

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİFOSFAT KİNAZ YOKSUNLUĞUNUN
STREPTOMYCES COELICOLOR'DA
ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİNE ETKİSİ

İrem YALIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2010

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİFOSFAT KİNAZ YOKSUNLUĞUNUN
STREPTOMYCES COELICOLOR'DA
ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİNE ETKİSİ

İrem YALIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

GEBZE

2010

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: POLİFOSFAT KİNAZ (PPK) YOKSUNLUĞUNUN STREPTOMYCES COELICOLOR'DA ANTİBİYOTİK BİYSENTEZİNE ETKİSİ.

YAZAR ADI: İrem YALIM

Bütün canlılarda bulunan Polifosfat (poliP), yüzlerce fosfat molekülünün yüksek enerjili anhidrid bağlarıyla birleşmesinden meydana gelen bir polimerdir. “PoliP kinaz” enzimi (PPK) tarafından sentezlenen PoliP, önemli bir enerji deposu olup bazı kinazlar tarafından ATP yerine kullanılabilmekte ve adenilat kinazlar yardımıyla da NTP'lerin yapımında kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu polimer, hücrelerin fiziksel ve kimyasal streslere karşı direnç göstermesinde de rol oynar.

Streptomyces 'ler, çok sayıda biyoaktif metabolit sentezleme kapasitesine sahip biyoteknolojik açıdan önemli mikroorganizmalardır. *Streptomyces* 'lerin poliP metabolizması ve bu polimerin antibiyotik üretimiyle bağlantısı konusunda ilk çalışma 2002'de Chouayekh ve Virolle tarafından yapılmış ve *Streptomyces lividans ppk* geninin antibiyotik biyosentezini negatif yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu negatif etkinin bütün *Streptomyces* türleri için geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. Bu konuya açıklık getirilmesi amacıyla, bu çalışmada, *Streptomyces coelicolor* 'ın *ppk* geni bloke edilerek bu mutasyonun antibiyotik üretimine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *S. lividans* 'da antibiyotik biyosentezine negatif etkisi bulunan *ppk* geninin, *S. coelicolor* türü için de aynı baskılayıcı etkiyi gösterdiği bulunmuştur.

S. coelicolor Δppk suşta undesilprodigiosin üretimi yaban suş ile aynıken aktinorhodin üretimi yaban suşa göre 120. saatte yaklaşık 5 kat artmıştır. Mutant suşun, yalnızca antibiyotik içeren zengin besiyerinde üreyebildiği ve etkin spor oluşturmadığı görülmüştür. Yaban ve *Δppk* suşlarının, oksidatif strese hassasiyetleri karşılaştırıldığında, sadece mutant suşun H₂O₂'ye hassasiyet gösterdiği bulunmuştur. *Δppk* suştaki mutasyonun komplementasyonu pHZ1351+*ppk* plazmidi ile gerçekleştirilmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: THE EFFECT OF POLYPHOSPHATE KINASE DEFICIENCY ON ANTIBIOTIC PRODUCTION IN STREPTOMYCES COELICOLOR.

AUTHOR: İrem YALIM

Polyphosphate (polyP), which is found in every living cell, is a linear polymer consisting of tens to hundreds of phosphate molecules joined together by high-energy anhydride bonds. Polyphosphate, which is synthesized by the enzyme polyP kinase, is not only an important energy store but also used as ATP substitutes and it serves as phosphate donor to regenerate NTP in association with the adenylate kinases. Moreover, this polymer has been shown to have a crucial role in the regulation of adaptive responses of cells to physical and chemical stresses.

Streptomyces are biotechnologically important bacteria and they are well known for their ability to produce a wide variety of bioactive compounds. The relationship between polyP metabolism and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* has been shown by Chouayekh and Virolle (2002). They have reported that *ppk* gene has a negative effect on antibiotic biosynthesis in *Streptomyces lividans*. It is not known whether this negative effect is also valid for other *Streptomyces*. In order to clarify this point, *ppk* gene of *Streptomyces coelicolor* has been disrupted and the effect of this mutation on antibiotic biosynthesis was investigated. According to the results of this work, *ppk* gene, which has a negative effect on antibiotic biosynthesis in *S. lividans*, has the same repressing effect in *S. coelicolor*.

Although undecylprodigiosin production by *S. coelicolor* Δppk strain is same, actinorhodin production increased about 5 times at 120. hour compared to wild type. Mutant strain grow only on antibiotic containing rich medium and not sporulate effectively. When oxidative stress sensitivity of wild type and Δppk strains were compared, it was found that only mutant strain was sensitive to H₂O₂. The complementation of mutation in Δppk strain has been done by pHZ1351+*ppk* plasmid.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve görüşleri ile beni yönlendiren, desteği ve güler yüzüyle hep yanımda olan danışmanım Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu süre boyunca rehberliğini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Füsun Gümüşel'e teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız hocam Yrd. Doç. Dr. İnci Öztürk'e imkanlarından yararlanmama izin verdiği ve güler yüzünü esirgemediği için teşekkür ederim. İstatistik analizlerinde yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Yelda Özden Tokatlı'ya teşekkür ederim.

Bu tezin gerçekleşmesinde her türlü katkıları bulunan, emeğinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim değerli arkadaşım Arş. Gör. Tuğrul Doruk'a, birlikte bu yola başladığımız ve bu yolda her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Ümmühan Savaş'a minnettarlıklarımı sunarım.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve tez çalışmam boyunca bir çok konuda yardımcı olan sevgili kader arkadaşlarım, Gonca Altın'a, Haluk Camcı'ya, Kemal Avican'a ve Davut Erdoğan'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Arş.Gör. Nagihan Akbulut, Arş.Gör.Merve Tuzlakoğlu Öztürk, Arş.Gör. Özlem Akkaya, Uzman Hüseyin Balcı, Arş.Gör. Serda Kayman ve Arş.Gör. Irmak Şah, Arş. Gör. Sinem Tunçer, Arş. Gör. Mine Gül Şeker, Arş. Gör. Çiğdem İleri, Laborant Pelin Balçık, Arş. Gör. Banu Başara, Teknisyen Özlem Asker, Arş. Gör. Hülya Akdemir, Arş. Gör. Emrah Kırdök, Uzman Ergün Kaya, ve Hale Hebip'e teşekkür ederim.Bu tezin yazım aşamasında benimle birlikte uykusuz kalan sevgili arkadaşım Birsu Çinçin'e emeği için çok teşekkür ederim.

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimimin her döneminde destekleyen sevgili babam Nezir Yalım'a, annem Nurcan Yalım'a, kardeşim Hasan Yalım'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana evini açarak her türlü desteği sağlayan saygıdeğer Melahat Akşahin ve tüm Akşahin ailesi fertlerine sonsuz teşekkürü bir borç bilirim

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	İX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Polifosfat	1
1.1.1. Polifosfat Kinaz (Polifosfat:ADP Fosfotransferaz [(PPK), EC 2.7.4.1]	2
1.1.2. Ekzopolifosfataz (Polifosfat Fosfohidrolaz [(PPX), EC 3.6.1.11]	5
1.1.3. Endopolifosfataz (Polifosfat Depolimeraz [(PPN), EC 3.6.1.10]	6
1.1.4. PoliP: AMP Fosfotransferaz [(PAP) EC. 2.7.4.3.]	7
1.2. Polifosfat Polimerinin İşlevleri	7
1.3. <i>Actinomyces</i> 'ler	12
1.4. <i>Streptomyces</i> 'ler	12
1.5. <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
1.6 <i>Streptomyces</i> 'lerde Antibiyotik Üretiminin Düzenlenmesi	17
1.7 Tez Çalışmasının Amacı	21
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
2.1. Gereçler	22
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	22
2.1.2. Kullanılan Enzimler	22
2.1.3. Kullanılan Kitler	22
2.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	23
1.5.Kullanılan Bakteri Soyları	23
2.1.6.Kullanılan kozmit ve plazmidler	24
2.1.7.Kullanılan çözeltiler	27
2.1.8.Kullanılan Besiyerleri	30
2.1.9.Kullanılan Antibiyotikler	34
2.1.10.Kullanılan Cihazlar	35
2.2.YÖNTEMLER	35
2.2.1. <i>E. coli</i> 'den plazmit izolasyonu	35
2.2.2. <i>E. coli</i> 'den kozmit izolasyonu	36
2.2.3. Elektroporasyon Yöntemi	36
2.2.4. <i>Streptomyces coelicolor</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	37
2.2.5. <i>S. coelicolor</i> ' dan plazmit izolasyonu	37
2.2.6. Restriksiyon endonükleaz kesimleri	38
2.2.7. Agaroz jel elektroforezi	38
2.2.8. İzole edilen DNA'nın jelden geri kazanılması	38
2.2.9. Mutasyon kasetinin hazırlanması	38

2.2.10. <i>S. coelicolor</i> Std84 kozmidinin <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 hücrelerine aktarılması	40
2.2.11. Mutasyon kasetinin Std84 kozmidini içeren <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 hücrelerine aktarılması	41
2.2.12. Mutant kozmidin metilasyon sistemi olmayan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılması	41
2.2.13. Mutant kozmidin doğruluğunun PCR ile ispatlanması	41
2.2.14. Mutant kozmidin <i>Streptomyces coelicolor</i> 'a transferi	42
2.2.14.1. Konjugasyon	42
2.2.14.2. Protoplast transformasyonu	43
2.2.15. Southern Blot	44
2.2.15.1. Apramisin prop DNA'sının hazırlanması	44
2.2.15.2. <i>ppk</i> prop DNA'sının hazırlanması	45
2.2.15.3. Sinyal Oluşumu ve Tespit Edilmesi	45
2.2.15.4. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon	46
2.2.16. Mutant suşun komplementasyonu	47
2.2.17. Antibiyotik Ölçümleri	47
2.2.18. <i>S. coelicolor</i> Δppk Suş ve Yaban Tip Suşların R2YE Besiyesinde H ₂ O ₂ Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması	48
3. BULGULAR	49
3.1. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması	49
3.2. <i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790'nın Std84 Kozmidi ile Transformasyonu	50
3.3. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini Taşıyan <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktararak mutant kozmidin oluşturulması	51
3.4. Mutant kozmidin metilasyon sistemi olmayan <i>E. coli</i> 12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılması	53
3.5. Mutant Kozmidin <i>Streptomyces coelicolor</i> 'a Transferi ve <i>ppk</i> mutantlarının taranması	54
3.6. Mutasyonun Southern Blot ile İspatlanması	55
3.7. <i>S. coelicolor</i> ve Mutant Suşa Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması	57
3.8. Mutant suşun farklı besiyerlerinde üremesi	60
3.10. Δppk Suş ve Yaban Suşların H ₂ O ₂ Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması	65
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
5.KAYNAKLAR	72
EK -1	84
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
AckA	Asetat Kinaz
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
Amp	Ampisilin
Apr	Apramisin
ATP	Adenozin trifosfat
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
BglII	<i>Bacillus globigii</i> Restriksiyon Endonükleaz
Bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
Chl	Kloramfenikol
CTAB	Setil trimetilamonyum bromid
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz V
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
EtBr	Etidyum Bromid
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
HCl	Hidroklorik asit
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
H₂O₂	Hidrojen peroksit
K	Potasyum
kDA	Kilodalton
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
K₂HPO₄	Potasyum fosfat dibazik
kJ	Kilojoule
Kn	Kanamisin
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria-Bertani Broth

M	Molar
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Na₂OAc	Sodium Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pi	İnorganik fosfat
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethanesülfonik asit)
PoliP	Polifosfat
ppGpp	Guanozin tetrafosfat
PPK	Polifosfat kinaz
PPN	Endopolifosfataz
PPX	Ekzopolifosfataz
RecA	Rekombinaz A
rpoS	RNA polimeraz sigma faktör (38)
Rpm	Dakika başına dönüş
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TES	N-[Tris-(hidroksimetil)-metil]-2-aminoetansülfonik acit
Tsr	Tiyostrepton
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
XhoI	<i>Xanthomonas_vasicola</i> _endonükleaz I
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ⁷⁰	Sigma 70
σ³⁸	Sigma 38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.	Lineer polifosfatın yapısı	1
1.2.	Polifosfat kinazın katalizlediği reaksiyonlar	2
1.3.	Oligosakkaritlerin sentezinde polifosfat kinazın rolü	3
1.4.	<i>E.coli</i> polifosfat kinaz enziminin kristal yapısı	4
1.5.	<i>E.coli</i> PPK1 enzimiyle (687 amino asit) 12 farklı bakterinin polifosfat kinaz genlerinin karşılaştırılmasıyla yapılmış homoloji çalışması.	5
1.6.	PoliP'in ekzopolifosfataz ile hidrolizi	5
1.7.	Ekzopolifosfataz enziminin yapısı	6
1.8.	PoliP'in endopolifosfataz ile hidrolizi	6
1.9.	PoliP:AMP Fosfotransferazın ADP sentezini katalizleme reaksiyonu	7
1.10.	Protein degradasyonunda poliP'nin görev aldığı zorlu yanıt sistemi	9
1.11.	<i>Streptomyces</i> 'lerin hayat döngüsü	13
1.12.	<i>Streptomyces coelicolor</i> 'ın elektron mikroskop görüntüsü	13
1.13.	<i>S. coelicolor</i> A3 (2) kromozomunun dairesel gösterimi	15
1.14.	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) tarafından üretilen antibiyotikler	16
1.15.	PhoR-PhoP iki bileşenli sistem	19
2.1.	Moleküler DNA belirteçleri	23
2.2.	pIJ773 plazmidi	25
2.3.	λ Red Rekombinasyon plasmidi	26
2.4.	pHZ1351 mekik vektörü	26
2.5.	Primerlerin dizaynı	39
2.6.	Agaroz jelden saflaştırılan 1398 bç'lik apr kaseti	44
2.7.	Agaroz jelden saflaştırılan 1815 bç'lik <i>ppk</i> fragmanı	45
2.8.	DNA İşaretleme metodu ile <i>apr</i> ve <i>ppk</i> problemlerinin kontrol DNA'sı	46

ile karşılaştırılması	
3.1. 1398 bç'lik apramisin kasetinin hazırlanması	49
3.2. 1476 bç'lik mutasyon kasetinin elde edilmesi	50
3.3. <i>E. coli</i> BW25113 hücrelerinden izole edilen Std84 kozmidi	51
3.4. Std84 mutant kozmidin oluşturulması	52
3.5. Std84 Δppk kozmidinin doğruluğunun PCR ile ispatlanması	53
3.6. <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 (<i>dam</i> ⁻ <i>dcm</i> ⁻) hücrelerinden izole edilen Std84 Δppk kozmidi	54
3.7. Pütatif <i>S. coelicolor</i> Δppk suşlarının taranması	55
3.8. Mutasyonun southern blot ile ispatlanması	56
3.9. <i>S. coelicolor</i> ve <i>S. coelicolor</i> Δppk suşların üreme eğrisi	58
3.10. Aktinorhodin spesifik aktivitesi	58
3.11. Undesilprodigiosin spesifik aktivitesi	59
3.12. Δppk suş ve yaban tipin farklı fosfat konsantrasyonlarında antibiyotik üretimlerinin karşılaştırılması	60
3.13. Δppk suşunun apramisin içeren TBO (A) ve TSA (B) besiyerlerinde üreme durumu	60
3.14.A Yaban ve mutant suşların MS besiyerindeki üreme durumları.	61
3.14.B Δppk suşunun apramisin içeren MS besiyerlerinde üreme durumu	61
3.15. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+ <i>ppk</i> ve pHZ1351 plazmidleri	62
3.16. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+ <i>ppk</i> ve pHZ1351 plazmidlerinin	62
3.17. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+ <i>ppk</i> plazmidinin doğruluğunun PCR ile gösterilmesi.	63
3.18.A Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu	64
3.18.B pHZ1351- <i>ppk</i> plazmidini taşıyan Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu.	64
3.19. <i>S. coelicolor</i> , pHZ1351+ <i>ppk</i> plazmidini taşıyan Δppk suşu (Komplementer) ve <i>S. coelicolor</i> Δppk suşunun antibiyotik üretimlerinin R2YE besiyerinde karşılaştırılması	65

3.20.	<i>Δppk</i> suş ve yaban suşların R2YE besiyerinde H ₂ O ₂ hassasiyetlerinin karşılaştırılması	66
-------	--	----

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo

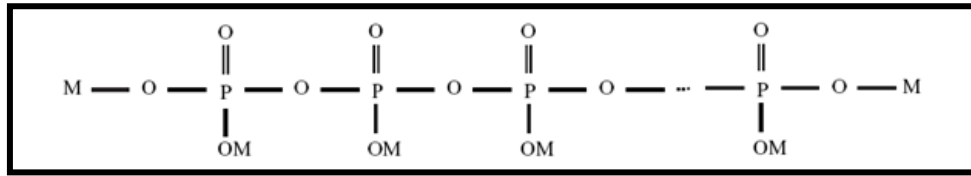
Sayfa

2.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri soyları	23
2.2. Deneylerde kullanılan kozmit ve plazmidler	24
2.3. Kullanılan antibiyotikler	34
2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler	39

1. GİRİŞ

1.1. Polifosfat

Organizmaların enerji gereksinimleri için en öncelikli kaynak, yüksek enerjili fosfoanhidrid bağlarıdır (Şekil 1.1). Bakterilerden yüksek ökaryotlara kadar bir çok canlı, enerjiyi ve fosfatı, fosfat polimerleri halinde depo ederler. Polifosfat (poliP) yüzlerce fosfat molekülünün yüksek enerjili anhidrid bağları ile birleşmesinden meydana gelen düz yapılı bir polimerdir (Wood ve Clark, 1988; Keasling ve ark., 2000).



Şekil 1.1. Lineer polifosfatın yapısı (M: H^+ veya monovalent metal katyon) (Wazer ve ark., 1955; Thilo ve ark., 1957).

Polifosfat, bakteriyel hücrelerin sitoplazmasında, hücre yüzeyinde, periplazmasında ve plazma membranında bulunmaktadır. Bir çok bakteride polifosfatlar granüller halinde sitoplazmada yer almaktadırlar (Kulaev, 1979; Kulaev ve Vagabov, 1983). *E. coli*'nin sitoplazmasında, polifosfat, RNA sentezinde görevli olan RNA polimeraz (Kusano, Ishihama, 1997) ve RNA yıkımında görevli olan degradozomlarla birlikte bulunur (Blum ve ark., 1997).

Normal büyüme koşullarında *Escherichia coli* hücreleri düşük seviyede polifosfat içermektedir (Nesmeyanova ve ark., 1974). Ortofosfatın taşınması ve polifosfat metabolizmasıyla ilgili genler değiştirilerek *E. coli*'nin polifosfatı hücre içinde depolama özelliğini arttırmak mümkündür (Hardoyo, Yamada ve ark. 1994; Kato, Yamada ve ark., 1993).

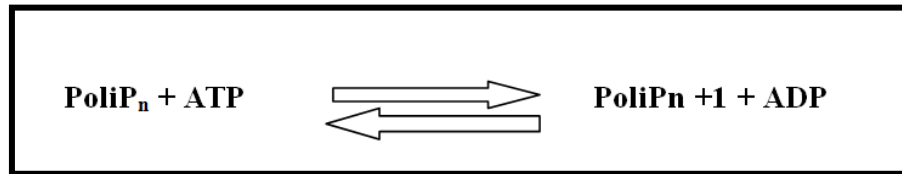
PoliP'nin organizmaların birçok bölgesinde bulunması hatta bazı canlılarda (*Saccharomyces cerevisiae*) hücre kuru ağırlığının %20'sini teşkil etmesi, bu polimerin enerji ve fosfat kaynağı olmasının yanında başka fizyolojik rollerinin de olduğunu işaret eder.

Farklı stres koşullarında yaşamın devamlılığını sağlamak, biyofilm oluşumu, hareketlilik, bakterilerin ve küflerin gelişimsel süreçlerinin desteklenmesi ve virülans oluşumu bu fizyolojik rollerden sadece bazılarıdır.

Bakterilerde polifosfat metabolizması ile ilişkili dört temel enzim bulunmaktadır: Polifosfat kinaz 1 (PPK1), ekzopolifosfataz (PPX), endopolifosfataz (PPN) ve polifosfat:AMP fosfotransferaz (PAP). Bunların yanında PPK1 homoloğu olan polifosfat kinaz 2 (PPK2) enzimi de bu metabolizmada görev yapan enzimlerdendir (Brown ve Kornberg, 2008).

1.1.1. Polifosfat Kinaz (Polifosfat:ADP Fosfotransferaz [(PPK), EC 2.7.4.1]

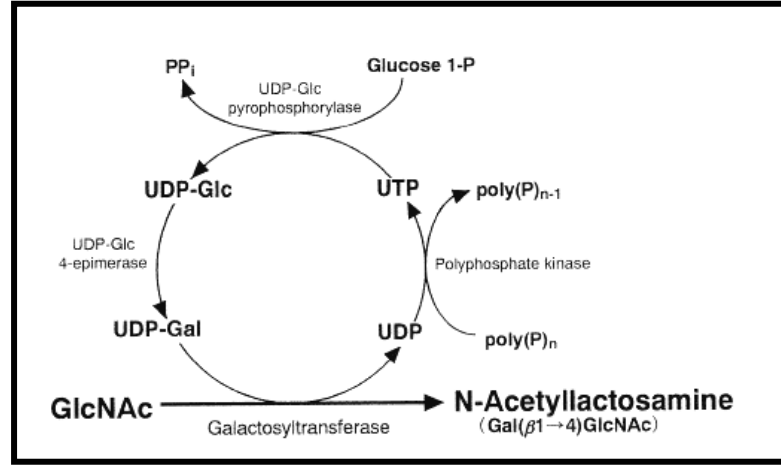
Polifosfat kinaz 1 (PPK1), ATP molekülünden terminal fosfat rezidüsünü koparıp polifosfat molekülüne aktaran reaksiyonu dönüşümlü katalizler. ATP'nin enerjice zengin fosfat rezidülerinin poliP'ye ve bu rezidülerin poliP'den ADP'ye geri transfer reaksiyonları (Şekil 1.2) Kornberg ve arkadaşları tarafından 1956 yılında keşfedilmiştir (Kornberg ve ark., 1956; Kornberg, 1957).



Şekil 1.2. Polifosfat kinazın katalizlediği reaksiyonlar (Kornberg ve ark., 1956).

PoliP'den GDP'ye P transferiyle GTP üretimini sağlayan polifosfat kinaz aynı zamanda pirofosfat gruplarını GDP'ye transfer ederek lineer guanozin tetrafosfat oluşumunu sağlamaktadır (Kim ve ark., 1998). Ayrıca, polifosfat kinaz'ın, N-asetil laktozamin sentezinde UDP yapımını katalizlediği görülmüştür.

Polifosfat kinaz'ın bu aktivitesi oligosakkaritlerin sentezini mümkün kılmaktadır (Şekil 1.3) (Noguchi ve Shiba, 1998).



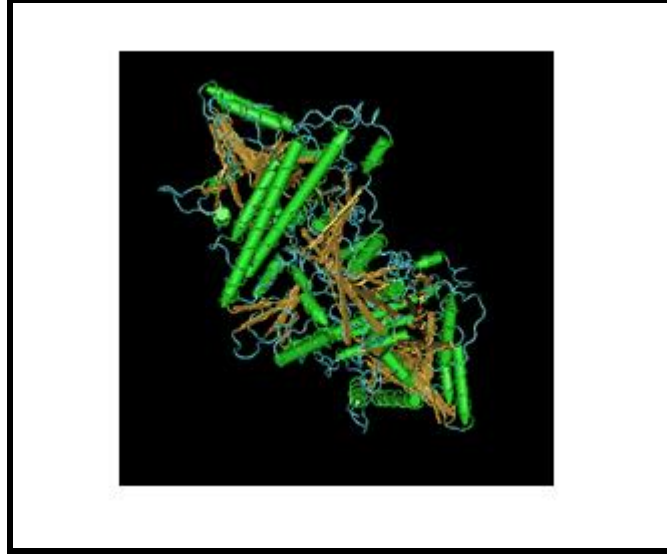
Şekil 1.3. Oligosakkaritlerin sentezinde polifosfat kinazın rolü (Noguchi ve Shiba, 1998).

Bakterilerde polifosfat kinaz farklı multienzim komplekslerinin bir bileşenidir ve bu enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesine katılır. Örneğin, RNA işlenmesi ve degradasyonundan sorumlu olan *E. coli* degradozomunun polifosfat kinaza sahip olduğu görülmüştür (Blum ve ark., 1997). *E. coli*'den saflaştırılan polifosfat kinaz'ın *in vitro*'da RNA ile bağlandığı ve ATP varlığında bu bağlanmanın engellendiği gözlenmiştir (Blum ve ark., 1997).

Polifosfat kinaz, *Propionibacterium shermanii*'den kısmen saflaştırılmış (Robinson ve ark, 1987) ve 83 kDa moleküler ağırlığında monomerik bir enzim olduğu bulunmuştur. PoliP zincirlerinin sentezi, 6-80 rezidüden meydana gelen kısa poliP zincirinin primer olarak kullanılmasıyla başlar ve ATP'nin substrat olarak kullanılmasıyla zincir uzamaya devam eder. *In vivo*'da sentezlenen en uzun poliP 750 rezidüden meydana gelmiştir.

E. coli'den izole edilen polifosfat kinaz (*ppk1*) 80 kDa moleküler ağırlığında, membrana bağlı homotetramer yapıda bir protein olup (Ahn ve Kornberg, 1990; Akiyama ve ark, 1992) kristal yapısı belirlenmiştir (Şekil 1.4) (Zhu ve ark., 2005). Çok fonksiyonlu bir enzim olan PPK, aktivitesi için Mg^{+2} a ihtiyaç duymaktadır (Ahn ve Kornberg, 1990).

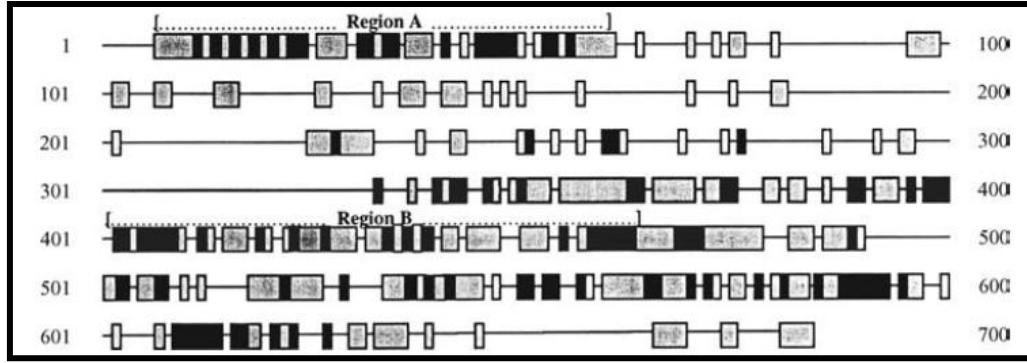
Bu enzim dönüşümlü olarak PoliP'den ATP sentez reaksiyonunu katalizlediği gibi (Kornberg, 1957; Murata ve ark., 1988; Ahn ve Kornberg, 1990; Kuroda ve Kornberg, 1997) poliP'ı fosfat donörü olarak kullanarak GDP ve diğer nükleotid difosfatların nükleotid trifosfatlara dönüştürülmesinde de görev alır (Kuroda ve Kornberg, 1997).



Şekil 1.4. *E.coli* polifosfat kinaz enziminin kristal yapısı (Zhu ve ark., 2005).

Polifosfat kinaz'ın substrat özgüllüğü, ADP > GDP > UDP, CDP şeklindedir. GDP yerine ADP substrat olarak kullanıldığında, enzimin aktivitesinin iki kat arttığı gözlenmiştir (Noguchi ve Shiba, 1998).

