T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SINIRLANDIRILMIŞ CEVAPTAN SORUMLU RELA GENİNİN STREPTOMYCES COELİCOLOR SUŞUNDA ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNE ETKİSİ

MÜBERRA FATMA CESUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SINIRLANDIRILMIŞ CEVAPTAN SORUMLU RELA GENİNİN STREPTOMYCES COELİCOLOR SUŞUNDA ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNE ETKİSİ

MÜBERRA FATMA CESUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE
2017

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

EFFECT OF RELA GENE RESPONSIBLE FOR STRINGENT RESPONSE ON ANTIBIOTIC PRODUCTION OF STREPTOMYCES COELICOLOR STRAIN

MÜBERRA FATMA CESUR

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE

2017

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..29.../..06.../..2017. tarih ve 2017/35... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ..24.../..10.../..2017. tarihinde tez savunma sınavı yapılan ..Müberra Fatma ÇESUR.....'ın tez çalışması ..Moleküler Biyoloji ve GENETİK....Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Sedef Tunca Gedik

ÜYE : Prof. Dr. Ayten Karatoz

ÜYE : Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Antibiyotik direnci sorunu hızla popülerlik kazanmasına rağmen, antibiyotiklerin medikal ve biyoteknolojik önemi tartışılamaz. Ticari ve medikal amaçlı kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %75'ini üretebilme kapasitesine sahip olan Streptomycetes'ler, bu yetenekleri sayesinde en dikkat çeken mikroorganizmalar arasındadır.

Bir Streptomyces türü olan *Streptomyces coelicolor* en az 5 farklı antibiyotiği sentezleyebilme yeteneğine sahip olup genetik çalışmalarda sıklıkla model organizma olarak kullanılmaktadır. Antibiyotik ve diğer ikincil metabolitlerin üretimi, besin kıtlığı gibi stres faktörleriyle aktive olan "sınırlandırılmış cevap" mekanizması üzerinden artırılabilir. Sınırlandırılmış cevap, ortamda yeterli besin bulunmaması durumunda, mikroorganizmaların alarmon (ppGpp ve pppGpp) üreterek metabolik durumlarının yeni koşullara adaptasyonu sağlayacak şekilde yeniden düzenlenmesini tetikler. RelA, hücresel (p)ppGpp seviyesinin artırılmasında görev alan faktörlerden birisidir. Bu çalışma kapsamında, ilgili gen çok kopyalı ve gliserolle uyarılabilir bir *E. coli – Streptomyces* mekik vektörüne (pSPG) klonlanarak yaban tip *S. coelicolor* A(3)2 hücresine aktarılmış ve rekombinant suşta antibiyotik üretimi ölçülerek *relA*'nın yüksek düzeyde ifadesinin ikincil metabolizma üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bilgimiz dahilinde bugüne kadar yapılmış *relA* genine ait ekpresyon çalışmaları bu genden yoksun mutant suşun komplementasyonunu baz alan çalışmalardır. Bu çalışmada elde edilen rekombinant suş, zengin besiyerinde yüksek düzeyde *relA* ifade edebilen ilk suş olması bakımından bilimsel literatür için değerli olacaktır. Aynı zamanda, RelA'nın ikincil metabolizmaya etkisinin daha detaylı çalışılacağı diğer araştırmalar için de materyal ve ön bulgular sağlaması çalışmanın önemini artırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sınırlandırılmış cevap, Alarmonlar, RelA, *E. coli*, *Streptomyces coelicolor*, antibiyotik üretimi.

SUMMARY

The medical and biotechnological importance of antibiotics is indisputable despite of the rapid rice in popularity of antibiotic resistance crisis. Approximately 75 % of commercially and medically useful antibiotics are sourced from the genus *Streptomyces* and they are among the most prominent microorganisms with their antibiotic-producing capacities.

Streptomyces coelicolor, a member of the genus *Streptomyces*, can synthesize 5 or more different antibiotics and it is frequently used as the model organism in genetic researches. Production of seconder metabolites including antibiotics can be enhanced upon "stringent response" mechanism induced by stress factors like nutrient deprivation. With the lack of enough nutrient in the environment, stringent response prompts microorganisms to rearrange the cellular metabolic status by alormone (ppGpp ve pppGpp) production for adaption into this new condition. *relA* is one of the main factors responsible for alarmone accumulation. This gene was cloned into a multicopy, glycerol-inducible *E. coli – Streptomyces* shuttle vector (pSPG) and introduced into wild-type *S. coelicolor* A(3)2. Then the effect of *relA* overexpression on secondary metabolism was investigated by measuring antibiotic production in recombinant strain.

To our knowledge, researches have focused on complementation of the mutant strain lacking *relA* gene so far. The recombinant strain obtained in this study will be valuable for scientific literature since it is the first example that overexpress *relA* gene in rich medium. Moreover, by providing materials and preliminary findings for the future studies regarding the effect of RelA on secondary metabolism increases the importance of this study.

Key Words: Stringent response, Alarmones, RelA, *E. coli*, *Streptomyces coelicolor*, antibiotic production.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübesi, anlayışı ve sabrıyla yanımda olan ve ne zaman ümitsizliğe düşsem güler yüzüyle beni motive eden değerli hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım (Ğarip DEMİR, Halil YILMAZ, Nagihan GENEL, Buse ÇINAR, Aslı BAYRAKTAR, Ozan TOPÇU, Müge Didem ORHAN ve Zeynep Tansu ATASAVUM) ile bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımızda olan değerli hocalarıma (Arş. Gör. Tuğrul DORUK, Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Arş. Gör. Zeynep DEMİR ÖKSÜZ ve Öğr. Gör. Şerif YILMAZ) tüm maddi, manevi desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız, bizden içtenlik ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. İnci ÖZDEMİR'e çok teşekkür ederim.

Benden manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Nuran SOYSAL, Havva BUĞDA ve Büşra KÖKSAL'a minnetlerimi sunarım.

Son olarak, yetişmemde emeği geçen, tez çalışmamın yanısıra yaşantım boyunca karşılaştığım hiçbir zorlukta elimi asla bırakmayan ve verdiğim her kararda arkamda duran sevgili babam Ali CESUR'a, annem Zehra CESUR'a ve abim Muhammet Raşit CESUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
SUMMARY v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
TABLOLAR DİZİNİ xiv

1. GİRİŞ 1
   1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği 1
2. ALARMON ÜRETİMİNİN SINIRLANDIRILMIŞ CEVAPTAKİ YERİ 3
   2.1. Sınırlandırılmış Cevap Mekanizması 3
   2.2. Stres Cevabından Sorumlu Anahtar Moleküller 3
   2.3. Alarmon Seviyesinin Hücrenin Ekspresyon Profiline Etkisi 4
   2.4. Alarmon Sentezinde Görevli Enzimler 4
   2.5. Alarmonların Etki Mekanizmaları 8
3. AKTİNOBAKTERİLER 13
   3.1. Aktinobakteri Grubunun Dikkat Çekici Mikroorganizmaları: *Streptomyces*'ler 14
   3.2. *Streptomyces*'lerin Katı Besiyerindeki Yaşam Döngüsü 14
   3.3. *Streptomyces*'lerin Sıvı Besiyerindeki Yaşam Döngüsü 15
   3.4. *Streptomyces*'lerin Antibiyotik Üretim Yeteneği 16
   3.5. RelA Proteinin *Streptomyces coelicolor* Hücrelerinde Antibiyotik Üretimine Etkisi 17
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER 20
   4.1. Gereçler 20
   4.1.1. Kullanılan Kimyasallar 20
   4.1.2. Kullanılan Enzimler 20
   4.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri 20
   4.2. Mikroorganizmalar ve Besiyerleri 21
   4.2.1. Mikroorganizmalar 21

4.2.2. Kullanılan Besiyerleri 22
4.2.2.1. Luria Bertani (LB) Besiyeri (pH 7.0) – 1 L 22
4.2.2.2. Luria Bertani (LB) Agar Besiyeri (pH 7.0) – 1 L 23
4.2.2.3. Xgal ve IPTG'li Luria Bertani (LB) Agar (pH 7.0) – 1 L 23
4.2.2.4. 2xYT Broth 23
4.2.2.5. Tripton Soya Besiyeri (TSB) 24
4.2.2.6. Tripton Soya Agar (TSA) 24
4.2.2.7. Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS) 24
4.2.2.8. R2YE Besiyeri 24
4.3. Kullanılan Çözeltiler 25
4.4. Kullanılan Kozmit ve Plazmitler 27
4.5. Tasarlanan Primerler 30
4.6. Kullanılan Cihazlar 32
5. YÖNTEMLER 34
5.1. *E. coli* Hücrelerinden Kozmit / Plazmit İzolasyonu 34
5.2. *relA* Geninin PZR Yöntemi İle Çoğaltılması 34
5.3. Agaroz Jel Elektroforezi 35
5.4. İzole Edilen DNA'ların veya PZR ile Çoğaltılan Genin Jelden Geri Kazanılması 35
5.5. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri 35
5.6. Klenow Reaksiyonu 36
5.7. Ligasyon 36
5.8. "In Fusion Klonlama" Protokolü 37
5.9. *E. coli* Alıcı (Kompetan) Hücrelerinin Hazırlanması 37
5.10. Standart Transformasyon Yöntemi 37
5.11. *E. coli* DH5α Hücrelerinde pSK(-)+*relA* Ekpresyonunun Kontrolü 38
5.12. *E. coli* DH5α Hücrelerinde pSPG+*relA* Ekpresyonunun Kontrolü 38
5.13. Rekombinant Plazmitlerin Alıcı *E. coli* ET12567 Hücrelerine Aktarımı 39
5.14. *E. coli* Transformantlarının Taranması 40
5.15. Miniprep Plazmit İzolasyonu Yöntemi 40
5.16. Plazmitlerin Restriksiyon Analizi 40
5.17. Rekombinant Plazmidin Yaban Tip *Streptomyces coelicolor* A(3)2 Hücrelerine Transferi 40
5.18. Konjugasyon Yöntemi 40

5.19. Protoplast Transformasyonu 41
5.20. Alkalin Liziz Yöntemiyle Olası *S. coelicolor* Mutantlarından Plazmit İzolasyonu 42
5.21. *S. coelicolor* Hücrelerinde *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi 42
5.21.1. *relA* Ekspresyonunun Tayininde Kullanmak Amacıyla Hücre Pelletlerinin Toplanması 42
5.21.2. *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi 43
5.22. Mutant ve Yaban Tip *S. coelicolor* Hücrelerinde Antibiyotik Ölçümleri 44
6. BULGULAR 46
6.1. *Streptomyces coelicolor relA* Gen Bölgesinin Çoğaltılması 46
6.1.1. *relA* Genini pRA ve pHZ1351 Plazmitlerine Klonlamak İçin Yapılan Çalışmalar 46
6.1.2. *relA* Geninin pET6xHN-N Ekspresyon Vektörüne Klonlanması 50
6.1.3. *relA* Geninin pSK(-) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması 52
6.1.4. *relA* Geninin pSPG *E. coli-Streptomyces* Mekik Vektörüne Klonlanması 54
6.2. *relA* Ekspresyonunun *E. coli* Hücrelerinde Test Edilmesi 57
6.3. Mutant Plazmidin Metilasyon Yoksunu *E. coli* ET12567 Hücrelerine Aktarımı 58
6.4. Rekombinant pSPG/*relA* Plazmidinin *E. coli* ET12567 Hücrelerinden Yaban Tip *S. coelicolor* A(3)2 Hücrelerine Aktarımı 59
6.4.1. *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi 60
6.5. *relA* Ekspresyonunun Antibiyotik Üretimine Etkisi 62
7. TARTIŞMA VE SONUÇ 66

KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
α	:	Alfa
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
σ	:	Sigma
~	:	Yaklaşık
Amp	:	Ampisilin
Apr	:	Apramisin
ATP	:	Adenozin trifosfat
***Bam*HI**	:	*Bacillus amyloliquefaciens* H endonükleaz
Bç	:	Baz çifti
$CaCl_2$	:	Kalsiyum klorür
CDA	:	Kalsiyum bağımlı antibiyotik
DAM	:	Deoksiadenozin metilaz
DnaB	:	DNA helikaz
DnaG	:	DNA primaz enzimi
dk	:	Dakika
***Eco*RI**	:	*Escherichia coli* endonuclease I
***Eco*RV**	:	*Escherichia coli* endonuclease V
EDTA	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
EtBr	:	Etidyum bromid
EF-G	:	Translasyon uzama faktörü G
GppA	:	Guanozin pentafosfat fosfohidrolaz
HCl	:	Hidroklorik asit
IF2	:	Translasyon başlama faktörü 2
kb	:	Kilobaz
KCl	:	Potasyum klorür
KOAc	:	Potasyum asetat
KOH	:	Potasyum hidroksit

***Kpn*I**	:	*Klebsiella pneumoniae* endonükleaz I
L	:	Litre
LB	:	Luria-Bertani Broth
M	:	Molar
mg	:	Miligram
Mg^{+2}	:	Magnezyum iyonu
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Mmy	:	Metilenomisin
$MnCl_2$	:	manganez (II) klorid
NaCl	:	Sodyum klorür
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NTP	:	Nükleotit trifosfat
Pα	:	Alfa fosfat
ppGpp	:	Guanozin tetrafosfat
PPi	:	Pirofosfat
pppGpp	:	Guanozin pentafosfat
pSK	:	pBluescript II SK
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAP	:	RNA polimeraz enzimi
rpoD	:	RNA polimeraz sigma faktörü RpoD (sigma-70)
rpoS	:	RNA polimeraz sigma faktörü RpoS (sigma S / sigma-38)
***Sal*I**	:	*Streptomyces albus* endonükleaz I
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	:	Saniye
SSB	:	Tek zincir bağlama proteini
Tris	:	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
***Xba*I**	:	*Xanthomonas badrii* endonükleaz I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa**

2.1: RelA ve SpoT enzimlerinin alarmon metabolizmasındaki rolü. 6
2.2: RelA enziminin amino asit açlığından kaynaklanan yüksüz tRNA birikimine dayalı aktivasyonu. 8
2.3: ppGpp ve DksA aracılığıyla transkripsiyonun kontrolü. 10
2.4: RNAP aktif bölgesinde bulunan Mg^{+2} iyonlarının polimerazyona katkısı. 11
2.5: Dam metiltransferazın ve SeqA proteinin replikasyon üzerindeki etkisi. 12
3.1: Aktinobakterilerin yaşam döngüsü. 15
3.2: *Streptomyces coelicolor* A(3)2 hücreleri tarafından üretilen antibiyotikler. 18
4.1: Çalışmada kullanılan belirteçler. 21
4.2: pET6xHN-N ekspresyon vektörü (2958 bç). 28
4.3: pHZ1351 mekik vektörü (8300 bç). 28
4.4 : pBluescript SK(-) ekspresyon vektörü (2958 bç). 29
4.5: pRA mekik vektörü (5769 bç). 29
4.6 : pSPG mekik vektörü (8149 bç). 30
4.7: *relA* geninin (SCO1513) StL2 kozmidi üzerindeki lokasyonu. 30
4.8: *S. coelicolor* hücrelerinde *apt–relA* bölgesinin restriksiyon haritası. 31
4.9: pRA ve pHZ1351 plazmitlerine klonlanacak *S. coelicolor relA* geninin ileri primer dizisinin lokasyonu. 31
5.1: Elektroporasyon yönteminin genel şeması. 39
6.1: *E. coli* DH5α hücrelerinden izole edilen StL2 kozmiti (~ 39 kb) ve PZR ile çoğaltılan *relA* geni (~ 2.5 kb). 46
6.2: pRA ve pHZ1351 plazmitlerinin restriksiyon endonükleaz kesimi sonuçları. 47
6.3: Olası rekombinant pRA ve pHZ1351 plazmitlerinin taranması. 48
6.4: Transformantların pRA+*relA* için taranması. 49
6.5: pRA plazmidinin kesilmemiş ve kesilmiş haldeki jel görüntüsü. 49
6.6: Ligasyona hazırlanan pHZ1351 plazmidinin jel görüntüsü. 50
6.7: Ligasyon öncesi pET6xHN vektörü ve *relA* geni. 51
6.8: pET6xNH-N+*relA* plazmidi için taranan transformantların koloni PZR sonuçları. 51

6.9: pET6xNH-N+*relA* plazmidi için taranan transformantların kesim sonuçları. 52
6.10: Ligasyon öncesi pSK(-) vektörü ve *relA* geni. 52
6.11: pSK(-)+r*elA* plazmidi için taranan transformantların koloni PZR sonuçları. 53
6.12: *Bam*HI kesimi aracılığıyla aktarılan genin yönünün belirlenmesi. 54
6.13: Farklı bağlanma sıcaklıklarında *relA* genine (~ 3 kb) ait PZR sonucu. 55
6.14: Ligasyona hazırlanan pSPG plazmidi ve *relA* geni. 55
6.15: Olası rekombinant DNA'nın *Nde*I-*Spe*I kesiminin agaroz jel görüntüsü. 56
6.16: Dizi analizi sonucu elde edilen DNA sekansının *S. coelicolor* A(3)2'ye ait *relA* geni ile karşılaştırılması. 57
6.17: *E. coli* DH5α-pSPG/*relA* hücresinin sırayla a) %0.5, b) %1 ve c) %5 gliserol ile indüklenmesi sonucu oluşan ekspresyon profili. 58
6.18: Olası *E. coli* ET12567 mutantlarının doğrulanması. 59
6.19: pSPG/*relA* plazmidini içerdiği düşünülen *S. coelicolor* hücrelerinin zamana bağlı görünümü. 59
6.20: Konjugasyon sonrası olası *S. coelicolor* mutantlarının doğrulanması. 60
6.21: Comassie Plus Reagent Protein Assay ile oluşturulan standart eğri grafiği. 61
6.22: *S. coelicolor*-pSPG/*relA* hücresinin farklı konsantrasyonlarda gliserol ile indüklenmesi sonucu oluşan 120 saatlik ekspresyon profili. 62
6.23: Yaban tip ve mutant *S. coelicolor* hücrelerinin zamana bağlı üreme eğrisi. 63
6.24: Aktinorhodin antibiyotiğinin yaban tip ve mutant hücrelerde spesifik aktiviteleri. 64
6.25: Undesilprodigiosin antibiyotiğinin yaban tip ve mutant hücrelerde spesifik aktiviteleri. 65

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No: **Sayfa**

4.1: Çalışmada faydalanılan mikroorganizmalar ve kaynakları. 21
4.2: Deneylerde kullanılan çözelti ve antibiyotikler. 26
4.3: Tez çalışması kapsamında kullanılan plazmitlerin genel özellikleri ve kaynakları. 27
4.4: Çalışmada kullanılan tüm primerler. 32
5.1: *relA* geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR protokolü ve programı. 35
5.2: Enzim kesimiyle oluşan fragmanların 5'- uçlarının doldurulması. 36
6.1: Plazmitlerin restriksiyon endonükleaz kesimleri sonucunda beklenen bant büyüklükleri. 47
6.2: Genin plazmitlere yerleşim durumuna göre kesim sonucunda beklenen bant büyüklükleri. 53

1. GİRİŞ

Filament formunda olmaları ve küf benzeri çoğalma mekanizmaları bakımından mantarlarla çeşitli benzerlikler gösteren Streptomycetes'ler, genetik materyallerinde yüksek GC içeriğine sahip, Gram-pozitif, toprak bakterileridir. Bu sıradışı mikroorganizmalar, tıbbi veya endüstriyel açıdan oldukça öneme sahip pek çok biyoaktif sekonder metabolitin üretimini gerçekleştirmektedir [1], [2].

Bir *Streptomyces* türü olan *Streptomyces coelicolor* en az 5 farklı antibiyotiği sentezleyebilme yeteneğine sahip olup genetik çalışmalarda sıklıkla model organizma olarak kullanılmaktadır. Antibiyotik ve diğer ikincil metabolitlerin üretimi, besin kıtlığı gibi stres faktörleriyle aktive olan "sınırlandırılmış cevap" mekanizması üzerinden artırılabilir. Sınırlandırılmış cevap, ortamda yeterli besin bulunmaması durumunda, mikroorganizmaların alarmon (ppGpp ve pppGpp) üreterek metabolik durumlarının yeni koşullara adaptasyonu sağlayacak şekilde yeniden düzenlenmesini tetikler. RelA ve SpoT, hücresel (p)ppGpp seviyesinin artırılmasında görev alan iki temel proteindir.

Tüm gelişmelere rağmen bakteriyel enfeksiyonların her yıl yaklaşık 17 milyon insanın ölümüne neden olduğu düşünülürse, ikincil metabolizma regülasyonunun tam olarak anlaşılabilmesi antibiyotik gibi dikkat çekici sekonder metabolitlerin daha verimli bir şekilde üretilebilmesine olanak tanıyacaktır [2]. Bu yüzden bu çalışma kapsamında, sekonder mekanizmanın kontrolünde aktif rol oynayan RelA proteinin yüksek düzeyde ifadesinin antibiyotik üretimi üzerinden sekonder mekanizmaya ve bakteriyel büyümeye etkisi araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Streptomycetes'ler her ne kadar farklı sekonder metabolitler (antiviraller, immünosupresifler ve tümör karşıtı metabolitler gibi) üretebiliyor olsa da muhtemelen en fazla antibiyotik üretim yetenekleri sayesinde dikkat çekmektedir [2]. Öyle ki her Streptomyces türü o türe spesifik olan birkaç farklı antibiyotiği üretebilir ve bu durum ticari ve medikal amaçlarla kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %75'ini üretebilen *Streptomyces*'leri özellikle tıp ve genetik gibi alanlarda önemli bir noktaya taşımaktadır [3], [4].

Ayrıca bu mikroorganizmaların sahip olduğu yolakların çoğunun antimikrobiyal, antitümör ve enzim inhibitörleri gibi sekonder (ikincil) metabolitlerin üretimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir [3]. Metilenomisin (Mmy), kalsiyum bağımlı antibiyotik (CDA) ve aktinorhodin (Act) gibi antibiyotiklerin sentezinde önemli bir yeri olan *S. coelicolor*, 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 [2], [4], [5].

Bu tez çalışması kapsamında alarmon üretimi üzerinden ikincil metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan *relA* geninin çok kopyalı bir plazmitle *S. coelicolor* hücresine aktarılarak, bu geni yüksek düzeyde eksprese edebilen bir rekombinant suş oluşturulması ve bu suşta antibiyotik üretiminin ve bakteriyel büyümenin ölçülmesi amaçlanmıştır.

2. ALARMON ÜRETİMİNİN SINIRLANDIRILMIŞ CEVAPTAKİ YERİ

Mikroorganizmalar yaşamlarını devam ettirebilmek için, çevrelerinde olup biteni algılamak ve hücresel sistemlerini tehdit eden bir durum söz konusu olduğunda ona karşı tedbir almak zorundadır. Sınırlandırılmış cevap mekanizması bu aşamada devreye girmekte ve antibiyotik sentezi de dahil bir çok hücresel süreci yeniden yapılandırarak hücrenin bu yeni koşula uyum sağlamasını teşvik etmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların günümüzde hala ciddi sağlık problemleri arasında yer aldığı düşünülürse, antibiyotik üretimini teşvik eden mekanizmaların aydınlatılması hayati önem taşımaktadır. Bu kapsamda sınırlandırılmış cevap ve alarmonlar arasındaki etkileşimlerin daha fazla araştırılması, *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) bakterisinin ikincil metabolizmasının aydınlatılmasında önemli ölçüde katkı sunacaktır.

2.1. Sınırlandırılmış Cevap Mekanizması

Birbirinden oldukça farklı nişlerde barınabilen bakteri hücreleri, ortam koşulları onları tehdit etmeye başladığında ilk etapta zorlansalar bile kısa sürede devreye giren ve çok sayıda düzenleyici (regülatör) mekanizma barındıran adaptasyon yetenekleri sayesinde bu koşullarla başa çıkabilirler [6].

Adaptasyon sürecinde mikroorganizmalar, bulundukları ortamdaki değişimleri bir dizi algılama sistemiyle (sensory systems) farkedip, ilişkili hücresel yolakları uyarır ve bu sayede çeşitli sekonder (ikincil) mesajcıların üretimini sağlayarak, bu yeni koşula uyum sağlarlar [7], [8]. Isı şoku veya besin kıtlığı gibi çevresel sinyallerin etkisiyle stres toleransının ve onunla alakalı metabolik yolakların düzenlenmesi bu duruma bir örnektir [7]. Stresle başa çıkmak adına hücrede meydana gelen fizyolojik değişimler (örneğin, transkripsiyon profillerinin değişimi), "sınırlandırılmış cevap" (stringent response, SR) olarak adlandırılmaktadır ve bu mekanizma ilk olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) hücrelerinde tespit edilmiştir [6], [8].

2.2. Stres Cevabından Sorumlu Anahtar Moleküller

E. coli hücrelerindeki sınırlandırılmış cevap sistemi oldukça hızlı bir şekilde uyarılarak, hücrelerin logaritmik fazdan durağan faza geçirilmesi ve bu sayede

hücresel kaynakların yeniden tahsisinin yanısıra sahip olunan enerjinin mümkün olduğunca korunması sağlanır [9]-[11]. Bu fizyolojik dönüşüm sürecindeki anahtar bileşenler, “alarmonlar” olarak adlandırılan ve 40 yıldan uzun zaman önce keşfedilen sıradışı guanozin nükleotitleridir [9], [12], [13]. Konsantrasyonu strese bağlı olarak değişim gösteren bu sekonder metabolitler, guanozin tetrafosfat (ppGpp) ile guanozin pentafosfat (pppGpp)) moleküllerini içerir (ppGpp and pppGpp: bu çalışma boyunca bu iki molekül birlikte (p)ppGpp olarak isimlendirilecektir) [6], [8], [10], [14].

2.3. Alarmon Seviyesinin Hücrenin Ekspresyon Profiline Etkisi

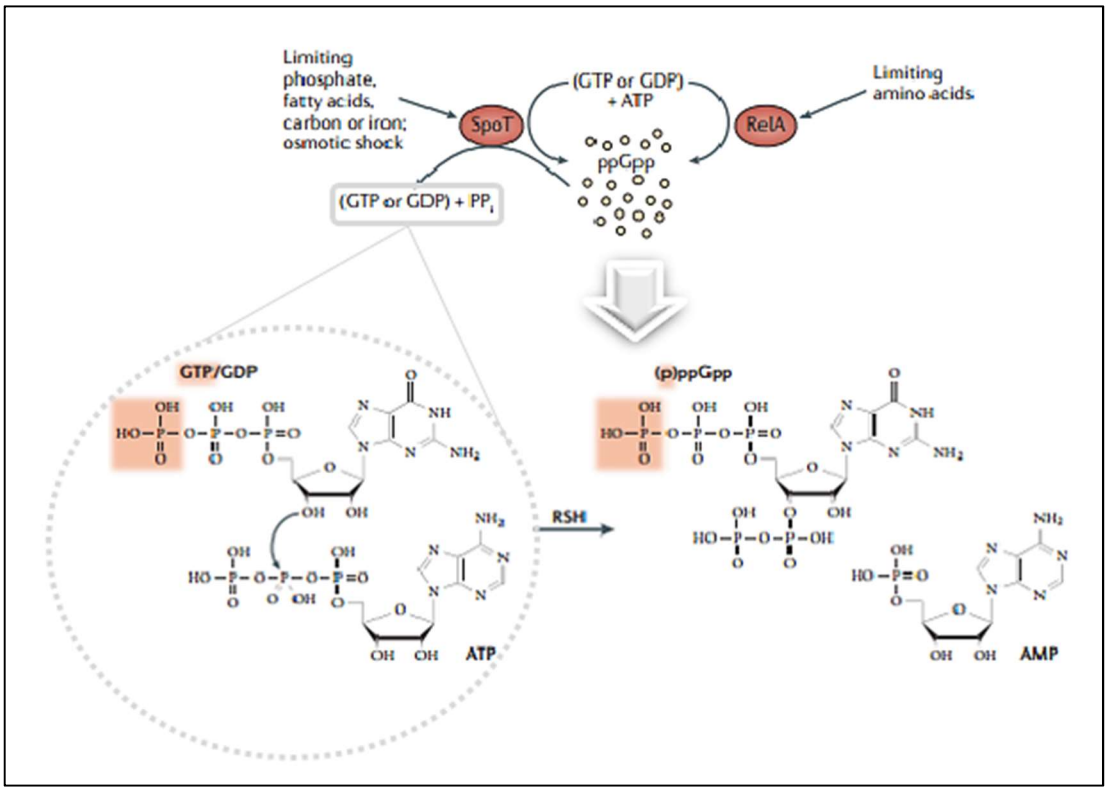
Alarmonların önemli bir özelliği çok düşük konsantrasyonlarda bile etki gösterebilmeleridir [12]. Ancak alarmon seviyesi, adaptasyon sürecindeki ekspresyon profilinin belirlenmesi açısından önemlidir. Çünkü (p)ppGpp konsantrasyonu, genel (global) transkripsiyon faktörü olan Lrp (leucine responsive protein) ve genel stres cevabında rol oynayan RpoS (alternatif sigma faktörü, σ^S) regülonlarından hangisinin aktive olacağını belirler [10], [15], [16]. Bu süreçte, düşük seviyeli (p)ppGpp, Lrp regülonunu uyararak aminoasit biyosentezi ve metabolizmasına ilişkin çok sayıda genin düzenlenmesini sağlar. Böylece aktif büyümeyi teşvik eden kaynakların sürdürülmesi sağlanır [15]. Ancak strese bağlı olarak (p)ppGpp seviyesi artacaktır ve yüksek (p)ppGpp seviyesi, RpoS bağımlı genlerin (örneğin, besin yetersizliği, oksidatif ve ozmotik stres cevabıyla ilişkili genler) aktivasyonu üzerinden hücresel kaynakların sadece hücreyi hayatta tutmak amacıyla kullanılmalarını sağlayacaktır. Böylece hücreler durgun fazda yaşamlarına devam ederler [15], [17].

