T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOMYCES COELICOLOR'DA LON PROTEAZ, SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP, POLİFOSFAT METABOLİZMASI VE ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNİN İLİŞKİLENDİRİLMESİ

ASLI BAYRAKTAR KAVALCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOMYCES COELICOLOR'DA LON PROTEAZ, SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP, POLİFOSFAT METABOLİZMASI VE ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNİN İLİŞKİLENDİRİLMESİ

ASLI BAYRAKTAR KAVALCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE
2019

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

RELATION BETWEEN LON PROTEASE, STRINGENT RESPONSE, POLYPHOSPHATE METABOLISM AND ANTIBIOTIC PRODUCTION IN STREPTOMYCES COELICOLOR

ASLI BAYRAKTAR KAVALCI

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE

2019

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..30.../..05.../..2019. tarih ve 2019.../..25... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ..21.../..06.../..2019. tarihinde tez savunma sınavı yapılan Aslı Bayraktar Kavalcı'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

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

ÜYE : Prof. Dr. Ayten Yanatan

ÜYE : Prof. Dr. Yelda Örden Çiftci

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Bakterilerde besin kıtlığı, ısı şoku gibi çeşitli stres durumlarında sentezlenen alarmonlar [(p)ppGp], polifosfat (poliP) polimerinin hücrede birikimini tetiklerler. *Esherichia coli*'de poliP'nin, hücre için hayati önemi olan pek çok fizyolojik proseste görev alan Lon proteaza bağlanarak bir kompleks oluşturduğu, bu kompleksin de ribozomal proteinleri yıkarak strese adaptasyonu sağlayan enzimlerin sentezinde kullanılacak yeni amino asitleri oluşturduğu bilinmektedir. Diğer bakterilerde poliP ve Lon arasında böyle bir ilişkinin olup olmadığı bilinmemektedir.

Antibiyotik üretiminin regülasyonunun incelendiği çalışmalarda sıklıkla model organizma olarak tercih edilen *Streptomyces coelicolor*'da, çeşitli genlerin ve strese neden olan farklı çevresel sinyallerin sekonder metabolit üretimini etkilediği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, genomunda bir ekstra *lon* geni bulunduran yüksek antibiyotik üreticisi rekombinant *S. coelicolor* suşunda, sınırlandırılmış cevap (*rel*A), poliP metabolizması (*ppk*), ikincil metabolit üretimi (*act*II-ORF4, *red*K) ve stres bağlantılı (*sig*B) genlerin transkripsiyonel analizleri yapılmıştır. Rekombinant suşta bu genlerin ekspresyon seviyelerinde yaban suşa kıyasla önemli artışlar tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında, ayrıca poliP üretemeyen yüksek antibiyotik üreticisi *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşunun genomuna ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilerek mutant bir suş (Δ*ppk*+pRA*lon*$^{+Str}$) oluşturulmuştur. Bu suşun, normalden çok daha yavaş büyüdüğü ve antibiyotikleri ölçüm yapılamayacak kadar az ürettiği gösterilmiştir. Bu durum, poliP yokluğunda ekstra bir kopya *lon* geninin hücrede aşırı düzeyde stres yaratarak yaşamsal faaliyetlere sekte vurmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları, *E. coli*'de öngürülen Lon proteaz-poliP etkileşiminin *S. coelicolor*'da da var olduğunu gösteren ön verileri sunmanın yanında, Lon proteaz, (p)ppGpp, poliP ve ikincil metabolit üretimi arasındaki kompleks ağın aydınlatılmasına da önemli katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces*, antibiyotik, Lon proteaz, sınırlandırılmış cevap, stres.

SUMMARY

Bacteria synthesize alarmones in response to stress conditions such as food deprivation and heat shock. Alarmones induce the accumulation of polyphosphate (polyP) polymer in the cell. PolyP in *Esherichia coli* is known to form a complex by binding to Lon protease, which is involved in many physiological processes that are vital to the cell, and this complex breaks down ribosomal proteins to form new amino acids for the synthesis of enzymes that provide adaptation to stress. It is not known whether there is such a relationship between poliP and Lon in other bacteria.

Streptomyces coelicolor is used as a model organism for studies on the regulation of antibiotic production and these studies have shown that a diverse set of genes and external factors that cause stress affect secondary metobolite biosynthesis.

In this study, we analyzed the transcription of genes involved in stringent response (*rel*A), polyP metabolism (*ppk*), secondary metabolite production (*act*II-ORF4, *red*K) and stress response (*sig*B) in a high antibiotic producer recombinant *S. coelicolor* strain with an extra *lon* gene in its genome. We have seen a significant increase in the expression of these genes compared to wild type. Within the scope of this study, we have also created a mutant strain, (Δ*ppk*+pRA*lon*$^{+Str}$), by integrating an extra copy of *lon* gene into the genome of high antibiotic producer *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* strain which cannot synthesize polyP. It is shown that this strain has slower growth rates compared to wild type and produce undetectable levels of antibiotic. We hypothesize that extra copy of *lon* gene generates high levels of stress in the absence of polyP, which in turn hinders vital activities. Results of this thesis not only provides the preliminary data that Lon protease-polyP interaction predicted in *E. coli* also exists in *S. coelicolor* but also sheds light on the complex network between Lon protease, (p)ppGpp, polyP and secondary metabolite production.

Keywords: *Streptomyces*, antibiotic, Lon protease, stringent response, stress.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendirerek bilimsel çalışma yetisi kazanmamı sağlayan, hoşgörü ve güvenini hissettirerek beni destekleyen, birlikte çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e,

Bilimsel metodları en iyi şekilde anlatarak öğrenmemde emekleri büyük olan ve tezimin her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK, Dr. Zeynep Demir ÖKSÜZ ve Arş.Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY'a,

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan mutluluk duyduğum, birlikte ağlayıp gülebildiğim sevgili çalışma arkadaşlarım Ğarip DEMİR, Müge Didem ORHAN, Buse ÇINAR, Nagihan GENEL, Çiğdem BOZKURT, Halil YILMAZ, Mouktar Abdi BARKAD ve Zeynep Tansu ATASAVUM'a,

Varlıklarıyla hayatımı neşelendiren ve bana ne kadar şanslı olduğumu hissettiren en yakın arkadaşlarım Hatice Didar ÇİFTÇİ, Fatma Ebru ACAR, Zehra ESER, Mine ÖZGÜR ve Yağmur YAHŞİ'ye,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, her daim desteklerini omuzlarımda hissettiğim en değerli varlıklarım babam Gültekin BAYRAKTAR, annem Kerime BAYRAKTAR, ablam Ayşegül KUMRU ve kardeşim Kemal Can BAYRAKTAR'a,

Bu zorlu süreçte hiç düşünmeden beni destekleyen ve her koşulda yanımda olacağını hissettirerek bana huzur veren yol arkadaşım Batuhan KAVALCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. ATP BAĞIMLI LON PROTEAZ	3
3. SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP	10
3.1. Alarmonların Sınırlandırılmış Cevaptaki Rolü	10
3.2 Polifosfat Polimeri ve Sınırlandırılmış Cevaptaki Rolü	15
4. AKTİNOBAKTERİLER	18
4.1. *Streptomyces*'ler	19
4.1.1 *Streptomyces*'lerin Antibiyotik Üretim Yeteneği	20
4.1.2. *Streptomyces*'lerde Sekonder Metabolizmanın Düzenlenmesinden Sorumlu Moleküler Mekanizmalar	21
4.1.3. *Streptomyces*'lerde Sınırlandırılmış Cevap, Lon Proteaz ve Antibiyotik Üretimi Arasındaki İlişki	23
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
5.1. Gereçler	26
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar	26
5.1.2. Kullanılan Enzimler	26
5.1.3. Kullanılan Kitler	26
5.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	27
5.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları	27
5.1.6. Kullanılan Besiyerleri	28
5.1.7. Kullanılan Antibiyotikler	30

5.1.8. Kullanılan Plazmitler 30
5.1.9. Kullanılan Çözeltiler 32
5.1.10. Kullanılan Cihazlar 33
5.2. Yöntemler 34
5.2.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu 34
5.2.2. Streptomisin Direnç Geninin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması 35
5.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi 36
5.2.4. *S. coelicolor'* dan Kromozomal DNA İzolasyonu 36
5.2.5 DNA Fragmentlerinin Jelden Geri Kazanılması 37
5.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri 38
5.2.7. Klenow Reaksiyonu 38
5.2.8. Ligasyon 38
5.2.9. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması 39
5.2.10 Kimyasal Transformasyon Yöntemi 39
5.2.11. *E. coli* DH5α Transformantlarının Taranması 40
5.2.11.1. Miniprep Plazmit İzolasyonu Yöntemi 40
5.2.11.2. Rekombinant Plazmitin Doğruluğunun PCR ile İspatlanması 41
5.2.12. Rekombinant Plazmitin Metilasyon Sistemi Olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarımı 41
5.2.13. Rekombinant Plazmitin *S. coelicolor* 'a Konjugasyon ile Transferi 42
5.2.14. Rekombinant plazmit entegrasyonun PCR ile doğrulanması 42
5.2.15. Total RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu 44
5.2.16. DNaz Muamelesi 45
5.2.17. İzole Edilen RNA'larda Genomik DNA Kontaminasyonun Kontrolü 46
5.2.18. cDNA Sentezi 47
5.2.19. Sentezlenen cDNA Örneklerinin Kontrolü 48
5.2.20. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR, RT-qPCR) 48
6.BULGULAR 51
6.1. Genomunda ektra 1 kopya *lon* geni bulunan mutant suşta antibiyotik üretimi, sınırlandırılmış cevap, polifosfat metabolizması ve stres bağlantılı genlerin ifadesi 51
6.1.1. *S. coelicolor* A3(2) ve Sco-pRA*lon* hücrelerinden RNA İzolasyonu 52
6.1.2. RNA Örneklerinin DNaz Muamelesi 53
6.1.3. Ters-Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA Sentezi 54

6.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Anlatımı Analizleri 55
6.2. Ekstra tek kopya *lon* geninin polifosfat üretemeyen mutant *S. coelicolor* M145'e etkisi 61
6.2.1. Streptomisin Direnç Geninin (*aad*A) PCR ile Çoğaltılması 61
6.2.2. Streptomisin Direnç Geninin (*aad*A) pRA*lon* Plazmitine Klonlanması 62
6.2.3. pRAlon^{+Str} Rekombinant Plazmidinin *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* Suşuna Konjugasyon ile Aktarımı 64
6.3. *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ Suşunun R2YE Besiyerinde Üremesi 66
7.TARTIŞMA 67
8. SONUÇ VE ÖNERİLER 73

KAYNAKLAR 75
ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar	**Kısaltmalar**
~	: Yaklaşık
Act	: Aktinorhodin
Amp	: Ampisilin
Apr	: Apramisin
ATP	: Adenozin trifosfat
*Bam*HI	: *Bacillus amyloliquefaciens* H endonükleaz
Bç	: Baz çifti
$CaCl_2$	: Kalsiyum klorür
CDA	: Kalsiyum bağımlı antibiyotik
Dk	: Dakika
*Eco*RI	: *Escherichia coli* endonuclease I
EDTA	: N,N,N,N'-tetrametiletilendiamin
GppA	: Guanozin pentafosfat fosfohidrolaz
HCl	: Hidroklorik asit
*Hind*III	: Haemophilus influenzae Rd endonükleaz III
KCl	: Potasyum klorür
KOAc	: Potasyum asetat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani broth
M	: Molarite
mg	: Miligram
Mg^{+2}	: Magnezyum iyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mmy	: Metilenomisin
$MnCl_2$	: Manganez (II) klorid
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit

PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
ppGpp	:	Guanozin tetrafosfat
PPi	:	Pirofosfat
PPK	:	Polifosfat kinaz
pppGpp	:	Guanozin pentafosfat
PPX	:	Ekzopolifosfataz
Red	:	Undesilprodigiosin
RNA	:	Ribonükleik asit
Rpm	:	Dakika başına dönüş
RT-qPCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Sn	:	Saniye
Str	:	Streptomisin
Tris	:	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
α	:	Alfa
μL	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar
σ	:	Sigma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil no: **Sayfa**

5.1: Çalışmada kullanılan moleküler DNA belirteçleri. 27

5.2: pRA mekik vektörü (5769 bç). 31

5.3: pIJ778 plazmiti 32

6. 1: RT-qPCR için hazırlanmış primerlerle, genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Gradient PCR sonuçları. 52

6. 2: İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 52

6. 3: DNaz muamelesinin ardından genomik DNA kontaminasyonun ve RNA bütünlüğünün kontrolü. 54

6. 4: cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucunda elde edilen *hrd*B genine ait jel elektroforez görüntüsü. 55

6.5: *gyr*A geni erime eğrisi. 56

6.6: Farklı saatlerde lon ekspresyon düzeyleri. 57

6. 7: 72. ve 96. saatlerde lon ekspresyon düzeyleri 58

6. 8: Farklı saatlerde *act*II-ORF4 ekspresyon düzeyleri 58

6. 9: Farklı saatlerde *red*K ekspresyon düzeyleri 59

6. 10: Farklı saatlerde *sig*B ekspresyon düzeyleri 59

6. 11: Farklı saatlerde *ppk* ekspresyon düzeyleri 60

6. 12: Farklı saatlerde *rel*A ekspresyon düzeyleri 60

6.13: Agaroz jelden saflaştırılan *aad*A genine özgü PCR ürünü. 62

6.14: Ligasyona hazırlanan pRA*lon* plazmidinin jel görüntüsü. 63

6.15: Olası rekombinant plazmitlerdeki *lon* ve *aad*A genlerinin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları.. 63

6.16: Genomik DNA izolasyon sonuçları. 65

6.17: pRAlon^{+Str} plazmidinin genoma entagrasyonunun doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları. 65

6. 18: *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* + pRAlon^{+Str} suşunun R2YE katı (A) ve sıvı besiyerinde (B) üreme durumu 66

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo no: **Sayfa**

5.1: Çalışmada kullanılan *E. coli* ve *S. coelicolor* suşları. 28

5.2: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri. 29

5.3: Kullanılan antibiyotikler. 30

5.4: Deneylerde kullanılan plazmitler. 30

5.5: Kullanılan çözeltiler. 33

5.6: Seçici streptomisin kasedi ile uyumlu primerler. 35

5.7: Q5 DNA polimeraz PCR bileşenleri. 35

5.8: Q5 DNA polimeraz reaksiyon koşulları. 36

5.9: Klenow Reaksiyonu. 38

5.10: Rekombinant plazmitin doğrulanmasında kullanılan *lon* ve *aad*A genleri ile uyumlu primerler. 41

5.11: *att*B bölgesi ile uyumlu primerler. 43

5.12: Phusion DNA polimeraz PCR bileşenleri. 43

5.13: Phusion DNA polimeraz reaksiyon koşulları. 44

5.14: Dnaz I reaksiyonu. 45

5.15: *hrd*B genine özgü primerler. 46

5.16: *Taq* DNA polimeraz PCR bileşenleri. 46

5.17: *Taq* DNA polimeraz reaksiyon koşulları. 47

5.18: RT-qPCR'da kullanılan primer dizileri. 49

5.19: RT-qPCR reaksiyon bileşenleri. 49

5.20: RT-qPCR döngü şartları. 50

6.1: Fermentasyonun 60., 72. ve 96. saatlerindeki hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin NanoDrop sonuçları. 53

1. GİRİŞ

Streptomyces türleri filamentöz yapılar ile vejatatif olarak üreyen actinomycetales ordosuna ait gram pozitif toprak bakterileridir [1]. *Streptomyces*'ler geniş biyoaktivite aralığına sahip çeşitli sekonder metabolitleri yüksek oranda üretebilmeleri nedeniyle medikal ve biyoteknolojik açıdan önem teşkil etmektedirler [2]. Çeşitli antibiyotikler, immünosupresan ilaçlar, antitümör ajanları ve herbisidler bu sekonder metabolitlerden bazılarıdır. Ticari antibiyotiklerin %75'inin bu mikroorganizmalar tarafından üretildiği bilinmektedir [3].

Bakteriler besin kıtlığı, ısı şoku gibi stres durumlarında meydana gelen ani değişimlere sınırlandırılmış cevap (stringent response) mekanizmasıyla cevap vererek başa çıkmaktadırlar. Aminoasit açlığındaki bir bakteride RelA ve SpoT proteinleri tarafından sentezlenen alarmonlar [guanozin pentafosfat (pppGpp) ve guanozin tetrafosfat (ppGpp)] aracılığı ile hücrede tRNA ve rRNA sentezi dururken protein yıkımı artmaktadır [4], [5]. Buna ek olarak alarmonların polifosfat kinaz (Ppk) enzimi ile oluşturulan polifosfatın yıkımında görev alan ekzopolifosfataz (Ppx) enzimini inhibe ettiği bilinmektedir [6], [7]. Bu inhibisyon sonucunda hücre içinde biriken polifosfat Lon proteaza bağlanarak bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleksin ribozomal proteinleri yıkarak oluşturduğu serbest aminoasitler açlığa adaptasyon için gerekli enzimlerin sentezi için kaynak olarak kullanılmaktadır [8]. Grubumuzun daha önce yapmış olduğu çalışmalarda, *Bacillus thuringiensis*'te polifosfat konsantrasyonunun artması ya da azalmasının strese yol açarak ikincil metabolizmayı uyardığı bulunmuştur [9], [10]. Başka bir çalışma kapsamında da polifosfat kinaz geninin *Streptomyces coelicolor* genomundan silinmesinin antibiyotik üretimini tetiklediği gösterilmiştir [11].

Streptomyces türlerinde ikincil metabolit üretiminin ortam koşulları elverişli olmadığında sentezlenen alarmonlar ile de tetiklendiği bilinmektedir [12]. Stres koşullarında sentezlenen ppGpp, *Streptomyces* genomunda bulunan aktinorhodin (*act*) ve undesilprodigiosin (*red*) antibiyotik biyosentez genlerinin yolak spesifik aktivatörleri olan ActII-ORF4 ve RedD proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır [13], [14]. Laboratuvarımızda daha önce yapılmış başka bir çalışma kapsamında, genomuna ekstra 1 kopya *lon* geni entegre edilmiş rekombinant *S. coelicolor* suşu elde edilmiştir. Söz konusu rekombinant suşta

antibiyotik üretiminin çok ciddi oranda arttığı bulunmuştur. Ancak bu artışın moleküler sebepleri bilinmemektedir [15].

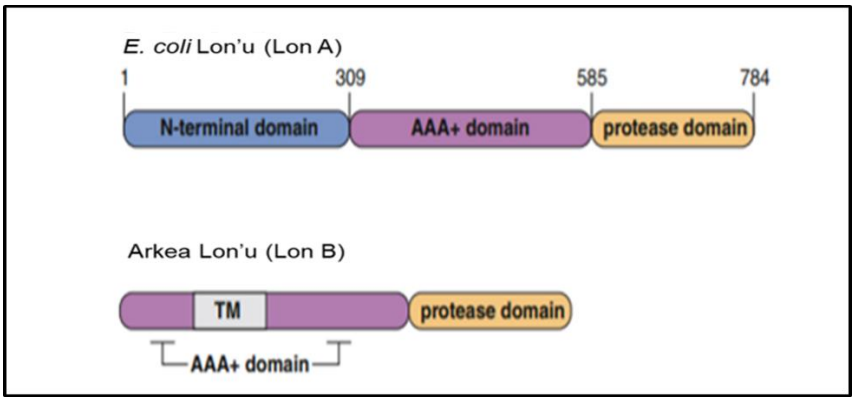
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, genomunda 1 ekstra *lon* geni bulunan rekombinant *S. ceolicolor* suşunda sınırlandırılmış cevap, polifosfat metabolizması, ikincil metabolit üretimi ve stres bağlantılı genlerin transkripsiyonel analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Böylece rekombinant suşta, yüksek antibiyotik üretimiyle bu kompleks regülasyon ağının ilişkisi aydınlatılmış olacaktır.

Ayrıca bu çalışma kapsamında, kendisi yüksek antibiyotik üreticisi olan M145 Δppk mutant suşun genomuna 1 ekstra *lon* geni entegre edilerek antibiyotik üretiminde daha üst değerlere ulaşılması da amaçlanmıştır. İstenen ikincil metaboliti yüksek miktarda üretebilen stabil suşların geliştirilmesi biyoteknolojik öneme sahiptir.

2. ATP BAĞIMLI LON PROTEAZ

Prokaryotlarda protein degradasyonu hücresel aktiviteler ile ilişkili ATPaz'lar olarak ifade edilen AAA^+ protein ailesinin üyeleri olan ATP bağımlı proteazlar ile gerçekleşir. Lon proteazlar, Clp proteazlar (ClpAP, ClpXP ve ClpYQ) ile membrana bağlı HfIB (FtSH) proteazlar bu protein ailesinin üyeleridir [16]. İlk defa *E. coli*'de tanımlanan Lon proteaz, arkeadan insana kadar bütün canlı türlerinde mevcuttur [17], [18]. Yapılan dizi homolojisi ve çeşitli yapısal özelliklere göre Lon proteazlar, LonA ve LonB olmak üzere iki genel sınıfa ayrılabilir. LonA, *E. coli* dahil çoğu bakteride bulunurken Lon B yaygın olarak arkealarda bulunur. *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeurginosa*'da ise her iki tip proteaz tipi de mevcuttur [19], [20]. 87 kDa olan *E. coli* Lon proteazı yaklaşık 300 amino asitten oluşan büyük bir N-terminal alt ünitesi ile ATPaz (AAA^+) ve C-terminal proteaz alt ünitelerinden oluşmaktadır [20], [21], [22]. LonA'dan farklı olarak N-terminal alt ünitesinden yoksun olan Lon B, ATPaz alt ünitesinin içerisinde küçük bir transmembran domaini (TM) bulundurmaktadır (Şekil 2.1) [22].

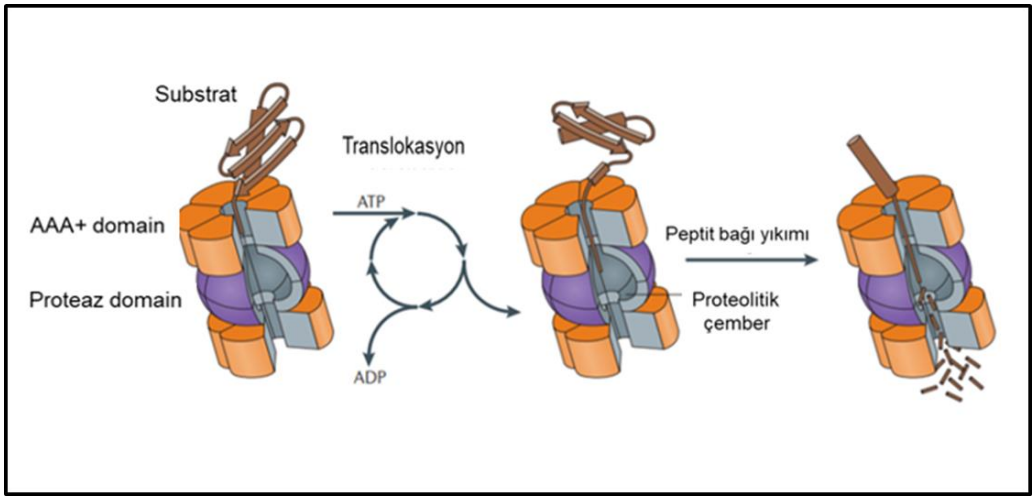


Şekil 2. 1: Bakterilerde bulunan Lon proteazların (*Lon*A ve *Lon*B) yapısal gösterimi

E. coli Lon proteazını oluşturan her bir alt ünitenin enzimin işlevini gerçekleştirebilmesi için önemli görevleri bulunmaktadır. N-terminal alt ünitesi substrat tanıması ve bağlanmasında görev alırken ATPaz altünitesi, ATP bağlanma motifi içermesine ek olarak polifosfat ve DNA'nın bağlanmasından da sorumludur [23], [24], [25]. Proteaz altünitesi ise bünyesinde serin-lizin katalitik ikilisinden oluşan aktif proteolitik bölgeyi barındırmaktadır. Buna ek olarak, ATPaz ve proteaz alt

üniteleri arasında substrat tanıma için gerekli olan SSD (sensör ve substrat ayırt edici domain) bölgesi bulunmaktadır [26]. SSD aracılığı ile substratların tanınması degron olarak ifade edilen degradasyon işaretleri ile gerçekleşmektedir. Bu işaretlerin genellikle substratların amino ya da karboksi terminallerinde bulunan kısa amino asit sekansları olduğu düşünülmektedir. Örneğin, Lon yanlış katlanmış proteinleri degronlar ile etkileşimi sonucunda tanımaktadır [27], [28]. Bunun yanı sıra Lon proteazın SulA'yı proteinin C- terminalinde bulunan histidin amino asidi sayesinde tanıyarak yıkıma uğrattığı bilinmektedir [29].