E. coli (Akiyama ve ark., 1992), *Klebsiella aerogenes* (Kato ve ark., 1993), *Neisseria meningitidis* (Tinsley ve Gotschlich, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Ishige ve ark., 1998), *Acinetobacter* sp. (Geissdorfer ve ark., 1998), *Vibrio. cholerae* (Ogawa ve ark., 2000b), *Rhodocyclus tenuis* (McMahon ve ark., 2002) ve birçok bakteriden *ppk1* geni klonlanmış, dizilenmiş ve enzimler nitelendirilmiştir. Bu enzimin aminoasit dizisi farklı bakteri türlerinde karşılaştırıldığında yüksek homoloji gözlenmiştir (Şekil 1.5) (Tzeng ve Kornberg, 1998).

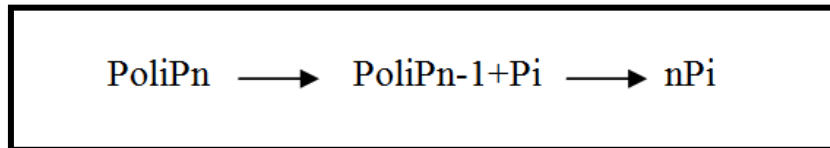


Şekil 1.5. *E. coli* PPK1 enzimiyle (687 amino asit) 12 farklı bakterinin polifosfat kinaz genlerinin karşılaştırıldığı homoloji çalışması. Siyah bölgeler tüm bakterilerde %100 homoloji gösteren bölgeleri, gri bölgeler ise %60'ın üzerinde homoloji gösteren bölgeleri temsil etmektedir (Tzeng ve ark., 1998; Kornberg, 1999).

Polifosfat metabolizmasında görev yapan bir diğer enzim de “Polifosfat kinaz 2” (PPK2)’dir. PPK1 homoloğu olan bu enzim, ATP bağımlı polifosfat sentezleme reaksiyonuna ek olarak polifosfat üzerinden GDP’nin GTP’ye dönüşümünü katalizlemektedir (Brown ve Kornberg, 2008). *ppk2*, 40.8 kDa moleküler ağırlığında 357 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır. PPK2, GTP ve ATP’yi poliP sentezinde eşit olarak kullanırken, PPK1 poliP sentezinde ATP’yi tercih etmektedir. Polifosfat kinazların her ikisi de durağan fazda yaşamsal öneme sahip olup hücre büyümesini düzenleyen deoksiribonükleozit trifosfatlar ile ribonükleozid trifosfatların hücre içi seviyesini düzenlemektedir (Ishige ve ark., 2002).

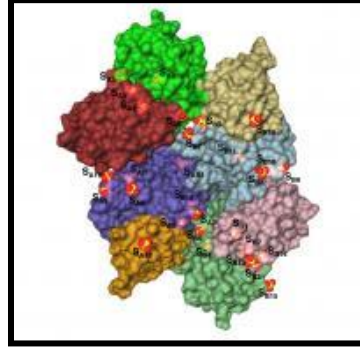
1.1.2. Ekzopolifosfataz (Polifosfat Fosfohidrolaz [(PPX), EC 3.6.1.11]

Polifosfat yıkımında görev alan enzimlerden biri olan ekzopolifosfataz, uzun poliP zincirinin uç kısmından Pi koparmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PoliP’in ekzopolifosfataz ile hidrolizi (Brown ve Kornberg, 2008)

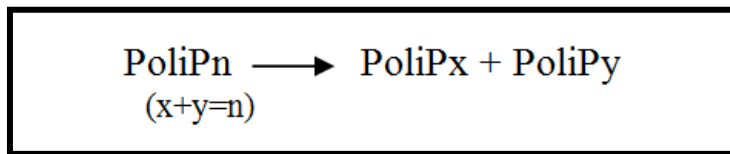
PPX, fosfotransferazların ASKHA (Asetat ve karbonhidrat kinazlar, Hsp70, Aktin) ailesinin bir üyesidir. 58 kDa büyüklüğündeki bu enzim, her biri üç domainden meydana gelmiş iki alt birimden oluşmuştur (Şekil 1.7). İlk iki domain hidrolizden sorumlu iken üçüncü domain poli P'ye bağlanma bölgesidir (Johnjeff, 2003). Bu enzim yüksek moleküler ağırlıklı poliP'ye daha fazla ilgi gösterir ve aktivitesi için katyonlara (K^+ , Mg^{+2}) ihtiyaç duymaktadır (Akiyama ve ark., 1993).



Şekil 1.7. Ekzopolifosfataz enziminin yapısı (Rangarajan ve ark., 2006).

1.1.3. Endopolifosfataz (Polifosfat Depolimeraz [(PPN), EC 3.6.1.10])

Polifosfat yıkımında görev alan enzimlerden bir diğeri de endopolifosfatazdır. Endopolifosfataz, poliP zincirinin iç kısmında bulunan fosfoanhidrit bağlarının hidrolizini katalizlemektedir (Şekil 1.8) (Kowalczyk ve ark., 1993).



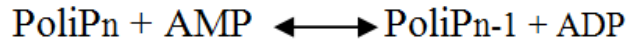
Şekil 1.8. PoliP'in endopolifosfataz ile hidrolizi (Brown ve Kornberg, 2008).

PPN1 memeli hücrelerinde tanımlanmış ve ilk kez *Saccharomyces cerevisiae*'dan saflaştırılmıştır. Mayadan saflaştırılan PPN1, vakuolar orijinli 35 kDa moleküler ağırlığında bir homotetramerdir ve *PHM5* geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, enzimin, 78 kDa moleküler ağırlığında bir öncü polipeptid (prePpn1) halinde sentezlendiğini ve daha sonra bir proteaz ile kesilerek 35 kDa moleküler ağırlığında aktif bir protein oluşturulduğunu göstermiştir (Shi ve Kornberg

2005). Endopolifosfataz aktivitesi prokaryotlarda gözlenmemiştir (Kumble ve Kornberg ,1996).

1.1.4. PoliP: AMP Fosfotransferaz [(PAP) EC. 2.7.4.3.]

PAP, poliP varlığında, polifosfattan kopardığı Pi'ı adenosin monofosfat (AMP)'a aktararak adenosin difosfat (ADP) oluşumunu katalizleyen bir enzimdir (Cornelus ve ark., 1991). İlk kez kısmi olarak *Acinetobacter johnsoii* 210A suşundan saflaştırılan AMP fosfotransferaz 55 kDa moleküler ağırlığındadır (Şekil 1.9) (Kulaev ve ark., 2004).



Şekil 1.9. PoliP:AMP Fosfotransferazın ADP sentezini katalizleme reaksiyonu (Brown ve Kornberg, 2008).

1.2. Polifosfat Polimerinin İşlevleri

Bakterilerin, çevresel koşullardaki değişimi algılayabilme ve bu koşullara hızla uyum sağlama, yüzeye tutunma, biyofilm oluşturma ve fiziksel-kimyasal-biyolojik (av-avcı ilişkisi) stres koşullarına uyum sağlama gibi hayatta kalmaları için çok önemli işlevleri yerine getirmek üzere temel metabolizmanın dengesinin korunmasına ihtiyaçları vardır. Polifosfat metabolizması da hücre homeostazisinin korunmasında çok önemli rollere sahiptir (Brown ve Kornberg, 1998).

Çoğu bilim adamı polifosfatın öncelikle bir fosfat kaynağı olduğu görüşünde birleşmektedir. Canlı hücreler bu kaynağı çeşitli aşamalarda kullanmakla beraber özellikle fosfat kıtlığı durumlarında poliP vazgeçilmez tek fosfat kaynağını oluşturmaktadır. Bu polimer bazı protein kinazların da fosfat kaynağı olup enzimlerin fosforilasyonunda kullanılmaktadır. Polimerik fosfat molekülünün hücre içinde birikmesinin hücre içi ozmotik basınca etkisinin çok az olması (Kornberg, 1995) ve hücrenin diğer biyolojik işlevleri için gerekli olan ATP ve serbest Pi'nin

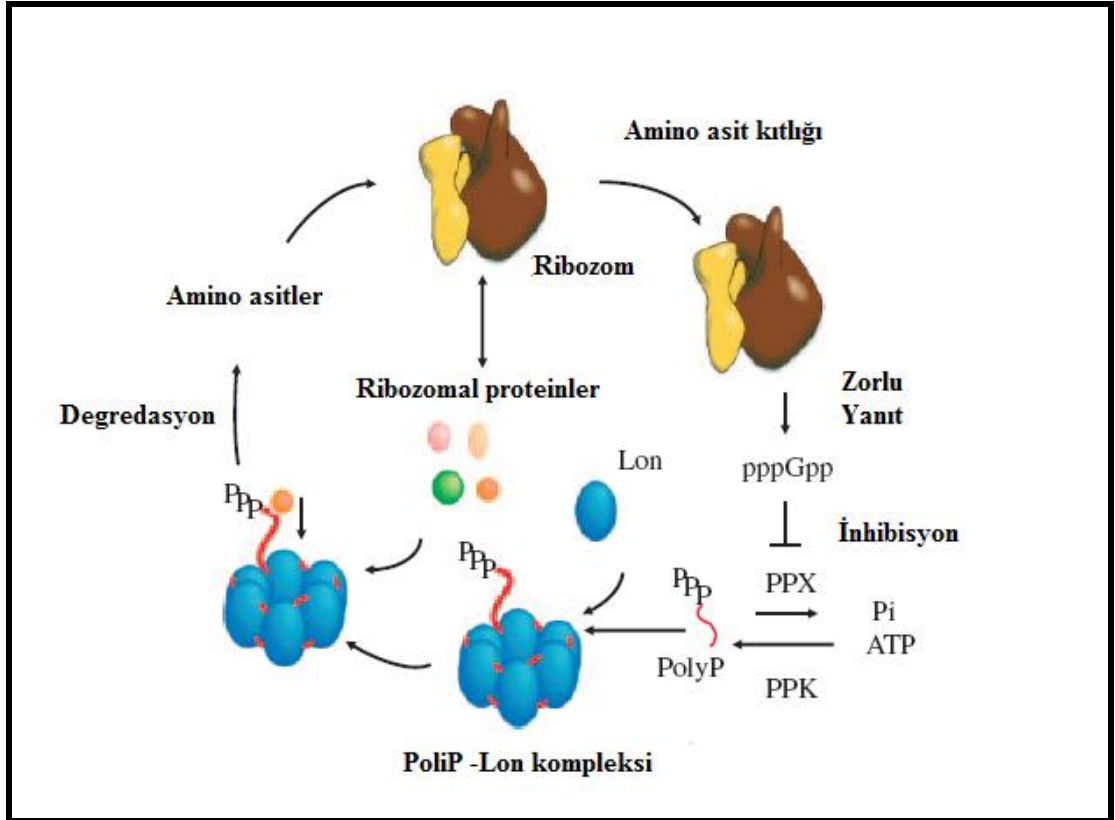
hücre içi seviyesinin sabit kalmasına verdiği katkıdan dolayı, polifosfat, hücre içinde biriktirilebilecek uygun polimerlerden biridir.

Bakterilerde, PoliP, enerji mekanizması ile ilişkilendirilmektedir. PoliP'in evrimsel süreçte enerji kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Belozersky, 1958). Yukarıda da bahsedildiği gibi bir çok prokaryotta poliP, biyokimyasal reaksiyonlar için fosfat vericisi olarak görev yapmaktadır. Ayrıca bu polimerin yapısında bulunan fosfoanhidrid bağları yüksek enerjiye sahip olduğu ve pH 5'te bir anhidrid bağının hidrolizi ile açığa çıkan serbest enerji miktarının 38 kJ olduğu bilinmektedir (Kortstee ve ark., 2000). Bu polimerden koparılan Pi'ların ATP üretiminde kullanılması, ekzopolifosfataz, endopolifosfataz, AMP fosfotransferaz hidrolitik enzimleri ve polifosfat kinazın geri reaksiyon aktivitesi ile mümkündür (Kuroda ve Kornberg, 1997; Murata ve ark., 1988; Kumble ve Kornberg, 1996).

Polifosfatın, diğer önemli bir işlevi de ağır metal katyonlarının detoksifikasyonudur. Bu polimerin bir çok prokaryotta değişik katyonlarla (Mg^{2+} , Ca^{2+} ve K^+) kompleks halinde bulunduğu gösterilmiştir. PoliP'nin ağır metallerin depolanmasında ve metallere olan dirençliliğin artmasında çok önemli roller oynadığı son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Keasling ve ark., 1998). Örneğin, *Staphylococcus aureus*'da Poli P'nin nikel topladığı (Gonzalez ve ark., 1998), hücre içi poli P seviyesinin artması ile *Anacystis nidulans*'ın (Keyhani ve ark., 1996) ve *E. coli*'nin (Keasling ve ark., 1996) kadmiyuma daha toleranslı olduğu bilinmektedir. Ağır metallerin detoksifikasyonunda poliP'nin rolü şu şekilde özetlenebilir: PoliP ağır metallere bağlanarak bunları hücre içinde biriktirir, daha sonra ekzopolifosfataz enzimi devreye girerek ağır metallerin metal-fosfat kompleksleri halinde hücre dışına taşınmasında görev alır (Keasling, 1997; Keasling ve ark., 1996).

PoliP, mikroorganizmanın, çevresel şartlarda (besin miktarı, pH, sıcaklık vb.) meydana gelen değişikliklere karşı hücrenin bu şartlara adaptasyonunda görev almaktadır. Stres altında olan mikroorganizmalar hücre içinde çok miktarda poliP biriktirmektedirler. Örneğin, *E. coli*'de, besin kısıtlılığı durumunda cevap oluşturan sistem, düşük fosfat ya da amino asit seviyesi tarafından başlatılmakta ve *relA* tarafından kodlanan (p)ppGpp sentetaz I (PSI) enzimi aracılığıyla guanozin penta (pppGpp) ve tetranükleotidlerin (ppGpp) sentezine neden olmaktadır. Bu

nükleotidler, poliP'nin ekzopolifosfataz ile hidrolizini inhibe ederek poliP birikimini sağlamaktadır (Şekil 1.10) (Cashel ve ark., 1996; Kuroda ve ark., 1997). Biriken bu polifosfatlar, Lon proteaz ile kompleks oluşturularak, serbest halde bulunan ribozomal alt ünitelerin parçalanmasına yol açar ve bu şekilde oluşan amino asitler kıtlık durumunda gerekli olan yeni proteinlerin sentezinde kullanılırlar (Kuroda ve ark., 1999, Kuroda ve ark., 2001, Kuroda, 2006).



Şekil 1.10. Protein degradasyonunda poliP'nin görev aldığı zorlu yanıt sistemi (Kuroda, 2006).

PoliP, hücre zarı, bakteriyel virülans, yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumu için önemli bir role sahiptir (Kornberg ve ark.,1999). *Neisseria* ile yapılmış bir çalışmada polifosfat kinaz mutantlarının patojenitelerinin normal hücrelerden oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. *ppk* geninden yoksun mutantlarda hücre zarının yapısına katılan poliP sentezlenmediğinden bakterinin konak canlıının savunma sistemine olan direnci azalmıştır (Tinsley ve ark., 1993). Başka bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın *ppk1* geni delesyona uğratılmış ve oluşturulan mutantların hareketlilik, korum sensing (quorum sensing), biyofilm oluşturma ve virulans özelliklerinde hasarlar meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bakterinin ekzopolimer oluşturma, β -laktam

antibiyotiklerine karşı direnç ve kurumaya karşı dayanıklılık özelliklerini de yitirdiği gözlenmiştir (Harunur ve ark., 2000).

Polifosfat, bir poli-anyon olduğu için birçok protein ve enzim ile (özellikle katyonik aminoasit yan zincirlerine sahip olanlarla) etkileşim halindedir. Örneğin; poliP, sitokrom C'ye 13., 86. ve 87. lizin aminoasitlerinden bağlanarak proteini daha kararlı bir hale getirmektedir (Concar ve ark., 1991). PoliP, bazı enzimlerin substratlarıyla aktif bölgeye bağlanmak için yarışmak ya da enzimlerin kofaktörleriyle etkileşmek suretiyle enzim aktivitelerini etkiler.

Yapılan birçok çalışmada, polifosfatın, enzim aktivitelerini düzenleyerek ve çok sayıda geni kontrol ederek bakterilerin aktif büyüme fazından durağan faza geçişinde olduğu kadar durağan fazda ve stres koşullarında yaşamlarını devam ettirebilmeleri açısından önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Kornberg ve ark., 1999). Örneğin, polifosfat'ın, *E. coli* hücrelerinden izole edilen RNA polimeraz ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (Kulaev ve Kulakovskaya, 2000). Bu çalışmada, polifosfatın, transkripsiyon üzerine etkisi, logaritmik büyüme evresi ($\sigma 70$) ve durağan evre ($\sigma 38$) sigma faktörlerinin bağlanabildiği iki RNA polimeraz formunu ayrı ayrı bulunduran iki ayrı suşta incelenmiştir. Düşük tuz konsantrasyonunda polifosfat, her iki enzimi de engelleyerek transkripsiyonu durdurmuştur. Yüksek tuz konsantrasyonunda ise polifosfat varlığında $\sigma 38$ içeren RNA polimeraz aktif iken $\sigma 70$ içeren RNA polimeraz aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre, durağan fazda ve yüksek ozmotik basınç altında polifosfatın, bakterinin promotor seçiminde görev yaptığı anlaşılmıştır (Kulaev ve Kulakovskaya, 2000).

Polifosfatın, ribozomlarla da etkileşim halinde olduğu ve bu etkileşimin ribozomal proteinlere bağlanarak gerçekleştiği ve translasyonel etkinliği etkilediği *in vitro* ve *in vivo* deneylerle gösterilmiştir (McInerney ve ark., 2006).

Tsutsumi ve arkadaşları (2000), ekzopolifosfatazın yüksek miktarda üretildiği suşlarda polifosfat seviyesindeki azalmanın, RNA polimeraz sigma faktörünü kodlayan *rpoS* geninin düşük miktarda ifade edilmesine sebep olduğunu göstermişlerdir. RpoS sigma faktörünün ($\sigma 38$) mikroorganizmanın stres koşullarına adaptasyonu ve durağan fazda canlılığını devam ettirebilmesinden sorumlu yaklaşık 50 genin ifade edilmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Hücre içi polifosfat

konsantrasyonu düşük olan *ppk* mutant suşlarının stres koşullarına hassas olduğu ve bu hassasiyetin, bakterilerin *ppk* veya *rpoS* genleri ile komplementasyonu sayesinde giderildiği görülmüştür. Aynı şekilde yüksek seviyede maya ekzopolifosfataz enzimi (scPPX1) üreten *E. coli* suşunda H_2O_2 'e karşı hassasiyet gözlenmiştir. Ekstra *rpoS* geni aktarılan mutant suşun H_2O_2 hassasiyeti ortadan kalkmıştır (Shiba ve ark.,1999).

Durağan faz ve stres şartları altında yaşamlarını sürdürebilmeleri için farklı bakteriler poliP toplanması ile ilgili farklı mekanizmalara sahip olabilir veya henüz çalışılmamış farklı mekanizmalar da bulunabilir. Örneğin, *H. pylori*' de amino asit kıtlığı durumunda pppGpp seviyesi yükselmemektedir (Scoarughi ve ark., 1999).

Polifosfat, DNA yapısında meydana gelebilecek bir hasarda devreye giren SOS sistemi için gerekli olan genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde de görev almaktadır. Polifosfatın, DNA hasarı onarımında görev alan *recA*'nın ifadesi için gerekli olduğu, hücrelerin mitomisin C veya UV'ye hassasiyetlerinin ölçüldüğü bir çalışmayla gösterilmiştir. Bu çalışmada, düşük polifosfat seviyelerinde, hücrenin SOS genlerinin indüksiyonunda azalma meydana gelmiş ve hücrelerin mitomisin C ve UV'ye hassasiyetlerinin arttığı gözlenmiştir (Kaori ve ark., 2000).

Bazı mikroorganizmalar, çevresel streslere dayanabilmek için spor oluşturmaktadır. Polifosfatın, sporlanma üzerine etkisini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde, *Bacillus cereus*'un *ppk1* ve *ppx* genleri delesyona uğratılmış ve elde edilen mutantların hareketlilik, biyofilm oluşturma ve sporulasyon etkinlikleri incelenmiştir. Mutantların hepsinde hareketlilik ve biyofilm oluşturabilme kapasitelerinde düşüş gözlenmiş, sadece *ppx* mutantlarında sporulasyon etkinliğinin azaldığı bulunmuştur (Shi ve ark., 2004). *Myxococcus xanthus*'la yapılan başka bir çalışmada da *ppk1* mutant suşların sporulasyonunda azalma ve sporların germinasyonunda gecikme gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2005).

E. coli'de farklı stres koşullarında ve besin azlığı durumunda polifosfatın rolü, *ppk* geninden yoksun mutantlarla çalışılarak aydınlatılmıştır (Crooke ve ark., 1994). Mutant hücreler büyümenin gelişim safhasında fenotipik bir farklılık göstermemişlerdir (Crooke ve ark., 1994). Durağan fazda ise, hücrelerin osmotik değişimlere, oksidanlara ve sıcaklığa daha az direnç gösterdiği bulunmuştur (Crooke ve ark., 1994; Rao ve ark., 1996). Benzer sonuçlar farklı mikroorganizmalarla

yapılan çalışmalarla da elde edilmiştir. Örneğin, *Neisseria gonorrhoeae* ve *N. meningitidis*'in *ppk* mutantları yaban tip hücrelerden daha az gelişmiş ve insan serumuna artan bir hassasiyet göstermişlerdir (Tinsley ve ark., 1995).

1.3. *Actinomyces*'ler

Actinomyces terimi, bu organizmaların morfolojileri dikkate alınarak, *aktis* (ısın demeti) ve *mykes* (mantar) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Gram pozitif pokaryotlar olan Aktinomiset'ler, selülaz, kitinaz ve lignin peroksidaz gibi ekstraselüler enzimlere sahip olduklarından topraktaki dekompozisyon ve mineralizasyon döngülerinde önemli rol oynarlar. Guanin+Sitozin (G+C) oranı oldukça yüksek (<%55) olan *Actinomyces*'ler, 16S rRNA'ları dikkate alınarak 10 alt takıma ayrılmışlardır. Aktinomisetlerin bazı üyeleri insan patojenidir (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ve *Corynebacterium diphtherae* vb.) (Embley ve Stackebrandt, 1994).

1.4. *Streptomyces*'ler

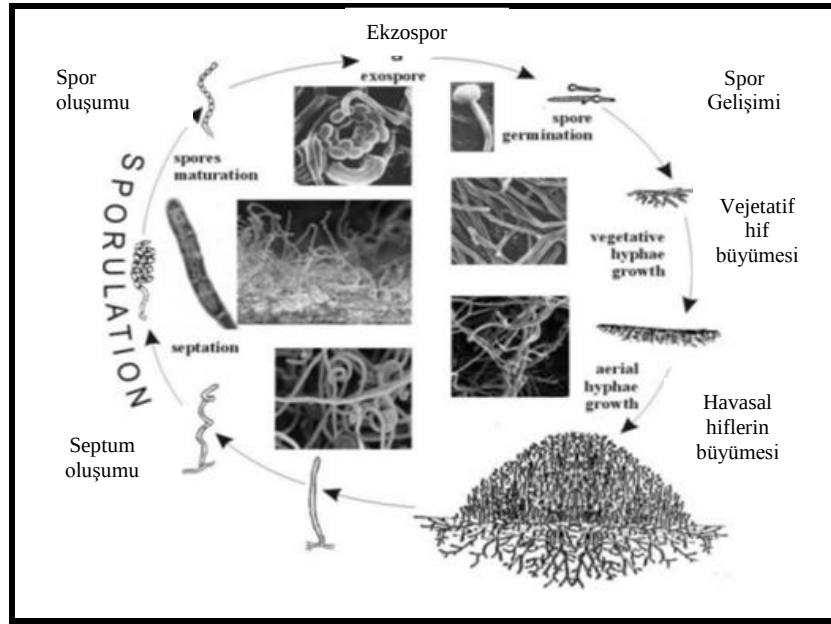
Streptomyces'ler, actinomycetales ordosuna ait, toprakta yaşayan Gram pozitif filamentli bakterilerdir (Garrity, 2002). Morfolojik değişim gösteren kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan bu grup bakteriler G+C oranı yüksek (%70-74) uzun lineer bir kromozoma (<8 Mb) sahiptir.

Streptomyces'ler, sahip oldukları farklı metabolik işlevler sayesinde ölü bitki, hayvan ve mantar atıklarını bileşenlerine ayırarak toprak biyodegradasyonunda önemli rol oynarlar (McCarthy ve Williams 1992; Wang ve ark., 1989).

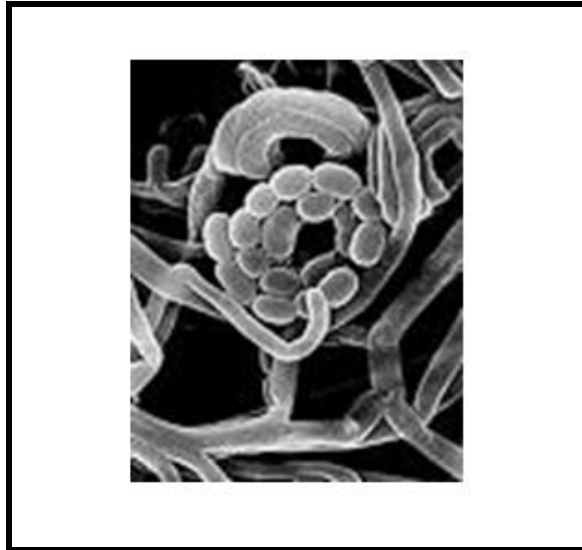
Streptomyces'ler çok geniş biyoaktivite aralığına sahip çeşitli sekonder metabolitleri yüksek oranda üretmektedirler. Bunlardan bazıları, antibiyotikler, immün sistemi baskılayan ajanlar, anti-kanser ajanlarıdır. *Streptomyces* türleri bilinen antibiyotiklerin yaklaşık % 75'ini üretmektedirler (Kieser ve ark., 2000).

Streptomyces'ler hücre farklılaşması, sekonder metabolit oluşumu, sporulasyon ve programlanmış hücre ölüm mekanizmasını içeren belirli bir hayat döngüsüne (Şekil 1.10) sahiptirler. Sıcaklık, pH, CO₂, O₂ ve nem gibi diğer çevresel faktörler topraktaki *Streptomyces*'lerin hayat döngüsünü etkiler (Vionis ve ark., 1998). Hayat döngüsü, sporların çimlenme tüpünü oluşturmasıyla başlar ve daha sonra bu tüpten

substrat misel olarak da adlandırılan vejetatif misellerin yayılması gerçekleşir. Birçok bakteri türünden farklı olarak dallanarak büyüyen vejetatif misellere sahiptirler. Besin miktarının azalması ve diğer fizyolojik stresler vejetatif misellerin morfolojik olarak değişmesine yol açar ve havaya doğru uzanan bulanık ve beyaz renkli hiflere dönüşürler. Bu değişimle beraber sekonder metabolizma aktif hale gelir. Hifler substrat içerisinde genişleyerek yoğun miseller oluştururlar. Daha sonra bu hifler gri renkli sporları oluştururlar (Şekil 1.11) (Chater 2001).



Şekil 1.11. *Streptomyces*'lerin hayat döngüsü.

