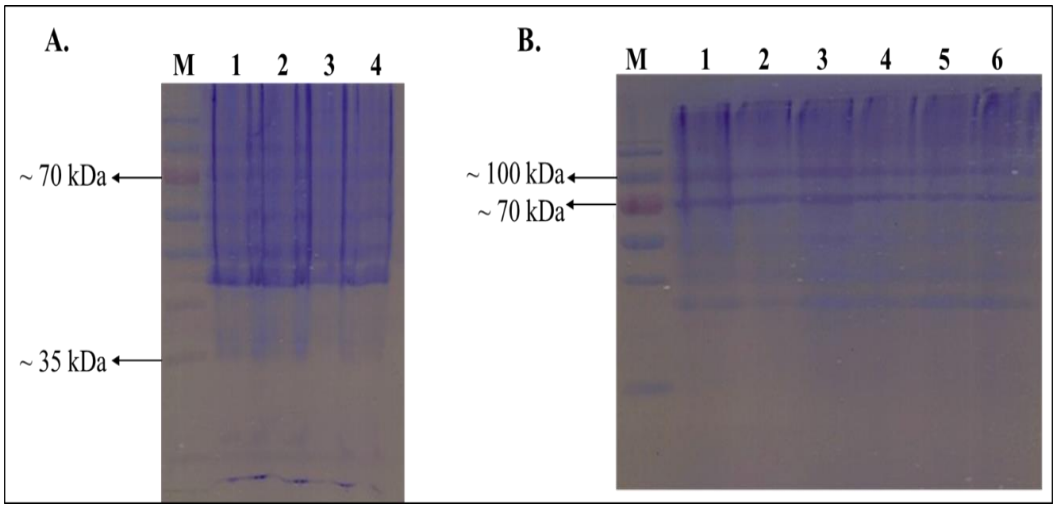


Şekil 5.3: pSK*lon* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1,2,3,4,5…..33: Olası pSK*lon* rekombinant plazmitlerinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesim sonucu.

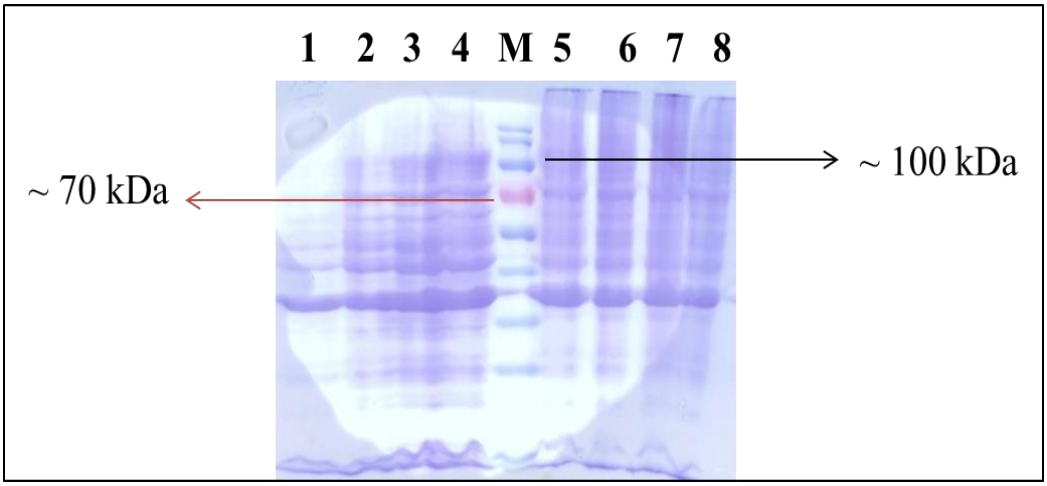
5.1.2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin Farklı *E. coli* Hücrelerinde İfade Edilmesi

pSK*lon* öncelikle *E. coli* Top 10 hücrelerine aktarılmıştır. Hücreler farklı IPTG konsantrasyonları varlığında büyütülmüş ve total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE jeline her bir örnekten 60 µg protein olacak şekilde yüklenmiş ancak yapılan farklı denemelerde Lon proteaza ait ~86 kDa'luk protein bandı jelde görülememiştir (Şekil 5.4).

E. coli Top 10 hücreleriyle *lon* geninin ekspresyonu görülemeyince, pSK*lon* plazmiti *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmış ve IPTG uyarımından sonra protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinler SDS-PAGE jeline hem eşit konsantrasyonda ve hem de eşit ağırlıktaki hücrelerden elde edilmiş proteinlerden eşit hacimde yüklenmiştir. Yapılan her denemede Lon proteaza ait protein bandı gözlenememiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.4: LB besiyerinde, farklı konsantrasyonlarda IPTG ile uyarılarak ve uyarılmadan üretilen pSK*lon* içeren *E. coli* hücrelerinin eşit konsantrasyondaki (60 µg) total protein üretimlerinin karşılaştırılması. M: Belirteç (Invitrogen), a) Rekombinant *E. coli* Top 10 hücreleri ile elde edilen sonuçlar: 1: 0.5 mM IPTG ile uyarılmış hücreler; 2: IPTG ile uyarılmamış hücreler; 5: 0.5 mM IPTG ile uyarılmış hücreler; 4: IPTG ile uyarılmamış hücreler. b) Rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri ile elde edilen sonuçlar: 1: IPTG ile uyarılmamış hücreler; 2,3,4: sırasıyla 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM IPTG ile uyarılmış hücreler; 5: IPTG ile uyarılmamış hücreler; 6,7,8: sırasıyla 0.5 mM,1 mM,1.5 mM IPTG ile uyarılmış BL21 pSK*lon* klonları (eşit miktardaki hücrenin patlatılmasıyla açığa çıkan protein).

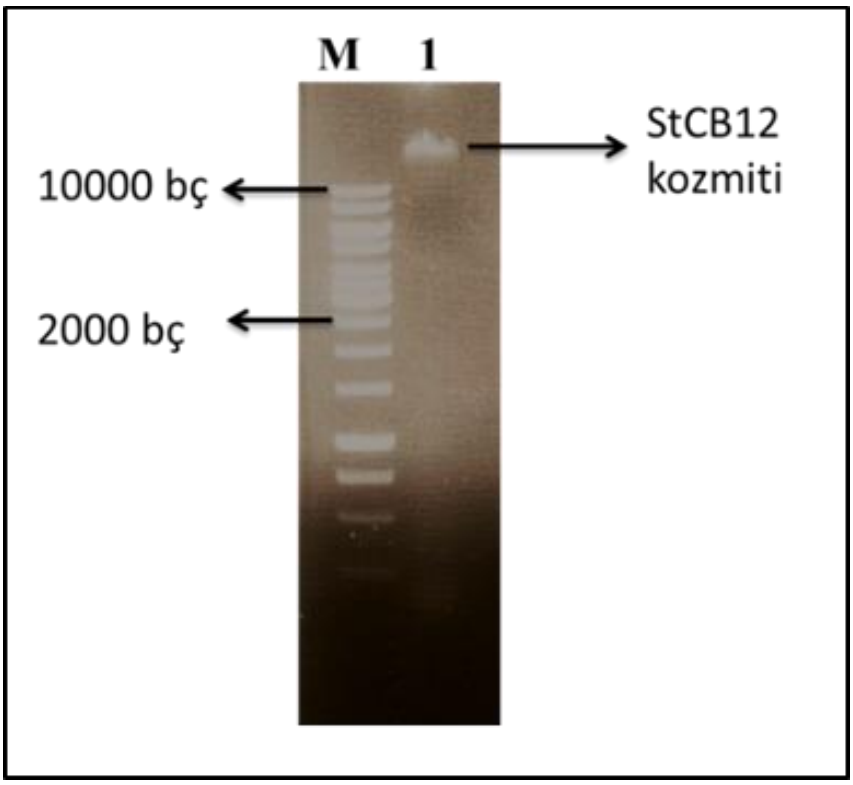


Şekil 5.5: LB besiyerinde, farklı konsantrasyonlarda IPTG ile uyarılarak ve uyarılmadan üretilen pSK*lon* plazmitini taşıyan *E. coli* BL21 hücrelerinin, eşit konsantrasyondaki (60 µg) total protein üretimlerinin ve eşit miktardaki hücrenin patlatılmasıyla açığa çıkan protein miktarlarının karşılaştırılması. M: Belirteç (Invitrogen), 1: IPTG ile uyarılmamış hücreler; 2,3,4: sırasıyla 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM IPTG ile uyarılmış hücreler (eşit konsantrasyonda total protein=60 µg); 5: IPTG ile uyarılmamış hücreler; 6,7,8: sırasıyla 0.5 mM,1 mM,1.5 mM IPTG ile uyarılmış hücreler (eşit miktardaki hücrenin patlatılmasıyla açığa çıkan protein).

5.2. Lon Proteazı Üretemeyen Mutant Suşun Oluşturulması

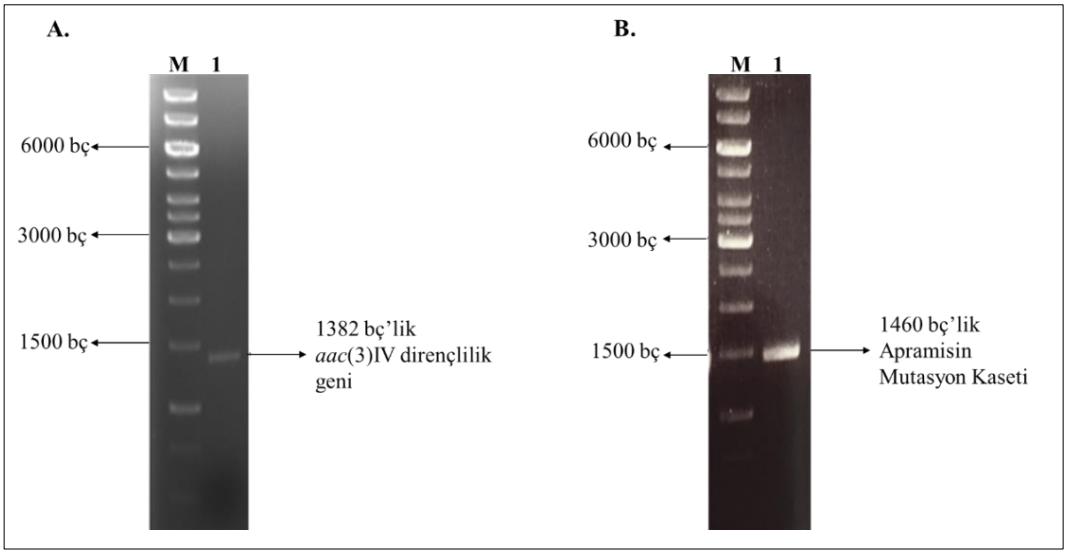
5.2.1. *S. coelicolor* A3(2) Genomundan *lon* Geninin λ/Red Rekombinasyon Yöntemiyle Silinmesi

Üzerinde Lon proteaz geni bulunan StCB12 kozmiti *E. coli* DH5α'dan izole edilerek (Şekil 5.6), *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır. Ampisilin ve kanamisine dirençli transformantlardan bir tanesi seçilmiş ve aşağıda nasıl hazırlandığı anlatılmış olan apramisin mutasyon kaseti ile transforme edilmiştir.



Şekil 5.6: StCB12 kozmit izolasyon sonucu. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); 1: StCB12 kozmit izolasyon sonucu (2 µl).

Mutasyon kasetinin hazırlanması için, PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan 1382 bç'lik apramisin dirençlilik geni, pIJ773 plazmidinden *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek jelden izole edilmiştir (Şekil 5.7A). Bu DNA fragmanının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1460 bç'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 5.7B).

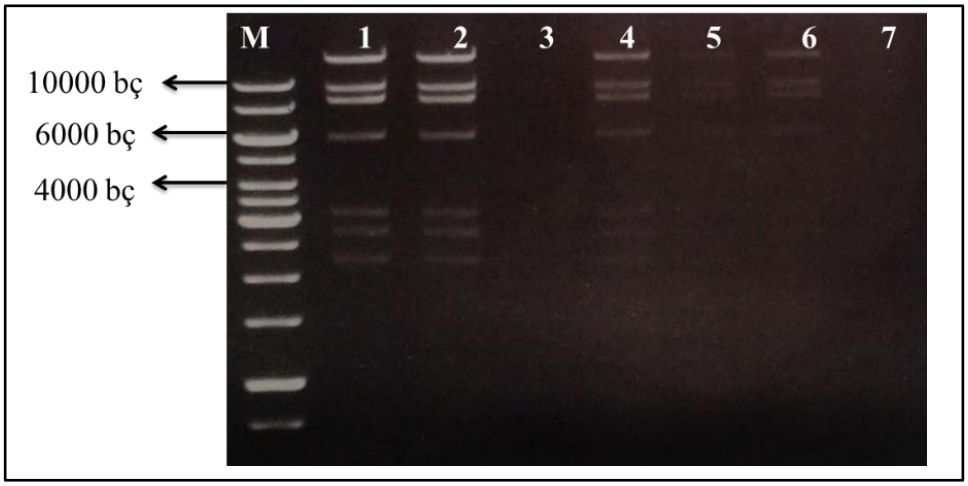


Şekil 5.7:Apramisin mutasyon kasetinin hazırlanması. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); a) 1: pIJ773 plazmidinin *Eco*RI-*Hind*III endonükleazlar ile kesilmesiyle elde edilen 1382 bç'lik apramisin direnç geninin agaroz jel görüntüsü; b) 1: PCR sonucu elde edilen 1460 bç'lik apramisin mutasyon kasetinin agaroz jelden saflaştırılması.

Apramisin mutasyon kaseti, *E. coli* BW25113/pIJ790+StCB12 hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış, antibiyotik direncine göre seçilmiş transformantlardan izole edilen mutant kozmitin doğrulanması için yapılan restriksiyon enzim kesimleri beklendiği gibi olmamıştır (Şekil 5.8), (Tablo 5.2).