2.4. Alarmon Sentezinde Görevli Enzimler

Sınırlandırılmış cevap mekanizması, temel olarak RelA/SpoT homolog (RSH) ailesinin birer üyesi olan, çok domainli (multidomain) RelA ve SpoT enzimlerinin aktif rol oynadığı yolaklar tarafından kontrol edilir [8], [13], [18]. RelA gibi monofonsiyonel sentetazlar *E. coli* gibi mikroorganizmalarda sadece sentetaz (SYNTH) domainleri vasıtasıyla (p)ppGpp üretiminden sorumluyken, SpoT gibi bifonksiyonel sentetaz-hidrolaz enzimleri guanozin nükleotidlerin hem üretiminde hem de hidroliz domainleri (HD) aracılığıyla degradasyonunda görev alır. Güçlü hidroliz ve zayıf sentez yeteneği bulunan SpoT enzimi, bir GTP-bağlanma proteini olan CgtA ile etkileşim kurar ve bu sayede muhtemelen besin kıtlığı gibi bir sorun

bulunmuyorsa enzimin hidroliz yeteneği arttırılır [19]. Ayrıca bu özellik RelA tarafından üretilen alarmon seviyesini dengeleme açısından da elzemdir [13], [18]. Çünkü ppGpp birikiminin replikasyonu durdurduğu ve hücre döngüsü kontolünü bozduğu, böylece *E. coli* ve *Pseudomonas putida* gibi hücrelerde *relA*'nın yüksek seviyede ifadesinin hücre büyümesini sınırlandırıldığı bilinmektedir [12], [13], [20]. Oysa bu hücrelerinin aksine *S. coelicolor* hücrelerinde bulunan RelA proteinin büyümeyi baskılamadığı öne sürülmüştür [21]. *S. coelicolor* RelA proteini aminoasit sekansı açısından *E. coli* hücrelerindeki RelA proteinine (%38.5 benzerlik) kıyasla SpoT proteinine (%42.6 benzerlik) daha fazla benzerlik göstermektedir.

RelA ve SpoT enzimleri hidroliz domaini (HD, RelA'daki inaktif) (p)ppGpp sentetaz (SYNTH) domaini, TGS domain (ThrRS, GTPaz ve SpoT domainlerinden oluşan), helikal domain, korunmuş sistein (CC) rezidülerini içeren bir domain ve ACT domaini (aspartokinaz, chorismate kinaz ve TyrA domainlerini içeren) olmak üzere toplamda 6 ortak domaini paylaşırlar [8]. Bu iki enzimin yanısıra sadece sentez veya hidroliz domaini bulunduran küçük alarmon sentetaz (small alarmone synthases, SAS) ve hidrolazlar (small alarmone hydrolases, SAH) da bulunmaktadır [12]. Kısaca RSH genel olarak hem ATP'den GDP/GTP molekülüne (3' pozisyonuna) pirofosforil transferiyle (p)ppGpp sentezi yapan, hem de (p)ppGpp molekülünün pirofosfat (PP_i) ve GDP/GTP'ye hidrolizini katalizleyen enzimlerden meydana gelir (Şekil 2.1) [7], [8], [13], [18]. *E. coli* hücrelerinde sentezlenen (p)ppGpp molekülü, bir fosfohidrolaz enzimi olan ve güçlü bir ekzopolifosfataz aktivitesi bulunan GppA (guanozin pentafosfat fosfohidrolaz, GPP) yardımıyla ppGpp'ye dönüştürülür [9], [22], [23]. Enzim bu işlevini pppGpp molekülünden 5' fosfat grubunu uzaklaştırarak gerçekleştirir [23].



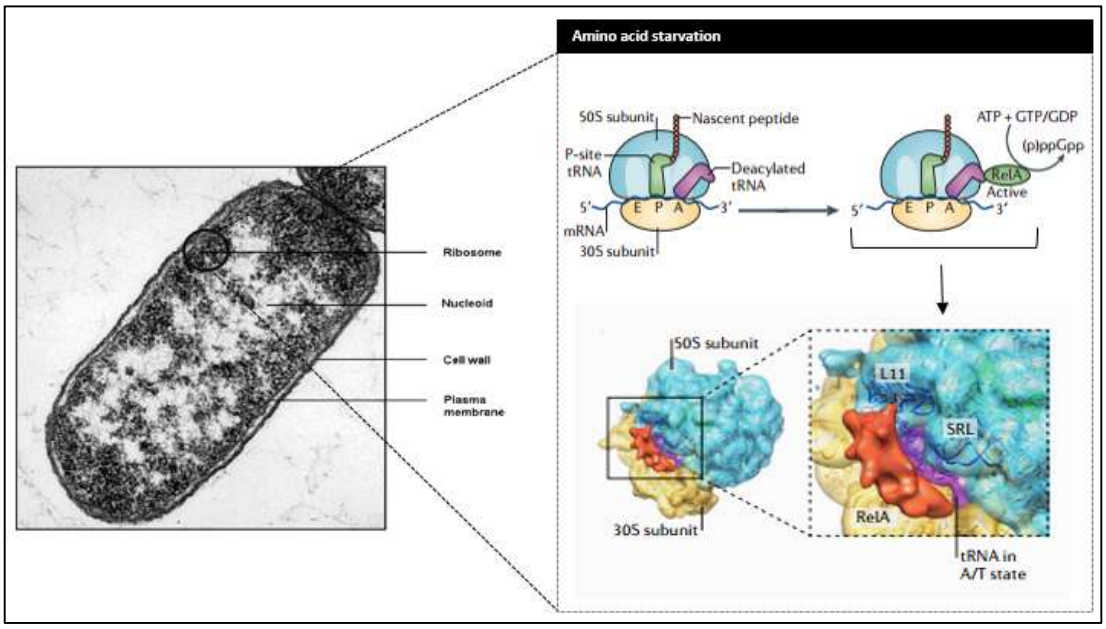
Şekil 2.1: RelA ve SpoT enzimlerinin alarmon metabolizmasındaki rolü.

Alarmon sentez ve hidrolizinde görevli enzimler bakterilerde büyük ölçüde korunmuştur ve geniş bir dağılım gösterirler [12]. Planctomycetes, Verrucomicrobia ve Chylamydiae (PVC üst şubesi) şubesindeki bakteriler ile statik bir ortama sahip bazı zorunlu hücre içi patojenler (örneğin, *Treponema pallidum*) ve endosimbiyontlar (örneğin, *Buchnera aphidicola*) dışında neredeyse tüm bakteriler bu enzimleri içermektedir [6], [8], [24]. Ayrıca bu enzimlerin bakteri, protista, bitki, hayvan ve *Homo sapiens*'te homolog genler tarafından kodlanması da önemli ölçüde korunduğunun bir kanıtıdır [25]. Her ne kadar bu enzimleri geniş bir organizma spektrumunda gözlesek de, her hücrede aynı kombinasyonda bulunmak zorunda değildirler. Örneğin, çoğu Gram-negatif bakteri (*E. coli*, *Salmonella* ve *Pseudomonas* gibi) RelA ve SpoT enzimlerini birlikte içerirken, *Bacillus subtilis* bir RHS ile iki SAS:RelA, RelP (YwaC) ve RelQ (YjbM) enzimlerine sahiptir [8], [12].

RelA ve SpoT proteinleri fonksiyonel farklılıkların dışında cevap verdikleri stres uyaranları açısından da birbirinden ayrılmaktadır. Örneğin, SpoT proteini çeşitli besin maddelerinin yetersizliği durumunda (sınırlı miktarda karbon kaynağı, fosfat, demir ve/veya yağ asidi varlığında) uyarılırken, RelA proteini ise ısı şoku ve aminoasit açlığı sırasında biriken yüksüz tRNA'ları içeren daha spesifik bir uyaran grubu tarafından

aktive edilir [7], [8], [13]. Böylece SpoT'den farklı olarak RelA uyarımını belirleyen temel faktör, hücrenin translasyonel durumudur. Normal büyüme şartları altında protein sentezi ribozomun aminoaçil (A) bölgesine bağlanan yüklü tRNA'lar tarafından yönetilirken, aminoasit yetersizliği yüksüz (deasetillenmiş) tRNA'ların birikimine (logaritmik büyüme fazında bu oran yaklaşık %15 iken aminoasit açlığı durumunda %80'in üzerine çıkar) ve ribozomun A bölgesini meşgul etmelerine sebep olur [8], [12], [26]. Bu sayede RelA, aksamış (stalled) ribozoma çekilerek yüksüz tRNA'ya bağlanır [8], [10]. Aslında bu modelin aksini öngören yani RelA'nın ribozoma yüksüz tRNA'dan bağımsız bir şekilde bağlandığını ve bu tRNA'ların ribozoma bağlanmasının, RelA'nın kompleksteki kararlılığının (stabilizasyon) sağlanması açısından önemli olduğunu öne süren çalışmalar da mevcuttur [27].

RelA proteini tRNA'nın yanısıra, muhtemel fonksiyonu mRNA-tRNA translokasyonu sırasında uzama faktörü G (EF-G)'nin ribozom üzerindeki stabilizasyonunu sağlamak olan 23S rRNA'nın SRL (sarcin-ricin loop) bölgesiyle ve 50S L11 proteiniyle etkileşim kurar [8], [28]. Ribozomal L11 proteininin RelA aktivasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir [8]. Çeşitli etkileşimler sonucunda açık konformasyona geçen RelA proteini, A bölgesindeki yüksüz tRNA'nın A/T-benzeri konformasyonunu (A/R (30S A-site/RelA-bound) tRNA) stabilize eder (Şekil 2.2) [8], [29]. Aynı zamanda enzimin TGS domaininin tRNA'nın CCA ucuyla olan etkileşimi de muhtemelen yüklü ve yüksüz tRNA'ların ayırt edilmesi için gereklidir [29]. Kısaca RelA'nın yüksüz tRNA'ya bağlanması çeşitli yapısal düzenlemeleri uyarmakta ve bu proteinin açık konformasyona geçmesini sağlamaktadır. Bir varsayıma göre bu sayede RelA, kendi CTD bölgesinin (C-terminal domain) NTD (N-terminal domain) üzerindeki otoinhibitör etkisini kaldırarak (p)ppGpp sentezini gerçekleştirmektedir [27], [29]. Sonuç olarak enzim konformasyonunun ve buna bağlı aktivitesinin düzenlenmesiyle ppGpp metabolizması kontrol edilir ve bu süreçte meydana gelen çok sayıdaki fizyolojik değişim, hücrenin yeni çevresel şartlara adapte olmasını sağlar [12].



Şekil 2.2: RelA enziminin amino asit açlığından kaynaklanan yüksüz tRNA birikimine dayalı aktivasyonu.

2.5. Alarmonların Etki Mekanizmaları

Alarmonlara dair bilgimiz zaman içinde artsa bile bu sıradışı moleküllerin etki mekanizmaları hala tam olarak çözülememiştir [12]. Genel olarak (p)ppGpp, hücre fizyolojisinde doğrudan veya dolaylı yollarla bir takım değişiklikler meydana getirerek, yeni koşullara adaptasyonu mümkün kılar [8], [12]. Bu bağlamda sınırlandırılmış cevap mekanizmasının en fazla ön plana çıkan amaçlarından bir tanesi hücresel kaynakların ve enerjinin mümkün olduğunca hücreyi hayatta tutacak sistemlerde kullanılmasıdır [8], [10], [11]. Bu yüzden logaritmik fazda bazal seviyede bulunan ve stresle birlikte artış gösteren alarmonlar belli transkriptlerin üretilmesini (örneğin, rRNA ve tRNA) ve replikasyonu inhibe ederek, nükleotid metabolizmasını düzenler [11], [12].

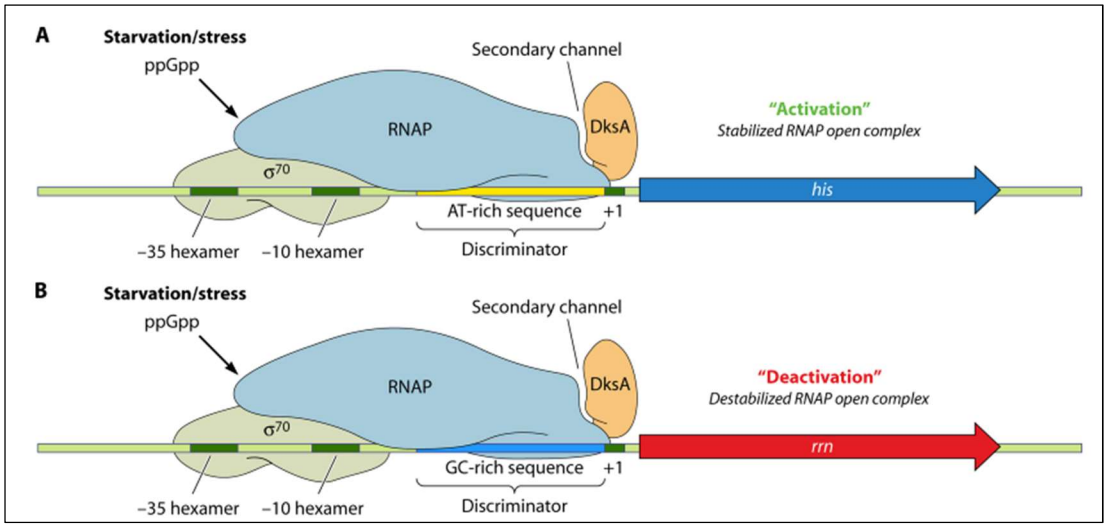
(p)ppGpp'nin transkripsiyon sürecini farklı mekanizmalar üzerinden düzenleyebildiğini öne süren çeşitli modeller vardır ve bu düzenleyici mekanizmalar, türler arasında farklılık gösterebilmektedir [8], [12]. *E. coli* hücrelerinde transkripsiyonun regülasyonu (örneğin, aminoasit sentezinin uyarılması veya rRNA operonlarının baskılanması), promotorun dizi özellikleri tarafından belirlenir ve buna bağlı olarak (p)ppGpp, RNA polimeraz (RNAP) üzerinden transkripsiyon başlangıcını kontrol eder [7], [12], [13]. Temel olarak bakteriyel RNAP enzimi 1 katalitik bölgeden (α2ββ'ω alt birimleri) ve enzimin promotoru, tanıyıp bağlanmasını teşvik eden 1 sigma

alt biriminden (σ faktör) meydana gelir. (p)ppGpp molekülü RNAP enziminin ω altbiriminde bulunan bazı rezidüler (metiyonin, alanin ve arjinin; MAR paterni) aracılığıyla uygun bir lokasyona yerleştirirlir [8]. Alarmonun RNAP'a bağlanması, açık promotor komplekslerinin kararlılığını bozar. Ayrıca bu molekül, yardımcı transkripsiyon faktörü olan DksA (DnaK supressor A) proteini ile sinerjik bir ilişki içinde çalışmaktadır [11].

(p)ppGpp molekülü ve DksA proteini, RNAP'da zıt yüzeylere bağlanmalarına ve herhangi bir fiziksel bir etkileşim içinde olmamalarına karşın DksA, alarmonun etkisini artırır ve RNAP'ı modifiye ederek, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynar [8], [24]. Bu protein, uzun çift kıvrımlı (coiled-coil) domain (N-terminal) ve küresel (globular) domain (C-terminal) olmak üzere iki domaine sahiptir ve DksA, RNAP enziminin ikincil kanalına yakın bir bölgeye bağlandıktan sonra proteinin çift kıvrımlı domaini bu kanalın içine doğru hareket eder [8], [30], [31]. İkincil kanalın temel işlevinin nükleotit substratlarını (NTP, Nükleotit Trifosfat) enzimin aktif bölgesine taşımak olduğu düşünülmektedir [8], [31]. Böylece DksA, ppGpp ile birlikte promotor kompleksinin kinetik özelliklerini değiştirip, kararlılığını bozarak veya oluşumunu engelleyerek RNAP aktivitesini düzenler ve özellikle güçlü bir şekilde σ^{70} (rpoD) hedefi olan promotorlarda (örneğin, rRNA sentezi, çeşitli proteinlerin üretimi ve flagella oluşumuna ilişkin promotorlarla birlikte birçok tRNA promotoru ve DksA'nin kendi promotoru) transkripsiyonu azaltmaktadır [12], [13], [30], [31]. Bu süreçte stres alternatif sigma faktörü σ^{E} birikimini uyarır ve RNAP bu sigma faktörüne bağlanarak, sınırlandırılmış cevap mekanizması açısından önemli olan birçok promotorun aktivasyonunu sağlar (sigma faktör yarışı) [7], [13]. Sonuç olarak DksA ve fazla miktarda ppGpp varlığında diskriminatör (discriminator) bölgelerinde yüksek oranda AT içeren promotorlar aktive edilirken, yüksek GC oranına sahip olanlar baskılanmaktadır (Şekil 2.3) [7], [24]. Böylece RNAP modifiye edilerek açık promotor kompleksinin kararlılığı değiştirilip, makromolekül metabolizması ve stres cevabından sorumlu yüzlerce genin ekspresyonu düzenlenir [24], [32].

Ayrıca, (p)ppGpp birikiminin gen ekspresyonu üzerinde daha dolaylı bir etikisinin olabilceğini öne süren çalışmalar da mevcuttur. Çünkü alarmonun bağlanma bölgesi ne RNAP'ın aktif bölgesinde ne de DNA kalıp zincirinin bağlandığı yerdedir. Bu yüzden RNAP aktivitesinde allosterik regülasyon da etkili olabilir. Bu süreçte magnezyumun (Mg^{+2}), RNAP üzerindeki etkileri ön plana çıkmaktadır. Mg^{+2} iyonları enzimin aktif bölgesinde lokalize olur ve bu bölgedeki asparajin rezidüleri tarafından

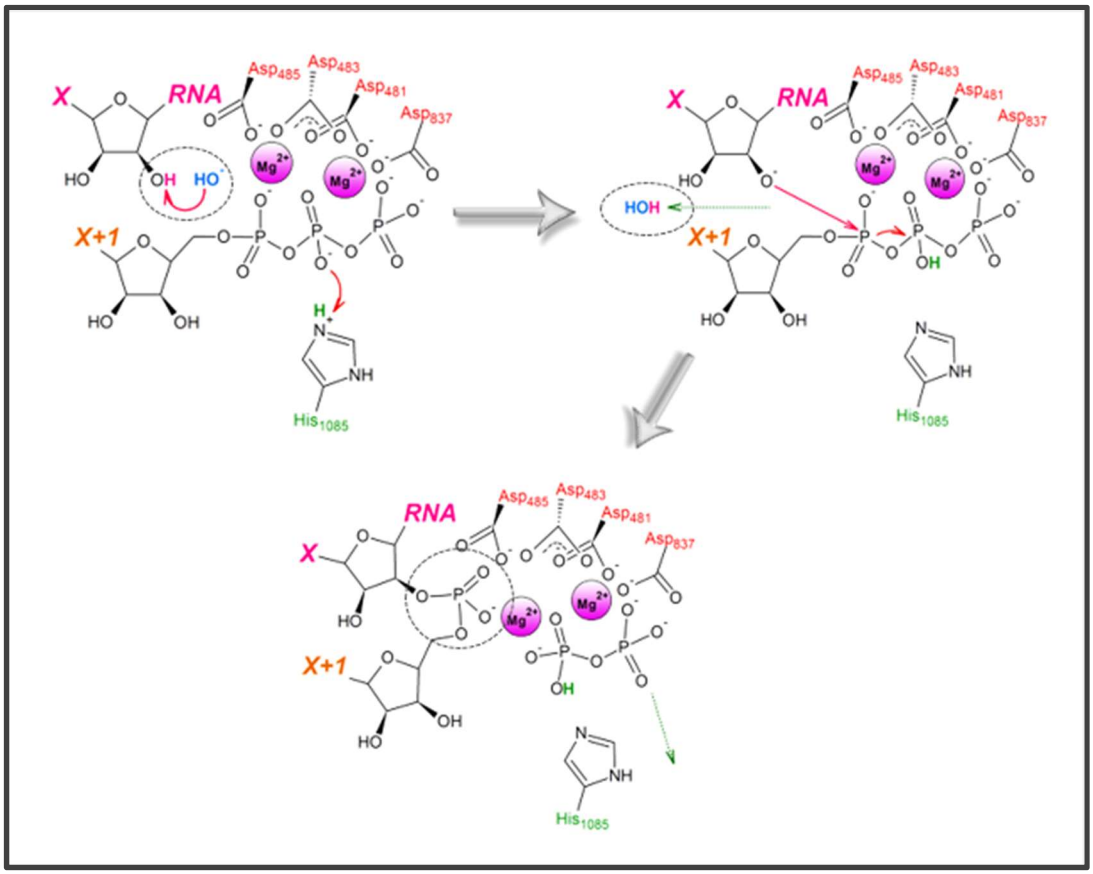
koordine edilir. Bu iyonlardan bir tanesi RNA'nın 3'OH grubundan bir proton kaybını teşvik eder ve bu sayede oksijen, NTP'nın α-fosfat (Pα) grubuna nükleofilik atak yaparak, PPi grubunun ayrılmasını ve yeni fosfodiester bağı oluşumunu (polimerizasyonu) katalizler (Şekil 2.4) [33]. (p)ppGpp molekülünün RNAP'a bağlanması bir takım allosterik değişimleri uyararak, Mg^{+2} iyonlarının lokasyonunu değiştirir ve RNAP aktivitesini dolaylı olarak düzenler [8].



Şekil 2.3: ppGpp ve DksA aracılığıyla transkripsiyonun kontrolü. Hücreler stres altındayken a) Özellikle AT oranı yüksek promotorlarda transkripsiyon uyarılırken, b) GC oranı yüksek promotorlarda ise baskılanmaktadır.

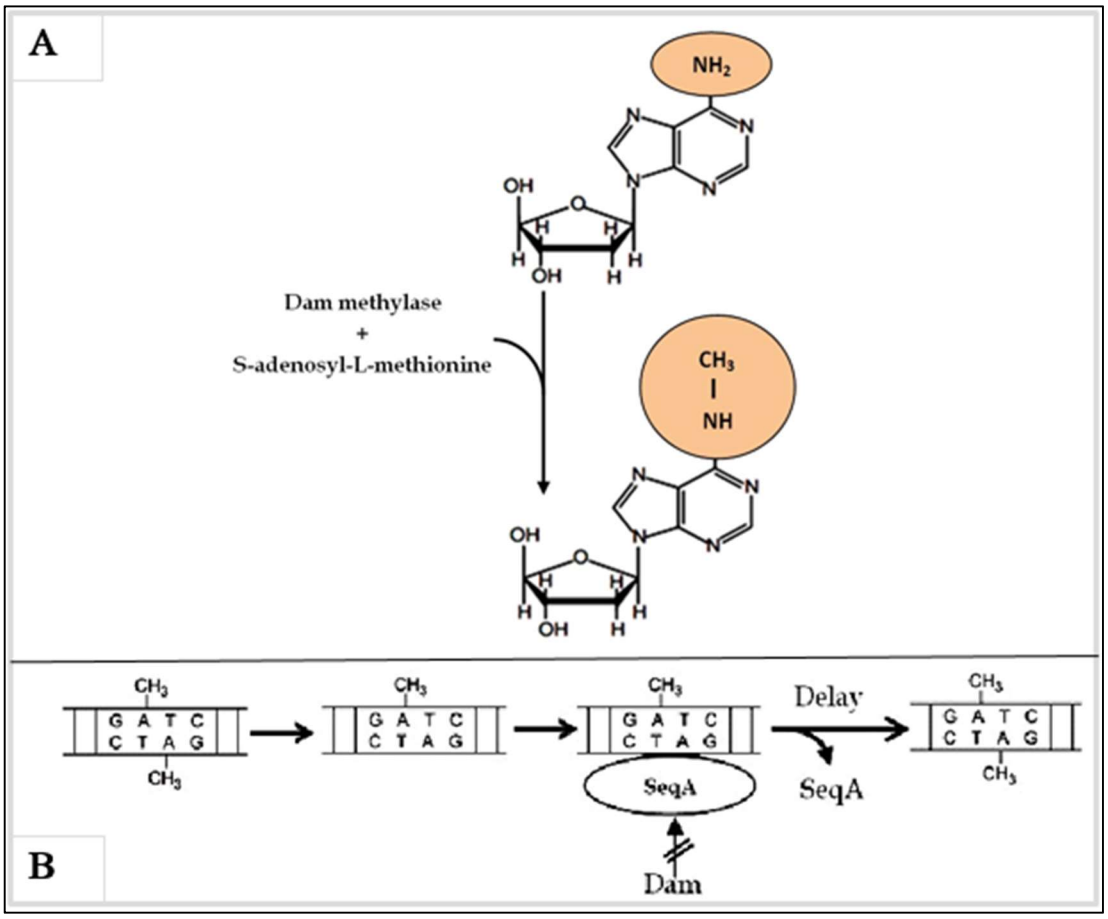
Transkripsiyonun yanısıra (p)ppGpp, strese bağlı olarak DNA replikasyonunu da etkilemektedir [6], [25]. *E. coli*'de Dam metiltransferaz (Deoksiadenozin metilaz) enzimi DNA'yı metilleyerek, replikasyon, transkripsiyon ve DNA tamiri gibi birçok süreci doğrudan kontrol eder. Metilasyon süreci S-adenozil-L-metiyonin (SAM) molekülünden bir metil grubunun GATC dizilerindeki adenine aktarılmasıyla yönetilmektedir (Şekil 2.5.a) [34].

Bakterilerde metilasyon sürecini düzenleyen diğer bir protein de SeqA'dır. Bu protein yarı-metillenmiş (hemimethylated) DNA'ya yüksek afiniteyle bağlanır ve proteinin bağlanma bölgesi (GATC dizisindeki metillenmiş adenin rezidüsü), Dam metil transferazınkiyle örtüşmektedir. Bu sayede SeqA proteini, Dam metiltransferaz enziminin yeni sentezlenmekte olan DNA'nın polimerizasyonunu baskılamasına engel olur ve replikasyon orjininin aktivasyonunu düzenler (Şekil 2.5.b). (p)ppGpp muhtemelen bu metilasyon-bağımlı veya SeqA-bağımlı mekanizmalar üzerinden replikasyonu kontrol etmektedir [12].



Şekil 2.4: RNAP aktif bölgesinde bulunan Mg^{+2} iyonlarının polimerazyona katkısı.

Replikasyonun kontrolünde alarmonlar tarafından hedeflenen diğer bir mekanizma, primer sentezidir [9], [12], [24], [25]. Bu süreç çok domainli bir enzim olan DNA primaz (DnaG) tarafından yönetilmektedir. Replizomun bir parçası olan primaz enzimi DNA helikaz (DnaB), tek zincir bağlama proteinleri (SSB) ve DNA polimeraz III ile etkileşim kurar [12]. *E. coli*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi farklı bakteri türlerinde (p)ppGpp molekülünün doğrudan primazın aktif bölgesine bağlanarak, enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. *B. Subtilis* hücrelerinde (p)ppGpp molekülünün inhibitör etkinliğinin ppGpp'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak bu durum DnaB varlığında tersine dönmektedir [9]. Kısaca alarmonlar primaz aktivitesi üzerinden primer etkinliğini düzenlenleyerek, polimerizasyon sürecini kontrol ederler [12], [25].



Şekil 2.5: Dam metiltransferazın ve SeqA proteinin replikasyon üzerindeki etkisi. a) Dam metiltransferaz enzimi, b) SeqA proteini.

Alarmonlar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak kontrol edilebilen diğer bir hücresel süreç de protein sentezidir. Dolaylı kontrol mekanizması ribozomal genlerin transkripsiyonel düzenlenmesini içerirken, (p)ppGpp molekülü aynı zamanda *E. coli* hücrelerinde doğrudan translasyon sürecinde görevli proteinlere (örneğin, başlama faktörü (IF2), uzama faktörü (EF-G) ve ribozom birleşme faktörü (ObgE)) bağlanarak hem translasyonun başlama ve polimerizasyon sürecini hem de ribozom kompleksi oluşumunu doğrudan kontrol edebilmektedir [6], [12].

Bahsedilen fonksiyonlarının dışında alarmonlar farklı canlılarda virulanslık (örneğin, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Legionella pneumophila*) hücre bölünmesi, lipit sentezi, enerji metbolizması, *Pseudomonas aeruginosa* hücrelerinin 'quorum sensing' mekanizması, DNA tamiri, pürin nükleotit havuzu ve polifosfat metabolizması gibi sistemlerin kontolünde de önemli yer tutmaktadır [8], [9], [11]-[13], [24], [25]. Böylece bu sıradışı yapılar birçok yolak üzerinde etkili olup, canlıyı değişen ortam koşullarına adapte etmek için yeniden programlarlar.