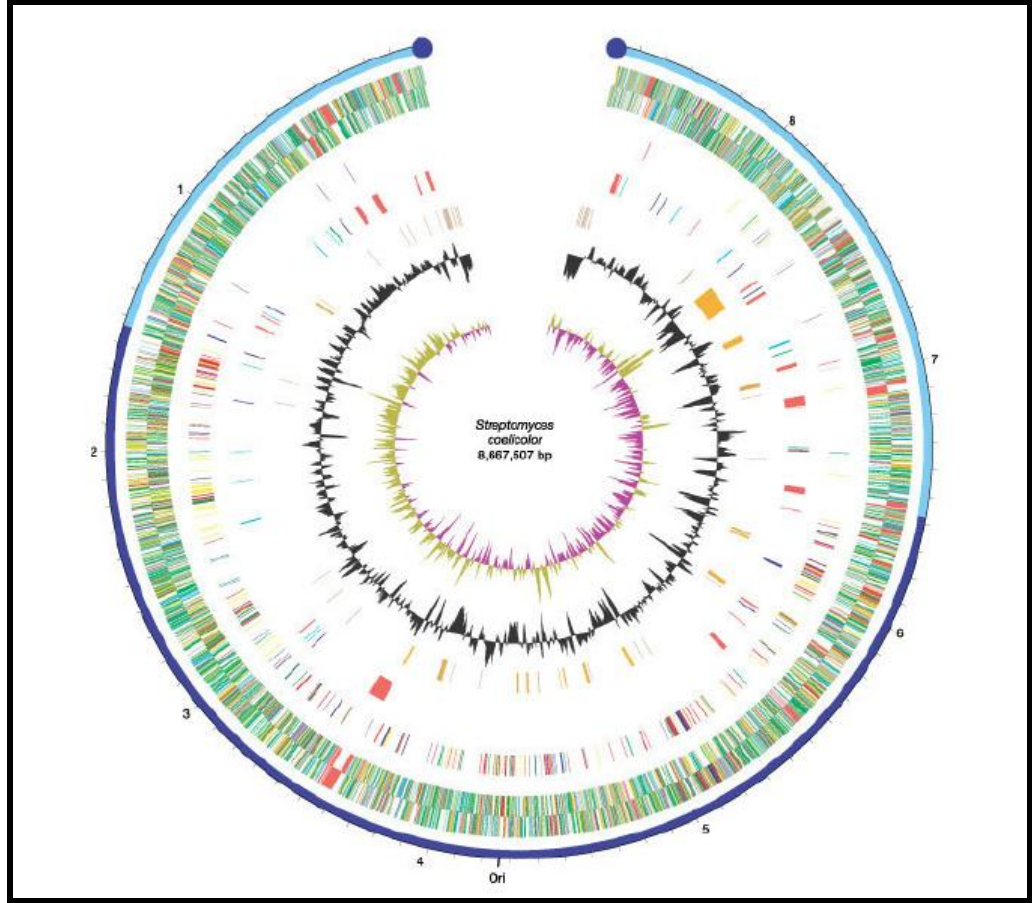


Şekil 1.12. *Streptomyces coelicolor*'ın elektron mikroskop görüntüsü.

Streptomyces'lerin kromozomları diğer bakterilerden farklı olarak doğrusaldır (Şekil 1.12). *Streptomyces* kromozomları hakkındaki bilgilerin çoğu *S. coelicolor* A3 (2) (Bentley ve ark., 2002) ve *S. avermitilis*'in (Ikeda ve ark., 2003) genom dizilerinin belirlenmesiyle elde edilmiştir. *S. coelicolor* A3 (2) kromozomunun büyüklüğü 8.667.507 bp'dir (Şekil 1.10). G+C içeriği oldukça yüksektir (%72.12) ve kodlandığı tahmin edilen 7.825 geni vardır. Kromozomun 5' uçlarında proteinlerin kovalent olarak bağlandığı birbirini ters yönde tekrar eden diziler (inverted repeats) bulunmaktadır. Replikasyon orijini (*oriC*) ise kromozomun ortasında bulunmaktadır. Kromozomun merkez bölgesi, bakterinin yaşaması için gerekli olan temel genleri (hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon gibi) kapsarken kromozomun geri kalanında ise sekonder metabolizmayla ilgili genler, hidrolitik ekzoenzimleri ve gaz vezikül proteinlerini kodlayan genler vb. bulunmaktadır (Bentley ve ark. 2002).

Kromozom üzerinde, 965 gen, düzenleyici fonksiyona sahip proteinlerin (sigma faktörleri, iki-bileşenli düzenleyici sistemleri, DNA'ya bağlı olduğu düşünülen proteinler ve birçok serin/threonin protein kinaz), 614 gen protein transport sisteminde görevli olan proteinlerin (ABC transport, ABC permeaz, ATP bağlı proteinler ve akıntı proteinleri) ve 819 gen protein salgı mekanizmasında görevli proteinlerin (proteaz/peptidaz, kitinaz/kitinonazaz, selüloz/endoglukanazaz, amilaz ve pektat lizaz) sentezinden sorumludur.

Ayrıca kromozom üzerinde sekonder metabolit (antibiyotik, siderofor, lipit ve diğer moleküller) üretimi ile ilgili 22 gen bölgesi bulunmaktadır (Bentley ve ark. 2002).



Şekil 1.13. *S. coelicolor* A3 (2) kromozomunun dairesel gösterimi (Bentley ve ark. 2002).

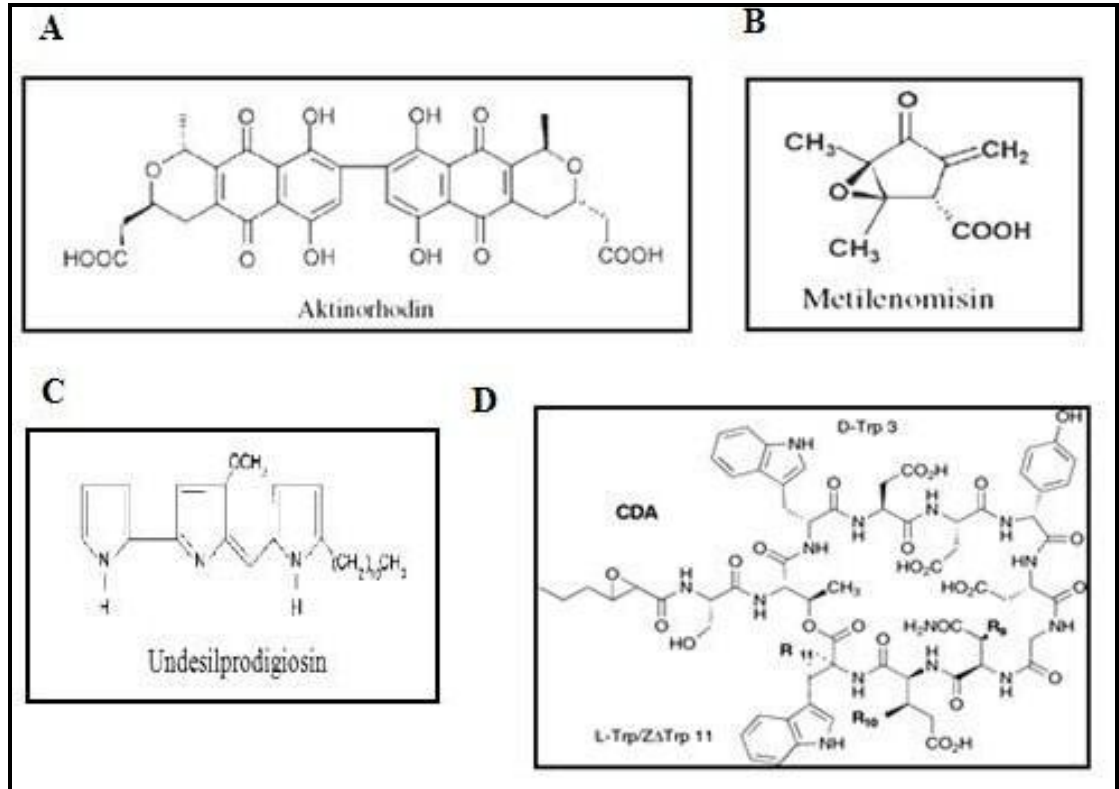
Streptomyces genetik çalışmaları 1954 yılında David Hopwood tarafından başlatılmıştır. *Streptomyces* genetik çalışmalarında, *S. coelicolor* A3(2) model organizma olarak günümüze kadar gelmiştir. 1980 yılına kadar yapılan *in vivo* çalışmalarda antibiyotik biyosentezinde görevli 100'den fazla gen belirlenmiş ve bu cinse ait plazmit ve bakteriyofajların izolasyonları gerçekleştirilmiştir. 1990 yılına kadar olan *in vitro* çalışmalarda ise ilk gen klonlanması, promotor dizilerinin izolasyonu, antibiyotik sentez yollarının araştırılması ve ilk transpozonun keşfi yapılmıştır. 1990 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalarda ise *S. coelicolor* A3 (2) ve *S. avermitilis*'in genom dizileri çıkartılmıştır (Hopwood, 1999).

1.5. *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor A3(2) türü, ilk defa Hopwood (1999) tarafından mavi pigmentli ve agarı eriten tür olarak tanımlanmıştır. *S. coelicolor*, kimyasal yönden

farklılık gösteren dört çeşit antibiyotik üretir (Şekil 1.13). Mavi aktinorhodin (Act) (Malpartida ve Hopwood, 1986), kırmızı undesilprodigiyosin (Red) (Feitelson ve ark., 1985; Malpartida ve ark., 1990) ve kalsiyuma bağlı antibiyotik (CDA) (Chong ve ark.,1998) biyosentetik genleri kromozomda bulunurken, metilenomisin biyosentetik genleri (Mmy) SCP1 plazmidi üzerinde yer alır (Chater ve ark., 1985).

Aktinorhodin ilk defa Brockman ve Hieronimus (1955) tarafından *S. coelicolor*'dan izole edilmiş ve biyosentetik genleri üzerine ilk çalışmalar Wright ve Hopwood (1976) tarafından yapılmıştır. Bu bileşik, pH 8.5'in altındaki asidik ortamda kırmızı renkli iken pH 8.5'in üzerindeki bazik ortamda mavi renklidir. Kırmızı renkli bir antibiyotik olan undesilprodigiosin *S. coelicolor*'da ilk defa Rudd ve Hopwood (1980) tarafından tanımlanmıştır. Kalsiyum bağlı antibiyotik (CDA) *S. coelicolor* A3(2)'de Lakey ve ark. (1983) tarafından tanımlanmış ve 1997 yılında da kimyasal olarak karakterize edilmiştir (Kempter ve ark. 1997). Metilenomisin ilk olarak *S. violaceoruber*'de Haneishi ve arkadaşları (1974) tarafından tanımlanmış ve bu antibiyotiğin varlığı SCP1 plazmidini taşıyan *S. coelicolor* A3(2) suşlarında Wright ve Hopwood (1976) tarafından gösterilmiştir.



Şekil 1.14. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) tarafından üretilen antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000) A) Aktinorhodin; B) Metilenomisin; C) Undesilprodigiosin; D) CDA.

1.6 *Streptomyces*'lerde Antibiyotik Üretiminin Düzenlenmesi

Bir antibiyotiğin biyosentezinden sorumlu olan genler çoğunlukla kromozom üzerinde toplu halde bulunmaktadır. Antibiyotik genlerinin büyüme fazına bağlı koordine edilen ifadeleri, pleiotropik regülatörlerin (A faktörü vb.) yanı sıra bir veya birkaç tane yolağa özgül regülatörün kontrolü altındadır (Hopwood ve ark.,1995; Bibb, 1996). Örneğin, *S. coelicolor*'da, *act* (aktinorhodin) ve *red* (undesilprodigiosin) genlerinin ifadesi sırasıyla SARP grubuna ait olan ActII-ORF4 ve RedD spesifik transkripsiyonel aktivatörlerle düzenlenir (Martínez-Hackert ve Stock, 1997; Mizuno ve Tanaka, 1997; Santamarta ve ark., 2002). Yine bu organizmada, KbpA-AfsK-AfsR-AfsS sistemi de antibiyotik üretiminin düzenlenmesinde görev almaktadır. Membranın iç kısmında yer alan AfsK, otofosforlanarak aktive olur ve AfsR'in ser (serin) ve thr (treonin) rezidülerine fosfat aktarır. Aktif AfsR, AfsS'i stimüle eder. AfsS ise actII-ORF4 ve redD transkripsiyonunu indükleyerek undesilprodigiosin ve aktinorhodin üretimi başlar (Umeyama ve ark., 2002).

S. coelicolor A3(2)'de aktinorhodin (Act) ve undesilprodigiosin (Red) üretimi ppGpp ile de düzenlenmektedir. (Strauch ve ark.,1991; Takano ve Bibb, 1994; Takano ve ark., 1992). ppGpp, her iki antibiyotiğin yolak-spesifik aktivatörleri olan *redD* ve *actII-ORF4*'ü kodlayan genlerin transkripsiyonunu tetikler. *E. coli*'de, (p)ppGpp, ribozomlara yüksüz tRNA bağlandığında aktive olan Rel A proteini tarafından GTP ve ATP'nin substrat olarak kullanılmasıyla sentezlenir (Cashel ve ark., 1996). *S. coelicolor*'da, *relA* genini aşırı ifade eden mutant suşta antibiyotik üretiminde değişiklik olmazken, *relA* geninden yoksun mutantta antibiyotik üretiminde besiyerine bağlı olarak düşüş görülmüştür (Chakraburttı ve ark., 1996).

Streptomyces'lerde, antibiyotik üretiminin nitrojen, fosfor ve karbon kaynaklarındaki azalmayla da tetiklendiği bilinmektedir (Martin ve Demain, 1980).

Fermentasyon besiyerinin optimizasyonunu konu alan çalışmalarda, antibiyotik üretimi için polisakkaridlerin veya oligosakkaridlerin glukozdan çok daha iyi bir karbon kaynağı olduğu hatta glukozun antibiyotik üretimini engellediği bulunmuştur (Soltero, ve Johnson, 1953).

Bir besiyerinde glukoz ve daha yavaş metabolize edilen başka bir karbon kaynağı var ise hücreler öncelikle glukozu kullanırlar. Bu aşamada antibiyotik üretilmez, besiyerinde glukoz bitip diğer karbon kaynağı kullanılmaya başlandığında antibiyotik üretimi başlar (Galo ve Katz, 1972; Demain, 1963). Glukozun, antibiyotik biyosentez yolağındaki enzimleri represe ederek antibiyotik üretimini engellediğı gösterilmiştir (Martin ve Demain, 1980). Örneğın, aktinomisin üreticisi *Streptomyces antibioticus*'da bu antibiyotiğın biyosentezinde görevli fenoksazinon sentaz enzimi glukoz tarafından transkripsiyonel seviyede baskılanmaktadır (Lorenzetti ve Lancini, 1993)

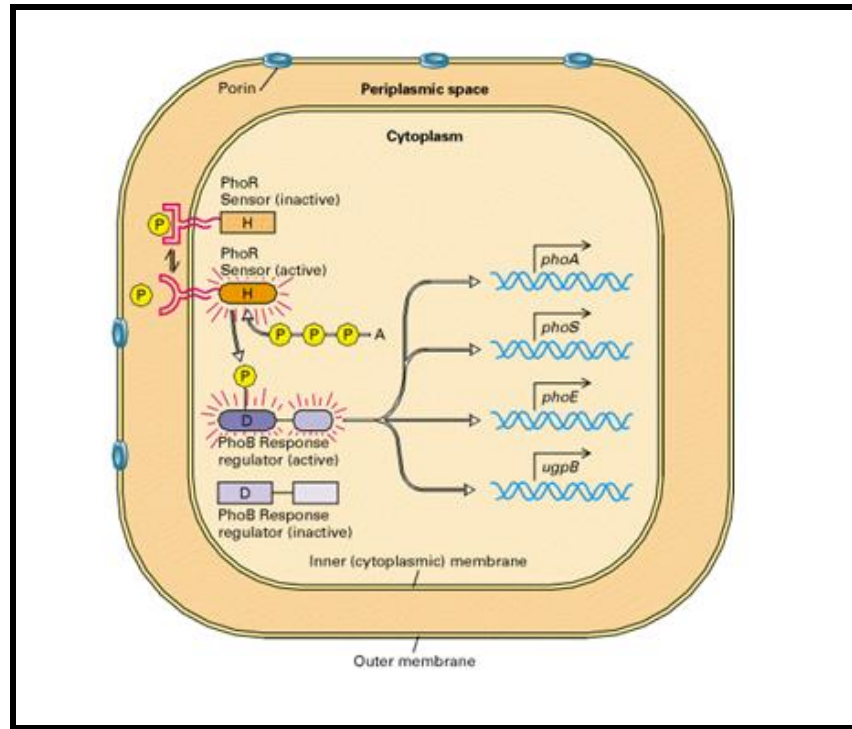
Fermentasyon besiyerinde kolay metabolize olan yüksek miktardaki amonyum iyonlarının da antibiyotik üretimini azalttığı bilinmektedir (Lancini ve Lorenzetti, 1993). Bazı antibiyotik fermentasyonlarında yavaş metabolize olan amonyum kaynaklarının kullanılması ile ürün artışı gözlenmiştir. Örneğın, *Streptomyces griseus* streptomisin üretimi, ortamda tek azot kaynağı olarak yavaş metabolize edilen prolin bulunduğunda üç kat artmıştır (Lancini ve Lorenzetti, 1993) Yine aynı çalışmada, besiyerine amonyum bağlayıcı magnezyum fosfat ilavesinin antibiyotik üretimini arttırdığı gösterilmiştir.

Kültür ortamındaki fosfat konsantrasyonu, makrolid, tetrasiklin, antrasiklin, polieter bileşikler, aminoglikozidler, aminoasitlerden türeyen metabolitler (klavulanik asit) gibi farklı biyosentetik yollara ait olan sekonder metabolitlerin sentezini kontrol eder (Dekeva ve ark., 1985). Sekonder metabolitlerin biyosentezi için gerekli enzimleri kodlayan genlerin ifadesi fosfat tarafından negatif bir şekilde düzenlenmektedir (Asturias ve Liras, 1990).

Streptomyces'lere ait bazı antibiyotiklerin düşük fosfat konsantrasyonu altında üretildiğı ya da üretimlerinin arttığı bilinmektedir (Hobbs ve ark., 1992). Besiyerine eklenen ekzojen inorganik fosfat ile antibiyotik üretiminin baskılandığını gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (Liras ve ark., 1990; Lounes ve ark., 1996; Kang ve ark., 1998; McDowall ve ark., 1999). *Streptomyces*'lerde bu düzenlemenin moleküler temelleri çok az bilinmektedir. Hücre içinde bulunan fosfatın konsantrasyonu, hem büyüme ortamında bulunan fosfatın hücre içine taşınması ile hem de hücrede bulunan fosfat polimerleri (poli P)'nin hidrolizi ile düzenlenmektedir (Kornberg ve ark., 1999).

Streptomyces'lerde fosfat kıtlığı durumunda bakterinin stres şartlarına adaptasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonu PhoR/PhoP sistemi tarafından kontrol edilir (Şekil 1.14). Pho düzenleme genlerinin fonksiyonu, sınırlı fosfat şartlarında, hücrel metabolizmanın normal işlevi için gerekli serbest fosfatı sağlamaktır. (Makino ve ark., 1989) Besiyerindeki fosfat konsantrasyonu azaldığında, sensör kinaz PhoP kendi kendine fosfatlanarak aktif hale geçer ve fosfat grubunu PhoR'e transfer eder. PhoR de fosfat düzenleyici genlerin önünde bulunan PHO kutularına bağlanarak yaklaşık 30 farklı genin ekspresyonunu aktive eder (Torriani-Gorini, 1994).

S. coelicolor'da aktinorhodin ve undesilprodigiosin antibiyotiklerinin sentezlenmesinden sorumlu olan genlerin ifadeleri de fosfat ile kontrol edilir (Martínez-Hackert ve Stock, 1997; Mizuno ve Tanaka, 1997; Santamarta ve ark., 2002). Fosfat ile kontrol edilen genlerin operatör bölgelerinde genellikle PHO kutuları bulunmasına rağmen, *act* ve *red* genlerinin önünde bu kutular bulunmamaktadır (Martin, 2004).



Şekil 1.15. PhoR-PhoP iki bileşenli sistem (Lodish ve ark., 2003).

phoP/phoR genlerinden yoksun mutantlarla yapılan çalışmalarda, hücre içi fosfat konsantrasyonunun düştüğü ve buna bağlı olarak antibiyotik üretiminin tetiklendiği belirtilmiştir (Landa ve ark., 2002). Bu çalışmada, *S. lividans*'ın $\Delta phoP$ ve $\Delta phoRP$ suşlarının normal suşla karşılaştırıldığında aktinorhodini çok daha fazla ürettikleri ve antibiyotik üretimindeki bu artışın, mutantların *phoP* ve *phoRP* genleri ile komplementasyonu normal seviyeye düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca, büyüme ortamına eklenen fazla miktardaki fosfatın $\Delta phoP$ ve $\Delta phoRP$ mutantlardaki aktinorhodin üretimindeki artışı engellediği de ortaya çıkarılmıştır (Landa ve ark., 2002).

Chouayekh ve Virolle (2002) *S. lividans* TK24'ün *ppk* genini klonlamış ve bu genin bloke edilmesiyle bir mutant elde etmişlerdir. *ppk* geninin bloke edilmesi *S. lividans*'da antibiyotik biyosentezinde çok önemli bir artışa sebep olmuş, böylece *ppk* geni tarafından kodlanan polifosfat kinazın *S. lividans*'ta antibiyotik üretiminde negatif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Çok yakın zamanda Ghorbel ve arkadaşları (2006) *Streptomyces* türlerinde antibiyotik biyosentezinin hücrenin enerji dengesine göre tetiklendiğini öne süren bir hipotez geliştirmişlerdir. İnorganik fosfat (Pi) yokluğunda, hücre içerisindeki ATP/ADP oranının azaldığı (Martin ve ark., 1978; Lounes ve ark., 1996) ve bu durumda PPK'nın ADP ve polifosfatlardan in vitro koşullarda ATP oluşumunu katalizleyen bir nükleozid difosfat kinaz görevi yaptığı bilinmektedir (Chouayekh ve Virolle, 2002). Ghorbel ve arkadaşları (2006), ortamda inorganik fosfat kalmadığında, hücrenin polifosfat rezervlerinin PPK bağımlı olarak ATP sentezinde kullanıldıklarını göstermişlerdir. *ppk* mutantında ATP oluşturan bu önemli enzim olmadığından polifosfatlar ATP yapımında kullanılamamakta ve bu durum mutant suşta önemli oranda bir enerji eksikliği oluşturmaktadır. İnorganik fosfat yokluğunda, *ppk* mutantının bu enerji açığını kapatmak için ATP yapımında önemli olan bütün merkezi metabolik yolları güçlü bir şekilde aktive ettiği ileri sürülmüştür. Bunun sonucunda hücrede yüksek düzeyde karbon iskeletleri, indirgenmiş kofaktörler (NADH ve NADPH) ve ATP sentezlendiğini ve durağan fazda anabolizma için kullanılamayan bu anahtar bileşiklerin antibiyotik biyosentezinde kullanıldığını tahmin etmişlerdir.

İnorganik fosfat yokluğunda bütün bu adaptif süreçlerin doğal suşta da gerçekleştiği ancak *ppk* mutant suşta bunların oldukça yüksek seviyede olduğu düşünülmektedir (Ghorbel ve ark., 2006).

Ghorbel ve arkadaşları (2006) aynı çalışmada, *ppk* geninin, inorganik fosfat konsantrasyonunun fazla olduğu durumlara göre, inorganik fosfat seviyesinin düşük olduğu durumlarda çok daha fazla ifade edildiğini ve bu genin ifadesinin PhoR/PhoP ikili sisteminin pozitif kontrolünde olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada *ppk* gen ifadesinin ATP'yi korepresör olarak kullanan bir represör tarafından kontrol edildiği olasılığı öne sürülmüştür.

Ghorbel ve arkadaşlarının (2006) ortaya attıkları, hücredeki enerji eksikliğinin antibiyotik biyosentezini tetikleyen bir faktör olabileceği daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir (Martin ve ark., 1978; Lounes ve ark., 1996).

1.7 Tez Çalışmasının Amacı

2002'de Chouayekh ve Virolle, *S. lividans* TK24'ün *ppk* genini klonlamışlar ve bu genin bloke edilmesinin antibiyotik biyosentezinde önemli bir artışa sebep olduğunu göstermişlerdir. *ppk* geni ürününün *S. lividans*'da antibiyotik biyosentezi üzerindeki negatif etkisinin bütün *Streptomyces* türleri için geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, genetik olarak en iyi çalışılmış ve genom dizisi çok yakın zamanda tamamlanmış olan *S. coelicolor*'ın *ppk* geninin, 'PCR temelli' bir metod kullanılarak bloke edilmesi ve oluşan mutasyonun antibiyotik üretimine etkisinin incelenmesi ve mutasyonun orjinal gen ile komplementasyonu amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

NaHCO₃ (sodyum bikarbonat), K₂HPO₄, K₂SO₄, Tris, Maleik asit, Pepton, MgCl₂·6H₂O, Titriplex III, Dodesilsülfat (Merck), TES, L-prolin (Applichem), Agar, Maya özütü (Alfa Aeaer), Bacto kasamino asit (BD), Sükroz, D-mannitol, NaOH, KOH, %87 Gliserol, D (+) Glukoz, KH₂PO₄, KCl (Riedel-de Haen), NaCl (Sigma-Aldrich), Triptik soya besiyeri, Magnezyum sülfat heptahidrat (Fluka), Fenol, Kloroform, İzöamil alkol, 2-propanol, Asetik asit, % 99,5 Etanol, Hidroklorik asit, Metanol (Riedel de Haen), Dimetil sülfoksit, CTAB (Merck).

2.1.2. Kullanılan Enzimler

Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), *Top-Taq* DNA polimeraz (Hangzhou Bioer Technology), *Pfx*® *Platinum* DNA Polimeraz (Invitrogen), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz, *XhoI* Restriksiyon Endonükleaz, *XbaI* Restriksiyon Endonükleaz, *SphI* Restriksiyon Endonükleaz, *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Promega), *BglIII* Restriksiyon Endonükleaz, *BamHI* Restriksiyon Endonükleaz, *EcoRV* Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas), DNA ligaz (Jena Bioscience), Ribonükleaz A, Lizozim (Sigma).

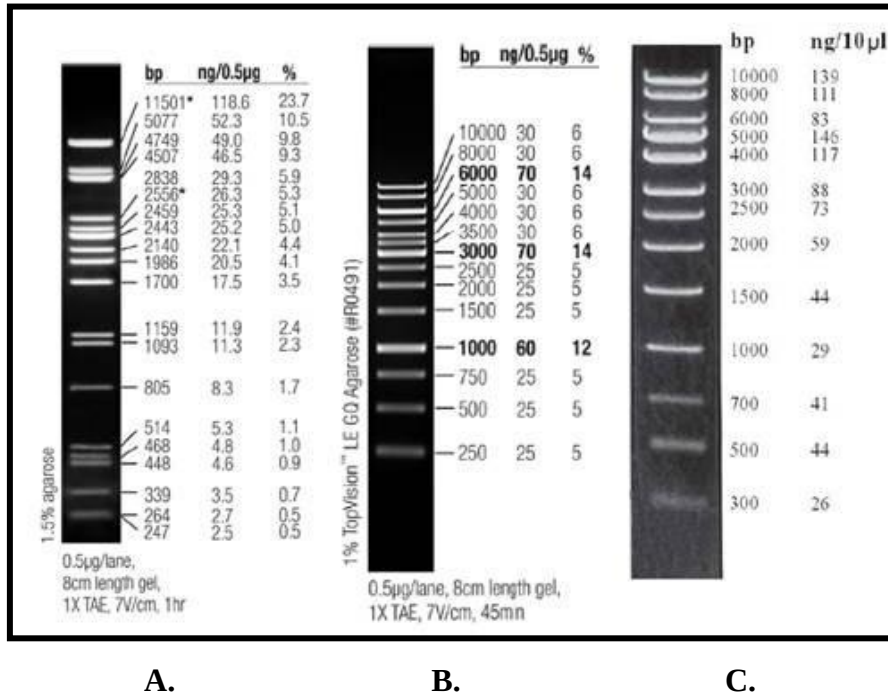
Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarda gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kitler

DNA saflaştırma kiti (GE Healthcare), DNA işaretleme kiti (Roche).