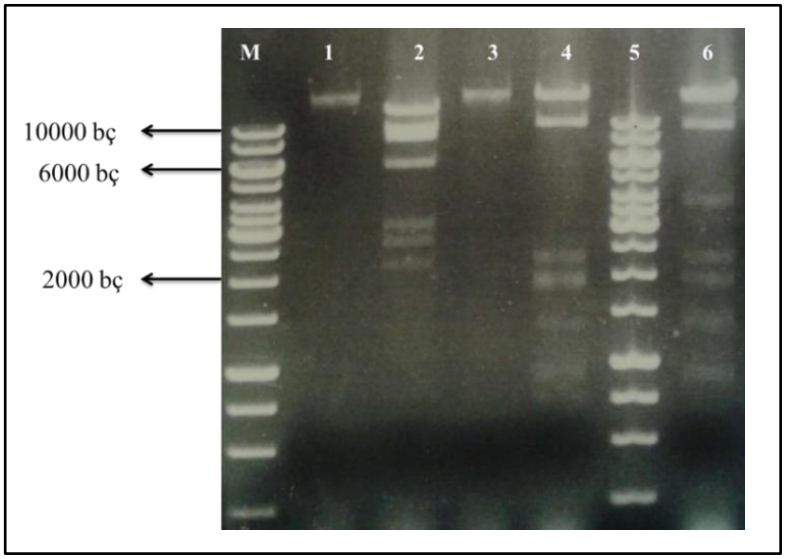
Tablo 5.2: Kozmit ve mutant kozmitin *Bam*HI enzim kesim sonucu beklenen bantlar.

Kozmit (StCB12)	**Mutant Kozmit (StCB12 *Δlon*)**
13277 bç	13277 bç
6388 bç	6388 bç
5571 bç	4704 bç
4132 bç	4132 bç
2569 bç	2569 bç
2098 bç	2098 bç
1713 bç	1713 bç
468 bç	468 bç
128 bç	128 bç

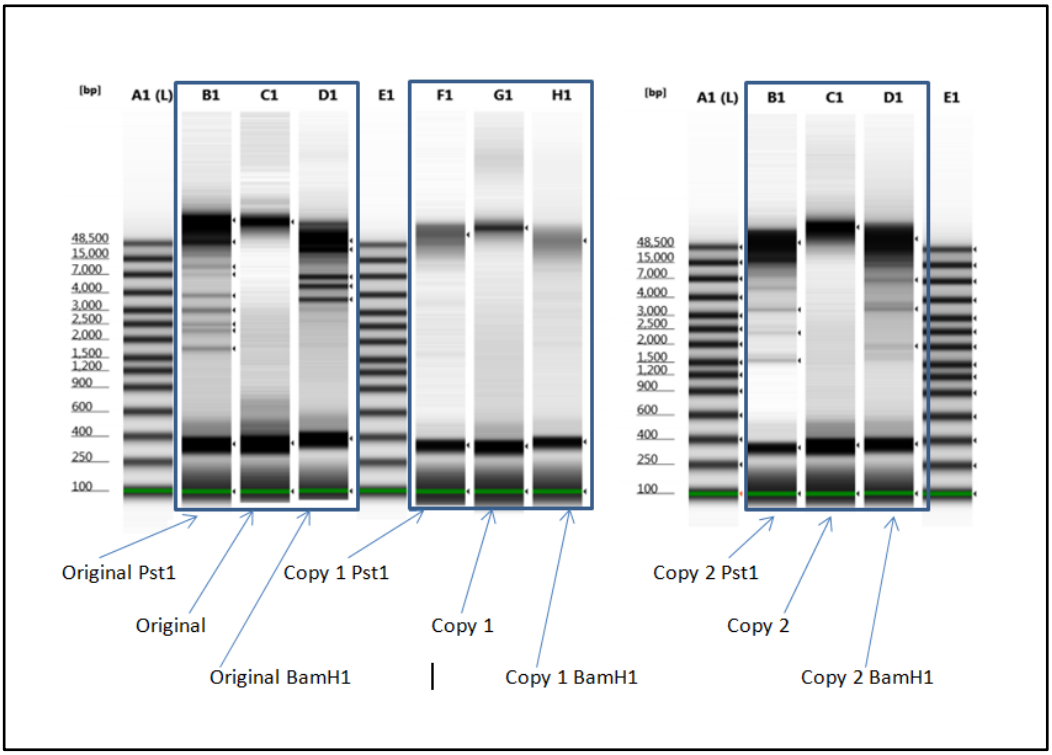


Şekil 5.8: Olası StCB12 Δ*lon* mutant kozmidin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1,2,3,4,5,6,7: Olası StCB12 Δ*lon* mtant kozmitin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesim sonucu.

Farklı enzimlerle (*Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI-*Pst*I, *Pst*I) kesimler tekrarlanmış (Şekil 5.9) ancak hiç birisiyle doğru bantlar gözlenmediği için Johnes Innes Center (JIC)'dan satın alınan kozmitin yanlış olduğu sonucuna varılmıştır. JIC ile StCB12 kozmiti için iletişime geçilmiş, ancak merkezin elindeki 3 kopya kozmit örneğinin de yanlış olması yüzünden (Şekil 5.10) *lon* genini taşıyan kozmit sağlanamamıştır.



Şekil 5.9: StCB12 kozmitinin *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI-*Pst*I, *Pst*I endonükleazlar ile kesim sonuçları. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: Kesilmemiş StCB12 kozmiti,2: StCB12 kozmitinin *Bam*HI kesim sonucu, 5: StCB12 kozmitinin *Kpn*I kesim sonucu, 4: StCB12 kozmitinin *Eco*RI-*Pst*I kesim sonucu, 5: M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); ,6: StCB12 kozmitinin *Pst*I kesim sonucu.

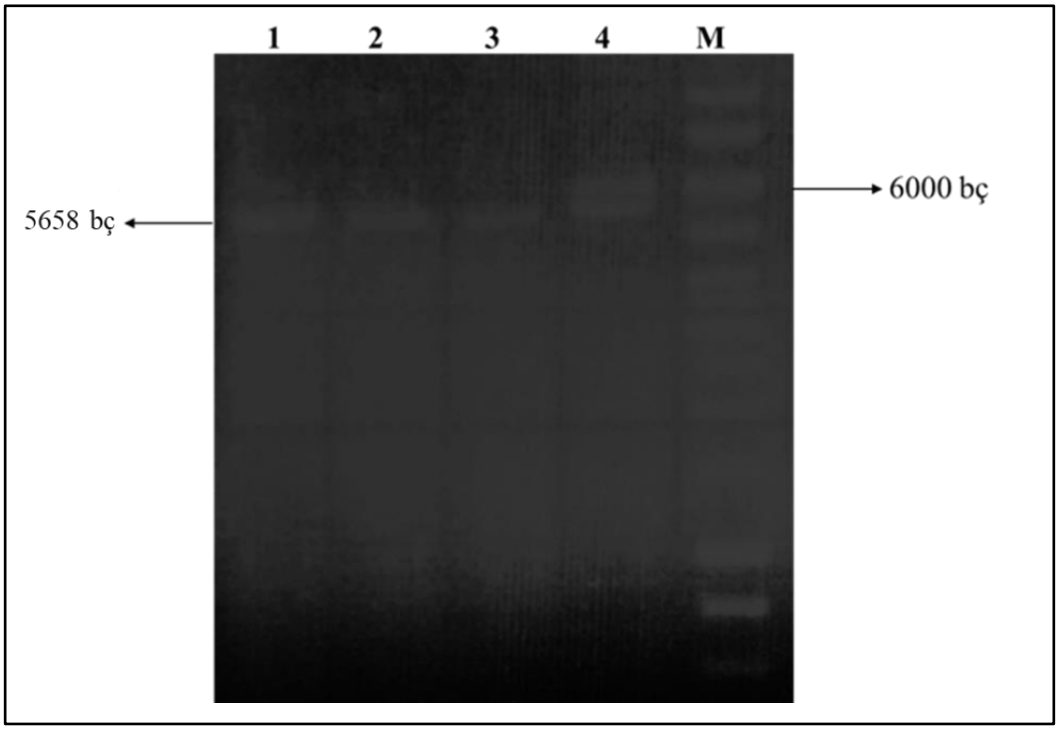


Şekil 5.10: StCB12 kozmitinin Johnes Innes Center tarafından *Bam*HI ve *Pst*I endonükleazlar ile kesim sonuçları.

5.2.2. *S. coelicolor* A3(2) Genomundan *lon* Geninin Kaset Mutagenez Yöntemiyle Silinmesi

5.2.2.1. Apramisin Mutasyon Kaseti ile Yapılan Çalışmalar

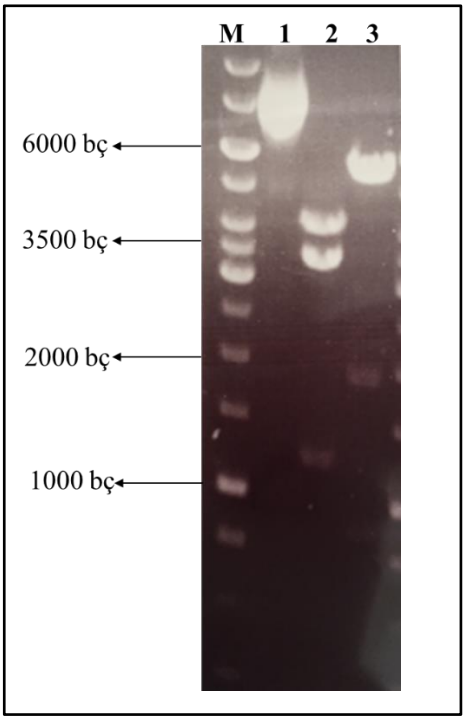
Lon proteaz enzimini üretemeyen *S. coelicolor* A3(2) mutant suşu oluşturmak için, kalıp olarak *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sının, ve *lon* 2 primerlerinin (Tablo 4.5) kullanıldığı PCR reaksiyonu Q5 High Fidelity polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde 5658 baz çiftlik *lon* geni ve bu gen bölgesinin ön ve arka kısmından yaklaşık 1500 bazlık bölge çoğaltılmıştır (Şekil 5.11). Bu DNA fragmanı pBluescript plazmidinin *EcoR*V bölgesine klonlanmış ve rekombinant plazmide pSK*lon* ismi verilmiştir. Rekombinant plazmidin doğruluğu restriksiyon enzim kesimiyle doğrulanmıştır (Şekil 5.12). Kullanılan enzimler ve kesimler sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri Tablo 5.3'te verilmiştir. Lon proteaz enzimini üretemeyen mutant suş oluşturmak için elde edilen bu rekombinant plazmit, Gust ve arkadaşlarının yönteminde [104] kozmit yerine kullanılmıştır.



Şekil 5.11: Farklı bağlanma sıcaklıklarında *lon* genini kodlama bölgesinin üst ve alt kısımlarıyla birlikte çoğaltan (5658 bç) PCR sonucu M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 60ºC; 2: 63 ºC; 3: 66 ºC; 4: 69 ºC primer bağlanma sıcaklıkları için PCR sonucu.

Tablo 5.3: Rekombinant pSK*lon* plazmitinin, *Bam*HI ve *Apa*I restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimleri sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.

Plazmit	pSK*lon*	
Enzim	*Bam*HI	*Apa*I
Kesim Sonucunda Beklenen DNA Fragmanı Büyüklükleri	5436 bç 1895 bç 829 bç 498 bç	4008 bç 2404 bç 1227 bç -



Şekil 5.12: pSK*lon* rekombinant plazmitinin *Apa*I ve *Bam*HI endonükleaz enzimleriyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: pSK*lon* plazmitinin restriksiyon endonüklaz enzimiyle kesilmemiş hali; 2: pSK*lon* plazmitinin *Apa*I endonükleaz enzimiyle kesim sonucu gözlenen 4008 bç, 3404 bç ve 1227 bç'lik bantlar; 3: pSK*lon* plazmitinin *Apa*I endonükleaz enzimiyle kesim sonucu gözlenen 5436 bç, 1895 bç, 498 bç ve 829 bç'lik bantlar.

Üzerinde Lon proteaz geni bulunan pSK plazmiti, *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır [104]. Sonuçta Ampisilin ve Kloramfenikole dirençli transformantlar elde edilmiştir.

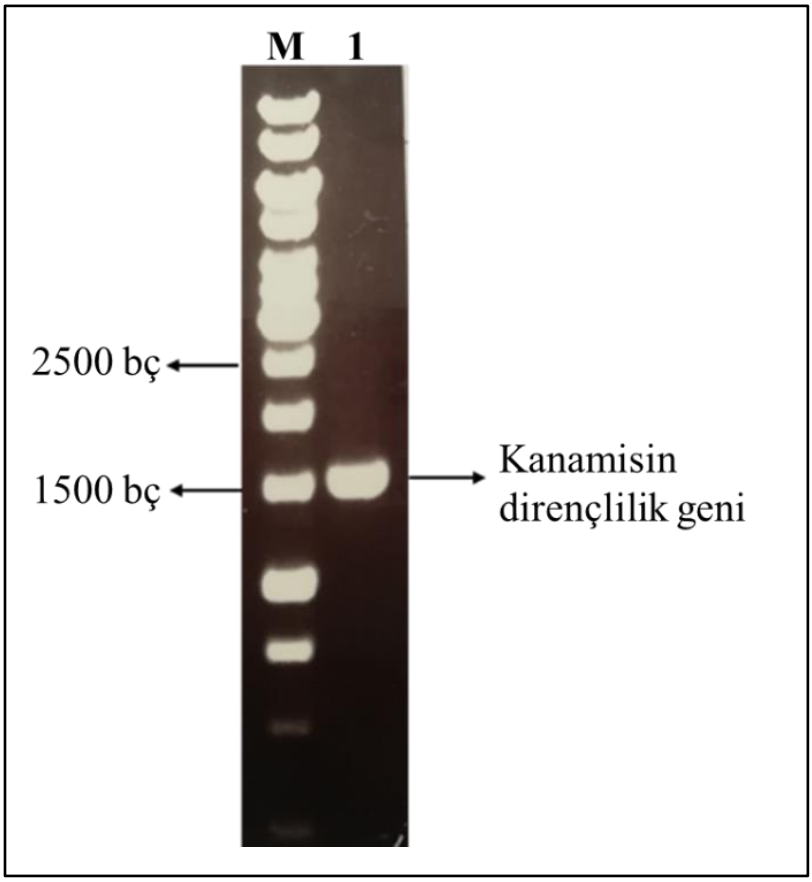
Apramisin mutasyon kaseti, *E. coli* BW25113/pIJ790+pSK*lon* hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır [104]. Elektroporasyon sonucunda ampisilin ve apramisinli ortamda büyüyen, 28 tane koloni seçilmiştir. Bu olası klonlar (*E. coli* BW25113/pIJ790+pSKΔ*lon)* restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri sonucunda doğrulanmışlardır.