3. AKTİNOBAKTERİLER

Aktinobakteriler (ya da eski ismiyle Actinomisetler) genomik heterojeniteleri baz alındığında en büyük taxonomik birimler arasında yer almaktadır [36]. Genomlarında yüksek oranda G+C içeriğine sahip bu Gram-pozitif bakteri grubu kara ya da su ekosisteminde yaşayabilen üyelerin (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* ve *Salinispora* türleri vb.) yanısıra bazı probiotik (*Bifidobacterium* vb.) ve patojen mikroorganizmaları da (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, ve *Nocardia* türleri vb.) barındırmaktadır [36], [37].

Bu mikroorganizmalar bazı istisnalar dışında oksijenli solunum yapmakta ve kemoheterotrof gelişim göstermektedir [36]. Aktinobakteriler sahip oldukları enzimler sayesinde kompleks bazı polimerler (selüloz, kitin vb.) dahil pek çok organik materyalin ayrıştırılmasında rol oynar [36], [37]. Örneğin, bu bakteriler tarafından üretilip, dış ortama salınan amilaz enzimleri gıda endüstrisi, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Aynı şekilde çeşitli Aktinobakteriler tarafından üretilen lipaz enzimi, deterjan ve gıda endüstrisi gibi alanlarda önemli yer tutmaktadır. Ayrıca bazı Aktinobakteri üyelerinin (*S. karnatakensis* ve *S. albidoflavus* gibi) önemli bir L-asparajinaz kaynağı oldukları bilinmektedir [37]. Enzim üretimi konusunda, çok sayıda proteazı kültür ortamına salgılama yeteneği olan *Streptomyces*'ler özellikle ön plana çıkmaktadır. Örneğin, iyi tanınmış bir Streptomyces türü olan *S. coelicolor* 60 proteaz, 13 kitinaz, 8 selülaz/endoglukanaz, 3 amilaz ve 2 pektat liyaz enzimi üretebilme kapasitesine sahiptir [2]. Böylece Aktinobakteriler, organik madde dönüşümünde, humus oluşumunda, bitki gelişimi için önemli bir parametre olan toprağın besin değerinin artırılmasında ve karbon döngüsünde yadsınamaz bir öneme sahiptir. Bu özelliklerinin dışında bu bakteriler, antagonistik aktiviteleri sayesinde bitki patojenlerinin kontrolünde de rol oynarlar. Özellikle *Streptomyces*'ler toprak veya tohum kaynaklı bitkisel hastalıklarla mücadelede önemli bir yere sahiptir [37], [38]. Biyokontrol süreçlerindeki etkin fonksiyonlarının yanısıra *Streptomyces*'ler, çok sayıda metaboliti üretebilme, bu metabolitlerin biyodönüşümünü sağlama, lignoselüloz ve kitini parçalayabilme gibi özellikleri sayesinde dikkat çekmektedir [2]. Ayrıca Aktinobakterilerin bir başka yeteneği de enzim inhibitörü ve immün düzenleyiciler (immunemodifiers) üreterek sırayla kanser tedavisinde ve immün sistem aktivasyonunda görev almalarıdır [37].

Hücresel yapıları ele alındığında ise Aktinobakteriler, peptidoglikan hücre duvarı ve nükleoid yapısı bulundurmaları nedeniyle her ne kadar prokaryorlara has özellikler sergilemektedir. Ancak isminden (*Actinomyces*) de anlaşılacağı üzere (aktis ya da aktin (ısın demeti) ve mukēs (mantar)); bu bakteriler yaşam döngüleri açısından (filamentli yapıları sayesinde) mantarlara benzerlik gösterir. Çünkü çoğu miselli aktinomiset sporlanarak çoğalmaktadır. Böylece bu Aktinomisetler, bakteri ve mantar arasında bir yaşam formu sergilerler [36].

3.1. Aktinobakteri Grubunun Dikkat Çekici Mikroorganizmaları: *Streptomyces*'ler

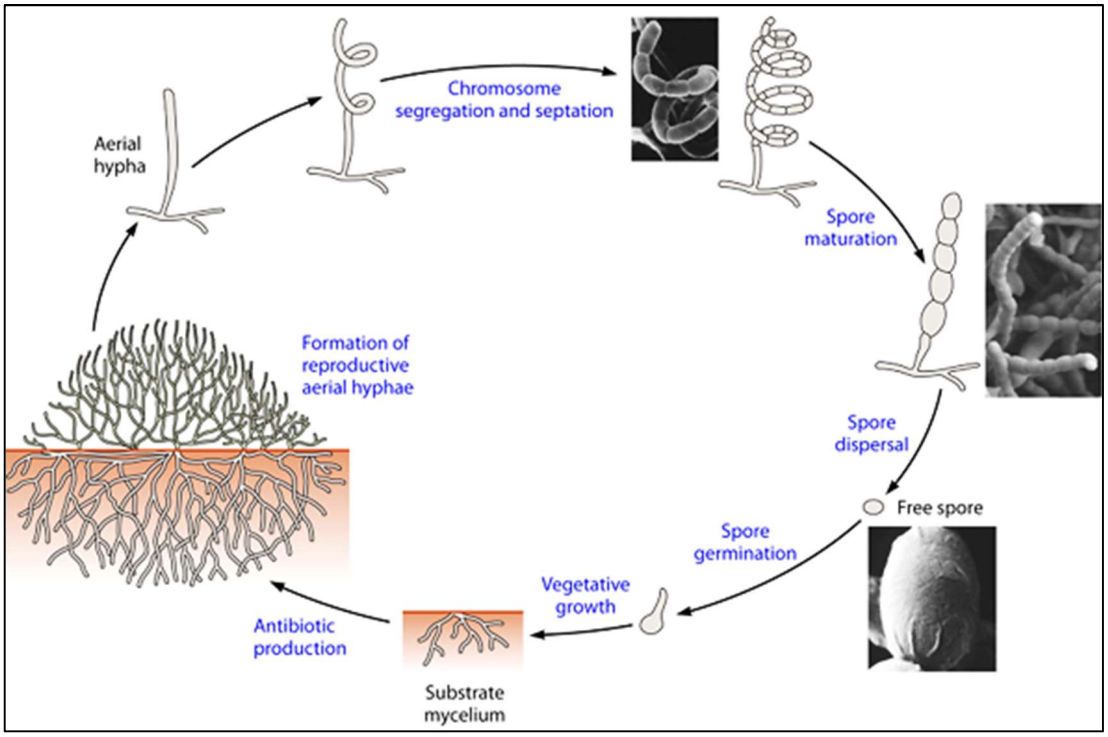
Streptomyces'ler en geniş Aktinobakteri cinsini oluşturan (> 500 Streptomyces cinsi) ve Streptomycetaceae familyasında yer alan, filamentli, kemoorganotrofik toprak bakterileridir [39], [40]. *E. coli* (%50 G+C içeren genom) ile kıyaslandığında genomlarında yüksek oranda (%69-78) G+C bulundurlar [2], [39]. Düşük pH'ya karşı çok duyarlı olan *Streptomyces*'ler kompleks gelişim karakterleri açısından da diğer bakterilerden ayrılmaktadır. Spor, vejetatif misel ve generatif misel hücrelerini kapsayan yaşam döngüleri; sporun çimlenerek vejetatif hif (substrat miselyumu) oluşturması, çok hücreli havasal (aerial) hifin büyümesi, septum oluşumu ve sporlanma aşamalarını kapsamaktadır [2], [41], [42].

3.2. *Streptomyces*'lerin Katı Besiyerindeki Yaşam Döngüsü

Katı besiyerinde büyütülen *Streptomyces* hücrelerinin yaşam döngüleri boyunca iki farklı misel yapısı (substrat miselyumu ve havasal miselyum) gözlenmektedir [43]. 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 [40], [44]. MII, besiyerinin içine doğru büyüyerek substrat miselyumunu oluşturur ve bu yapı da yüzeye ve agarın içine doğru büyümeye devam ederek yayılır [40], [42], [43].

Makromoleküler sentezin baskılanması aracılığıyla kısa süreli büyüme inhibisyonunun (growth arrest phase) ardından, havaya doğru büyüyen özelleşmiş havasal hif yapılarına farklılaşma gerçekleşir [40], [43]. 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 [44]. *Streptomyces* hücrelerinin yaşam döngüsünde son olarak hidrofobik spor zincirleri oluşturulur (Şekil 3.1) [43].



Şekil 3.1: Aktinobakterilerin yaşam döngüsü.

Programlı hücre ölümünü ve sporulasyonu içeren bu yaşam döngüsü sayseinde *Streptomyces* hücreleri 'çok hücreli prokaryotik model olarak' görülmektedir [42]. MI, MII ve programlı hücre ölümü mekanizmasının varlığı *S. antibioticus* ATCC11891 ve *S. coelicolor* M145 gibi *Streptomyces* türlerinde rapor edilmiştir [40].

3.3. *Streptomyces*'lerin Sıvı Besiyerindeki Yaşam Döngüsü

Aktinobakterilerde morfolojik ve fizyolojik farklılaşma arasındaki ilişki hücresel davranışı belirlemektedir. Bu durum sekonder metabolit üretimi ve morfolojik farklılaşma arasındaki güçlü bağdan da anlaşılabilir [42]. *S. venezuelae*, *S. griseus*, *S. albidoflavus* SMF301 ve *S. antibioticus* gibi türler dışında çoğu *Streptomyces* hücresi sıvı besiyerlerinde sporlanmazken, TBO gibi katı besiyerlerinde sporlanma gözlenmektedir [40], [44]. Genel bir büyüme davranışı olarak, sıvı besiyerlerinde *S. coelicolor* ve *S. griseus* gibi *Streptomyces* türlerinde pellet ve küme (clump) oluşturmaktadır [43], [44].

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 [45]. 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 [46]. Bu morfolojik ve fizyolojik farklılaşma süreçlerin yönetiminde çeşitli anahtar düzenleyiciler rol oynamaktadır [42].

Streptomyces morfolojisi, besiyeri içeriği ve sekonder metabolit üretimiyle alakalı çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur [43]. Antibiyotik üretimi gibi sekonder metabolizmaya ilişkin pek çok endüstriyel süreç sıvı besiyerlerinde gerçekleştirilmektedir [43], [47]. 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 ikinci misel oluşumu, antibiyotik üretimi gibi süreçlerin gecikmesine yol açmaktadır. İkinci çok nukleuslu misel gelişimi, hücrelerin ikinci bir büyüme fazına geçmesini sağlar ve böylece aktinorhodin ile undesilprodigiosin üretimi başlatılmış olur [43].

3.4. *Streptomyces*'lerin Antibiyotik Üretim Yeteneği

Streptomyces hücreleri farklı amaçlar için kullanılabilecek çok sayıda metabolitin üretimininden (örneğin, ökaryotik hücre farklılaşmasını teşvik eden moleküller, antifungallar, antiviraller, antitümör proteini (protein C kinase), immün baskılayıcılar, apoptoz aktivatör ve inhibitörleri) sorumlu olmasına karşın, kuşkusuz bu bakterinin en fazla göze çarpan özelliği antibiyotik üretim kapasitesidir [2], [43]. *Streptomyces*'lerin endüstriyel amaçlı üretilen abtibiyotiklerin üçte ikisinden sorumlu olduğu düşünüldüğünde, bu hücrelerin antibiyotik üretimiyle bu kadar özdeşleştirilmesi hiç de şaşırtıcı değildir [48].

Bakteri hücreleri rekabet ettikleri diğer hücrelerle başa çıkabilmek için farklı yapı ve mekanizmaları hedef alan antibiyotiklerden yararlanmaktadır. Genel hatlarıyla bu antimikrobiyal moleküller; hücre duvarı sentezi, replikasyon veya transkripsiyon gibi hayati süreçleri hedef alarak bakteriyel büyümeyi baskılar [42]. Aktinobakteriler,

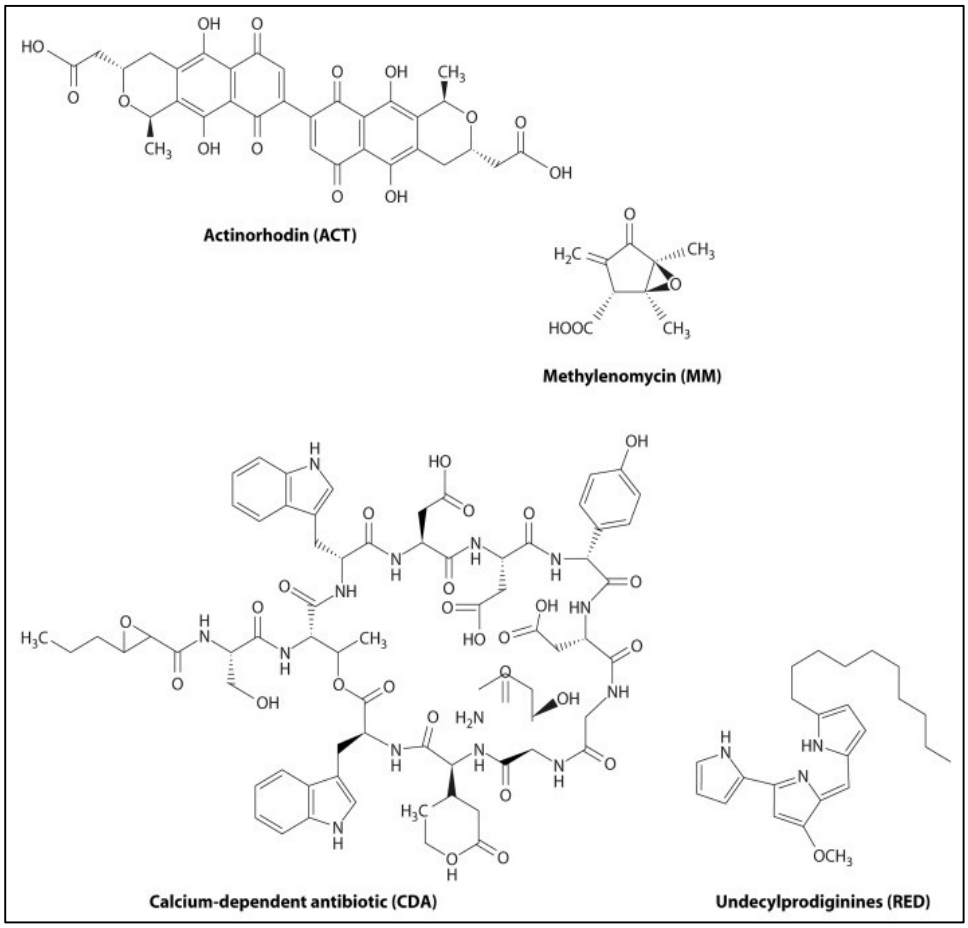
aminoglikozid (streptomisin ve kanamisin gibi), ansamisin (rifampin gibi), makrolid (eritromisin gibi), β-laktam (sefalosporin gibi) ve antrasiklin gibi farklı yapısal sınıflara ait pek çok antibiyotiği üretebilmektedir [37]. Ayrıca, farklı mekanizmalar üzerinden protein sentezini baskılayan çeşitli *Streptomyces* antibiyotikleri, sıklıkla laboratuvarlar ortamında kullanılmaktadır. *S. aureofaciens* tarafından üretilip, aminoaçil tRNA'ya bağlanabilen tetrasiklin, *S. venezuelae* tarafından sentezlenip 50S ribozomal alt birime bağlanabilen kloramfenikol, *S. griseus* tarafından sentezlenip rRNA'ya bağlanarak başlangıç kompleksinin oluşumunu baskılayan streptomisin, *S. kanamyceticus* tarafından üretilip 30S ribozomal alt birime bağlanabilen kanamisin ve *S. laurentii* tarafından üretilip ribozom-bağımlı EF-Tu ve EF-GTPaz'ı baskılayabilen tiyostrepton bu tarz antibiyotiklere örnektir [42].

Genel olarak antibiyotik üretiminden sorumlu gen kümeleri öncül moleküllerin biyosentezi, pozitif/negatif regülasyonu, taşınması ve direnci gibi mekanizmalarla ilintili farklı sayılarda gen içermektedir. Bu gen kümeleri çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. Örneğin, bir pleitropik regülatör olan ve morfolojik gelişim ve primer metabolizmada rol oynayan ActII-ORF4, aktinorhodin sentezini düzenlerken, RedD undesilprodigiosin üretiminde rol oynamaktadır [42].

3.5. RelA Proteinin *Streptomyces coelicolor* Hücrelerinde Antibiyotik Üretimine Etkisi

Bilimsel çalışmalarda özellikle iki *Streptomyces* türü (*S. griseus* ve *S. coelicolor*) ön plana çıkmaktadır. *S. griseus* endüstriyel anlamda antibiyotik üretimi için kullanılan ilk *Streptomyces* türüyken, miselli bir toprak bakterisi olan *S. coelicolor* kompleks düzenleyici yolakları ile genetik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır [2]. Bu mikroorganizma, ortam koşullarına bağlı olarak fizyolojisini yeniden programlayıp, morfolojik olarak farklılaşarak sekonder metabolizmasını harekete geçirebilme özelliğine sahiptir. Bu sayede tıp ve tarım gibi alanlarda önemli yeri olan pek çok ikincil metaboliti sentezleyebilir [49]. *S. coelicolor* A3(2) model organizmasının genom dizisinin analizi, bu hücrenin ikincil metablitlere ilişkin en az 29 gen kümesi içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Özellikle tip II poliketid sentaz temelli bir yolak tarafından sentezlenen mavi pigmentli aktinorhodin (ACT), yağ-asidi sentaz-benzeri bir yolak üzerinden sentezlenen kırmızı pigmentli undesilprodigiosin (RED), kalsiyum bağımlı antibiyotik (CDA) ve metilenomisin furan (MM) gibi farklı antibiyotikleri

(Şekil 3.2) üretebilme yeteneği hücrenin ikincil metabolizmasına olan ilgiyi artırmaktadır [4].



Şekil 3.2: *Streptomyces coelicolor* A(3)2 hücreleri tarafından üretilen antibiyotikler.

Sınırlı ortam koşullarında RelA proteini, hücrenin logaritmik büyüme fazının sonlarında ve geçiş (transition) fazı boyunca sınırlandırılmış cevap mekanizmasının baş aktörlerinden olan 'alarmonların birikimini' (amino asit ya da azot açlığı durumunda) desteklemektedir. Bu sayede hücrenin transkripsiyonel aktivitesi rRNA sentezi yerine antibiyotik gen kümeleri ve morfogenetik proteinlerin sentezi için kullanılmaktadır [50]. Antibiyotik üretimi sıvı besiyerinde genellikle düşük büyüme hızlarında veya durağan fazda gerçekleşirken, katı besiyerinde morfolojik farklılaşmanın başlamasıyla meydana gelmektedir [51].

RelA proteini ve antibiyotik üretimi arasındaki ilişkiyi ortayan koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Chakraburtty ve Bibb (1997) *Streptomyces coelicolor* A3(2) suşu ile yaptıkları çalışmada azotça fakir ortamda Δ*relA* mutantlarında redD and actII-ORF4 transkripsiyonun olumsuz etkilendiğini, Act ve Red antibiyotiklerinin

üretiminin bozulduğu ve morfolojik farklılaşmanın geciktiğini tespit etmiştir. Başka bir çalışmada glikoz, amonyum ve fosfatça fakir besiyerleri kullanılarak Δ*relA* mutantlarında Act ve Red üretimi incelenmiştir. Glikoz ve amonyumun sınırlandırıldığı durumlarda alarmon sentezi ile Act ve Red üretimi arasında güçlü bir bağlantı bulunurken, fosfatın sınırlandırılması durumunda mutant karakterin antibiyotik üretimini diğer besiyerleri kadar etkilemediği görülmüştür [51].

Sınırlandırılmış kaynaklara sahip besiyerlerinin aksine *S. coelicolor* Δ*relA* suşları zengin 'nutrient agar' besiyerinde büyütüldüğünde de morfolojik farklılaşma ve antibiyotik üretiminde sorunların olduğu bulunmuştur. Mutant hücreler 120 saatlik süreçte spor oluşturamamışlardır. Ayrıca karboksi-terminal bölgesi olmayan *relA* geni tiyostrepton tarafından uyarılabilir bir promotor altında ifade edilerek, RelA proteini, alarmon sentezi ve actII-ORF4 transkripsiyonu arasında amino asit açlığından bağımsız bir ilişki olduğu gösterilmiştir [52].

Bu tarz çalışmalar RelA'nın antibiyotik üretimi üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bölümde bahsedilen çalışmalar dışında bilgimiz dahilinde literatürde yer alan diğer çalışmaların da *relA* geninin silinerek ifadesinin engellenmesine veya ilgili genin Δ*relA* mutantlarına aktarılarak komplementasyonuna dayandığı görülmüştür. Bu yüzden bu tez çalışması kapsamında, zengin besiyeri (R2YE) kullanılmış ve *S. coelicolor* A(3)2 *relA* geni çok kopyalı bir plazmit ile yaban tip hücrelere aktarılmıştır. Zengin besiyeri kullanımıyla alarmon üretiminin strese bağlı uyarılabilen herhangi bir olası RelA homoloğuyla değil; doğrudan RelA proteininin yüksek düzeydeki üretimiyle sağlanacağından emin olunmuştur. Bir sonraki aşamada RelA ifadesinin, undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotiklerinin spesifik aktivitesine ve bakteriyel büyümeye olan etkisi araştırılmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gereçler

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Pepton (Bacto^{TM}), NaCl (Sigma-Aldrich), Maya özütü (Bacto^{TM}), Agar (Merck), NaOH (Merck), SDS (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), D (+) Glukoz (Merck), KOAc, İzopropanol, Agaroz (Sigma Aldrich), Etidyum bromid (Sigma Aldrich), Sükroz (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), MOPS (Sigma Aldrich), Gliserol (Riedel de Haen), $CaCl_2$ (Merck), $MgCl_2$ (Merck), KCl (Riedel de Haen), KCl (Riedel-de Haen), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99,5 Etanol (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), K_2HPO_4 (Merck), K_2SO_4(Merck), TES Buffer (Applichem), D (+) Glukoz (Merck), Mannitol (Merck), Bacto kazamino asit (BD), EDTA (Merck), %84-88 Gliserol (Sigma Aldrich). Pepton (Merck).

4.1.2. Kullanılan Enzimler

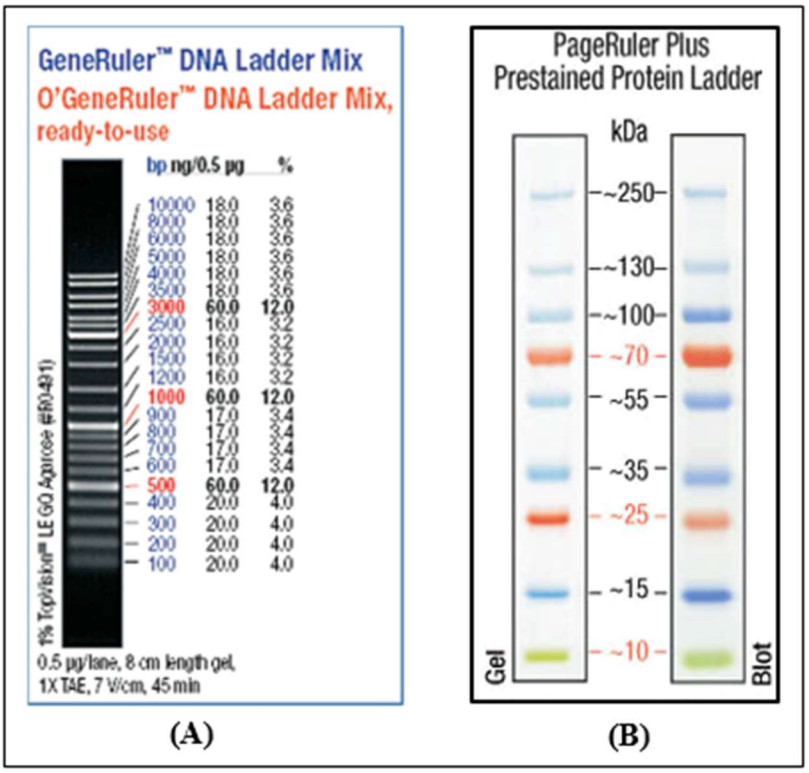
Kullanılan enzimler T4 DNA ligaz (Jena Bioscience), *Eco*RI Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Eco*RV Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Kpn*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Sal*I Restriksiyon Endonükleaz (Jena Bioscience), *Xba*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Nde*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *Spe*I Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma), *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), Klenow Fragment (Merck) ve Q5 DNA polimeraz (NEB, Biolabs) enzimleridir.

Reaksiyonlar enzim tedarikçisi firmaların önerdiği koşullarda ve belirtilen tampon çözeltiler kullanılarak kurulmuştur.

4.1.3. Kullanılan Kitler ve DNA Moleküler Belirteçleri

Hem kimyasal yöntemle izole edilen plazmitlerin ve PZR ürünlerinin temizlenmesinde hem de DNA'ların jelden saflaştırılması işlemlerinde PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon kiti (MN) kullanılmıştır. *relA* geninin pET6xNH-N plazmidine aktarımında In-Fusion® HD Klonlama kitinden (Clontech®) faydalanılmıştır.

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



Şekil 4.1: Çalışmada kullanılan belirteçler. a) 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Thermo, SMO311), b) Protein Belirteci (Fermentas).

4.2. Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

4.2.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada genetik manipülasyon amaçlı kullanılan tüm hücre suşları Tablo 4.1'de listelenmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada faydalanılan mikroorganizmalar ve kaynakları.

Bakteri türleri	Genotip özellikleri	Kaynak/Referans
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	[53]
E. coli TG1	Δ(*lac-pro*) *supE thi hsd5*/F' *traD36 proA*$^+$*B*$^+$*lacI*^{q} Δ(*lacZ*) M15	[54]
E. coli ET12567	*dam*, *dcm*, *hsdS*, *cat*, *tet*	[55]

Tablo 4.1: Devam.

Bakteri türleri	Genotip özellikleri	Kaynak/Referans
E. coli ET12567 (pUZ8002)	*dam, dcm, hsdS, cat, tet/ tra, neo, RP4*	[56]
Streptomyces coelicolor A(3)2	Prototrofik yaban tip	[57]
E. coli DH5α/pSK(-) *relA*	pSK(-)*relA* plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
E. coli DH5α/pSPG + *relA*	pSPG + *relA* plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
E. coli ET12567/ pSPG + *relA*	pSPG + *relA* plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
E. coli ET12567 (pUZ8002) pSPG + *relA*	pSPG + *relA* plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
S. coelicolor A(3)2/pSPG + *relA*	pSPG + *relA* plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma

4.2.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan *E. coli* suşları Luria-sıvı ve Luria-katı besiyerlerinde büyütülmüştür. Gerekli durumlarda besiyerlerine ampisilin (100 µg/mL), apramisin (50 µg/mL), kloramfenikol (25 mg/ml) ve/veya kanamisin (50 µg/mL) antibiyotikleri eklenmiştir.

S. coelicolor hücrelerinin büyütülmesinde ise genel olarak daha kompleks besiyerleri tecih edilmiştir.

4.2.2.1. Luria Bertani (LB) Besiyeri (pH 7.0) – 1 L

- 5 g Maya özütü
- 10 g Pepton
- 5 g NaCl

Yukarıda belirtilen bileşelerin eklenmesinin ardından, hacim dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülen besiyeri 121 °C'ta 20 dakika steril edilir [58].

4.2.2.2. Luria Bertani (LB) Agar Besiyeri (pH 7.0) – 1 L

- 1 L LB besiyeri
- 15 g Agar

1 L LB besiyeri yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp, agar bulunan şişelere uygun hacimlerde paylaştırılır. Daha sonra 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir [58].

4.2.2.3. Xgal ve IPTG'li Luria Bertani (LB) Agar (pH 7.0) – 1 L

- 2 ml Xgal (20 mg/ml)
- 250 µL IPTG
- 1 ml Seçici antibiyotik
- 5 g Maya özütü
- 10 g Pepton
- 5 g NaCl
- 3 g Agar

Pepton, maya özütü ve NaCl son hacim 1 L olacak şekilde dH_2O ile çözünüp, agar bulunan şişelere paylaştırılır. Daha sonra 121 °C'ta 20 dakika steril edilir [58]. Besiyeri 50 °C'ın altına düştüğünde, Xgal, IPTG ve uygun antibiyotik (pSK(-) plazmidi taşıyan hücrelerin kültüre edilmesinde Amp (100 µg /ml)) eklenir.

4.2.2.4. 2xYT Broth

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

Tüm bileşenler eklenip, son hacim H_2O ile 1 L'ye tamamlanır ve manyetik karıştırıcıda iyice çözündükten sonra 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır [58].

4.2.2.5. Tripton Soya Besiyeri (TSB)

- % 3 Oxoid Tripton Soya besiyeri

30 g TSB tartılıp, son hacmi 1 L olacak şekilde dH_2O ile çözülür. Daha sonra, besiyeri 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır [58].

4.2.2.6. Tripton Soya Agar (TSA)

- 1 L TSB besiyeri
- 15 g Agar

1 L LB besiyeri hazırlanıp, agar bulunan şişelere uygun hacimlerde paylaştırılır. Daha sonra 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir [58].

4.2.2.7. Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)

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

Mannitol, dH_2O ile çözülür. 2 g agar ve 2 g soya unu içeren 250 ml'lik şişelere her birinde 100 ml olacak şekilde bölünür. 115 °C'ta, 15'er dk iki kez üst üste otoklavlanır [58].