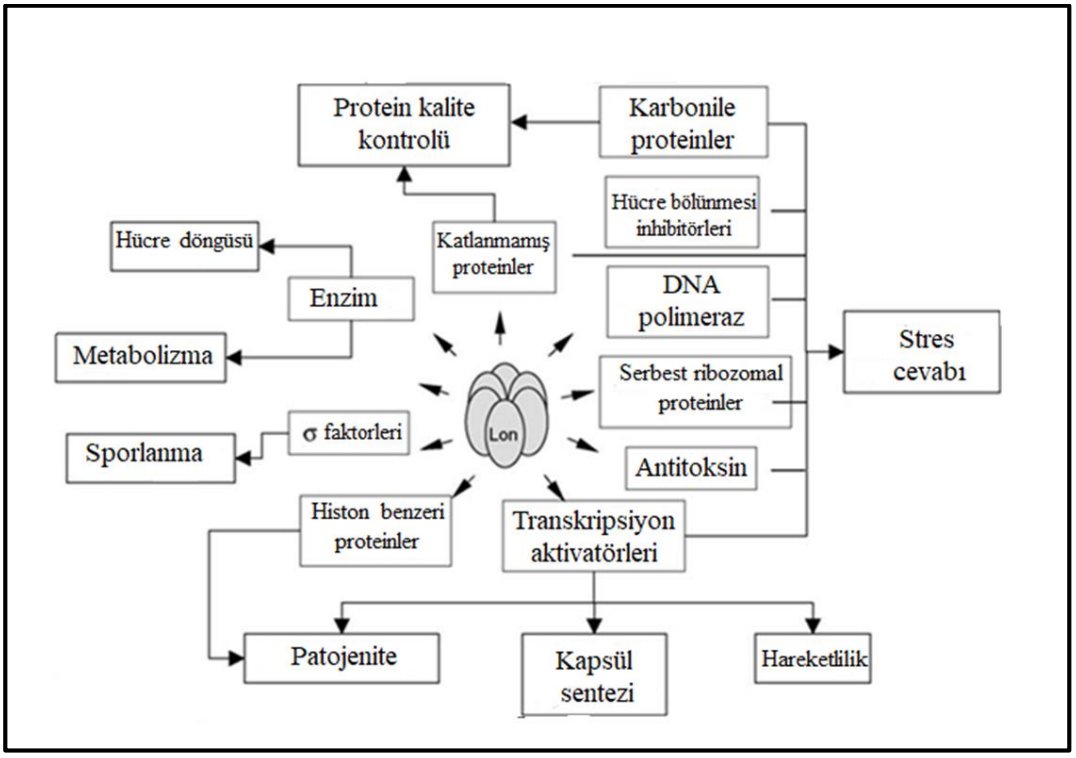
E. coli'de Lon proteaz çoğunlukla halka şekilli homohekzamer bir yapı oluşturmaktadır. Bu oligomerik yapıda bulunan aktif proteolitik bölgeler homohekzamerin iç kısmında bir proteoliz çemberi oluşturmaktadır [30]. Lon gibi diğer ATP-bağımlı proteazlar da çeşitli oligomerik yapılar (tetramer, hekzamer, oktomer vb.) oluşturmalarının yanı sıra benzer susbtrat yıkım mekanizmalarına sahiptirler [31]. Protein yıkımının ilk aşamasında substratlar oligomerik yapıdaki proteaz tarafından tanınır. ATPaz domaini aracılığıyla ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerji hem proteinlerin katlamış yapılarının açılmasında hem de proteolitik çembere doğru hareket etmelerinde kullanılır. En son aşamada, substratların proteolitik çemberde yıkımları gerçekleşir (Şekil 2.2) [27].



Şekil 2. 2: ATP bağımlı proteazların protein yıkım mekanizması.

E. coli'de, Lon proteaz ile ClpAP ve ClpXP proteazların enerji bağımlı protein yıkımının %70-%80'inden sorumlu olduğu bilinmektedir [21]. ATP bağımlı Lon

proteazlar, yanlış katlanmış ve hasara uğramış proteinler ile kararlı olmayan doğal proteinlerin yıkımını hızlı bir şekilde gerçekleştirerek protein kalite kontrolünü sağlamaktadırlar [32], [33]. Buna ek olarak, gen anlatımının kontrolünde görev alan doğal katlanmış regülatör proteinleri de yıkarak önemli hücresel proseslerin düzenlemesinde etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Hücre bölünmesi, çeşitli stres koşullarına adaptasyon, patojenite, motilite ve sporulasyon bu hücresel proseslerden bazılarıdır (Şekil 2.3) [34].



Şekil 2. 3: Lon proteazların görev aldığı hücresel prosesler.

Lon proteazların bakterilerin farklılaşma süreçlerinde önemli roller oynadıklarına ilişkin pek çok örnek bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* ve *Myxococcus xanthus* ile yapılan çalışmalarda Lon'un sporulasyon üzerinde çeşitli etkileri olduğu gösterilmiştir. *B. subtilis*'te sporulasyonun başlaması SpoA transkripsiyon faktörü aracılığı ile olmaktadır. Düşük pH gibi sporulasyon için uygun olmayan bir büyüme ortamında *B. subtilis* LonA'sının *spoA* geninin transkripsiyonunun düzenlemesinden sorumlu olan σ^H 'i yıkıma uğratarak sporulasyonu engellediği gösterilmiştir [34], [35]. *Myxococcus xanthus*'da ise gelişim döngüsünde *lonD* geninin (*bsgA*) hayati bir öneme sahip olduğu ve sporulasyonda etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir [36]. Bunların yanı

sıra *Vibrio parahaemolyticus*'da Lon proteazın hücre farklılaşmasınının düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir [37]. Bir diğer çalışmada, *E. coli lon* mutantında, RcsA'nın birikimi sonucunda kapsül sentezinin uyarılması ile mukoid karakterde kapsül oluşumu gözlemlenmiştir. Normal büyüme koşullarında kapsül sentezinden sorumlu genlerin transkripsiyonel aktivatörü olan RcsA'nın Lon ile yıkıldığı bilinmektedir [38], [39].

Salmonella enterica lon mutantında patojeniteyle ilişkili SPI-1 invazyon genlerinin (*hilA, invF, sipA, sipC*) transkripsiyonlarının arttığı gözlemlenmiştir [40]. Ayrıca Lon proteazın *Brucella abortus* ve *Salmonella enterica'*da transkripsiyon faktörü HilA'nın degradasyonunu düzenleyerek virulans genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir [41]. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada Lon mutantlarında patojenitenin azaldığı ve motilitenin zarar gördüğü belirlenmiştir [42]. Bunlara ek olarak, Lon'un elma pathojeni *Erwenia amylovora*'da virülans özelliklerin düzenlenmesinde etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir [43].

Çeşitli bakterilerle yapılan çalışmalarda Lon proteazın hücre bölünmesinin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin, *Caulobacter crescentus lon* mutantında DNA replikasyonunun başlamasında ve hücre bölünmesinin kontrolünde çeşitli bozukluklar olduğu gözlemlenmiştir. Bu bakteride, hücre bölünmesinin hemen öncesinde kromozomun CcrM DNA metil transferaz enzimi ile metillenmesi gerekmektedir. Bölünme olmadığı zamanlarda ise Lon'un CcrM'yi yıkıma uğratarak hücrede düşük bir seviyede tutulmasında rol aldığı belirlenmiştir [44]. Mascarenhas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *B. subtilis* LonA'sının kromozom replikasyonunun düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir. Replikasyonda anahtar bir rol oynayan SMC proteininin, durağan faza giren hücrelerde DNA'dan ayrılmasını takiben LonA tarafından hızlı bir şekilde degrede edildiği öngörülmüştür [45].

Hücre farklılaşma ve bölünmesindeki rollerine ek olarak Lon proteazın sürekli değişen çevre koşullarında yaşayan bakterilerin çeşitli streslere yanıt oluşturmalarında da önemli görevler üstlendiği bilinmektedir. Lon aracılığı ile oluşturulan SOS yanıtının mekanizması *E. coli*'de ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. Lon proteaz, hücre bölünmesinin inhibitörü olarak görev yapan SulA proteinini yıkarak SOS yanıtının düzenlenmesini sağlamaktadır [34]. Normal büyüme koşullarında, LexA tarafından transkripsiyonu baskılanan ve Lon tarafından yıkıma uğratılan SulA proteininin

sitoplazmik konsantrasyonu düşük bir seviyededir. UV ışığına maruz bırakılan *E. coli* hücrelerinde oluşan DNA hasarı sonrasında *sulA*'nın ekspresyonu uyarılır. Konsantrasyonu artan SulA, hücre bölünmesinde septum oluşumundan sorumlu olan FtsZ'ye bağlanarak bölünmenin durmasına neden olur. DNA'daki hasarların giderilmesi ile *sulA*'nın ekspresyonu baskılanır ve hücre bölünmesi yeniden başlar [46]. UV ışığına duyarlı oldukları bilinen *E. coli lon* mutantlarında ise SulA'nın sitoplazmik konsantrasyonu azalamadığı için hücre bölünmesine devam edilemediği görülmüştür [47], [48].

SOS yanıtına ek olarak, Lon proteazların ısı şoku yanıtındaki rollerinin aydınlatılması amacıyla farklı bakteri türleri ile gerçekleştirilen pek çok çalışma mevcuttur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, sıcaklık 42 °C'ın üzerine çıktığında *E. coli'*de Lon seviyesininin arttığı görülmüş ve *lon* geni yüksek sıcaklık regülonu (HTR) ile ilişkilendirilmiştir [49]. Benzer şekilde *B. subtilis*'te de ısı şoku ile beraber *lon* mRNA seviyesinin arttığı gösterilmiştir [50]. *Streptomyces lividans* ile yapılan bir çalışmada ise yüksek sıcaklık koşullarında *lon* geninin ekspresyonunun uyarıldığı ancak normal koşullar altında transkripsiyonun regülatör protein HspR ile baskılandığı gösterilmiştir [51].

Lon proteazın protein yapım ve yıkımını hızlandırarak çeşitli stres koşullarına cevap oluşturulmasına önemli katkılar sağladığı bilinmektedir [34]. Sınırlandırılmış cevap (stringent response) mekanizması bu durum ile ilintili en iyi örneklerden biridir. Bakterilerde strese neden olan amino asit açlığı durumunda protein yıkımı artmaktadır. Yıkım sonrasında oluşan amino asitler ise yeni çevresel koşullara adaptasyon için gerekli enzimlerin yapımında kullanılmaktadır. Sınırlandırılmış cevap olarak adlandırılan bu stres yanıtı, serbest ribozomal proteinlerin yıkımından sorumlu PoliP-Lon kompleksi aracılığıyla oluşturulmaktadır [6], [52]. Bu duruma örnek olarak verilebilecek bir diğer çalışmada Nishii ve arkadaşları, Lon proteazın, bakterilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması sonucunda oluşan stresle başa çıkılmasında etkin bir role sahip olduğunu göstermişlerdir. Enterobacteriaceae ailesine ait üyelerle yapılan bu çalışmada, aneorobik bir ortamdan aerobik bir ortama geçiş yapıldığında reaktif oksijen türleri ile karşılaşan bakterilerde Lon'un oksidasyonla tetiklenen konformasyonel değişimi sonucunda proteolitik aktivesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sayede stresle birikimi tetiklenen anormal proteinlerin (yanlış katlanmış ve hasarlı) yıkımı artmakta ve elde edilen yeni aminoasitler, adaptasyonun sağlanmasına yardımcı

enzimlerin sentezinde kullanılmaktadır. Tüm bunlar bu bakterilerin hem konak içinde hem de konak dışında yaşayabilmelerini mümkün kılmaktadır [53].

Farklılaşma ve çeşitli stres cevaplarının oluşturulması gibi pek çok hücresel proseste önemli roller oynayan Lon proteaz, normal büyüme koşulları altında çoğu bakteri türü için hayati bir enzim değildir ancak yokluğunda hücrede çeşitli fonksiyonel bozuklukların meydana geldiği bilinmektedir. *E. coli*'de yapılan çeşitli çalışmalarda *lon* mutantlarında, UV radyasyonuna karşı hassasiyet kazanımı, filament oluşumu, mucoidy ve anarmol ya da sağlıklı yapıdaki proteinlerin yıkımının azalması gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda farklılıklar gözlemlenmiştir [38], [54]. *E. coli*' de Lon ve Clp proteaz mutantlarında besin sınırlamasının ardından normalden uzun süren bir lag fazı görülürken *lon, clp* ikili mutantında bu durumun daha şiddetli yaşandığı gözlemlenmiştir [8].

Sobczyk ve arkadaşlarının *Streptomyces lividans*'ın *lon* geninin içine hygromisin direnç geni yerleştirerek ifadesini bozdukları çalışmada ise yüksek sıcaklıkta Lon mutantının hücre döngüsünde önemli değişimler gözlemlenmediği halde mutantın yaban tipten daha yavaş büyüdüğü ve spor çimlenmesinin etkilendiği gösterilmiştir [51]. Lon mutantı ile yapılan bir diğer çalışmada, LonV ve LonD olmak üzere iki tane *lon* genine sahip *M. xanthus*'ta vejatatif büyüme ve gelişimle ilişkili *lon*V geninin delesyon mutantının hayatta kalmayı başaramadığı görülmüştür. Bu nedenle bu genin canlılık için zorunlu olduğu kanısına varılmıştır [36], [55].

Bakteriler için hayati olan pek çok görevi yerine getiren proteazların, çeşitli hücresel olayların sağlıklı bir şekilde devam etmesi için belirli bir seviyede bulunmaları gerekmektedir. Lon proteazın hücredeki seviyesinin ayarlanmasında *lon*'un transkripsiyonel seviyede regüle edilmesinin önemi büyüktür [34]. Sboczyk ve arkadaşlarının *S. lividans*'ta *lon* geninin HspR/HAIR ısı şoku cevap regülonunun bir parçası olduğunu gösterdiği çalışma bu durumla ilişkilendirilebilecek önemli bir örnektir HspR regülatör proteininin *lon* geninin promotorunda bulunan HAIR benzeri DNA motifi ile etkileşime girdiği ve normal koşullar altında *lon*'un HspR tarafından negatif olarak düzenlendiği gözlenmiştir [51]. Beiler ve arkadaşları tarafından yine *S. lividans* ile yapılan bir çalışmada ise transkripsiyonel aktivatör ClgR'nin özel bir DNA motifi aracılığı ile *lon*'un promotoruna bağlanarak transkripsiyonunu uyardığı belirlenmiştir [56].

Transkripsiyonel seviyede gerçekleşen bu düzenlemelere ek olarak çeşitli konformasyonel değişikler ve spesifik inhibitörler aracılığı ile Lon'un proteolitik aktivitesinin düzenlenlendiği bilinmektedir. Örneğin, T4 fajı ile infekte olan *E. coli*'de faj genomundan kodlanan PinA proteininin Lon'un aktivitesini inhibe etmesi sonucunda hücrede anormal protein miktarının arttığı gözlemlenmiştir [57], [58]. Bu durumla ilintili bir diğer çalışmada, *E. coli'* de ROS miktarının artması ile Lon'un yapısında meydana gelen konformasyonel değişiklikler sonucunda proteolitik aktivitesinin arttığı bilinmektedir [53].

Tüm bu regülasyon mekanizmaları ile *lon* seviyesinin ve proteolitik aktivitesinin düzenlenmesi, bakterilerde Lon proteazların rol aldığı fizyolojik proseslerin sorunsuz işleyişi ve çeşitli stres koşullarına cevap oluşturulmasını sağlaması açısından önem teşkil etmektedir.

3. SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP

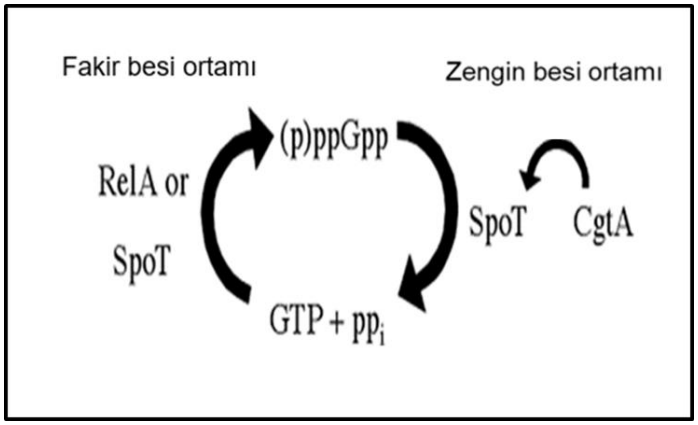
Sürekli değişen çevre koşullarında yaşayan bakteriler; besin kıtlığı, UV ışığı, asit stresi, kuraklık, oksidatif stres, ısı şoku ve osmatik stres gibi pek çok zorlayıcı durumla karşı karşıya kalırlar. Bu koşullar altında hayatta kalabilmelerinin tek yolu ise değişen ortam koşullarına adapte olmaktır [59]. Adaptasyon, gen ekspresyonlarında ve morfolojilerinde gerçekleşen değişimler (spor oluşumu, kemotaksis vb.) ile sağlanmaktadır. Alternatif sigma faktörler, toksin-antitoksin sistemleri, DNA tamiri, düzenleyici sistemler (iki ya da üç bileşenli kontrol mekanizmaları), şaperonlar, sınırlandırılmış cevap (stringent response), CRISPR-cas sistemi ve alarmonlar gen ekspresyonun değişmesiyle çevresel koşullara cevap oluşturulmasında kullanılan sayısız mekanizmadan yalnızca birkaçıdır [59], [60].

Sınırlandırılmış cevap, besin açlığı durumunda transkripsiyonun, replikasyonun ve translasyonun hızlı bir şekilde yeniden düzenlemesi için bakterilere imkan sağlayan korunmuş bir stres cevabıdır [61]. Bu yanıtın amino asit, karbon, nitrojen ve fosfat açlığı ile ısı şoku gibi çeşitli stres koşullarında tetiklendiği bilinmektedir [59].

3.1. Alarmonların Sınırlandırılmış Cevaptaki Rolü

Özellikle amino asit açlığı durumunda tetiklenen sınırlandırılmış cevap mekanizması aracılığı ile yeni çevresel koşullara adaptasyonun sağlanabilmesi için tRNA ve rRNA sentezi durdurulurken protein yıkım işlemleri artmaktadır [5]. Protein yıkımıyla oluşan yeni amino asitler, açlığa uyum sürecinde gerekli olan yeni enzimlerin sentezi için kullanılmaktadır [8]. Tüm bu metabolik değişimler, sınırlandırılmış cevabın tetikleyicileri olan guanozin tetrafosfat (ppGpp) ve guanozin pentafosfat (pppGpp)'ın hücre içinde hızlı bir şekilde birikimi ile gerçekleşmektedir. Alarmonlar [(p)ppGpp] olarak adlandırlan bu anahtar moleküller transkripsiyonu yeniden düzenleyerek değişen koşullara adaptasyonu sağlarlar [4]. Bu sıradışı iki küçük molekül durağan mikroçevrelerde yaşayan bazı hücre içi patojenler ve zorunlu simbiyontlar dışında tüm bakteri türlerinde bulunan Rel/Spo homolog (RSH) ailesinin üyeleri olan RelA ve SpoT proteinleri tarafından sentezlenmektedirler [4], [59].

Açlık ve stresi tetikleyen çeşitli durumlarda, SpoT ve RelA aracılığı ile (p)ppGpp sentezi, bu enzimlerin ATP'den GTP ya da GDP'ye fosforil transferini katalizlemeleri ile gerçekleşmektedir [62]. Karbon, yağ asidi, demir ve fosfat kaynaklarının sınırlı olduğu durumlar ile ozmotik strese cevap olarak alarmon birikimini tetikleyen SpoT, (p)ppGpp sentezinin yanı sıra hidrolizinden de sorumludur [63]. CgtA ile etkileşimi sonucunda aktive olan bu enzimin (p)ppGpp molekülünü pirofosfat (PPİ) ve GDP ya da GTP'ye yıktığı bilinmektedir. Bu durum besinsel sınırlamanın sona erdiği ortamlarda alarmon miktarının azalmasını ve yeterli bir seviyede tutulmasını sağlamaktadır (Şekil 3.1) [62].

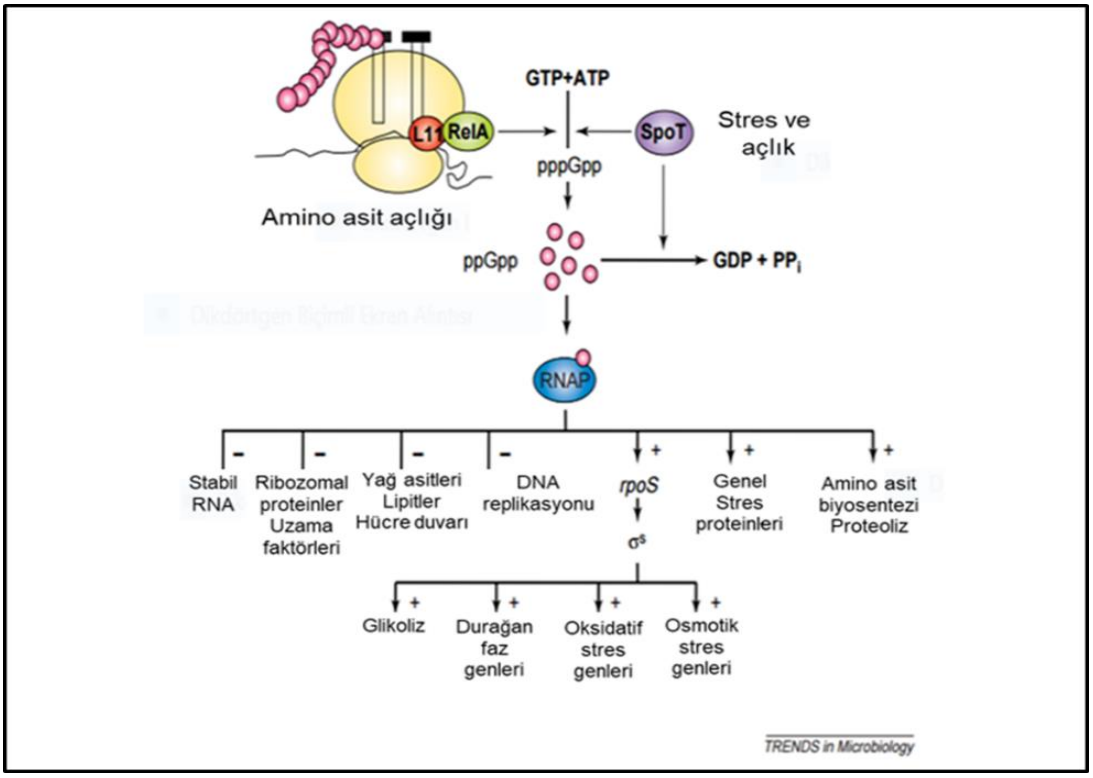


Şekil 3. 1: *Spo*T ve *Rel*A aracılığı ile alarmon sentez ve hidrolizi.