Elde edilen pSKΔ*lon* rekombinant plazmiti konjugasyon ile S. *coelicolor* A3(2)'ye aktarıldığında çift yönlü rekombinasyon olayının gerçekleştiği olası mutant hücreleri, tek yönlü rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutantlardan ayırt edebilmek için, pSKΔ*lon* rekombinant plazmitine ikinci antibiyotik direnç geni aktarılmalıdır. Bu sebeple üzerinde kanamisin direnç geni bulunan pSK*Kn* plazmiti kalıp olarak kullanılarak, kanamisin direnç geni PCR'da elde edilmiştir (Şekil 5.13). Kanamisin direnç geninin pSKΔ*lon* plazmitine klonlanma çalışmaları her denemede

başarılı sonuç vermemiştir. Yapılan kontrollü deneyler sonucunda pSKΔ*lon* plazmiti üzerinde bulunan apramisin dirençlilik geninin kanamisin antibiyotiğine de dirençlilik sağladığı gösterilmiştir. Bunun üzerine *lon* mutasyonundan önce pSK*lon* plazmitine kanamisin dirençlilik geni klonlanmıştır. Olası pSK*lonKn* plazmitinin doğruluğu restriksiyon endonükleaz kesimi sonucunda ispatlanmıştır (Şekil 5.14). Kullanılan enzimler ve kesimler sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri

Tablo **5.4**'te verilmiştir.

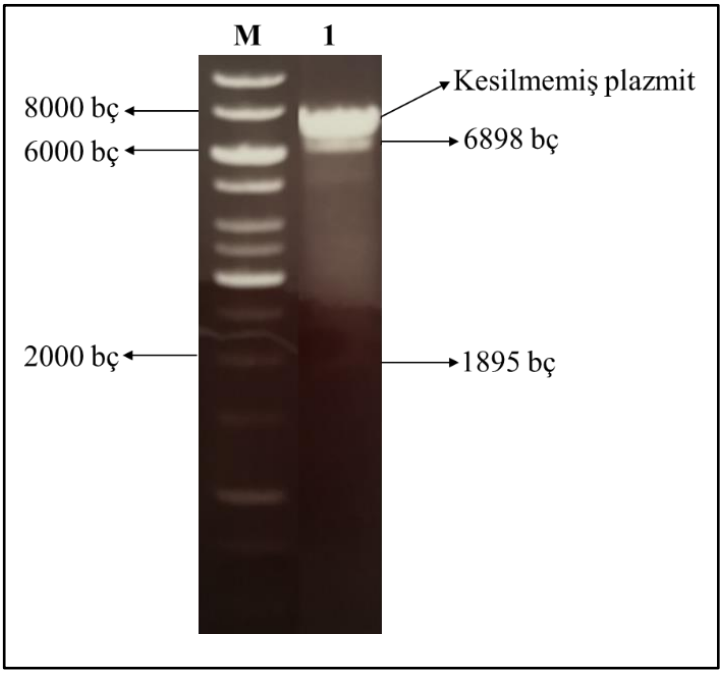
Elde edilen pSK*lonKn* plazmidi *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine aktarılmış, ardından bir tane transformant seçilerek apramisin mutasyon kaseti ile transforme edilmiştir. Defalarca tekrarlanan deneyler sonucunda ampisilin, kanamisin ve apramisinli ortamda tek koloni oluşturan hücreler yerine 16-24 saatlik inkübasyonun sonunda çoğu zaman tüm yüzeyi kaplayan bir üreme gözlenmiştir. Tek koloni elde edebilmek antibiyotik (apramisin) konsantrasyonu 2 kat, 4 kat ve 8 kat arttırılmış ancak sonuç alınamamıştır.



Şekil 5.13: PCR sonucunda elde edilen kanamisin direçlilik geni. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); 1: Kanamisin dirençlilik geni.

Tablo 5.4: pSK*lonKn* rekombinant plazmidinin, *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.

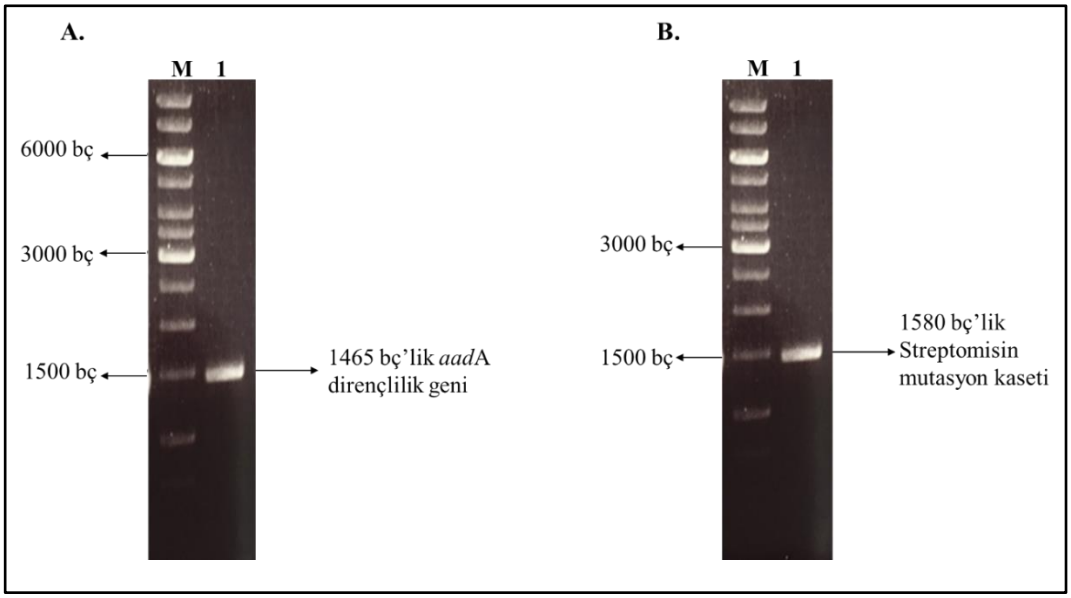
Plazmit	*pSKlonKn*
Enzim	*Bam*HI
Kesim Sonucunda Beklenen DNA Fragman Büyüklükleri	6898 bç 1895 bç 851 bç 498 bç



Şekil 5.14: pSK*lonKn* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: pSK*lonKn* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesim sonucu gözlenen 6898 bç, 1895 bç, 851 bç ve 498 bç'lik bantlar.

5.2.2.2. Streptomisin Mutasyon Kaseti ile Yapılan Çalışmalar

Streptomisin mutasyon kasetinin hazırlanması için, PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan 1465 bç'lik streptomisin dirençlilik geni, pIJ778 plazmitinden *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek jelden izole edilmiştir (Şekil 5.15A). Streptomisin dirençlilik geninin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1580 bç'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 5.15B).

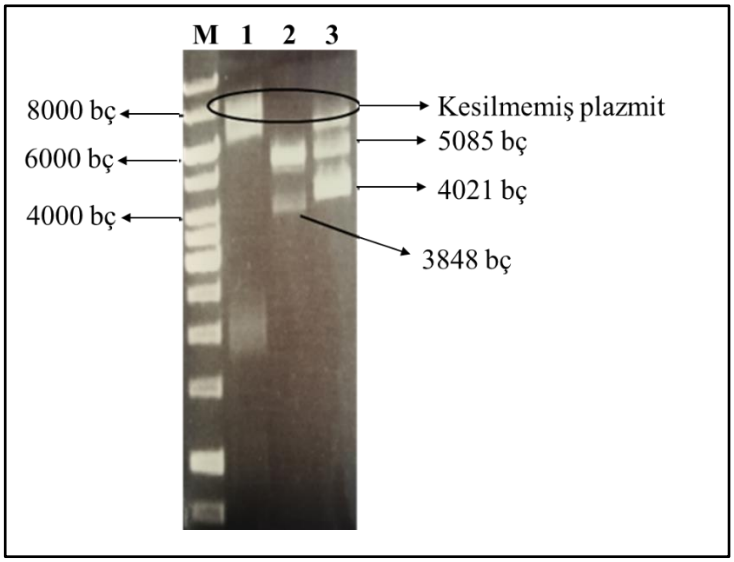


Şekil 5.15: Streptomisin mutasyon kasetinin hazırlanması. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); a) 1: pIJ778 plazmidinin *Eco*RI-*Hind*III endonükleazlar ile kesilmesiyle elde edilen 1465 bç'lik streptomisin dirençlilik geninin agaroz jel görüntüsü; b) 1: PCR sonucu elde edilen 1580 bç'lik streptomisin mutasyon kasetinin agaroz jelden saflaştırılması.

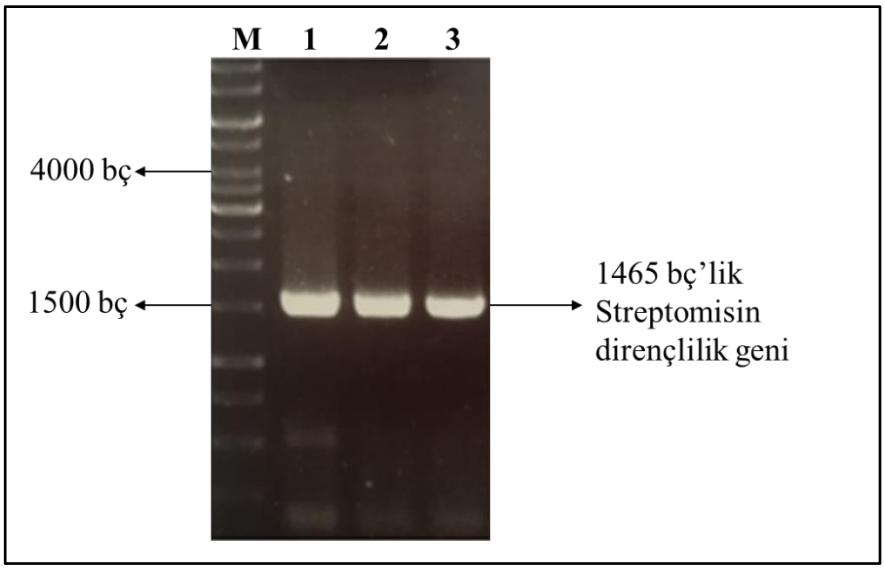
Streptomisin mutasyon kaseti, *E. coli* BW25113/pIJ790+pSK*lonKn* hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır [104]. Elektroporasyon sonucunda ampisilin, kanamisin ve streptomisinli ortamda sadece 4 tane olası *E. coli* BW25113/pIJ790+pSKΔ*lonKn* klonu elde edilmiştir. Bu olası klonlardan izole edilen olası pSKΔ*lonKn* plazmiti restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek (Şekil 5.16) ve PCR ile (Şekil 5.17) doğrulanmıştır. Kullanılan enzimler ve kesimler sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri Tablo 5.5'te verilmiştir.

Tablo 5.5: pSK*ΔlonKn* plazmitinin, *Bam*HI, *Eco*RI ve *Not*I restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimleri sonucunda beklenen DNA fragman büyüklükleri.

Plazmit	pSKΔ*lonKn* (9106 bç)		
Enzim	*Bam*HI	*Eco*RI	*Not*I
Kesim Sonucunda Beklenen DNA fragman büyüklükleri	7351 bç 851 bç 498 bç 376 bç	5285 bç 3848 bç	5085 bç 4021 bç



Şekil 5.16: pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin sırasıyla *Bam*HI, *Eco*RI ve *Not*I endonükleaz enzimleriyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin *Bam*HI endonükleaz enzimiyle kesim sonucu; 2: pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin *Eco*RI endonükleaz enzimiyle kesim sonucu; 5: pSKΔ*lonKn* rekombinant plazmitinin *Not*I endonükleaz enzimiyle kesim sonucu.



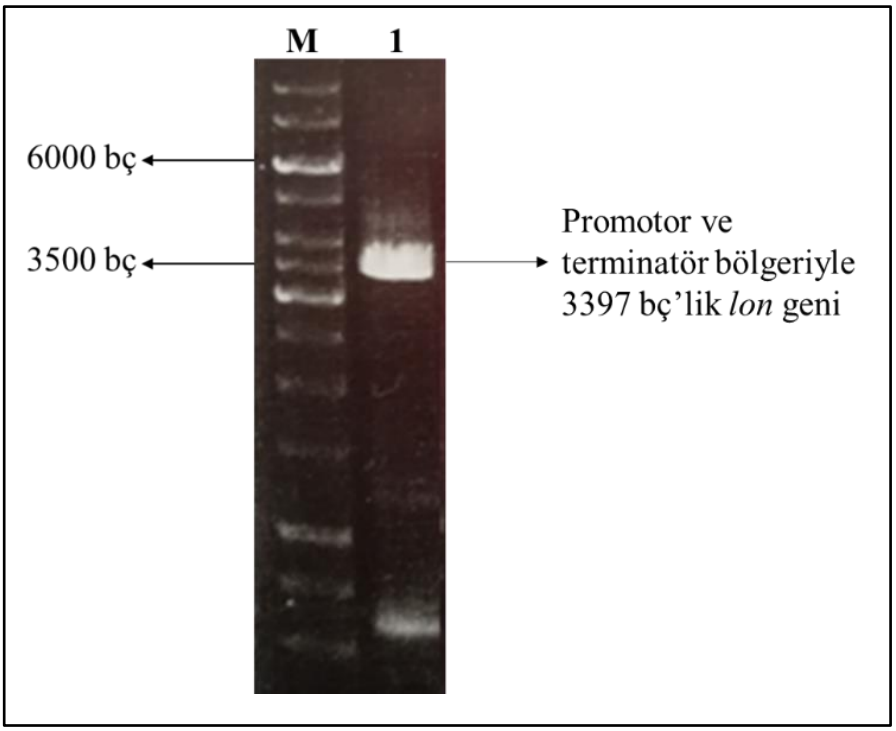
Şekil 5.17: Olası pSKΔ*lonKn* plazmitinin Streptomisin primerleriyle çoğaltılarak PCR ile doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 60 °C; 2: 62 °C; 3: 65 °C primer bağlanma sıcaklıkları için PCR sonucu.