2.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Bu çalışmada Şekil 2.1.'de gösterilen moleküler DNA belirteçleri kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Moleküler DNA belirteçleri. **A.** Lambda DNA/*Pst*I belirteci (Fermentas, SM0361). **B.** 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas, SM1334) **C.** 1 kb mavi DNA belirteci (Bioron)

1.5.Kullanılan Bakteri Soyları

Kullanılan bakteri soyları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri soyları

Bakteri türleri	Genotip	Kaynaklar
<i>E. coli</i> BW25113	<i>K12 derivative: ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i>	Datsenko ve Wanner,2000
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	MacNeil ve ark.,1992
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Prototrofik yaban tip	Hopwood ve ark., 1999
<i>S. coelicolor</i> Δ <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geninden yoksun suş	Bu çalışma
<i>S. coelicolor</i> Δ <i>ppk</i> + pHZ1351- <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geni ile komplemente edilmiş Δ <i>ppk</i>	Bu çalışma

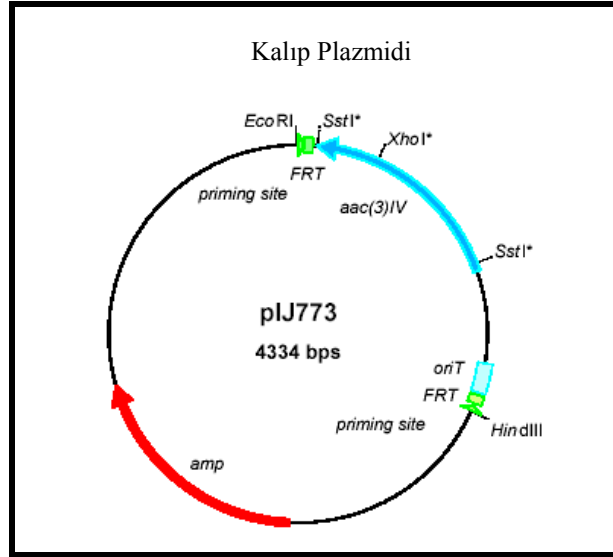
2.1.6.Kullanılan kozmit ve plazmidler

Bu çalışmada kullanılan kozmit ve plazmidler Tablo 2.2’de listelenmiştir.

Tablo 2.2. Deneylerde kullanılan kozmit ve plazmidler

Kozmit ve Plazmidler	Dirençlilik belirteci	Dirençlilik	<i>oriT</i>	Büyüklik	Kaynaklar
Std84	<i>kn</i>	Kanamisin	-	38491 bç	Sanger enstitüsü
pHZ1351	<i>tsr Ltz- sti+</i>	Tiyostrepton	-	8300 bç	Kieser ve ark., 2000
pHZ1351- <i>ppk</i>	<i>tsr Ltz- sti+</i>	Tiyostrepton	-	11190 bç	Savaş, 2010
pIJ773	<i>aac(3)IV</i>	Apramisin	+	1382 bç	Gust ve ark., 2002
pIJ790	<i>cat, bla</i>	Kloramfenikol, Ampisilin	-	6084 bç	Gust ve ark., 2002
pUZ8002	<i>tra, neo, RP4</i>	Kanamisin	+	70 kb	Wang ve ark., 2001
pBluescript II SK (-)	<i>amp</i>	Ampisilin	-	3000 bç	Stratagene
pBluescript II SK (-)- <i>ppk</i>	<i>Bla, ppk</i>	Ampisilin	-	5890 bç	Savaş, 2010

pIJ773 plazmidi (Şekil 2.2) üzerinde, iki FLP rekombinaz hedef bölgesinin (FRT) içinde yer alan *aac(3)IV* apr direnç geni ve RP4 plazmidinin *oriT* bölgesi bulunmaktadır.



Şekil 2.2. pIJ773 plazmidi.

Lambda RED rekombinasyon plazmidi olan pIJ790 (Şekil 2.3), pKD20 plazmidindeki amp direnç geninin (*bla*) yerine chl direnç geninin (*cat*) klonlanmasıyla elde edilmiştir. pKD20'nin aksine pIJ790, SupercosI (kozmit) varlığında hücre içinde varlığını koruyabilmektedir. pIJ790 üzerinde bulunan genler ve görevleri aşağıda listelenmiştir:

araC: arabinoz aktivatörünü kodlar.

bet: tek zincirli DNA'ya bağlanan proteini kodlar.

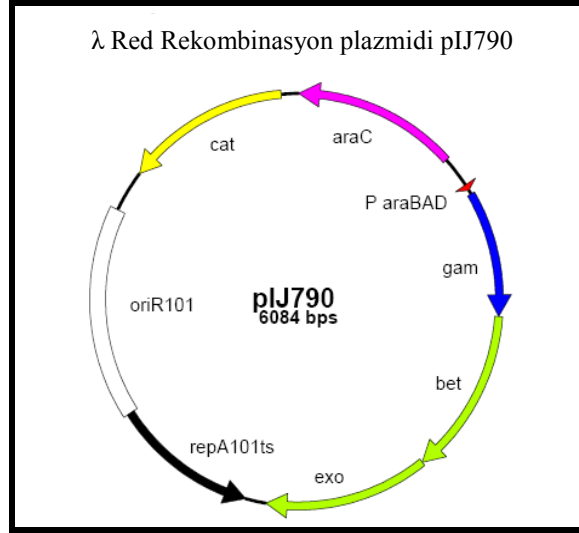
cat: kloramfenikol direnç geni.

exo: *bet* geni ile birlikte rekombinasyonu başlatan ekzonükleaz geni.

gam: konakçı ekzonükleaz V'i inhibe eden ürünü kodlar.

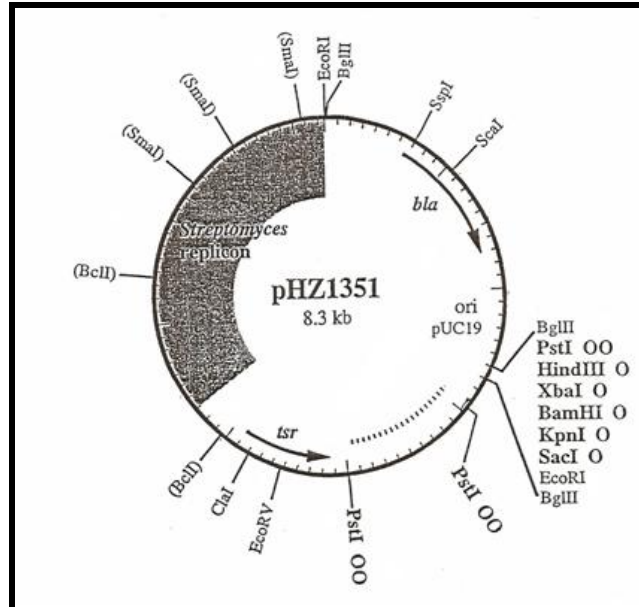
P araBAD: L-arabinoz ile indüklenebilen promotor.

repA 101ts: sıcaklık duyarlı replikasyon



Şekil 2.3. λ Red rekombinasyon plazmid pIJ790.

Streptomyces sp. FR-005 suşunun kromozomal DNA'sından çok kopyalı bir *Streptomyces* replikonu (4 kbç) izole edilerek bu replikonu içeren pHZ1351 (8,3 kbç) bifonksiyonel (mekik) vektör sistemi oluşturulmuştur (Şekil 2.4). Bu plazmit, birçok *Streptomyces* suşuna yüksek transformasyon etkinliği ile aktarılabilmekte, ampisilin direçlilik geni sayesinde *E.coli*'de, tiyostrepton dirençlilik geni sayesinde de *Streptomyces*'te seçilebilmektedir.



Şekil 2.4. pHZ1351 mekik vektörü.

2.1.7.Kullanılan çözeltiler

Tüm sterilizasyon işlemleri yüksek basınç altında 121 °C'ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X)

- 242 g Tris Baz
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

Tris-EDTA (TE) Tamponu

- 10 mM Tris-HCl (pH 8)
- 1mM EDTA (pH 8)

20x SSC (pH:7)

- 3 M NaCl
- 0.3 M Sodyum sitrat

Solüsyon I

- 25mM Tris (pH 8)
- 10 mM EDTA (pH 8)
- 50 mM Glukoz

Solüsyon II

- 0.2 N NaOH
- % 1 SDS

Solüsyon III

- % 60 5M Potasyum asetat
- % 11.5 Glasiyal asetik asit

STE+ Lizozim

- % 10.3 sükroz
- 25 mM Tris-HCl (pH 8)
- 25 mM EDTA (pH 8)
- 2 mg/ml Lizozim

Lizis Solüsyonu

- 0.3 N NaOH
- %2 SDS

CaCl₂ Solüsyonu

- 60 mM CaCl₂
- % 15 Gliserol
- 10 mM PIPES

CTAB/NaCl Solüsyonu

- % 10 CTAB
- 0.7 M NaCl

STE Tamponu

- % 10,3 Sükroz
- 25 mM Tris-HCl pH 8
- 25 mM EDTA

Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)

- 0.1 M maleik asit,
- 5 M NaCl

Depürinizasyon Solüsyonu

- 0.25 M HCl

Denötralizasyon Solüsyonu

- 1.5 M NaCl
- 0.5 M NaOH

Nötralizasyon Solüsyonu

- 1.5 M NaCl
- 0.05 M Tris-HCl pH 7.2
- 1 mM EDTA

Pre-Hibridizasyon Solüsyonu

- 5X SSC
- % 1 Bloklama solüsyonu
- % 0.1 Sarkosil
- % 0.02 SDS

Hibridizasyon Solüsyonu

- Prehibridizasyon solüsyonu+ prob

Yıkama Tamponu I

- 2XSSC
- % 0.1 SDS

Yıkama Tamponu II

- % 0.1 SSC
- % 0.1 SDS

Deteksiyon Tamponu (pH 9.5)

- 0.1 M Tris-HCl
- 0.1 M NaCl

Yıkama Tamponu

- 30 ml Maleik asit Tampon
- 90 µl Tween 20

Bloklama solüsyonu

- 0.5 g bloklama solüsyonu/ 50 ml maleik asit tamponu

Antikor solüsyonu

- Bloklama solüsyonu kullanılarak 5000 defa seyreltilen Anti-Digoksigenin-AP

Renk oluşturan substrat

- Deteksiyon tamponu içinde seyreltilen NBT/BCIP solüsyonu

2.1.8.Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani Besiyeri

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

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika steril edilir (Gust ve ark., 2002).

2xYT Broth

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

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır (Gust ve ark., 2002).

Maya özütü-Malt özütü Besiyeri (YEME)

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

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır (Gust ve ark., 2002).

Otoklavlandıktan sonra;

- 5mM MgCl₂.6H₂O
- % 0.5 Glisin ilave edilir.

Trypton soya besiyeri (TSB)

- % 3 Oxoid Trypton Soya besiyeri

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika steril edilir (Gust ve ark., 2002).

Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)

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

Çeşme suyu ile 1 lt'ye tamamlanır.

Mannitol çeşme suyunda çözülür ve 2 g agar, 2 g soya unu içeren 250 ml'lik erlenlere 100'er ml olacak şekilde bölünür. İki defa üst üste 115 °C'ta 15 dk otoklavlanır (Gust ve ark., 2002).

SOB Besiyeri

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

ddH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır. 5N NaOH ile pH:7.0'e ayarlanır. Otoklavlandıktan sonra 2M MgCl₂'den 5 ml eklenir (Sambrook ve ark., 1989).

R2YE Besiyeri

- 103 g Sükroz
- 0.25 g K₂SO₄
- 10.12 g MgCl₂.6H₂O
- 10 g Glukoz
- 0.1 g Kazamino asit
- 22 g Agar (% 2.2)

dH₂O ile 800 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlandıktan sonra her 160 ml besiyeri içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir (Thompson ve ark., 1980):

- 2 ml KH_2PO_4 (% 0.5)
- 16 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (% 3.68)
- 3 ml L-prolin (% 20)
- 20 ml TES Tampon (% 5.73, pH 7.2)
- 0.4 ml iz element solüsyonu*
- 1 ml NaOH (1N)

***İz Element Solüsyonu**

- 40 mg ZnCl_2
- 200 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

TBO Besiyeri (pH: 6.5)

- 20 g Salça
- 20 g Yulaf
- 25 g Agar

dH_2O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır (Aparicio ve ark., 1999).

Protoplast P (-) Solüsyonu

- 103 g Sükroz
- 24 g K_2SO_4
- 2.02 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2 ml İz element solüsyonu

dH₂O ile 800 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır (Gust ve ark., 2002).

Protoplast P (+) Solüsyonu

Her 80 ml P(-) solüsyonu içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir:

- 1 ml KH₂PO₄ (% 0.5)
- 10 ml CaCl₂.2H₂O
- 10 ml TES buffer (% 5.73, pH 7.2)

2.1.9.Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3.Kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E.coli</i> 'de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)	<i>Streptomyces</i> 'de kullanılan konsantrasyonu(µg/ml)
Apramisin (Apr)	50	50	50
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Kanamisin (Kn)	50	50	50
Kloramfenikol ¹ (Chl)	50	25	-
Nalidiksik asit ² (NA)	25	-	25
Tiyostrepton (Tsr)	50	-	50

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

2.1.10.Kullanılan Cihazlar

4 °C Buzdolabı (Ariston), - 20 °C derin dondurucu (Ariston), - 80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, Mını-Sab Cell CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BECKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilmer Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000), Econo Gradient Pompa (BIO-RAD), Econo UV Monitör (BIO-RAD), Blotlama sistemi (Amersham), Hibridizasyon fırını (Amersham)

2.2.YÖNTEMLER

2.2.1. *E. coli*'den plazmit izolasyonu

E. coli'den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile yapılmıştır. Uygun antibiyotik içeren 5 ml LB'de 37 °C'ta 12-16 saat büyütülmüş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pelet üzerine 200 µl solüsyon I (TEG) eklenmiş, vortekslenmiş ve ependorf tüpüne alınmıştır. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 400 µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dk'da bir karıştırılarak 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. Daha sonra 300 µl Solüsyon III eklenip, her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. 14.000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka bir tüpe alınarak, 0.6 hacim izopropanol eklenip, karıştırılmıştır. Yaklaşık 5 dk kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 11.000 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, pelet H₂O'da çözülmüştür. Solüsyon üzerine RNaz (10mg/ml) eklendikten sonra 30 dk 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, Jel Bant Pürifikasyon Kitinden (GE healthcare) geçirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.2. *E. coli*'den kozmit izolasyonu

E. coli hücrelerinden Std84 kozmidinin izolasyonu için, plazmit izolasyonunda uygulanan protokol kullanılmış, ancak kozmit, pürifikasyon kolonundan geçemeyecek büyüklükte olduğundan (yaklaşık 39.000 bp) RNaz aşamasından sonra fenol-kloroform:izoamilalkol (24:23:1) ekstraksiyonu yapılarak saflaştırılmıştır. 1:1 oranında eklenen fenol-kloroform ile karıştırılan solüsyon, oda sıcaklığında 11.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorfa alınarak bu işlem en az 3 kez tekrarlanmıştır. Üst faz alınarak üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (23:1) karışımı eklenip karıştırıldıktan sonra 11.000 rpm'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edilerek fenolün iyice uzaklaştırılması sağlanmıştır. Su fazındaki DNA, 3 hacim etanol ile -20 °C'ta 2 saat ya da -80 °C'ta yarım saat bekletilerek çöktürülmüştür. 4 °C'ta 14000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra pelet kurutulup dH₂O'da çözülmüştür.

2.2.3. Elektroporasyon Yöntemi

Elektrokompetan hücreler Gust ve arkadaşları'na (2003) göre hazırlanmıştır. LB besiyerinde bir gece boyunca üreyen *E. coli* hücrelerinden, 20 mM MgSO₄ içeren SOB besiyerine 1/10 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm'de abzorban 0.4'e ulaşınca kadar 30 °C'ta üretilmiş ve 4 °C'ta 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Pelet 10 ml %10'luk soğuk gliserolde çözüldükten sonra aynı işlem iki kez tekrarlanmıştır. Ardından, pelet, 5 ml %10'luk soğuk gliserolde çözülüp santrifüjlendikten sonra son olarak 100µl %10'luk gliserolde çözülmüş ve -80 °C'ta saklanmıştır.

50 µl elektrokompetan hücre yaklaşık 100 ng DNA ile karıştırılarak 200 Ω, 25 µF ve 2,5 kV değerlerinde elektrik akımına maruz bırakılmış ve akım sonunda 'time constant' değerinin 4.5-4.9 arasında çıkmasına özen gösterilmiştir. Daha sonra hücreler, antibiyotik içermeyen 1 ml soğuk LB içine alınıp 30 °C'ta 1 saat inkübe edilmiş ve ardından seçici besiyerlerine yayılarak 30 °C'ta gece boyunca inkübe edilmişlerdir.

2.2.4. *Streptomyces coelicolor*'dan Kromozomal DNA İzolasyonu

S. coelicolor genomik DNA'sı Hopwood ve arkadaşları'na (1985) göre izole edilmiştir. 20 ml TSB besiyerine stok spor solüsyonundan 50 µl inoküle edilerek, 4 gün boyunca 30 °C'ta 220 rpm'de büyütülmüştür.

50 ml besiyerine bu ön kültürden 1/10 oranında ekim yapılarak hücreler 2 gün daha 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve 10 ml TE tamponunda çözölen peletin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Karışımın 1.7 ml'si steril bir tüpe ayrıldıktan sonra geri kalanı -20 °C'ta saklanmıştır. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl (10mg/ml) RNaz eklendikten sonra, 37 °C'ta 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 300 µl 5 M NaCl ve 249 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (CIA, 23:1) solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında 11.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst faz fenol:CIA (24:23:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 0,6 hacim izoproponal eklenerek 14.000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Pelet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve H₂O'da çözölmüştür.

2.2.5. *S. coelicolor*' dan plazmit izolasyonu

S. coelicolor plazmit DNA'sı Hopwood ve arkadaşları'na (1985) göre izole edilmiştir. Önceki bölümde anlatıldığı gibi hazırlanan 50 ml'lik *S. coelicolor* kültürü 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve pelet, 5 ml 2 mg/ml lizozim içeren STE solüsyonunda çözölererek 37 °C'de her 3-4 dk'da bir karıştırılarak toplam 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 3/5 oranında lizis solüsyonu eklenerek, 20 sn vortekslenmiş, ardından 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 70 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına inmesi için beklenmiştir. 3 defa tekrarlanan fenol-kloroform ekstraksiyonundan sonra ayrılan üst fazın üzerine eşit hacimde izoproponal ve hacmin 1/10'i kadar 3M sodyum asetat (pH: 4,8) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra -20 °C'ta 30 dk inkübe edilmiştir. Solüsyon, 4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dk santrifüjlendikten sonra pelet kurutulup dH₂O'da çözölmüştür.

2.2.6. Restriksiyon endonükleaz kesimleri

İzole edilen plazmit, kozmit ve kromozomal DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, enzimlerin üretici firmalarının belirttiği konsantrasyonlar ve koşullarda önerilen tamponlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kozmit ve plazmit kesimleri yaklaşık 2-5 saat süre ile kesilirken, kromozomal DNA'ların kesimleri gece boyunca devam etmiştir.

2.2.7. Agaroz jel elektroforezi

Nükleik asitlerin, elektroforez yöntemi ile agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmaları sağlanmıştır. %0.8-1'lik agaroz jeli, 1xTAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr ilave edilmiştir. DNA yükleme tamponu ilave edilen örnekler, agaroz jele yüklenerek, içinde yürütme tamponu olarak 1xTAE bulunan elektroforez tankında 85-120 Volt'ta yürütülmüşlerdir.

2.2.8. İzole edilen DNA'nın jelden geri kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri elde edilmesi protokolü, Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapılmıştır.

2.2.9. Mutasyon kasetinin hazırlanması

ppk geninin blokasyonu için son yıllarda *Streptomyces*'de başarıyla uygulanan PCR temelli yöntem kullanılmıştır (Gust ve ark., 2003). Bu yöntemde, seçilen bir antibiyotik direnç geni *S. coelicolor ppk* geninin yerini almaktadır. Bu çalışmada, apramisin direnç geni belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında apramisin direnç genini (*aac(3)IV*) ve *oriT* (konjugasyon sırasında plazmidin mobilizasyonunu sağlar) bölgesinin bulunduğu mutasyon kasetini taşıyan pIJ773 plazmidi kalıp (template) olarak kullanılmıştır.

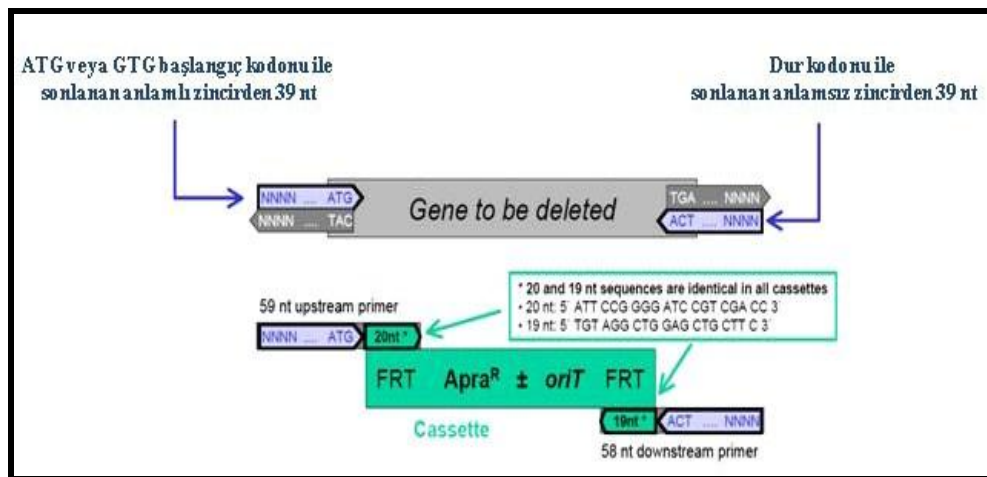
pIJ773 plazmidi, *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiş ve mutasyon kasetinin hazırlanması için yapılacak PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılacak olan seçici apramisin kaseti elde edilmiştir. 1398 bp uzunluğundaki bu kaset jelden izole edilerek PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır.

Polifosfat kinaz (*ppk*) geninin delesyonu için HPLC ile saflaştırılmış uzun (59 ve 58 bp) primerler (Tablo 2.4) kullanılmıştır. Primerlerin 39 nükleotidlik kısmı, *S. coelicolor* genom dizisine (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. İleri primerin (forward) 39 bazlık kısmı *ppk* geninin ön kısmındaki bölgeye uyumlu olup ATG başlangıç kodonuyla bitirilmiştir.

İleri primerin 3' kısmı (20 bp'lık) ise mutasyon kasetinin ön kısmına uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir. Yine aynı şekilde ters primerin (reverse) 39 bazlık 5' kısmı *ppk* geninin alt kısmındaki bölgeye uyumlu olacak şekilde ve TGA bitiş kodonuyla bitirilmiştir. Ters primerin 3' kısmı (19 bp'lık) ise mutasyon kasetinin arka kısmına uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir. Bu iki primer, *ppk* geninde, sadece ATG ve TGA kodonları kalacak şekilde bir delesyona sebep olacaktır (Şekil 2.5).

Tablo 2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler

İleri Primer	5'aaccatcgattcagccagccttgcgaggetcaccgaatg ATTCCGGGGATC CGTCGACC 3'
Geri Primer	5'gtttccggtgaaagtccgctcggaatgtccgctgggtca TGTAGGCTGGAG CTGCTTC 3'



Şekil 2.5. Primerlerin dizaynı

Kalıp olarak pIJ773'den elde edilen apramisin direnç geni ve uzun primerler kullanılarak *Taq* DNA polimeraz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir.

50 µl'lik PCR reaksiyonu, 1XTaq polimeraz tamponunda, 1.5 mM MgCl₂, 50 µM dNTP (her biri için), ileri ve geri primerlerin her birinden 50 pmol, 80 ng kalıp DNA ve 2.5 U Taq DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü, denatürasyon 94 °C'ta 2 dakika, primer bağlanması 50 °C'ta 45 saniye ve polimerizasyon 72 °C'ta 90 saniye olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon, 94 °C'ta 2 dakikalık bir denatürasyon işlemi ile başlamış ve 72 °C'ta 5 dakikalık ek bir polimerizasyon aşaması ile tamamlanmıştır.

2.2.10. *S. coelicolor* Std84 kozmidinin *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine aktarılması

E. coli BW25113 içinde yer alan, pIJ790 plazmidi, kloramfenikol dirençlilik geni (*cat*) ve sıcaklığa duyarlı replikasyon orijini içermektedir.

E. coli BW25113 kompetan hücreleri CaCl₂ yöntemiyle hazırlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Hücreler, kloramfenikol içeren 10 ml LB besiyerine ekilerek 30 °C'ta gece boyunca üretilmiştir. Kloramfenikol ve MgSO₄ içeren 50 ml SOB besiyerine bu ön kültürden 1/100 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda abzorban değeri 0.4-0.6'ya ulaşana kadar 30 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. 2 santrifüj tüpüne eşit bir şekilde bölünen kültür, 5 dk buzda bekletildikten sonra 4 °C'ta 3000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Peletler 10'ar ml soğuk CaCl₂ solüsyonunda çözülmüş ve ardından 4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 defa tekrar edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra peletler toplam 200 µl -500 µl soğuk CaCl₂ solüsyonunda çözülmüş ve soğuk ependorf tüplere dağıtılmıştır. Hücreler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C'ye kaldırılmışlardır.

Üzerinde *ppk* geni bulunan Std84 kozmidi, *E. coli* BW25113/ pIJ790 hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). 50-80 ng arasında farklı konsantrasyonlarda Std84 kozmidi, kompetan hücrelerle birleştirilerek bu karışım buzda 30 dk bekletilmiştir. Hücrelere, 42 °C'ta 45 sn ısı

şoku uygulanmış ve ardından buzda 2 dk bekletilmiştir. Steril koşullarda üzerine 500 µl LB eklenen hücreler, 30 °C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler, Amp (100 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerine ekilerek 30 °C'ta bir gece inkübe edilmiştir.

2.2.11. Mutasyon kasetinin Std84 kozmidini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine aktarılması

Std84 kozmidini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 kompetan hücreleri Sambrook ve arkadaşları'na (1989) göre yukarıda 2.2.9. bölümde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Hücreler, Amp (100 µg/ml), Kn (50 µg/ml), Chl (25 µg/ml) ve 10 mM L-arabinoz içeren 100 ml SOB-MgSO₄ besiyerinde üretilmiştir.

Mutasyon kaseti Std84 kozmidi içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine, yine 2.2.9. bölümde anlatılan yöntemle aktarılmış ve transformanlar Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Amp (100 µg/ml) içeren LB agarda seçilmişlerdir.

2.2.12. Mutant kozmidin metilasyon sistemi olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılması

CaCl₂ metodu (Sambrook ve ark., 1989) ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreler, mutant kozmit (Std84 Δppk) ile transform edilmiştir. Transformanlar, Apr (50 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml)'i birlikte içeren ve sadece Apr (50 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerinde taranmıştır. Her iki besiyerinde de üremesi gereken transformanlar sadece apramisin içeren besiyerinde üremiştir. Bu transformanlar daha sonra normal şartlarda üremeleri gereken Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) antibiyotiklerini içeren besiyerine aktarılmıştır. Tekrarlanan deneylerde transformasyondan olumlu sonuç alınamamıştır. Bu özel *E. coli* hücrelerinde kozmit üzerindeki antibiyotik dirençlilik genlerinin ifadelerinin normalden daha zayıf olduğu tespit edilmiş ve her seferinde tek çeşit antibiyotik yarım dozda uygulanmıştır.