Amino asit açlığı durumunda, yüksüz tRNA'ların birikerek ribozomun A (aminoaçil) bölgesine bağlanması translasyonun durması ile sonuçlanır [64]. RelA proteini, SpoT'den farklı olarak yüksüz tRNA'lara cevap olarak alarmon üretimini gerçekleştirir. Bu bağlanmanın ardından RelA'nın, ribozomal L11 proteini ile etkileşimi sonucunda (p)ppGpp sentetaz domaini aktive olmaktadır [4], [61]. Alarmonlardan ilk olarak pppGpp'nin sentezlendiği ve daha sonra GppA (guanozin pentafosfat fosfohidrolaz) enzimi aracılığı ile ppGpp'ye dönüştürüldüğü bilinmektedir [65].

Büyümenin duraklamasına neden olan çeşitli stres koşulları altında alarmonların, RNA polimeraz (RNAP) ile direkt ya da dolaylı olarak etkileşimi transkripsiyonun pozitif ya da negatif yönde düzenlenmesini sağlamaktadır [4]. ppGpp'nin RNAP'ın β ve β' alt birimleriyle interaksiyona girerek enzimin aktif

bölgesinin yakınına bağlandığı bilinmektedir. Bu durum RNAP ile promotoru arasındaki ilişkiyi etkilemektedir [4], [64]. tRNA ile rRNA sentezinden sorumlu genler ile hücre proliferasyonu ve büyümesinde rol oynayan (*E .coli*'de normal büyüme koşullarının temel sigma faktörü) σ^{70} bağımlı genlerin promotorları ppGpp tarafından negatif olarak düzenlenirken amino asit biyosentezinden sorumlu genler ile besin yetersizliği, oksidatif ve ozmotik stres cevabıyla ilişkili σ^{S} (*E. coli* durağan faz sigma faktörü, RpoS) bağımlı genlerin promotorları ise pozitif olarak düzenlenmektedir [4], [66]. Bu genlerin transkripsiyonunun hızlı bir şekilde baskılanması ve indüklenmesi sınırlandırılmış cevabın en iyi karakterize edilmiş özelliğidir. *E. coli* hücrelerinde sınırlandırılmış cevabın alarmonlar tarafından nasıl kontrol edildiği Şekil 3.2'de özetlenmiştir [4].

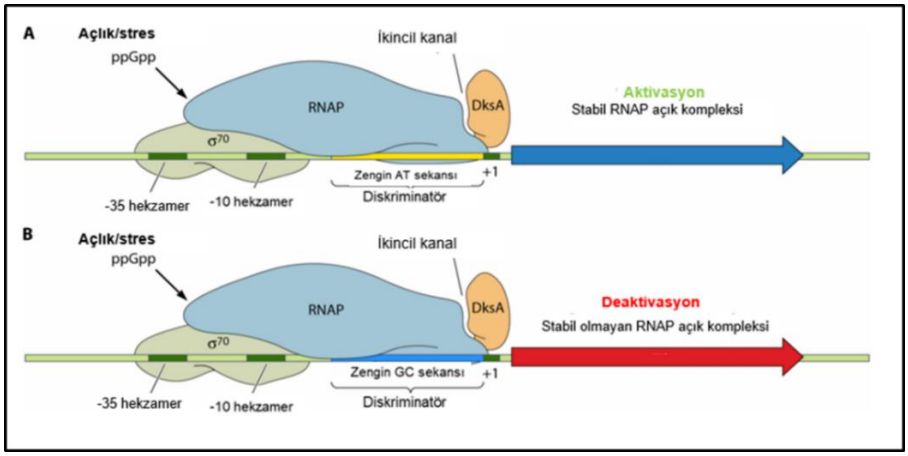


Şekil 3. 2: *E. coli*'de sınırlandırılmış cevabın alarmonlar ile düzenlenmesi.

Sınırlandırılmış cevabın oluşturulması için oldukça önem taşıyan gen ekspresyonu değişikleri, içerisinde pek çok faktörün yer aldığı kompleks mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler alarmonlar, DksA (DnaK supressor A), sigma faktörleri ve RNAP arasında gerçekleşen çeşitli etkileşimler

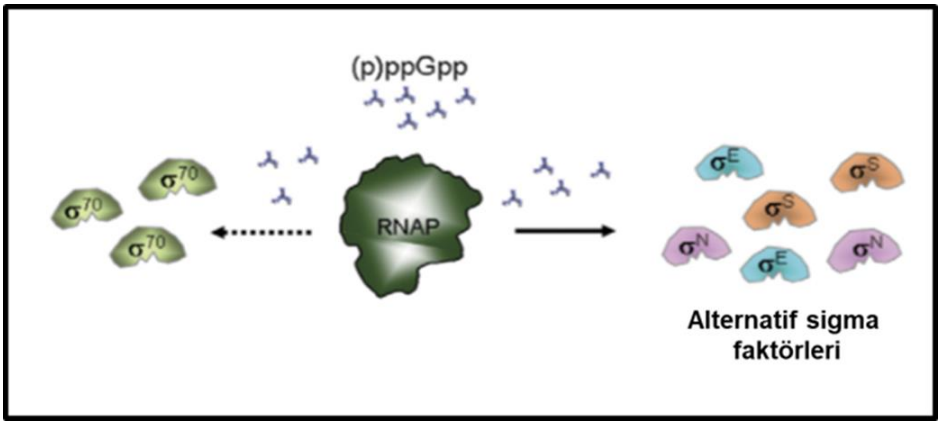
sayesinde olmaktadır [67]. Keşfi alarmonların transkripsiyonu nasıl etkilediğinin anlaşılması açısından oldukça önemli olan DksA, işlevini RNAP'ın ikinci kanalına bağlanarak gerçekleştirir. ppGpp, DksA ile birlikte RNAP ile etkileşim halinde olan promotorlarda transkripsiyonun düzenlenmesine yardımcı olur. RNAP'ın farklı bölgelerini bağlanmalarına ve aralarında herhangi bir fiziksel etkileşim bulunmamasına rağmen DksA, alarmonların etkisini arttırarak bu düzenlenmelerin gerçekleşmesine katkı sağlamaktadır [67], [68], [69].

Değişen çevre koşullarında, alarmonların hangi promotoru baskılaması hangisini uyarması gerektiği önemlidir. Örneğin, amino asit açlığı durumunda ppGpp, DksA ile beraber rRNA ve protein sentezinden sorumlu genlerin promotorları gibi σ^{70} 'nin hedefi olan promotorlarda transkripsiyonun baskılanmasına neden olur [66], [69]. -10 elementi ile transkripsiyonun başlama bölgesi arasında GC bakımından zengin diskriminatör sekansa sahip olan promotorların transkripsiyonun başlangıcı sırasında RNA polimeraz ile kararlı olmayan açık kompleks oluşturdukları bilnmektedir [61], [70]. DksA ile etkileşim halinde olan ppGpp molekülü (ppGpp/DksA) zaten kendiliğinden kararlı olmayan açık kompleksin kararlılığını daha fazla bozarak transkripsiyonun başlamasını engellemektedir (Şekil 3.3 A) [70]. rRNA promotorlarından farklı olarak amino asit biyosentez promotorları AT açısından zengin diskriminatör sekansa sahiptirler. Bu promotorda oluşan açık kompleks, ppGpp/DksA'nın destabilizasyon etkisine karşı koyabilecek güce sahiptir. Bu açık kompleksin kararlılığını git gide arttırması trasnskripsiyonun başlamasını tetikler (Şekil 3.3 B) [70].



Şekil 3. 3: Alarmonların (A) GC bakımından zengin ve (B) AT bakımından zengin sekanslara sahip promotorlarda transkripsiyon üzerindeki doğrudan etkileri.

Transkripsiyonu doğrudan etkileyebilmelerinin yanı sıra dolaylı olarak da etkileyebilen alarmonlar, transkripsiyonun başlangıcı esnasında sigma faktörlerinin kullanımı ile ilgili birtakım değişiklikler meydana getirirler [61], [69]. Besin açlığı durumunda artan ppGpp konsantrasyonu sonucunda RNAP'ın σ^{70}'e olan afinitesi azalırken stres durumunda birikimleri tetiklenen alternatif sigma faktörlerine (σ^{E}, σ^{S} vb.) olan ilgisi artar. Bu RNAP'ın bağlanmak için σ^{70} yerine alternatif sigma faktörlerini tercih etmesine neden olur. Sigma faktör yarışı olarak bilinen bu olay sınırlandırılmış cevabın oluşturulması için gerekli olan pek çok promotorun aktivasyonuyla sonuçlanır (Şekil 3.4) [61].



Şekil 3. 4: Alarmonların transkripsiyon üzerindeki dolaylı etkisi.

Sonuç olarak, alarmonlar stres koşullarına adaptasyonun sağlanması için önemli olan yüzlerce genin ekspresyonunu, DksA proteini ile birlikte promotorların kinetik özelliklerini ve kararlılıklarını etkileyerek doğrudan ya da dolaylı olarak alternatif sigma faktörlerinin kullanımı için RNA polimerazın serbest kalmasını sağlayarak gerçekleştirmektedirler [4], [61], [67], [69].

Sınırlandırılmış cevabın oluşturulmasında anahtar roller oynayan alarmonların, değişen çevre koşullarında canlılığın devamı için gerekli diğer pek çok proseste önemli görevleri mevcuttur. Gen ekspresyonun global regülatörü olarak kabul edilen ppGpp aynı zamanda çeşitli bakteri türlerinde virülans özellikleri ve 'quorum sensing' mekanizmalarının düzenlenmesinde görevlidirler [4], [71]. Bunların yanı sıra DNA tamiri, hücre bölünmesi, lipid sentezi ve polifosfat metabolizmasının düzenlenmesinde de önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir [71], [72] .

3.2 Polifosfat Polimeri ve Sınırlandırılmış Cevaptaki Rolü

Bütün canlılarda bulunan polifosfat (poliP), yüzlerce fosfat molekülünün yüksek enerjili anhidrid bağlarıyla birleşmesinden meydana gelen bir polimerdir [73]. Fosfat rezarvuarı olarak kullanılabilen bu polimer, canlılık için önemli bir enerji deposudur ve bazı kinazlar tarafından ATP yerine kullanılmaktadır [74]. Polifosfat polimerinin sentezi, "polifosfat kinaz" (Ppk) enziminin geri dönüşümlü olarak ATP'nin terminal fosfatını substrat olarak kullanmasıyla gerçekleşirken yıkımı ise endopolifosfataz (Ppn) ve eksopolifosfataz (Ppx) enzimleriyle inorganik fosfata parçalanması ile olmaktadır [6], [7].

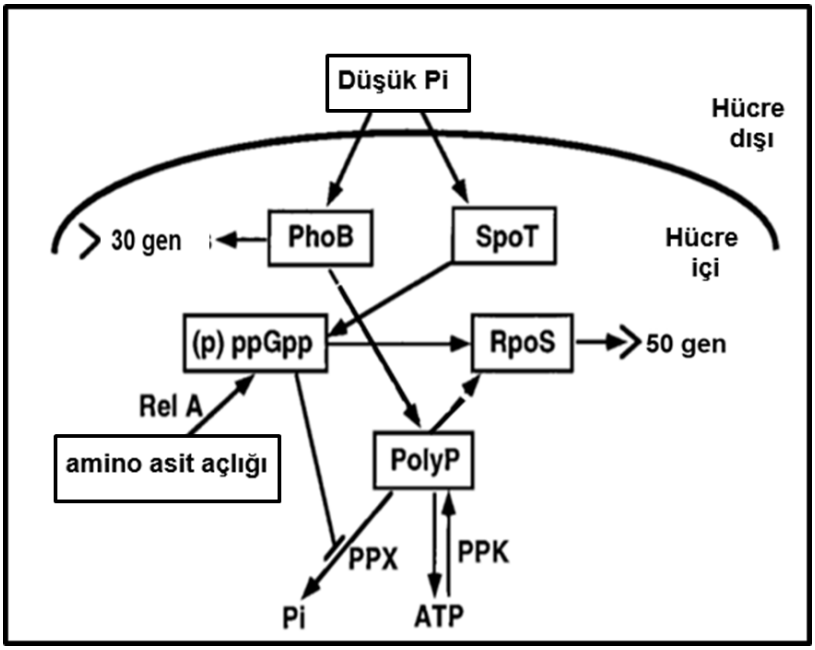
Farklı hücre tiplerinde, çeşitli biyolojik olayların gerçekleşmesi hücredeki poliP seviyesi ile ilişkilidir. Bu polimer bakterilerin sporulasyon, biyofilm oluşumu ve motilite gibi önemli fizyolojik proseslerin düzenlenmesi ile fiziksel ve kimyasal streslere karşı direnç göstermelerinde önemli roller üstlenmektedir [75], [76], [77].

Özellikle amino asit açlığı gibi stres koşullarında devreye giren poliP'ın hücre içinde birkimi sınırlandırılmış cevap mekanizması için oldukça önemlidir [78]. Kuroda ve arkadaşları, *E. coli'* de poliP seviyesinin eksponansiyel fazda oldukça düşük olduğunu ancak aminoasit açlığı durumunda PoliP konsantrasyonunun ciddi oranda arttığını göstermişlerdir [79]. Yine aynı çalışmada, *E. coli rel*A ve *spo*T ikili mutantının açlık durumunda hücre içinde poliP biriktiremediği görülmüştür. Bu durum RelA ve SpoT tarafından sentezlenen alarmonların polifosfat birikimi için gerekli olduğunu göstermektedir. Alarmonların, Ppk'nın aktivitesi üzerinde önemli bir etkisini olmaması ve Ppx aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe etmesi bu birikime neden olmaktadır [78], [79].

Büyüme ortamında yeterli miktarda fosfat bulunmaması *E. coli*'de poliP birikimini tetikleyen bir diğer etkendir. İnorganik fosfatın belirli bir seviyenin altına düşmesinin fosfat regülonu (Pho) tarafından algılanması sonucunda bu regülona ait bir protein olan PhoB'nin aktivasyonu gerçekleşir. Aktive olan PhoB, temel fosfat metabolizmasıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu uyarır [80], [81]. Bakterilerde fosfat açılığında, hücresel metabolizmanın normal işlevi için gerekli serbest fosfat gruplarının oluşmasını sağlayan alkalin fosfataz enzimini kodlayan *pho*A bu genlerden biridir. Buna ek olarak, *E. coli pho*B mutantlarında amino asit açlığına cevap olarak

alarmon birikimi gözlemlenirken poliP birikimi gözlemlenmemiştir [80]. Bu durum, RhoB'nin hücredeki poliP birikimi için gerekli olduğunu göstermektedir.

Özetle, *E. coli*' de poliP birikimi için amino asit açlığı durumunda RelA ve fosfat kıtlığı durumunda SpoT tarafından sentezlenen alarmonlar ile PhoB proteini aracılığıyla gerçekleşmektedir [78], [79], [81]. Biriken poliP, ppGpp ile beraber *E. coli'*de *rpo*S geninin ekspresyonunu uyarmaktadır [82]. Bu uyarımın, durağan büyüme fazında ve organizmanın maruz kaldığı çeşitli stres koşullarında ilgili yanıtın oluşumunda görev alan 50'den fazla genin anlatımı indüklenebileceği öngörülmektedir. Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında polifosfat birikiminin nasıl gerçekleştiği ve bu birikimin hücredeki önemli fonksiyonlarından biri Şekil 3.5'te özetlenmiştir [80].

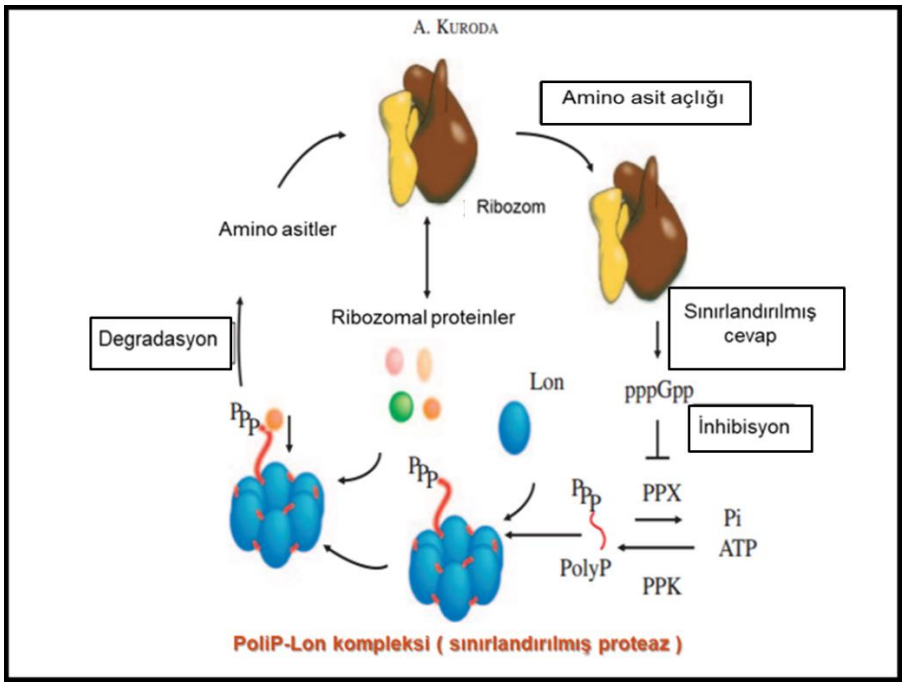


Şekil 3. 5: Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında poliP birikimi.

Polifosfatın sınırlandırılmış cevap mekanizmasındaki rolünün aydınlatılması için yapılan çalışmalardan birinde, PPK enzimini üretmeyen *E. coli* mutantının zengin besiyerinden fakir besiyerine alınması sonucunda normale göre çok uzun bir lag fazı görülürken ortama amino asit eklenmesi ile lag fazının normale çekildiği gözlemlenmiştir [52]. Yine aynı çalışmada, besin kıtlığı durumunda amino asit sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyesinin yaban suşa oranla çok düşük olduğu gösterilmiştir.

Amino asit açlığı ve genel besin kıtlığı durumunda, protein yıkımının arttığı ve böylece çevresel koşullara uyum için gerekli enzimlerin yapımı için amino asit sağlanmaktadır. *E. coli*' de sınırlandırılmış cevap ve protein yıkımı arasında bir köprü görevi gören poliP, Lon proteaz ile bir kompleks oluşturarak bu yıkımda aktif olarak yer almaktadır. poliP'ın spesifik bazı proteinleri yıkması için Lon'u tetiklediği bilinmektedir [8], [52]. Amino asit açlığı durumda serbest ribozomal proteinler Polip-Lon kompleksi için temel subsratlar olmakla beraber bu kompleksin bazı temel nukleoid proteinlerini (HimA, HupA) ve translasyonun başlamasından sorumlu bazı faktörleri degrade edebildiği de bilinmektedir [8], [78].

Kısaca ifade etmek gerekirse, amino asit açlığı durumunda sentezlenen alarmonlar, poliP yıkımından sorumlu Ppx enzimini inhibe ederek, poliP'nin hücrede kısa zamanda birikmesine sebep olmaktadır. poliP'nin Lon proteaza bağlanarak oluşturduğu kompleks (PoliP-Lon kompleksi) ise ribozomal proteinleri yıkarak yeni amino asitlerin oluşumunu sağlamaktadır. Kuroda ve arkadaşları tarafından önerilen bu çalışma ağı Şekil 3.6' da özetlenmiştir [8].



Şekil 3. 6: *E. coli* için önerilen (p)ppGpp, poliP ve Lon proteaz arasındaki çalışma ağı.

4. AKTİNOBAKTERİLER

Aktinomisetler olarak da bilinen aktinobakteriler 15 alt takımdan (*Micromonospora, Frankia, Streptomyces, Corynebacterium* vb.) oluşan en geniş taksonomik birime sahip bakteri filumudur [83]. Gram pozitif bakteriler olan aktinomisetlerin genomları yüksek oranda Guanin+Sitozin (%57-75) baz çifti içermektedir [84]. Anaeroblar, aeroblar, spor oluşturanlar, tek hücreli ve filamentli formlar da dahil olmak üzere birçok farklı fenotipte doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar [85]. Dallanmış hifli yapılar oluşturarak çoğalan aktinomisetler bu özelliklerinden dolayı bakteri ve mantarlar arasındaki geçiş organizması olarak görülmektedirler [83], [86].

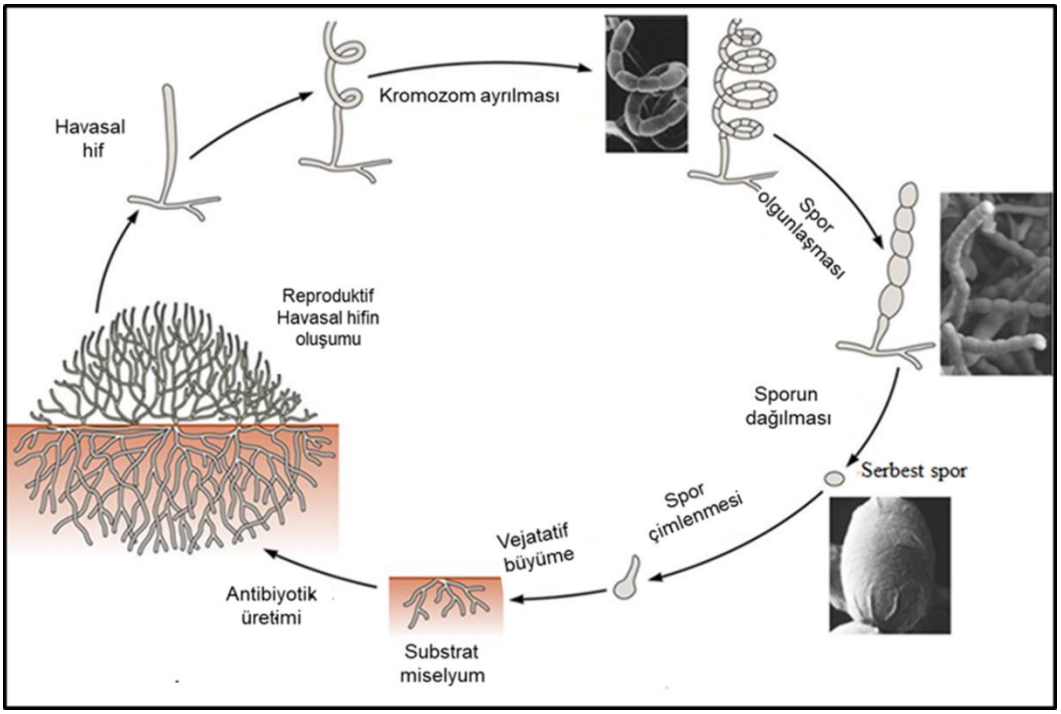
Farklı çevre koşullarına adapte olabilen aktinomisetlerin birçok üyesi toprak ekosisteminde bulunmaktadır. Selüloz, kitin ve pektin gibi çeşitli organik maddelerin ayrıştırılmasında görev alarak toprak ekosisteminin düzenlenmesinde ve karbon döngüsünde önemli rol oynamaktadırlar [83], [85], [86]. Aktinomisetler izole edildikleri ekosisteme göre farklı pH ve sıcaklıklarda çoğalabilirler. Su ekosisteminde bulunan bazı aktinomisetlerin yüksek asidite ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda derin deniz diplerinde üreyebildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte sıcaklıkları 100 °C'ye ulaşan hidrotermal kaynaklarda üreyebilen türler de mevcuttur [83], [86].

Bugüne kadar bilinen 22.000'den fazla antikanser, antiparazitik, antifungal gibi biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin %45'i aktinobakteriler tarafından üretilmektedir [85], [87]. Bu metabolitlerin 8000'den fazlasının antibiyotik olmasının yanı sıra klinik kullanımda olan antibiyotiklerin %50' sinden fazlasının yine aktinomisetler tarafından üretildiği bilinmektedir [85]. Yapılan çeşitli biyoinformatik çalışmaların neticesinde bu bakterilerin 150.000 civarında kimyasal olarak farklı antimikrobiyal madde üretme kabiliyetine sahip olabileceği öngörülmüştür [87]. Bütün bu özelliklerinin yanı sıra aktinobakteriler, biyoyakıt üretimi için hammadde görevi gören basit şekerler üretmek için bitki biyokütlesini parçalayan selülolitik enzimleri de üretebilmektedir. Bu sebeple sürdürülebilir bir biyoenerji endüstrisinin geliştirilmesinde tercih edilen organizmalar olamaya başlamışlamışlardır [85], [88].