Elde edilen pSKΔ*lonKn* plazmiti, *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri aracılığıyla *S. coelicolor* A3(2)'ye konjugasyon ile transfer edilmiştir. Farklı antibiyotik konsantrasyonları ve farklı besiyerleri kullanılmış, sonunda R2YE

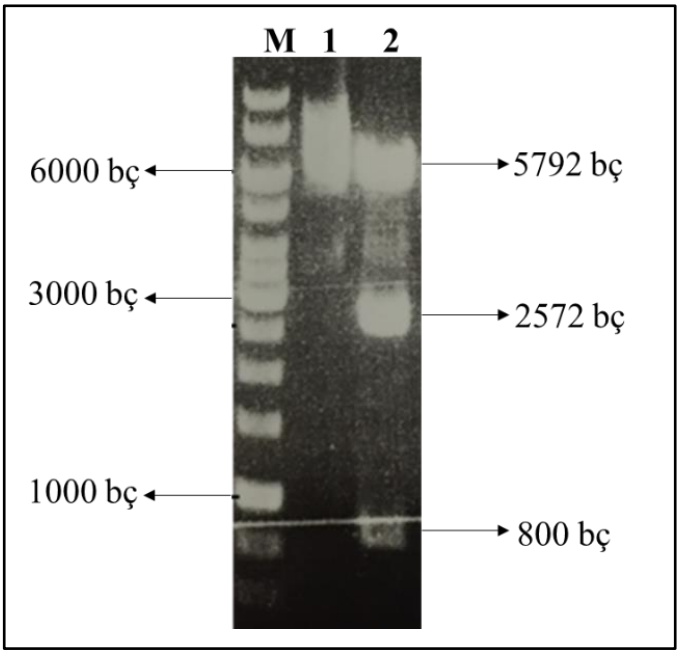
besiyerinde 10-15 günde zorlukla büyüyen, çok küçük, streptomisine dirençli, kanamisine duyarlı 5 tane olası mutant koloni elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar için bu hücreler kültürlenememiştir.

5.3. Lon Proteazı Normalden Fazla Üreten Mutant Suşun Oluşturulması

Ekstra bir kopya *lon* geni taşıyan *S. coelicolor* A3(2) suşunu oluşturmak için kalıp olarak *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sı, Q5 High Fidelity polimeraz enzimi ve *lon* 3 primerleri (Tablo 4.5) ile PCR yapılmış ve 3397 baz çiftlik *lon* geni, promotor ve terminator bölgeleri dahil olacak şekilde çoğaltılmış ve jelden saflaştırılmıştır (Şekil 5.18). Bu DNA fragmanı integratif bir vektör olan pRA plazmitinin *Eco*RV bölgesine *E. coli* DH5α'da klonlanmıştır. pRA*lon* adı verilen rekombinant vektör *Pst*I ile kesilmiş, beklenen DNA fragmanları (Tablo 5.6) elde edilerek doğrulanmıştır (Şekil 5.19).



Şekil 5.18: Promotor ve terminator bölgeleri içinde olacak şekilde PCR ile çoğaltılan *lon* genine ait 3397 bç bantın jelden saflaştırılması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: *lon* geninin promotor ve terminator bölgelerini içine alan bölgeye ait 3397 bç bantın jelden saflaştırılma sonucu (2µl).



Şekil 5.19: pRA*lon* rekombinant plazmitinin *Pst*I endonükleaz enzimiyle kesilerek doğrulanması. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: Kesilmemiş pRA plazmiti; 2: pRA*lon* rekombinant plazmitinin *Pst*I endonükleaz enzimiyle kesim sonucu.

Tablo 5.6: pRA*lon* plazmitinin, *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesimi sonucunda beklenen DNA fragmanı büyüklükleri.

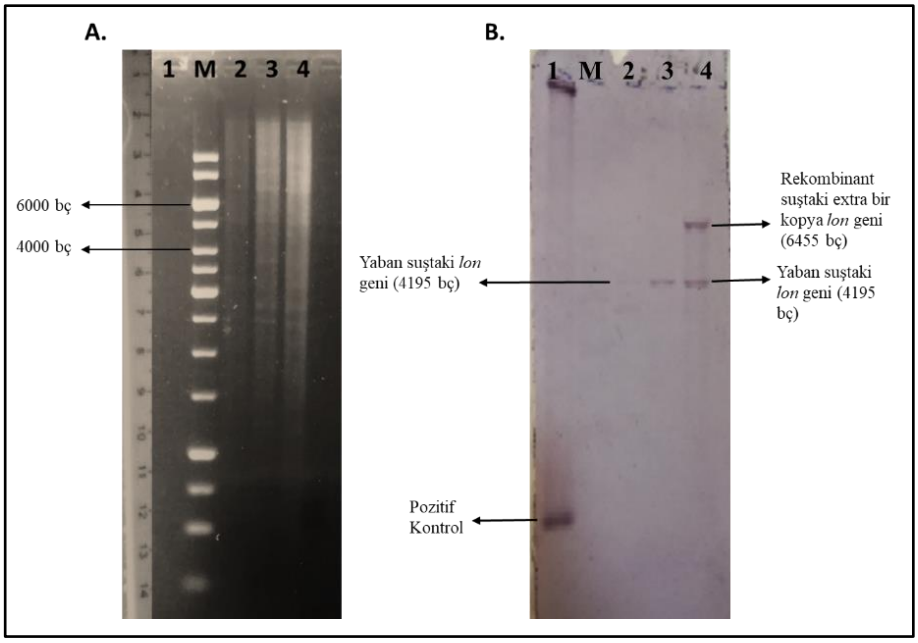
Plazmit	pRA*lon* (9166 bç)
Enzim	*Pst*I
Kesim Sonucunda Beklenen DNA Fragman Büyüklükleri	5792 bç 2572 bç 802 bç

pRA*lon* plazmiti *E. coli* ET12567/pUZ8002 aracılığıyla konjugasyon ile *S. coelicolor* A3(2) hücrelerine aktarılmıştır. Konjugasyon sonucunda apramisinli ortamda büyüyebilen pRA*lon* plazmitini taşıyan olası rekombinant *S. coelicolor*+pRA*lon* (Sco-pRA*lon*) kolonileri seçilmiştir. Ayrıca boş pRA plazmiti de *E. coli* ET12567/pUZ8002 aracılığıyla konjugasyon ile *S. coelicolor* A3(2) hücrelerine aktarılarak *S. coelicolor*+pRA (Sco-pRA) rekombinant hücreleri elde edilmiştir.

5.3.1. *lon* geninin *S. coelicolor* A3(2) Genomuna Entegrasyonunun Southern Hibridizasyon ile İspatlanması

Yaban tip *S. coelicolor* A3(2), rekombinant Sco-pRA *ve* Sco-pRA*lon* suşlarından kromozomal DNA izolasyonu yapılarak, DNA'lar *lon* genini tespit etmek için *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmişlerdir (Şekil 5.20A).

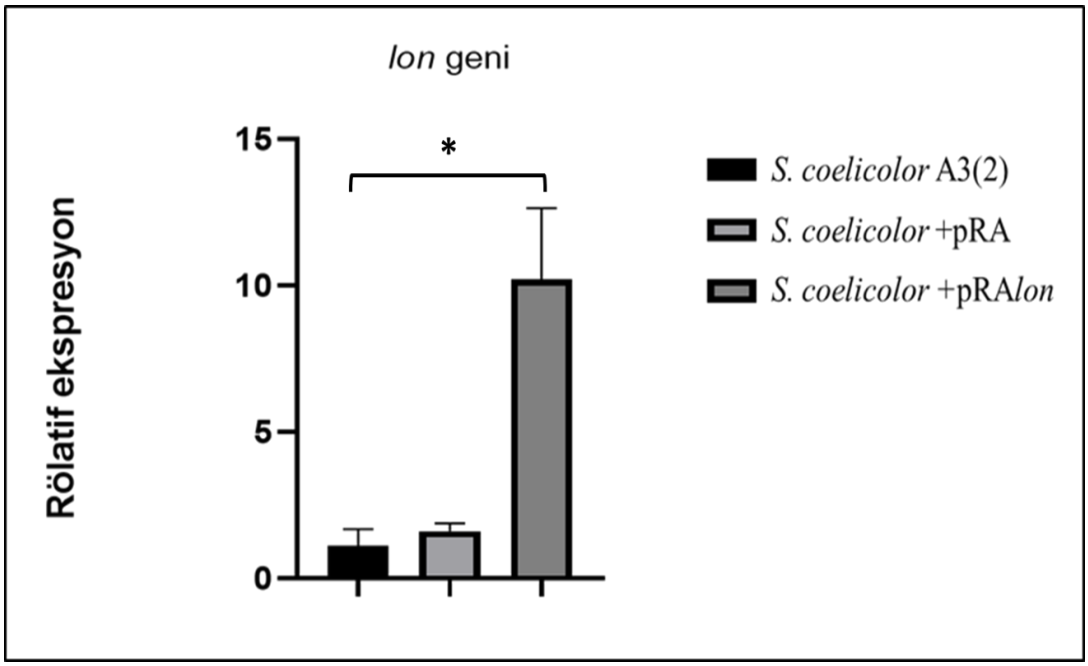
*Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş kromozomal DNA'ların *lon* probu ile hibridizasyonu sonucunda, tüm suşlarda *lon* genini içinde bulunduran 4195 bç'lik DNA bandı gözlenirken, ekstra bir kopya *lon* genini taşıyan Sco-pRA*lon* rekombinant suşunda ekstra *lon* genini içinde bulunduran 6455 bç'lik DNA bandı gözlenmektedir (Şekil 5.20B).



Şekil 5.20: *S. coelicolor* A3(2)'de ekstra bir kopya *lon* geninin varlığının Southern Blot ile ispatlanması. a) Red Safe ile boyanmış agaroz jel görüntüsü.1: 1141bç'lik prop olarak kullanılan *lon* gen parçası (pozitif kontrol); 2: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü; 3: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş rekombinant Sco-pRA suşunun kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü; 4: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş rekombinant Sco-pRA*lon* suşunun kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron). b) *lon* geninin prob olarak kullanıldığı Southern Blot sonucu. 1: 1141bç'lik *lon* gen parçası (pozitif kontrol); 2: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sı; 3: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş rekombinant Sco-pRA suşunun kromozomal DNA'sı , 4: *Eco*RI- *Sph*I ile kesilmiş rekombinant Sco-pRA*lon* suşunun kromozomal DNA'sı; M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron).

5.3.2. Sco-pRA*lon* Rekombinant Suşunda *lon* Geninin Transkripsiyonel Analizi

Sco-pRA*lon,* Sco-pRA ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının TSB besiyerine inokülasyonlarının 48. saatinde alınan örneklerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'larda genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek amacıyla *hrd*B genine özgü primerler ile RNA PCR yapılarak DNA kontaminasyonu olmadığı gösterilmiştir. Daha sonra bu RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'lar ile RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda her bir örnek için elde edilen Cp (Crossing point) değerlerinin ortalaması kullanılmıştır. Daha sonra örneklere rölatif kantifikasyon analizi uygulanmış ve aynı grup örneklerde *gyrA* cDNA'sı miktarı ile *lon* miktarı $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile karşılaştırılmıştır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri projede üzerinde durduğumuz gen ekspresyonu oranlarını anlamamızı sağlamıştır. Şekil 5.21'de *lon* geni için elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Yapılan istatistik çalışmalarının sonuçlarına göre 48. saatte, Sco-pRA*lon* suşunda yaban suşa göre *lon* geninin ekspresyonu 10 kat artmıştır. Elde edilen bu sonuç, rekombinant suşta *lon*'un fazla ifade edildiğini transkripsiyonel düzeyde göstermektedir.

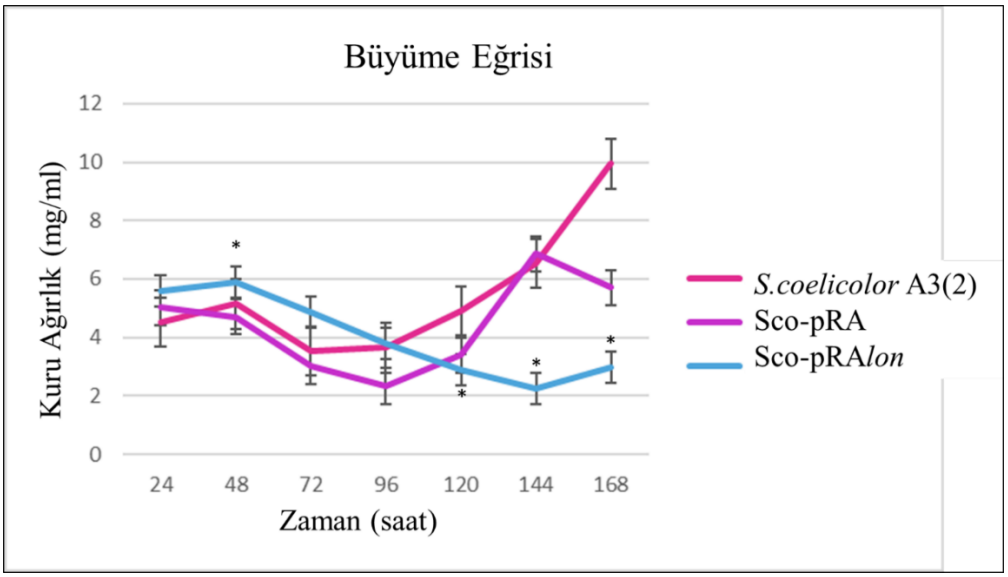


Şekil 5.21: 48. saatte *lon* ekspresyon düzeyleri (* p<0,05)

5.3.3. Sco-pRA*lon* Rekombinant SuşundaAktinorhodin ve Undesilprodigiosin Antibiyotiklerinin Ölçümü

Sco-pRA*lon ve* Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşları ile 168 saatlik bir fermentasyon yapılarak, undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotikleri Keiser ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüştür [78].