4.2.2.8. R2YE Besiyeri

- 103 g Sükroz
- 0.25 g K_2SO_4
- 10.12 g $MgCl_2.6H_2O$
- 10 g Glikoz
- 0.1 g Kazamino asit
- 22 g Agar (% 2.2)

Besiyeri bileşenleri son hacim 800 ml olacak şekilde dH_2O ile çözülür. 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır ve her 160 ml besiyerine aşağıda belirtilen sırayla steril R2YE solüsyonları eklenir [59]:

- 1 ml KH_2PO_4 (% 0.5)
- 16 ml $CaCl_2.2H_2O$ (% 3.68)
- 3 ml L-Prolin (% 20)
- 20 ml TES Tamponu (% 5.73, pH 7.2)
- 0.4 ml 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 $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$
- 1 ml NaOH (1N)

4.3. Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan çözelti ve antibiyotikler Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tabloda listelenen solüsyonların dışında antibiyotik ölçüm sürecinde, 5 M potasyum hidroksit, 0.5 M HCl ve 0.5 M metanol-HCl kullanılmıştır. Bu solüsyonların hazırlanma prosedürleri aşağıda verilmiştir:

5 M, 200 ml KOH hazırlamak için; 56.11 g KOH tartılıp, hacim dH_2O ile 200 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta, 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir.

0.5 M, 200 ml HCl hazırlamak için; %37'lik HCl çözeltisinden 9.85 ml alınarak, hacim dH_2O ile 200 ml'ye tamamlanır.

0.5 M, 200 ml metanol-HCl hazırlamak için; %37'lik HCl çözeltisinden 9.85 ml alınarak, hacim metanol ile 200 ml'ye tamamlanır.

Tablo 4.2: Deneylerde kullanılan çözelti ve antibiyotikler.

Solüsyonlar & Jeller		Tamponlar & Antibiyotikler
Solüsyon I (4 °C) •25mM Tris (pH 8) •10 mM EDTA (pH 8) •50 mM Glikoz **Solüsyon II** •0.2 N NaOH •% 1 SDS **Solüsyon III (4 °C)** •% 60 5M Potasyum asetat •% 11.5 Glasiyal asetik asit **Liziz Solüsyonu (4 °C)** •1 M Tris-HCl (pH 8) •0.5 M EDTA (pH 8) •1 M Sükroz **Alkalin Solüsyonu (4 °C)** •10 N NaOH •% 20 SDS **SDS Jeli (%12'lik): Ayırma jeli (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 **Commasie Blue (SDS PAGE için)** •% 50 Metanol •% 0.05 Commasie •% 10 Asetik asit •% 40 dH_2O **Protoplast P (-) Solüsyonu (800 ml)** •103 g Sükroz •24 g K_2SO_4 •2.02 g $MgCl_2.6H_2O$ •2 ml İz element solüsyonu	**TfbI (4 °C)** • 5 M KOAc • 1M $MnCl_2$ • 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 gram Sükroz •% 0.5 Triton X-100 •1 M Tris-HCl •0.5 M EDTA **% 40 Gliserol (50 ml) (4 °C)** •23 ml % 84-88 gliserol •27 ml dH_2O **Yoğunlaştırma jeli (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 **Destaining Solüsyonu (SDS PAGE için)** •% 50 Metanol •% 10 Asetik asit •% 40 dH_2O **Protoplast P(+) Solüsyonu** 80 ml P(-) solüsyonu + steril 1 ml KH_2PO_4 (% 0.5) + 10 ml $CaCl_2.2H_2O$ + 10 ml TES buffer (% 5.73, pH 7.2)	**Antibiyotikler | Stok konsantrasyonları** •Apramisin (Apr) | 50 m/ml •Ampisilin (Amp) | 100 mg/ml •Kloramfenikol (Chl) | 25 mg/ml • Kanamisin (Kn) | 50 mg/ml **Tampon çözeltiler** **50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) (1 L)** • 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) **50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) (1 L)** •242 g Tris baz •57.1 ml Glasiyal asetik asit •100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) **Liziz Tamponu (Sonikasyon) (pH 7.4)** •20 mM Sodyum fosfat tamponu •50 mM Sodyum klorür •5 mM İmidazol **Sodyum fosfat Tamponu (Sonikasyon) (20 mM)** •0.185 gram NaH_2PO_4 •0.427 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$ **SDS-PAGE: 2X Yürütme tamponu (1 L)** •28.8 gr Glisin •6.04 gr Tris •2 gr SDS •1.8 L dH_2O **4X SDS Yükleme Tamponu** •2 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8) •0.8 g SDS •4 ml % 100 gliserol •0.4 ml β-merkaptoetanol •1.0 ml 0.5 M EDTA •8 mg bromofenol mavisi •2.6 ml dH_2O

- ✓ **Antibiyotikler dışında tüm sterilizasyon işlemleri otoklavla gerçekleştirilmiştir.**
- ✓ **Antibiyotikler ise filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir.**

4.4. Kullanılan Kozmit ve Plazmitler

Çalışmada yer alan bifonksiyonel (mekik) vektörlerinden biri olan pZH1351 (8300 bç), *Streptomyces coelicolor* suşunda yüksek kopya sayısına sahiptir ve ampisilin direçlilik geni plazmidin *E.coli*'de seçilebilmesinde kullanılmıştır.

Diğer bir *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü pRA (5769 bç), kromozoma entegre olabilme yeteneğine sahiptir ve bu sayede aktarılmak istenen genin tek kopyasının kromozoma yerleşmesini sağlar.

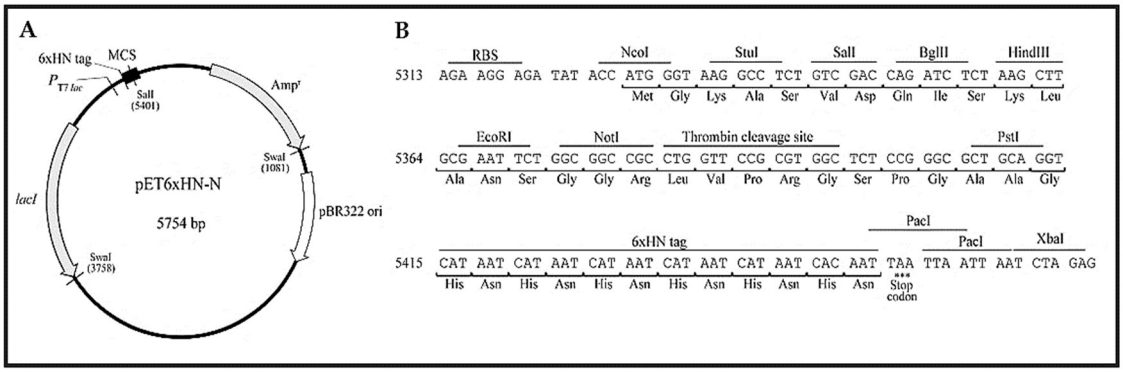
Çalışmada kullanılan pSPG plazmidi 40-300 arasında değişen kopya sayısına sahip, pIJ699 türevli bir *E. coli*/*Streptomyces* mekik vektörüdür [60]. Bu vektör, gliserol alım yolağında görevli bir promotora (P_{glpF}) sahiptir. *S. coelicolor*'da da bulunan P_{glpF}, gylR geninin altında yer alır ve promotorun indüklenmesi, gliserol ve GylR aracılığyla düzenlenir [61]. pSPG vektörü 19 Mayıs Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Kurt Kızıldoğan'dan temin edilmiştir.

Streptomyces coelicolor A3(2) *StL2* kozmidi (38640 bç) ise *relA* geninin çoğaltılmasında kalıp olarak kullanılmıştır. Faydalanılan tüm kozmit ve plazmitler Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

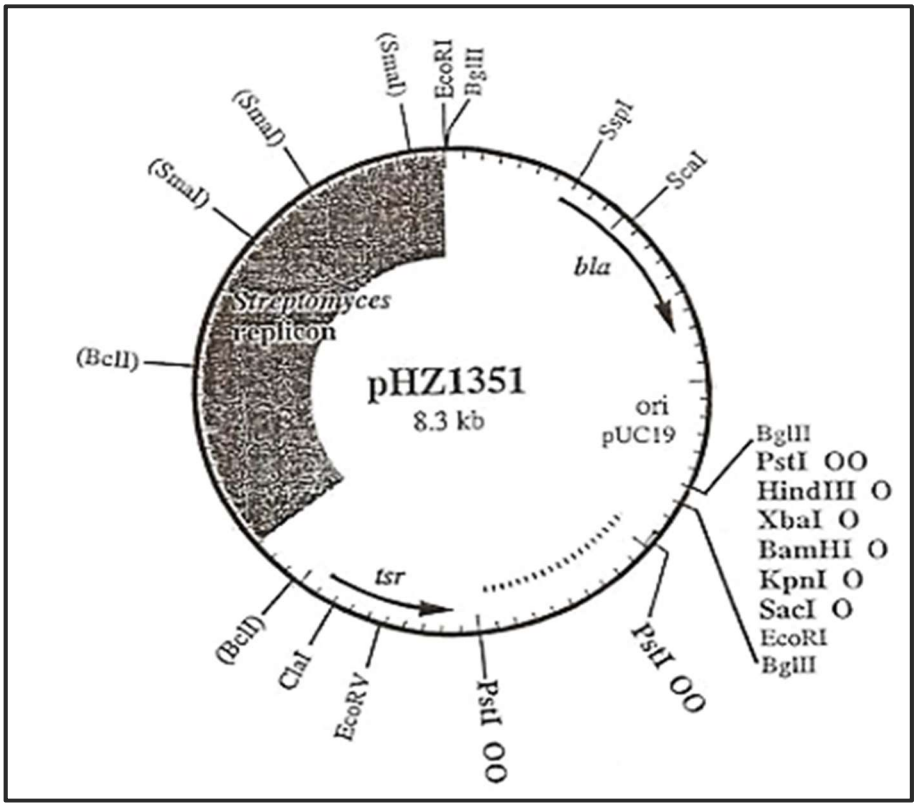
Tablo 4.3: Tez çalışması kapsamında kullanılan plazmitlerin genel özellikleri ve kaynakları.

Kozmit ve plazmitler	**Direnç promotorları dışındaki promotorlar**	**Dirençlilik belirteci**	**Dirençlilik**	**Büyüklük**	**Kaynak/ referans**
pBluescript II SK (-) (pSK(-))	*lac* promotoru T7 promotoru	*Amp*	Ampisilin	2958 bç	Stratagene
pET6xHN-N	T7 promotoru	*Amp*	Ampisilin	5754 bç	Clontech
pHZ1351 (pIJ101 türevi bir mekik vektörü)	-	*tsr Ltz− sti+ amp*	Tiyostrepton Ampisilin	8300 bç	[62]
pRA	-	*Apr*	Apramisin	5769 bç	[63]
pSPG	P_{glpF} promotoru	*amp* *apr*	Ampisilin Apramisin	8149 bç	[64]
StL2	İçerdiği genlere özgü promotorlar	*Amp*	Ampisilin	38640 bç	Johnes Innes Center

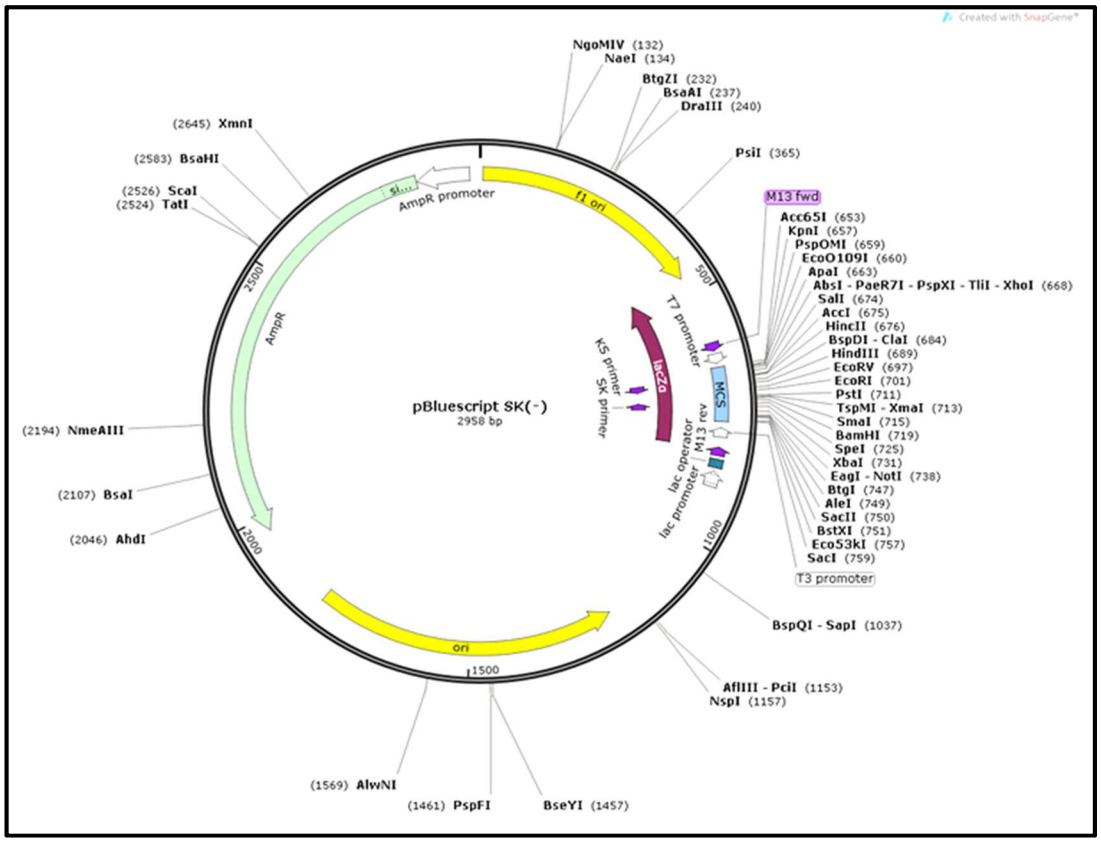
Çalışmada kullanılan tüm vektörlerinin restriksiyon haritası sırayla verilmiştir.



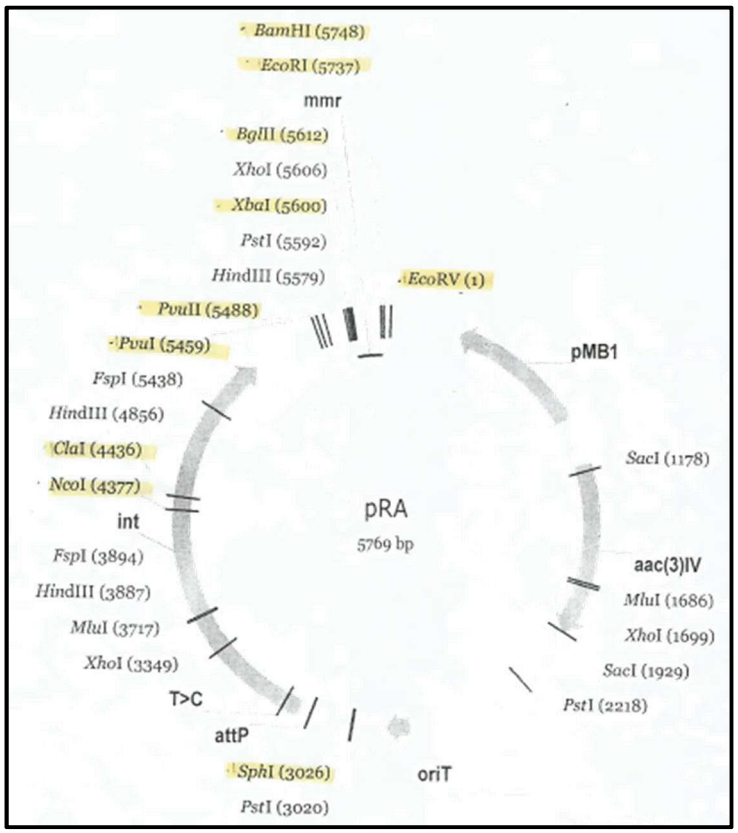
Şekil 4.2: a) pET6xHN-N ekspresyon vektörü (2958 bç), b) pET6xHN-N plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).



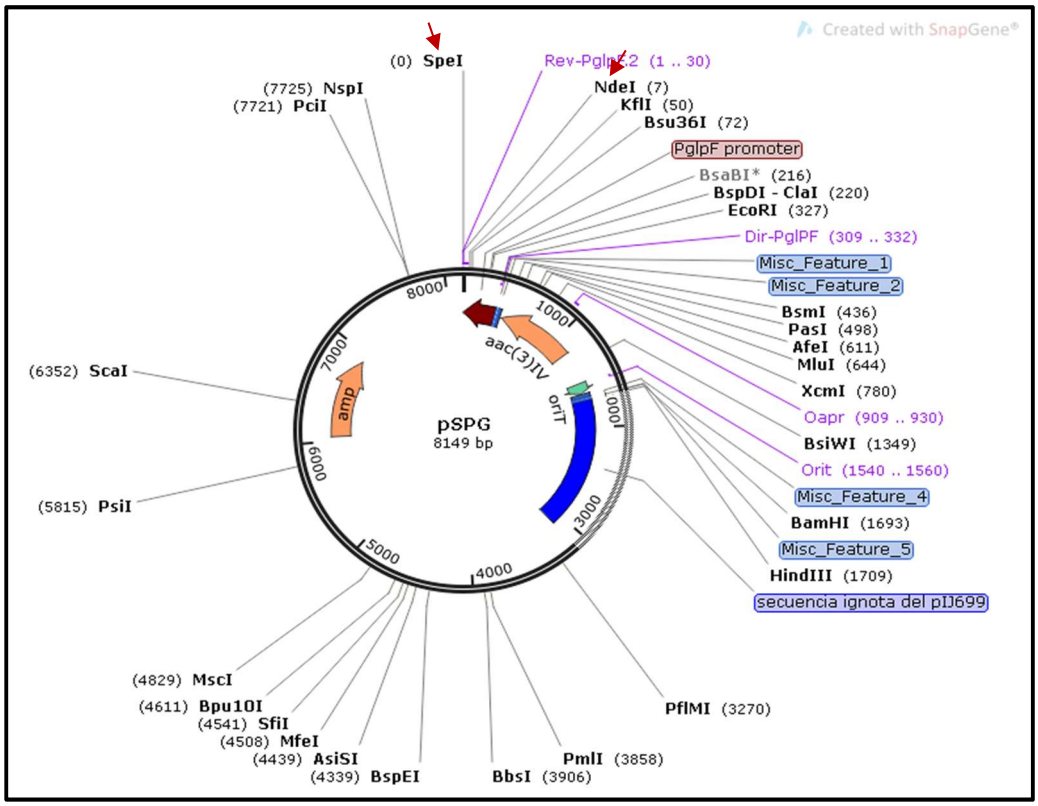
Şekil 4.3: pHZ1351 mekik vektörü (8300 bç).



Şekil 4.4 : pBluescript SK(-) ekspresyon vektörü (2958 bç).



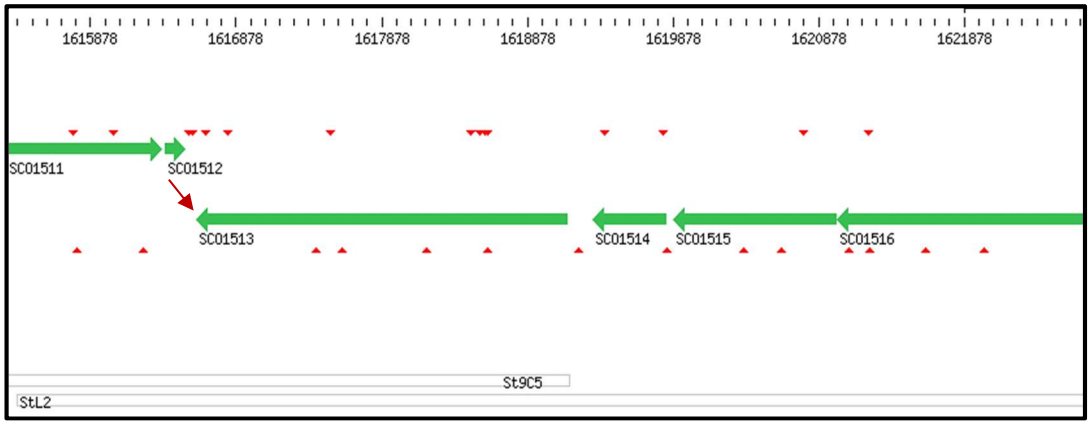
Şekil 4.5: pRA mekik vektörü (5769 bç).



Şekil 4.6 : pSPG mekik vektörü (8149 bç). Çalışmada kullanılan klonlama bölgeleri kırmızı oklarla işaretlenmiştir.

4.5. Tasarlanan Primerler

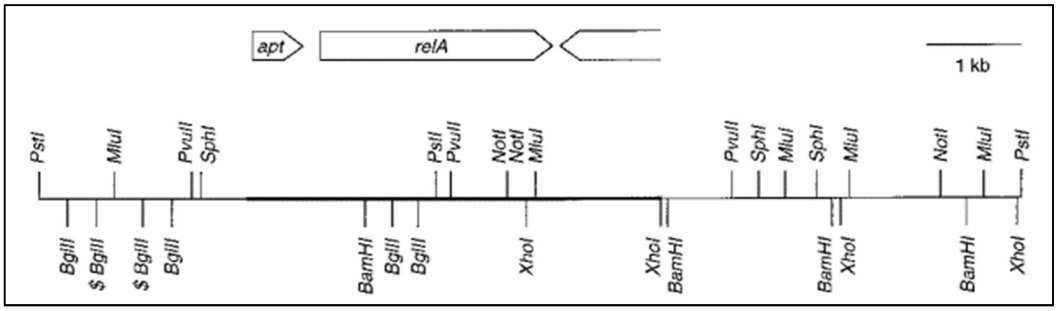
relA geni *Steptomyces coelicolor* A3 (2) suşuna ait StL2 kozmidi üzerinde yer almaktadır. Bu yüzden genin çoğaltılmasında kalıp iplik olarak StL2 kullanılmış ve primer tasarımı için *relA*'nın bu plazmit üzerindeki lokasyonu, StrepDB veritabanı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: *relA* geninin (SCO1513) StL2 kozmidi üzerindeki lokasyonu.

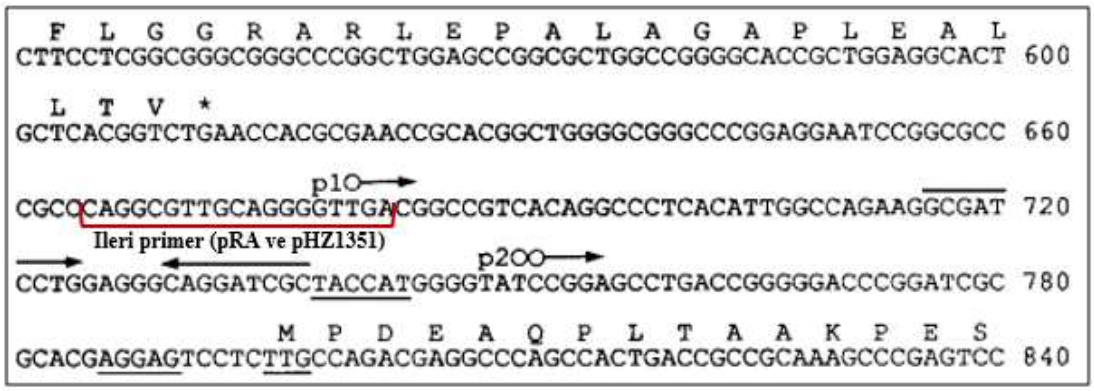
Genom üzerinde (erişim numarası: AL645882.2), 1616607 bç - 1619150 bç arasında yer alan *relA* geninin sekansı NCBI veritabanı üzerinden indirilmiş ve primerler uzunluk, GC/AT oranı, dimer oluştuma eğilimi ve erime sıcaklığı (Tm) değeri gibi parametreler göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır.

pRA ve pHZ1351 plazmitlerinde promotor dizisi bulunmadığı için primer dizileri, düzenleyici (regulatör) bölgeleri (promotör ve terminatör gibi) dışlamayacak şekilde; yani genin 1000 bç aşağısından ve yukarısından tarama yapılarak tespit edilmiştir. *S. coelicolor*'a ait *relA* geni, adenin fosforibozil transferaz enzimini (adenin ve 5-fosforibozil pirofosfatın AMP'ye dönüşümünü katalizleyen) kodlayan *apt* geninin altında yer almaktadır (Şekil 4.8). *apt* geni iki promotor üzerinden (relAp1 ve relAp2) üzerinden eksprese edilir. İleri primer dizisi promotor dizisini içine alan bir bölgeden tasarlanmıştır (Şekil 4.9) [21, 49].



Şekil 4.8: *S. coelicolor* hücrelerinde *apt–relA* bölgesinin restriksiyon haritası.

Her iki primer çifti için ortak bir geri primer ve iki farklı ileri primer oluşturulmuş ve uçlarına genin aktarılacağı plazmide özgü kesim bölgeleri eklenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: pRA ve pHZ1351 plazmitlerine klonlanacak *S. coelicolor relA* geninin ileri primer dizisinin lokasyonu. Transkripsiyonel başlama bölgesi halkayla ve transkripsiyon yönü okla gösterilmiştir.

pSK ve pET6xNH-N plazmitlerine klonlama yapmak için “In-Fusion® HD Klonlama Kiti” kullanım kılavuzunda belirtilen ölçütlere uyularak, genin başlangıç ve bitiş bölgelerini içine alacak şekilde ortak bir primer seti oluşturulmuştur.

relA geninin pSPG vektörüne klonlanabilmesi için yeni bir primer seti tasarlanmıştır. İleri primer genin başlangıç kodonundan (TTG) [65] itibaren oluşturulurken, geri primer genin bitiş kodonunun yaklaşık 420 bç altından ve terminatör bölgeyi de içine alacak şekilde tasarlanmıştır. *Nde*I ve *Spe*I kesim bölgelerini içeren primerler Tablo 4.4’te sunulmuştur.

Tablo 4.4: Çalışmada kullanılan tüm primerler

Primer	**Dizisi**	**Fragman Boyu (bç)**	**~ GC oranı (%)**
İleri primer (pHZ1351 için)	5‘gg**ggtacc**CAGGCGTTGCAGGGGTTGA3’ (***Kpn*I**)	27	67
İleri primer (pRA için)	5’g**gaattc**CAGGCGTTGCAGGGGTTGA3’ (***EcoR*I**)	26	58
Geri primer (pHZ1351 ve) pRA için)	5’gc**tctaga**GCACGAGTTCGGCGGCTGA3’ (***Xba*I**)	27	63
İleri primer (pET6xNH-N ve pSK için)	5‘taaggcctct**gtcgac**TTGCCAGACGAGGCCCAGCCAC3’ (***Sal*I**)	38	63
Geri primer (pET6xNH-N ve pSK için)	5’tagagatctg**gtcgac**CTACGACGGCCTGCGCGCCGAAG3’ (***Sal*I**)	39	64
İleri primer (pSPG için)	5’ataattc**catatg**TTGCCAGACGAGGCCCAGCCAC3’ (***Nde*I**)	35	51
Geri primer (pSPG için)	5’**actagt**AAGCTCGTCCCGGTCACCGACCTCAAGTC3’ (***Spe*I**)	35	57
Dizileme – primeri (pSPG+*relA* için)	5’ACCGGAAATACCCGTTAGA3’	19	47

Tasarlanan primerlerin etkinliklerinin kontrolü için DNASTAR (Lasergene) primer tasarım programına başvurulmuştur.

4.6. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde masa üstü santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), masa üstü santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 22R), yatay elektroforez sistemi (BIO-RAD, Mini-Sab

Cell CT), güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), +4 °C buzdolabı (Ariston), -20 °C derin dondurucu (Ariston), -80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), buz makinesi (BAR-LINE BF85), otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), pH metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), steril kabin (Tez-San), etüv (Bınder, 9010-0078), inkübatör (Wisecube), çalkalamalı inkübatör (Edmund Bühler, KS-15), su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV görüntüleme cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), spektrofotometre (BIO-RAD), PZR cihazı (Applied Biosystems) kullanılmıştır.

5. YÖNTEMLER

5.1. *E. coli* Hücrelerinden Kozmit / Plazmit İzolasyonu

StL2 kozmidi ve çalışmada kullanılan plazmitler *E. coli* DH5α hücrelerinden Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile izole edilmiştir [66]. Bu metot kapsamında, uygun antibiyotik çeşidini içeren 100 ml LB besiyerinde, 37 °C'ta, gece boyu (12-16 saat) büyütülen hücre kültürü eşit hacimde iki falkona aktarılıp 25°C'ta, 4500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Her bir pellet 800'er µl solüsyon I ile vortekslenerek çözülmüş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, karışımlar ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. Her 200 µl 'lik karışıma, 400 µl solüsyon II eklenip 5 dk buzda bekletilmiştir. Bu süre boyunca ependorflar 2 dakikada bir ters-düz edilip karıştırılmıştır. Daha sonra 300 µl soğuk solüsyon III ilave edilip, her 2 dk'da bir yavaşça karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. 14000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dk santrifüj uygulanmış ve supernatantlar yeni ependorflara transfer edilerek, her birine 0.6 hacim izopropanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 2.5 saatlik inkübasyonun ardından, 24-25 °C'ta santrifüj işlemi uygulanmıştır. Supernatantlar atılıp, pelletler 200 µl dH_2O ile çözülmüştür. Her bir tüpe 14 µl RNaz (10mg/ml) eklenip, 37 °C'ta, 30 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen kozmit/plazmit, 'PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon Kiti (MN)' yardımıyla kolonla saflaştırılmıştır.