2.2.13. Mutant kozmidin doğruluğunun PCR ile ispatlanması

Std84 Δppk ve yaban Std84 kozmidlerinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonunda *ppk* genine uygun primerler ve Pfx DNA polimeraz enzimi

kullanılmıştır. 25 µl'lik PCR reaksiyonu, 1X *Pfx* Amplikasyon tamponunda, 0.5 mM MgSO₄, 0,15 mM dNTP (her biri için), ileri ve geri primerlerin herbirinden 0.15 µM, 50 ng kalıp kozmit DNA ve 0.5 U *Pfx* DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam 30 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü, denatürasyon 94 °C'ta 30 sn, primer bağlanması 65 °C'ta 30 sn ve polimerizasyon 68 °C'ta 3 dk olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon, 94 °C'ta 3 dakikalık bir denatürasyon işlemi ile başlamış ve 68 °C'ta 10 dakikalık ek bir polimerizasyon aşaması ile tamamlanmıştır.

2.2.14. Mutant kozmidin *Streptomyces coelicolor*'a transferi

2.2.14.1. Konjugasyon

Std84 *Appk* kozmidini taşıyan *E. coli* ET12567+ pUZ8002 ön kültüründen, Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren 10 ml LB besiyerine, 1/10 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda aborbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler iki kez antibiyotik içermeyen LB ile yıkanarak, 1 ml LB'de çözülmüştür. Bu sırada, her bir konjugasyon denemesi için 500µl 2xYT besiyerine 10⁸ sayıda *S. coelicolor* sporu ilave edilerek 50 °C'ta 10 dk sıcaklık şoku uygulanmıştır. 0.5 ml *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri ile 0.5 ml *S. coelicolor* sporları karıştırılarak, kısaca (yaklaşık 1 dk) santrifüj edilmiş ve sıvının büyük bir kısmı dökülerek, hücreler kalan 50 µl sıvıda çözülmüştür. Hücreler, 10⁻¹-10⁻⁴ aralığında seyreltilerek antibiyotik içermeyen MS + 10mM MgCl₂ agar besiyerlerine 100'er µl ekilmiştir. 30 °C'ta 16-20 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerleri, besiyerindeki son konsantrasyon 25 µg/ml NA ve 50 µg/ml apramisin olacak şekilde antibiyotik içeren 1 ml dH₂O ile kaplanarak inkübasyona devam edilmiştir. Tekrarlanan deneylerde hiçbir konjugan elde edilememiştir. Konjugan kolonilerin elde edilmesi durumunda, aynı tek koloniler, hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren MS besiyerine hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren MS besiyerine ekilir ve apramisine dirençli kanamisine hassas olan olası mutant suşlar taranır.

2.2.14.2. Protoplast transformasyonu

S. coelicolor protoplastları Hopwood ve arkadaşları'na (1985) göre hazırlanmıştır. *S. coelicolor* ön kültüründen, 100 µl 2.5 M MgCl₂.6H₂O ve 1.25 ml %20 glisin eklenen 50 ml YEME besiyerine 1/10 oranında ekim yapılmıştır. 20 saat 30 °C'ta 250 rpm'de üretilen hücreler daha sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve %10.3 sükroz ile iki kez yıkanmıştır. Pelet, 20 ml 2 mg/ml lizozim içeren P(+) solüsyonunda çözülmüştür. Hücreler 30 °C'ta, her 5 dakikada bir dikkatlice karıştırılarak 30 dk inkübe edilmiştir. İlk 15 dk ve 30 dk sonunda mikroskop altında protoplast oluşumu kontrol edilmiştir. Daha sonra protoplastlar, içi pamuk ile gevşekçe doldurulmuş 5 ml'lik pipet ucu yardımıyla filtre edilmiştir. Bu şekilde misellerden arındırılan protoplastlar, 3300 rpm'de 4 °C'ta 7 dk santrifüj edilmiş ve P(+) solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Pelet 300 µl P(+) buffer'da çözülerek, ependorf tüplere 50'şer µl olacak şekilde bölünerek buz içinde -80 °C'a kaldırılmıştır.

Her bir transformasyon için, -80 °C'tan alınan 50 µl protoplast, çeşme suyuna tutularak hızlıca çözülmüştür. Protoplastların üzerine hızlı bir şekilde, 5 µl DNA (*E. coli* ET12567'den izole edilen mutant kozmit) ve 200 µl PEG + P(+) içeren karışımdan ilave edilerek pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırılmıştır. Protoplastlar iki R2YE besiyerine eşit bir şekilde yayılarak ekilmiş ve 30 °C'ta 20 saat inkübe edilmiştir. 20 saat inkübasyon sonunda petrilere, besiyerindeki son konsantrasyon 50 µg/ml olacak şekilde apramisin içeren 1 ml dH₂O ile kaplanmıştır.

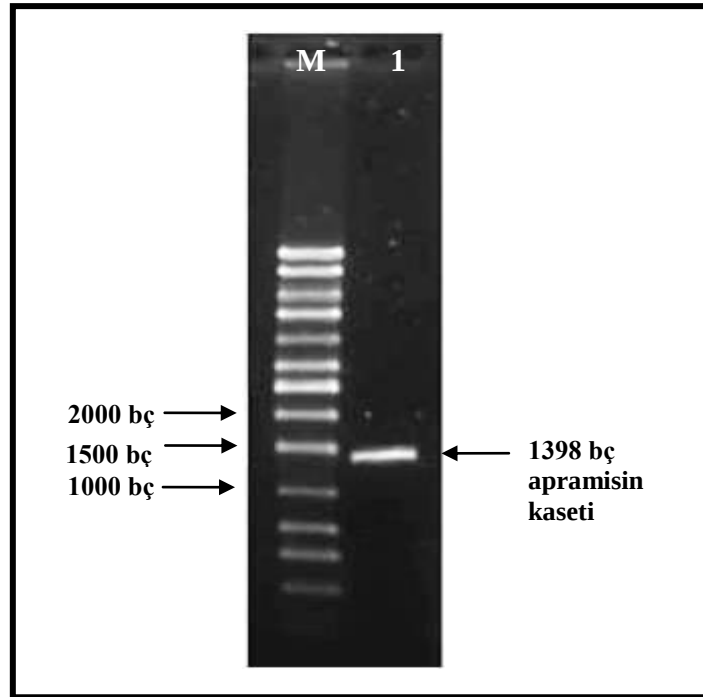
Protoplast transformasyonu sonucunda apramisin içeren R2YE besiyerinde üreyen hücreler arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği suşa (Apr^D, Kn^H) rastlanmadığından tek rekombinasyon (single cross over) olayının meydana geldiği herhangi bir apr^D koloni, antibiyotik içermeyen R2YE besiyerlerinde ard arda pasajlanarak çift rekombinasyona zorlanmıştır. Her bir pasaj sonrasında, aynı hücreler tek koloni halinde hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren besiyerlerine ekilerek taranmıştır. NA+Apr besiyerinde üreyip de NA+Apr+Kn besiyerinde üremeyen *S. coelicolor* kolonileri doğru mutantlardır

2.2.15. Southern Blot

Southern blot Sambrook ve arkadaşları'na (1989) göre yapılmıştır. Öncelikle kromozomal DNA'lar *XhoI* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek agaroz jelde yürütülmüştür. DNA fragmanlarının jelden membrana aktarımı blotlama sistemi (Amersham) ile sağlanmıştır. 2xSSC solüsyonu ile yıkanan membranın üzerinde bulunan agaroz jelin yüzeyi, sırası ile 30 dk süreyle depürinizasyon solüsyonu, 30 dk süreyle denötralizasyon solüsyonu, 30 dk süreyle nötralizasyon solüsyonu ve son olarak 90 dk süreyle 20xSSC solüsyonu ile kaplanmıştır. Bu süreçte sistem vakuma bağlı olduğundan DNA fragmanları membrana transfer edilmiştir. En son, UV ışığı ile DNA'lar membrana sabitlenmiştir. Membran 2xSSC ile yıkanarak adi filtre kağıdı arasında 4 °C'ta saklanmıştır.

2.2.15.1. Apramisin prop DNA'sının hazırlanması

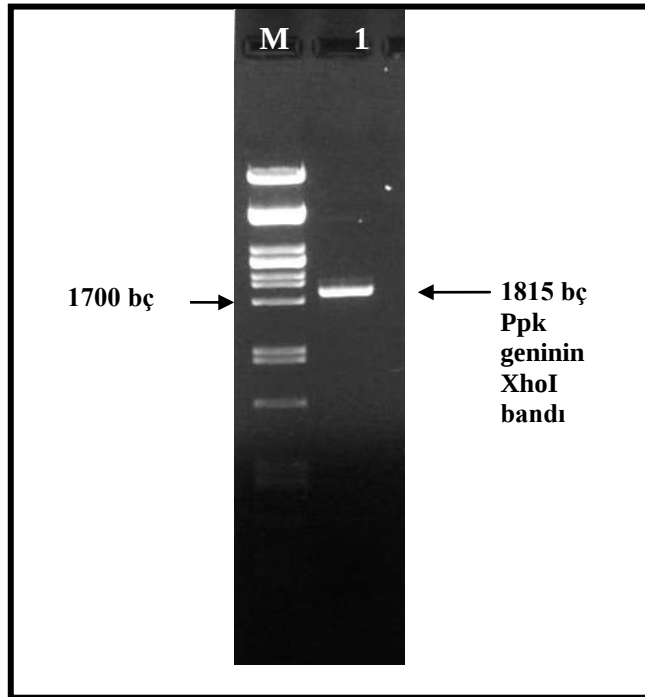
Apramisin direnç geni, pIJ773 plazmidinin *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazlar ile kesilip, 1398 bç uzunluğundaki *apr* direnç genini bulunduran bölge agaroz jelden, Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil2.6)



Şekil 2.6. Agaroz jelden saflaştırılan 1398 bç'lik *apr* kaseti. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 1398 bp'lik apramisin kaseti.

2.2.15.2. *ppk* prop DNA'sının hazırlanması

ppk geni, laboratuvarımızda sürdürülen paralel bir çalışmayla pBluescript plazmidine klonlanmıştır (Ümmühan Savaş'ın yüksek lisans tez çalışması). Söz konusu pSK-*ppk* plazmidi, *Xho*I restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve *ppk* genini bulunduran 1815 bç uzunluğundaki DNA fragmanı agaroz jelden saflaştırılmıştır. *ppk* genine özgül 1815 bç'lik DNA fragmanı % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Agaroz jelden saflaştırılan 1815 bç'lik *ppk* fragmanı. M: Lambda DNA/*Pst*I belirteç (fermentas); 1: 1 µl 1815 bp'lık *ppk Xho*I bandı

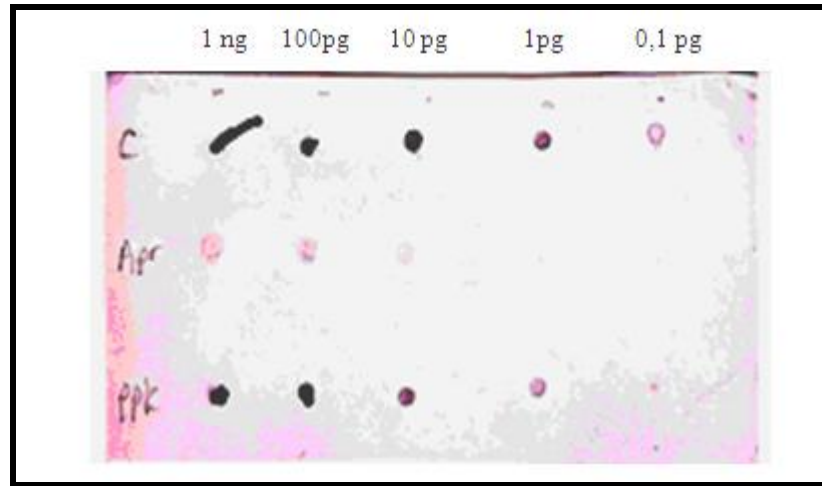
2.2.15.3. Sinyal Oluşumu ve Tespit Edilmesi

Digoksijenin ile üreticilerin önerdiği şekilde işaretlenen apramisin ve *ppk* problemlerinin seri dilüsyonları hazırlanarak pozitif yüklü naylon membrana sırasıyla emdirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Bam*HI ile kesilmiş pBR328 plazmidi kullanılmıştır. 1 ng, 100pg, 10 pg, 1 pg ve 0,1 pg konsantrasyonlarında hazırlanan kontrol DNA'sı ve işaretlenmiş problemlerin 1'er µl'si naylon membrana UV ışığı

altında sabitlenmiştir. Membran, öncelikle 20 ml maleik asit tamponunda 15-25 °C'ta çalkalanarak 2 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, sırası ile 10 ml bloklama solüsyonunda ve 10 ml antikör solüsyonunda 30'ar dk bekletilmiştir. Membran, 10 ml yıkama tamponunda 2 kez 15'er dk yıkandıktan sonra, 10 ml tespit (detection) tamponunda 2-5 dk inkübe edilmiştir.

Son olarak membran, taze hazırlanmış 2 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için membran 1 dk steril dH₂O ile yıkanmıştır.

Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında, *apr* probu, digoksijenin ile başarılı bir şekilde işaretlenmemiş, buna karşılık *ppk* probunun etkinliği hemen hemen kontrol DNA'sı kadardır.



Şekil 2.8. DNA İşaretleme metodu ile *apr* ve *ppk* problemlerinin kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.

2.2.15.4. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

Membran, 55 °C'ta 2-4 saatlik bir prehibridizasyon basamağının ardından, *ppk* probunun içinde olduğu hibridizasyon solüsyonu içerisinde gece boyunca 55 °C'ta hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir. Hibridizasyon solüsyonu daha sonraki kullanıma kadar -20 °C'ta saklanmıştır. Hibridizasyondan sonra membran, yıkama tamponu I ile oda sıcaklığında 2 defa 15'er dk çalkalanarak ve yıkama tamponu II ile 55 °C'ta 2 defa 25'er dk çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkamalardan sonra membran, maleik asit yıkama tamponunda 1-5 dk durularak, sırasıyla 100 ml bloklama

solüsyonunda ve 20 ml antikör solüsyonunda 30'ar dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 ml maleik asit yıkama tamponunda 2 defa 15'er dk yıkanan membran, 20 ml tespit (detection) tamponunda 2-5 dk inkübe edilmiştir. Membran, taze hazırlanmış 10 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta bekletilmiştir. Renk reaksiyonu membranın dH₂O ile yıkanmasıyla durdurulmuştur.

2.2.16. Mutant suşun komplementasyonu

ppk geninden yoksun *S. coelicolor*'ın mutasyonu, yaban tip *ppk*'nın üzerinde bulunduğu pHZ1351-*ppk* (Ümmühan Savaş'ın tez çalışmasından) plazmidi ile gerçekleştirilmiştir. pHZ1351-*ppk* ve kontrol olarak kullanılan pHZ1351 plazmidleri Δppk suşuna protoplast transformasyonu ile aktarılmış ve transformanlar tiyostrepton (25 µg/ml) içeren R2YE besiyerinde seçilmiştir. Transformanlardan izole edilen plazmidler, *Hind*III ve *Xba*I restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek doğrulanmışlardır. Kesim reaksiyonları, 10 µl hacimde, 2xTango tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Transformanlardan izole edilen pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351 plazmitleri ile Pfx DNA polimeraz kullanılarak PCR da yapılmıştır. 50 µl'lik PCR reaksiyonu, 1x amplikasyon tamponunda, 200 µM (her biri) dNTP, 1 mM MgSO₄, 0.3 µM *ppk* ileri primer, 0.3 µM *ppk* geri primer, 500ng kalıp DNA, enhancer, 3U Pfx DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam 25 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü, denatürasyon 94 °C'ta 30 sn, primer bağlanması 65 °C'ta 30 sn ve polimerizasyon 68 °C'ta 3 dk olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon, 94 °C'ta 3 dakikalık bir denatürasyon işlemi ile başlamış ve 68 °C'ta 10 dakikalık ek bir polimerizasyon aşaması ile tamamlanmıştır.

2.2.17. Antibiyotik Ölçümleri

Δppk olduğu southern blot yöntemi ile ispatlanan suş ve yaban suş ile 168 saatlik bir fermentasyon yapılmıştır. Mutant suş, 0.185 mM KH₂PO₄ ve 50 µg/ml apramisin içeren besiyerinde, yaban suş ise antibiyotik eklenmemiş aynı besiyerinde üretilmiştir. Fermentasyon boyunca, 24., 48., 72., 96., 120., 144. ve 168. saatlerde 4

ml örnek alınmış, bunun 1 ml'si antibiyotik ölçümü için -20 °C'a 3 ml'si kuru ağırlık ölçümü için 2 kez dH₂O ile yıkandıktan sonra -80 °C'a kaldırılmıştır.

Undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotiklerinin üretimi Kieser ve arkadaşlarının (2000) spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüştür.

-20 °C'tan alınan 1 ml'lik örnekler eritilerek, herbirine 250 µl 5M KOH ilave edilip karıştırıldıktan sonra gece boyunca 4 °C'ta inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 14.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek, pelet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Aktinorhodin, süpernatantta 640 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Pelet 0,5 M HCl ile 2 kez yıkanmış ve 1 ml 0,5 M metanol-HCl karışımında 2 saat bekletilmiştir. 11.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra süpernatantta undesilprodigiosin, 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Antibiyotik aktiviteleri, spektrofotometrede ölçülen değerlerin, aktinorhodin için $\epsilon = 25.23$ ile, undesilprodigiosin için ise $\epsilon = 100.5$ sabit değerleri ile çarpılarak hesaplanmıştır.

Kuru ağırlık ölçümü için -80 °C'a kaldırılan peletler eritilerek kurutma kaplarına alınmış ve 4 gün boyunca 80 °C'ta kurutulduktan sonra ağırlıkları ölçülmüştür. Antibiyotik aktiviteleri kuru ağırlığa bölünerek spesifik aktiviteleri elde edilmiştir.

2.2.18. *S. coelicolor* Δppk Suş ve Yaban Tip Suşların R2YE Besiyerinde H₂O₂ Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması

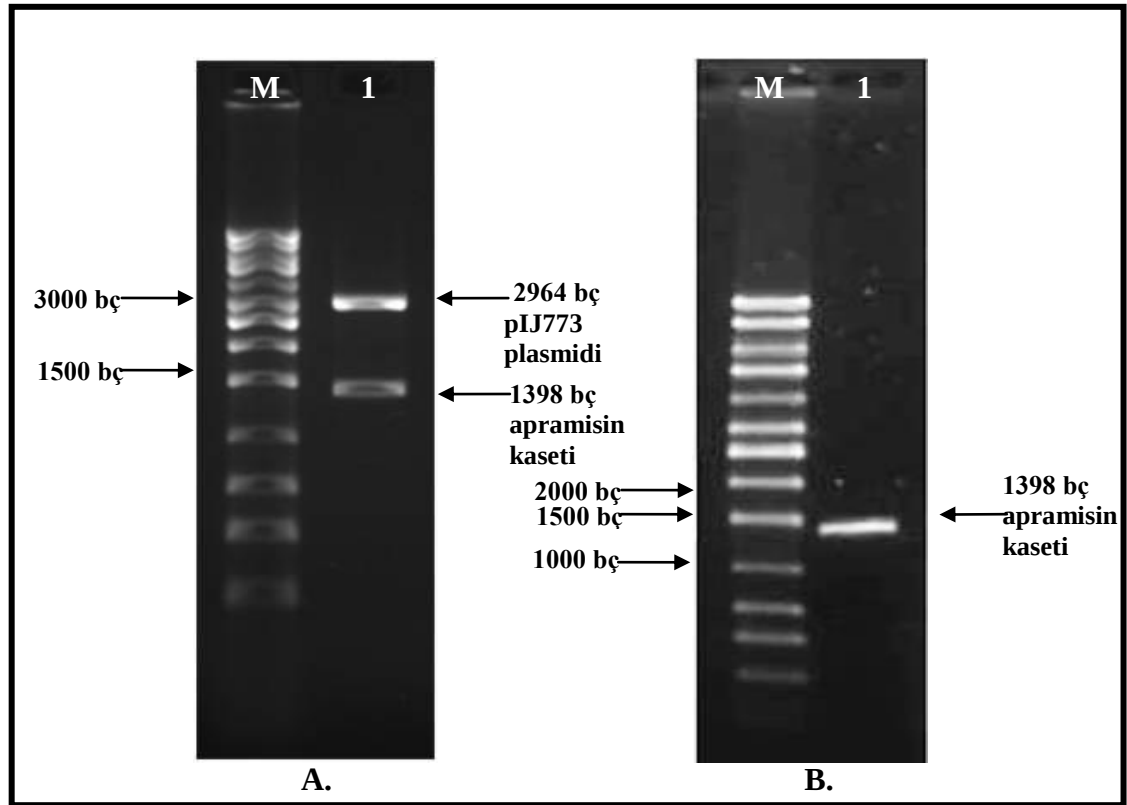
H₂O₂ hassasiyetlerini karşılaştırmak için, *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* Δppk suşlarının sporları, 0.37 mM, 1 mM, 1.85 mM ve 3.7 mM KH₂PO₄ içeren R2YE katı besiyerlerine eşit sayıda ekilmiştir. Daha sonra her bir petrinin ortasına, 100 mM H₂O₂ solüsyonundan 20 µl emdirilmiş diskler (whatman membranından hazırlanmıştır) yerleştirilmiştir. Hücreler, 30 °C'ta 3 gün inkübe edilmiş ve disk etrafında oluşan halkasal bölgenin çapı ölçülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması

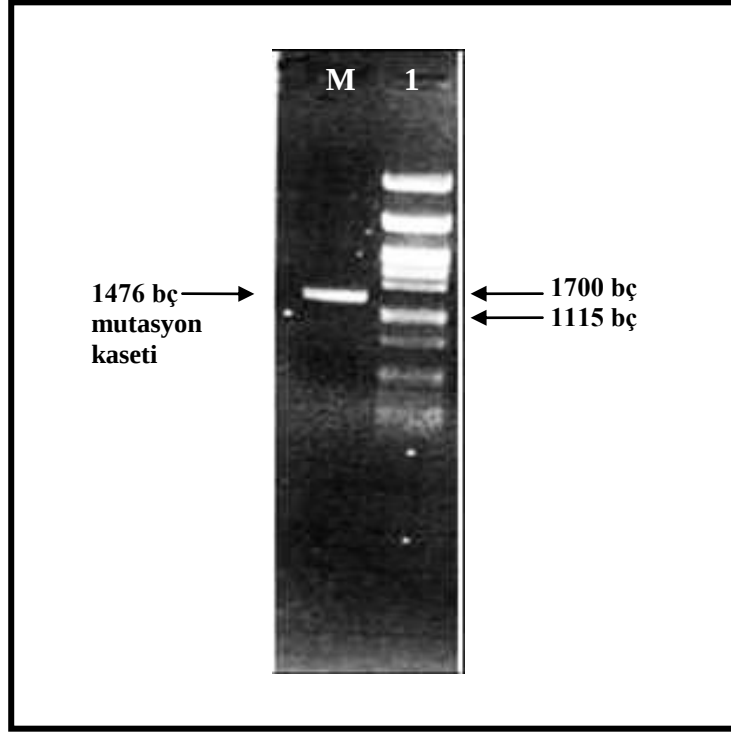
ppk geninin blokasyonu için PCR temelli bir yöntem (Gust ve ark., 2003) ile apramisin direnç geninin *S. coelicolor ppk* geninin yerini alması sağlanmıştır.

Mutasyon kasetinin hazırlanması için, PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan 1398 bp'lik apramisin kaseti, pIJ773 plazmidinden *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek (Şekil 3.1.A) jelden izole edilmiştir (Şekil 3.1.B).



Şekil 3.1. 1398 bp'lik apramisin kasetinin hazırlanması. **A.** M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); 1: *EcoRI-HindIII* endonükleazlar ile kesilen pIJ773 plazmidinin agaroz jel görüntüsü. **B.** M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 1398 bp'lik apramisin kaseti.

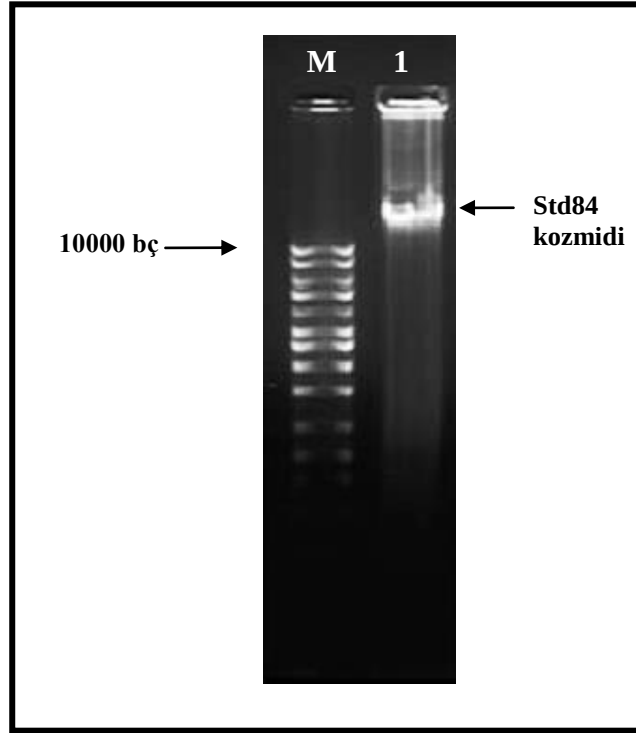
Apramisin kasetinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1476 bp'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. M: Lambda DNA/*Pst*I belirteci (Fermentas); 1: 1476 bç'lik mutasyon kaseti.

3.2. *E. coli* BW25113/ pIJ790'nın Std84 Kozmidi ile Transformasyonu

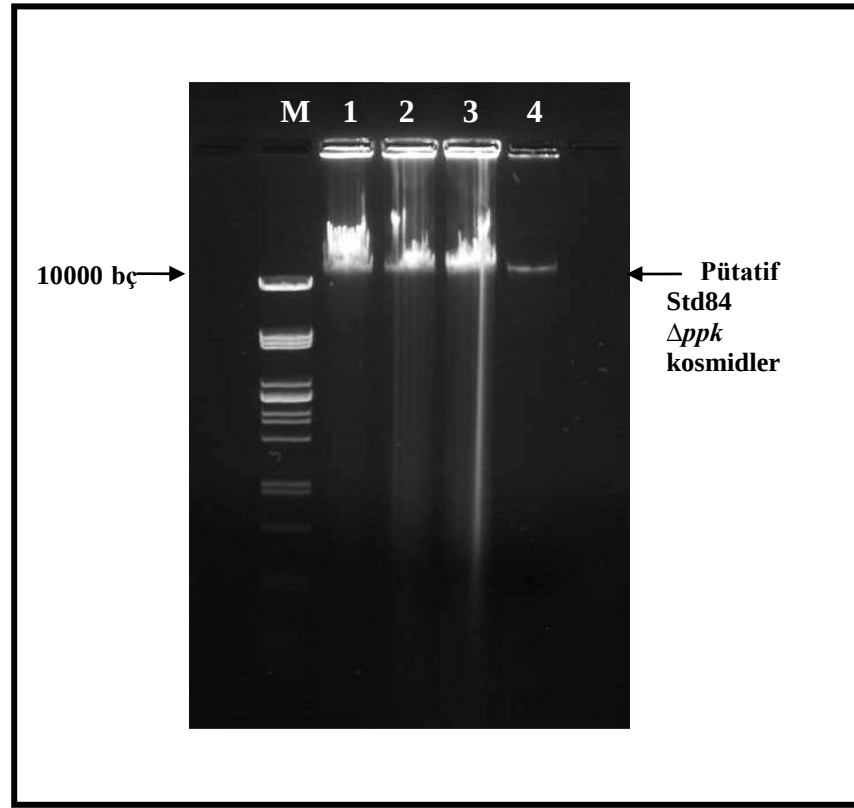
Üzerinde *ppk* geni bulunan Std84 kozmidi, *E. coli* BW25113/ pIJ790 hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Ampisilin ve kanamisine dirençli transformanlardan herhangi bir tanesi seçilerek kozmit izole edilmiştir (Şekil 3.3).