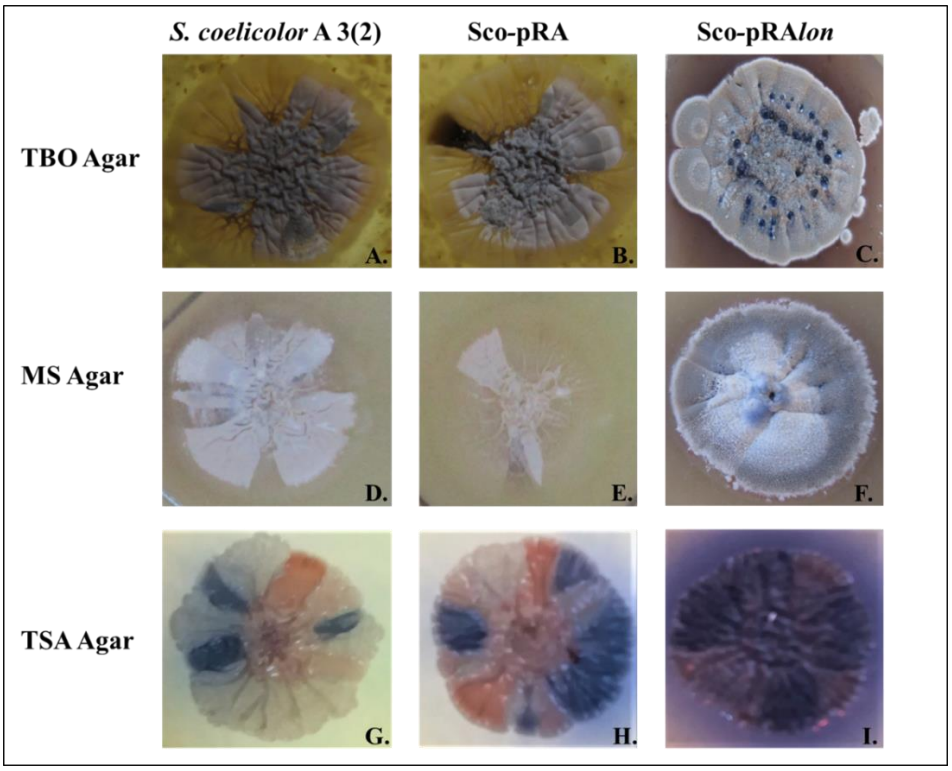
Fermantasyon boyunca yaban tip ve mutant suşun üremeleri de karşılaştırılmış ve 96. saate kadar mutant suşun aynı koşullarda yaban suşa göre biraz daha iyi ürediği ancak 96. saatten sonra yaban suşun mutant suştan daha iyi ürediği gözlenmiştir (Şekil 5.22).



Şekil 5.22: Sco-pRA*lon ve* Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının kuru ağırlıklarının karşılaştırılması. Dikey çubuklar, ortalama değerden standart sapmayı göstermektedir. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir. T-TEST'ine göre (Microsoft Office Excel), bir yıldız işareti (*) p <0.05'i, çift yıldız işareti (**) ise p <0.005'i ifade etmektedir. Sonuçlar altı bağımsız deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

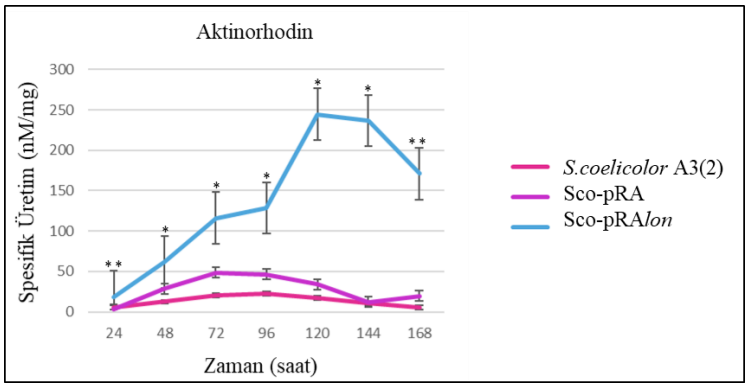
Ayrıca Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşunun TBO, MS ve TSA gibi farklı besiyerlerinde üreme sporlanma ve antibiyotik üretme durumu karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda Sco-pRA*lon* rekombinant suşun tüm besiyerlerinde, kontrol olarak kullanılan boş pRA plazmitini taşıyan rekombinant suş (Sco-pRA) ve yaban suşa göre çok daha fazla antibiyotik ürettiği gözlenmektedir. Sporlanmayı teşvik eden TBO besiyerinde yaban suş ve

Sco-pRA rekombinant suşu benzer şekilde sporlanırken (Şekil 5.23A ve B), Sco-pRA*lon* rekombinant suşunun çok daha fazla sporlandığı ve fazla miktarda ürettiği mavi renkli aktinorhodin antibiyotiğini kesecikler içinde dışarıya saldığı Şekil 5.23C'de gösterilmektedir. MS agarda ise yaban suş ve Sco-pRA*lon* rekombinant suşun sporlanarak büyüdüğü ve rekombinant suşun yine mavi renkli antibiyotik ürettiği gösterilmektedir (Şekil 5.23D ve F). Sco-pRA kontrol suşu ise MS agarda nispeten çok daha az sporlanmış ve antibiyotik üretmemiştir (Şekil 5.23E). Son olarak TSA besiyerinde yaban suş ve kontrol suş benzer şekilde üreyip, mavi ve kırmızı renkli antibiyotikleri ürettikleri kaydedilmiştir (Şekil 5.23G ve H). Yaban ve kontrol suşuna oranla koloninin çevresinde oluşturduğu koyu mavi renk göz önünde bulundurulduğunda Sco-pRA*lon* rekombinant suşunun daha fazla antibiyotik ürettiği öngörülmüştür (Şekil 5.23I).



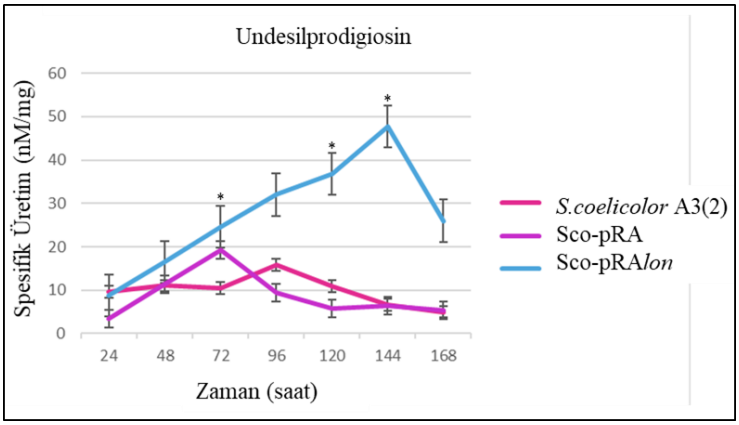
Şekil 5.23: Sco-pRA*lon* rekombinant suşu, Sco-pRA kontrol suşu ve yaban suş *S. coelicolor* A3(2)'nin TBO, MS ve TSA besiyerlerindeki üremelerinin karşılaştırılması.A., B. ve C.: TBO agarda sırasıyla yaban tip *S. coelicolor* A3(2), Sco-pRA ve Sco-pRA*lon*; D., E. ve F.: MS agarda sırasıyla yaban tip *S. coelicolor* A3(2), Sco-pRA ve Sco-pRA*lon*; G., H. ve I.: TSA agarda sırasıyla yaban tip *S. coelicolor* A3(2), Sco-pRA ve Sco-pRA*lon* suşlarının inkübasyonun 168. saatindeki petri fotoğraflarını temsil etmektedir.

Antibiyotik ölçüm sonuçlarına göre Sco-pRA rekombinant suşu ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşu birbirlerine yakın miktarlarda aktinorhodin üretirken, Sco-pRA*lon* rekombinant suşun aktinorhodin üretiminin yaban suşuna göre, 168. saatte yaklaşık 34 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 5.24).



Şekil 5.24: Sco-pRA*lon ve* Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının aktinorhodin üretimlerinin karşılaştırılması. Dikey çubuklar, ortalama değerden standart sapmayı göstermektedir. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir. T-TEST'ine göre (Microsoft Office Excel), bir yıldız işareti (*) p <0.05'i, çift yıldız işareti (**) ise p <0.005'i ifade etmektedir. Sonuçlar altı bağımsız deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

Undesilprodigiosin üretimleri karşılaştırıldığında ise 168. saatte Sco-pRA*lon* rekombinant suşun, yaban suşa göre yaklaşık 9 kat daha fazla antibiyotik ürettiği gözlenmiştir (Şekil 5.25).



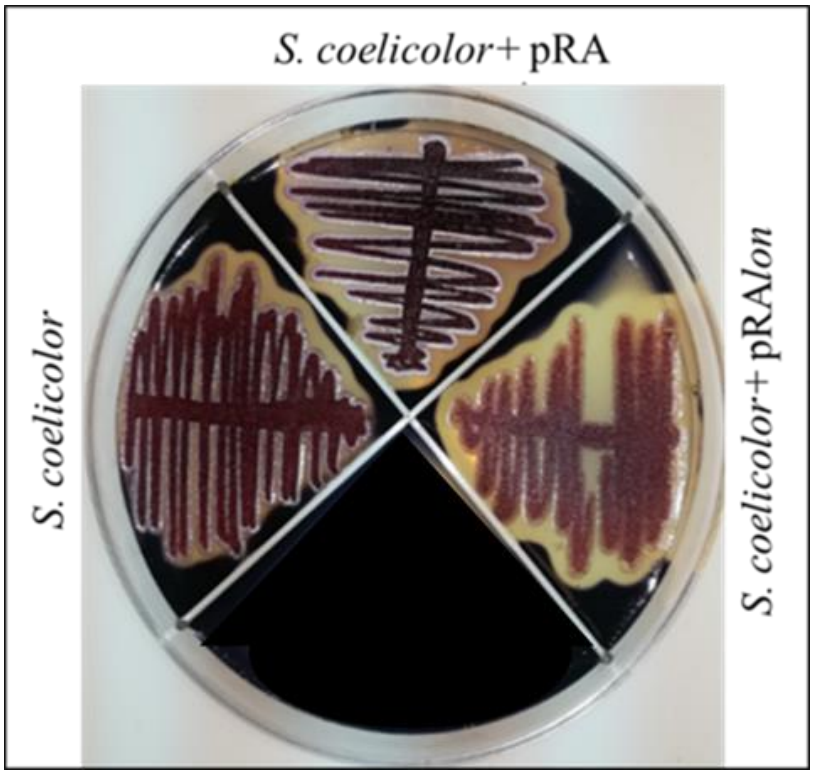
Şekil 5.25: Sco-pRA*lon ve* Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarının undesilprodigiosin üretimlerinin karşılaştırılması. Dikey çubuklar, ortalama değerden standart sapmayı göstermektedir. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir. T-TEST'ine göre (Microsoft Office Excel), bir yıldız işareti (*) p <0.05'i, çift yıldız işareti (**) ise p <0.005'i ifade etmektedir. Sonuçlar altı bağımsız deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

5.3.4. Sco-pRA*lon* Rekombinant Suşunda α-Amilaz Üretimi

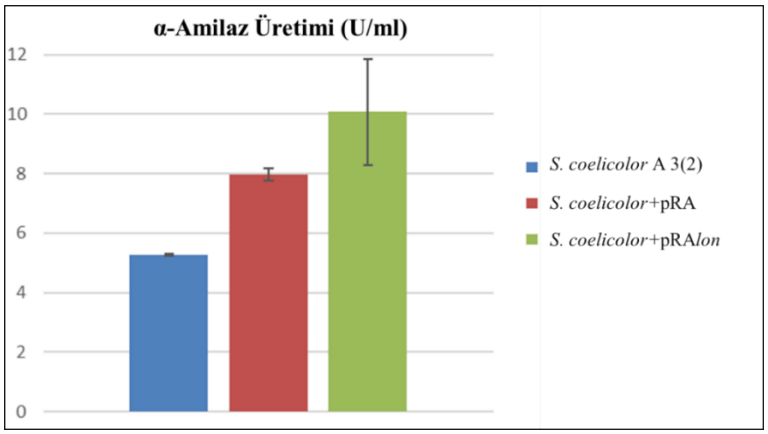
Ekstra bir kopya *lon* geninin birincil metabolizma üzerindeki etkisini belirlemek için, *S. coelicolor*+pRA*lon* ve *S. coelicolor*+pRA rekombinant suşları ile yaban suşta birincil metabolizma ürünü olan α-amilaz enziminin üretimi karşılaştırılmıştır.

Öncelikle *S. coelicolor*+pRA*lon* ve *S. coelicolor*+pRA rekombinant suşları ile yaban suştaki amilaz enziminin varlığı, enzimin nişastayı hidrolizasyonu sonucunda, lügol ayıracının damlatılmasının ardından koloni etrafında renksiz bir halkanın oluşmasıyla gözlenmiştir (Şekil 5.26).

Daha sonra Mieller ve arkadaşlarının metodu ile α-amilaz üretimi hesaplanmıştır [110]. Sonuçta bir birincil metabolizma ürünü olan amilaz enziminin aktivitesinin, yaban suşa göre rekombinant suşta 2 kat arttığı bulunmuştur (Şekil 5.27)



Şekil 5.26: Sco-pRA*lon* ve Sco-pRA rekombinant suşları ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) suşlarındaki amilaz enziminin varlığının nisaştalı besiyerinde gösterilmesi.