4.1. *Streptomyces*'ler

Streptomyces'ler bugüne kadar 843 tür ve 38 alt tür ile Actinobacteria filumu altında en çok çalışılan bakterilerdir [83]. Büyüklüğü türlere göre değişkenlik gösteren uzun lineer genomları ortalama %70 oranında Guanin+Sitozin baz çifti içermektedir. Çok hücreli miseller oluşturarak çoğalan bu mikroorganizmalar suda yaşayan türlerinin olmasına karşın ağırlıklı olarak toprak ekosisteminde yaşamaktadırlar [88], [89]. Ayrıca programlı hücre ölümü ve sporulasyonu içeren kompleks yaşam döngüleri sebebiyle 'çok hücreli prokaryotik model olarak' görülmektedirler [83].

Katı besi ortamında büyütülen *Streptomyces* hücresi, yaşam dögüsü süresince substrat ve havasal miselyum olmak üzere iki farklı misel yapısı gözlemlenmektedir. Spor çimlenmesinin ardından oluşan genç miselyumların programlı hücre ölümünden kurtulan kısımları çok sayıda nükleoid içeren ikincil miselyum yapısını oluşturmaktadır. Sonrasında bu yapı bölünmüş hiflerden oluşan substrat miselyumlarına dönüşür [83], [89]. Substrat miselyumlar ise havaya doğru büyüyen dallanmış çok nükleoidli havasal miselyumlara farklılaşır [88]. Morfolojik farklılaşma esnasında, ölmekte olan substrat misellerinden antimikrobiyal etki gösteren sekonder metabolitler salınmaktadır. Bu metabolitlerin, besin maddeleri için rekabet eden diğer organizmaların gelişimini engellediği bilinmektedir [83],[89]. Spor çimlenmesi ile başlayan *Streptomyces* yaşam döngüsü hidrofobik spor zincirlerinin oluşumu ile sonlanmaktadır (Şekil 4.1) [83].



Şekil 4. 1: *Streptomyces*'lerin yaşam döngüsü.

Sıvı besi ortamında ise bazı *Streptomyces* türlerinin (*S. coelicolor*, *S. griseus* vb.) pellet ve küme oluşturarak büyüdükleri gözlemlenmiştir [90]. Katı besiyerindekine benzer biçimde, çimlenen spor hücreleri genç vejetatif misel yapıları oluşturur. "Birincil miselyum" olarak da adlandırılan bu genç miseller pellet oluşumunu başlatır. Zamanla hücre yoğunluğu artar ve pellet merkezindeki hücreler ölmeye başlar (programlı hücre ölümü) ve büyüme durur. Sonrasında oluşan çok nukleoidli yeni miselyumun (ikincil miselyum) pellet içerisinde ve çevresindeki gelişimi sonucunda ikinci büyüme fazına geçilmesiyle sekonder metabolit üretimi de başlamış olur [90], [91].

4.1.1 *Streptomyces*'lerin Antibiyotik Üretim Yeteneği

Yakın zamanda yapılan çalışmalar genomlarında çoğu ifade edilmeyen (kriptik) pek çok metabolit biyosentetik gen kümeleri bulunduran *Streptomyces*'lerin 30' dan fazla sekonder metaboliti üretebilme kapasitesinde olduklarını göstermiştir [92], [93]. Bu gen kümeleri aracılığı ile ticari antibiyotiklerin %75'i dahil olmak üzere immünosüpresan ilaçlar, herbisidler ve antikanser ajanları gibi farklı özellikler gösteren biyoaktif bileşikleri sentezleyebilme yetenekleri Streptomycetes'leri

biyoteknolojik ve medikal açıdan vazgeçilmez organizmalar kılmaktadır [83], [93]. *S. coelicolor*'ın yaban tipi olan "A3(2)" suşu ve ondan lineer SCP1 (365 kb) ile dairesel SCP2 (31 kb) plazmitlerinin çıkarılmasıyla elde edilmiş olan "M145" suşu antibiyotik üretiminin regülasyonu için yapılan pek çok bilimsel çalışmada model organizma olarak kullanılmaktadır [94]. Tümü dizilenmiş olan *Streptomyces coelicolor* genomunda metabolit üretiminden sorumlu 29 tane biyosentetik gen kümesinin bulunduğu belirlenmiştir [92], [94]. *S. coelicolor* A3(2) tarafından üretilen farklı kimyasal karakterlere sahip 5 çeşit antibiyotik tanımlanmıştır. Bunlardan en fazla çalışılmış olanı Aktinorhodin (ACT), bir poliketit türevi benzoizokromanquinon yapısında olan ve ortamın PH seviyesine göre mavi ya da mor renkte olabilen bir antibiyotiktir [95]. Bir diğer antibiyotik ise kırmızı pigmentli olan pirol bazlı Undesilprodigiosin (RED)'dir. Bunlara ek olarak, SCP1 plazmitinin üzerinde bulunan *mmy* genleri tarafından kodlanan Metilenomisin (MM), nonribozomal peptit sentetazlar aracılığı ile üretilen kalsiyum bağımlı antibiyotik (CDA) ve bir poliketit türevi olan kriptik *(cpk*) gen kümesi tarafından sentezlenen sarı renkli coelimycin (*y*CPK) *S. coelicolor* tarafından üretilen diğer antibiyotiklerdir [83], [95].

4.1.2. *Streptomyces*'lerde Sekonder Metabolizmanın Düzenlenmesinden Sorumlu Moleküler Mekanizmalar

Sekonder metabolit üretiminin regülasyonu oldukça karmaşık bir proses olup, birçok farklı düzenleyici protein ailesi ile çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyal moleküllerini içermektedir [14]. Bakteriler tarafından sinyal olarak algılanan çeşitli iyonların, alarmonların ve reaktif oksijen türlerinin sekonder metabolit gen kümelerinin ekspresyonları üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir [12], [96], [97].

Streptomyces genomunda bulunan sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu genler, boyutları birkaç ile 100 kb arasında değişen kümeler halinde düzenlenmiştir [14], [94]. Örneğin, *S. coelicolor*'da Aktinorhodin (ACT) biyosentezinden sorumlu *act* gen kümesi 22 tane genden (Sco5070-5092) oluşmaktadır. Bu gen kümesi tarafından kodlanan ActII-ORF4, *Streptomyces* antibiyotik regülatör protein ailesinin (SARPs) bir üyesidir [95], [98]. Bu transkripsiyonel aktivatör, *act* gen kümesinin içinde bulunan hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanarak ACT üretiminin düzenlemesinde

görev almaktadır [14], [95]. Bunun yanı sıra, *actII*-ORF4 geninin promotor bölgesi ise farklı görevlere sahip çeşitli düzenleyici proteinler için bir hedef niteliğindedir. AdpA (antibiyotik üretimi ve gelişimin pleiotropik regülatörü), AbsA2 (antibiyotik sentezinin global baskılayıcıs), DasR (N-asetil glukozamin cevabının aracısı) ile DraR ve AfsQ1 (azot fazlalığı durumunda yanıt oluşturan aktivatörler) bu düzenleyici proteinlerden bazılarıdır [95], [99], [100]. Bu proteinlere ek olarak, antibiyotik sentezinin global regülatörü olarak kabul edilen AtrA'nın *actII*-ORF4'ün promotoruna ek olarak ACT öncülü olan asetil-CoA'nın metabolizması ile ilgili hedeflere de bağlandığı bilinmektedir [101].

S. coelicolor tarafından sentezlenen bir diğer antibiyotik olan Undesilprodigiosinin (RED) üretimi, ACT üretimine benzer bir şekilde düzenlenmektedir. RED biyosentezinden sorumlu gen kümesi (Sco5877-5899) aralarında RedD transkripsiyonel aktivatörünü kodlayan genin (*redD*) de bulunduğu 22 tane genden oluşmaktadır [98]. RedD'de tıpkı ActII-ORF4 gibi SARP protein ailesinin bir üyesi olup *red* biyosentetik genlerini aktive etmekten sorumludur [14], [95]. Yine aynı gen kümesinde yer alan diğer düzenleyici protein RedZ, *redD*'nin aktivasyonundan sorumludur. DasR ve AfsQ1 proteinlerinin doğrudan *redZ* promotoruna bağlandığı bilinmektedir [100], [101].

Sürekli değişen çevresel koşullarda yaşayan bakterilerde pek çok düzenleyici protein ailesi gibi iki bileşenli kontrol sistemleri de sekonder metabolizmanın regülasyonu için oldukça önemli olup içerdikleri sensör kinazlar ve regülatör proteinler aracılığı ile çeşitli stres sinyallerine cevap verilmesini sağlamaktadırlar [102]. *S. coelicolor*'da 70'e yakın sayıda bulunan bu kontrol sistemlerinin (AbsA1A2, PhoPR, DraRK vb.) stres ile tetiklenerek antibiyotik üretiminin transkripsiyonel düzeyde regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir [14], [95], [102], [103].

Sözü edilen tüm bu düzenleyici mekanizmalara ek olarak, *Streptomyces*'lerde kromozom üzerinde toplu halde bulunan ikincil metabolit biyosentez genlerinin ifadelerinin koordine edilmesi hücrenin büyüme fazı ile de yakından ilişkilidir [104]. Katı besi ortamında besinsel sınırlamalar ile tetiklenen sekonder metabolit üretimi, morfolojik farklılaşmanın başlangıcında (havasal misellerin oluşumu) gerçekleşirken sıvı besiyerinde ise büyümenin durağan evresinde ikincil miselyumlar aracılığı ile gerçekleşmektedir [91], [105]. Bu evredeki hücrelerde kültür ortamındaki besiyerinin azalması, pH'nın değişmesi gibi etkenlerin yarattığı stres sekonder metabolit üretimini

tetiklemektedir [106]. Farklı düzenleyici proteinlerin görev aldığı sekonder metabolit üretimi için farklılaşma ve sporulasyon süreçlerini kontrol eden *whi* ve *bld* genlerinin de gerekli olduğu bilinmektedir. Bu durum hücrenin yaşam döngüsünü etkileyen herhangi bir stres koşulunun sekonder metabolit üretimini de etkileyebileceğini göstermektedir [90], [107].

4.1.3. *Streptomyces*'lerde Sınırlandırılmış Cevap, Lon Proteaz ve Antibiyotik Üretimi Arasındaki İlişki

Streptomyces'lerde birçok faktör tarafından kontrol edilen ikincil metabolit üretimini etkileyen bazı genlerin tespit edilmesi ve karakterizasyonuna rağmen, farklı çevresel ve besin ile ilgili sinyalleri birleştirerek biyosentetik genlerin ekspresyonunu değiştiren düzenleyici ağlar konusunda yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır [14], [95].

Bakterilerde ikincil metabolit üretimi ortamdaki azot, karbon, fosfor ve aminoasit gibi besin kaynakları azalıp stres oluşmaya başladığında tetiklenmektedir [106]. Besin açlığı durumunda bakterilerin ürettiği sınırlandırılmış cevap alarmonlarının [(p)ppGpp] *Streptomyces*'lerde ikincil metabolit biyosentezini uyardığı bilinmektedir [12], [14]. Alarmon sentezinden sorumlu *rel*A geninden yoksun suşlarla yapılan çalışmalar, *Streptomyces'*lerde alarmonlarının antibiyotik sentezini tetiklediğini göstermektedir. Alarmonların bu etkiyi, RNA polimerazın, antibiyotik biyosentez genlerinin promotorlarını tanıyan sigma faktörlerine olan afinitesini arttırarak sağladığı düşünülmektedir [12]. Azot bakımından fakir bir ortamda, *S. coelicolor* A3(2) suşuyla yapılan bir çalışmada ise Δ*rel*A mutantlarında redD ve actII-ORF4 transkripsiyonun baskılanması sonucunda ACT ve RED antibiyotiklerinin üretiminin azaldığı gösterilmiştir

Alarmon sentezi ile tetiklenen poliP birikimi, sınırlandırılmış cevapla karakterize edilen bir diğer özelliktir [52]. Literatürde, hücre için önemli bir enerji kaynağı olan polifosfat ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkinin aydınlatılmaya çalışıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, poliP üretiminden sorumlu temel gen olan *ppk* genin silinmesi ile oluşturulan mutant *S. lividans* suşunda ACT üretiminin arttığı gösterilmiştir [109]. Bu durum, hücre için önemli bir enerji kaynağı olan PoliP'ı sentezleyemeyen mutant suşun enerji açlığı ile

baş edebilmek adına antibiyotik sentezi için de kullanılan NADH, NADPH ve karbonilin üretiminden sorumlu yolakları aktive etmesi ile ilişkilendirilmiştir [109], [110].

Bunların yanı sıra, poliP'ın Ppx enzimi ile yıkımı sonucunda oluşan inorganik fosfatın antibiyotik üretim yolaklarını baskıladığını öngören bir çalışmada, *S. lividans*'ın büyütüldüğü kültür ortamına dışarıdan eklenen inorganik fosfatın sekonder metabolit üretimini engelleyici bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir [111]. Yine aynı mikroorganizma ile yapılan bir diğer çalışmada iki bileşenli PhoR-PhoB kontrol sisteminin delesyonu sonucunda azalan alkalen fosfataz seviyesi ve buna bağlı olarak oluşan düşük fosfat konsantrasyonunda ACT ve RED üretiminin arttığı gösterilmiştir [112]. Tüm bunlar, poliP metabolizmasındaki herhangi bir değişikliğin hücrede genel stres durumu yarattığı ve ikincil metabolizmayı tetiklediğine işaret etmektedir.

Önemli stres yanıt mekanizmalarından biri olan sınırlandırılmış cevap sürecinde alarmonlar ile hızlı bir şekilde biriken poliP, *E. coli* hücrelerinde serbest ribozomal proteinleri yıkması için Lon proteazı tetiklemektedir [8]. Bu mekanizmanın yanı sıra hücre için hayati önemi olan pek çok fizyolojik proseste de görevleri bulunan Lon proteazın, aynı zamanda bakterilerin hücresel faklılaşma süreçlerinde rol alması ve önemli bir stres cevap regülonunun bir parçası olması onu ikincil metabolit üretimini etkileyebilecek önemli bir aday yapmaktadır [34]. Ancak bilgimiz dahilinde literatürde, Lon proteazı antibiyotik üretimi ile ilişkilendiren yalnızca tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Whistler ve arkadaşları, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 suşunda Lon proteazın pyoluteorin üretimini negatif olarak etkileyen global bir regülatör olduğunu keşfetmişlerdir. Lon'un bu etkiyi pyoluteorin biyosentez geninin transkripsiyonu için gerekli olan bir sigma faktörünü ya da antibiyotik üretiminin pozitif bir regülatörünü degrade ederek sağladığı öne sürülmüştür [113].

E. coli'de öngürülen Lon proteaz, (p)ppGpp ve poliP arasındaki çalışma ağının medikal ve biyoteknolojik açıdan önemli mikroorganizmalar olan *Streptomyces*'lerde olup olmadığının belirlenmesi ve bu ağ içerisinde gerçekleşen etkileşimlerin ikincil metabolizmayı nasıl etkilediğinin aydınlatılması oldukça önemli bir konudur. Bu hedef kapsamında laboratuvarımız bünyesinde gerçekleştirilen çalışmalardan birinde, genomuna fazladan 1 kopya *lon* geni entegre edilen rekombinant *S. coelicolor* A3(2) suşu elde edilmiştir. Lon proteazın sekonder metabolizma üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan antibiyotik ölçümleri neticesinde rekombinant suşta

aktinorhodin üretiminde yaban suşa kıyasla 34 katlık, undesilprediogisin üretiminde ise 9 katlık bir artış gözlemlenmiştir [15]. Bir diğer çalışmada ise poliP sentezinden sorumlu temel genden yoksun *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşu elde edilmiş ve aktinorhodin üretiminde yaban tipe kıyasla 8,5 katlık bir artış gözlemlenmiştir [137]. Bunlara ek olarak, *rel*A geninin yüksek düzeyde ifade edildiği rekombinant bir *S. coelicolor* A3(2) suşunun oluşturulduğu bir çalışmada ise hücre içindeki (p)ppGpp seviyesinin arttırılmasında görevli olan RelA proteinin fazla miktarda üretiminin sekonder metabolizmayı tetiklediğine dair önemli bulgular elde edilmiştir [138].

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında, hücredeki fizyolojik proseslerde hayati role sahip Lon proteazı fazla üreten rekombinant *Streptomyces coelicolor* suşunda *lon* geni ile beraber sınırlandırılmış cevap (*rel*A), polifosfat metabolizması (*ppk*), ikincil metabolit üretimi (*act*II-ORF4, *red*K) ve stres bağlantılı (*sig*B) genlerin transkripsiyonel analizleri yapılarak bu karmaşık regülasyon ağının aydınlatılması amaçlanmıştır. Yine aynı amaç doğrultusunda antibiyotik üretiminde önemli artışların gözlemlendiği *S. coelicolor* M145 Δ*ppk suşunun* genomuna ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilerek bir mutant suş oluşturulmuş ve Lon proteazın antibiyotik üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Pepton (Bacto^{TM}), NaCl (Sigma-Aldrich), Maya özütü (Bacto^{TM}), Agar (Merck), NaOH (Merck), SDS (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), D (+) Glukoz (Merck), KOAc, İzopropanol, Agaroz (Sigma Aldrich), RedSafe (İntron), Sükroz (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), MOPS (Sigma Aldrich), Gliserol (Riedel de Haen), $CaCl_2$ (Merck), $MgCl_2$ (Merck), KCl (Riedel de Haen), KCl (Riedelde Haen), Asetik asit (Riedel de Haen), %99.5 Etanol (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), K_2HPO_4 (Merck), K_2SO_4 (Merck), TES Buffer (Applichem), D (+) Glukoz (Merck), Mannitol (Merck), Bacto kazamino asit (BD), EDTA (Merck), %84-88 Gliserol (Sigma Aldrich).

5.1.2. Kullanılan Enzimler

Bu çalışma süresince kullanılan enzimler ile kurulan kimsayal reaksiyonlar üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan enzimler; Phusion DNA Polimeraz (Thermo Scientific), Q5 DNA polimeraz (NEB, Biolabs), Pfx® Platinium DNA Polimeraz (Invitrogen), *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific) T4 DNA ligaz (Jena Bioscience), *Eco*RI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific), *Sph*I Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific), *Sac*I Restriksiyon Endonükleaz (NEB, Biolabs), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma), Klenow Fragment (Merck) ve Deoksiribonükleaz I (Thermo Scientific) enzimleridir.

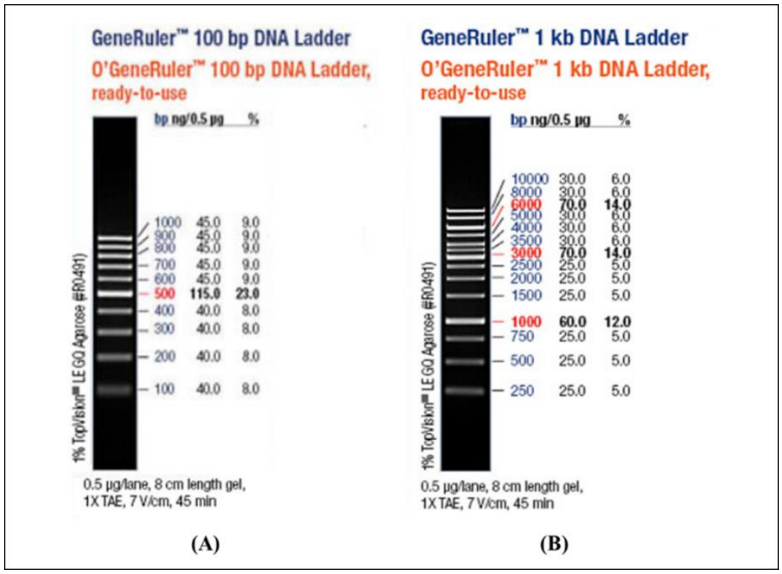
5.1.3. Kullanılan Kitler

Total RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için ‘’NucleoSpin RNA Plus’’ izolasyon kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılmıştır. İzole edilen RNA

örneklerinden iScript cDNA sentez kiti (Bio-rad, ABD) ile cDNA sentezlenmiştir. SYBR Green qPCR Master Mix (Bio-rad, ABD) ile RT-qPCR çalışmaları gerçekleştirilerek gen ifadesi analizi yapılmıştır. Bu kitlere ek olarak, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere izole edilen plazmitlerin temizlenmesinde ve DNA'ların jelden saflaştırılması işlemlerinde PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon kitinden (Macherey-Nagel, Almanya) faydalanılmıştır.

5.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Bu çalışmada DNA bant boyutlarının belirlenmesi ve RNA zincirinin bütünlüğünün tespit edilmesi için kullanılan moleküler DNA belirteçleri Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Çalışmada kullanılan moleküler DNA belirteçleri. A) 100 bç Moleküler DNA Belirteci (SM0311, Thermo Scientific); B) 1 kb Moleküler DNA Belirteci (SM0241, Thermo Scientific)

5.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları

Çalışmada kullanılan tüm hücre suşları Tablo 5.1'de listelenmiştir.

Tablo 5.1: Çalışmada kullanılan *E. coli* ve *S. coelicolor* suşları.

Bakteri türleri	Genotip	Referans
***E. coli* suşları**		
E. coli DH5α	F– *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17 (rK–, mK+), *sup*44, *rel*A1λ, (σ80 dL*ac*ZAM15), D (*lac*ZYA-*arg*F) U169	[114]
E. coli DH5α +pRA*lon*	pRA*lon* rekombinant plazmitini taşıyan suş	[15]
E. coli DH5α +pRAlon^{Str}	pRA*lon* rekombinant plazmitini taşıyan suş	Bu çalışma
E. coli ET12567/pUZ8002	*dam, dcm, hsdS, cat, tet*	[115]
ET12567/pUZ8002+ pRAlon^{+Str}	pRA*lon* rekombinant plazmitini taşıyan suş	Bu çalışma
***S. coelicolor* suşları**		
S. coelicolor A3(2)	Prototrofik yaban tip	[116]
S. coelicolor A3(2) + pRA*lon* (Sco-pRA*lon*)	pRA*lon* rekombinant plazmitini taşıyan suş	[15]
S. coelicolor M145	A3(2)'den SCP1 ve SCP2 plazmitleri çıkarılmış suş	[94]
S. coelicolor M145 Δ*ppk*	*ppk* geninden yoksun suş	[137]
S. coelicolor M145 Δ*ppk* + pRAlon^{+Str}	pRAlon^{+Str} rekombinant plazmitini taşıyan suş	Bu çalışma

5.1.6. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin büyütülmesi için hazırlanan besiyerleri ve içerikleri Tablo 5.2'de listelenmiştir.