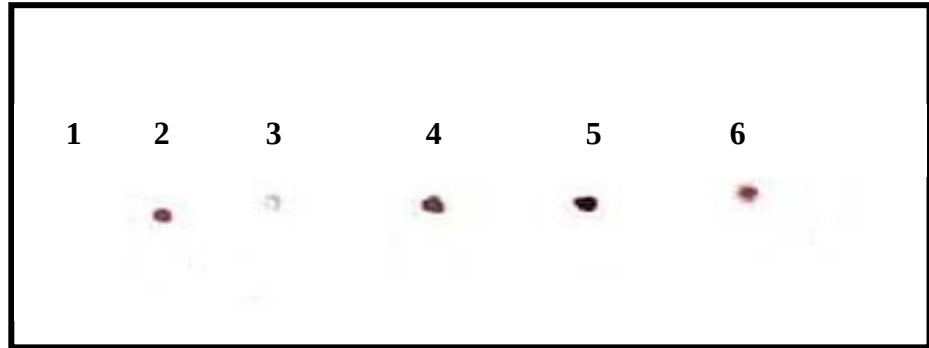
Şekil 3.3. *E. coli* BW25113 hücrelerinden izole edilen Std84 kozmidi. M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron), 1: Std84 kozmidi.

3.3. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini Taşıyan *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılarak mutant kozmidin oluşturulması

Std84 kozmidini taşıyan *E. coli* BW25113 kompetan hücrelerine *ppk* geninin alt ve üst bölgeleriyle uyumlu 1476 bç'lik mutasyon kaseti transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. pIJ790 plazmidi, *E. coli* BW25113 içerisinde mutasyon kaseti ile plazmid arasında çift rekombinasyon (double cross-over) olayının gerçekleşmesini sağlayarak antibiyotik direnç geni *S. coelicolor ppk* geninin yerini almıştır. Bu şekilde olası *ppk* geninden yoksun Std84 kozmidler (Δppk) elde edilmiştir. Transforman hücrelerden Std84 Δppk kozmidi izole edilmiş (Şekil 3.4.A) ve mutant kozmidlerin varlığı *ppk* probunun kullanıldığı hibridizasyon deneyi ile doğrulanmıştır (Şekil 3.4.B). İzole edilen olası Std84 Δppk kozmit DNA'ları arasından *ppk* probu ile eşleşmeyen 1 numaralı kozmit sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.



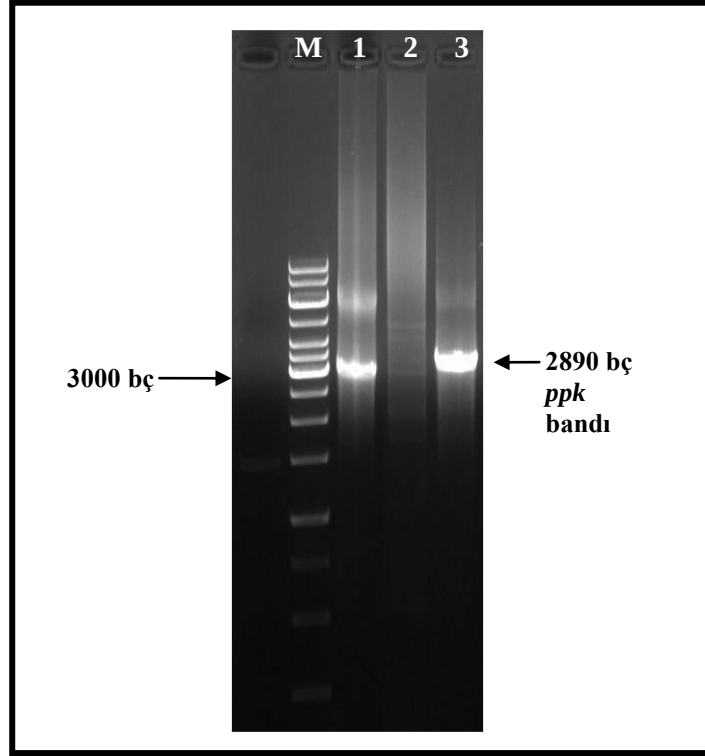
A.



B.

Şekil 3.4. Std84 mutant kozmidin oluşturulması **A.** M: Lambda DNA/PstI belirteci (Fermentas); Pütatif Std84 Δppk kozmidleri. **B.** Std84 Δppk kozmidinin *ppk* probu ile hibridizasyonu sonucunda tespit edilmesi. 1: (-) Kontrol olarak kullanılan pBlueskript plazmidi; 2: (+) Kontrol olarak kullanılan Std84 kozmid; 3: Pütatif kozmit 1; 4: Pütatif kozmit 2; 5: Pütatif kozmit 3; 6: Pütatif kozmit 4.

ppk geninden yoksun kozmidin doğruluğu, *ppk* genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR ile de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak *ppk* geninin klonlandığı pBluescript plazmidi (pSK+*ppk*) ile orjinal Std84 kozmidinin kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda, sadece mutant kozmidde, *ppk* genine özgül 2890 bç'lik DNA fragmanı gözlenmemiştir (Şekil 3.5).

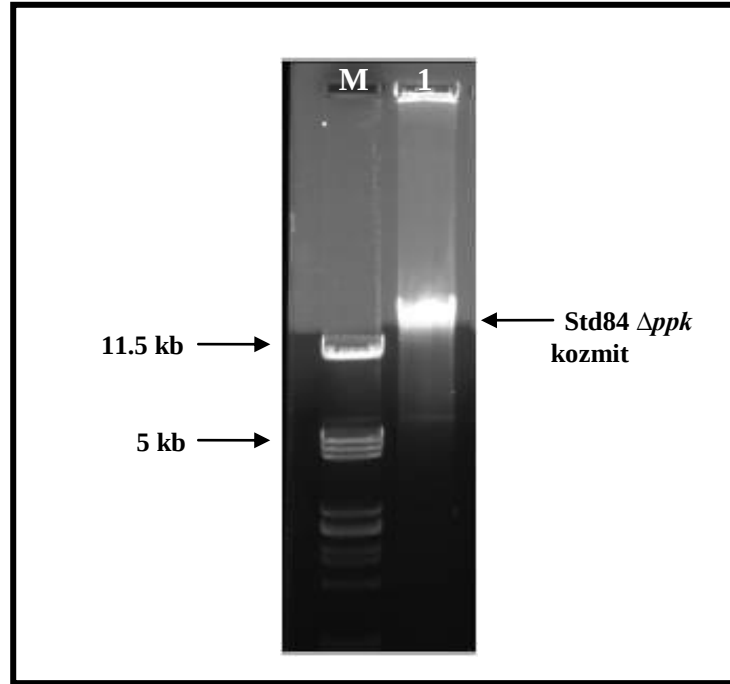


Şekil 3.5. Std84 Δppk kozmidinin doğruluğunun PCR ile ispatlanması. M: 1 kb DNA belirteci (Fermentas); 1: Std84 kozmidinin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu; 2: Std84 Δppk kozmidinin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu; 3: pSK+*ppk* plazmidinin kullanıldığı reaksiyon sonucu.

3.4. Mutant kozmidin metilasyon sistemi olmayan *E. coli* 12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılması

S. coelicolor'ın çok güçlü bir metil spesifik restriksiyon sistemi bulunduğundan, oluşturulan mutant kozmidin *S. coelicolor*'a aktarılması ancak metilasyon sistemi olmayan *E.coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerinin kullanılmasıyla mümkündür.

Mutant kozmidin *E.coli* ET12567/pUZ8002'e aktarılması aşamasında sorunlar yaşanmıştır. Transformasyon deneylerinde standart kimyasal yöntemlerden (Sambrook ve ark., 1989) bir sonuç elde edilemeyince, elektroporasyon yöntemi (Gust ve ark., 2003) denenmiş ancak tekrarlanan deneylerde olumlu sonuç alınamamıştır. Bu özel *E. coli* hücrelerinde kozmit üzerindeki antibiyotik dirençlilik genlerinin ifadelerinin normalden daha zayıf olduğu tespit edilmiş ve her seferinde tek çeşit antibiyotik yarım dozda uygulanarak mutant kozmidi taşıyan olası *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri elde edilmiştir. Transformanlardan bir tanesi seçilerek metillenmemiş mutant kozmit izole edilmiştir (Şekil 3.6).



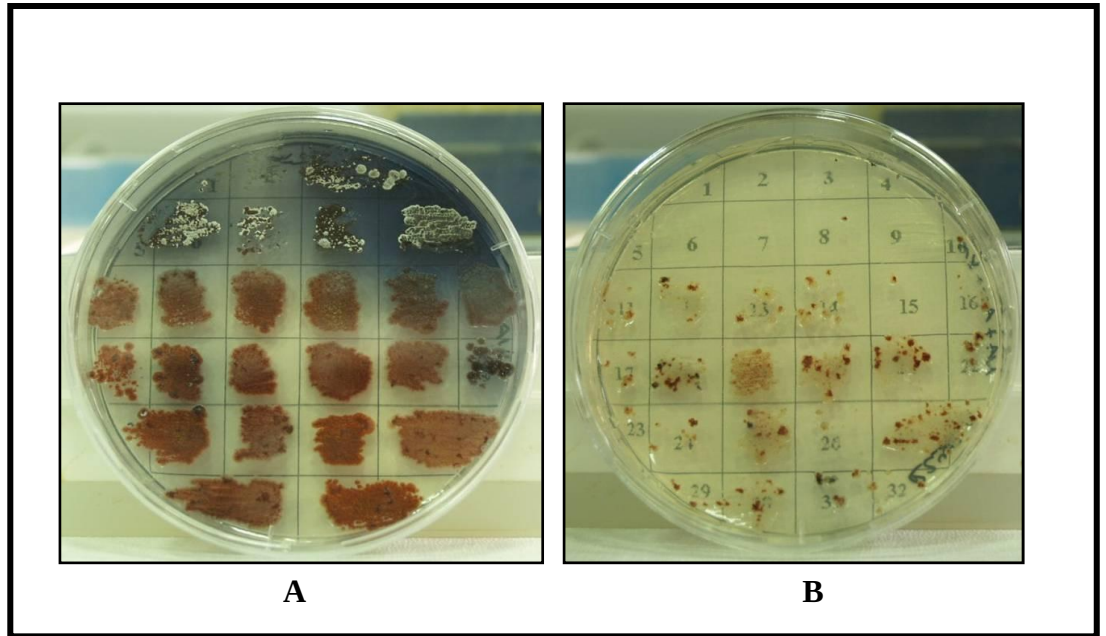
Şekil 3.6. *E. coli* ET12567/pUZ8002 (*dam*⁻ *dcm*⁻) hücrelerinden izole edilen Std84 Δppk kozmidi. M: Lambda DNA/PstI belirteci (Fermentas); 1: Std84 Δppk kozmit.

3.5. Mutant Kozmidin *Streptomyces coelicolor*'a Transferi ve *ppk* mutantlarının taranması

Mutant kozmidi taşıyan *E. coli* ET12567/pUZ8002 ile *S. coelicolor*'ın konjugasyonu gerçekleştirilmiştir (Kieser ve ark., 2000). Değişik koşulların

denendiği farklı konjugasyon deneylerinde, seçici besiyerinde üreyen hiç bir konjugan elde edilememiştir.

Konjugasyon denemelerinden sonuç alınamayınca Std84 Δ *ppk* kozmidi *S. coelicolor*'a protoplast transformasyonu yöntemiyle aktarılmıştır (Hopwood ve ark., 1984). Kozmit, *S. coelicolor* içinde replike olmadığından kromozoma uygun bölgeden tek yönlü rekombinasyonla (single cross over) integre olması beklenmektedir. Bu şekilde oluşan apramisine dirençli transformanlar elde edilmiştir. Transformanların arasından bir tanesi seçilerek antibiyotiksiz R2YE besiyerinde ard arda pasajlanarak çift yönlü rekombinasyona (double cross over) zorlanmıştır. Apramisine dayanıklı kanamisin hassas pütatif *S. coelicolor ppk* mutant suşları taranmıştır. Olası 5 transforman seçilmiştir (Şekil 3.7).

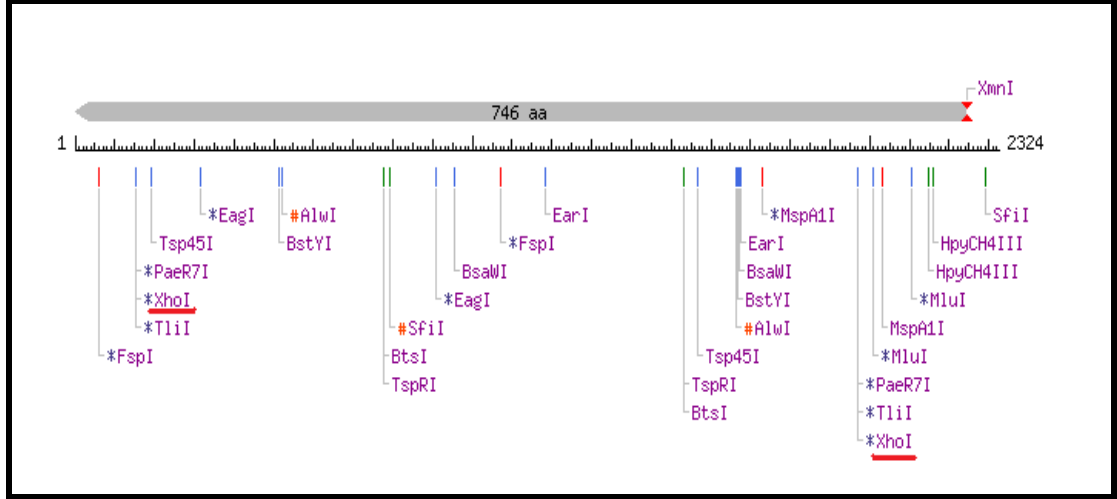


Şekil 3.7. Pütatif *S. coelicolor* Δ *ppk* suşlarının taranması. **A:** Nalidiksik asit ve apramisin içeren R2YE besiyeri üzerindeki hücreler; **B:** Aynı hücrelerin nalidiksik asit, apramisin ve kanamisin içeren R2YE besiyeri üzerindeki üreme durumları.

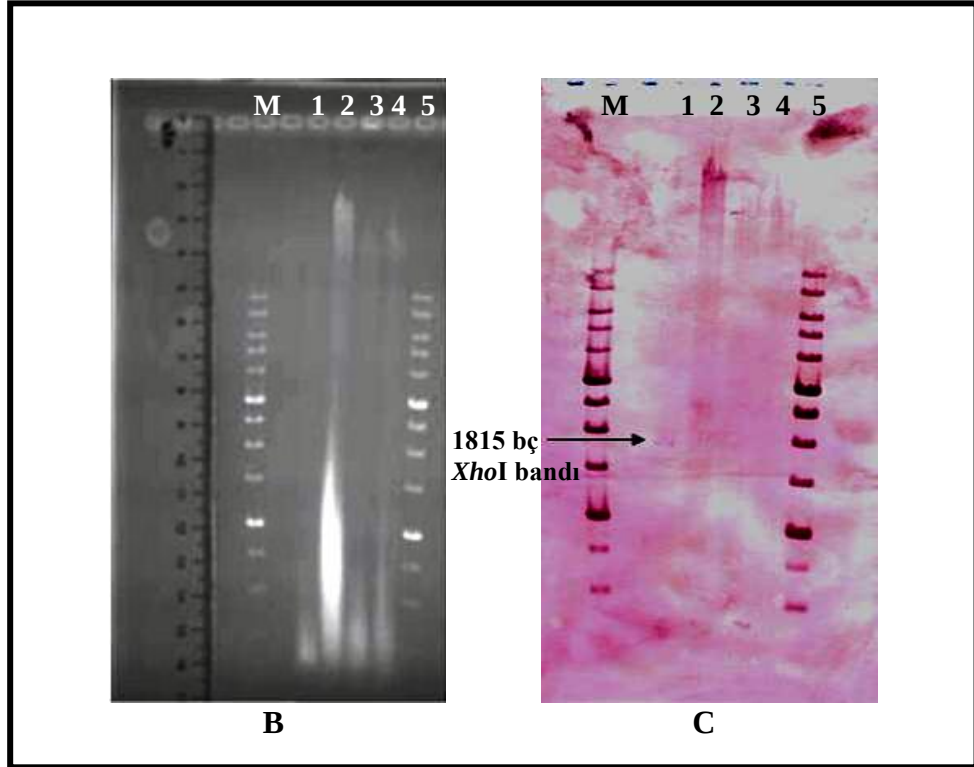
3.6. Mutasyonun Southern Blot ile İspatlanması

Yaban tip *S. coelicolor* ve olası *S. coelicolor* Δ *ppk* suşlarından kromozomal DNA izolasyonu yapılarak, DNA'lar *ppk* geni içinde kesim bölgesi bulunan *Xho*I restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir (Şekil 3.8.A; Şekil 3.8.B).

Kromozomal DNA'lar naylon membrana southern blot yöntemiyle aktarılmıştır. *ppk* probu ile gerçekleştirilen hibridizasyonun sonucunda, yaban suşta 1815 bp'lik DNA bandı görülürken, *ppk* mutantında aynı bant gözlenmemiştir (Şekil 3.8.C).



A

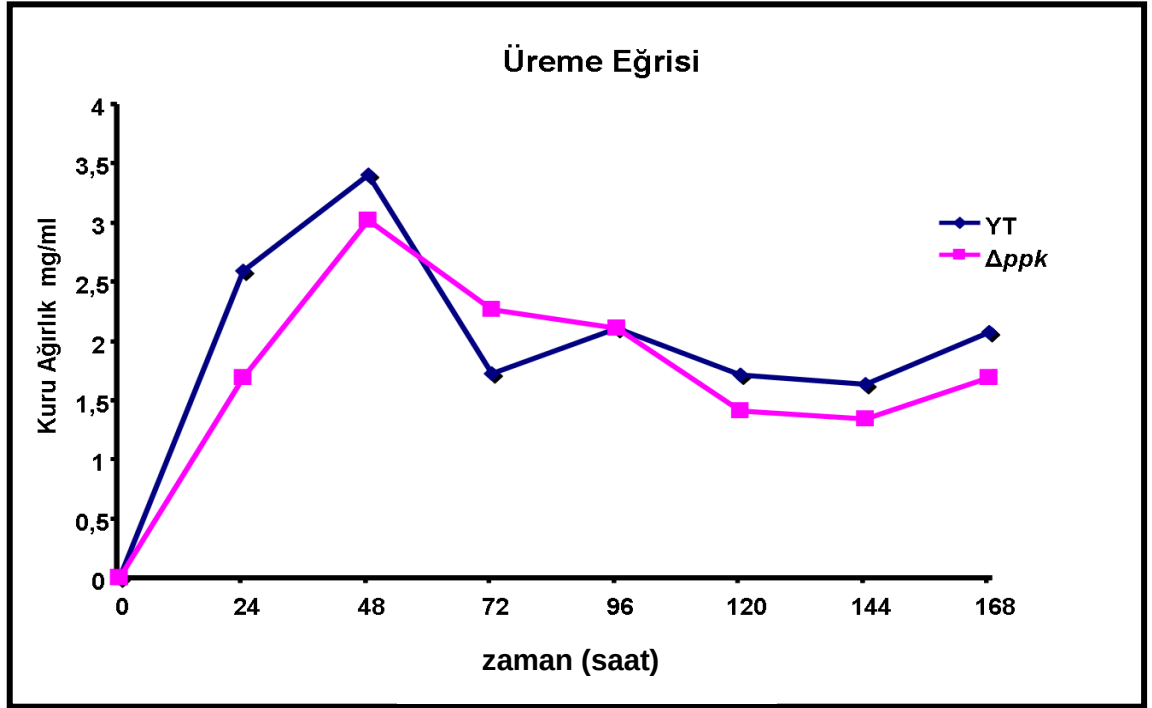


Şekil 3.8. Mutasyonun southern blot ile ispatlanması. **A.** *ppk* geni içindeki *XhoI* enzim kesim bölgeleri. **B.** *XhoI* ile kesilmiş kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüsü. **C.** Southern blot sonucu. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron); 1: *XhoI* ile kesilmiş yaban tip kromozomal DNA'sı; 2,3,4: *XhoI* ile kesilmiş *S. coelicolor* Δppk kromozomal DNA'ları (farklı konsantrasyonlarda); 5: 1 kb DNA belirteci (Bioron)

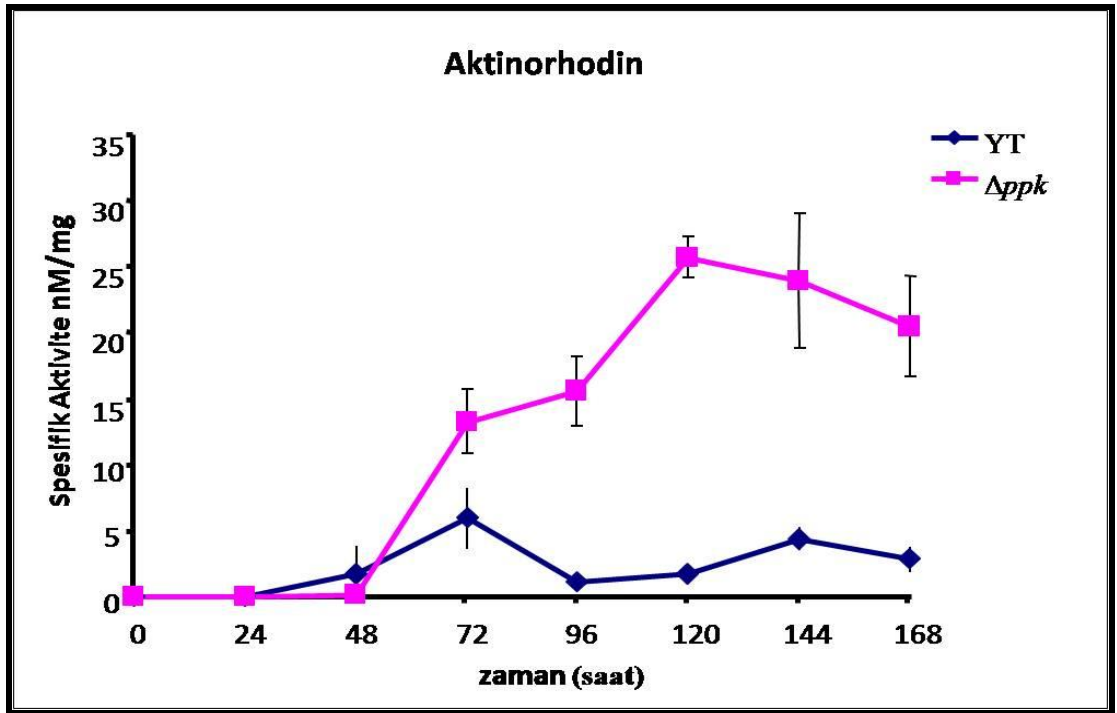
3.7. *S. coelicolor* ve Mutant Suşta Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması

S. coelicolor ve mutant suşların, aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretimleri sıvı R2YE besiyerinde ölçülmüştür. Gerçekleştirilen 168 saatlik fermentasyon sırasında Δppk suşunun bu besiyerindeki üremesinin yaban tip ile hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9). Aktinorhodin üretimi her iki suşta da hücrelerin 48. saatten sonra durağan faza girmesi ile başlamıştır. Yaban suşun aktinorhodin üretimi 72. saatte en yüksek değere ulaşmış ve bu saatten sonra biraz azalarak fermentasyonun sonuna kadar hemen hemen aynı seviyede kalmıştır. Mutant suşun aktinorhodin üretimi ise 72. saatten sonra artarak devam etmiş ve 120. saatte en yüksek değere çıkmıştır. Mutant suşun aktinorhodin üretiminin 120. saatte yaban suşa göre 5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10). Yaban ve mutant suşların aktinorhodin üretim değerleri her saat için “t testi” ile değerlendirilmiştir. Sig. P’nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. Buna göre, yaban ve mutant suşların aktinorhodin üretimleri arasında, 24. ve 48. saatlerde herhangi bir fark bulunmadığı, 72., 96., 120., 144., 168. saatlerde ise aktinorhodin üretim değerleri arasında fark bulunduğu istatistiki verilerle gösterilmiştir (“t testi” sonuçları EK-1’de verilmiştir).

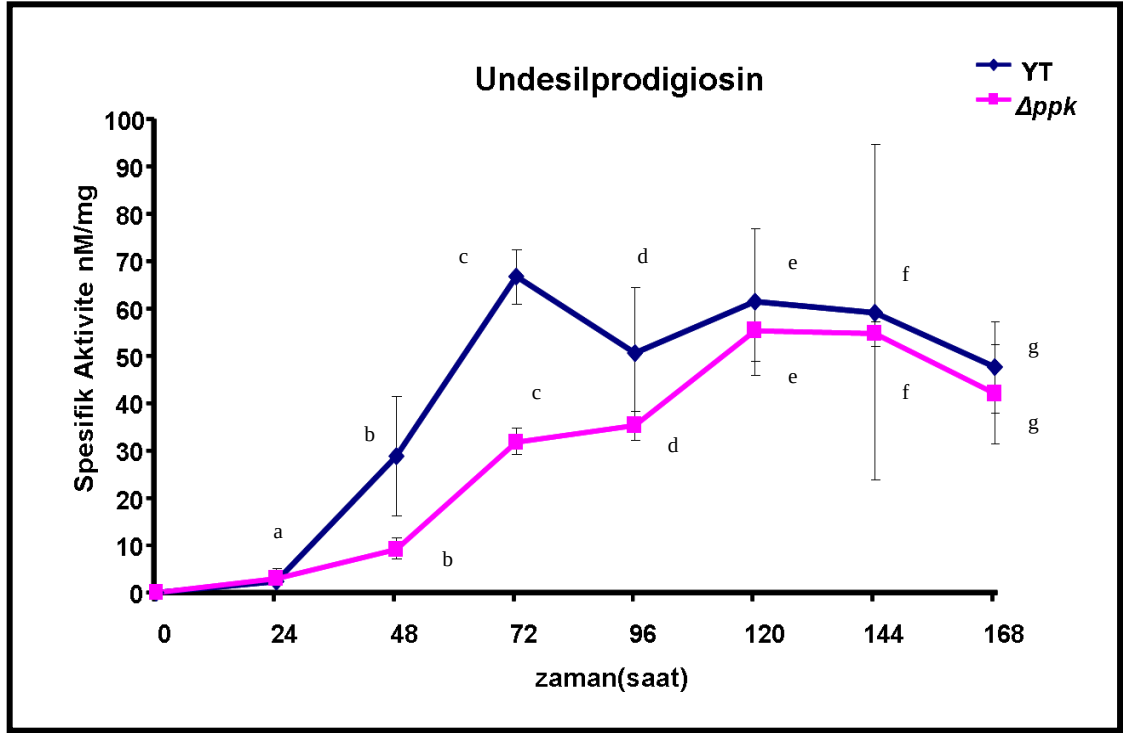
Undesilprodigiosin üretimine bakıldığında ise yaban suş ve mutant suş hemen hemen aynı seviyede antibiyotik üretmişlerdir (Şekil 3.11). Tekrarlanan deneylerde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Yaban ve mutant suşların aktinorhodin üretim değerleri her saat için “t testi” ile değerlendirilmiştir. Bu teste göre, yaban ve mutant suşların undesilprodigiosin üretimleri arasında, 24., 96., 120., 144., 168. saatlerde herhangi bir fark bulunmadığı, 48. ve 72. saatlerde ise antibiyotik üretim değerleri arasında fark bulunduğu istatistiki verilerle gösterilmiştir (“t testi” sonuçları EK-1’de verilmiştir).