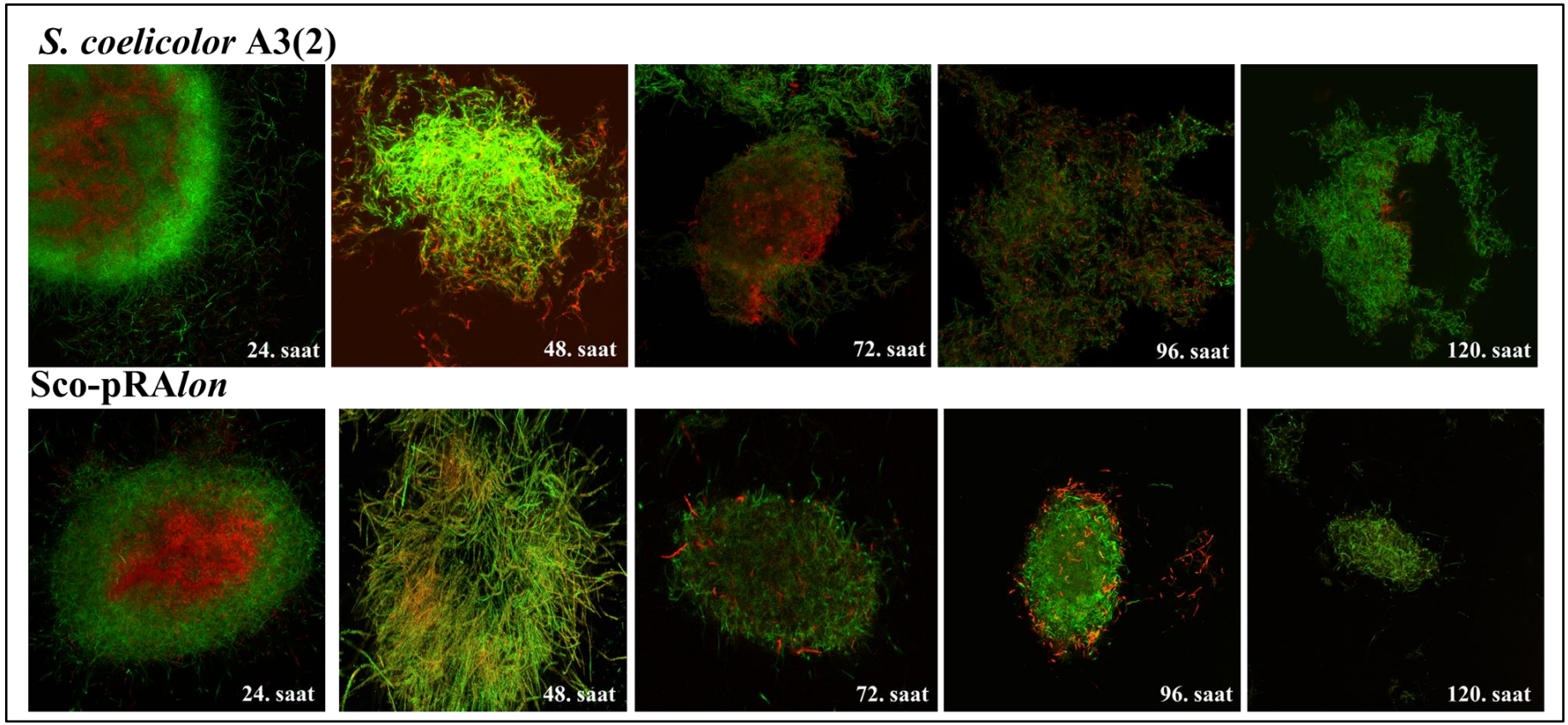
Şekil 5.27: Sco-pRA*lon*, Sco-pRA ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2)'ın amilaz aktivitelerinin (U/ml) karşılaştırılması.

5.3.5. Sco-pRA*lon* Rekombinant Suşun Konfokal Mikroskopta Görüntülenmesi

120 saatlik fermentasyon boyunca her 24 saatte Sco-pRA*lon* rekombinant suş ve yaban suştan alınan örnekler, konfokal mikroskobu altında incelenmiştir. Ölü hücreler kırmızı renkli gözlenirken, canlı hücreler yeşil renkli gözlenmektedir.

İlk 8 saatte oluştuğu bilinen nükleotidleri ayıran bölümlenmiş birincil misellerin 24. saatten itibaren radyal bir şekilde büyümeye başlayıp merkezden dışarı doğru ölmeye başlayan koloniler oluşturduğu rekombinant ve yaban suşta gözlenmektedir. Yaban suşta 72. saate kadar miselyal kitlelerin içindeki ölüm miktarının arttığı ve buna bağlı olarak azalan pellet çapından büyümenin durduğu görülmektedir. 96 ve 120. saatlerde ise yaban suşta canlı olan miselyumlardan koloninin gelişiminin devam etmesiyle ölüm oranının azaldığı ve canlılığın arttığı gözlenmektedir. Fermentasyon boyunca yaban suştaki topak halindeki koloni morfolojisinin 24. saatten itibaren azaldığı ve ilerleyen saatlerde daha serbest miseller oluşturduğu dikkat çekmektedir (Şekil 5.28 A, B, C, D, E).

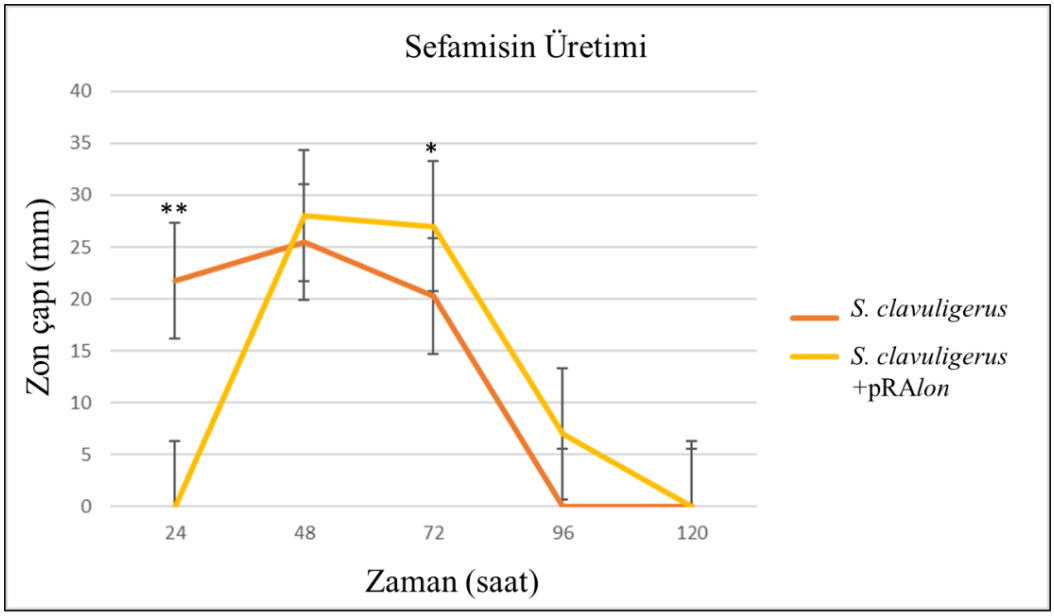
Rekombinant suşta ise 24. saatten itibaren radyal bir şekilde büyümeye başlayıp merkezden dışarı doğru ölmeye başlayan kolonilerin, 48. saat itibariyle canlı olan miselyumlardan yeniden geliştiği gözlenmektedir. İlerleyen aşamalarda ölüm oranının azaldığı ve yeşil renkli canlı kolonilerin arttığı 120. saate kadar görülmektedir. Fermentasyon boyunca rekombinant suştaki topak halindeki koloni morfolojisi devam etmektedir (Şekil 5.28 F, G, H, I, J).



Şekil 5.28: *S. coelicolor* A3(2) yaban suş (A,B,C,D,E) ve *S. coelicolor*+pRA*lon* rekombinant suşun (F,G,H,I,J) sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki konfokal mikroskop görüntüleri.

5.3.6. lon Geninin Fazla İfadesinin *S. clavuligerus*'ta Sefamisin C Üretimine Etkisi

pRA*lon* plazmidi konjugasyon ile *S. clavuligerus*'a aktarılmış ve apramisinli ortamda büyüyebilen olası rekombinant konjugant ile sefamisin C ölçümleri yapılmıştır. Bunun için olası rekombinant *S. clavuligerus* suşu (*S. clavuligerus* pRA*lon)* ve yaban tip ile 120 saatlik bir fermentasyon yapılmış ve her 24 saatte bir alınan örneklerle Bölüm 4.2.20'de anlatıldığı gibi agar disk difüzyon yöntemi ile sefamisin C antibiyotiği ölçülmüştür. 24. saatte olası rekombinant suşta zon oluşumu gözlenmezken, yaban suşta ortalama 22 mm'lik bir zon oluşmuştur. Fermentasyonun 48., 72. ve 96. saatlerinde *S. clavuligerus* pRA*lon* örneklerinde yaban suşa göre sırasıyla 2.5, 6.5 ve 7 mm kadar daha büyük zonlar oluşurken, 120. saatte her iki suşta da zon oluşumu gözlenmemiştir. Veriler grafiğe döküldüğünde Şekil 5.29'deki gibi bir profil elde edilmiştir.



Şekil 5.29: Lon proteaz enzimini normalden fazla üreten *S. clavuligerus* rekombinant suşu ve yaban tip suşlarının sefamisin C üretimlerinin karşılaştırılması. Dikey çubuklar, ortalama değerden standart sapmayı göstermektedir. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir. T-TEST'ine göre (Microsoft Office Excel), bir yıldız işareti (*) p <0.05'i, çift yıldız işareti (**) ise p <0.005'i ifade etmektedir. Sonuçlar dört bağımsız deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Streptomycetes'ler her ne kadar farklı biyoaktiviteye sahip sekonder metabolitler (antiviraller, immünosupresifler ve tümör karşıtı metabolitler gibi) üretebiliyor olsa da muhtemelen en fazla antibiyotik üretim yetenekleri sayesinde dikkat çekmektedirler [111]. *S. coelicolor* ise, genetik çalışmalarda sıkça yararlanılan bir *Streptomyces* türüdür ve en az 5 farklı antibiyotiği üretebilme özelliğiyle antibiyotik üretiminin regülasyonu için sıklıkla model organizma olarak tercih edilmektedir [97, 111, 112].

ATP-bağımlı Lon proteaz bakterilerden insana kadar tüm canlılarda katlanmamış proteinleri parçalayarak protein kalite kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır [113, 114]. Aynı zamanda hücre döngüsü, metabolizma, sporulasyon, patojenite ve stres cevabı gibi özel ve çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev almaktadır [48].

Bu tez çalışmasında, model organizma *S. coelicolor* A3 (2)'de Lon proteazın sekonder metabolizma üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bunun için öncelikle *S. coelicolor*'da Lon proteazı üretemeyen mutant suşu oluşturmak için deneyler yapılmıştır. *lon* geninin kromozomdan silinmesi için "PCR temelli" bir metod kullanılmış ancak farklı denemelerin hepsinde çok yavaş ve zor büyüyen olası mutant hücreler elde edilmiş ve bu hücreleri alt kültürlemek mümkün olmamıştır. *lon*'u genomdan silme denemelerimizin başarısız olması, bu genin *S. coelicolor* A3(2)'de yaşamsal bir gen olduğunu düşündürmüştür. Bildiğimiz kadarıyla, *lon* geninin genomdan tamamen silinmesiyle oluşturulan *Streptomyces* mutant suşu bulunmamaktadır. Sobczyk ve arkadaşları, *S. lividans*'ta *lon* geninin ekspresyonunu bozarak bir mutant suş oluşturmuşlar ve mutant suşun yaban suşa göre daha yavaş büyüdüğünü göstermişlerdir [9]. Söz konusu çalışmada bütün gen silinmediğinden *lon*'un büyüme üzerindeki etkisini tam olarak belirlemek mümkün değildir, çünkü delesyon mutantlarının, aktivitesi bozulmuş gene sahip mutantlardan farklı özelliklere sahip olabileceği bilinmektedir. Lon proteaz çoğu bakteri türü için hayati bir enzim olmasa da, *lon* geninin hücrenin canlılığı için gerekli olduğunu gösteren bir çalışma bulunmaktadır. *M. xanthus* ile yapılan bu çalışmada, *lon* geninin vejetatif büyümedeki rolünü göstermek için *lon*$^-$ mutantları izole edilmeye çalışılmış ancak

başarılı olunamamıştır. Bunun üzerine *lon* geninin vejetatif büyüme için hayati bir öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır [37].

Ching ve arkadaşları, *Acinetobacter baumannii* ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri *lon*$^-$ mutantında, bir yüzey antijen geni olan *sur*A1'in ifadesinin dramatik bir şekilde yükseldiğini ve bu yükselişin hücrenin fonksiyonlarını bozarak hücrenin ölümüne neden olabileceğini göstermişlerdir [115]. Açıklığa kavuşturulmamasına rağmen, elde ettiğimiz olası *S. coelicolor* Δ*lon* mutant hücrelerinde SurA1 proteini kritik seviyelere ulaşarak, olası mutant hücrelerin ölümüne neden olmuş olabilir. Bu konunun aydınlatılması için farklı çalışmaların planlanması gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, ekstra bir kopya *lon* geni taşıyan Sco-pRA*lon* rekombinant suşu da oluşturulmuştur. Rekombinant suşta öncelikle *lon* geninin fazla ifade edildiği transkripsiyonel düzeyde gösterilmiş, daha sonra antibiyotik ölçümleri yapılarak ektra tek kopya *lon* geninin ikincil metabolizma üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Yapılan antibiyotik ölçümleri sonucunda aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretiminin rekombinant suşta dramatik bir şekilde arttığı ve yaban suştan sırasıyla yaklaşık 34 kat ve 9 kat daha fazla üretildiği bulunmuştur.

Boş pRA vektörünün *S. coelicolor*'a aktarılmasıyla elde edilen kontrol suşunda, yaban suşa kıyasla antibiyotik üretiminde dikkate değer bir artış gözlenmemiştir. Bu da Sco-pRA*lon* rekombinant suşu tarafından antibiyotik üretimindeki aşırı artışın, ekstra *lon* geninin ekspresyonundan kaynaklandığını göstermektedir. pRA ve diğer integratif vektörler, *S. coelicolor* A3(2) genomunda bulunan "olası kromozom kondenzasyon proteinini" kodlayan ve daha önceden hücre sağ kalımı için gerekli olmadığı gösterilen [116] gen bölgesi (SCAC2.o6c; SCO3798) üzerindeki *att*B bölgesine girmektedirler. Vektör, bu *att*B bölgesine 300 kat verimlilikte entegre olabilse de, genomda vektörün girebileceği diğer psödo-*att*B bölgelerinin olduğu da bilinmektedir [116]. Bu bölgelerden üçünün (pseB1: olası dihidropteroat sentaz geni içinde, pseB2: hipotetik protein geni ve pseB3: aspartat aminotransferaz geninin içinde) aktif faj entegrasyon bölgeleri olduğu gösterilmiştir. *att*B ve psödo-*att*B bölgeleri ikincil metabolizmayı etkileyebilecek genlerin içinde bulunmamaktadır.

"Bir genin sayısını 2 katına çıkarmak, genin transkriptini de iki katına çıkarır" fikri bu çalışma için doğru değildir, çünkü *lon* geninin ifadesi Sco-pRA*lon* suşunda yaban suşa göre 10 kat artmıştır. Literatürde, bir genin transkripsiyonunun, kromozomun içine ilave bir kopya olarak entegre edildiğinde 2 kattan fazla arttığını

gösteren farklı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Schmid ve arkadaşları *Salmonella typhimurium*'un, his operonunun ilk 4 genini kendi promotoru ile birlikte 16 farklı kromozomal bölgeye aktarmışlardır. Bu bölgelerdeki *his*D ifadesinin seviyesini farklı büyüme koşulları altında ölçmüşler ve bulunan krozomal bölgeye göre genlerin farklı seviyelerde ifade edildiğini göstermişlerdir [117]. Diğer çalışmalar da genlerin ekspresyonunun "pozisyon etkisi" diye bilinen, kromozom üzerindeki pozisyonuna bağlı olarak değiştiğini göstermektedir [118, 119]. Gen ekspresyonunun genom üzerindeki pozisyondan etkilendiği ökaryotik organizmalarda da görülmektedir [120].