Tablo 5.2: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

BESİYERİ	İÇERİK
Luria Bertani (LB) Besiyeri	10 g NaCl, 10 g tripton ve 5 g maya özütü dH_2O ile 1 L'ye tamamlanarak 121°C'de 20 dakika boyunca steril edilir.
Luria Bertani (LB) Agar Besiyeri	1 L LB besiyeri, 15 g agar bulunan cam şişeye eklenir ve ardından 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilir.
2xYT Broth	16 g Difco Bacto tripton, 10 g Difco Bacto maya özütü ve 5 g NaCl dH_2O ile 1 L'ye tamamlanır. Tüm bileşenler manyetik karıştırıcıda iyice çözüldükten sonra 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanır.
Tripton Soya Besiyeri (TSB)	30 gr %3 Oxoid Tripton Soya besiyeri tartılıp son hacmi 1 L olacak şekilde dH_2O ile çözülür ve 121°C'ta 20 dakika steril edilir.
Tripton Soya Agar (TSA)	1 L TSB besiyeri, 15 gr agar bulunan cam şişeye eklenir ve ardından 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilir.
R2YE Besiyeri	103 g sükroz, 0.25 g K_2SO_4, 10.12 g $MgCl_2.6H_2O$, 10 g glikoz ve 0.1 g kazaminoasit ve 22 gr agar (%2.2) tartılıp son hacmi 800 ml olacak şekilde dH_2O ile tamamlanır. Tüm besiyeri bileşenleri manyetik karıştırıcı yardımı ile tamamen çözülüp ardından 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanır. Otoklavlanan her 160 ml besiyerine sırasıyla aşağıda belirtilen steril kimyasallar eklenir. -1 ml KH_2PO_4 (% 0.5), -16 ml $CaCl_2.2H_2O$ (% 3.68), -3 ml L-Prolin (% 20), -20 ml TES Tamponu (% 5.73), - 0.4 ml İz Element Solüsyonu -1 ml NaOH (1N)
R2YE Agar Besiyeri	160 ml besiyeri 4.4 g agar (%2.2) bulunan cam şişelere eklenerek 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanır ve sterilize edilmiş gerekli kimyasal maddeler ilave edilerek besiyeri kullanıma hazır hale getirilir.
Maya özütü-Malt özütü Besiyeri (YEME)	3 g Difco maya özütü, 5 g Difco Bacto-pepton, 3 g Oxoid malt özütü, 10 g glukoz ve 340 g sükroz dH_2O ile 1 L'ye tamamlanarak. 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanır.
TBO Besiyeri (pH 6.5)	20 g salça, 20 g yulaf ve 25 g agar son hacim 1 L olacak şekilde dH_2O ile tamamlanır ve 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanır.
Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)	20 g mannitol, 20 g soya unu ve 20 g agar eşme suyu ile 1 L'ye tamamlanır. Besiyeri hazırlanırken ilk aşamada, mannitol çeşme suyunda çözülür ve 2 g agar, 2 g soya unu içeren 250 ml'lik cam şişelere 100'er ml olacak şekilde bölünür. İki defa üst üste 115°C'de 15 dakika otoklavlanır. Otoklavın ardından steril 5 mM $MgCl_2.6H_2O$ ilave edilerek besiyeri kullanıma hazır hale getirilir.

5.1.7. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışılan *E. coli* ve *S. coelicolor* suşlarının büyütülmesi için hazırlanan besiyerlerine gerekli durumlarda çeşitli antibiyotikler eklenmiştir. Uygun çözücüler kullanılarak hazırlanan antibiyotikler filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, konsantrasyon değerleri ve çözücüleri ile birlikte Tablo 5.3'te gösterilmiştir.

Tablo 5.3: Kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	**Stok konsantrasyon (mg/ml)**	***E. coli*'de kullanılan konsantrasyon (µg/ml)**	***S. coelicolor*'da kullanılan konsantrasyon (µg/ml)**	**Çözücü**
Apramisin (Apr)	50	50	50	dH_2O
Kanamisin (Kn)	50	50	50	dH_2O
Kloramfenikol (Chl)	50	25	-	%100 Etanol
Nalidiksik asit (NA)	25	-	25	0.15 M NaOH
Streptomisin (Str)	50	-	50	dH_2O

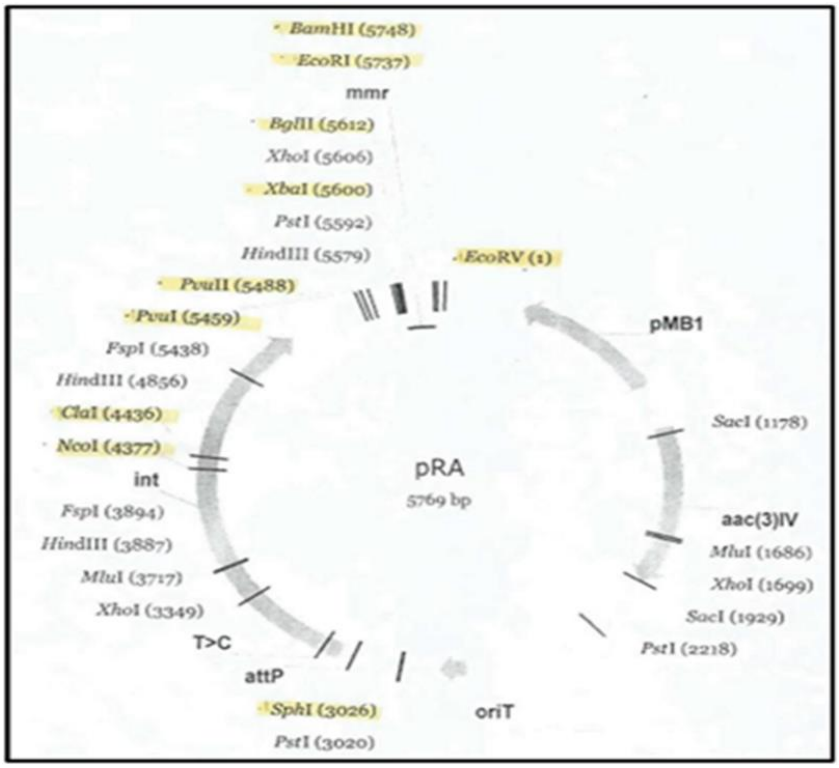
5.1.8. Kullanılan Plazmitler

Çalışmada kullanılan plazmitler Tablo 5.4'te gösterilmektedir.

Tablo 5.4: Deneylerde kullanılan plazmitler.

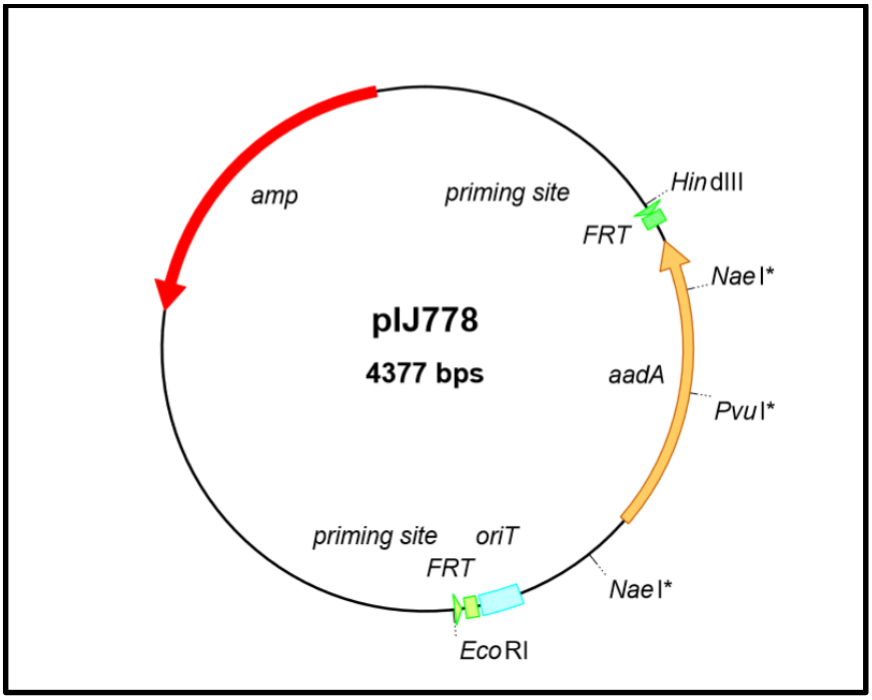
Plazmitler	**Dirençlilik belirteci**	**Dirençlilik**	***ori*T**	**Boyut**	**Referanslar**
pUZ8002	*neo*	Kanamisin	+	70 kb	[117]
pIJ778	*aad*A	Streptomisin Spektinomisin	+	4377 bç	[118]
pRA	*aac*(3)IV	Apramisin	_	5769 bç	[119]
pRA*lon*	*aac*(3)IV	Apramisin	_	9166 bç	[15]
pRA*lon*$^{+Str}$	*aad*A	Streptomisin	_	9840 bç	Bu çalışma

Çalışmada kullanılan plazmitlerden biri olan pRA (Şekil 5.2), pSET152'den türetilmiş *E. coli-Streptomyces* mekik vektörüdür ve üzerinde apramisin direnç geni (*aac*(3)IV) taşımaktadır. İntegrative özelliğe sahip olan bu vektör sayesinde aktarılmak istenen genin tek kopyası kromozoma yerleşebilmektedir [119]. Entegrasyonun, pRA vektöründe bulunan ϕC31 *int*/*att*P bölgesi ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bu bölge aracılığı ile *Streptomyces* genomunda bulunan *att*B bölgesine (yaklaşık 34 bç), aktarılmak istenen geni taşıyan rekombinant plazmit genomu sokulabilmektedir [120].



Şekil 5.2: pRA mekik vektörü (5769 bç).

Kullanılan bir diğer plazmit pIJ778'in (Şekil 5.3) üzerinde, streptomisin/ spektinomisin direç geni (*aad*A) ve RP4 plazmidinin *ori*T bölgesi bulunmaktadır [118].



Şekil 5.3: pIJ778 plazmiti.

5.1.9. Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 5.5'te belirtilmiştir. Çalışılan solüsyonlar ve tamponlar 121°C'ta 20 dakika boyunca otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo 5.5: Kullanılan çözeltiler.

Kullanılan Çözeltiler		
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) 1 mM EDTA (pH 8) **Solüsyon I** •25 mM 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 **20X SSC (pH 7)** •3 M NaCl •0.3 M Sodyum sitrat **STE+ Lizozim** •%103 sükroz •25 mM Tris-HCl (pH 8) •25 mM EDTA (pH 8) •2 mg/ml Lizozim **CTAB/NaCl Solüsyonu** •%10 CTAB •0.7 M NaCl	**Lizis Solüsyonu** •0.3 N NaOH •%2 SDS **STET Tamponu** •%10.3 Sükroz •25 mM Tris-HCl pH 8 •25 mM EDTA **İz Element Solüsyonu** •40 mg $ZnCl_2$ •200 mg $FeCl_3.6H_2O$ •10 mg $CuCl_2.2H_2O$ •10 mg $MnCl_2.4H_2O$ •10 mg $Na_2B_4O_7.10H_2O$ •10 mg $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$

5.1.10. 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), 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 Heraus), Çalkalamalı İnkübator (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystems), Mikrodalga Fırın (Samsung), Spektrofotometre (Bio-rad, Smartspec 3000), Econo UV Monitör (Bio-rad), PCR Cihazı (Applied Biosystems), StepOnePlus™ Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems), 'NanoDrop Lite' Spektrofotometre Cihazı (Thermo Scientific).

5.2. Yöntemler

5.2.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

Sambrook ve arkadaşlarının yöntemine uygun olarak *E. coli* DH5α hücrelerinden plazmit izole edilmiştir. Plazmit izolasyonu aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir [121]. Plazmit izole edilecek *E. coli* DH5α hücreleri antibiyotiklerin eklenmiş olduğu 100 ml LB'de 37°C'ta 12-16 saat büyütülmüştür. 100 ml'lik hücre kültürü, 50'şer ml'lik iki tane falkon tüpe alınarak oda sıcaklığında 4500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak her bir hücre pelleti üzerine 600 µl solüsyon I eklenerek vorteks işlemi uygulanmıştır. Elde edilen pellet ve solüsyon I karışımı, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra her bir ependorfta 200'er µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Her 200 µl'lik karışımın üzerine 400 µl solüsyon II (taze hazırlanmış) eklenerek 5 dakika boyunca buzda bekletilmiş ve dakikada bir ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından her bir ependorfa 300 µl solüsyon III ilave edilerek her 2 dakikada bir yavaşça karıştırılarak 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben karışımlar 14000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatantlar yeni ependorflara aktarılmıştır. Her bir ependorf içerisindeki süpernatantların üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenerek yaklaşık bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 25°C'ta 11000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası süpernantlar uzaklaştırılak her bir hücre pelleti 25 µl dH_2O'da çözülmüştür. Elde edilen çözeltiler 100'er µl olacak şekilde yeni ependorflarda birleştirilmiş ve her birininin üzerine 7 µl RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37°C'ta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

Gerçekleştilen tüm bu işlemlerin ardından elde edilen plazmit, ‘PCR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon Kiti (MN) yardımıyla kolondan geçirilerek saflaştırılmıştır.

5.2.2. Streptomisin Direnç Geninin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Bu çalışma kapsamında, streptomisin direnç geni (*aad*A) seçici markör olarak belirlenmiştir. pIJ778 plazmidinin *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile kesimi sonucunda, seçici streptomisin kaseti elde edilmiştir. Jelden izole edilen kaset, streptomisin direnç geninin çoğaltılması için gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Bu kasede uyumlu olarak tasarlanan primerler ise Tablo 5.6’da gösterilmektedir. PCR 25 µl’lik hacimde, Q5 DNA polimeraz kullanılarak üretici firmanın önerdiği reaksiyon bileşenleri (Tablo 5.7) ve reaksiyon koşullarına (Tablo 5.8) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan amplikonun boyutu 1425 bç’dir.

Tablo 5.6: Seçici streptomisin kasedi ile uyumlu primerler.

F (ileri) primer	5’ ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC 3’
R (geri) primer	5’ TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3’

Tablo 5.7: Q5 DNA polimeraz PCR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	**Kullanılan Hacim**
5X Q5 reaksiyon tamponu	5 µl
5X Q5 high GC enhancer	5 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0.5 µl
Primer F (10 µM)	1.25 µl
Primer R (10 µM)	1.25 µl
Kalıp DNA	1 µl
Q5 DNA polimeraz	1 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	Son hacim 25 µl’ye tamamlanır.

Tablo 5.8: Q5 DNA polimeraz reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	10 dakika	1
Denatürasyon Primer bağlanma Uzama	98 60 72	10 saniye 30 saniye 30 saniye	35
Son uzama	72	2 dakika	1
Saklama	4	∞	

5.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yöntemi ile agaroz jelde DNA bant boyutları belirlenmiş ve RNA zincirinin bütünlüğü tespit edilmiştir. Agaroz jel, istenilen yoğunluğuna bağlı olarak (%0.8, %1.5 ve %2) belirlenen miktardaki toz agarozun 1X TAE tamponu içerisine eklenmesi ile hazırlanmış ve ardından mikrodalga fırında çözülmüştür. Agaroz çözeltisi oda sıcaklığında soğutularak üzerine 6 µl/100 ml olacak şekilde RedSafe (20.000X) boyası eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından çözelti, kasete dökülüp oda sıcaklığında bekletilerek polimerize edilmiştir. Nükleik asit örnekleri, 6X DNA yükleme boyası ile son hali 1X olacak şekilde karıştırılıp uygun moleküler DNA belirteci ile birlikte hazırlanan jele yüklenmiştir. Örnekler, içerisinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankında, 80-100 Volt'ta, 50-60 dakika yürütülmüş ve ardından UV ışık altında görüntülemiştir.

5.2.4. *S. coelicolor'* dan Kromozomal DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan tüm *S. coelicolor* suşlarından, Hopwood ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak genomik DNA izole edilmiştir [116]. Kromozomal DNA izolasyonu aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek gerçekleştirilmiştir. 50 ml R2YE besiyerine *S. coelicolor* suşuna ait stok spor solüsyonundan 100 µl inoküle edilerek hücreler 2 gün boyunca 30°C'ta ve 220 rpm'de büyütülmüştür. Hazırlanan bu ön kültürden 100 ml YEME besiyerine 1/10 oranında ekim yapılmış ve hücreler 48

saat boyunca 30°C'ta 220 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 2 günlük inkübasyonun ardından hücreler 50 ml'lik falkonlara alınarak oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası hücre pelletleri 8 ml TE tamponu içersinde vorteks yardımı ile çözülmüş üzerlerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Bu işlemi takiben 500 µl %20 SDS ve 500 µl (10mg/ml) RNaz eklenen örnek 37°C'ta 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnek üzerine l.5 ml 5 M NaCl ve 1.2 ml CTAB/NaCl (65°C) solüsyonu eklenerek 65°C'de 10-25 dakika bekletilmiştir. İnkübasyonu takiben bir süre oda sıcaklığında bekletilerek soğutulan örnek eşit hacimde kloroform:izoamilalkol CIA (24:1) solüsyonu ile muamele edildikten sonra oda sıcaklığında 11000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir falkona alınmış ve 1:1 oranında fenol:CIA (25:24:1) eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kere tekrarlandıktan sonra yeni bir falkona alınan üst faz üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenerek yaklaşık 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında, 4000 rpm'de, 30 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmış ardından süpernatant uzaklaştıralarak pellet kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan pellet 2 ml TE tamponunda çözülerek 1'er ml olacak şekilde ependorflara dağıtılmıştır. Örneklerin üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol CIA (24:1) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 11.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir falkona alınmış ve 1:1 oranında fenol: CIA (25:24:1) eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından ependorflara bölüştürüleren üst faz üzerine 3 kat etanol ilavesi yapılmış ve gece boyu -20°C'de bekletilmiştir. Bu işlemin ardından 4°C'ta14000 rpm' de 30 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet kurutulmuş ve dH_2O' da çözülmüştür.

5.2.5 DNA Fragmentlerinin Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden saflaştırılmasında 'PCR Temizleme (cleanup) Jel Ekstraksiyon'kitinden (MN) faydanılmıştır. Bu işlem üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

5.2.6. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

S. coelicolor ve *E. coli* hücrelerinden izole edilen plazmit ve kromozomal DNA'ların, klonloma ve doğrulama çalışmalarında kullanılmak üzere restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlarda üretici firmalarının tavsiye ettiği konsantrasyon ve koşullara uyularak önerilen tamponlar kullanılmıştır. Plazmitler 2-4 saat süre ile kesilirken, *S. coelicolor* kromozomal DNA'larının kesimleri gece boyu devam etmiştir.

5.2.7. Klenow Reaksiyonu

Yapılan enzim kesimi sonrasında plazmitlerde oluşan 3'-uçlar, Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirilmiştir. Reaksion detayları Tablo 5.9'da gösterilmiştir.

Tablo 5.9: Klenow Reaksiyonu.

Reaksiyon Bileşenleri	Protokol
-60 µl kesilmiş plazmit (pRA*lon*) -10 µl SacI tamponu -2 µl (10 mM) dNTP mix (karışımı) -2 µl Klenow Fragment (Merck) -26 µl dH_2O	37 °C'ta 15 dakika ⇨ İnkübasyon 75 °C'ta 15 dakika ⇨ İnhibisyon

5.2.8. Ligasyon

Ligasyon işlemi Sambrook ve arkadaşlarının kullandıkları yönteme uygun olarak gerçekleştirilmiştir [121]. İlk aşamada, plazmit (vektör) ve genin (insört) kurulacak ligasyon reaksiyonlarında konsantrasyonlarının ne kadarının kullanması gerektiği aşağıda belirtilen eşitlik 5.1 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$ng\ (insört) = \frac{ng\ (vektör) \times insört(kb)}{vektör\ (kb)} \quad (5.1)$$

Ligasyon reaksiyonları, vektör:insört oranı, 1:3, 1:5 ve 1:10 olacak şekilde kurulmuştur. Belirlenen oranlarda vektör ve insört karışımları hazırlanarak üzerlerine 1'er µl T4 DNA ligaz enzimi ve tamponu eklenerek son hacim dH_2O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 14-16 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

5.2.9. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli hücrelerinin kompetant hale getirilmesinde Sanders Laboratuvarında geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [122]. Kompetan hücreler aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek hazırlanmıştır. İlk aşamada, *E. coli* hücrelerinden seçilen tek koloni 10'ar ml LB besiyerlerine ekilerek 37°C'ta 180 rpm'de gece boyunca çoğaltılmıştır. Elde edilen bu ön kültürden 1:100 oranında, 50 ml antibiyotiksiz LB besiyerine ekim yapılarak 37°C'ta, 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince hücre yoğunluklarındaki artış, düzenli aralıklarla spektrofotometrik ölçümlerle takip edilmiştir. 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (OD600) 0.4-0.5 aralığına ulaşan kültürler 4°C'ta, 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletler buza alınarak 40 ml TfbI solüsyonunda çözülmüştür. Çözelti buz içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra 4°C'ta, 3000 rpm'de, 8 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletler tekrar buza alınarak 1 ml TfbII ile çözülmüştür. Bu işlemin ardından hücreler, buzda bekletilen ependorf tüplerine 100'er ul olacak şekilde pay edilerek sıvı azot içinde dondurulmuş ve hızlıca -80°C'a kaldırılmıştır.

5.2.10 Kimyasal Transformasyon Yöntemi

Ligasyon sonucunda elde edilen DNA'lar, alıcı *E. coli* DH5α hücrelerine Sambrook ve arkadaşlarının kullandığı kimyasal transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır [121]. İlk aşamada -80°C'de muhafaza edilen kompetan hücreler (100'er µl) buza alınarak her hücreye 5 µl ligasyon ürünü eklenmiştir. Elde edilen karışım buz

içerisinde 25-30 dakika bekletilmiş ardından 42°C'ta, 45 saniye su banyosunda tutulmuştur. Isı şokunun ardından hücreler hızlı bir şekilde buz içerisine alınarak 2 dakika daha bekletilmiştir. Bu işlemleri takiben her bir hücrenin üzerine 800 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklenmiş ve hücreler 180 rpm'de 37°C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her bir seçici LB katı besiyerine (50 µg/ml streptomisin içeren) 200'er µl ekilen hücreler 37°C'ta gece boyu üremeye bırakılmıştır.

5.2.11. *E. coli* DH5α Transformantlarının Taranması

Olası rekombinant plazmiti taşıyan *E. coli* DH5α transformantlarının tespitinde antibiyotik içeren seçici besiyerinden yararlanılmıştır. Transformasyon sonrasında seçici besiyerinde oluşan tek kolonilerden doğru olanların tespiti için miniprep plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları kurulmuş ve ilgili genlere özgü primerler ile doğru koloniler belirlenmiştir.

5.2.11.1. Miniprep Plazmit İzolasyonu Yöntemi

Miniprep plazmit izolasyonu, Holmes ve arkadaşlarının kullandığı yöntem ile gerçekleştirilmiştir [123]. Bu yöntem kapsamında ilk aşamada, transformasyon sonrası oluşan tek kolonilerin bir kısmı 1'er ml LB + Str besiyerine ekilerek gece boyu büyütülmüşlerdir. Sonrasında hücreler, 4°C'ta 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılmış ve pelletler, 250'şer µl STET ile vortekslenerek hızlıca çözünmüştür. Bu işlemi takiben 45 saniye kaynar suda bekletilen örnekler ardından 4°C'ta 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Protein ve hücresel atıkların bulunduğu pellet kısmı steril kürdan yardımı ile uzaklaştırılmış ve sıvı faz yeni ependorflara aktarılmıştır. Her bir ependorf tüpüne 250 µl izopropanol ilave edilmiştir. 2-3 saat süren inkübasyonun ardından izopropanol tamamen uzaklaştırılarak pelletler 25'er µl dH_2O ile çözünmüştür.

5.2.11.2. Rekombinant Plazmitin Doğruluğunun PCR ile İspatlanması

Seçici besiyerinde büyüyen transformantlardan izole edilen plazmitlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarında, *lon* ve *aad*A genlerine özgü primerler (Tablo 5.10) kullanılmıştır. PCR, Bölüm 5.2.2'de belirtilen şekilde üretici firmanın önerdiği reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşullarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Primer bağlanma sıcaklıkları *lon* primeri için 55°C iken *aad*A primeri için 60°C'dır.

Tablo 5.10: Rekombinant plazmitin doğrulanmasında kullanılan *lon* ve *aad*A genleri ile uyumlu primerler.