5.2. *relA* Geninin PZR Yöntemi İle Çoğaltılması

S. coelicolor A(3)2 hücresine ait *relA* geni, uygun primer çiftlerinin (Tablo 4.4) ve kalıp olarak StL2 kozmidinin kullanıldığı PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Kullanılan PZR protokolü ve programları Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR kurularak belirlenmiştir. Bu değer pRA ve pHZ1351'e klonlamada kullanılacak genlerin primerleri için sırasıyla 60 °C ve 67.5 °C olarak bulunurken, pSK(-)/pET6xNH-N çalışmaları için 65 °C ve pSPG çalışmaları için 70 °C olarak saptanmıştır.

Tablo 5.1: *relA* geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR protokolü ve programı.

PZR BİLEŞENLERİ (100 µL)	PZR PROGRAMI
92 µl dH_2O	98 °C 3 dk
40 µl Q5 reaksiyon tamponu	98 °C 10 sn denatürasyon
40 µl Q5 high GC enhancer	60 °C - 70 °C 30 sn tutunma (annealing)
10 µl ileri primer	72 °C 100 sn uzama
10 µl geri primer	72 °C 5 dk
2 µl Kalıp iplik (StL2 kozmidi)	4 °C ∞
4 µl (10 mM) dNTP mix (karışımı)	
2 µl Q5 DNA polimeraz enzimi	

35 döngü

5.3. 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 son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr 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.

5.4. İzole Edilen DNA'ların veya PZR ile Çoğaltılan Genin Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden saflaştırılmasında, 'PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon' kitine (MN) başvurulmuş ve üretici firmanın sağladığı kullanım talimatına uyulmuştur.

5.5. 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 dikkate alınarak kurulmuştur. Yoğunluğu çok yüksek olan

pRA ve pHZ1351 plazmitleri gece boyu kesilirken, *relA* geni yaklaşık 2-3 saat süre ile ve pSPG plazmidi 5-6 saat kesilmiştir.

5.6. Klenow Reaksiyonu

Yapılan enzim kesiminin ardından küt uçlu hale getirilmek istenen plazmitlerin 5' uçları Klenow Fragmentiyle doldurulmuştur. Bu amaçla Tablo 5.2'deki reaksiyon kurulmuştur.

Tablo 5.2: Enzim kesimiyle oluşan fragmanların 5'- uçlarının doldurulması.

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	PROSEDÜR
300 µl kesilmiş plazmit (pHZ1351) 40 µl *Bam*HI tamponu (enzim tedarikçisi firmanın önerdiği tampon çözeltisi) 4 µl (10 mM) dNTP mix (karışımı) 7 µl Klenow Fragment (Merck) 49 µl dH_2O	Tüm reaksiyon bileşenleri karıştırıp, 37 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir.

5.7. Ligasyon

Ligasyon aşamasında Sambrook ve arkadaşlarının (1989) uyguladıkları protokol takip edilmiştir. Bu prosedür çerçevesinde öncelikle ligasyonda kullanılacak plazmit (vektör) ve genin (insört) konsantrasyonları eşitlik (5.1) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$ng\ (relA) = \frac{ng\ (vektör) x\ relA\ (kb)}{vektör\ (kb)} \tag{5.1}$$

Genel olarak reaksiyonlarda vektör:insört oranı, 1:3, 1:5 ve 1:10 olacak şekilde ayarlanmaya çalışılmıştır. Ligasyon reaksiyonlarında T4 DNA ligaz tamponu iyice vortekslenip belirtilen oranlarda alınan plazmit ve gen karışımlarının her birine 1'er µl eklenmiştir. Daha sonra 1 µl T4 DNA ligaz enzimi eklenip, gerekli durumlarda hacim dH_2O ile istenilen düzeye getirilip, karışım 14-15 °C'ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

5.8. "In Fusion Klonlama" Protokolü

relA geninin pET6xNH-N plazmidine aktarımında In-Fusion® HD Klonlama kiti (Clontech®) kullanılmış ve klonlama işlemi kılavuzda dikkat çekilen uyarılar baz alınarak yapılmıştır. ~ 200 ng vektör ve ~ 200 ng insört karıştırılıp (5 µl), 2 µl In-Fusion HD enzim karışımı eklenmiş ve hacim dH_2O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. 50 °C'ta, 15 dk ısıtıcı bloktaki inkübasyonun ardından, karışım buza alınmıştır.

5.9. *E. coli* Alıcı (Kompetan) Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli kompetan hücrelerinin hazırlanmasında Sanders (2011) Laboratuvarı'nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır [67]. Hücreler 10'ar ml LB besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta 180 rpm'de gece boyunca çoğaltılmıştır. Bu ön kültürlerden 1:100 oranında, 50 ml antibiyotiksiz LB besiyerine ekim yapılmış ve kültürler 37 °C'ta, 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Hücre yoğunluklarındaki artış, düzenli spektrofotometrik ölçümlerle takip edilmiş ve 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (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 uygulanmıştır. Pelletler tekrar buza alınıp, 1 ml TfbII ile çözünmüştür. Daha sonra hücreler, her birinde 100'er µl olacak şekilde soğuk ependorf tüplerine paylaştırılıp, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak hemen -80 °C'a kaldırılmıştır.

5.10. Standart Transformasyon Yöntemi

Ligasyon sonucunda elde edilen DNA'lar, alıcı *E. coli* DH5α ve ET12567 hücrelerine Sambrook ve arkadaşlarının (1989) kimyasal transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. İlk etapta kompetanlar buza alınıp, her 100 µl hücreye 4-5 µl ligasyon ürünü (ligasyon sonucunda elde edilen plazmitler) eklenmiş ve karışım 25-30 dk buzda bekletilmiştir. 42 °C'ta, 45 sn su banyosunda inkübasyonun (ısı şoku) ardından, hücreler 2 dk buzda bekletilmiştir. Steril koşullarda üzerine 700-800 µl antibiyotiksiz LB eklenip, 180 rpm'lik inkübatörde 37 °C'ta 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında seçici LB katı besiyerlerine ekilerek 37 °C'ta tüm gece üretilmişlerdir.

5.11. *E. coli* DH5α Hücrelerinde pSK(-)+*relA* Ekpresyonunun Kontrolü

100 µg/ml ampisilin içeren besiyerinde gece boyu büyütülen hücrelerden ertesi gün 2 ml alınıp, 100 ml LB + 100 µg/ml ampisilin besiyerine ekilmiş ve absorbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır (180 rpm). Bu absorbans değeri elde edildikten sonra hücreler eşit miktarda erlenlere paylaştırılmış ve kültürlerden bir tanesi kontrol olarak seçilirken, diğeri son konsantrasyonu 0.42 M olacak şekilde IPTG (stok konsantrasyonu 0.5 mM) eklenerek uyarımıştır. Uyarımdan önce ve sonraki 2., 4. ve 6. saatlerde steril eppendorflara 1'er ml örnek alınmıştır. OD_{600} ölçümleri de eş zamanlı sürdürülmüştür. Alınan örnekler 4 °C'ta 4500 rpm'de 15 dk çöktürülüp, kurutularak -20 °C'a kaldırılmıştır.

Her bir örnek 45 µl dH_2O ile çözülüp, üzerine 15 µl 4X SDS yükleme boyası eklenmiştir. Boya ve örnek karışımı 5 dakika kaynar suda inkübe edildikten sonra örnekler (0. saat dışında) alındıkları saatteki hücre yoğunluğuyla ters orantılı olacak şekilde (örneğin OD_{600} değeri 1.72 olan 2. saat örneğinden 15 µl yüklenirken, 2.87 olan 4. saat örneğinden 9 µl yüklenmiştir) %12'lik SDS-PAGE jelin kuyucuklarına yüklenmiş ve 120 voltta yürütülmüştür.

5.12. *E. coli* DH5α Hücrelerinde pSPG+*relA* Ekpresyonunun Kontrolü

50 µg/ml apramisin içeren LB'de büyütülen ön kültürden ertesi gün 2 ml alınıp, 100 ml LB + 50 µg/ml apramisin besiyerine ekilmiş ve absorbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır (180 rpm). Bu absorbans değeri elde edildikten sonra hücreler eşit bir şekilde erlenlere paylaştırılmış ve bir tanesine kültürdeki oranı % 0.5 olacak şekilde % 40 gliserol eklenmiştir. Böylece bu hücreler deney grubu olarak uyarılmış, uyarılmayan hücreler de kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İndüklenme sonrasında 2'şer saat arayla toplamda 6 saat (0. saat, 2. saat, 4. saat, ve 6. saatler) örnek alınmış ve OD_{600} ölçümleri de eş zamanlı sürdürülmüştür. Alınan örnekler 4 °C'ta 4500 rpm'de 15 dk çöktürülüp, kurutularak -20 °C'a kaldırılmıştır. Aynı çalışma %1 ve %5 gliserol konsantrasyonları için de tekrarlanmıştır.

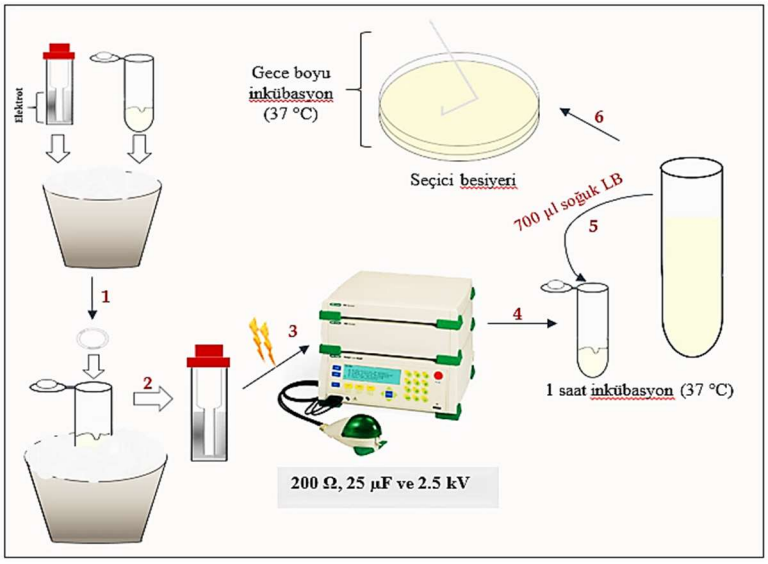
Her bir örnek 45 µl dH_2O ile çözülüp, bölüm 3.1.23'te belirtildiği şekilde SDS-PAGE jelinde yürütülüp, görüntülenmiştir.

5.13. Rekombinant Plazmitlerin Alıcı *E. coli* ET12567 Hücrelerine Aktarımı

E. coli DH5α hücrelerinden izole edilen pSPG+*relA*'nın pUZ8002 plazmidi içeren ve içermeyen *E. coli* ET12567 hücrelerine aktarımında 2 farklı yönteme başvurulmuştur. pUZ8002 plazmidi içermeyen *E. coli* ET12567 hücrelerine gen aktarımı için önceki bölümde bahsedilen standart transformasyon yöntemi kullanılırken, ilgili gen bir RK2 türevi olan pUZ8002 plazmidini taşıyan *E. coli* ET12567 hücrelerine elektroporasyon yöntemi [56] kullanılarak transfer edilmiştir. pUZ8002 plazmidi oriT taşıyan plazmitlerin farklı alıcı hücrelere aktarımında rol oynamaktadır [68].

Elektroporasyon deneyinde her 100 µl elektokompetan hücreye, ~ 200 ng/µl rekombinant plazmit (pSPG+*relA*) eklenmiştir. Hücre ve plazmit pipet yardımıyla karıştırılıp, soğuk elektroporasyon küvetlerine alınmış ve hücrelere Bio-Rad GenePulser II elektroporatöründe *E. coli* için tanımlı bir program seçilerek (200 Ω, 25 µF ve 2.5 kV) elektrik akımı uygulanmıştır. Akım uygulanması sonucunda beklenen 'time constant' değeri 4.5-4.9 ms aralığındadır ve çalışmada bu değer beklenen aralığın içinde çıkmıştır.

Elektroporasyonun ardından hücrelere 700 µl antibiyotiksiz soğuk LB besiyeri eklenerek, her bir hücre yeni steril ependorf tüpüne alınmıştır. 37 °C'ta 1 saatlik inkübasyonun ardından hücreler, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve Apr (50 µl/ml) içeren LB katı besiyerlerine ekilip, 37 °C'ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Elektroporasyon yönteminin genel şeması.

5.14. *E. coli* Transformantlarının Taranması

Doğru kolonilerin tespitinde miniprep plazmit izolasyonu ve plazmitlerin restriksiyon haritalanması yöntemlerine başvurulmuştur. Ayrıca olası mutant hücrelerin tespitinde antibiyotik içeren seçici besiyerlerinden faydalanılmıştır.

5.15. Miniprep Plazmit İzolasyonu Yöntemi

Aktarılan geni alan kolonilerin tespitinde Holmes ve arkadaşlarının (1981) yöntemine başvurulmuştur [69]. Bu yöntem kapsamında 1'er ml LB + Apr besiyerinde gece boyu büyütülen hücreler, 4 °C'ta 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pelletler, 250'şer µl STET ile vortekslenerek hızlıca çözünmüştür. 45 sn kaynar suda inkübasyonun ardından, ependorf tüpleri 4°C'ta 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Protein ve hücresel atıkların bulunduğu pellet kısmı uzaklaştırılarak, sıvı faz yeni ependorflara aktarılmıştır. Her bir tüpe 250 µl izopropanol eklenerek 2-3 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun ardından izopropanol tamamen uzaklaştırılıp, pelletler 25'er µl dH_2O ile çözünmüştür.

5.16. Plazmitlerin Restriksiyon Analizi

Çalışmalarda izole edilen olası rekombinant plazmitler uygun enzimlerle kesilerek büyüklükleri tespit edilmiş ve böylece geni alıp almadıkları kontrol edilmiştir. Kesim reaksiyonları, enzimlerin üretici firmalarının önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.17. Rekombinant Plazmidin Yaban Tip *Streptomyces coelicolor* A(3)2 Hücrelerine Transferi

Rekombinant plazmidin yaban tip hücrelere transferinde konjugasyon ve protoplast transformasyonu olmak üzere iki çeşit yöntem kullanılmıştır.

5.18. Konjugasyon Yöntemi

Konjugasyon için Gust ve arkadaşlarının (2002) protokolü takip edilmiştir [58]. Rekombinant (pSPG+*relA*) plazmidi taşıyan *E. coli* ET12567 (pUZ8002) hücresi, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve yarım doz Apr (25 µg/ml) içeren LB besiyerine ekilip,

37 °C'ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bu ön kültürden, yine aynı antibiyotikleri barındıran 10 ml LB besiyerine 1/100 oranında ekim yapılmış ve hücrelerin 600 nm dalga boyutundaki absorbans değeri (OD_{600}) 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır (200 rpm). Beklenen OD_{600} değeri sağlandığında, kültürler 4 °C'ta, 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve 2 kez 10'ar ml antibiyotiksiz LB besiyeri ile yıkanmıştır. Yıkama işlemleri devam ederken, her bir konjugasyon denemesi için 500 µl 2xYT besiyerine 1 µl ve 1.5 µl 10^8 *S. coelicolor* A(3)2 sporu eklenip, 4 °C'ta 10 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Yıkama işleminin ardından *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri tekrar 4500 rpm'de 10 dk çöktürülerek pellet, 1 ml LB besiyerinde çözünmüştür. Sporların soğutulmasının ardından, 500 µl *S. coelicolor* sporu ile 500 µl *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücresi karıştırılmıştır. Daha sonra 6000-7000 rpm'de 1-2 dk santrifüj uygulanıp, süpernatant boşaltılmış ve pellet dipte kalan ~ 50 µl'lik sıvıda çözülmüştür. Hücreler 10^{-2} ve 10^{-4} oranlarında seyreltilip, 10 mM $MgCl_2$ içeren antibiyotiksiz MS agar besiyerlerine ekilmiştir. 30 °C'ta 20 saatlik inkübasyonun ardından MS besiyerine son konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde NA ve apramisin uygulanıp, besiyerleri antibiyotiği tamamen çekene kadar petriler ters bir şekilde 30 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri kuruduktan sonra tekrar eski haline getirilerek inkübasyon devam ettirilmiştir.

5.19. Protoplast Transformasyonu

Polietilen glikol aracılı protoplast transformasyonu için Hopwood ve arkadaşlarının (1985) yöntemi kullanılmıştır [57]. Bu metoda göre, -80 °C'tan alınan 50 µl *S. coelicolor* protoplastı hızlı bir şekilde çeşme suyu altında çözülerek, buza konulmuştur. Her bir protoplasta 5 µl rekombinant plazmit (*E. coli* ET12567 hücrelerinden izole edilen) ve 200 µl % 25 (PEG + P(+) karışımı) eklenmiş ve tüm bileşenler pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırılmıştır. 2 tane antibiyotiksiz R2YE katı besiyerine karışımdan 125'er µl ekilmiş ve hücreler 30 °C'ta 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu 20 saatlik inkübasyonun ardından petriler, son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde apramisin içeren 1 ml dH_2O ile kaplanıp, besiyerleri antibiyotiği tamamen çekene kadar petriler ters bir şekilde 30 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri kuruduktan sonra tekrar eski haline getirilerek inkübasyon devam ettirilmiştir.

5.20. Alkalin Liziz Yöntemiyle Olası *S. coelicolor* Mutantlarından Plazmit İzolasyonu

S. coelicolor konjugantlarından plazmit izolasyonu için, Hopwood ve arkadaşlarının (1985) yöntemi biraz modifiye edilerek kullanılmıştır [57]. Yarım doz NA ve apramisin içeren 50 ml TSB'de büyütülen *S. coelicolor* kültürü steril bir falkona alınıp 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve pelet 10 ml STE solüsyonunda çözülerek, içine 200 µl, 50 mg/ml lizozim eklenmiştir. 37 °C'ta, 45-60 dk'lık inkübasyonun ardından 5 ml taze hazırlanmış alkalin solüsyonu ilave edilip, 20-30 sn vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında, 10 dk'lık inkübasyonun ardından 65 °C'ta 20 dk bekletilen örnek, 5 dk buzda soğutulmuştur. Daha sonra üzerine 10 ml soğuk solüsyon III (*E. coli* hücresinden plazmit izolasyonunda da kullanılan) eklenip, 10 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresi boyunca her iki dakikada bir yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra, 4500 rpm'de, 4 °C'ta, 15 dk santrifüj uygulanıp, falkona 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir. -20 °C'ta gece boyu inkübasyonun ardından, oda sıcaklığında 4500 rpm'de, 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra süpernatant atılıp, kurutulan pelet 40 µl dH_2O'da çözülmüştür. 14 µl RNaz (10mg/ml) eklenip, 37 °C'ta, 30 dk inkübe edilmiştir. İzole edilen plazmit, PZR Temizleme (clean-up) Kiti (MN) yardımıyla kolon ile saflaştırılmıştır.

5.21. *S. coelicolor* Hücrelerinde *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi

pSPG plazmidi aracılığıyla yaban tip *Streptomyces* hücrelerine aktarılan *relA* geninin ekspresyonu protein seviyesinde gösterilmiştir. Bu amaçla ilk başta belli saat aralıklarında örnek toplanmış, daha sonra protein izolasyonu yapılarak, SDS-PAGE yöntemi ile miktarları tayin edilmiştir.

5.21.1. *relA* Ekspresyonunun Tayininde Kullanmak Amacıyla Hücre Pelletlerinin Toplanması

Mutant *S. coelicolor* A(3)2 hücrelerinde *relA* ekspresyonunun gösterilebilmesi için 2 tekrarlı 5 hücre kültürü seti (**(1)** yaban tip hücre (WT); **(2)** %0.5 gliserollü ortamda yaban tip hücre (WT/0.5); **(3)** gliserolsüz ortamda mutant hücre (M); **(4)** %0.5 gliserollü ortamda mutant hücre (M/0.5); **(5)** %1 gliserollü ortamda mutant hücre (M/1)) ile çalışılmıştır. Gliserolün yaban tip hücredeki gen ekspresyon profiline

etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi için kontrol grubunda %0.5 gliserollü ortamda büyütülen yaban tip hücreye de yer verilmiştir. Uygun antibiyotiklerin (mutant hücreler için Apr (50 µg/ml) ve NA (25 µg/ml)) yer aldığı 100 ml TSB besiyerinde büyütülen hücrelerden belli saatlerde (24, 48, 72, 96 ve 120) örnek alınıp her bir hücre, 4000 rpm'de 20 dk çöktürülmüştür. 2'şer ml PBS (pH=7.4) ile 2 kez yıkanan pelletler (4 °C, 13.000 rpm, 3 dk) yine PBS ile çözünerek, eşit hacimde ependorflara paylaştırılmıştır. 4 °C'ta, 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj uygulanmış ve süpernatantlar tamamen çekilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelletler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak hemen -80 °C'a kaldırılmıştır.

5.21.2. *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi

Hücre pelletlerinden protein ekstraksiyonu için sonikasyon yöntemine başvurulmuştur. 1'er ml iziz tamponunda (pH 7.4) çözünen pelletler, mekanik yollarla parçalanmak üzere ilk etapta 20 sn süreyle ve % 30 genlikte (amplitude) sonikastona 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. Sonikasyonda parçalanan örnekler +4 °C'ta 13.000 rpm'de 20 dk çöktürülmüştür. Süpernatantlar steril ependorflara alınıp, protein miktarlarının tayini için 'Commassie Plus (Bradford) Assay' yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle mikroplaka kuyucuklarına 20'şer µl dH_2O eklenmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarından (250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml ve 2000 µg/ml) 2 tekrarlı olacak şekilde 10'ar µl yüklenmiştir. 1:5 oranında dilüe edilen protein örneklerinden ise her bir kuyucuğa 2'şer µl konulmuş ve hem protein örnekleri hem de BSA standartlarına 200'er µl 'Coomassie Plus Reagent' eklenip, mikroplakalar karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Yarım saatlik inkübasyonun ardından 595 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Her bir örnekten 30 µl alınıp steril ependorflara aktarılmış ve üzerine 10'ar µl 4X SDS yükleme boyası eklenmiştir. Boya ve örnek karışımı 5 dakika kaynar suda inkübe edildikten sonra örnekler 'Commassie Plus (Bradford) Assay' yöntemiyle hesaplanan miktarlarda % 12'lik SDS-PAGE jellerine yüklenmiş ve 110-115 voltta yürütülerek proteinlerin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

5.22. Mutant ve Yaban Tip *S. coelicolor* Hücrelerinde Antibiyotik Ölçümleri

Mutant hücrelerden bir dizi ekim yapılarak konjugasyondan gelebilecek olası *E. coli* kontaminasyonundan tamamen kurtulunmuştur. Bu aşamada, ilk başta 2 şer gün arayla Apr ve NA içeren TSA besiyerlerine 2 kez ekim yapılmış, daha sonra tek koloni alınarak yine 2'şer gün arayla Apr içeren TSA besiyerine ekilmiştir.

Antibiyotik ölçümleri için miktarları eşitlenen mutant ve yaban tip hücreler, 3'er tekrarlı olacak şekilde 100'er ml R2YE besiyerine ekilmiştir. Sadece mutant hücrelere Amp (100 µg/ml) uygulanmıştır. Yaban tip kültürlerin bir kısmına (WT/0.5) %0.5 gliserol eklenirken, kalan kısmına (WT) herhangi bir şey uygulanmamıştır. Mutant hücrelerin (M/0.5) ise tamamı %0.5 gliserolle uyarılmıştır. 168 saatlik fermentasyon süresi (24, 48, 72, 96, 120 ve 168 saat) boyunca her bir hücre kültüründen 5 ml örnek alınmış ve bunun 1 ml'si antibiyotik ölçümünde, kalan 4 ml'si ise pellet ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Antibiyotik ölçümü için ayrılan örnekler doğrudan –20 °C'a kaldırılmıştır. Ağırlık tayininde kullanılacak örnekler ise 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve pelletler 2 kez dH_2O ile yıkanıp –20 °C'a bırakılmıştır.

Kuru ağırlık ölçümü için pelletler –20 °C'tan alınıp, 1'er ml dH_2O ile çözülmüş ve daha önceden ağırlıkları belirlenen kurutma kaplarına alınmıştır. Örnekler, 80 °C'ta 3-4 gün kurutulup ağırlıkları (mg/ml) ölçülmüştür. Kap ağırlıkları, toplam ağırlıktan çıkartılarak kuru pellet ağırlıkları belirlenmiştir.

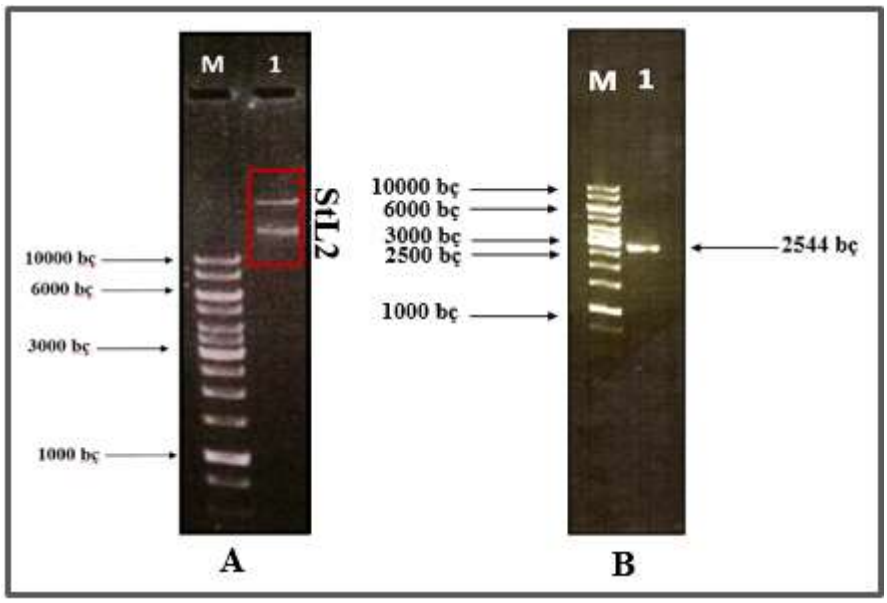
Antibiyotik ölçüm deneyleri Kieser ve arkadaşlarının (2000) spektrofotometrik yöntemi ile kullanılarak gerçekleştirilmiştir [62]. -20 °C'tan alınan 1 ml'lik örneklerin üzerine 250 µl 5 M KOH eklenip, karıştırılarak 1 gece 4 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 4 °C'ta, 13.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar yeni ependorflara aktarılmıştır. Aktinorhodin antibiyotiği 640 nm dalga boyunda doğrudan süpernatant üzerinden ölçülürken (blank olarak R2YE kullanılarak), undesilprodigiosin antibiyotiğinin ölçümü pellet üzerinden gerçekleşmiştir. Öncelikle pellet 2 kez 0.5 M HCl ile yıkanmış (4 °C, 13.000 rpm, 5 dk) ve her bir örneğe 1 ml 0.5 M metanol-HCl eklenerek, 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışım 4 °C'ta, 13000 rpm'de 15 dk çöktürülüp, undesilprodigiosin antibiyotiği süpernatantta, 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Blank olarak metanol-HCl solüsyonunun kullanıldığı undesilprodigiosin ölçümlerinde ihtiyaç halinde dislüsyonlar da bu solüsyon ile yapılmıştır.

Farklı kültürlerdeki antibiyotik aktivitelerinin hesaplanmasında **Abs = ε x [M]** formülünden yararlanılmıştır. Formülde yer alan **ε** değeri aktinorhodin için 25230'a eşitken, bu sabit değer undesilprodigiosin antibiyotiği için 100500'dür. Formülden hesaplanan molarite değerleri 10^6 ile çarpılarak, nM cinsinden konsantrasyonlar belirlenmiştir. Daha sonra bulunan sonuçlar mg cinsinden kuru ağırlıklara bölünerek her bir hücre kültürü için spesifik antibiyotik aktivite değerleri tespit edilmiştir. Mutant ve yaban tip hücrelerin antibiyotik aktiviteleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığının belirlenmesinde t-test yöntemi kullanılmıştır.

6. BULGULAR

6.1. *Streptomyces coelicolor relA* Gen Bölgesinin Çoğaltılması

relA geni, kendi promotor ve transkripsiyonel terminatör bölgelerini kapsayacak şekilde, StL2 kozmidinin (Şekil 6.1.a) kalıp olarak kullanıldığı PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır (Şekil 6.1.b). Elde edilen DNA fragmanının dizilemesi yapılmış (İontek/İstanbul) ve dizilenen bölgenin *S. coelicolor relA* geni ile uyumu BLAST programı ile araştırılmıştır. Analiz sonucunda DNA fragmanının *relA* genine ait olduğu doğrulanmıştır.