Şekil 3.9. *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* Δppk suşlarının üreme eğrisi

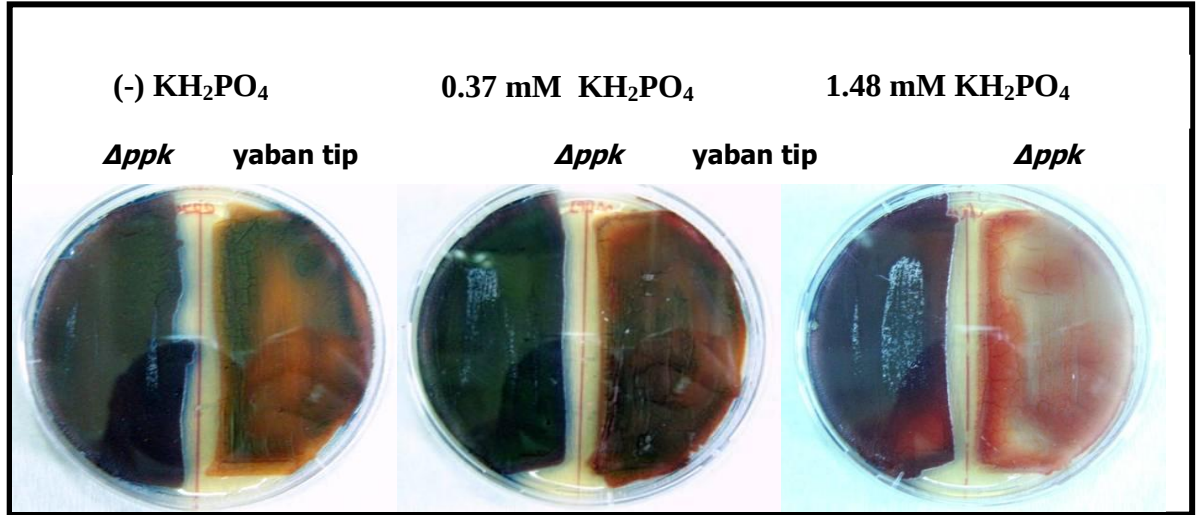


Şekil 3.10. Aktinorhodin spesifik aktivitesi. Yaban ve mutant suşların aktinorhodin üretim değerleri her saat için “t testi” ile değerlendirilmiştir (“t testi” sonuçları EK-1’de verilmiştir).



Şekil 3.11. Undesilprodigiosin spesifik aktivitesi. Yaban ve mutant suşların undesilprodigiosin üretim değerleri her saat için “t testi” ile değerlendirilmiştir (“t testi” sonuçları EK-1’de verilmiştir).

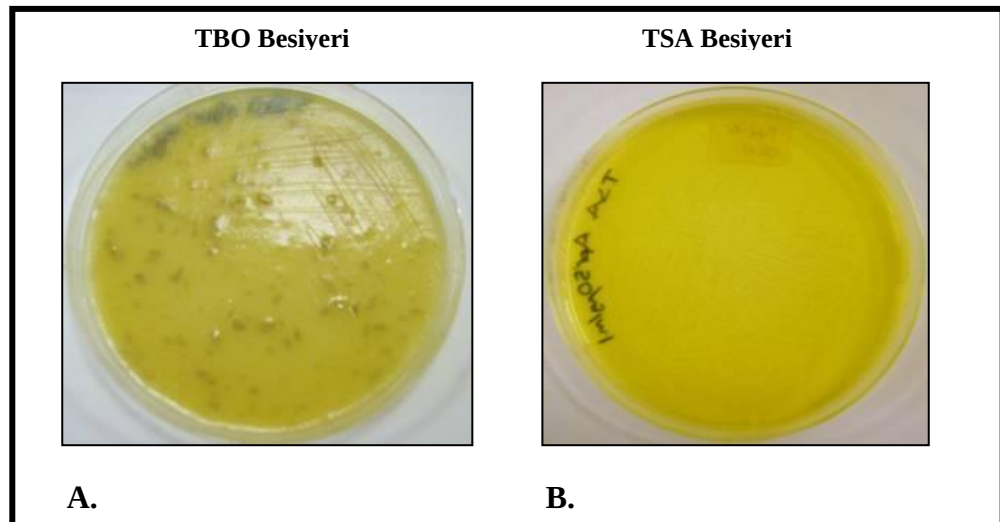
S. coelicolor ve mutant suşların antibiyotik üretimleri, farklı fosfat konsantrasyonları içeren katı R2YE besiyerinde de karşılaştırılmıştır. *Δppk* ve yaban tip suşlar besiyerine eşit miktarda ekilmiştir. Şekil 3.12’de de görüldüğü gibi denenen farklı fosfat konsantrasyonlarının hepsinde *Δppk* suş yaban suşa göre daha fazla antibiyotik üretmiştir.



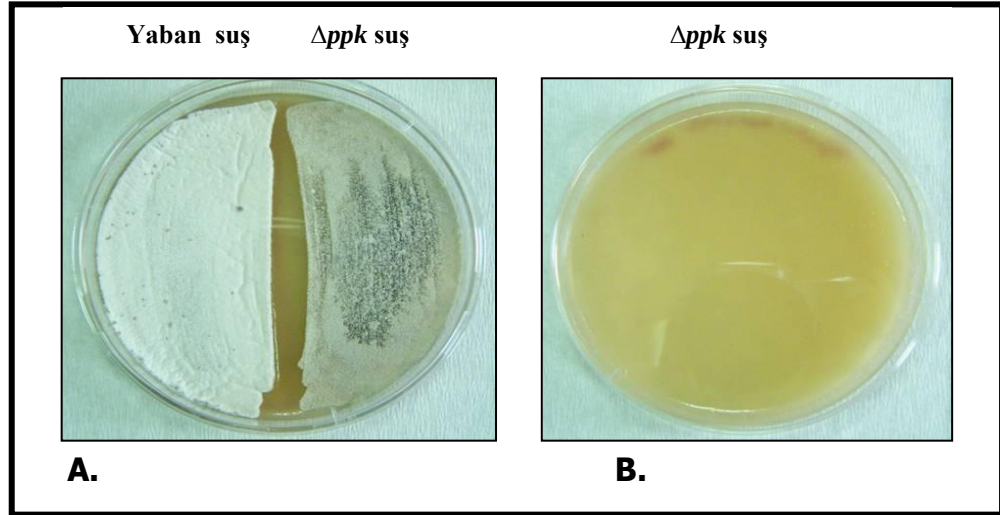
Şekil 3.12. *Δppk* suş ve yaban tipin farklı fosfat konsantrasyonlarında antibiyotik üretimlerinin karşılaştırılması.

3.8. Mutant suşun farklı besiyerlerinde üremesi

R2YE zengin besiyerinde üreyebilen *S. coelicolor* *Δppk* suşunun diğer besiyerlerinde üreyebilme yeteneğine bakılmıştır. Apramisin içeren TSA, TBO ve MS besiyerlerinde *Δppk* suşunun üreyemediği görülmüştür (Şekil 3.13; Şekil 3.14). Aynı besiyerleri antibiyotiksiz kullanıldığında yaban tip normal üreme gösterirken, mutant suşun üremesinde gecikme gözlenmiş ve yaban suşla karşılaştırıldığında etkin spor oluşturmamıştır. Örnek olarak yaban tip ve mutant suşun MS besiyerindeki üremesi gösterilmiştir (Şekil 3.14). Mutant suşun sporlarının germinasyonunda herhangi bir sorun görülmemiştir.



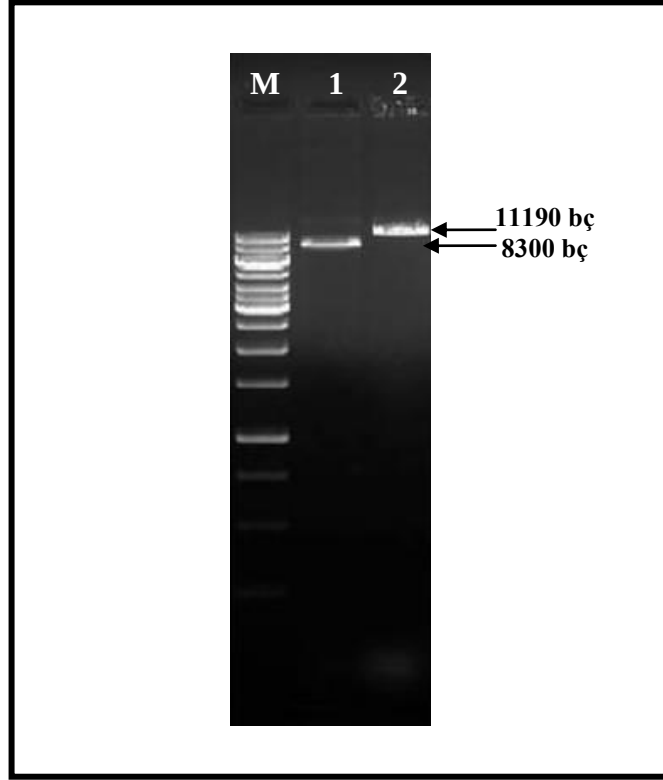
Şekil 3.13. *Δppk* suşunun apramisin içeren TBO (A) ve TSA (B) besiyerlerinde üreme durumu.



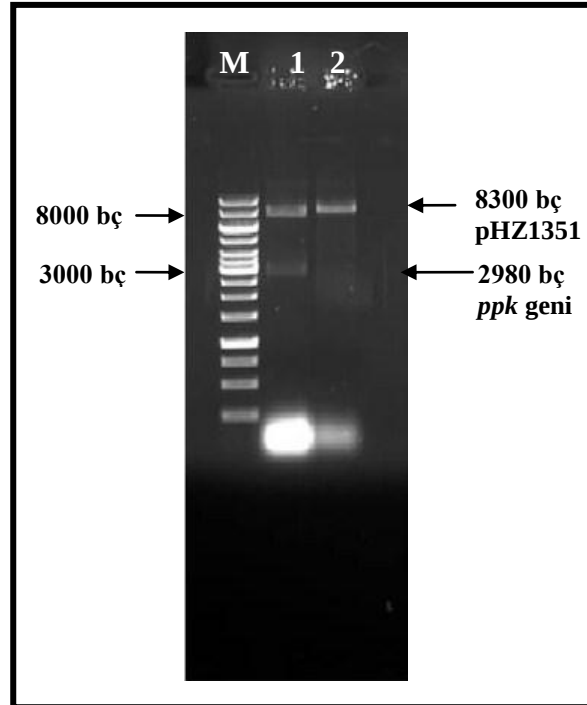
Şekil 3.14. A. Yaban ve mutant suşların MS besiyerindeki üreme durumları. B. Δppk suşunun apramisin içeren MS besiyerlerinde üreme durumu.

3.9. Mutant Suşun *ppk* Geni ile Komplementasyonu

Mutant suşta, aktinorhodin üretiminde görülen bu artışın, mutasyonun yarattığı polar etkiden değil de *ppk* geninin delesyonundan kaynaklandığını göstermek amacıyla, yaban *ppk* geni pHZ1351 üzerinde *S. coelicolor* Δppk suşuna aktarılmıştır. Negatif kontrol olarak pHZ1351 plazmidi de mutant suşa aktarılmıştır. Tiyostreptona dirençli transformanlar arasından iki tanesinden plazmit izolasyonu yapılmıştır (Şekil 3.15). Plazmidlerin doğruluğu restriksiyon endonükleaz kesimleri ile gösterilmiştir (Şekil 3.16). pHZ1351 ve pHZ1351+*ppk* plazmidleri, *Hind*III ve *Xba*I restriksiyon endonükleazlar ile kesildiğinde *ppk* genine denk gelen 2890 bp'lik fragman sadece pHZ1351+*ppk* plazmidinde görülmüştür .

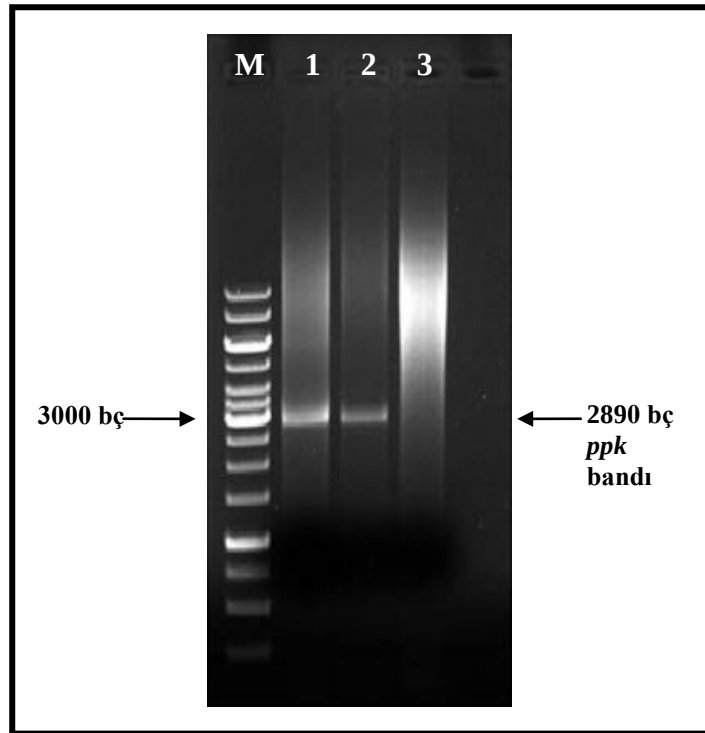


Şekil 3.15. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+*ppk* ve pHZ1351 plazmidleri. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron); 1: pHZ1351 plazmidi, 2: pHZ1351+*ppk* plazmidi.



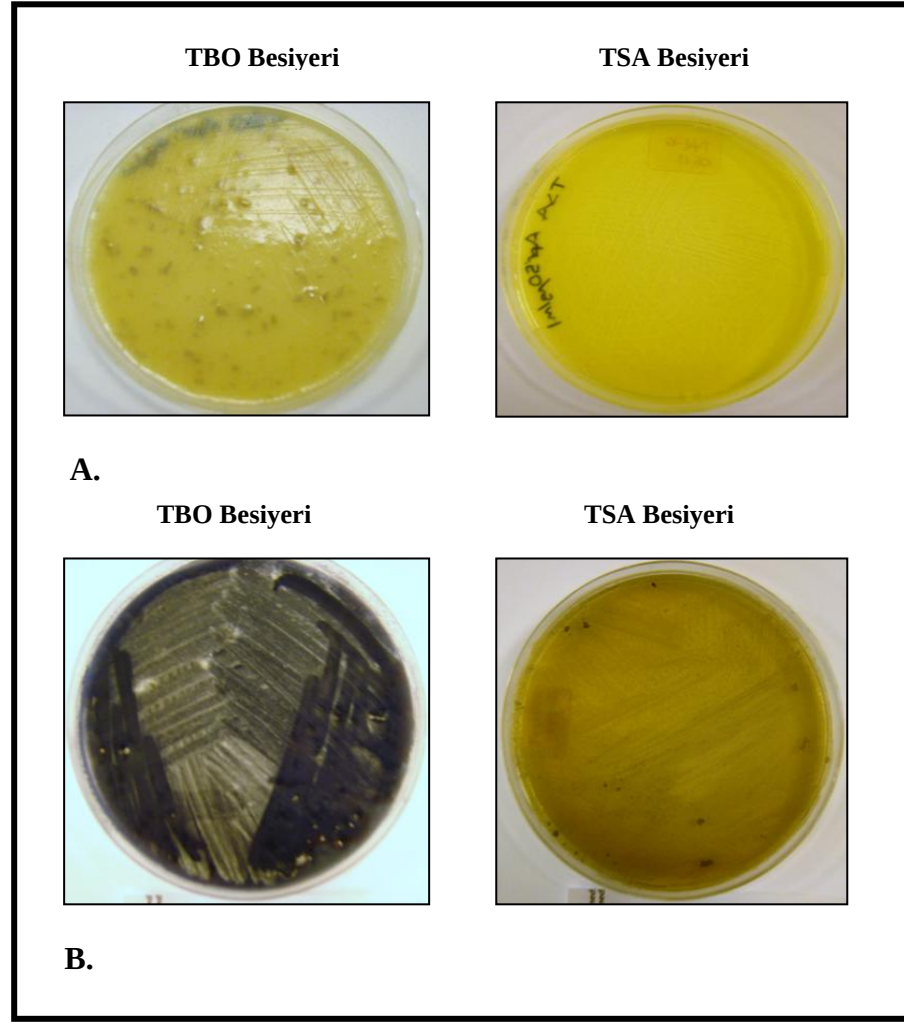
Şekil 3.16. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+*ppk* ve pHZ1351 plazmidlerinin doğrulanması. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron); 1: pHZ1351+*ppk* plazmidinin *XbaI-HindIII* kesimi, 2: pHZ1351 plazmidinin *XbaI-HindIII* kesimi.

S. coelicolor Δppk 'dan izole edilen pHZ1351+*ppk* plazmidinin doğruluğu *ppk* genine uyumlu primerlerin kullanıldığı PCR ile de gösterilmiştir (Şekil 3.17). pHZ1351+*ppk* plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon sonucunda *ppk* genine denk gelen 2890 bç'lik DNA fragmanı elde edilmiştir. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak pSK+*ppk* plazmidi, negatif kontrol olarak da pHZ1351 kullanılmıştır.



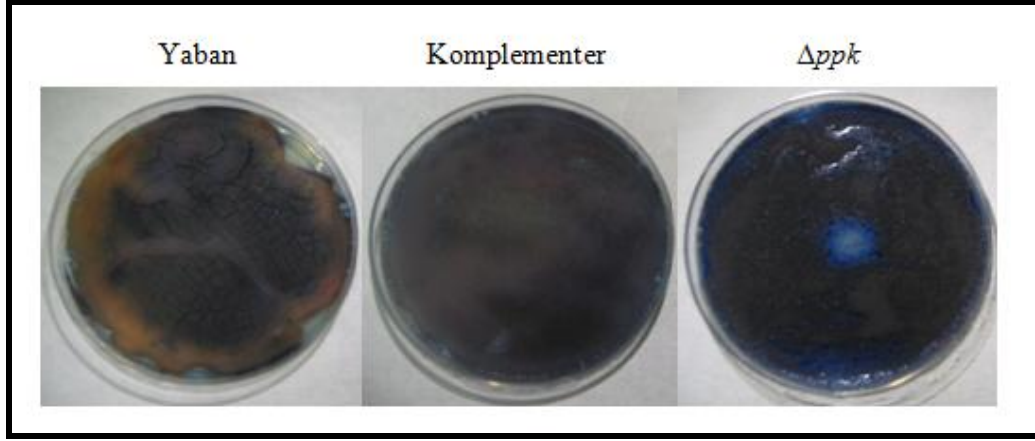
Şekil 3.17. Mutant suştan izole edilen pHZ1351+*ppk* plazmidinin doğruluğunun PCR ile gösterilmesi. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron); 1: pSK+*ppk* plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; 2: pHZ1351+*ppk* plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; 3: pHZ1351 plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu.

S. coelicolor Δppk ve pHZ1351+*ppk* plazmidini taşıyan mutant suşlarının TSA ve TBO katı besiyerlerinde üreme durumları karşılaştırılmıştır. Suşlar, besiyerlerine 10^6 spor olacak şekilde ekilmişlerdir. *S. coelicolor* Δppk suşu apramisin varlığında her iki besiyerinde de üreyememiştir (Şekil 3.18.A). Buna karşılık, pHZ1351+*ppk* plazmidini taşıyan Δppk suş, apramisin içeren TSA ve TBO besiyerlerinde üremiştir (Şekil 3.18.B).



Şekil 3.18. A. Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu. **B.** pHZ1351-ppk plazmidini taşıyan Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu.

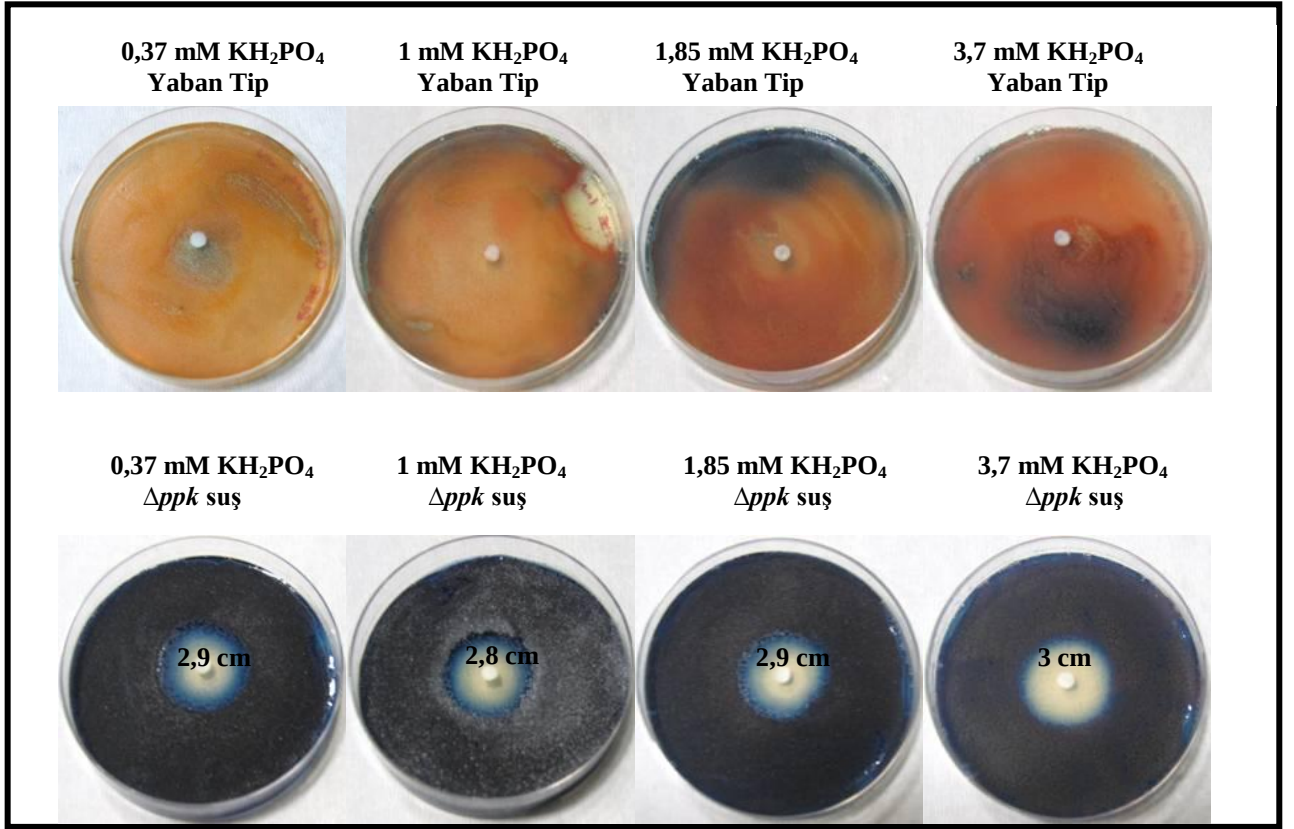
S. coelicolor, *S. coelicolor* Δppk ve pHZ1351+ppk plazmidini taşıyan Δppk suşlarının antibiyotik üretimleri R2YE besiyerinde karşılaştırılmıştır. Şekil 3.19’da görüldüğü gibi, *S. coelicolor* Δppk suşunun antibiyotik üretimi yaban suşa ve pHZ1351+ppk plazmidini taşıyan Δppk suşuna göre oldukça fazladır. ppk geni ile mutasyonu tamamlanan Δppk suşun antibiyotik üretimi gerileyerek yaban suşla hemen hemen aynı seviyeye inmiştir.



Şekil 3.19. *S. coelicolor*, pHZ1351+*ppk* plazmidini taşıyan *Δppk* suşu (Komplementer) ve *S. coelicolor* *Δppk* suşunun antibiyotik üretimlerinin R2YE besiyerinde karşılaştırılması.

3.10. *Δppk* Suş ve Yaban Suşların H₂O₂ Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması

Yaban ve *Δppk* suşlarının, oksidatif strese dayanıklılıkları, farklı fosfat konsantrasyonunda hazırlanmış R2YE katı besiyerlerinde karşılaştırılmıştır. Her bir suştan besiyerlerine eşit sayıda spor ekilmiştir. *S. coelicolor* suşu bütün besiyerlerinde H₂O₂ varlığında etkin bir şekilde ürerken, *Δppk* suşu aynı koşullarda H₂O₂'ye hassasiyet göstermiştir (Şekil 3.20). Farklı fosfat konsantrasyonları sonuçları etkilememiştir.



Şekil 3.20 Δppk suş ve yaban suşların R2YE besiyerinde H_2O_2 hassasiyetlerinin karşılaştırılması.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakterilerden yüksek ökaryotlara kadar bir çok canlı, enerjiyi ve fosfatı, fosfat polimerleri halinde depo ederler. Polifosfat (PoliP) olarak adlandırılan ve uzunlukları 750 rezidüye kadar ulaşabilen bu polimerler, *ppk* geninin kodladığı polifosfat kinaz tarafından, ATP'nin kullanılması ile geri dönüşümlü olarak sentezlenmektedir (Akiyama ve ark., 1992). Hücre içinde inorganik fosfat'a (Pi) ihtiyaç olduğunda bu polimerler fosfat kaynağı olarak kullanılırlar (Van Dien ve Keasling, 1999).

PoliP polimerinin, değişik organizmalarda fazla miktarda ve farklı lokasyonlarda bulunması, bu molekülün fosfat kaynağı olması dışında başka bir çok görevi olduğunu düşündürmektedir. Birçok çalışmada, polifosfat kinazın ve bu enzim tarafından sentezlenen polifosfatların, enzim aktivitelerini düzenleme ve çok sayıda genin kontrolünde görev alma gibi önemli fonksiyonları yerine getirerek, bakterilerin aktif büyüme fazından durağan faza geçişinde, ayrıca durağan fazda ve stres koşullarında yaşamlarını devam ettirebilmelerinde önemli role sahip oldukları gösterilmiştir (Kornberg ve ark., 1999). PoliP'ler aynı zamanda, mikroorganizmalarda, biyofilm oluşumu, hareketlilik, ağır metal detoksifikasyonu, fosfat biyoremediasyonu ve patojen bakterilerin virülans özelliklerinin korunması için de çok önemlidir.

Streptomyces 'ler, ticari antibiyotiklerin % 75'i de dahil olmak üzere çok sayıda biyoaktif metabolit sentezleme kapasitesine sahip olmaları dolayısıyla biyoteknolojik açıdan çok önemli olmalarına rağmen, literatürde, *Streptomyces* 'lerin poliP metabolizması ve bu polimerin antibiyotik üretimiyle nasıl bir bağlantısı olduğu konularında bilginiz dahilinde sadece 2 yayın bulunmaktadır. *S. lividans* ile aynı grup tarafından yapılmış bu çalışmalarda, polifosfat kinaz'ı kodlayan *ppk* geninin bloke edilmesi, antibiyotik biyosentezinde artışa sebep olmuştur (Chouayekh ve Virolle, 2002; Ghorbel ve ark., 2006). *ppk* geninin *S. lividans*'ta antibiyotik biyosentezine negatif etkisinin bütün *Streptomyces* türleri için genel bir etki olup olmadığı bilinmemektedir. PoliP polimerinin önemi son yıllarda ortaya çıkmaya başladığından literatürde bu polimer ile ilgili bilimsel boşluk vardır.

Bu çalışma, *ppk* geninin ürününün *S. lividans*'da antibiyotik biyosentezine negatif etkisinin *Streptomyces coelicolor* türü için de geçerli olduğunu gösteren bulguları içermektedir. *S. coelicolor*'ın *ppk* geni, Std84 kozmidi kullanılarak PCR

temelli bir yöntem ile bloke edilmiş ve polar etki yaratmayacak olan bu mutasyonun PCR ve ‘Southern hibridizasyon yöntemi’ ile doğrulanmasının ardından antibiyotik üretimine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan PCR bazlı yöntem daha önce de birçok çalışmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Tunca ve ark., 2007; Mendes ve ark., 2007; Lu ve ark., 2007)

Mutasyonun oluşturulması için öncelikle, kozmit üzerinde bulunan *S. coelicolor ppk* geninin, başlangıç ve bitiş bölgesinde bulunan nükleotidler ile homoloji gösteren primerler kullanılarak PCR ile elde edilen seçici kaset (apramisin kaseti) ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. Rekombinasyon olayı, λ RED (*gam*, *bet*, *ex*) rekombinasyon plazmidi pIJ790’nın (Datsenko ve Wanner 2000) kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada seçici kaset olarak, pIJ773 plazmidinde bulunan apramisin kaseti kullanılarak *ppk* geninden yoksun Std84 kozmidi elde edilmiştir.