Gen	**Oligonükleotid dizisi 5'⟶3'**	**Amplikonun büyüklüğü (bç)**
lon-F	GGTACACCGAGTGCAAGAT	1114 bç
lon-R	GTCGTAGTTGTCCGTGAAGT	
*aad*A-F	AGCTGGTGAAGGAGTACA	750 bç
*aad*A-R	TCAGGAACGGCGAGTAG	

5.2.12. Rekombinant Plazmitin Metilasyon Sistemi Olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarımı

E. coli DH5α hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmit (pRA*lon*$^{+Str}$), *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine elektroporasyon yöntemi kullanılarak transfer edilmiştir [118]. Elektroporasyonun ilk aşamasında, 100'er µl elektrokompetan hücrelere ~100-200 ng/µl rekombinant plazmit eklenerek soğuk elektroporasyon küvetlerine alınmıştır. Sonrasında elektrokompetanlar, Bio-Rad GenePulser II elektroporatöründe *E. coli* için kayıtlı olan bir programa göre (200 Ω, 25 µF ve 2.5 kV) elektrik akımına maruz bırakılmışlardır. Akım uygulanması sonucunda, 'time constant' değeri 4.5-4.9 ms aralığında çıkmıştır. Bu değer beklenen aralığın içindedir ve yöntemin başarılı bir şekilde gerçekleştiğine işaret etmektedir. Elektroporasyonu takiben hücrelere 700 µl antibiyotik içermeyen soğuk LB besiyeri eklenmiş ve ardından her bir hücre steril ependorflara aktarılmıştır. 37°C'ta 1 saat boyunca inkübe

edilen hücreler, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve Str (50 µl/ml) içeren LB katı besiyerlerine ekilerek 37°C'ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.13. Rekombinant Plazmitin *S. coelicolor* 'a Konjugasyon ile Transferi

Metilasyon sisteminden yoksun özel bir suş olan *E. coli* ET12567/pUZ8002 içerisinde bulunan pRA*lon*$^{+Str}$ plazmiti, *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşuna Gust ve arkadaşlarının kojugasyon yöntemi ile aktarılmıştır [118]. *E. coli* ET12567/pUZ8002/ pRA*lon*$^{+Str}$ hücresi, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve Str (50 µg/ml) içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C'ta gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu ön kültüründen, aynı antibiyotikleri içeren 50 ml LB besiyerine, 1/100 oranında ekim yapılmış ve hücreler 37°C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince hücre yoğunluklarındaki artış, düzenli aralıklarla spektrofotometrik ölçümlerle takip edilmiştir. 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (OD600) 0.4'e ulaşan kültürler 4°C'ta, 3000 rpm'de, 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından hücreler 2 kez 10'ar ml antibiyotiksiz LB besiyeri ile yıkanıp 5 ml LB'de çözülmüştür. Yıkama işlemleri esnasında, her bir konjugasyon denemesi için 500µl 2xYT besiyerine 10^8, 10^7 ve 10^6 sayılarında *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* sporu ilave edilmiş ve sporlar 50 °C'ta 10 dakika boyunca sıcaklık şokuna maruz bırakılmışlardır. Sonrasında oda sıcaklığında soğutulan sporlar ile 0.5 ml *E. coli* ET12567/pUZ8002/ pRA*lon*$^{+Str}$ hücreleri karıştırılarak, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantın büyük bir kısmı dökülerek hücreler kalan sıvıda (~50 µl) çözülmüştür. Bu işlemi takiben 10^{-1}-10^{-4} aralığında seyreltilen hücrelerin 100'er µl'si alınarak antibiyotik içermeyen R2YE katı besiyerlerine ekilmiştir. 30°C'ta 16-20 saat inkübasyonun ardından her bir petri 1.5 doz streptomisin (75 µg/ml) ve tam doz nalidiksik asit (25 µg/ml) antibiyotikleri içeren 1 ml dH_2O ile kaplanmış ve inkübasyona devam edilmiştir.

5.2.14. Rekombinant Plazmit Entegrasyonun PCR ile Doğrulanması

İntegrative bir vektör olan pRA'nın *S. coelicolor* genomu üzerinde bulunan attB bölgesine girerek aktarılmak istenen genin tek kopyasını kromozoma entegre

edebildiği bilinmektedir [119], [120]. pRA*lon*$^{+Str}$ plazmitinin (9840 bç) genoma entegre olduğunu ispatlamak için *S. coelicolor* genomunun *att*B bölgesine özgü tasarlanan primerler (Tablo 5.11) ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Olası rekombinant suşlar ile *S. coelicolor M145* ve *S. coelicolor M145* Δ*ppk* suşlarından izole edilen genomik DNA'lar ise kalıp olarak kullanılmıştır. Phusion DNA polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarının bileşenleri ve koşulları Tablo 5.12 ve 5.13'te belirtilmiştir.

Tablo 5.11: *att*B bölgesi ile uyumlu primerler.

Gen	**Oligonükleotid dizisi 5' ⟶ 3'**	**Amplikonun büyüklüğü (bç)**
*att*B-F	GGGTGCCAGGGCGTGC	~ 10000 bç
attB-R	TACGCGCCCGGGGAGCCC	

Tablo 5.12: Phusion DNA polimeraz PCR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	**Kullanılan Hacim**
10X Phusion reaksiyon tamponu	2.5 µl
dNTP karışımı (10mM)	2.5 µl
Primer F (25 µM)	1.25 µl
Primer R (25 µM)	1.25 µl
Phusion DNA polimeraz	1 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	Son hacim 25 µl'ye tamamlanır.

Tablo 5.13: Phusion DNA polimeraz reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	10 dakika	1
Denatürasyon Primer bağlanma Uzama	98 (63,67) 72	30 saniye 30 saniye 400 saniye	40
Son uzama	72	3 dakika	1
Saklama	4	∞	

5.2.15. Total RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

S. coelicolor A3(2) ve Sco-pRA*lon* hücrelerine ait 200'er µl spor TSB besiyerinde 30°C'ta iki gün boyunca büyütülmüştür. Elde edilen ön kültürlerden eşit miktarda yaş ağırlığa sahip hücre pelletleri alınarak R2YE besiyerine inoküle edilmiştir. Bakterilerin inokülasyonlarını takiben 24., 36., 48., 60., 72. ve 96. saatlerde total RNA izolasyonu için 5'er ml örnek alınmıştır. Ependorflara 1,25 ml olacak şekilde paylaştırılan örnekler +4°C'ta 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra iki kez TE tamponu ile yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından hücre pelletleri sıvı azot ile muamele edilip daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ta muhafaza edilmiştir.

Total RNA izolasyonu gerçekleştirilecek hücre pelletlerine ~ 200 µl TE tamponu ve ~70 µl lizozim (10 mg/ml) ilave edilerek örnekler 37°C'ta 60 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Eklenen TE tamponu ve lizozim ile izolasyonda kullanılacak pellet miktarı (1/4 veya 1/5) örneklerin toplandığı saatlere göre değişkenlik göstermektedir. İnkübasyonu takiben ''NucleoSpin RNA Plus'' izolasyon kiti (MN) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

TE tamponunda çözüldükten sonra lizozim ile muamele edilen hücre pelleti, üzerine 350 µl LBP (lizis tamponu) ilave edilerek oda sıcaklığında 4-5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen hücre lizatı, genomik DNA'dan arındırılmak için özel bir kolona (NucleoSpin® gDNA Removal Column) transfer edilerek 30 saniye 11.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Kolondan geçen sıvının üzerine 100 µL BS (RNA-bağlama

solüsyonu) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilen karışım RNA'nın bağlanabilmesini sağlayan bir kolona (NucleoSpin® RNA Plus Column) aktarılarak 15 saniye 11.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından kolon, yeni bir toplama tüpene alınarak üç defa yıkama işleminden geçirilmiştir. İlk olarak, kolona 200 µL WB1 (1 numaralı yıkama tamponu) eklenerek 15 saniye 1.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Aynı işlem bu defa 600 µL WB2 (2 numaralı yıkama tamponu) eklenerek tekrar edilmiştir. Son olarak, 250 µL WB2 eklenenen kolon 11.000 x g'de 2 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi sonlandırılmıştır. Yıkama işlemleri sonrasında, kolon nükleaz içermeyen ependorfa alınıp üzerine 30 µL RNaz-içermeyen H_2O eklenerek 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem tekrarlanmasının ardından RNA izolasyonu tamamlanmıştır. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve OD 260/280 oranları ''NanoDrop Lite'' spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Ardından %2'lik agaroz jelde yürütülen izolatlar UV ışık altında görüntülenmiş ve RNA zincirinin bütünlüğü tespit edilmiştir. Kantitasyonun ardından RNA'lar DNaz uygulaması ve cDNA sentezinde kullanılmak üzere alikotlanarak -80°C'ta saklanmıştır.

5.2.16. DNaz Muamelesi

RNA örneklerinin içindeki olası DNA kontaminasyonu, deoksiribonükleaz I enzimi kullanılarak elimine edilmiştir. Reaksiyon, üretici firmanın önerdiği protokol üzerinde yapılan bazı değişiklikler sonrasında Tablo 5.14'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Başarısızlıkla sonuçlanan pek çok denemenin ardından kit protokolünde belirtilen inkübüsyon sürelerinin ve sıcaklıkların arttırılması ile genomik DNA kontaminasyonu giderilebilmiştir.

Tablo 5.14: Dnaz I reaksiyonu.

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**
RNA	300 ng
10X $MgCl_2$ içeren reaksiyon tamponu	1 µl
Deoksiribonükleaz I	1 µl
RNaz içermeyen dH_2O	Son hacim 10 µl'ye tamamlanır.

Tüm reaksiyon bileşenleri karıştırılıp, 37°C'ta 1 saat 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından reaksiyon tüpüne 1 µl 50 mM EDTA eklenerek 72°C'ta 20 dakika bekletilmiş ve DNaz inhibe edilmiştir.

5.2.17. İzole Edilen RNA'larda Genomik DNA Kontaminasyonun Kontrolü

DNaz uygulamasının ardından genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek amacıyla (referans gen) *hrd*B genine özgü primerler (Tablo 5.15) kullanılarak RNA PCR yapılmıştır. PCR 25 µl'lik hacimde, *Taq* DNA polimeraz kullanılarak firmanın önerdiği reaksiyon bileşenleri (Tablo 5.16) ve reaksiyon koşullarına (Tablo 5.17) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kontrol PCR'ından elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek örneklerin DNA'dan tamamen temizlenip temizlenmediği belirlenmiştir. Herhangi bir ürün alınması, RNA örneklerinin DNA ile kontamine olduğunu gösterdiğinden tekrar DNaz muamelesi yapılmıştır.

Tablo 5.15: *hrd*B genine özgü primerler.

Gen	**Oligonükleotid dizisi 5'⟶3'**	**Amplikonun büyüklüğü (bç)**
*hrd*B-F	CTCTTCCTGGACCTCATCCA	543
*hrd*B-R	GTACACCTTGCCGATCTCGT	

Tablo 5.16: *Taq* DNA polimeraz PCR bileşenleri.

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

Tablo 5.17: *Taq* DNA polimeraz reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon Primer bağlanma Uzama	95 59.5 72	15 saniye 30 saniye 30 saniye	40
Son uzama	72	3 dakika	1
Saklama	4	∞	

5.2.18. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden, spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre 300 ng kullanılarak "iScript cDNA Synthesis Kit" (Bio-rad, ABD) ile cDNA sentezlenmiştir. Kit prosedürü uyarınca, ilk aşamada her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanan PCR tüplerine belirlenen konsanstrasyonlarda RNA konularak üzerlerine 4 µl 5X reaksiyon karışımı [oligo(dT) ve random hexamer primer] eklenmiş ve nükleaz içermeyen dH_2O ile son hacim 19 µl'ye tamamlanmıştır.

Bu şekilde hazırlanan örnekler, primer dimeri ve saç tokası yapısının oluşumunun önlenmesi için 70°C'ta 5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında 2-3 dakika buzda bekletilmiştir. Bu işlemin ardından her bir tüpe 1'er µl iScript ters transkriptaz enzimi eklenmiştir. Ayrıca her cDNA sentezinde, kullanılan reaktiflerin kontaminasyonunu belirlemek için RNA kalıbı hariç tüm reaktifleri içeren bir kontrol (Non Template Control: NTC) de kullanılmıştır.

Son hacimleri 20 µl olan reaksiyon karışımları PCR cihazına yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı ilk olarak primerlerin bağlanması için 25°C'ta 5 dakika ardından ters transkripsiyonun gerçekleşmesi için 46°C'ta 60 dakika ve son olarak ters transkriptaz inaktivasyonu için 85°C'ta 5 dakika boyunca inkübe edilmiş ve cDNA sentezi tamamlanmıştır.

5.2.19. Sentezlenen cDNA Örneklerinin Kontrolü

Sentezlenen cDNA'lardan *Taq* polimeraz kullanılarak *hrd*B genine özgü primerler (Tablo 5.15) ile Ters-Transkriptaz PCR (RT-PCR) yapılmıştır**.** PCR, Bölüm 5.2.17'de belirtilen şekilde üretici firmanın önerdiği reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşullarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak PCR ürünleri jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

5.2.20. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR, RT-qPCR)

RT–qPCR için kullanılan primerler (Tablo 5.18), primer 3 programı ve "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" nin Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlanmıştır. Seçilen ileri (F) ve geri (R) primerlerin kendi kendilerine homodimer ya da birbirleriyle heterodimer oluşturmadıklarından emin olmak için her bir primer çifti OligoAnalyzer Tool (IDT) programı ve DNA Star programı altında yer alan Primer Select aracılığıyla kontrol edilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi için (52.5°C, 55.0°C, 57.5°C, 60.0°C, 62.5°C ve 65.0°C) Gradient PCR yapılmıştır. Farklı sıcaklık koşullarında, *Taq* DNA polimeraz ile üretici firmanın önerdiği şekilde (Bölüm 5.2.17) gerçekleştirilen PCR'da, *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sı ise kalıp olarak kullanılmıştır.

*lon, act*II-ORF4*, red*K, *sig*B, *ppk* ve *rel*A genlerinin anlatım düzeyleri SYBR Green temelli gerçek zamanlı PCR analizi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Rölatif kantitasyon çalışmalarında referans gen olarak *gyr*A *ve hrd*B genleri kullanılmış ve *S. coelicolor* A3(2) suşuna ait RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar ise pozitif kalibratör olarak tanımlanmıştır. Gen ifadesindeki değişim $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır [124].

RT-qPCR çalışmalarında SYBR Green qPCR Master Mix (Bio-rad, ABD) ile StepOnePlus™ Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılmıştır. RT-qPCR, kitin önerdiği reaksiyon hacmi ve konsantrasyonu ile döngü şartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 5.19 ve 5.20).

Tablo 5.18: RT-qPCR'da kullanılan primer dizileri.

Gen	Oligonükleotid dizisi 5' ⟶ 3'	Amplikonun büyüklüğü (bç)
*gyr*A-F	GGTACACCGAGTGCAAGAT	89 bç
*gyr*A-R	GTCGTAGTTGTCCGTGAAGT	
lon-F	AGCTGGTGAAGGAGTACA	135 bç
lon-R	TCAGGAACGGCGAGTAG	
*act*II-ORF4-F	GAGCTGCGGCTTTTTGGAAT	101 bç
*act*II-ORF4-R	TGCGAAATTACCAGGGACCG	
*red*K-F	GCAAGGACTTCGTGATCGAG	103 bç
*red*K-R	GCGTTGGAGACGTAGAGCAG	
*sig*B-F	GGAGTTGTCGAAGCTGTTCTT	110 bç
*sig*B-R	GTTCATCTCGATCAGCGTGTT	
*rel*A-F	GTCACCAAGCTGGACAAGGT	196 bç
*rel*A-R	CGTAGATCTCCAGGGTCTCG	
ppk-F	GACCTCTCCGACCTGTTCAA	129 bç
ppk-R	GTGGTGCTGGATCTCCTTGT	
*hrd*B-F	TGCCTTCCTGGACCTCAT	86 bç
*hrd*B-R	GAACTTGTAGCCCTTGGTGTAG	

Tablo 5.19: RT-qPCR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim
SYBR Green supermix (2X)	10 µl
cDNA (30 ng)	3 µl
Primer F (10 µM)	0.8 µl
Primer R (10 µM)	0.8 µl
Nükleaz içermeyen dH_2O	8.4 µl
	Son hacim 20 µl'ye tamamlanır.

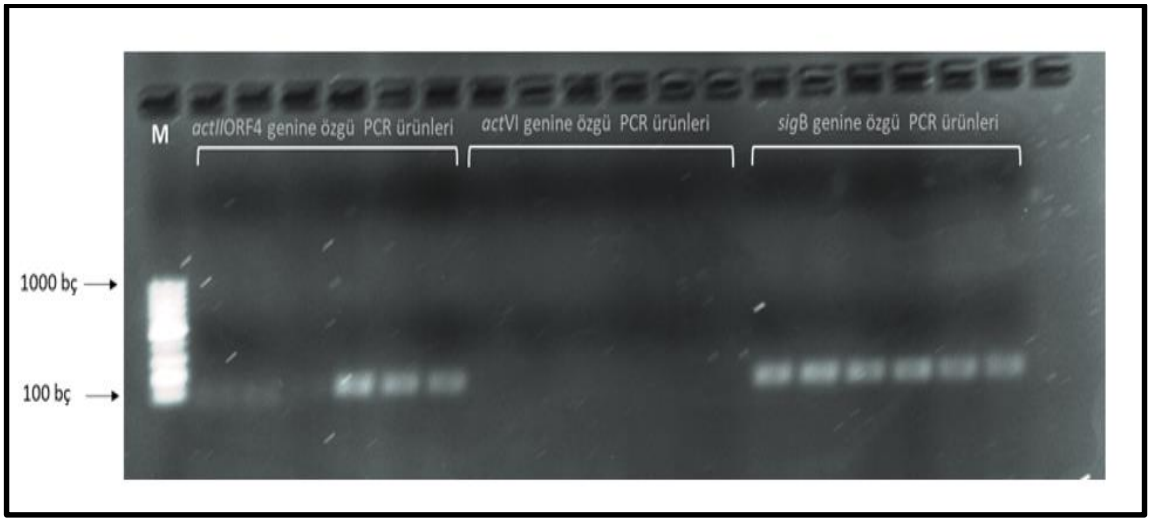
Tablo 5.20: RT-qPCR döngü şartları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon Primer bağlanma Uzama	95 60 60	15 saniye 30 saniye 30 saniye	40
Erime eğrisi	55-95	Her 0.1°C sıcaklık değişiminde ölçüm	1

6.BULGULAR

6.1. Genomunda Ekstra 1 Kopya *lon* Geni Bulunan Mutant Suşta Antibiyotik Üretimi, Sınırlandırılmış Cevap, Polifosfat Metabolizması ve Stres Bağlantılı Genlerin İfadesi

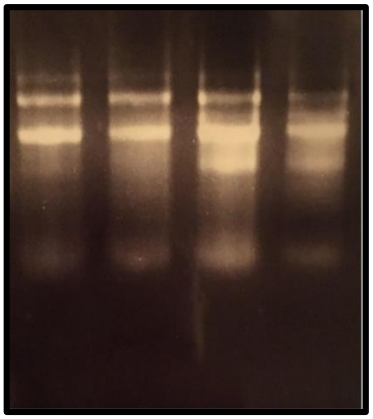
Laboratuvarımızda daha önce yapılmış bir çalışma kapsamında, *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin genomuna ekstra 1 kopya *lon* proteaz geni entegre edilmiş ve bu rekombinant *S. coelicolor* suşuna Sco-pRA*lon* ismi verilmiştir [15]. Bu tez çalışmasında, *S. coelicolor* A3(2) ve Sco-pRA*lon* suşlarında ikincil metabolit üretimi, sınırlandırılmış cevap, polifosfat metabolizması ve stres bağlantılı genlerin ifadelerinin ölçülerek karşılaştırılması amacıyla *lon, act*II-ORF4, *act*VI, *red, red*K, *rel*A, *spo*T, *sig*B, *ppk, ppx* genleri seçilmiştir. RT-qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen genlere göre tasarlanan tüm primerler *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sı ile farklı sıcaklık koşullarında denenmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı, PCR ürünlerine ait en iyi DNA bantlarının görüldüğü 60°C olarak belirlenmiştir. Yapılan Gradient PCR sonuçlarının bir kısmı örnek teşkil etmesi açısından Şekil 6.1'de verilmiş olup aktinorhodin biyosentetik gen kümesinde bulunan *act*VI genine özgü primer ile herhangi bir PCR ürünü elde edilemediği gözlemlenmiştir. Sonuç alınamayan tüm primerler tekrar tasarlanmış ve gradient PCR ile yeniden kontrol edilmiştir. Ancak farklı koşullar altında ve farklı DNA polimerazlarla yapılan tüm denemelere rağmen *act*VI, *ppx, spo*T ve *red*D genine özgü tasarlanan primerler ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir.



Şekil 6. 1: RT-qPCR için hazırlanmış primerlerle, genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Gradient PCR sonuçları. **M:** 100 bç'lik moleküler DNA belirteci. (Her bir primer için sırasıyla 52.5°C, 55.0°C, 57.5°C, 60°C, 62.5°C ve 65.0°C bağlanma sıcaklığında elde edilen PCR ürünleri kuyucuklara yüklenmiştir).

6.1.1. *S. coelicolor* A3(2) ve Sco-pRA*lon* hücrelerinden RNA İzolasyonu

S. coelicolor A3(2) ve Sco-pRA*lon* hücrelerinin R2YE besiyerine inokülasyonlarının 60., 72. ve 96. saatlerinde alınan örneklerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen total RNA'lar %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 6.2). Elde edilen RNA'ların spektrofotomektrik ölçüm sonuçları ise Tablo 6.1'de gösterilmiştir.



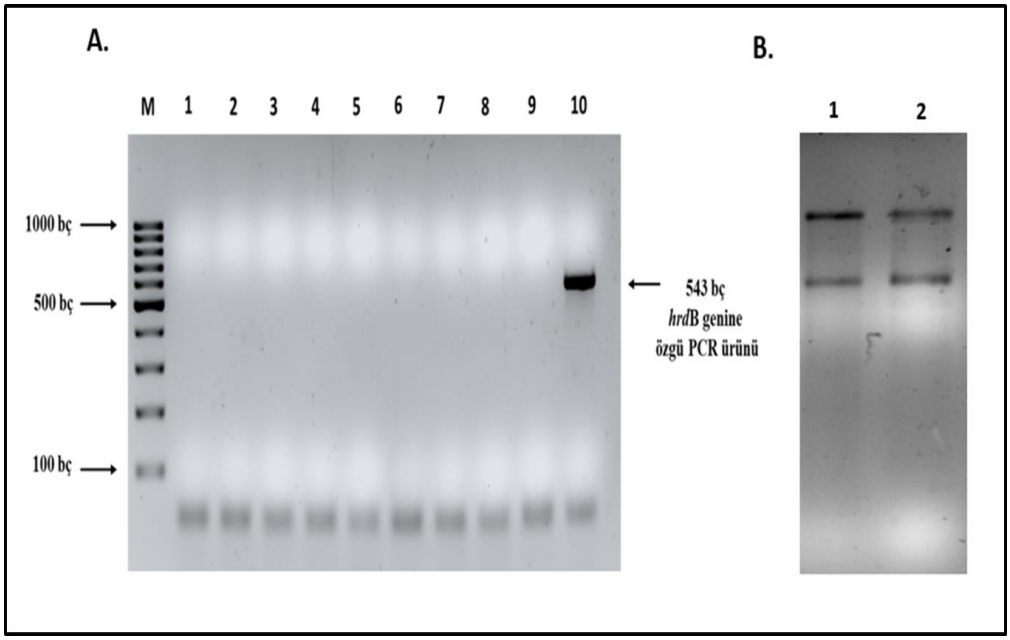
Şekil 6. 2: İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Tablo 6.1: Fermentasyonun 60., 72. ve 96. saatlerindeki hücrelerden izole edilen RNA örneklerinin NanoDrop sonuçları.