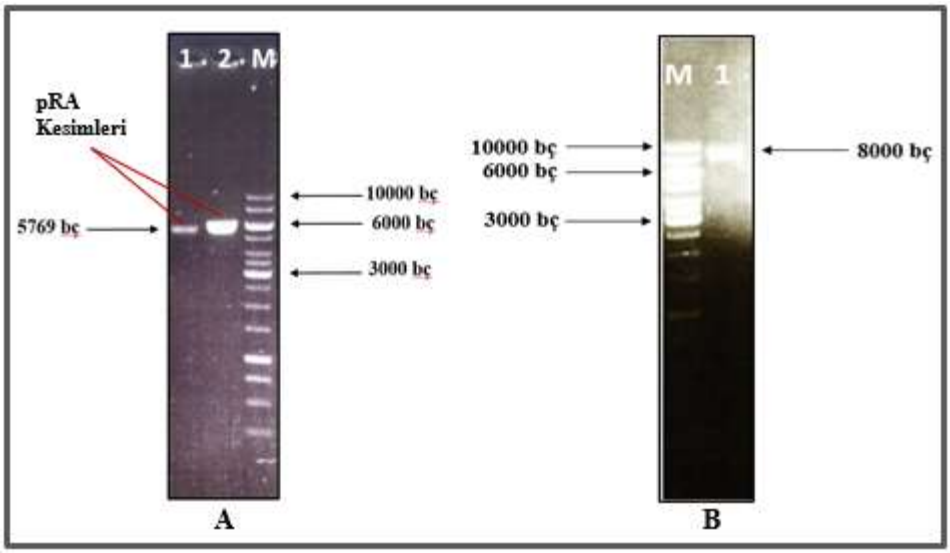


Şekil 6.1: *E. coli* DH5α hücrelerinden izole edilen StL2 kozmiti (~ 39 kb) ve PZR ile çoğaltılan *relA* geni (~ 2.5 kb). a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: StL2 kozmidi, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: *relA* geni.

6.1.1. *relA* Genini pRA ve pHZ1351 Plazmitlerine Klonlamak İçin Yapılan Çalışmalar

E. coli DH5α hücrelerinden izole edilen pRA plazmidi (~ 5.7 kb), *Xba*I ve *Eco*RI enzimleriyle, pHZ1351 plazmidi (8.3 kb) ise *Xba*I ve *Kpn*I enzimleri ile *Bam*HI tamponunda kesilerek ligasyona hazırlanmıştır (Şekil 6.2). PZR ile çoğaltılan küt uçlu *relA* fragmanı da her iki vektöre klonlanmak üzere uygun enzim çiftleriyle kesilmiştir. Farklı insört:vektör oranlarında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve ligasyon

ürünleri alıcı *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılarak, transformantlar 'miniprep plazmit izolasyonu' yöntemiyle taranmıştır.



Şekil 6.2: pRA ve pHZ1351 plazmitlerinin restriksiyon endonükleaz kesimi sonuçları a) 1-2: Kesilip, lineer hale getirilen pRA plazmitleri; M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: Kesilip, lineer hale getirilen pHZ1351 plazmidi.

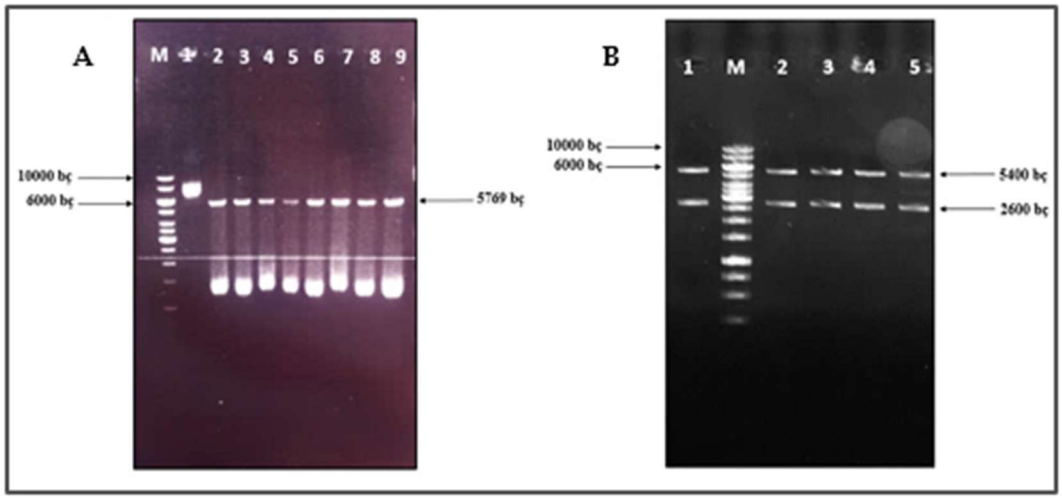
Transformantlardan elde edilen olası rekombinant plazmitlerin doğrulanması için restriksiyon endonükleaz kesimleri yapılmıştır. Gerçekleştirilen kesimler ve beklenen DNA fragmanı büyüklükleri Tablo 6.1'de sunulmuştur.

Tablo 6.1: Plazmitlerin restriksiyon endonükleaz kesimleri sonucunda beklenen bant büyüklükleri.

Vektörler - RE	**Kurulan Deneyin Amacı**	**Beklenen bant büyüklükleri**	
		Yaban suş	**Rekombinant suş**
pHZ1351 - *Eco*RI	Rekombinant *E. coli* DH5α suşlarında pHZ1351 plazmidi aracılığıyla aktarılan *relA* geninin çoğaltılması.	5.4 kb 2.6 kb	5.4 kb 5.1 kb
pRA - *Bam*HI	Rekombinant *E. coli* DH5α suşlarında pRA plazmidi aracılığıyla aktarılan *relA* geninin çoğaltılması.	5.7 kb	7.8 kb 0.5 kb

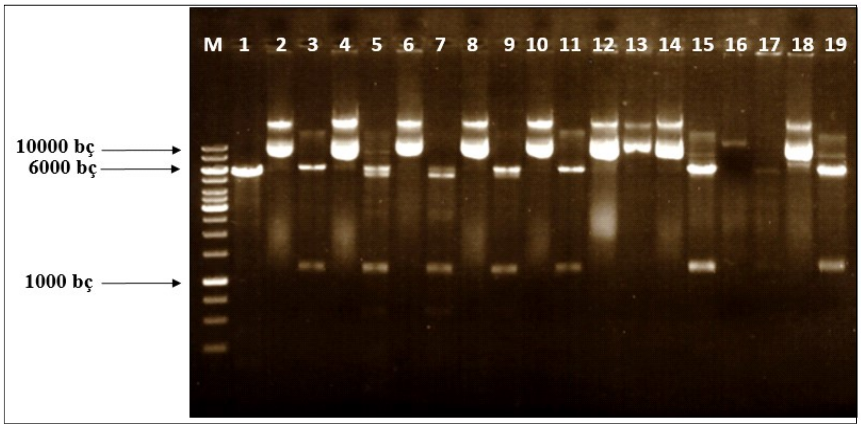
***RE: Restriksiyon endonükleaz**

Bu olası rekombinant plazmitlerden hiç birinin *relA* genini taşımadığı gözlenmiştir. Yapılan taramalardan bir kısmı örnek teşkil etmesi açısından Şekil 6.3'te verilmiştir.



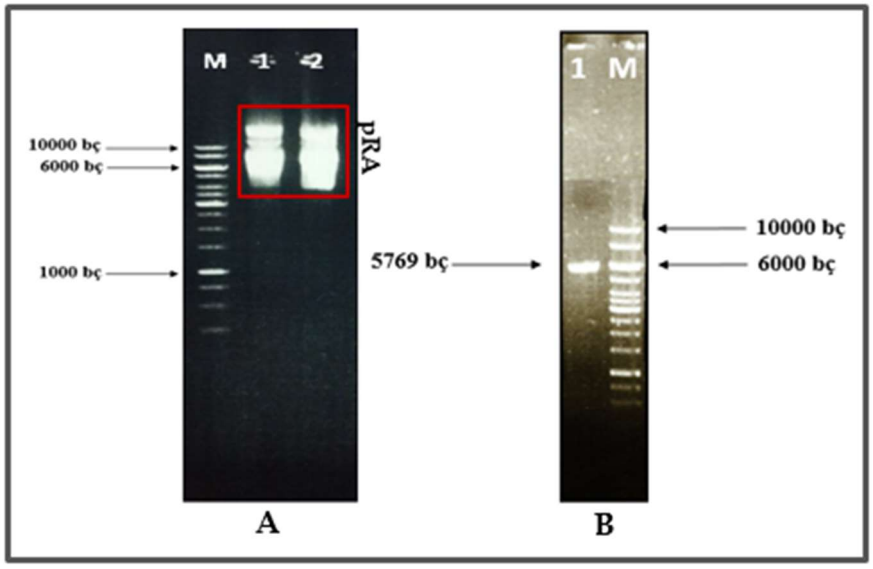
Şekil 6.3: Olası rekombinant pRA ve pHZ1351 plazmitlerinin taranması. a) Transformantların pRA+*relA* için taranması. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: Kesilmemiş pRA plazmiti; 2: pRA plazmidinin *Bam*HI kesimi (kontrol) 3-9: Olası rekombinant plazmitlerin *Bam*HI kesim sonuçları, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: pHZ1351 plazmidinin *Eco*RI kesimi (kontrol). 2-5: Olası rekombinant plazmitlerin *Eco*RI kesim sonuçları.

*Xba*I ve *Eco*RI enzimleriyle kesilip, jelden saflaştırılmış *relA* fragmanı ile aynı enzimlerle kesilmiş pRA vektörü, farklı oranlarda tekrar ligasyon reaksiyonuna sokulmuş ve ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α kompetanlarına [66] aktarılmıştır. Miniprep plazmit izolasyonu [69] yöntemiyle transformantlar doğru rekombinant plazmitlerin tespiti için taranmıştır. *relA* genini taşıyan pRA plazmidi *EcoR*I/*Xba*I ikili enzim kesimine tabi tutulduğunda yaklaşık 6 kb ve 2.5 kb büyüklüğünde iki bant beklenmektedir. Transformantlardan izole edilen plazmitler kesildiğinde beklenildiği gibi 6 kb boyutunda bir bant gözlenmiş ancak *relA* ile aynı boyutta bir bant gözlenememiş, onun yerine daha küçük boyutlu DNA fragmanları elde edilmiştir. Yapılan ~ 80 taramanın bir kısmı örnek teşkil etmesi açısından Şekil 6.4'te sunulmuştur.



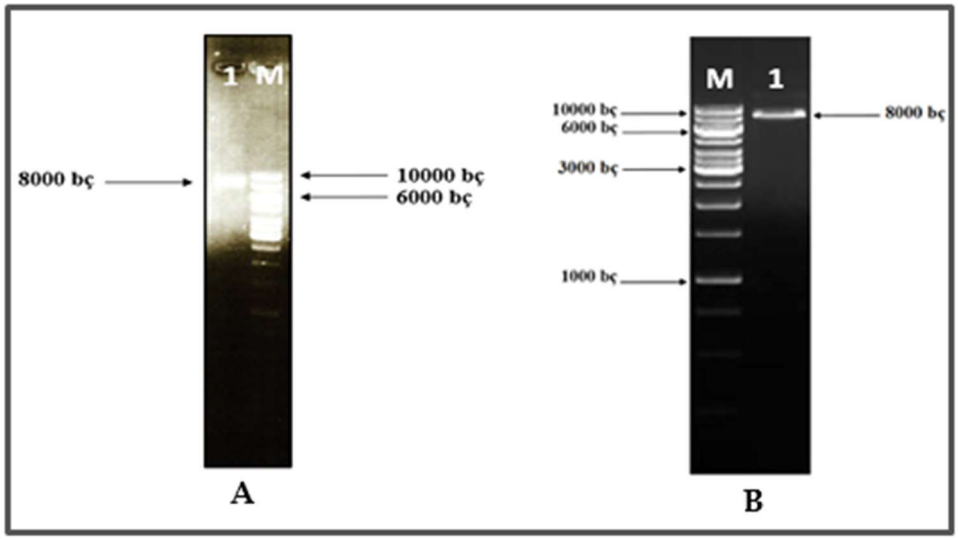
Şekil 6.4: Transformantların pRA+*relA* için taranması M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: pRA plazmidinin *Eco*RI-*Xba*I kesiminin agaroz jel görüntüsü (kontrol) 2-19: Sırasıyla, izole edilen olası rekombinant plazmidlerin kesilmemiş ve *Eco*RI-*Xba*I enzimleriyle kesilmiş görüntüleri.

Yapışkan uçlu ligasyon sonucunda *relA* geninin pRA ve pHZ1351 vektörlerine klonlanması sağlanamadığından küt uçlu ligasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda izole edilen pRA plazmidi *Eco*RV enzimi ile kesilmiştir (Şekil 6.5).



Şekil 6.5: pRA plazmidinin kesilmemiş ve kesilmiş haldeki jel görüntüsü. a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1-2: pRA plazmidi, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: pRA plazmidinin *Eco*RV kesimi.

pHZ1351 plazmidi ise *Bam*HI enzimi ile kesilmiş, daha sonra plazmidin 5' yapışkan uçları klenow fragmentiyle doldurularak ligasyon için küt uçlu hale getirilmiştir (Şekil 6.6).



Şekil 6.6: Ligasyona hazırlanan pHZ1351 plazmidinin jel görüntüsü. a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: pHZ1351 plazmidinin *Bam*HI kesimi, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: *Bam*HI enzimi ile kesilmiş ve klenow fragmanı ile doldurulmuş pHZ1351 plazmidi.

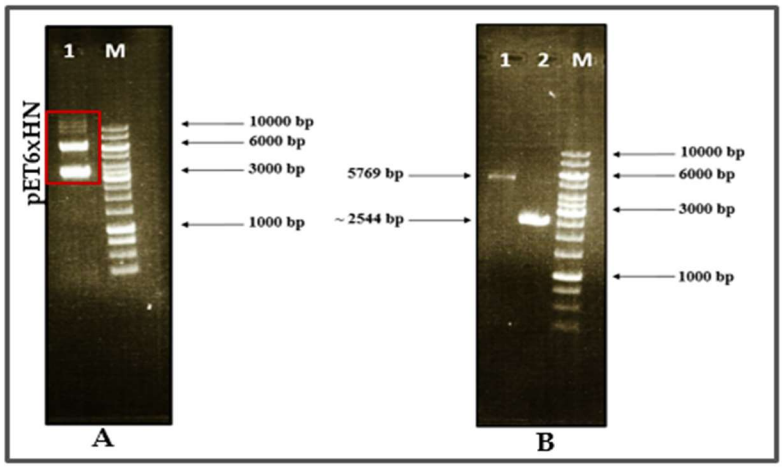
Q5 DNA polimeraz enziminin kullanıldığı PZR ile elde edilen küt uçlu *rel*A geni, jelden izole edilerek ligasyon reaksiyonuna sokulmuştur. Transformantlardan izole edilen plazmitlerin hiçbirinin *relA* genini taşımadığı bulunmuştur (sonuç verilmedi).

Yüksek dozda ifade edildiğinde *relA* ürününün, hücre içerisinde alarmon birikimini teşvik ederek toksik etkiye neden olduğu bilinmektedir [70], [71]. Her ne kadar *E. coli* RNA polimerazının *Streptomyces* promotoruna bağlanması ve ekspresyona sebep olması düşük bir ihtimal olsa da klonlama çabalarındaki başarısızlıklar bu olasılığın düşünülmesine sebep olmuştur. Ayrıca pRA ve pHZ1351 plazmitleri ticari vektörler olmadığından klonlanan gene bağlı olarak stabilite problemleriyle karşılaşılabilmektedir. Bu yüzden *relA* geninin pET6xHN-N ekspresyon vektörüyle *E. coli* TG1 hücrelerine ve pBluescript II SK (pSK(-)) ekspresyon vektörü aracılığıyla da *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmasına ve gen ekspresyonun uyarılabilir bir promotor altında kontrol edilmesine karar verilmiştir.

6.1.2. *relA* Geninin pET6xHN-N Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

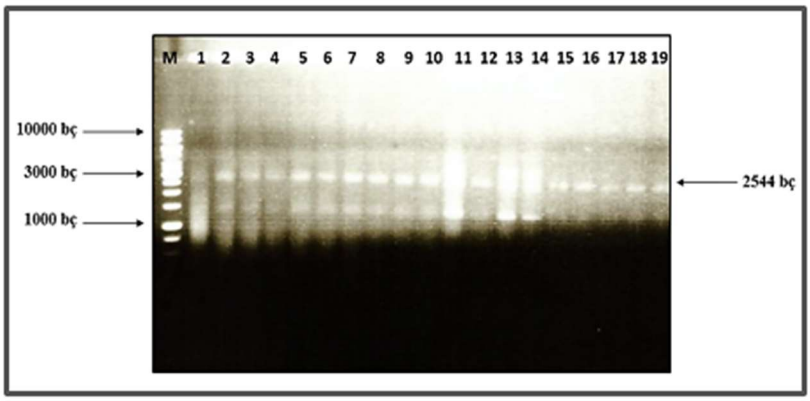
E. coli BL21 hücrelerinden izole edilen pET6xHN-N plazmidi *Sal*I enzimiyle kesilip ligasyona hazır hale getirilmiştir (Şekil 6.7). PZR ile elde edilen küt uçlu *relA* fragmanı (Şekil 6.7.b), pET6xHN-N plazmidinin kesim bölgesine (T7 promotoru

altına) klonlanmıştır. Klonlama işlemi In-Fusion® HD Klonlama kitinde yer alan prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6.7: Ligasyon öncesi pET6xHN vektörü ve *relA* geni. a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: *E. coli* BL21 hücresinden izole edilip saflaştırılan pET6xHN ekspresyon vektörü, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: Ligasyon öncesi *Sal*I enzimiyle kesilen pET6xHN ekspresyon vektörü; 2: *relA* geni.

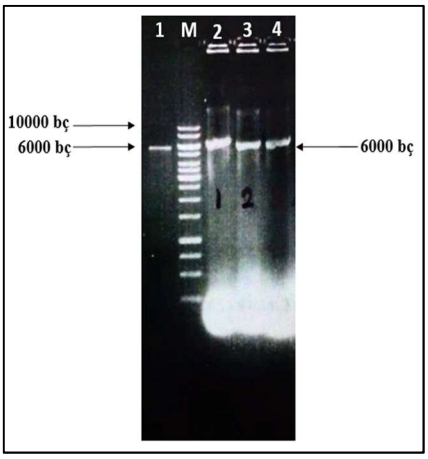
Ligasyon ürünlerinin *E. coli* TG1 hücrelerine aktarılması sonucu 27 transformant elde edilmiştir. Bu kolonilerden 21 tanesi koloni PZR yöntemi ile taranmış ve yapılan taramada transformantların hemen hepsinde *relA* genine ait bant elde edilmiştir. İlk 19 koloni için sonuçlar Şekil 6.8'de gösterilmektedir.



Şekil 6.8: pET6xNH-N+*relA* plazmidi için taranan transformantların koloni PZR sonuçları. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1-19: Koloni PZR Sonuçları.

Koloni PZR ile *relA* geninin varlığı gösterilmiş olsa da olası rekombinant plazmitlerin restriksiyon endonükleaz kesim sonuçları klonlamanın başarısız olduğunu ortaya koymuştur. Rekombinant plazmit, *Hind*III ile kesildiğinde jelde ~ 8.5 kb

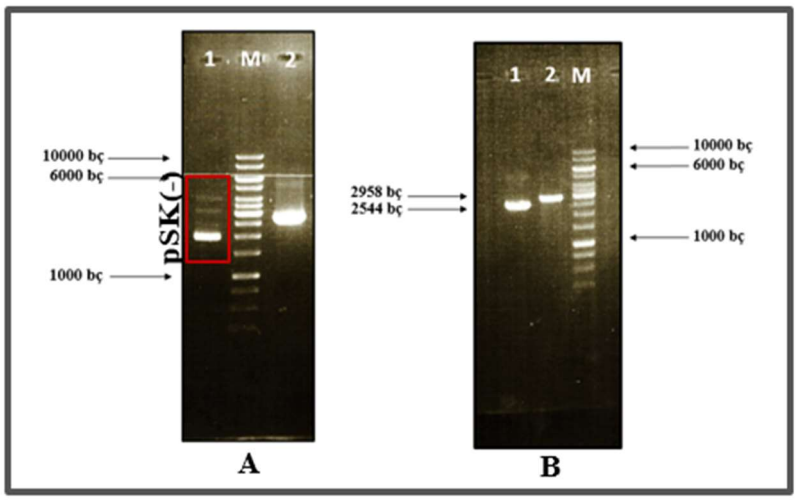
boyutunda bir bant beklenmektedir. Şekil 6.9'da olası 3 rekombinant plazmidin *Hind*III enzimiyle kesim sonucu gösterilmiştir.



Şekil 6.9: pET6xNH-N+*relA* plazmidi için taranan transformantların kesim sonuçları. 1: pET6xNH-N plazmidinin *Hind*III enzimiyle kesim sonucu M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 2-4: *Hind*III enzimiyle kesilerek taranan DNA'lar.

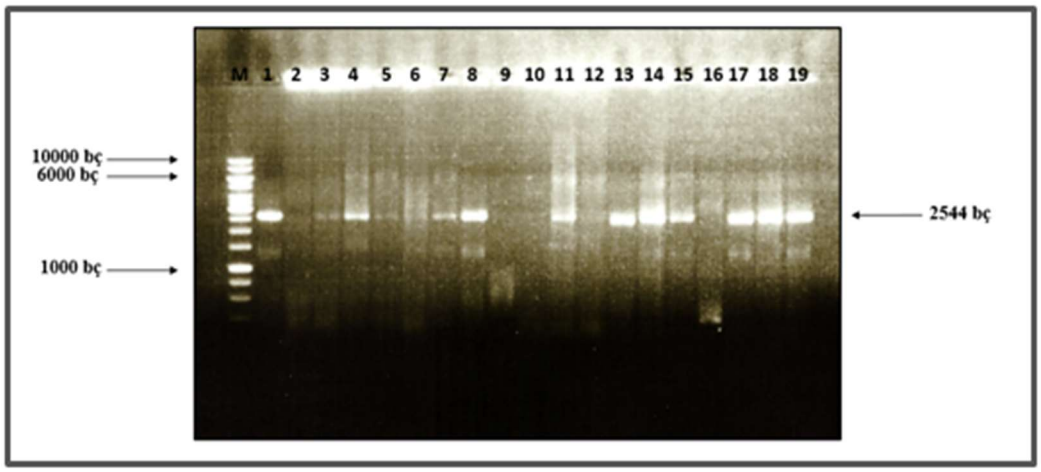
6.1.3. *relA* Geninin pSK(-) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pSK(-) vektörü *Eco*RV enzimiyle kesilip, jelden saflaştırılmş ve *relA* geni pET6xHN-N vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılan primerlerle çoğaltılarak, küt uçlu fragmanlar elde edilmiştir (Şekil 6.10).



Şekil 6.10: Ligasyon öncesi pSK(-) vektörü ve *relA* geni. a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: İzole edilen pSK(-) plazmidi. 2: PZR ile çoğaltılan *relA* geni, b) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1: 2544 bç boyutundaki *relA* geni; 2: *Eco*RV enzimiyle kesilen, 2958 bç boyutundaki pSK(-) plazmidi.

Ligasyon ürünleri öncelikle kompetan *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Olası rekombinant hücreler IPTG ve Xgal içeren ampisilinli LB agar besiyerlerinde mavi-beyaz seçim yöntemi ile belirlenmiştir. Beyaz kolonilerden *relA* genine ait primerler ile koloni PZR yapılmış ve bazı transformantlarda ilgili genin varlığı gösterilmiştir (Şekil 6.11).



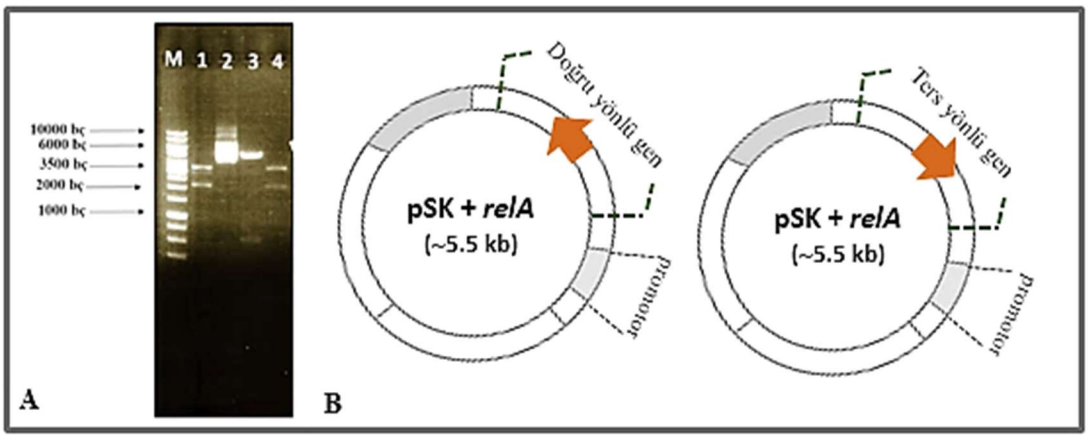
Şekil 6.11: pSK(-)+*relA* plazmidi için taranan transformantların koloni PZR sonuçları. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1-19: Koloni PZR Sonuçları.

PZR sonucu *relA* genine ait bant gözlenen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmış ve genin, vektör üzerinde bulunan *lac* promotoru altına nasıl yerleştiğini tespit etmek için plazmitler *Bam*HI enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda her iki yerleşim yönü için beklenen fragman büyüklükleri Tablo 6.2'de verilmiştir.

Tablo 6.2: Genin plazmitlere yerleşim durumuna göre kesim sonucunda beklenen bant büyüklükleri.

Yerleşim Yönü	**Beklenen bant büyüklükleri**	
	Yaban suş	**Rekombinant suş**
Ters yönde	~ 2.9 kb	3.5 kb 2 kb
Doğru yönde	~ 2.9 kb	5.0 kb 0.5 kb

Şekil 6.12'de görüldüğü gibi 1. ve 4. kuyulara yüklenen plazmitlerde gen, promotorun altına ters yönlü yerleşmiş, 3 numaralı kuyuya yüklenen plazmitte ise promotorun altına doğru yönlü yerleşmiştir.



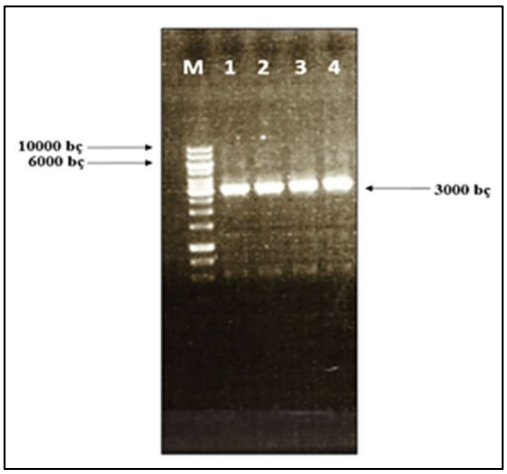
Şekil 6.12: *Bam*HI kesimi ile aktarılan genin yönünün belirlenmesi. a) M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1-4: Plazmitlerin *Bam*HI kesim sonuçları, b) Plazmit üzerinde olası gen yerleşim yönleri.

Elde edilen olası rekombinant plazmidin dizilemesi yapılmış (İontek/İstanbul) ve dizilenen bölgenin *S. coelicolor* A(3)2 *relA* geni ile uyumu BLAST programı ile tespit edilmiştir.

lac promotoru farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarıldığı halde *relA* geni *E. coli* hücrelerinde eksprese olmamıştır (sonuç verilmedi). Böylece daha önce gerçekleştirilen negatif klonlama çalışmalarının sebebinin *S. coelicolor relA* geninin *E. coli*'de ekspresyonundan kaynaklı toksik etkiden dolayı olup olmadığı gösterilememiştir. Bunun üzerine, klonlamada yaşanan sorunun, pRA ve pHZ1351 *E. coli-Streptomyces* mekik vektörlerinin stabilite probleminden kaynaklanabileceği ihtimali üzerinde yoğunlaşarak tez çalışmasına, üzerinde *S. clavuligerus*'a ait gliserol ile uyarılabilen P_{glpF} promotoru bulunan *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü pSPG ile devam edilmiştir.