Stres, bakterilerde sekonder metabolit biyosentezini tetikleyen önemli faktörlerden biridir [1] [121]. Amino asit açlığı ve enerji kıtlığı durumunda, bakteriler "RelA" ve "SpoT" proteinleri tarafından üretilen sınırlandırılmış cevap alarmonlarını (ppGpp ve pppGpp) üretmektedirler. Bu süreçte protein sentezi ile birlikte tRNA ve rRNA sentezi durdurulurken protein yıkımı artmaktadır. Bu şekilde açığa çıkan amino asitler, yeni çevre koşullarına adapte olmak için gereken proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Lon proteazın bu süreçteki rolü oldukça kritiktir [66]. *S. coelicolor* genomunda ekstra bir kopya *lon* bulunması, doğrudan protein degradasyonu ile antibiyotik biyosentezi için daha fazla öncülün üretilmesine neden olmuş olabilir. Ayrıca, sınırlandırılmış cevap alarmonlarının, aktinorhodin de dahil olmak üzere bazı sekonder metabolitlerin öncüleri olan [122] çeşitli amino asit biyosentetik genlerinin transkripsiyonunu doğrudan etkiledikleri de gösterilmiştir [123]. Traxler ve arkadaşları, açlık durumunda, dallanmış zincirli amino asit biyosentezi için öncül metabolit üreten yolaklardaki genlerin yanı sıra, amino asit biyosentetik yolaklarındaki genlerin de indüklendiğini göstermişlerdir [124]. Dallanmış zincirli amino asit katabolizmasının besin bağımlı yolaklar aracılığıyla Tip II poliketid antibiyotik olan aktinorhodin için prekürsör sağladığı bilinmektedir [125]. Sco-pRA*lon* rekombinant suşunda, bakterilerdeki genel stres yanıtından sorumlu olan *sig*B sigma faktörünün ifadesinin artması, ekstra bir kopya *lon* geni taşıyan Sco-pRA*lon* rekombinant suşun stres altında olduğunu göstermektedir [126]. Bu nedenle, stres altındaki rekombinant suşun daha fazla dallanmış zincirli amino asitleri üreterek daha fazla aktinorhodin üretmiş olabileceği düşünülmüştür. Bu olasılığı doğrulamak için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son zamanlarda Bucca ve arkadaşları, *S. coelicolor*'da sıcaklık stresinin ardından genom çapında transkripsiyonel ve translasyonel değişiklikleri incelemiş ve

"transkriptom" ile "translatom" verileri arasında çok az ilişki olduğunu göstermişlerdir [127]. Ana moleküler şaperonlar ve proteazlar gibi anahtar proteinlerin hem transkripsiyon hem de translasyon seviyesinde yüksek miktarda indüklendiğinin gösterilmesine rağmen, diğer birçok genin translasyonel seviyede kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaya dayanarak, rekombinant suşun detaylı bir transkriptomik ve translatomik analizi, ekstra bir kopya *lon* geninin *S. coelicolor'*da antibiyotik üretimini arttırmasının nedenini açıklayabilir.

Yüksek miktarda sekonder metabolit üreten stabil *Streptomyces* suşlarının gelişimi, biyoteknolojik açıdan oldukça ilgi çekicidir. Mak ve Nodwell, aktinorhodinin pH'a duyarlı, güçlü bir bakteriyostatik antibiyotik olduğunu ancak, tıbbi olarak kullanılmadığını bildirmişlerdir [87]. Bununla birlikte, *Streptomyces* tarafından üretilen aktinorhodin ve diğer renkli metabolitlerin, bazı endüstriyel alanlarda toksik sentetik boyalara alternatif olarak test edildiği ve etkili sonuçlar alındığı bilinmektedir. Bu bakımdan, Sco-pRA*lon* rekombinant suşunun sanayide kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Farklı *Streptomyces* türlerinde *lon*'un ikincil metabolizma üzerinde aynı etkiyi gösterip göstermediğini araştırmak için sefamisin C üreticisi *S. clavuligerus*'a da ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilmiş, ancak antibiyotik üretiminde sadece 1.5 katlık bir artış gözlenmiştir.

Ekstra bir kopya *lon* geninin ikincil metabolizma üzerindeki çarpıcı etkisi gözlemlendikten sonra, birincil metabolizma üzerindeki etkisi merak edilmiştir. α-amilaz aktivitesi ölçümleri sonucunda, rekombinant suşta birincil metabolizmanın çok fazla etkilenmediği belirlenmiştir.

Özetle bu tez çalışmasında, ekstra bir kopya *lon* geninin *S. coelicolor'*da ikincil metabolit üretimini dramatik bir şekilde arttırdığı gösterilmiş ve bu genin *S. coelicolor* için hayati bir öneme sahip olduğuna dair ön bulgular elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Bibb M. J., (2005), "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes", Current opinion in microbiology, 8 (2), 208-215.

[2] Ghorbel S., Kormanec J., Artus A., Virolle M.-J., (2006), "Transcriptional studies and regulatory interactions between the phoR-phoP operon and the phoU, mtpA, and ppk genes of Streptomyces lividans TK24", Journal of bacteriology, 188 (2), 677-686.

[3] Mendes M. V., Tunca S., Antón N., Recio E., Sola-Landa A., Aparicio J. F., Martín J. F., (2007), "The two-component phoR-phoP system of Streptomyces natalensis: inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis", Metabolic engineering, 9 (2), 217-227.

[4] Tunca S., Barreiro C., Coque J. J. R., Martín J. F., (2009), "Two overlapping antiparallel genes encoding the iron regulator DmdR1 and the Adm proteins control sidephore and antibiotic biosynthesis in Streptomyces coelicolor A3 (2)", The FEBS journal, 276 (17), 4814-4827.

[5] Camci İ. Y., Doruk T., Avican Ü., Gedik S. T., (2012), "Deletion of polyphosphate kinase gene (ppk) has a stimulatory effect on actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3 (2)", Turkish Journal of Biology, 36 (4), 373-380.

[6] Doruk T., Avican U., Camci I. Y., Gedik S. T., (2013), "Overexpression of polyphosphate kinase gene (ppk) increases bioinsecticide production by Bacillus thuringiensis", Microbiological research, 168 (4), 199-203.

[7] Whistler C. A., Stockwell V. O., Loper J. E., (2000), "Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of Pseudomonas fluorescens Pf-5", Appl. Environ. Microbiol., 66 (7), 2718-2725.

[8] Bucca G., Brassington A. M., Hotchkiss G., Mersinias V., Smith C. P., (2003), "Negative feedback regulation of dnaK, clpB and lon expression by the DnaK chaperone machine in Streptomyces coelicolor, identified by transcriptome and in vivo DnaK-depletion analysis", Molecular microbiology, 50 (1), 153-166.

[9] Sobczyk A., Bellier A., Viala J., Mazodier P., (2002), "The lon gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress-response regulon in actinomycetes", Microbiology, 148 (6), 1931-1937.

[10] De Crécy-Lagard V., Servant-Moisson P., Viala J., Grandvalet C., Mazodier P., (1999), "Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in Streptomyces", Molecular microbiology, 32 (3), 505-517.

[11] Manikprabhu D., Lingappa K., (2013), "γ Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi", Saudi journal of biological sciences, 20 (2), 163-168.

[12] Kramar A., Ilic-Tomic T., Petkovic M., Radulović N., Kostic M., Jocic D., Nikodinovic-Runic J., (2014), "Crude bacterial extracts of two new Streptomyces sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing", World journal of microbiology and biotechnology, 30 (8), 2231-2240.

[13] Goff S. A., Casson L. P., Goldberg A. L., (1984), "Heat shock regulatory gene htpR influences rates of protein degradation and expression of the lon gene in Escherichia coli", Proceedings of the National Academy of Sciences, 81 (21), 6647-6651.

[14] Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Mori H., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T., (1993), "The Escherichia coli FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression", Journal of bacteriology, 175 (5), 1344-1351.

[15] Katayama-Fujimura Y., Gottesman S., Maurizi M., (1987), "A multiple-component, ATP-dependent protease from Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 262 (10), 4477-4485.

[16] Baker T. A., Sauer R. T., (2006), "ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles", Trends in biochemical sciences, 31 (12), 647-653.

[17] Sauer R. T., Baker T. A., (2011), "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction", Annual review of biochemistry, 80, 587-612.

[18] Pickart C. M., Cohen R. E., (2004), "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age", Nature reviews Molecular cell biology, 5 (3), 177.

[19] Wang T.-F., Chang J., Wang C., (1993), "Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding", Journal of Biological Chemistry, 268 (35), 26049-26051.

[20] Goldberg G. I., Frisch S. M., He C., Wilhelm S. M., Reich R., Collier I. E., (1990), "Secreted proteases", Annals of the New York Academy of Sciences, 580 (1), 375-384.

[21] Botos I., Melnikov E. E., Cherry S., Tropea J. E., Khalatova A. G., Rasulova F., Dauter Z., Maurizi M. R., Rotanova T. V., Wlodawer A., (2004), "The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site", Journal of Biological Chemistry, 279 (9), 8140-8148.

[22] Ebel W., Skinner M. M., Dierksen K. P., Scott J. M., Trempy J. E., (1999), "A conserved domain in Escherichia coliLon protease is involved in substrate discriminator activity", Journal of bacteriology, 181 (7), 2236-2243.

[23] Fischer H., Glockshuber R., (1994), "A point mutation within the ATP-binding site inactivates both catalytic functions of the ATP-dependent protease La (Lon) from Escherichia coli", FEBS letters, 356 (1), 101-103.

[24] Nomura K., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H., Kuroda A., (2004), "Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 279 (33), 34406-34410.

[25] Amerik A. Y., Antonov V. K., Gorbalenya A. E., Kotova S. A., Rotanova T. V., Shimbarevich E. V., (1991), "Site-directed mutagenesis of La protease: a catalytically active serine residue", FEBS letters, 287 (1-2), 211-214.

[26] Smith C. K., Baker T. A., Sauer R. T., (1999), "Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains", Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (12), 6678-6682.

[27] Gottesman S., (1996), "Proteases and their targets in Escherichia coli", Annual review of genetics, 30 (1), 465-506.

[28] Gur E., Biran D., Ron E. Z., (2011), "Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria—how and when?", Nature Reviews Microbiology, 9 (12), 839.

[29] Lupas A., Flanagan J. M., Tamura T., Baumeister W., (1997), "Self-compartmentalizing proteases", Trends in biochemical sciences, 22 (10), 399-404.

[30] Griffith K. L., Shah I. M., E. Wolf Jr R., (2004), "Proteolytic degradation of Escherichia coli transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons", Molecular microbiology, 51 (6), 1801-1816.

[31] Ishıı Y., Amano F., (2001), "Regulation of SulA cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of SulA, histidine", Biochemical Journal, 358 (2), 473-480.

[32] Gonzalez M., Frank E. G., McDonald J. P., Levine A. S., Woodgate R., (1998), "Structural insights into the regulation of SOS mutagenesis", Acta Bıochımıca Polonıca-Englısh Edıtıon-, 45, 163-172.

[33] Jubete Y., Maurizi M. R., Gottesman S., (1996), "Role of the heat shock protein DnaJ in the Lon-dependent degradation of naturally unstable proteins", Journal of Biological Chemistry, 271 (48), 30798-30803.

[34] Van Melderen L., Thi M. H. D., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M. R., (1996), "Atp-dependent degradation of ccda by lon protease effects of secondary structure and heterologous subunit interactions", Journal of Biological Chemistry, 271 (44), 27730-27738.

[35] Christensen S. K., Maenhaut-Michel G., Mine N., Gottesman S., Gerdes K., Van Melderen L., (2004), "Overproduction of the Lon protease triggers

inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system", Molecular microbiology, 51 (6), 1705-1717.

[36] Ito K., Udaka S., Yamagata H., (1992), "Cloning, characterization, and inactivation of the Bacillus brevis lon gene", Journal of bacteriology, 174 (7), 2281-2287.

[37] Tojo N., Inouye S., Komano T., (1993), "The lonD gene is homologous to the lon gene encoding an ATP-dependent protease and is essential for the development of Myxococcus xanthus", Journal of bacteriology, 175 (14), 4545-4549.

[38] Yura T., Nakahigashi K., (1999), "Regulation of the heat-shock response", Current opinion in microbiology, 2 (2), 153-158.

[39] Schumann W., (2003), "The Bacillus subtilis heat shock stimulon", Cell stress & chaperones, 8 (3), 207.

[40] Riethdorf S., Völker U., Gerth U., Winkler A., Engelmann S., Hecker M., (1994), "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Bacillus subtilis lon gene", Journal of bacteriology, 176 (21), 6518-6527.

[41] Bellier A., Gominet M., Mazodier P., (2006), "Post-translational control of the Streptomyces lividans ClgR regulon by ClpP", Microbiology, 152 (4), 1021-1027.

[42] Hilliard J. J., Maurizi M. R., Simon L. D., (1998), "Isolation and Characterization of the Phage T4 PinA Protein, an Inhibitor of the ATP-dependent Lon Protease ofEscherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 273 (1), 518-523.

[43] Hilliard J. J., Simon L. D., Van Melderen L., Maurizi M. R., (1998), "PinA inhibits ATP hydrolysis and energy-dependent protein degradation by Lon protease", Journal of Biological Chemistry, 273 (1), 524-527.

[44] Simon L. D., Randolph B., Irwin N., Binkowski G., (1983), "Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in Escherichia coli", Proceedings of the National Academy of Sciences, 80 (7), 2059-2062.

[45] Simon L. D., Tomczak K., John A. C. S., (1978), "Bacteriophages inhibit degradation of abnormal proteins in E. coli", Nature, 275 (5679), 424.

[46] Schoemaker J., Gayda R., Markovitz A., (1984), "Regulation of cell division in Escherichia coli: SOS induction and cellular location of the sulA protein, a key to lon-associated filamentation and death", Journal of bacteriology, 158 (2), 551-561.

[47] Mascarenhas J., Volkov A. V., Rinn C., Schiener J., Guckenberger R., Graumann P. L., (2005), "Dynamic assembly, localization and proteolysis of the Bacillus subtilis SMC complex", BMC cell biology, 6 (1), 28.