Örnekler	**OD 260/280**	**Konsantrasyon (ng/ µl)**
60. saat *S. coelicolor* A3(2)	1.97	509.7
60.saat *S. coelicolor* A3(2)	2.03	306.8
60. saat Sco-pRA*lon*	1.93	368.2
60. saat Sco-pRA*lon*	1.92	535.1
72. saat *S. coelicolor* A3(2)	1.89	697.2
72. saat *S. coelicolor* A3(2)	2.11	349.5
72. saat Sco-pRA*lon*	1.98	483.1
72. saat Sco-pRA*lon*	2.01	278.0
96. saat *S. coelicolor* A3(2)	2.10	136.7
96. saat *S. coelicolor* A3(2)	1.95	121.6
96. saat Sco-pRA*lon*	1.88	210.0
96. saat Sco-pRA*lon*	2.11	71.8

6.1.2. RNA Örneklerinin DNaz Muamelesi

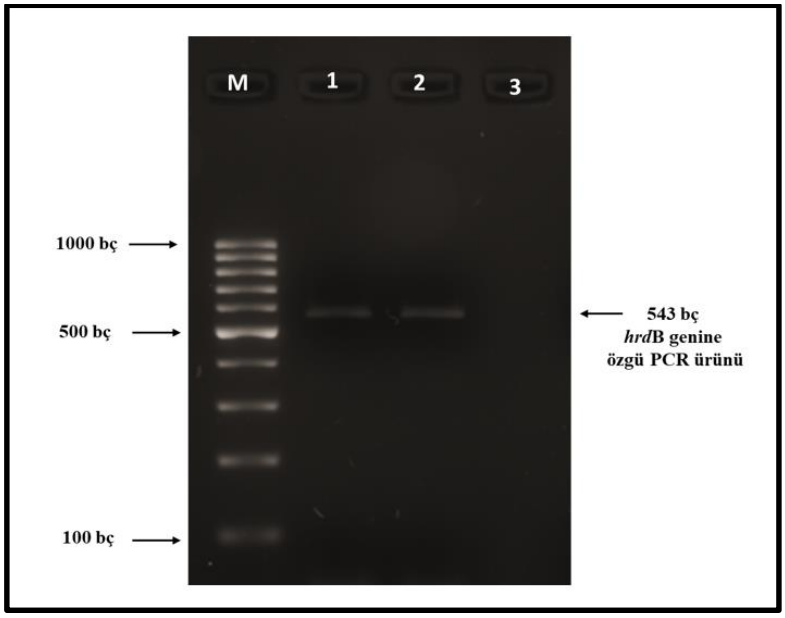
İzole edilen RNA'lar DNaz ile muamele edilerek olası DNA kontaminasyonu giderilmeye çalışılmıştır. Ardından RNA örneklerinde genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek amacıyla hücre içerisinde her zaman ifade edilen bir gen olan *hrd*B genine özgü primerler ile PCR yapılmış ve RNA örneklerinde DNA bulaşı tespit edilmemiştir (Şekil 6.3-A). DNaz muamelesinin ardından çalışılan iki hücre grubuna ait RNA örnekleri agaroz jelde tekrar yürütülmüş ve RNA bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir (Şekil 6.3-B).



Şekil 6. 3: DNaz muamelesinin ardından genomik DNA kontaminasyonun ve RNA bütünlüğünün kontrolü. **A)** RNA PCR jel elektroforez görüntüsü. **M:** 100 bç'lik moleküler DNA belirteci; **1-9:** DNaz uygulanan RNA örnekleriyle yapılan PCR sonucu; **10:** *S. coelicolor* A3(2) genomik DNA'sıyla yapılan PCR sonucu. **B)** DNaz ile muamele edilen RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsü. **1:** *S. coelicolor* A3(2) RNA'sı; **2:** Sco-pRA*lon* RNA'sı.

6.1.3. Ters-Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA Sentezi

İzole edilen ve DNaz muamalesi uygulanan RNA örneklerinin 300 ng'ı kullanılarak RT-PCR ile cDNA'lar sentezlenmiştir. *S. coelicolor* A3(2) ve Sco-pRA*lon* suşlarına ait bu cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucunda *hrd*B genine özgü primerler ile beklenen boyutlarda DNA fragmanları elde edilmiş ve cDNA çevriminin başarıyla gerçekleştirildiği belirlenmiştir (Şekil 6.4).



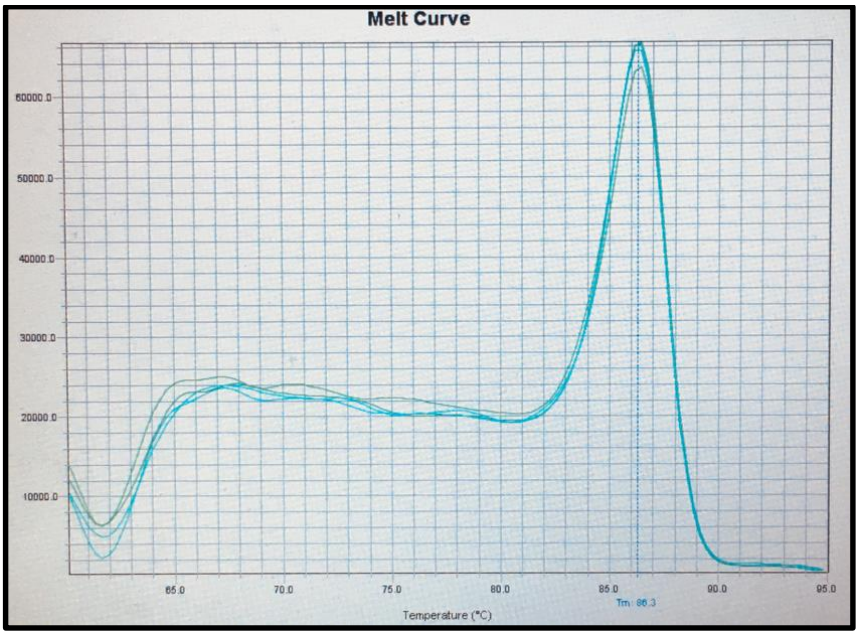
Şekil 6. 4**:** cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucunda elde edilen *hrd*B genine ait jel elektroforez görüntüsü **M:** 100 bç'lik moleküler DNA belirteci; **1:** *S. coelicolor* A3(2) cDNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; **2:** Sco-pRA*lon* cDNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu; **3:** NTC (Non Template Control)

6.1.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Anlatımı Analizleri

S. coelicolor ve Sco-pRA*lon* suşlarından elde edilen RNA'lar kullanılarak hazırlanmış olan cDNA'lar kullanılarak *act*II-*ORF*4, *red*K, *sig*B, *ppk*, *rel*A ve *lon* genlerinin transkripsiyonel analizleri yapılmıştır.

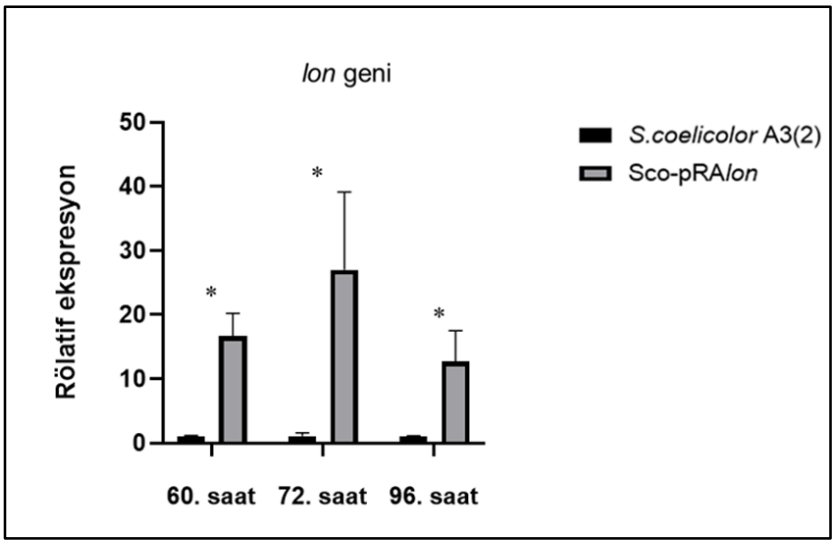
Öncelikle *gyr*A ve *hrd*B referans genleri ile hedef genlerin optimizasyonları için bir seri PCR yapılmış, ardından cDNA'lar ile RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda her bir örnek için elde edilen Cp (Crossing point) değerlerinin ortalaması kullanılmıştır. Daha sonra örneklere rölatif kantifikasyon analizi uygulanarak gen ifadesindeki değişim $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır [124]. Gen anlatım seviyelerinin istatistiksel analizleri Mann-Whitney testi ile GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $P<0.05$ olan ifadeler bilimsel olarak anlamlı farklılıklar olarak not edilmiştir ve grafiklerde anlamlı bulunan sonuçlar (*) işareti ile gösterilmektedir.

Gerçekleştirilen her RT-qPCR analizinin ardından, primerlerin spesifitesini anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. *gyr*A genine ait erime eğrisi grafiğinde tek bir pik gözlemlenmiştir (Şekil 6.5).



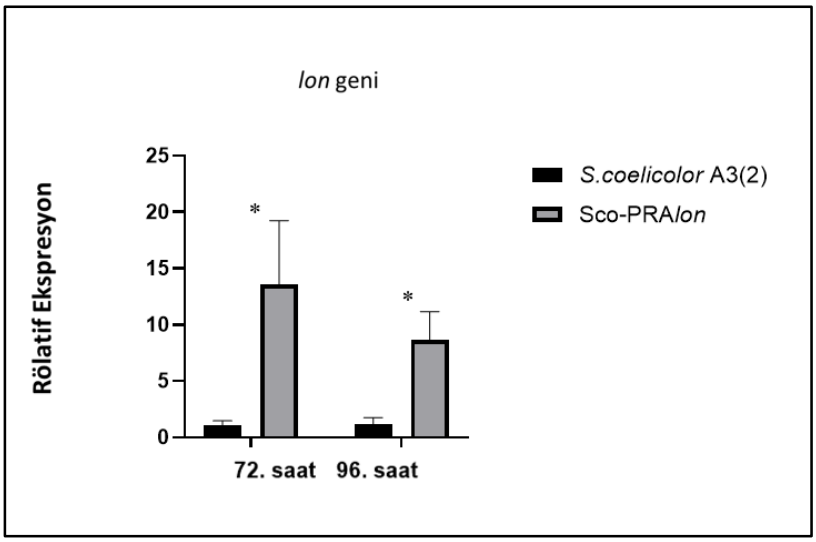
Şekil 6.5: *gyr*A geni erime eğrisi

RT-qPCR sonrası *lon*, *act*II-ORF4, *red*K, *sig*B, *ppk* ve *rel*A genlerinin ekspresyon düzeyleri hem *gyr*A hem de *hrd*B genlerine göre normalize edilerek hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *lon* geninin ekspresyon seviyesinde *gyr*A genine göre normalize edildiğinde 60., 72. ve 96. saatlerde, Sco-pRA*lon* suşunda *S. coelicolor* A3(2) suşuna kıyasla sırasıyla 16, 24 ve 12 katlık artışlar gözlenmiştir (Şekil 6.6). Elde edilen bu sonuç, rekombinant suşta *lon*'un fazla ifade edildiğini transkripsiyonel düzeyde göstermektedir.



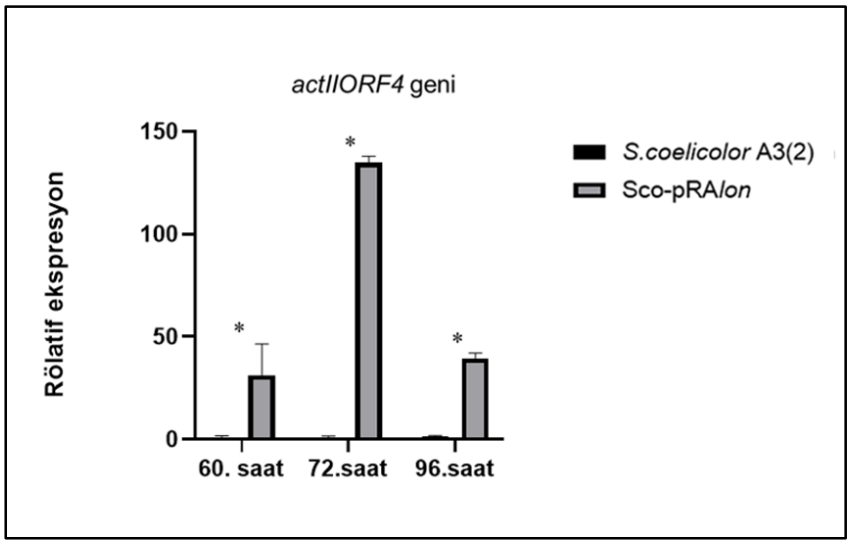
Şekil 6.6**:** Farklı saatlerde *lon* ekspresyon düzeyleri (* $p<0.05$).

Yapılan literatür araştırmalarının sonucunda, çalışmamızda referans gen olarak kullanılan *hrd*B geninin *S. coelicolor* için uygun olmadığı ve farklı koşullarda anlatım düzeyinin değişebildiği belirlenmiştir [125]. Bu genin normalizatör olarak kullanıldığı analizlerde, *gyr*A genine göre yapılanlardan farklı gen anlatım seviyeleri belirlenmesine rağmen çoğu gen için önemli bir seviyede artan ekspresyon profilinin korunduğu görülmüştür. Örnek teşkil etmesi açısından 72. ve 96. saatlerde *lon* genine ait *hrd*B geninin normalizatör olarak kullanılması ile elde edilen ekspresyon seviyeleri Şekil 6.7'de gösterilmiştir. Bu sonuç haricinde, verilen diğer hedef genlere ait tüm ekspresyon düzeyleri *gyr*A geninin normalizatör olarak kullanıldığı analizler baz alınarak oluşturulmuştur.

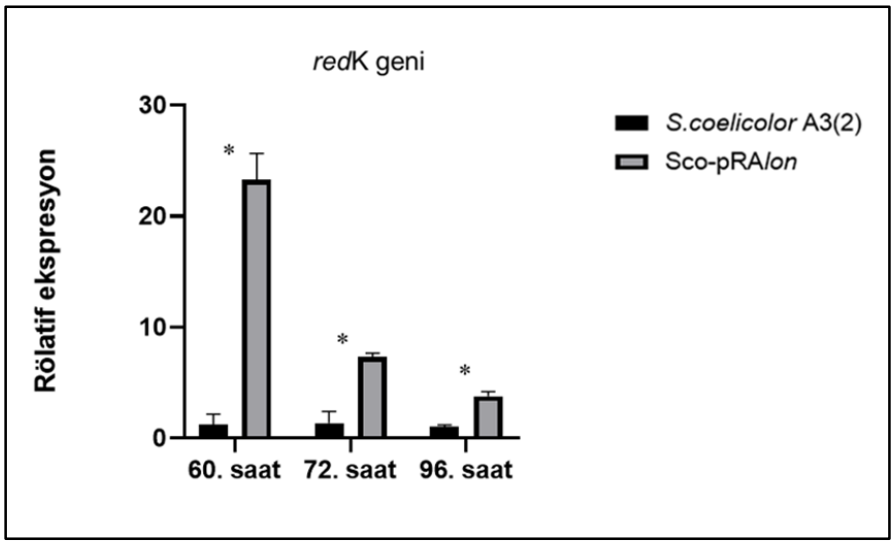


Şekil 6. 7: 72. ve 96. saatlerde *lon* ekspresyon düzeyleri (* p<0.05).

Aktinorhodin biyosentezi aktivator proteinini kodlayan *act*II-ORF4 geni ve undesilprodigiosin biyosentetik gen kümesinde bulunan *red*K geninin transkripsiyonel analizleri sonucunda, 60., 72. ve 96. saatlerde, Sco-pRA*lon* suşunda *S. coelicolor* A3(2) suşuna kıyasla *act*II-ORF4 geninin ekspresyonun sırasıyla 25, 120 ve 34 kat arttığı gözlemlenirken (Şekil 6.8), *red*K geninin ekspresyonunun ise sırasıyla 22, 6 ve 4 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 6.9).

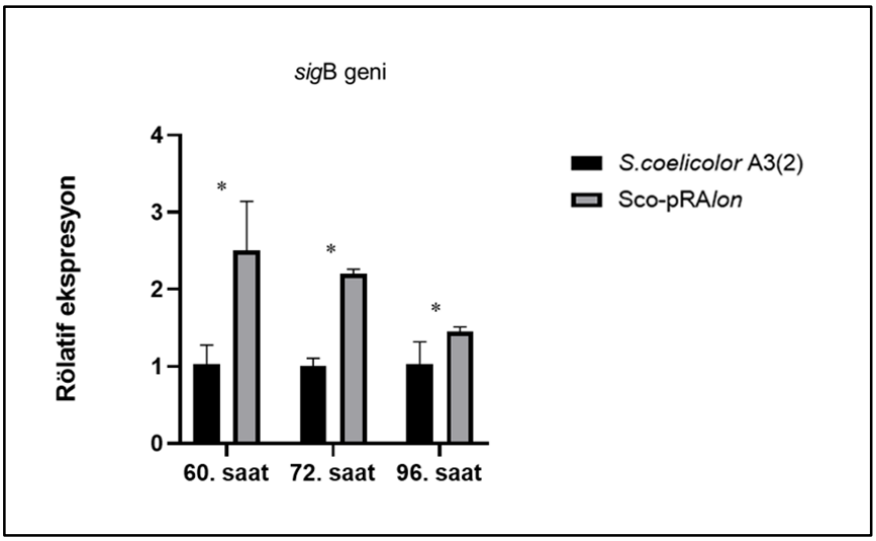


Şekil 6. 8: Farklı saatlerde *act*II-ORF4 ekspresyon düzeyleri (* p<0.05)



Şekil 6. 9: Farklı saatlerde *red*K ekspresyon düzeyleri (* p<0.05).

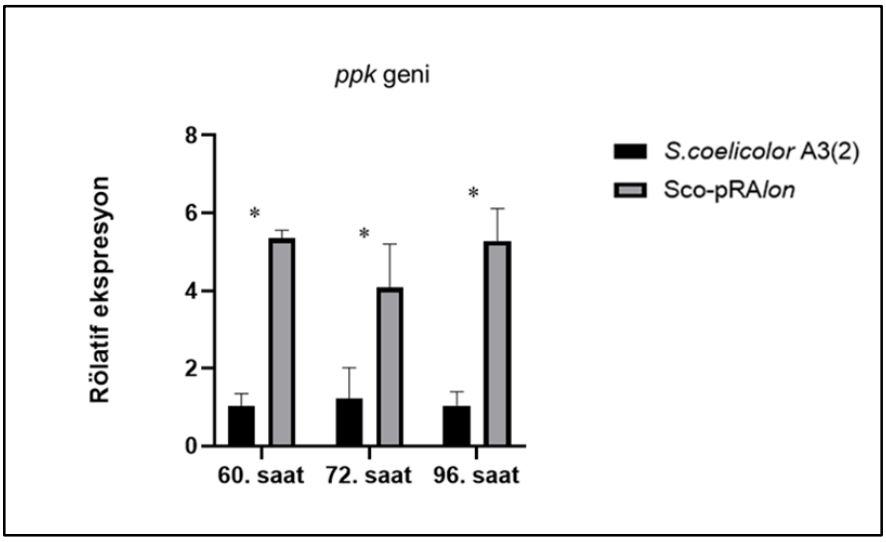
Şekil 6.10'da *sig*B geni için elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Yapılan istatistik çalışmasının sonuçlarına göre *sig*B geni için, Sco-pRA*lon* suşu ile *S. coelicolor* A3(2) suşu kıyaslandığında ekspresyonunun 60., 72. ve 96. saatlerde sırasıyla 2.5, 2.2 ve 1.5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



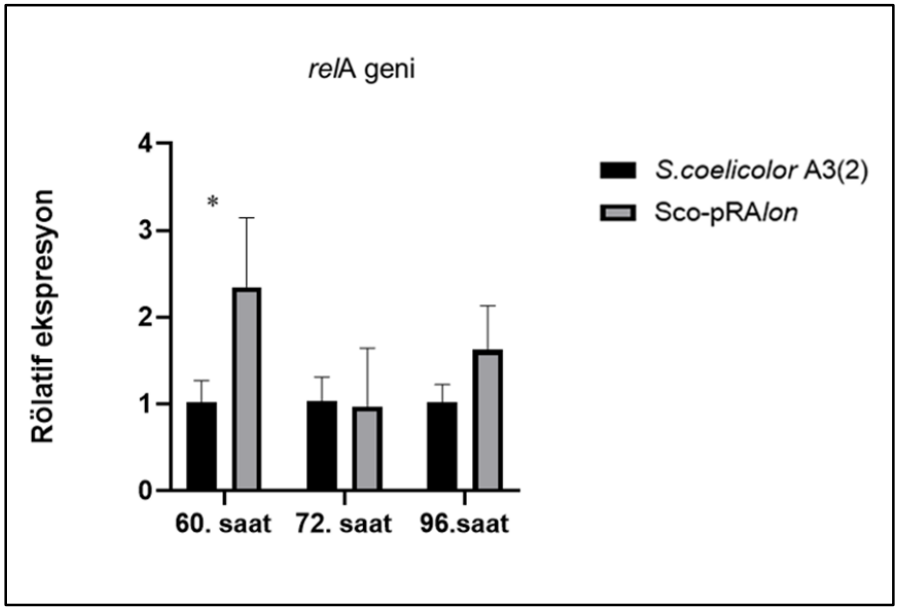
Şekil 6. 10: Farklı saatlerde *sig*B ekspresyon düzeyleri (* p<0.05).

Polifosfat metabolizması ile bağlantılı *ppk* geninin ve alarmon sentezinden sorumlu *rel*A geninin ekspresyon düzeylerine ait sonuçlara göre, Sco-pRA*lon* suşunda *S. coelicolor* A3(2) suşuna kıyasla *ppk* geninin ekspresyonu 60., 72. ve 96. saatlerde

sırasıyla 5.3, 3.6 ve 5.1 kat artmıştır (Şekil 6.11). *rel*A geninin ekspresyon seviyesinde ise 60. saatte 2.3 katlık bir artış gözlemlenirken 72. ve 96. saatlerde istatiksel olarak anlamlı bir değişim saptanamamıştır (Şekil 6.12).



Şekil 6. 11: Farklı saatlerde *ppk* ekspresyon düzeyleri (* p<0.05).



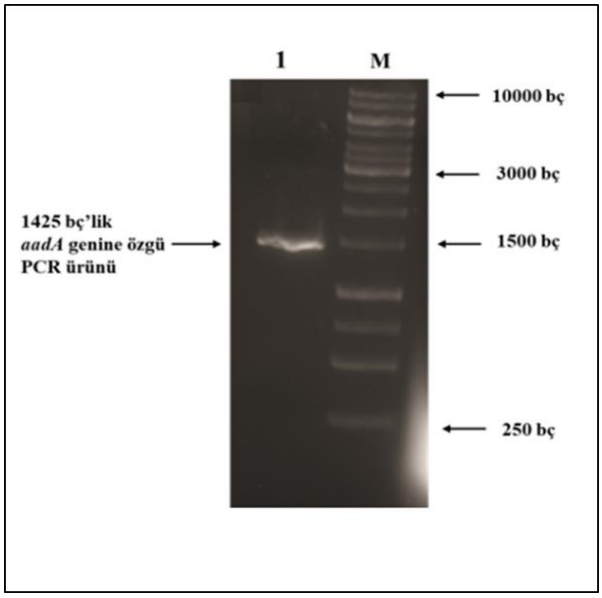
Şekil 6. 12: Farklı saatlerde *rel*A ekspresyon düzeyleri (* p<0.05).