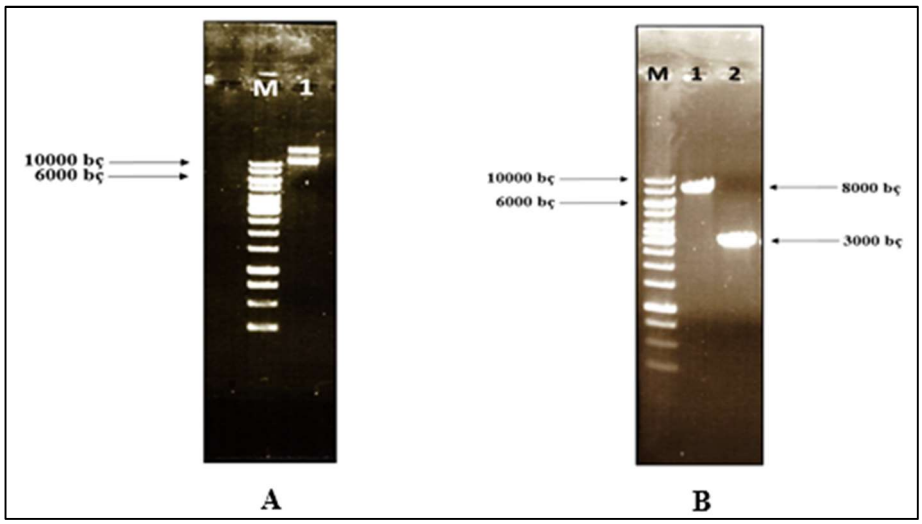
6.1.4. *relA* Geninin pSPG *E. coli-Streptomyces* Mekik Vektörüne Klonlanması

Optimal bağlanma sıcaklığının tespiti için, *S. coelicolor* A(3)2 *relA* geni farklı bağlanma sıcaklıklarında ve uygun primerlerle StL2 kozmidi kalıp olarak kullanılarak çoğaltılmıştır (Şekil 6.13).



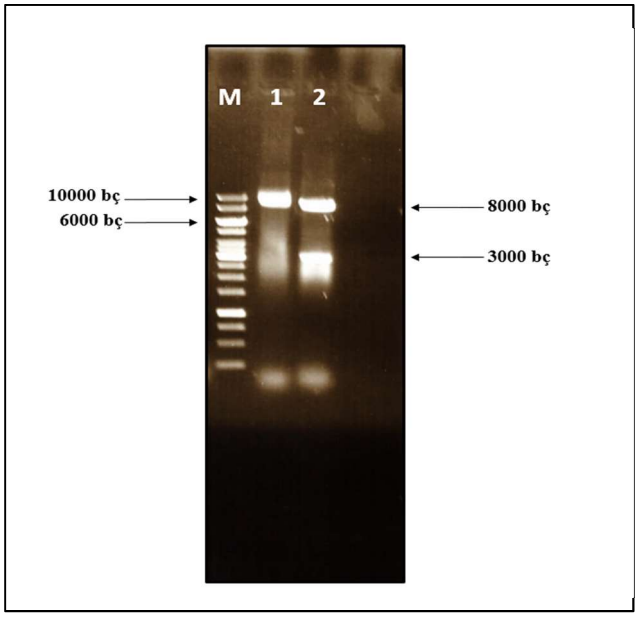
Şekil 6.13: Farklı bağlanma sıcaklıklarında *relA* genine (~ 3 kb) ait PZR sonucu. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: 60 °C; 2: 65 °C; 3: 70 °C; 4: 75 °C primer bağlanma sıcaklıkları için *relA* geni.

PZR yöntemi ile 70 °C bağlanma sıcaklığında çoğaltılan *relA* geni, *Nde*I ve *Spe*I ikili enzim kesimine tabi tutulmuştur. İstenilen boyuttaki bant (~ 3 kb), jelden saflaştırılmıştır (Şekil 4.15). Aynı şekilde, *E. coli* DH5α hücrelerinden izole edilip, saflaştırılan ~ 8 kb boyutundaki pSPG plazmidi *Nde*I ve *Spe*I enzimleriyle kesilip, jelden ekstrakte edilmiştir (Şekil 6.14). Vektör ve insört fragmanları farklı kombinasyonlarda ligasyon reaksiyonuna sokulmuştur. Elde edilen ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α kompetanlarına aktarılmıştır.



Şekil 6.14: Ligasyona hazırlanan pSPG plazmidi ve *relA* geni. a) *E. coli* DH5α hücresinden izole edilen pSPG vektörünün agaroz jel görüntüsü, b) Ligasyon öncesi *relA* geninin ve pSPG plazmidinin *Nde*I-*Spe*I kesimlerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: *Nde*I-*Spe*I enzimleriyle kesilen pSPG vektörü 2: *Nde*I-*Spe*I enzimleriyle kesilen *relA* geni.

Apramisin içeren seçici besiyerinde büyüyen kolonilerden plazmit izole edilmiş ve olası rekombinant plazmitler restriksiyon kesimine (*Nde*I kesimi ve *Nde*I/*Spe*I ikili kesimi) tabi tutulmuştur. Teorik olarak eğer plazmit *relA* genini içeriyorsa, *Nde*I/*Spe*I kesimi sonucunda jelde ~ 8 kb ve ~ 3 kb boyutunda 2 bant gözlenecektir. *relA* genini içermemesi durumunda ise jelde sadece ~ 8 kb boyutunda bir bant beklenmektedir. Olası rekombinant plazmide ait kesim sonuçlarından bir tanesi, tarama çalışmalarına örnek teşkil etmesi açısından Şekil 6.15'te sunulmuştur.



Şekil 6.15: Olası rekombinant DNA'nın *Nde*I-*Spe*I kesiminin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: Olası rekombinant DNA; 2: Olası rekombinant DNA'nın *Nde*I-*Spe*I enzim kesimi.

*Nde*I-*Spe*I ikili kesimi sonucunda jelde, plazmit (~ 8 kb) ve genin (~ kb) boyutlarına eş 2 bant gözlenmiştir. Böylece bir sonraki aşamaya geçilmiş ve olası rekombinant DNA için, genin biraz yukarısından tasarlanan yeni bir primerle İontek (İstanbul) firmasına DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Genin yaklaşık 100 bç dışındaki (pSPG üzerindeki) bir bölgeden tasarlanan yeni primer dizisi (Tablo 3.4) üzerinden dizilenen ve anlamlı bir okunma gösteren bölge, *S. coelicolor* A(3)2'ye ait *relA* geni ile kıyaslandığında % 99'luk bir benzerlik tespit edilmiştir ve E-değerinin (E-value) 0.05'ten küçük (sıfır) çıkması da iki dizi arasında anlamlı bir benzerlik olduğunu ortaya koymuştur. Kıyaslanan dizilerin ilk 360 nükleotitlik kısmı örnek olması açısından Şekil 6.16'da sunulmuştur. Böylece olası rekombinant plazmidin *relA*

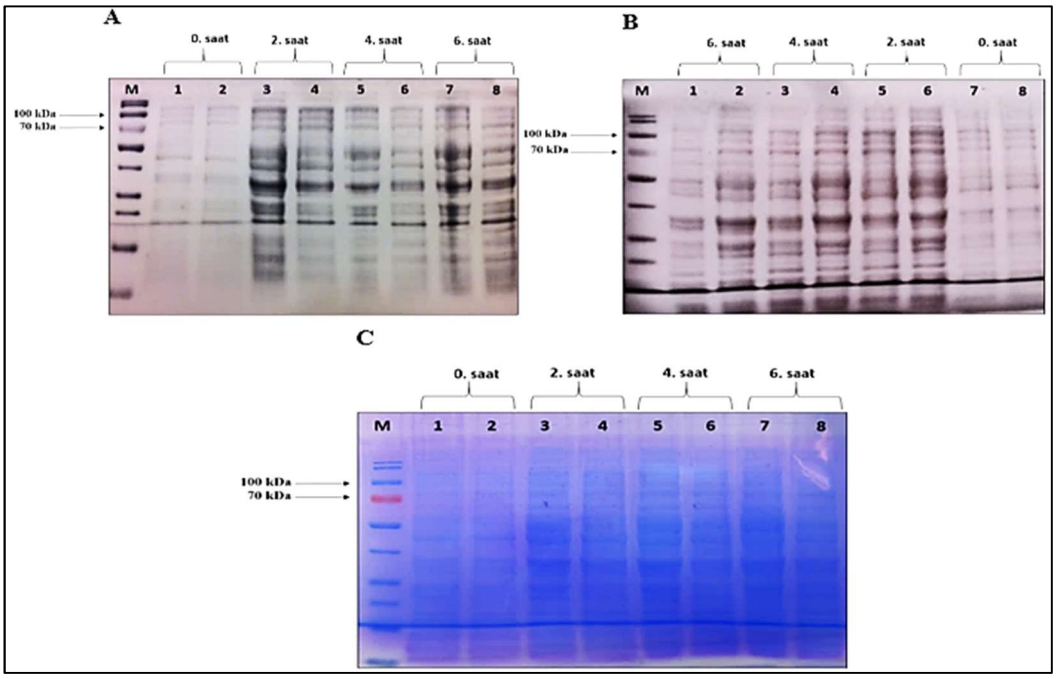
genini içerdiği ve genin plazmit üzerindeki promotor altına doğru bir şekilde oturduğu kanıtlanmıştır.

```
Query          1    TTGCCAGACGAGGCCCAGCCACTGACCGCCGCAAAGCCCGAGTCCGCCTCGGCGTCCGCG  60
Query_131641   1    TTGCCAGACGAGGCCCAGCCACTGACCGCCGCAAAGCCCGAGTCCGCCTCGGCGTCCGCG  60

Query          61   GCGAAGCCCGCGCCGAGCGCGCCCCAGGCGAAGAACGACACGCACGGGCCGATCCAGCAC  120
Query_131641   61   GCGAAGCCCGCGCCGAGCGCGCCCCAGGCGAAGAACGACACGCACGGGCCGATCCAGCAC  120

Query          121  GCCCCGGCCGCACCGGTCGACAAGCCGGCCGAGCAGCAgccgcgccccaagccgctgccg  180
Query_131641   121  GCCCCGGCCGCACCGGTCGACAAGCCGGCCGAGCAGCAGCCGCGCCCCAAGCCGCTGCCG  180

Query          181  gccgagcgcccgcagaacgcgcccgtggtccgcgcccccgccgggcagcccgcccgctcc  240
Query_131641   181  GCCGAGCGCCCGCAGAACGCGCCCGTGGTCCGCGCCCCCGCCGGGCAGCCCGCCCGCTCC  240

Query          241  ggctcctccaaccgcgtccgcgcccgcctggcccgccTCGGCGTGCAGCGCGCCAACCCG  300
Query_131641   241  GGCTCCTCCAACCGCGTCCGCGCCCGCCTGGCCCGCCTCGGCGTGCAGCGCGCCAACCCG  300

Query          301  TACAACCCGGTCCTGGAGCCGCTGCTGCGCATAGTGCGCGGCAACGACCCGAAGATCGAG  360
Query_131641   301  TACAACCCGGTCCTGGAGCCGCTGCTGCGCATAGTGCGCGGCAACGACCCGAAGATCGAG  360
```

Şekil 6.16: Dizi analizi sonucu elde edilen DNA sekansının *S. coelicolor* A(3)2'ye ait *relA* geni ile karşılaştırılması. TTG: başlangıç kodonu.

6.2. *relA* Ekspresyonunun *E. coli* Hücrelerinde Test Edilmesi

pSPG plazmidi üzerindeki P_{glpF} promotoru gliserol ile uyarılabilmektedir. *S. clavuligerus*'a ait olan promotorun, *E. coli* DH5α hücrelerinde korunmadığı BLAST algoritmasıyla tespit edilmiş ve *E. coli* genomunda P_{glpF} promotor sekansı ile anlamlı benzerlik gösteren herhangi bir bölgeye rastlanmamıştır (sonuç verilmedi). Ayrıca bu promotorun *E. coli* DH5α hücrelerinde gliserol varlığında uyarılmadığı ekspresyon deneyleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.17). Bu deneyler kapsamında farklı saatlerde alınan *E. coli* DH5α (pSPG + *relA*) örneklerinden protein izole edilmiş ve *relA* geninin ekspresyonu %0.5, %1 ve %5 gliserol konsantrasyonlarıyla indüklenmiştir. %0.5 gliserol değeri, ekspresyonu uyarmak için referans olarak seçilmiş [64] ve bu değer artırılarak *E. coli* RNA polimerazın P_{glpF}'e bağlanıp bağlanmadığı araştırılmıştır. 847 aminoasit içeren *S. coelicolor* RelA proteinin moleküler ağırlığı 94,2 kDa olarak tahmin edilmektedir [21]. 'ProtParam' programı (ExPASy) kullanılarak da bu tahmin desteklenmiştir. Test edilen hiçbir gliserol değerinde *relA* geninin ekspresyonuna rastlanmamıştır (Şekil 6.17).

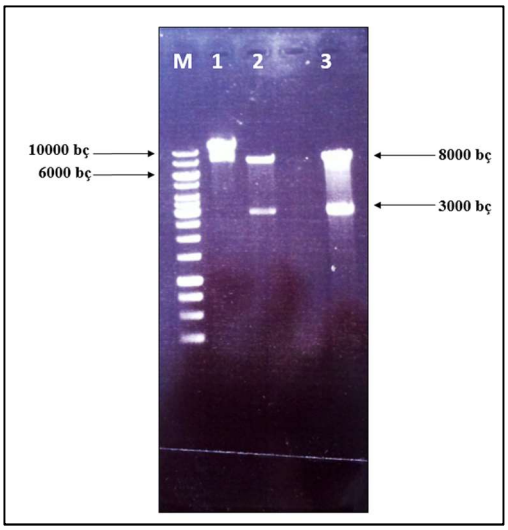


Şekil 6.17: *E. coli* DH5α-pSPG/*relA* hücresinin sırayla a) %0.5, b) %1 ve c) %5 gliserol ile indüklenmesi sonucu oluşan ekspresyon profili. M: Protein marker (Fermantas SM0671). 1-2: 0. saat örnekleri (sırasıyla, kontrol ve indüklenmiş örnek); 3-4: 2. saat örnekleri (sırasıyla, kontrol ve indüklenmiş örnek); 5-6: 4. saat örnekleri (sırayla, kontrol ve indüklenmiş örnek); 7-8: 6. saat örnekleri (sırasıyla, kontrol ve indüklenmiş örnek).

6.3. Mutant Plazmidin Metilasyon Yoksunu *E. coli* ET12567 Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmitlerin sıkı restriksiyon sistemini geçerek, *S. coelicolor* hücrelerinde ifade edilebilmesi için metil gruplarının uzaklaştırılması gerekmektedir. Çünkü bu hücrelerin metil içeren DNA'ların aktarımını sınırlandırdığı, ancak metilasyon yoksunu *E. coli* suşlarından gelen DNA'yı kabul ettiği bilinmektedir [72]. Bu yüzden rekombinant plazmitler, ilk etapta Sambrook ve çalışma arkadaşlarının (1989) yöntemiyle hazırlanan DNA metiltransferaz enziminden yoksun, pUZ8002 vektörü içeren ve içermeyen *E. coli* ET12567 kompetanlarına sırasıyla elektroporasyon ve standart transformasyon yöntemleri yardımıyla [56] aktarılmıştır. Plazmidi içeren hücreler yarım doz apramisinli LB agar besiyerlerinde büyütülmüştür.

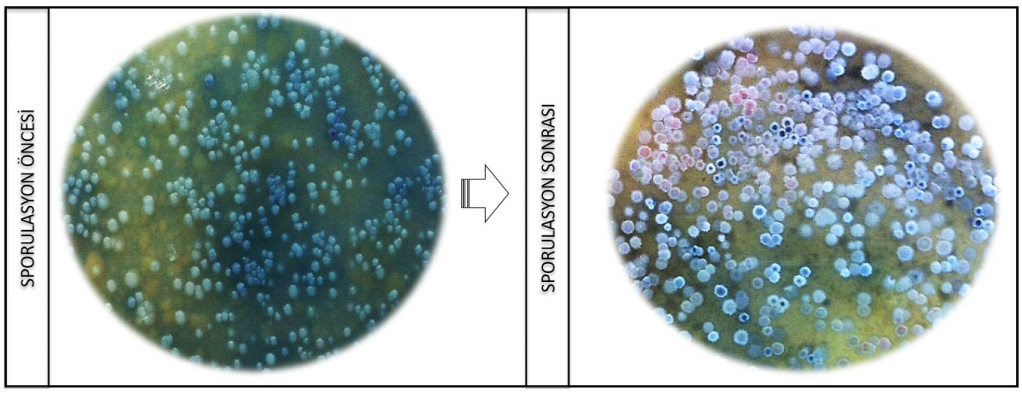
Transformant *E. coli* ET12567 hücreleri plazmit izolasyonuyla ve bu olası rekombinant plazmidin *Nde*I/*Spe*I enzimleriyle kesilmesiyle taranmıştır. Bu kesim sonucunda rekombinant DNA'lar için plazmidin (~ 8 kb) ve genin (~ 3 kb) boyutlarına eş 2 bant beklenmektedir. Jelde transformantlar için beklenen boyutta 2 bant gözlenmiş ve böylece transformasyon sonuçları doğrulanmıştır (Şekil 6.18).



Şekil 6.18: Olası *E. coli* ET12567 mutantlarının doğrulanması. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: Kesilmemiş pSPG+*relA*. 2: Rekombinant pSPG (pSPG+r*elA*) plazmidinin *Nde*I/*Spe*I ikili kesimi; 3: *E. coli* ET12567 hücresinden izole edilen olası rekombinant DNA'nın *Nde*I-*Spe*I enzim kesimi.

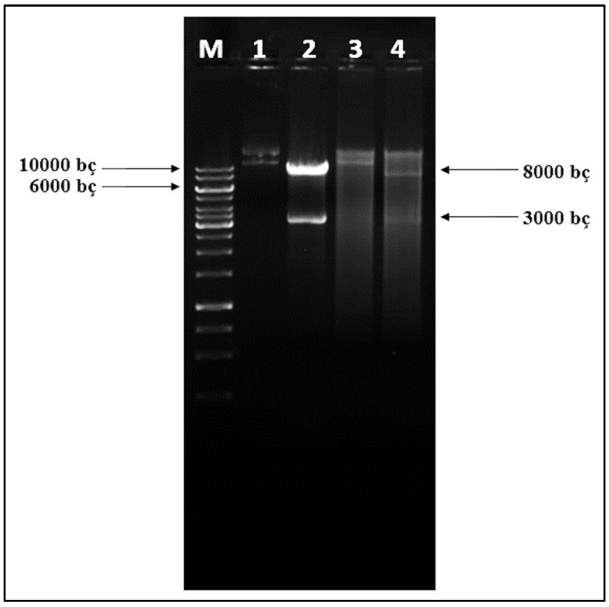
6.4. Rekombinant pSPG/*relA* Plazmidinin *E. coli* ET12567 Hücrelerinden Yaban Tip *S. coelicolor* A(3)2 Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmitlerin apramisine dirençli *E. coli* ET12567 hücrelerinden *S. coelicolor*'a transferi için konjugasyon ve PEG-aracılı protoplast transformasyonu yöntemleri kullanılmıştır [58]. Konjugasyon sonrası hücreler, $MgCl_2$ içeren MS besiyerinde büyütülmüştür. Dirençli hücreler apramisinle seçilirken, *E. coli* kontaminasyonunu önlemek amacıyla besiyerine nalidiksik asit uygulanmıştır. Antibiyotik uygulamasının ardından 2-3 gün 30 °C'ta inkübe edilen *S. coelicolor* hücreleri antibiyotik üretmeye başlamış ve yaklaşık 1 hafta içinde sporlanma gözlenmiştir (Şekil 6.19).



Şekil 6.19: pSPG/*relA* plazmidini içerdiği düşünülen *S. coelicolor* hücrelerinin zamana bağlı görünümü.

Konjugasyon sonucu oluşan olası rekombinant *S. coelicolor* suşları apramisin ve nalidiksik asit içeren TSA besiyerine aktarılmıştır. Bu hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmış ve rekombinant plazmidin varlığı *Nde*I/*Spe*I ikili enzim kesimiyle gösterilmiştir. %0.8'lik agaroz jelde pSPG plazmidine ait ~ 8 kb'lik ve *relA* genine ait ~ 3 kb'lik iki bant gözlenmiştir (Şekil 6.20).

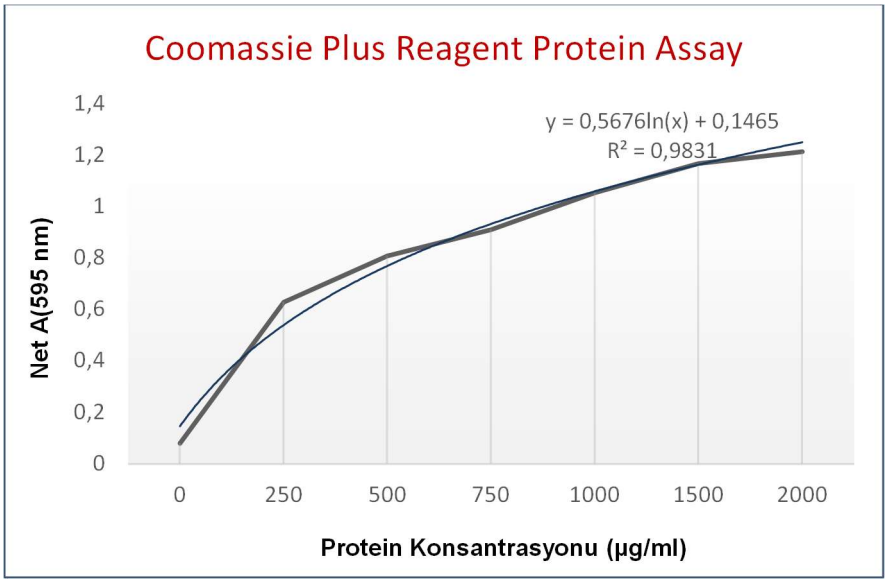


Şekil 6.20: Konjugasyon sonrası olası *S. coelicolor* mutantlarının doğrulanması. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1: Kesilmemiş pSPG+*relA*. 2: Rekombinant pSPG (pSPG+*relA*) plazmidinin *NdeI*/*Spe*I ikili kesimi (kontol); 3: Konjugasyon sonrası *S. coelicolor* hücresinden izole edilen olası rekombinant DNA; 4: Olası rekombinant DNA'nın *Nde*I-*Spe*I enzim kesimi.

6.4.1. *relA* Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi

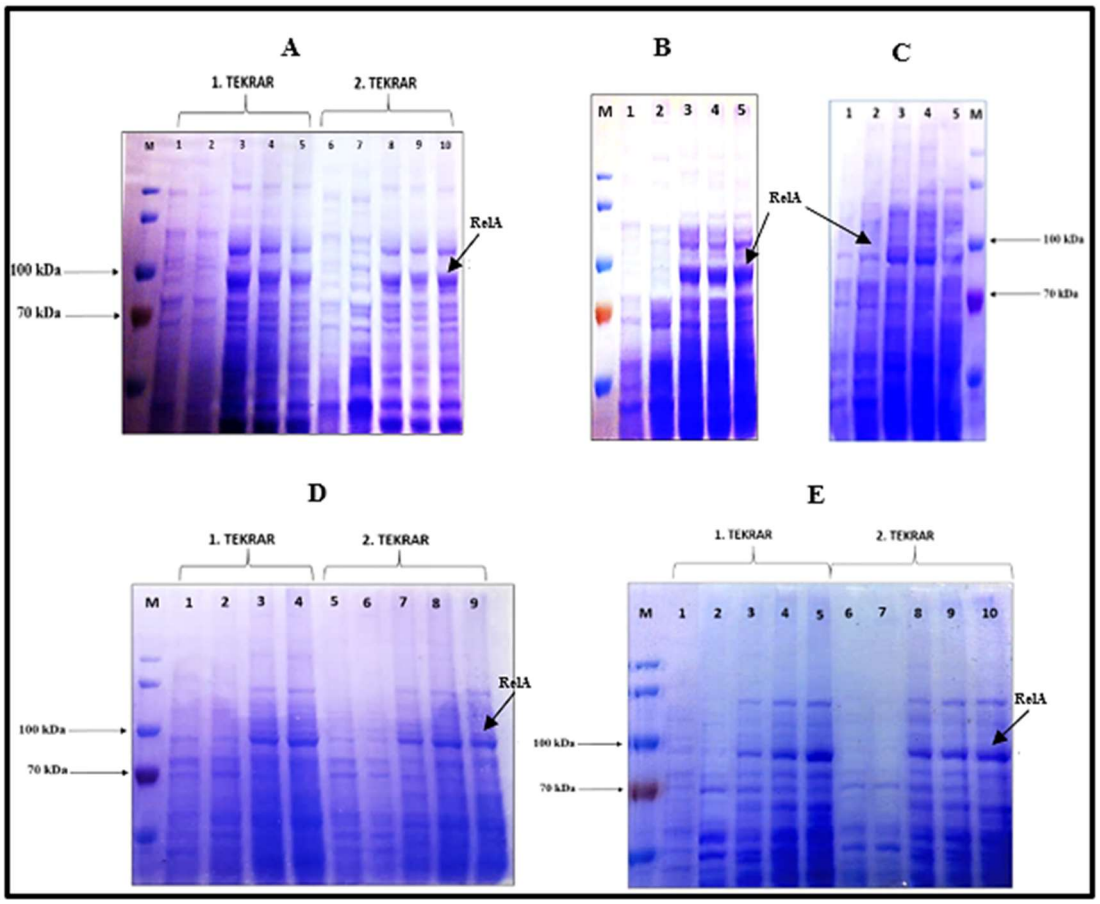
Rekombinant *S. coelicolor* A(3)2 hücrelerinde *relA* ekspresyonunun protein düzeyinde gösterilebilmesi için 2 tekrarlı, 5 hücre kültürü (**(1)** yaban tip hücre (WT); **(2)** %0.5 gliserollü ortamda yaban tip hücre (WT/0.5); **(3)** gliserolsüz ortamda rekombinant hücre (M); **(4)** %0.5 gliserollü ortamda mutant hücre (M/0.5); **(5)** %1 gliserollü ortamda mutant hücre (M/1)) ile çalışılmıştır.

Rekombinant hücreler, Apr (50 µg/ml) ve NA (25 µg/ml) içeren 100 ml TSB besiyerinde büyütülürken, yaban tip hücrelerin besiyerlerine sadece NA (25 µg/ml) eklenmiştir. Hücrelerden belli saatlerde (24, 48, 72, 96 ve 120) örnek alınmış ve proteinler mekanik ve kimyasal işlemlere tabi tutularak izole edilmiştir. Örneklerin protein miktarları, BSA standart grafiği referans alınarak hesaplanmıştır (Şekil 6.21).



Şekil 6.21: Comassie Plus Reagent Protein Assay ile oluşturulan standart eğri grafiği.

120 saatlik fermentasyon süresi boyunca toplanan hücrelerden izole edilen 2 tekrarlı protein örnekleri, SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür (Şekil 6.22). Rekombinant hücrelerde 100 kDa bandının altında (RelA proteinin moleküler ağırlığına (94,2 kDa) eş) kalın bir bant tespit edilmiştir. *relA* geninin ifadesi indüksiyonda kullanılan gliserol miktarıyla doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Özellikle 120. saatte bu ayrım çok net bir şekilde fark edilmektedir (Şekil 6.22). Bu sonuçlar, pSPG plazmidi üzerinde yer alan *S. clavuligerus*'a ait P_{glpF} promotorunun *S. coelicolor* RNA polimerazı tarafından da tanındığını; böylece aktarılan *relA* geninin mutant hücrelerde protein düzeyinde ifade edildiğini göstermektedir.

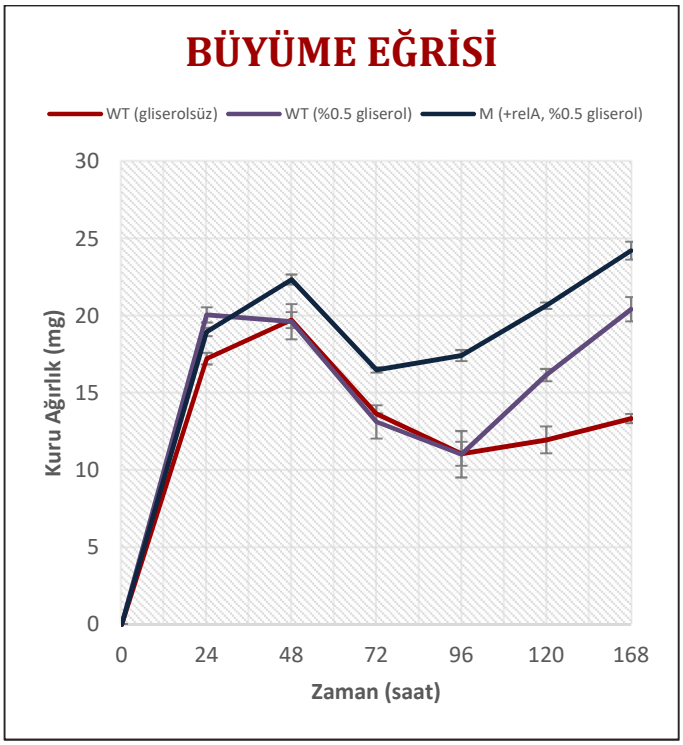


Şekil 6.22: *S. coelicolor*-pSPG/*relA* hücresinin farklı konsantrasyonlarda gliserol ile indüklenmesi sonucu oluşan 120 saatlik ekspresyon profili. a) 24. saat sonuçları, b) 48. saat sonuçları, c) 72. saat sonuçları, d) 96. saat sonuçları, e) 120. saat sonuçları. M: Protein marker (Fermantas SM0671). 1-2: Yaban tip hücre (sırasıyla, kontrol ve indüklenmiş örnek); 3-5: Mutant hücre (sırasıyla, kontrol, %0.5 gliserolle ve/veya %1 indüklenmiş örnekler); 6-7: Yaban tip hücre (sırasıyla, kontrol ve indüklenmiş örnek); 8-10: Mutant hücre (sırasıyla, kontrol, %0.5 gliserolle ve %1 indüklenmiş örnekler). 48. ve 72. saat örneklerinin sadece tek tekrarları verilmiştir.