[48] Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Van Melderen L., (2006), "Biological roles of the Lon ATP-dependent protease", Research in microbiology, 157 (8), 701-713.

[49] Mizusawa S., Gottesman S., (1983), "Protein degradation in Escherichia coli: the lon gene controls the stability of sulA protein", Proceedings of the National Academy of Sciences, 80 (2), 358-362.

[50] Torres-Cabassa A., Gottesman S., (1987), "Capsule synthesis in Escherichia coli K-12 is regulated by proteolysis", Journal of bacteriology, 169 (3), 981-989.

[51] Tojo N., Inouye S., Komano T., (1993), "Cloning and nucleotide sequence of the Myxococcus xanthus lon gene: indispensability of lon for vegetative growth", Journal of bacteriology, 175 (8), 2271-2277.

[52] Schmidt R., Decatur A. L., Rather P. N., Moran C., Losick R., (1994), "Bacillus subtilis lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor sigma G", Journal of bacteriology, 176 (21), 6528-6537.

[53] Serrano M., Hövel S., Moran C. P., Henriques A. O., Völker U., (2001), "Forespore-Specific Transcription of thelonB Gene during Sporulation in Bacillus subtilis", Journal of bacteriology, 183 (10), 2995-3003.

[54] Liu J., Cosby W. M., Zuber P., (1999), "Role of Lon and ClpX in the post-translational regulation of a sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in Bacillus subtilis", Molecular microbiology, 33 (2), 415-428.

[55] Stewart B. J., Enos-Berlage J. L., McCarter L. L., (1997), "The lonS gene regulates swarmer cell differentiation of Vibrio parahaemolyticus", Journal of bacteriology, 179 (1), 107-114.

[56] Wright R., Stephens C., Zweiger G., Shapiro L., Alley M., (1996), "Caulobacter Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation", Genes & development, 10 (12), 1532-1542.

[57] Maas R., (2001), "Change of plasmid DNA structure, hypermethylation, and Lon-proteolysis as steps in a replicative cascade", Cell, 105 (7), 945-955.

[58] Calmann M. A., Marinus M. G., (2003), "Regulated expression of the Escherichia coli dam gene", Journal of bacteriology, 185 (16), 5012-5014.

[59] Bota D. A., Davies K. J., (2002), "Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism", Nature cell biology, 4 (9), 674.

[60] Bota D. A., Ngo J. K., Davies K. J., (2005), "Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death", Free Radical Biology and Medicine, 38 (5), 665-677.

[61] Lee J. H., Ancona V., Zhao Y., (2018), "Lon protease modulates virulence traits in Erwinia amylovora by direct monitoring of major regulators and indirectly through the Rcs and Gac-Csr regulatory systems", Molecular plant pathology, 19 (4), 827-840.

[62] Jackson M. W., Silva-Herzog E., Plano G. V., (2004), "The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the Yersinia pestis type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein", Molecular microbiology, 54 (5), 1364-1378.

[63] Magnusson L. U., Farewell A., Nyström T., (2005), "ppGpp: a global regulator in Escherichia coli", Trends in microbiology, 13 (5), 236-242.

[64] Ahn K., Kornberg A., (1990), "Polyphosphate kinase from Escherichia coli. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate", Journal of Biological Chemistry, 265 (20), 11734-11739.

[65] Akiyama M., Crooke E., Kornberg A., (1993), "An exopolyphosphatase of Escherichia coli. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon", Journal of Biological Chemistry, 268 (1), 633-639.

[66] Kuroda A., Tanaka S., Ikeda T., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H., (1999), "Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in Escherichia coli", Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (25), 14264-14269.

[67] Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A., (2001), "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in E. coli", Science, 293 (5530), 705-708.

[68] Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. G., (2004), "Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology", Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

[69] Vionis A. P., Katsifas E. A., Karagouni A. D., (1998), "Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced streptomycete strains in soil microcosms", Antonie van Leeuwenhoek, 73 (1), 103-115.

[70] Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sanchez J., (2008), "Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of Streptomyces coelicolor", Applied and environmental microbiology, 74 (12), 3877-3886.

[71] Yagüe P., López-García M. T., Rioseras B., Sánchez J., Manteca Á., (2013), "Pre-sporulation stages of Streptomyces differentiation: state-of-the-art and future perspectives", FEMS microbiology letters, 342 (2), 79-88.

[72] Rioseras B., López-García M. T., Yagüe P., Sánchez J., Manteca Á., (2014), "Mycelium differentiation and development of Streptomyces coelicolor in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are

closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production", Bioresource technology, 151, 191-198.

[73] Grasso L. L., Martino D. C., Alduina R. (2016), "Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes". "Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications", IntechOpen.

[74] Manteca A., Sanchez J., (2010), "Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production", Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol, 1, 560-566.

[75] McCarthy A. J., Williams S. T., (1992), "Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review", Gene, 115 (1-2), 189-192.

[76] Wang Z., Crawford D. L., Pometto III A. L., Rafii F., (1989), "Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant Streptomyces in a soil ecosystem", Canadian journal of microbiology, 35 (5), 535-543.

[77] Champness W. C., (1994), "Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in Streptomyces spp", Regulation of bacterial differentiation, 61-93.

[78] Keiser T., (2000), "Practical streptomyces genetics", The John Innes Foundation.

[79] Bibb M., (1996), "The regulation of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3 (2)", Microbiology, 142 (6), 1335-1344.

[80] Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A.-M., Challis G. L., Thomson N., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., (2002), "Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3 (2)", Nature, 417 (6885), 141.

[81] Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Ōmura S., (2003), "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis", Nature biotechnology, 21 (5), 526.

[82] Malpartida F., Hopwood D. A., (1986), "Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin inStreptomyces coelicolor A3 (2)", Molecular and General Genetics MGG, 205 (1), 66-73.

[83] Malpartida F., Niemi J., Navarrete R., Hopwood D., (1990), "Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the Streptomyces coelicolor antibiotic undecylprodigiosin", Gene, 93 (1), 91-99.

[84] Feıtelson J. S., Malpartıda F., Hopwood D. A., (1985), "Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of Streptomyces coelicolor A3 (2)", Microbiology, 131 (9), 2431-2441.

[85] Chong P. P., Podmore S. M., Kieser H. M., Redenbach M., Turgay K., Marahiel M., Hopwood D. A., Smith C. P., (1998), "Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of Streptomyces coelicolor A3 (2)", Microbiology, 144 (1), 193-199.

[86] Chater K. F., Bruton C. J., (1985), "Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered", The EMBO journal, 4 (7), 1893-1897.

[87] Mak S., Nodwell J. R., (2017), "Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against G ram-positive cells", Molecular microbiology, 106 (4), 597-613.

[88] Martín J. F., Demain A. L., (1980), "Control of antibiotic biosynthesis", Microbiological reviews, 44 (2), 230.

[89] Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P., (1996), "Regulation of spiramycin synthesis in Streptomyces ambofaciens: effects of glucose and inorganic phosphate", Applied microbiology and biotechnology, 45 (1-2), 204-211.

[90] Martín J.-F., Liras P., (2010), "Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in Streptomyces", Current opinion in microbiology, 13 (3), 263-273.

[91] Wietzorrek A., Bibb M., (1997), "A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold", Molecular microbiology, 25 (6), 1181-1184.

[92] Martínez-Hackert E., Stock A. M., (1997), "Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors", Journal of molecular biology, 269 (3), 301-312.

[93] Mizuno T., Tanaka I., (1997), "Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators", Molecular microbiology, 24 (3), 665-667.

[94] Santamarta I., Rodríguez-García A., Pérez-Redondo R., Martín J. F., Liras P., (2002), "CcaR is an autoregulatory protein that binds to the ccaR and cefD-cmcI promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in Streptomyces clavuligerus", Journal of bacteriology, 184 (11), 3106-3113.

[95] Martín J. F., (2004), "Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story", Journal of bacteriology, 186 (16), 5197-5201.

[96] Sola-Landa A., Moura R., Martin J., (2003), "The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in Streptomyces lividans", Proceedings of the National Academy of Sciences, 100 (10), 6133-6138.

[97] Ryding N. J., Anderson T. B., Champness W. C., (2002), "Regulation of the Streptomyces coelicolor calcium-dependent antibiotic by absA, encoding a cluster-linked two-component system", Journal of bacteriology, 184 (3), 794-805.

[98] Hanahan D., (1983), "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", Journal of molecular biology, 166 (4), 557-580.

[99] MacNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H., MacNeil T., (1992), "Analysis of Streptomyces avermitilis genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector", Gene, 111 (1), 61-68.

[100] Datsenko K. A., Wanner B. L., (2000), "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products", Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (12), 6640-6645.

[101] Hopwood D. A., (1999), "Forty years of genetics with Streptomyces: from in vivo through in vitro to in silico", Microbiology, 145 (9), 2183-2202.

[102] Paget M. S., Chamberlin L., Atrih A., Foster S. J., Buttner M. J., (1999), "Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor çE is required for normal cell wall structure in Streptomyces coelicolor A3 (2)", Journal of bacteriology, 181 (1), 204-211.

[103] Perez-Redondo R., Santamarta I., Bovenberg R., Martín J. F., Liras P., (2010), "The enigmatic lack of glucose utilization in Streptomyces clavuligerus is due to inefficient expression of the glucose permease gene", Microbiology, 156 (5), 1527-1537.

[104] Gust B., Challis G. L., Fowler K., Kieser T., Chater K. F., (2003), "PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin", Proceedings of the National Academy of Sciences, 100 (4), 1541-1546.

[105] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), "Molecular cloning: a laboratory manual", Edition, Cold spring harbor laboratory press.

[106] Thompson C., Ward J., Hopwood D., (1980), "DNA cloning in Streptomyces: resistance genes from antibiotic-producing species", Nature, 286 (5772), 525.

[107] Aparicio J. F., Colina A. J., Ceballos E., Martín J. F., (1999), "The Biosynthetic Gene Cluster for the 26-Membered Ring Polyene Macrolide Pimaricin A new polyketıde synthase organızatıon encoded by two subclusters separated by functıonalızatıon genes", Journal of Biological Chemistry, 274 (15), 10133-10139.

[108] Sanders E. R., (2012), "Aseptic laboratory techniques: plating methods", JoVE (Journal of Visualized Experiments) (63), e3064.

[109] Donovan W. P., Gonzalez J. M., Gilbert M. P., Dankocsik C., (1988), "Isolation and characterization of EG2158, a new strain of Bacillus

thuringiensis toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene", Molecular and General Genetics MGG, 214 (3), 365-372.

[110] Miller G. L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", Analytical chemistry, 31 (3), 426-428.

[111] de Lima Procópio R. E., da Silva I. R., Martins M. K., de Azevedo J. L., de Araújo J. M., (2012), "Antibiotics produced by Streptomyces", The Brazilian Journal of infectious diseases, 16 (5), 466-471.

[112] Liu G., Chater K. F., Chandra G., Niu G., Tan H., (2013), "Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in Streptomyces", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 77 (1), 112-143.

[113] Wickner S., Maurizi M. R., (1999), "Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon", Proceedings of the National Academy of Sciences, 96 (15), 8318-8320.

[114] Gottesman S., Wickner S., Maurizi M. R., (1997), "Protein quality control: triage by chaperones and proteases", Genes & development, 11 (7), 815-823.

[115] Ching C., Yang B., Onwubueke C., Lazinski D., Camilli A., Godoy V. G., (2018), "Lon protease has multifaceted biological functions in Acinetobacter baumannii", Journal of bacteriology, JB. 00536-00518.

[116] Combes P., Till R., Bee S., Smith M. C., (2002), "The Streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the φC31-encoded site-specific recombination system", Journal of bacteriology, 184 (20), 5746-5752.

[117] Schmid M. B., Roth J. R., (1987), "Gene location affects expression level in Salmonella typhimurium", Journal of bacteriology, 169 (6), 2872-2875.

[118] Thompson A., Gasson M. J., (2001), "Location Effects of a Reporter Gene on Expression Levels and on Native Protein Synthesis in Lactococcus lactisand Saccharomyces cerevisiae", Appl. Environ. Microbiol., 67 (8), 3434-3439.

[119] Bryant J. A., Sellars L. E., Busby S. J., Lee D. J., (2014), "Chromosome position effects on gene expression in Escherichia coli K-12", Nucleic acids research, 42 (18), 11383-11392.

[120] Loehlin D. W., Carroll S. B., (2016), "Expression of tandem gene duplicates is often greater than twofold", Proceedings of the National Academy of Sciences, 113 (21), 5988-5992.

[121] Yeşilırmak F., Doruk T., Yılmaz Ş., Gedik S. T., (2018), "Comparative proteomic analysis of Bacillus thuringiensis wild-type and two mutant strains disturbed in polyphosphate homeostasis", Turkish Journal of Biology, 42 (1), 87-102.

[122] Paul B. J., Berkmen M. B., Gourse R. L., (2005), "DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp", Proceedings of the National Academy of Sciences, 102 (22), 7823-7828.

[123] Hesketh A., Chen W. J., Ryding J., Chang S., Bibb M., (2007), "The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3 (2)", Genome biology, 8 (8), R161.

[124] Traxler M. F., Summers S. M., Nguyen H. T., Zacharia V. M., Hightower G. A., Smith J. T., Conway T., (2008), "The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in Escherichia coli", Molecular microbiology, 68 (5), 1128-1148.

[125] Stirrett K., Denoya C., Westpheling J., (2009), "Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the Type II polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent", Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36 (1), 129-137.

[126] Demir Z., Bayraktar A., Tunca S., (2019), "One Extra Copy of lon Gene Causes a Dramatic Increase in Actinorhodin Production by Streptomyces coelicolor A3 (2)", Current Microbiology, 1-10.

[127] Bucca G., Pothi R., Hesketh A., Möller-Levet C., Hodgson D. A., Laing E. E., Stewart G. R., Smith C. P., (2018), "Translational control plays an important role in the adaptive heat-shock response of Streptomyces coelicolor", Nucleic acids research, 46 (11), 5692-5703.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Demir Öksüz, 1986 yılında İstanbul'da doğdu. Lisans eğitimini 2009 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamlayıp, aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. Yüksek lisans eğitimini Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında 2012 yılında tamamladı. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında, Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında doktora eğitimine başladı. 2015-2019 yılları arasında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Demir Z., Bayraktar A., Tunca S., (2019), "One Extra Copy of *lon* Gene Causes a Dramatic Increase in Actinorhodin Production by *Streptomyces coelicolor* A3(2)", Current Microbiology, 1-10.