S. coelicolor’ın güçlü bir metil-spesifik restriksiyon sistemi bulunmaktadır. Elde edilen mutant kozmidin *S. coelicolor*’a transferi ancak DNA metilasyon sisteminden yoksun bir ara konakçı (*E. coli* ET12567) sayesinde mümkün olacağından, bu aşamada pUZ8002 plazmidini taşıyan *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılmıştır. pUZ8002 plazmidi, *E. coli* hücreleriyle *Streptomyces* hücreleri arasında konjugasyon olayını mümkün kılmaktadır. Bu aşamada, kozmit üzerindeki antibiyotik dirençlilik genlerinin bu özel *E. coli* hücrelerinde normalden daha zayıf ifade edilmesi üst üste alınan negatif sonuçlara sebep olmuş ve bu problem, her seferinde tek çeşit antibiyotiğin yarım dozda kullanılmasıyla çözülmüştür.

Actinomycete’lerde konjugasyon ile gen aktarımı oldukça pratik, az zaman alan, ve en önemlisi güvenilir bir yöntemdir. Ancak tez çalışması sırasında farklı koşullar denendiği halde yöntem çalışmadığından, mutant kozmit *S. coelicolor*’a protoplast transformasyonu ile aktarılmış ve mutant suş Δppk elde edilmiştir.

ppk geninin blokasyonu ile elde edilen *S. coelicolor ppk* mutant (Δppk) suşa aktinorhodin üretiminde, 120. saatte yaban suşa göre yaklaşık 5 kat artış olduğu görülmüştür. Undesilprodigiosin üretimleri karşılaştırıldığında ise yaban suş ve mutant suş hemen hemen aynı seviyede antibiyotik üretmişlerdir. Antibiyotik ölçümlerinin yapıldığı fermentasyonda yaban tip ve mutant suşun üremelerinin benzer olduğu gözlenmiştir.

Chouayekh ve Virolle de 2002 yılında yaptıkları çalışmada, *ppk* genini bloke ederek, katı besiyerinde *S. lividans* TK24'de aktinorhodin biyosentezinde artış görmüşlerdir. Bu çalışmada, *ppk* geninin ürününün antibiyotik üretimi üzerindeki negatif etkisinin, poliP hidroliziyle oluşan hücre içi fosfatın doğrudan yada dolaylı olarak antibiyotik biyosentez yollarında görevli spesifik aktivatörleri kodlayan genlerin represyonu ile gerçekleştiği öne sürülmüştür.

2006 yılında yine aynı grup (Ghorbel ve ark., 2006), *Streptomyces* türlerinde antibiyotik biyosentezinin hücrenin enerji dengesine göre tetiklendiğini öne süren bir hipotez geliştirmişlerdir. Pi kıtlığı durumunda, *ppk* mutant hücrelerde PoliP rezervlerinin ATP sentezi için kullanılamaması nedeni ile önemli oranda bir enerji eksikliği olduğu ve bu enerji açığını kapatmak için hücrelerin ATP yapımında görevli olan diğer bütün merkezi metabolik yolları güçlü bir şekilde aktive ettiği ileri sürülmüştür. Bu yolların kullanılması hücrede yüksek düzeyde karbon iskeletleri, indirgenmiş kofaktörler (NADH ve NADPH) ve ATP birikimine neden olacağından, hücrenin durağan faza girmesini takiben, anabolizma için kullanılamayan bu anahtar bileşiklerin antibiyotik biyosentezinde kullanıldığı düşünülmektedir. Pi yokluğunda tüm bu adaptif süreçlerin doğal suşta da gerçekleştiği ancak *ppk* mutant suşta bu süreçlerin oldukça yüksek seviyede olduğu öne sürülmüştür.

Bu çalışmada, *ppk* mutant suşta undesilprodigiosin üretiminde yaban suşa göre artış görülmemesi yine Chouayekh ve Virolle'ün (2002) sonuçlarıyla örtüşmektedir. *act* (aktinorhodin) ve *red* (undesilprodigiosin) genlerinin ifadesi sırasıyla SARP grubuna ait olan ActII-ORF4 ve RedD spesifik transkripsiyonel aktivatörlerle düzenlenir (Martínez-Hackert ve Stock, 1997; Mizuno ve Tanaka, 1997; Santamarta ve ark., 2002). Chouayekh ve Virolle (2002) çalışmalarında fosfat kıtlığı durumunda *actII-ORF4* geninin ifadesinin arttığını, *redD* geninin ifadesinde ise herhangi bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Act biyosentezinin aksine Red biyosentezi fosfat ile düzenlenmemektedir. Act ve Red biyosentezlerinin farklı besin kaynakları ile farklı şekilde düzenlendiği daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir (Kang ve ark., 1998).

Yaban ve mutant suşların üremeleri farklı besiyerlerinde karşılaştırıldığında, mutant suşun, yaban suşa göre üremesinde gecikme gözlenmiş ve etkin spor oluşturmadağı görülmüştür. Antibiyotikli zengin besiyerinde üreyebilen mutant suş antibiyotik içeren TBO, TSA ve MS besiyerlerinde üreyememiş, aynı besiyerleri

antibiyotiksiz hazırlandığında ise zayıf bir üreme gözlenmiştir. Bu sonuçlar, konjugasyon deneyinin neden başarılı olmadığını açıklamaktadır. Çünkü deney sonrasında, hücreler seçici MS besiyerine ekilerek konjuganların üremesi beklenmiştir. Pi kıtlığı yüzünden PoliP rezervlerinin ATP sentezi için kullanılamaması nedeni ile mutant suşun önemli oranda enerji eksikliği çekerek sadece zengin besiyerinde üreyebildiği düşünülmektedir.

Yaban ve mutant suşların antibiyotik üretimleri zengin katı besiyerinde de karşılaştırılmış ve test edilen farklı fosfat konsantrasyonlarının hepsinde mutant suşun yabana göre daha fazla antibiyotik ürettiği gözlenmiştir.

Mutant suşun bu karakteristik özelliklerinin, mutasyonun yarattığı polar bir etkiden değil de *ppk* geninin delesyonundan kaynaklandığını göstermek amacıyla *S. coelicolor* Δppk suşunda mutasyonun komplementasyonu yapılmıştır. Komplementasyon, pHZ1351+*ppk* plazmidinin mutant suşa aktarılmasıyla gerçekleştirilmiş ve bu yeni suшта antibiyotik üretiminin yaban suştaki normal seviyeye indiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, yaban ve Δppk suşlarının oksidatif strese karşı hassasiyetleri karşılaştırılmış ve sadece Δppk suşunun H_2O_2 'ye hassasiyet gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuç, Ghorbel ve arkadaşlarının (2006), *S. lividans* *ppk* mutantının yaban suşa göre H_2O_2 'ye karşı hassasiyet gösterdiğini belirten çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Çalışmalarında, Ghorbel ve arkadaşları (2006) mutant suşlarda oksidatif strese karşı meydana gelen bu hassasiyeti şu şekilde açıklamışlardır; *ppk* mutant suşda, *phoR* ve *phoP* genlerinin dolayısıyla *pho* regülonunda bulunan genlerin ifadeleri güçlü bir şekilde uyarılarak aktif metabolizma için gerekli olan Pi alımı artmaktadır. Merkezi metabolik yolların uyarılması sonucunda da indirgenmiş kofaktörlerin üretimi artmaktadır. Bu indirgenmiş kofaktörlerin üretimi, solunum zincirinin oksidatif kapasitesini aştığında, reaktif oksijen türleri (H_2O_2 , O_2^- ve OH^-) hücre içinde birikerek oksidatif stres oluşturmaktadır. *ppk* mutant suşda, bu reaktif serbest radikallerin hücre içinde birikmesi oksidatif strese karşı hassasiyeti açıklamaktadır.

Kısaca, bu tez çalışmasında, *ppk* geninden yoksun *S. coelicolor* mutant suşu (Δppk) oluşturulmuş ve bu suşun antibiyotik (aktinorhodin ve undesilprodigiosin) üretimi yaban suş ile karşılaştırılmıştır. Yaban ve mutant suşun undesilprodigiosin

retimlerinde bir fark görülmezken, mutant suşun aktinorhodin üretiminin, 120. saatte yaban suşu göre yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, mutasyonun komplementasyonu, çok kopyalı bir mekik vektörü olan pHZ1351 üzerine klonlanmış yaban *ppk* geni ile gerçekleştirilmiştir.

5.KAYNAKLAR

1. **Ahn, K., Kornberg, A.** (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265:11734–39
2. **Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A.** (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*: isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267:22556–61
3. **Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A.** (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*: the enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633–39
4. **Asturias, J. A., Liras, P., Martín, J. F.** (1990). Phosphate control of *pabS* gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene* **93**:79–84.
5. **Asturias, J.A., Liras, P., Martín, J.F.** (1990) Phosphate control of *pabS* gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene* 93(1):79-84.
6. **Belozerky, A.N.** (1958). The formation and function of polyphosphates in the development processes of some lower organisms. *Int. Biochim. Congr., 4th, Vienna*, pp. 3–12
7. **Bentley, S. D., Chater, K. F.** (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) , *Nature*. 417,
8. **Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Haris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. ve Hopwood, D.A.** (2002), “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2),” *Nature*, 417, 141-147.

9. **Blum, E., Py, B., Carpousis, A. J., Higgins, C. F.** (1997). Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* 26:387–98
10. **Brockman, H., Hieronimus, E.** (1955), “Über Actinomycetenfarbstoffe 8. die constitution des Actinorhodins,” *III. Mitteil. Chem. Ber.*, 88, 1379-1390.
11. **Brown, M.R.W., Kornberg, A.** (2008) The long and short of it-polyphosphate, PPK and bacterial survival, *Trends in Biochemical Sciences*,
12. **Chater, K.F.** (2001), “Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) a checkpoint multiplex?,” *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 667-673.
13. **Chater, K.F., Chandra, G.** (2006), “The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons,” *FEMS Microbiol. Rev.*, 30(5), 651-72.
14. **Chouyekh H, Virolle M.J.,** (2002). The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibioic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43: 919-30
15. **Chouyekh, H., Virolle, M.J.** (2002) The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibioic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43: 919-30
16. **Concar D. W., Whitford, D., Williams., R. J. P.** (1991) The location of the polyphosphate-binding sites on cytochrome c measured by NMR paramagnetic difference spectroscopy; *Eur. J. Biochem.* 199. 569-574
17. **Cornelus, F. C., Bonting, G., Kortsee, J. J., Zehnder, J. B.** (1991) Properties of Polyphosphate:AMP Phosphotransferase of Acinetobacter Strain 210A *J Bacteriol.* 173(20): 6484-6488
18. **Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N.N., Kornberg, A.** (1994). Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269:6290–95

19. **Dekeva, M.L., Titus, J.A., Strohl, W.R.** (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can J Microbiol.* 31(3):287-94.
20. **Demain, A. L.** (1963). Synthesis of cephalosporin C by resting cells of *Cephalosporium* sp. *Clin.Med.* 70:2045-2051.
21. **Durr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J., Nagy, M.** (1979). Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 121:169–75
22. **Embley, T.M. ve Stackebrandt, E.** (1994), “The molecular phylogeny and systematics of the *Actinomycetes*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 257-289.
23. **Fraley, C. D.** (2007).; A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *PNAS*, 104(9): 3526–3531
24. **Galo, M., and E. Katz.** (1972). Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109:659-667.
25. **Galo, M., E. Katz.** (1972). Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109:659-667.
26. **Geissdorfer, W., Ratajczak, G., Hilen, W.** (1998). Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:896–901
27. **Ghorbel, S., Kormanec, J., Artus A., Virolle, M.-J.** (2006) Transcriptional Studies and Regulatory Interactions between the *phoR-phoP* Operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* Genes of *Streptomyces lividans* TK24 *Journal of Bacteriology*, 188(2): 677-686.
28. **Ghorbel, S., Smirnov, A., Chouayekh, H., Sperandio, B., Esnault, C., Kormanec, J., Virolle, M.-J.** (2006). Regulation of *ppk* Expression and In Vivo Function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Bacteriology*. 188(17): 6269-6276.

29. **Gonzalez H, Jensen TE.** (1998). Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 93:179–85
30. **Haneishi, T., Terahara, A., Arai, M., Hata, T. ve Tamura, C.** (1974), “New antibiotics, methylenomycins A&B. 2. structures of methylenomycins A&B,” *J. Antibiot.*, 27, 393-399.
31. **Hardoyo, K., Shinjo, H., Kato, J., Ohtake, H.** (1994). Production and release of polyphosphate by a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3485–90
32. **Harland, G. W., Clark, E. J.** (1988) Biological Aspects of Inorganic Polyphosphates; *Ann. Rev. Biochem.* 57:235-260
33. **Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., Oliver, S.G.** (1989), “Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture,” *App. Microbiol. Biotechnol.* 31, 272-277.
34. **Hodgson, D.A.** (1982), “Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose,” *J. Gen. Microbiol.* 128, 2417-2430.
35. **Hopwood, D.A.** (1999), “Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*,” *Microbiology*, 145, 2183-2202.
36. **Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., et al.** (1985) Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation.
37. **Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. ve Omura, S.** (2003), “Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*,” *Nat. Biotechnol.*, 21, 526-531.
38. **Ischige, K., Kameds, A., Noguchi, T., Shiba, T.** (1998). The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.* 5:157–62
39. **Kaori, T., Masanobu, M., Toshikazu, S.** (2000) Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes; *Biochimica et Biophysica Acta* 1493 73-81

40. **Kato, J., Yamada, K., Muramatsu, A., Ohtake H.** (1993). Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from waste water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3744–49
41. **Keasling, J. D.** (1997) Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann N.Y. Acad.Sci.* 829:242-9.
42. **Keasling, J. D. Hupf, G.A.** (1996) Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* 743-746.
43. **Keasling, J. D., Van Dien, S. J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K.** (2000) Application of Polyphosphate Metabolism to Environmental and Biotechnological Problems, *Biochemistry (Moscow)*, 65(3): 324-331
44. **Keasling, J.D., Bertsch, L., Kornberg, A.**(1993). Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7029–33
45. **Kempter, C., Kaiser, D., Haag, S., Nicholson, G., Gnau, V., Walk, T., Gierling, K.H., Decker, H., Zahner H., Jung, G. ve Metzger, J.W.** (1997), “CDA: calcium dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues,” *Angewandte Chem. Int. English Edi.*, 36, 498-501.
46. **Keyhani, S., Lopez, J.L., Clark, D.S., Keasling, J.D.** (1996). Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios* 88:105–14
47. **Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A.** (2000), “Practical *Streptomyces* genetics,” The John Innes Foundation, Norwich, England.
48. **Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A.** (2000), “Practical *Streptomyces* genetics,” The John Innes Foundation, Norwich, England.
49. **Kim, H.Y., Schlichtman, D., Shankar, S., Xie, Z. D., Chakrabarty, A. M. Kornberg, A.** (1998). Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis

co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.* 27:717–25

50. **Kornberg, A.** (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable, *Journal of Bacteriology*, 491–496

51. **Kornberg, A.** (1995). Inorganic polyphosphate:toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177:491–96

52. **Kornberg, A., Kornberg, S., Simms, E.**(1956). Methaphosphate synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 20:215–27

53. **Kornberg, A., Narayana, N. R., Ault-Riché, D.** (1999); Inorganic Polyphosphate A Molecule Of Many Functions; *Annu. Rev. Biochem.* 68:89–125

54. **Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Rich, D.** (1999).Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.*68:89–125.

55. **Kortstee, G. J. J., Appeldoorn, K. J., Bonting, C. F. C., van Niel, E. W. J., van Veen, H. W.** (2000) Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal; *Biochemistry (Moscow)*, 65(3): 332-34

56. **Kowalczyk, T. H., Phillips, N. F. B.** (2003) Structural analysis of *Escherichia coli* Exopolyphosphatase by *Alvarado, Johnjeff*, Ph.D., Purdue University, 120 pages; AAT 3122815

57. **Kulaev, I. S.** (1979). The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. New York: Wiley.234 pp.

58. **Kulaev, I. S., Kulakovskaya, T..** (2000) Polyphosphate and Phosphate Pump; *Annu. Rev. Microbiol.* 54:709–34

59. **Kulaev, I.S., Vagabov, V.M.** (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv.Microb. Physiol.* 24:83–171

60. **Kumble, K. D., Kornberg, A.** (1996). Endopolyphosphatases for long chain polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol.Chem.* 271:27146–51

61. **Kuroda, A., Kornberg, A.** (1997). Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:439–42

62. **Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., Kornberg, A.** (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:21240–43.
63. **Kusano, S., Ishihama, A.** (1997). Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes Cells* 2:433–41
64. **Lakey, J.H., Lea, E.J., Rudd, B.A., Wright, H.M. ve Hopwood, D.A.** (1983), “A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity,” *J Gen Microbiol.*, 129(12), 3565–3573.
65. **Liras, P., Asturias, J.A., Martín, J. F.** (1990). Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 8(7):184-9.
66. **Lorenzetti, R., Lancini, G.** (1993). Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites.
67. **Lounes, A., A. Lebrihi, C. Benslimane, G. Lefebvre, ve P. Germain.** (1996). Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *Journal of Bacteriology*, 186.16.5197-5201
68. **Martín, J. F., Casqueiro, J., Kosalková, K., Marcos, A. T., Gutiérrez, S.** (1999). Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Annu Rev Microbiol* 1992, 46:461-495
69. **Martin, J.F., Demain, A.L.** (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* 44(2):230-51.
70. **Martínez-Hackert, E., Stock, A. M.** (1997). Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* 269:301–312.
71. **Masuma, R., Tanaka, Y., Tanaka, H., Omura, S.** (1986). Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J Antibiot (Tokyo)*. 39(11):1557-64.

72. **Mc Cormick, J.R., Su, E.P., Driks, A. ve Losick, R.** (1994), “Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene, *ftsZ*,” *Mol. Microbiol.*, 14, 243-254.
73. **Mc Dowall, K., Thamchaipenet, A., Hunter, I. S.** (1999). Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *J. Bacteriol.* 181:3025–3032.
74. **Mc Inerney P., Taeko M., Toshikazu S.** (2006) Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity *in vitro* and *in vivo*; *Molecular Microbiology*. 60, 438–447
75. **Mc Mahon, K. D., Dojka, M. A., Pace, N. R., Jenkins, D. . Keasling, J. D.** (2002). Polyphosphate Kinase from Activated Sludge Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 4971-4978
76. **Mc Mahon, K. D., Dojka, M. A., Pace, N. R., Jenkins, D., Keasling, J. D.** (2002). Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4971–4978.
77. **McCarthy, A.J., Williams, S.T.** (1992), “*Actinomycetes* as agents of biodegradation in the environmental,” *A Review, Gene*, **115**, 189-192.
78. **Mizuno, T., and I. Tanaka.** (1997). Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol. Microbiol.* 24:665–667.
79. **Murata, K., Kato, J., Chibata, I.** (1979). Continuous production of NADP by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 21:887–95
80. **Nesmeyanova, M.A., Dmitriev, A.D., Kulaev, S.** (1974). Regulation of enzymes of phosphate metabolism and polyP level by exogenous orthophosphate in *E. coli* K-12. *Microbiologia* 43:227–32
81. **Noguchi, T., Shiba, T.** (1998). Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1594–96

82. **Ogawa, N., Tzeng, C.M., Fraley, C.D. and Kornberg, A.** (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182:6687–93
83. **Prágai, Z., Harwood, C.R.** (2002) Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*.148(Pt 5):1593-602.
84. **Rangarajan, E.S., Nadeau, G., Y., Li, Wagner, J. and Hung M.N.** (2006). The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J.Mol. Biol.* 359:1249–60
85. **Rao, N.N. and Kornberg A.** (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationaryphase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:1394–400.
86. **Rashid, M., Rao, N. N., Kornberg, A.** (2000) Inorganic Polyphosphate Is Required for Motility of Bacterial Pathogens. *Journal of Bacteriology* 225-227.
87. **Reusch, R. N., Sadoff, H. L.** (1988) Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate-calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 4176-4180,
88. **Robinson, N.A, Clark, J.E. Wood, H.G.** (1987). Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that polyphosphates are primers and determination of the size of the synthesized polyphosphate. *J Biol Chem.* 262(11):5216-22.
89. **Rudd, B.A.M., Hopwood, D.A.** (1980), “A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster,” *J. Gen. Microbiol.*, 119, 333-340.
90. **Sambrook J., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual.
91. **Scoarughi, G.L., Cimmino, C., Donini, P.** (1999) *Helicobacter pylori*: a eubacterium lacking the stringent response. *J. Bacteriol.* 181:552–55

92. **Shi, X., Rao, N. N., Kornberg, A.** (2004) Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:17061–65
93. **Shi, X., Kornberg, A.** (2005) Endopolyphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates. *FEBS letter*. 579(9): 2014-8.
94. **Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A.** (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of RPOS expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11210–15
95. **Sola-Landa, A., Moura, R. S., Martin, J. F.** (2002) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Pnas*, 6133–6138.
96. **Soltero, F. V., and M. J. Johnson.** (1953). Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. *Appl. Microbiol.* 1:52-57.
97. **T. Shiba, K Tsutsumi, H Yano, Y Ihara, A Kameda, K Tanaka, H Takahashi, M Munekata, N N Rao, A Kornberg** Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proc Natl. Acad.* 11210-5
98. **Tinsley, C. R., Manjula, B. N., Gotschlich, E. C.**(1993). Purification and characterization of polyphosphate kinase from *Neisseria meningitidis*; *Infect Immun.* 61(9): 3703–3710.
99. **Tinsley, C.R., Gotschlich, E.C.** (1995). Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutant. *Infect. Immun.* 63:1624– 30
100. **Torriani-Gorini.** (1994). A. *Phosphate in Microorganisms*. Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S. , editors. Washington, DC: *Am. Soc. Microbiol.*; 1–4.
101. **Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J., Martin, J. F.** (2006) Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces*

coelicolor is mediated by binding of *DmdR1* to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *FEBS Journal* .274. 1110–1122

102. **Tzeng, C.M., Kornberg, A.** (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 29:381–82
103. **Umeyama, T., P.-C. Lee, and S. Horinouchi.** (2002). Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:419-425.
104. **Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N. and Zehnder, A. J. B.** (1994). Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *J. Biol. Chem.* 269, 29509–29514
105. **Vionis, A.P., Katsifas, E.A. ve Karagouni, A.D.** (1998), “Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms,” *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 103-115.
106. **Wang, Z., Crawford, D.L., Pometto, III.A.L. ve Rafii, F.** (1989), “Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem,” *Can. J. Microbiol.*, 35, 535-543.
107. **Wellington, E.M.H., Saunders, V.A.** (1992), “Gene transfer between *Streptomyces* in soil,” *Gene*, 115, 193-198.
108. **Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington E.M.H., Sneath, P.H.A. ve Sakin, M.J.** (1983), “Numerical classification of *Streptomyces* and related genera,” *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1743-1813.
109. **Williams, S.T., Sharpe, M.E. ve Holt, J.G.** (1989), “Bergey’s manual of systematic bacteriology,” The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Vol. 4
110. **Wood, H.G., Clark, J.E.** (1988). Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* 57:235–60

111. **Wright, L.F. ve Hopwood, D.A.** (1976b), "Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *J. Gen. Microbiol.*, 95, 96-106.
112. **Zhang, H., Rao, N. N., Shiba, T., Kornberg, A.** (2005) Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: Motility, development, and predation. *PNAS*. 13416–13420.
113. **Zhang, H., Gomez-Garcia, M. R., Shi, X., Rao, N. N., Kornberg, A.** (2007) Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis, *PNAS*. 104(42) :16486–16491
114. **Zhu, Y. Huang, W., Lee, S. S., Xu, W.** (2004) Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis *EMBO Rep.* 6(7): 681–687

EK -1

AKTİNORHODİN ÖLÇÜMLERİ İSTATİSTİK ANALİZLERİ

48. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N (Örnek Sayısı)	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,1883	,24991	,14429
	2,00	3	,0170	,00964	,00557

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
Değişken 2	11,823	,026	1,187	4	,301
			1,187	2,006	,357

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 48. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

72. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1.Değişken	N (Örnek Sayısı)	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,4060	,16672	,09626
	2,00	3	1,181 0	,14206	,08202

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	,168	,703	-6,128	4	,004
			-6,128	3,902	,004

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 72. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

96. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,0987	,02948	,01702
	2,00	3	1,2920	,14031	,08101

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	9,516	,037	-14,416	4	,000
			-14,416	2,176	,003

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 96. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

120. saat T testi sonuçları:**Grup İstatistikleri**

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,1193	,02610	,01507
	2,00	3	1,4407	,15010	,08666

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	9,928	,034	-15,022	4	,000
			-15,022	2,121	,003

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 120. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

144. saat T testi sonuçları:**Grup İstatistikleri**

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,2833	,09667	,05581
	2,00	3	1,2707	,24484	,14136

Bağımsız Örnekler İçin t testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	3,300	,143	-6,497	4	,003
			-6,497	2,609	,011

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 144. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

168. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,2303	,07600	,04388
	2,00	3	1,3510	,18334	,10585

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df(serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	2,765	,172	-9,780	4	,001
			-9,780	2,668	,004

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 168. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

UNDESİLPRODİGİOSİN ÖLÇÜMLERİ İSTATİSTİK ANALİZLERİ

24. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,0587	,07135	,04119
	2,00	3	,0487	,00115	,00067

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	15,313	,017	,243	4	,820
			,243	2,001	,831

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 24. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

48. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,9393	,30561	,17645
	2,00	3	,2737	,06264	,03617

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	2,558	,185	3,696	4	,021
			3,696	2,168	,058

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 48. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

72. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	1,1410	,14245	,08225
	2,00	3	,7170	,01997	,01153

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df(serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	7,119	,056	5,105	4	,007
			5,105	2,079	,033

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 72. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten küçük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark vardır.

96. saat T testi sonuçları:**Grup İstatistikleri**

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	1,0613	,30691	,17719
	2,00	3	,7343	,02994	,01729

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	5,137	,086	1,837	4	,140
			1,837	2,038	,205

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 96. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

120. saat T testi sonuçları:**Grup İstatistikleri**

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	1,0513	,32185	,18582
	2,00	3	,7717	,04727	,02729

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	4,444	,103	1,489	4	,211
			1,489	2,086	,270

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 120. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

144. saat T testi sonuçları:

Grup İstatistikleri

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
2. Değişken	1,00	3	,8937	,37056	,21394
	2,00	3	,7307	,04329	,02500

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	11,562	,027	,757	4	,491
			,757	2,055	,526

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 144. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

168. saat T testi sonuçları:**Grup İstatistikleri**

	1. Değişken	N	Ort.	Std. Sapma	Std.Hata
2. Değişken	1,00	3	1,0010	,33421	,19295
	2,00	3	,6873	,09080	,05242

Bağımsız Örnekler İçin t Testi

	Levene Testi		t-testi		
	F	Sig. (Farklılık)	t	df (serbestlik derecesi)	Sig. (P değeri)
2. Değişken	3,052	,156	1,569	4	,192
			1,569	2,294	,241

Sig. P'nin ≤ 0.05 olması, karşılaştırılan iki grup arasında fark olduğunu göstermektedir. 168. saat antibiyotik ölçümlerinde, Sig.P değeri 0.05'ten büyük olduğundan, yaban suş ve mutant suş aktinorhodin üretimleri arasında fark yoktur.

ÖZGEÇMİŞ

İrem Yalım, 29 Ağustos 1984'te Bursa'da doğdu. 2002 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2006 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında yüksek lisans derecesini alan İrem Yalım, aynı yıl GYTE Biyoloji Bölümü'nde Doktora eğitimine başladı.