6.5. *relA* Ekspresyonunun Antibiyotik Üretimine Etkisi

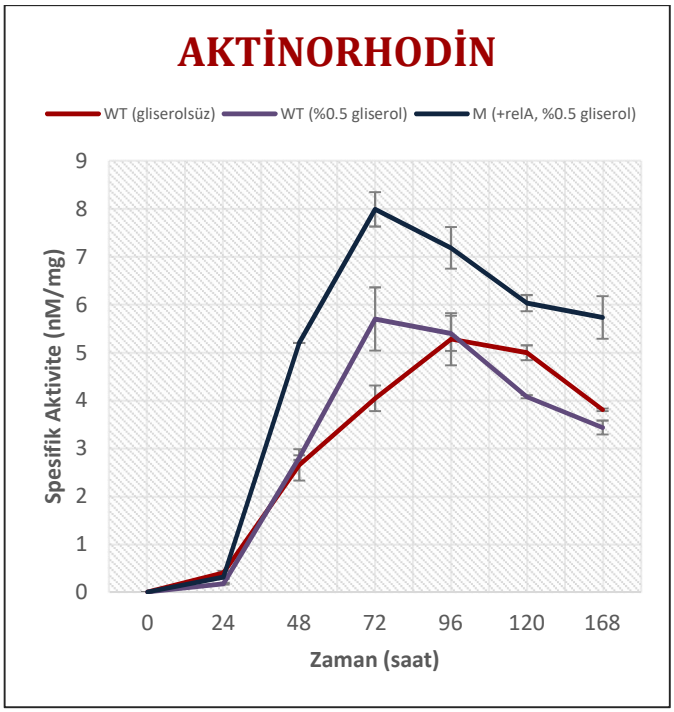
Fermentasyon deneyleri; yaban tip hücreler (WT) için antibiyotik içermeyen (gliserolsüz veya %0.5 gliserollü) R2YE besiyerlerinde gerçekleştirilirken, rekombinant hücreler (M), Amp (100 µg/ml) içeren ve % 0.5 gliserollü R2YE besiyerlerinde büyütülmüştür. Bu süreç 168 saat boyunca devam ettirilmiş ve 144. saat dışında her 24 saatte bir örnek toplanmıştır. Hücrelerin 168 saatlik büyüme profilleri incelendiğinde; bazı saatlerde, gliserollü ortamdaki hücrelerin, gliserolsüz ortamdakilere kıyasla daha iyi büyüdüğü gözlenmiştir. T-test sonuçları dikkate alındığında; 0.05 eşik değeri (cut-off) için gliserolsüz ortamda büyütülen tüm yaban tip hücreler ile gliserollü ortamda büyütülen mutant hücrelerin arasında anlamlı bir

değişiklik vardır (p-değeri ≤ 0.05). Bu fark özellikle 96. saatten itibaren artmıştır (1.5-1.8 katlık değişim). Aynı eşik değer için 120. ve 168. saatlerde, gliserollü ortamda bulunan yaban tip hücrelerin, diğer yaban tip suşlara oranla biraz daha iyi büyüdüğü tespit edilmiştir (p-değeri ≤ 0.05, 1.2 ve 1.8 katlık değişim) (Şekil 6.23).



Şekil 6.23: Yaban tip ve mutant *S. coelicolor* hücrelerinin zamana bağlı üreme eğrisi.

Yaban tip ve mutant suşların, aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretimleri bölüm 5.22'de belirtildiği gibi ölçülmüştür. %0.5 gliserollü ortamda büyütülen mutant ve yaban tip hücrelerin spesifik aktinorhodin aktivitesi kıyaslandığında; 96. saat dışında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (p-değeri ≤ 0.05). Mutant hücreler, yaban tip suşlara oranla ~ 1.7-2 kat daha fazla aktinorhodin üretmiştir. Ayrıca istatistiksel açıdan daha anlamlı olacağı düşünüldüğünden bağımlı örneklem testi (two-paired t-test) de uygulanmıştır. %0.5 gliserollü ortamda büyütülen mutant suşun spesifik aktinorhodin aktivitesi, gliserolsüz ve %0.5 gliserollü ortamda büyütülen yaban tip hücrelerin aktinorhodin üretim değerleri ile kıyaslandığında p-değerleri sırasıyla ~ 0.019 ve ~ 0.0034 olarak hesaplanmıştır. Bu durum 0.05 eşik değeri için karşılaştırılan iki grup (yaban tip ve mutant hücreler) arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 6.24).

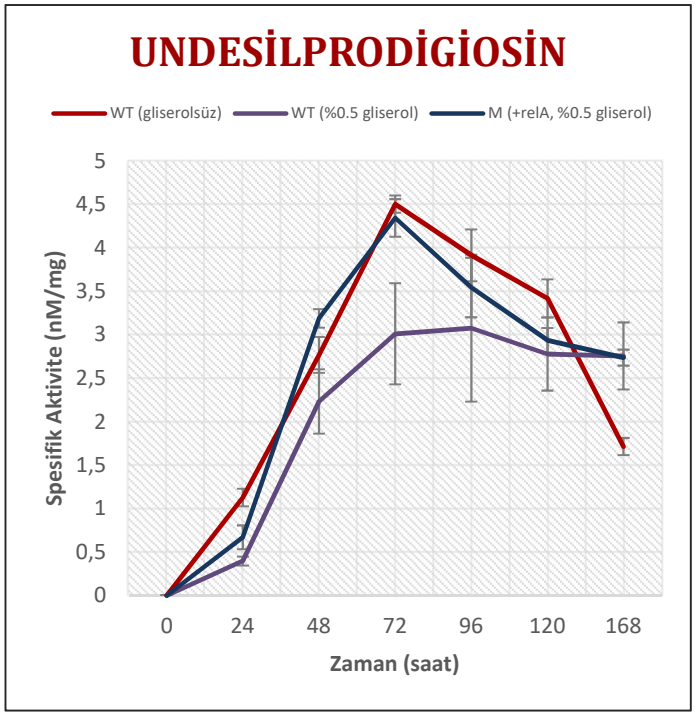


Şekil 6.24: Aktinorhodin antibiyotiğinin yaban tip ve mutant hücrelerde spesifik aktiviteleri.

Undesilprodigiosin antibiyotiğinin spesifik aktivitesinin incelenmesinde yine bağımlı örneklem testi uygulanmıştır. Test sonucunda gliserollü ve gliserolsüz ortamda büyütülen yaban tip hücrelerin undesilprodigiosin aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ancak 0.05 eşik değeri için p-değeri ~ 0.06 bulunmuştur. Bu değer 0.05'e yakındır. Bu yüzden deneydeki replikaların artırılması sonucun değişmesine neden olabilir. Eğer artan replika sayısı, gliserollü ve gliserolsüz ortamdaki yaban tip suşlar arasında anlamlı bir değişim koyarsa aktinorhodin üretimi her ne kadar gliserolden etkilenmiyor olsa da; gliserolün undesilprodigiosin sentezini negatif yönde etkilediği söylenebilir. Gliserollü ortamda büyütülen yaban tip ve mutant hücrelerin undesilprodigiosin üretim profilleri kıyaslandığında ise bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu (p-değeri = ~ 0.015) bulunmuştur. Şekil 6.25'te verilen grafik incelendiğinde bu farkın özellikle 72. saatte belirgin olduğu görülmektedir (Şekil 6.25).

Sonuç olarak, gliserollü ortamdaki mutant ve yaban tip hücreler karşılaştırıldığında, bu hücrelerin hem aktinorhodin hem de undesilprodigiosin üretim seviyelerinin farklı olduğu bulunmuştur. *relA*'nın yüksek düzeyde ifade edildiği mutant hücreler her iki antibiyotiği de aynı koşuldaki yaban tip hücrelerden daha fazla

üretmiştir. Bu ayrımın özellikle aktinorhodin antibiyotiğinde daha net olduğu görülmektedir.



Şekil 6.25: Undesilprodigiosin antibiyotiğinin yaban tip ve mutant hücrelerde spesifik aktiviteleri.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sınırlandırılmış cevap, ortamda yeterli besin bulunmaması durumunda, mikroorganizmaların alarmon (ppGpp ve pppGpp) üreterek metabolik durumlarının yeni koşullara adaptasyonu sağlayacak şekilde yeniden düzenlenmesini tetikler. Bu mekanizma, temel olarak RSH ailesinin birer üyesi olan, RelA ve SpoT enzimlerinin yer aldığı yolaklar tarafından kontrol edilmektedir [8], [13], [18]. RelA, hücresel (p)ppGpp seviyesinin artırılmasında rol oynayan hayati proteinlerden biridir. Bu çalışma kapsamında, RelA'yı yüksek oranda üretebilen rekombinant bir suş oluşturulması ve bu suşta ikincil metabolizmadaki değişimin araştırılması amaçlanmıştır.

Öncelikle *relA* geni, integratif bir vektör olan pRA ile *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü olan pHZ1351 plazmitlerine klonlanmaya çalışılmış ancak tüm denemelere rağmen olumlu sonuç alınamamıştır. Ticari vektörler olmayan pRA ve pHZ1351 vektörlerinin çok stabil olmadıkları, özellikle bazı ürünü toksik etki yaratabilecek genlerin klonlanmasında bu vektörlerle sorunlar yaşandığı bilinmektedir. Üzerinde durulan diğer bir ihtimal de genin *Steptomyces*'e ait promotorunun *E. coli* RNA polimerazı tarafından tanınıp ifade edilebileceğidir. Yüksek düzeyde ifade edildiğinde *relA*'nın, *E. coli* hücrelerinde toksik etkiye neden olduğu bilinmektedir [70], [71]. Bu olasılığı araştırmak için ilgili gen, pET6xHN-N ve pBluescript ekspresyon vektörlerine klonlanmaya çalışılmıştır. pET6xHN-N ile yapılan klonlama çalışmaları yine negatif sonuçlanmış olsa da *relA* geni pSK(-) vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmıştır. *lac* promotoru farklı IPTG konsantrasyonlarıyla uyarıldığı halde *relA* geni, *E. coli* hücrelerinde ifade olmamıştır. Başarısız klonlama çalışmalarının sebebinin pRA ve pHZ1351 *E. coli-Streptomyces* mekik vektörlerinin stabilite probleminden kaynaklandığı ihtimali üzerinde durularak tez çalışmasına, üzerinde *S. clavuligerus*'a ait gliserol ile uyarılabilen P_{glpF} promotoru bulunan *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü pSPG ile devam edilmiştir.

relA geni pSPG vektörü üzerindeki P_{glpF} promotoru altına klonlanmış ve rekombinant plazmit ilk etapta *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılarak bu hücrelerde ifade edilmediği gösterilmiştir. Daha sonra *S. coelicolor*'a hem konjugasyon hem de protoplast transformasyonuyla aktarılan rekombinant plazmit, restriksiyon endonükleaz kesimi ile doğrulanmıştır. Ardından *relA* ekspresyonu protein düzeyinde gösterilmiştir.

E. coli ve *Pseudomonas putida* gibi canlılarda *relA*'nın yüksek seviyede ifadesinin büyümeyi negatif olarak etkilediği bulunmuştur [20]. Bu mikroorganizmalardan farklı olarak *S. coelicolor* RelA miktarındaki artışın büyümeyi baskılamadığı öne sürülmüştür [21], [71]. Bu tez çalışmasında da RelA'nın yüksek düzeyde üretiminin bakteriyel büyümeyi baskılamadığı gözlenmiştir. Hatta mutant suşun besiyerine yaban tip hücrelerden farklı olarak antibiyotik eklenmesine karşın, genel olarak bu hücrelerden daha iyi büyümüştür. Ayrıca, gliserol yaban tip hücrelerde de belli saatlerde büyümeyi teşvik etmiştir.

Alarmon üretiminin *S. coelicolor* hücrelerinde ATP sentezi, yağ asidi sentezi, karbon metabolizması, besinlerin taşınması gibi bakteriyel büyümeye ilişkin pek çok hücresel sürecin yanısıra sekonder metabolizmayı da etkilediği bilinmektedir [52]. Bu yüzden çalışmada *relA* geninin yüksek düzeyde ekspresyonunun antibiyotik üretimine etkisi araştırılmıştır. Aktinorhodin ve undesilprodigiosin antibiyotiklerinin spesifik aktiviteleri 168 saatlik fermentasyon deneyiyle belirlenmiştir. %0.5 gliserollü ve gliserolsüz ortamda büyütülen yaban tip hücre kültürü ile %0.5 gliserollü ortamda büyütülen mutant kültürden 24 saatte bir örnek alınmış ve antibiyotik ölçümleri yapılarak, spesifik aktiviteler belirlenmiştir. Ölçümler sonucunda *relA* geninin yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde, gliserollü ortamda büyütülen yaban tip hücrelere oranla daha yüksek düzeyde antibiyotik üretimi görülmüştür. Alınan sonuç literatür çalışmaları ile tutarlıdır.

Bilgimiz dahilindeki literatür çalışmaları Δ*relA* mutantlarında komplementasyona dayanmaktadır. Bu tarz çalışmalar, çoğu sınırlandırılmış besiyerinde Δ*relA* hücrelerinde aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretiminin olumsuz etkilendiği ve *relA* komplementasyonun bu etkiyi tersine çevirdiğini göstermiştir [51][73][74]. Bu bulgu alarmon üretimi ve antibiyotik sentezi arasındaki güçlü bağlantıyı ortaya koymaktadır. Ayrıca Hesketh ve arkadaşları (2007) zengin 'nutrient agar' besiyerinde yürüttükleri çalışma sonucunda RelA proteini, alarmon sentezi ve actII-ORF4 transkripsiyonu arasında amino asit açlığından bağımsız bir ilişki olduğunu öne sürmüştür [52]. Zengin R2YE besiyeri kullanılarak yürütülen bu tez çalışmasında da benzer bir bulguya rastlanmıştır.

Gliserollü ve gliserolsüz ortamda büyütülen yaban tip hücreler karşılaştırıldığında aktinorhodin üretimleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Oysa gliserollü ortamda büyütülen mutant hücre, her iki kontrol grubundan daha yüksek düzeyde aktinorhodin üretmiştir. Bu sonuçlar bize mutant

hücrelerin aktinorhodin üretim potansiyellerin gliserolden bağımsız bir şekilde arttığını göstermektedir. Undesilprodigiosin üretimi incelendiğinde ise sadece gliserollü ortamda büyütülen yaban tip ve mutant hücreler arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Her ne kadar gliserollü ve gliseolsüz ortamda büyütülen yaban tip hücreler arasında statistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmese de; bağımlı örneklem testi sonucunda p-değeri 0.05'e yakın çıkmıştır. Çalışmada her deney seti üçer replikadan oluşmaktadır. Oysa tekrar sayısı artırılarak hem testin güvenilirliği artırılabilir hem de eğer gerçekte bu iki grup arasında anlamlı bir benzerlik varsa bu da ortaya çıkabilir. Böyle bir fark gözlendiği takdirde her ne kadar aktinorhodin üretimi gliserolden etkilenmese de gliserolün undesilprodigiosin sentezinin regülasyonu üzerinde etkili olabileceği öne sürülebilir.

Δ*relA* ve *relA*$^+$ (komplementasyon) hücrelerdeki alarmon üretim farklılıklarının bakteri morfolojisine yansımalarını araştıran çeşitli çalışmalar da literatürde mevcuttur [21], [35], [74]. Δ*relA* mutantlarında 'aerial' misel ve spor oluşumu gözlenmezken [35], *Streptomyces relA*$^+$ mutantlarında (komplementasyon) *relA*'nın indüklenmesinin (p)ppGpp üzerinden morfolojik gelişimi başlattığı önerilmiştir [21]. Tez çalışması kapsamında elde edilen, yüksek düzeyde *relA* eksprese eden *S. coelicolor* suşundaki RelA sentezi daha yüksek gliserol konsantrasyonlarıyla ve besiyeri optimizasyonuyla iyileştirilerek bu genin bakteri morfolojisini nasıl etkilediği daha kapsamlı bir şekilde incelenebilir. Çünkü bugüne kadar bilgimiz dahilinde yapılan çalışmalarda, yüksek düzeyde *relA* ifadesinin yaban suştaki etkisi incelenmemiş, hep *relA* geni silinmiş ve mutant hücrelerin komplementasyonu üzerinden bir takım sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM) gibi araçlarla yüksek miktarda RelA üretiminin yaban suşun morfolojine etkisi ile bu süreçte görevli sigma faktörleri araştırılabilir.

Ayrıca bu çalışmada her ne kadar *relA* geninin protein seviyesinde ekspresyonu gösterilmişse de üretilen proteinin işlevsel olup olmadığı incelenmemiştir. Bu yüzden RelA seviyesi ve alarmon düzeyi arasındaki korelasyon göz önünde bulundurularak, RelA ifadesine bağlı alarmon (ppGpp ve (p)ppGpp) seviyesindeki artış HPLC vasıtasıyla incelenebilir.

Özetle bu tez çalışmasında *S. coelicolor*'a ait sınırlandırılmış cevaptan sorumlu *relA* geni, çok kopyalı bir *E. coli-Streptomyces* mekik vektörünün gliserol ile uyarılabilen promotoru altına klonlanmış ve ekspresyonu protein düzeyinde gösterilmiştir. Yapılan antibiyotik ölçümleri sonucunda, RelA proteinin yüksek

düzeyde üretiminin zengin besiyerinde sekonder metabolizmayı tetiklediğine dair ön bulgular elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Chater K. F., (2006), "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics", Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 361, 761-768.

[2] de Lima P. R. E., da Silva, I. R., Martins M. K., de Azevedo, J. L., de Araújo, J. M., (2012), "Antibiotics produced by Streptomyces", Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16(5), 466-471.

[3] Khattab A. I., Babiker E. H., Saeed H., (2016), "Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites", International Current Pharmaceutical Journal, 5(2), 27-32.

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

[5] Ryding J. 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.

[6] Boutte C. C., Crosson S., (2013), "Bacterial lifestyle shapes stringent response activation", Trends in Microbiology, 21(4), 174-180.

[7] Dalebroux Z. D., Svensson S. L., Gaynor E. C., Swanson M., (2010), "ppGpp conjures bacterial virulence", 74(2), 171-199.

[8] Hauryliuk V., Atkinson G. C., Murakami K. S., Tenson T., (2015), "Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology", Nature Publishing Group, 2(4).

[9] Kanjee U., Ogata K., Houry W., (2012), "Micro review direct binding targets of the stringent response alarmone (p) ppgpp", Mol Microbiol, 85(6), 1029-1043.

[10] Traxler M. F., Summers S. M., Nguyen H., 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", Mol Microbiol., 68(5), 1128-1148.

[11] Kamarthapu V., Epshtein V., Benjamin B., Proshkin A., M., Cashel M., Nudler E., (2016) "ppGpp couples transcription to DNA repair in E. coli", Science, 352(6288): 993–996.

[12] Liu K., Bittner A. N., Wang J., (2015), "Diversity in (p) ppGpp metabolism and effectors", Current Opinion in Microbiology, 24(1), 72-79.

[13] Dalebroux Z. D., Swanson M., (2012), "ppGpp: magic beyond RNA polymerase", Nature Publishing Group, 10(3), 203-212.

[14] Magnusson L. U., Farewell A., Nystro T., (2005), "ppGpp: a global regulator in Escherichia coli", Trends Microbiol., 13(5).

[15] Traxler M., Zacharia V., Marquardt S., Summers S. M., Nguyen H. T., Stark S. E., Conway T., (2011), "Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the 'feast to famine' gradient in Escherichia coli", Mol Microbiol., 79:830–845.

[16] Balsalobre C., (2011), "Concentration matters!! ppGpp, from a whispering to a strident alarmone", Mol Microbiol., 79(1), 827-829.

[17] Hengge R., (2009), "Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in Escherichia coli", Research in Microbiologoy, 160(9), 667-676.

[18] Atkinson G. C., Tenson T., Hauryliuk V., (2011), "The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppgpp synthetases and hydrolases across the tree of life", PLoS ONE, 6(8).

[19] Gaca A. O., Colomer-winter C., Lemos J., (2015), "Many means to a common end: the intricacies of (p) ppgpp metabolism and its control of bacterial homeostasis", 197(7), 1146-1156.

[20] van Delden, C., Comte R., Bally A., (2001), "Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in Pseudomonas aeruginosa", J Bacteriol., 183(18), 5376-5384.

[21] Sun J., Hesketh A., Bibb M. J., (2001), "Functional analysis of rela and rsha, two Rela/Spot homologues of Streptomyces coelicolor A3(2)", Society, 183(11), 3488-3498.

[22] Kristensen O., Ross B., Gajhede M., (2008), "Structure of the PPX/GPPA phosphatase from Aquifex aeolicus in complex with the alarmone ppGpp", J Mol Biol., 375(3), 1469-1476.

[23] Choi M. Y., Wang Y., Wong L. L. Y., Lu B., Chen W., Huang J., Tanner J. A., Watt R., (2012), "The two PPX-GppA homologues from Mycobacterium tuberculosis have distinct biochemical activities", 7(8).

[24] Ross W., Vrentas C. E., Sanchez-vazquez P., Gaal T., Gourse R. L., (2013), "The magic spot: a ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation", Mol Cell. 50:420–429.

[25] Maciąg-Dorszyńska M., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G., (2013), "Different effects of ppGpp on Escherichia coli DNA replication in vivo and in vitro", FEBS Open Bio, 3(1), 161-164.

[26] Wendrich T. M., Blaha G., Wilson D. N., Marahiel M. A., Nierhaus K. H.,

Genetik M., (2002), "Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA", Mol Cell, 10(4), 779-788.

[27] Loveland A. B., Bah E., Madireddy R., Zhang Y., Brilot A. F., Grigorieff N., Korostelev A., (2016), "Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation", Elife, 17(2), 1-23.

[28] Shi X, Khade P. K., Sanbonmatsu K. Y., Joseph S., (2012), " Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis", J Mol Biol., 419(3-4):125-38.

[29] Arenz S., Abdelshahid M., Sohmen D., Payoe R., Starosta L., Berninghausen O., Hauryliuk V., Beckmann R., Wilson, (2016), "The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis", Nucleic Acids Res, 44(13), 6471-6481.

[30] Lee J., Lennon C. W., Ross W., Gourse R., (2012), "Role of the Coiled-Coil Tip of Escherichia coli DksA in Promoter Control", Journal of Molecular Biology, 416(4), 503-517.

[31] Parshin A., Shiver A. L., Lee J., Ozerova M., Schneidman-duhovny D., (2015), "DksA regulates RNA polymerase in Escherichia coli through a network of interactions in the secondary channel that includes Sequence Insertion 1", Proc Natl Acad Sci USA, 112(50), E6862-E6871.

[32] Roberts J. W., (2009), "Promoter-specific control of E. coli RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor", Genes Dev. 15;23(2):143-146.

[33] Svetlov V., Nudler E., (2013), "Basic mechanism of transcription by RNA polymerase II", Biochim Biophys Acta, 1829(1), 20-28.

[34] Aloui A., E M. A., Sahbani S. K. L. A., (2013), "Roles of methylation and sequestration in the mechanisms of dna replication in some members of the Enterobacteriaceae family", 41(9), 315-318.

[35] Jin W., Ryu Y. G., Kang S. G., Kim S. K., Saito N., Ochi K., Lee S. H., Lee K. J., (2004), "Two relA/spoT homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of Streptomyces clavuligerus", Microbiology, 150(5), 1485-1493.

[36] Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel, G. P., (2016), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(1), 1-43.

[37] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G. P., (2016), "An Introduction to Actinobacteria", 6(9), 111-133.

[38] Priyadharsini P., Dhanasekaran D., (2015), "Diversity of soil Allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India", Journal of the

Saudi Society of Agricultural Sciences, 14(1), 54-60.

[39] Hasani A., Kariminik A., Isaazadeh K., (2014), "Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities", International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2(1), 63-75.

[40] 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.

[41] Karandikar A., Sharples G. P., Hobbs G., (1997), "Differentiation of Streptomyces coelicolor A3(2) under nitrate-limited conditions", Microbiology, 143(6), 3581-3590.

[42] Lo Grasso L., Martino D. C., Alduina R., (2016), "Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes", In: Actinobacteria - Basics Biotechnol. Appl. InTech. 24(1), 177-195.

[43] 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.

[44] 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, 151:91-198.

[45] Manteca A., Sanchez J., (2010), "Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production", Applied and Environmental Microbiology, 75(9), 560-566.

[46] Bibb M. J., (2005), "Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes", Current Opinion in Microbiology, 8(2), 208-215.

[47] López-García M. T., Rioseras B., Yagüe P., Álvarez J. R., Manteca Á., (2014), "Cell immobilization of Streptomyces coelicolor: Effect on differentiation and actinorhodin production", International Microbiology, 17(2), 75-80.

[48] Yagüe P., Lopez-Garcia M. T., Rioseras B., Sanchez J., Manteca A., (2012) "New insights on the development of Streptomyces and their relationships with secondary metabolite production", Current Trends in Microbiology., 8:65–73.

[49] Chakraburtty R., White J., Takano E., Bibb M., (1996), "Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (reIA) of Streptomyces coelicolor A3(2)", Molecular Microbiology, 19(2), 357-368.

[50] Aldridge M., Facey P., Francis L., Bayliss S., Del Sol R., Dyson P., (2013), "A novel bifunctional histone protein in Streptomyces: a candidate for structural coupling between DNA conformation and transcription during development

and stress?", Nucleic Acids Res., 41(9):4813-4824.

[51] Kang S. G., Jin W., Bibb M., Lee K. J., (1998), "Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and relA mutant strains of Streptomyces coelicolor A3(2) grown in continuous culture", FEMS Microbiology Letters, 168(2), 221-226.

[52] 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)", 8(8).

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

[54] Carter P., Bedouelle H., Winter G., (1985), "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors", Nucleic Acids Res., 13:4431–4443.

[55] 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.

[56] 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", Proc Natl Acad Sci U S A., 100:1541–6.

[57] Hopwood D., (1999), "Forty years of genetics with Streptomyces: from in vivo through in vitro to in silico", Microbiology, 145(1), 2183-2202.

[58] Gust B., Kieser T., Chater K., (2002), "PCR targeting system in Streptomyces coelicolor A3 (2)", John Innes Centre, 3(2), 1-39.

[59] Yi J. S., Kim M., Kim S. J., Kim B. G., (2015), "Effects of sucrose, phosphate, and calcium carbonate on the production of pikromycin from Streptomyces venezuelae", Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(4), 496-502.

[60] Kurt Kızıldoğan A., Vanlı J. G., Mutlu A., Sertdemir İ., Özcengiz G., (2017), "Genetic engineering of an industrial strain of Streptomyces clavuligerusfor further enhancement of clavulanic acid production", Turkish Journal of Biology, 41(5530), 342-353.

[61] Wang L., Tahlan K., Kaziuk T. L., Alexander D. C., Jensen S. E., (2004), "Transcriptional and translational analysis of the ccaR gene from Streptomyces clavuligerus", Microbiology, 150(12), 4137-4145.

[62] Kieser T., Bibb, M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A., (2000), “Practical Streptomyces genetics”, The John Innes Foundation, Norwich, England.

[63] Pérez-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(Pt 5):1527-1537.

[64] Kurt A., Álvarez-Álvarez R., Liras P., Özcengiz G., (2013), "Role of the cmcH-ccaR intergenic region and ccaR overexpression in cephamycin C biosynthesis in Streptomyces clavuligerus", Applied Microbiology and Biotechnology, 97(13), 5869-5880.

[65] Gomez-Escribano J. P., Martín J. F., Hesketh A., Bibb M. J., Liras P., (2008), "Streptomyces clavuligerus relA-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: Negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp", Microbiology, 154(3), 744-755.

[66] Sambrook, J., MacCallum, P., Russell, D., (2000), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

[67] Sanders C., (2011), "E.coli: Sanders Lab Protocols", 3:1–85.

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

[69] Holmes D. S., Quigley M., (1981), "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids", Analytical Biochemistry, 114(1), 193-197.

[70] Schreiber G., Metzger S., Aizenman E., Roza S., Cashel M., Glaser G., (1991), "Overexpression of the relA gene in Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 266(6), 3760-3767.

[71] Tedin K., Bremer H., (1992), "Toxic effects of high levels of ppGpp in Escherichia coli are relieved by rpoB mutations", Journal of Biological Chemistry, 267(4), 2337-2344.

[72] González-Cerón G., Miranda-Olivares O. J., Servín-González L., (2009), "Characterization of the methyl-specific restriction system of Streptomyces coelicolor A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases", FEMS Microbiology Letters, 301(1), 35-43.

[73] Martínez-Costa O. H., Arias P, Romero N. M., Parro V, Mellado R. P., Malpartida F., (1996), "A relA/spoT homologous gene from Streptomyces coelicolor A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes", J Biol Chem., 271(18):10627-34.

[74] Chakraburtty R., Bibb M., (1997), "The ppGpp synthetase gene (relA) of Streptomyces coelicolor A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation", Journal of Bacteriology, 179(18), 5854-5861.

ÖZGEÇMİŞ

Müberra Fatma CESUR, 1 Temmuz 1991 yılında Uşak'ta doğdu. 2015'te Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamlayıp, aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam eden Müberra Fatma CESUR, 2015 yılından bu yana Gebze Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.