6.2. Ekstra Tek Kopya *lon* Geninin Polifosfat Üretemeyen Mutant *S. coelicolor* M145'e Etkisi

Laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalardan birinde polifosfat kinaz geni silinmiş mutant suşun (Δ*ppk*) yaban suşa göre yaklaşık 9 kat daha fazla aktinorhodin ürettiği [137], başka bir çalışmada ise genomuna 1 kopya entegre edilmiş *S. coelicolor*'ın (Sco-pRA*lon*) yaban suşa göre 34 kat aktinorhodin ürettiği bulunmuştur [15]. Söz konusu iki mutasyonun antibiyotik üretiminde olası kümülatif etkisini araştırmak için bu çalışma kapsamında, Δ*ppk*'nın genomuna tek kopya *lon* geni entegre edilmesi de amaçlanmıştır. Bunun için apramisin direnç geni taşıyan pRA*lon* plazmiti aracılığı ile *lon* geninin *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşuna entegrasyonu hedeflenmiştir. Ancak Δ*ppk* suşundaki mutasyon kaseti de apramisin direnç geni taşıdığından öncelikle pRA*lon* üzerindeki apramisin direnç geni yerine streptomisin direnç geni klonlanmıştır.

6.2.1. Streptomisin Direnç Geninin (*aad*A) PCR ile Çoğaltılması

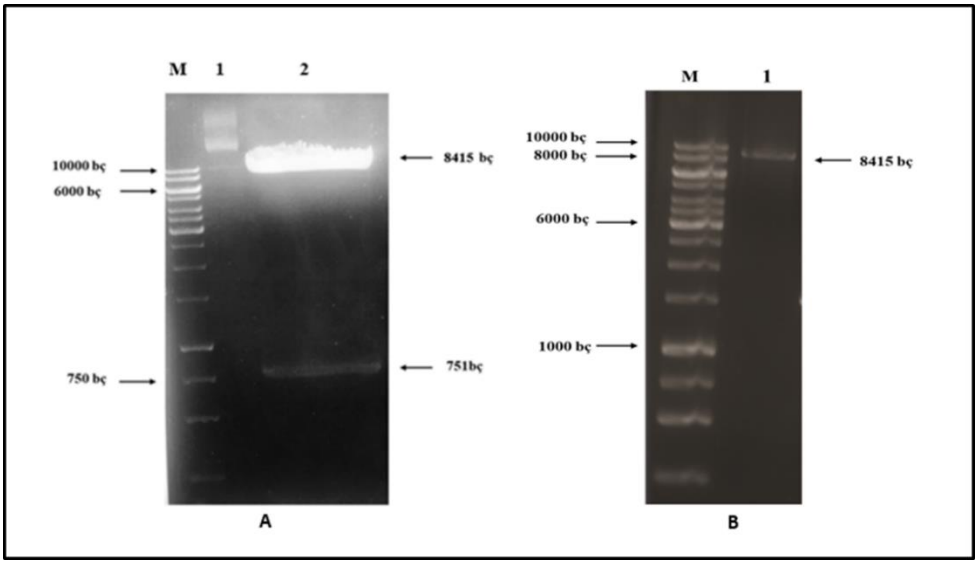
Streptomisin direnç geni (*aad*A), pIJ778 plazmitinin *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile kesimi sonucunda elde edilen DNA fragmanının kalıp olarak kullanıldığı PCR ile çoğaltılmıştır. 1425 bç'lik PCR ürünü, agaroz jelden saflaştırılmış ve büyüklüğü moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (Şekil 6.13).



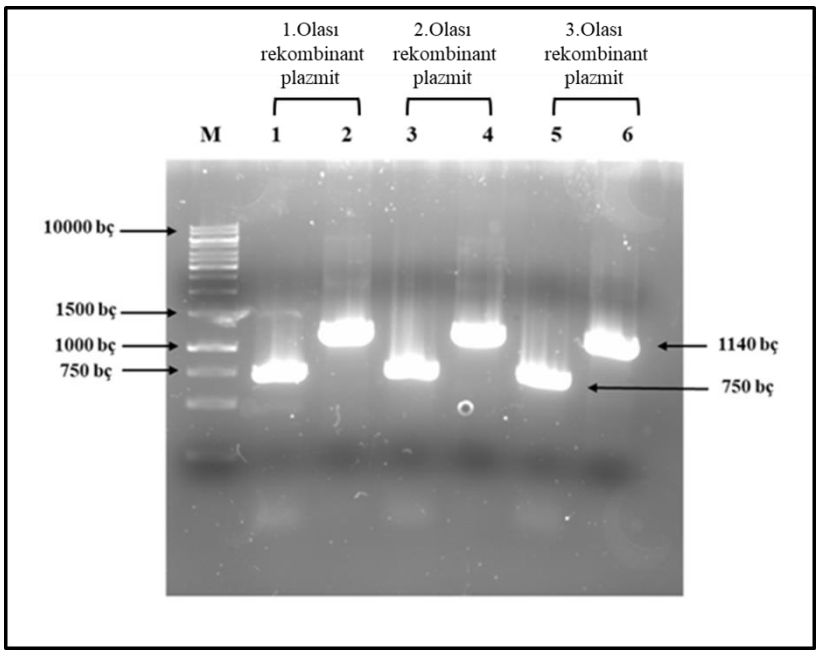
Şekil 6.13: Agaroz jelden saflaştırılan *aad*A genine özgü PCR ürünü. **M**:1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1**: *aad*A genine özgü PCR ürünü (1425).

6.2.2. Streptomisin Direnç Geninin (*aad*A) pRA*lon* Plazmitine Klonlanması

E. coli DH5α+pRA*lon* hücrelerinden izole edilen rekombinant pRA*lon* plazmitinin boyutu 9166 bç'dir. *Sac*I restriksiyon enzimi, pRA*lon* plazmitini apramisin direnç genini taşıyan fragmentinin başında (1178. bç) ve sonunda (1929. bç) bulunan iki noktadan kesmektedir. Kesim sonrasında jelde, 751 bç ve 8415 bç boyutunda iki tane bant beklenmektedir. pRA*lon* plazmitinin *Sac*I restriksiyon enzim kesim sonucu Şekil 6.14 A'da gösterilmiştir. Apramisin direnç genini taşımayan 8415 bç'lik DNA fragmanı agaroz jelden saflaştırılmış ve yapışkan uçlar klenow fragmenti ile küt uçlu hale getirilmiştir (Şekil 6.14 B). Streptomisin geni (*aad*A) ve pRA*lon* plazmitinin apramisin direnç genini taşımayan fragmenti (vektör) ligaz enzimi ile birleştirilmiş, ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Streptomisin içeren besiyerinde üreyen transformantlardan elde edilen plazmitlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları ile olası rekombinant plazmitler doğrulanmıştır. *aad*A ve *lon* genlerine özgü primerler ile yapılan PCR sonrasında elde edilen ürünler agoroz jelde yürütülmüştür (Şekil 6.15). Rekombinant plazmide bu çalışmada pRA*lon*$^{+Str}$ adı verilmiştir.



Şekil 6.14: Ligasyona hazırlanan pRA*lon* plazmidinin jel görüntüsü. A) **M**: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1**: pRA*lon* plazmiti (kesilmemiş) **2**: pRA*lon* plazmidinin *Sac*I kesimi. B) **M**: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1**: *Sac*I kesimi sonrası klenow enzimi ile doldurulan pRA*lon* plazmitinin 8415 bç'lik fragmanı.



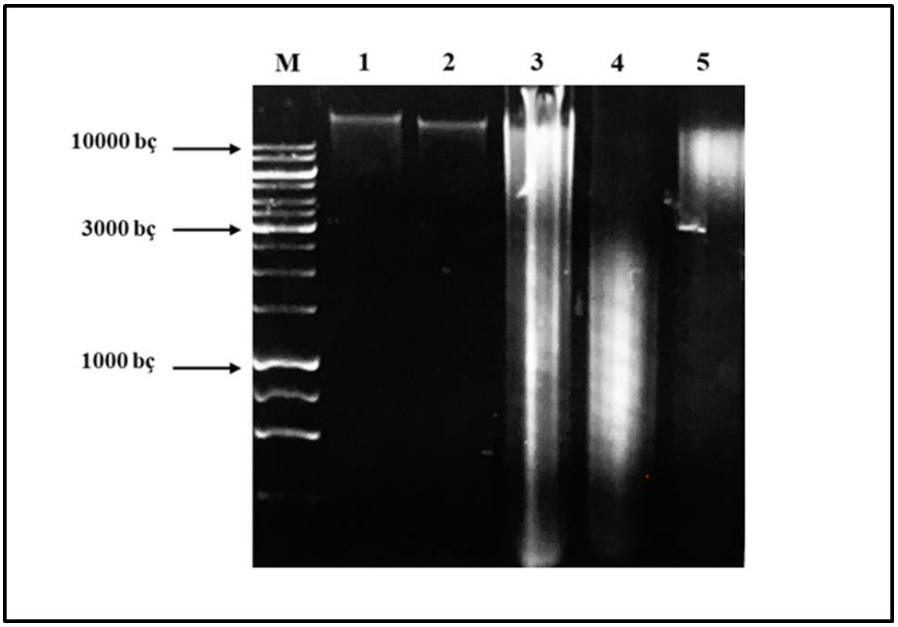
Şekil 6.15: Olası rekombinant plazmitlerdeki *lon* ve *aad*A genlerinin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları. **M:** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1,3,5:** 750 bç'lik *aad*A genine özgü primerlerin kullanıldığı PCR sonucu; **2,4,6**: 1140 bç'lik *lon* genine özgü primerlerin kullanıldığı PCR sonucu.

6.2.3. pRAlon^{+Str} Rekombinant Plazmidinin *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* Suşuna Konjugasyon ile Aktarımı

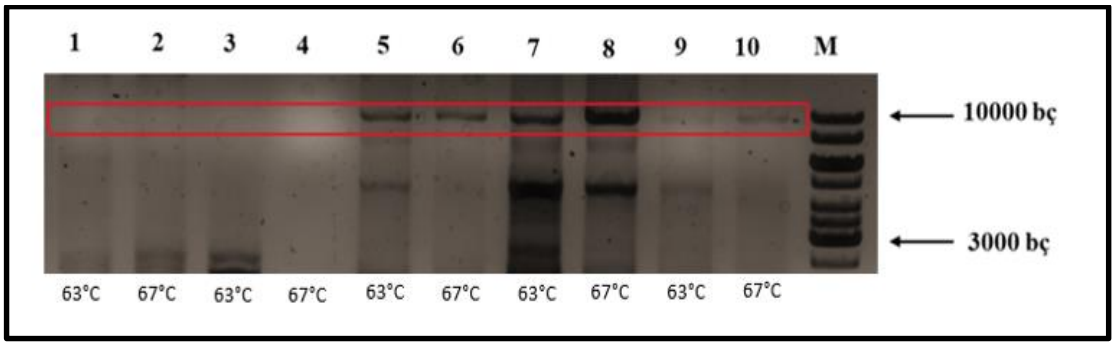
Rekombinant plazmitlerin, *S. coelicolor* hücrelerininin güçlü restriksiyon sistemini atlatarak bu hücrelerde ifade edilebilmesi için metil grupları taşımamaları gerekmektedir [126]. Bu sebeple rekombinant plazmit pRA*lon*$^{+Str}$ *Streptomyces* hücrelerine aktarılmadan önce metilasyon sisteminden yoksun özel bir suş olan ve pUZ8002 plazmidi taşıyan *E. coli* ET12567 hücrelerine aktarılmıştır. pUZ8002 plazmidi ise yabancı DNA'nın *Streptomyces*'e transferini sağlayan *tra* genlerini taşımaktadır [117].

pRA*lon*$^{+Str}$ plazmidi *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşuna *E. coli* ET12567/pUZ8002 aracılığıyla konjugasyon ile aktarılmıştır. Konjugasyon sonrası hücreler, nalidiksik asit (NA) ve streptomisin (Str) içeren R2YE besiyerinde büyütülmüştür. Nalidiksik asidin sadece *E. coli* hücrelerini inhibe etmesi streptomisine dayanıklı konjugantların seçilebilmesini mümkün kılmıştır.

pRA*lon*$^{+Str}$ plazmitinin, *S. coelicolor* genomuna entegrasyonu PCR ile ispatlanmıştır. PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak üzere, konjugasyon sonrasında streptomisin varlığında üreyen 3 olası rekombinant suş ile *S. coelicolor* M145 ile *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşlarının kromozomal DNA'ları izole edilmiştir (Şekil 6.16). İzole edilen genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları, *Streptomyces* genomunda bulunan ve pRA*lon*$^{+Str}$ plazmidinin (9.840 bç) entegre olması beklenen *att*B bölgesine özgü primerler ile gerçekleştirilmiştir. Entegrasyonun gerçekleşmesi halinde, PCR sonucunda ~10000 bç boyutunda bir bant beklenmektedir. Bölüm 5.2.14'de belirtildiği gibi 2 farklı primer bağlanma sıcaklığı (63°C ve 67°C) denenmiştir. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin büyüklükleri moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (Şekil 6.17).



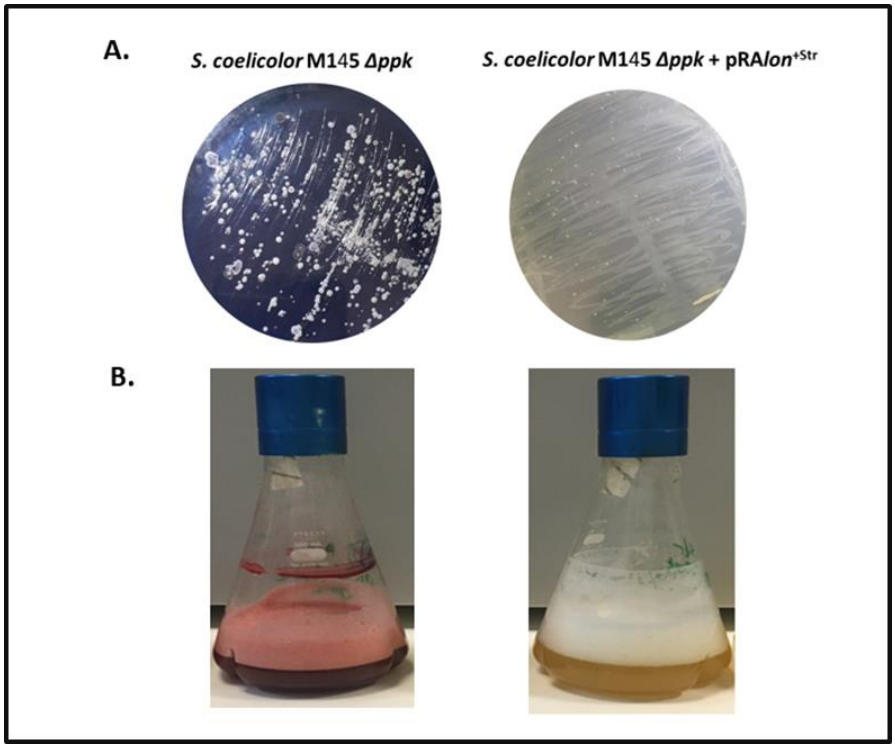
Şekil 6.16: Genomik DNA izolasyon sonuçları. **M:** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1:** *S. coelicolor* M145 genomik DNA'sı; **2:** *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* genomik DNA'sı; **3:** 1. olası rekombinant suşa ait genomik DNA; **4:** 2. olası rekombinant suşa ait genomik DNA; **4:** 3. olası rekombinant suşa ait genomik DNA.



Şekil 6.17: pRA*lon*$^{+Str}$ plazmidinin genoma entagrasyonunun doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen PCR reaksiyonları. **M:** 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; **1,2:** *S. coelicolor* M145 genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonuçları; **3,4:** *S.* coelicolor M145 Δ*ppk* genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucları; **5-6:** 1. olası rekombinant suşa ait genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonuçları; **7-8:** 2. olası rekombinant suşa ait genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonuçları; **9-10:** 2. olası rekombinant suşa ait genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR sonuçları.

6.3. *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ Suşunun R2YE Besiyerinde Üremesi

S. coelicolor M145 Δ*ppk* suşunun R2YE besiyerinde yüksek miktarda antibiyotik ürettiği ve spor oluşturabildiği bilinmektedir [137]. Bu mutant suşun genomuna ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilerek oluşturulan *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ suşu, antibiyotik üretimi ve üreme durumunun belirlenebilmesi amacıyla R2YE besiyerinde büyütülmüştür. Bu suşun R2YE katı (Şekil 6.18 A) ve sıvı besiyerinde (Şekil 6.18 B) çok yavaş büyüdüğü ve antibiyotik üretiminin ölçülemeyecek kadar az olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda katı besiyerindeki görüntüsü spor oluşturma yeteneğini de kaybettiğini göstermektedir.



Şekil 6. 18: *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ suşunun R2YE katı (A) ve sıvı besiyerinde (B) üreme durumu

7.TARTIŞMA

Bakterilerde besin kıtlığı, ısı şoku gibi çeşitli stres durumlarında sentezlenen alarmonlar [(p)ppGp], polifosfat polimerinin hücrede birikimini tetiklerler [4]. *Esherichia coli*'de polifosfatın, hücre için hayati önemi olan pek çok fizyolojik proseste görev alan Lon proteaza bağlanarak oluşturduğu kompleks (PoliP-Lon kompleksi) ise ribozomal proteinleri yıkarak strese adaptasyonu sağlayan enzimlerin sentezinde kullanılacak yeni amino asitlerin oluşumunu sağlamaktadır [8].

Arkeadan insana kadar bütün canlılarda bulunan ATP bağımlı Lon proteaz, protein kalite kontrolünden sorumlu temel enzimlerden biridir [32]. Bakterilerde önemli stres yanıt mekanizmalarından biri olan sınırlandırılmış cevabın yanı sıra gen anlatımının kontrolünde görev alan regülatör proteinleri yıkarak hücre bölünmesi, sporulasyon, motilite ve patojenite gibi hücre için hayati önemi olan proseslerin düzenlemesinde de etkin rol oynamaktadır [34], [45], [127]. Stres bakterilerde ikincil metabolit üretimini tetikleyen önemli faktörlerden bir tanesidir [14], [106]. Lon proteazın, bakterilerin hücresel faklılaşma süreçlerinde rol alması ve önemli bir stres cevap regülonunun bir parçası olması onu ikincil metabolit üretimini etkileyebilecek önemli bir aday yapmaktadır [36], [51].

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında, ürettiği sekonder metabolitlerle medikal ve biyoteknolojik açıdan önemli bir mikroorganizma olan *Streptomyces coelicolor*'da Lon proteaz, sınırlandırılmış cevap, polifosfat metabolizması ve antibiyotik üretimi arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Öncelikle, SYBR Green temelli gerçek zamanlı PCR analizi ile *lon, act*II-ORF4, *red*K, *sig*B, *ppk* ve *rel*A genlerinin anlatım düzeyleri kantitatif olarak belirlenmiştir. RT-qPCR çalışmaları, R2YE besiyerinde büyütülen *S. coelicolor* A3(2) ve Sco-pRA*lon* suşlarına ait 60., 72., ve 96. saat örneklerinden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar ile gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak *gyr*A *ve hrd*B genleri kullanılırken *S. coelicolor* A3(2) suşuna ait cDNA'lar ise pozitif kalibratör olarak tanımlanmıştır.

Deneylerde kullanılan referans genler, yapılan literatür taramalarının sonuçlarına göre belirlenmiştir. Pek çok bakteri türü ile yapılan RT-qPCR çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *16S rRNA* geninin S. *coelicolor* A3(2) için uygun olmadığını gösteren çalışmalardan birinde bu genin transkripsiyonunun

sınırlandırılmış cevap gibi bazı biyolojik faktörlerden etkilendiği gösterilmiştir [128], [125].

Çalışmamızda da kullanılan referans genlerden biri olan *hrd*B geni *S. coelicolor* A3 (2) ve diğer *Streptomyces* türleri için sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak Hesketh ve arkadaşları, bu suşta ppGpp miktarının artması sonucunda *hrd*B geninin baskılandığını gözlemlemişlerdir [12]. Bunun yanı sıra *S. coelicolor* M145 suşunda gerçekleştirilen mutasyonların ve kültür koşullarınının, *hrd*B'nin promotor gücünü önemli ölçüde etkilediğini gösteren bir çalışmada, *bld*B mutantında *hrd*B promotor aktivitesinin yaklaşık 5 kat arttığı belirlenmiştir [125], [129]. Bizim çalışmamızda da *hrd*B geninin normalizatör olarak kullanıldığı analizler sonucunda *gyr*A geninkinden farklı gen anlatım seviyelerinin tespit edilmesi bu çalışmaları destekler niteliktedir. Bu sebeple *16S rRNA* ve *hrd*B geninin referans gen olarak kullanılması halinde elde edilen verilerin doğru sonuç vermemesi ihtimali yüzünden temel referans gen olarak *gyrA* geninin kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmada yer alan sonuçlarda hedef genlerin ekspresyon seviyeleri *gyr*A genine göre normalize edilerek hesaplanmıştır.

Rt-qPCR çalışmalarında kullanılan ve laboratuvarımızda daha önceden yapılmış bir çalışmada oluşturulan Sco-pRA*lon* suşu, *S. coelicolor* A3(2) genomuna integratif pRA*lon* plazmiti aracılığıyla ekstra bir kopya *lon* geninin entegrasyonu sonucunda elde edilen rekombinant bir suştur [15]. pRA gibi integratif vektörlerin *S. coelicolor* A3(2) genomunda attB bölgesine girebildikleri ve bu bölgeye girişin deneysel olarak ispatlanan diğer 3 pseudo-attB bölgesine girişten 300 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir [120].

Çalışılan rekombinant suşta 60., 72. ve 96. saatlerde yaban suşa kıyasla *lon* geninin ekspresyonunda sırasıyla 16, 24 ve 12 katlık artışlar görülmüştür. Yaban tipe oranla rekombinant suşta *lon* geninin ekspresyonunun bu denli artışı "Genomda bir genin iki kopyasının bulunması halinde o genin transkript miktarının da iki katına çıkmalıdır" yargısının bizim çalışmamız için geçerli olmadığını göstermektedir. Literatürde bir genin kromozoma ekstra bir kopya halinde entegre edildiğinde transkripsiyonunun neden iki kattan daha fazla arttabiliceğini gösteren farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Schmid ve Roth *Salmonella typhimurium*'un L-histidin biyosentezinden sorumlu *his* operonunun (hisGDCB) ilk dört genini promotoru ile birlikte farklı 16 kromozomal bölgeye aktarmışlardır [130]. Bu yönlendirilmiş translokasyon sonucunda farklı koşullar altında farklı bölgelerde *his*D

geninin ekspresyon seviyesinin değiştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, *Streptomyces albus* J1074 suşunda antibiyotik biyosentetik genlerinin ekspresyon seviyelerinin, genomda bulundukları konuma göre önemli oranlarda arttığı belirlenmiştir [131]. Gen ekspresyonu üzerindeki pozisyon etkisi ökaryotik organizmalarda da görülmektedir [132].

Lon proteazın antibiyotik üretimi üzerindeki etkisini incelemek için oluşturulan Sco-pRA*lon* suşun hem aktinorhodin hem de undesilprediogisin antibiyotiklerini yüksek konsantrasyonlarda ürettiği bilinmektedir [15]. Bu tez çalışması kapsamında ise ekstra bir kopya *lon* geninin antibiyotik üretimi üzerindeki etkileri transkripsiyonel düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla, aktinorhodin üretiminin regülasyonundan sorumlu aktivatör proteini kodlayan *act*II-ORF4 geni ve undesilprodigiosin biyosentetik gen kümesinde bulunan *red*K geninin transkripsiyonel analizleri yapılmıştır. 60., 72. ve 96. saatlerde, Sco-pRA*lon* suşunda yaban suşa kıyasla *act*II-ORF4 geninin ekspresyonun sırasıyla 25, 120 ve 34 kat arttığı gözlemlenirken *red*K geninin ekspresyonunun ise sırasıyla 22, 6 ve 4 kat arttığı belirlenmiştir.

S. coelicolor suşunda çeşitli genlerin ve strese neden olan farklı çevresel sinyallerin sekonder metabolizmayı etkilediği bilinmektedir. Literatürde, önemli bir stres cevap regülonunun (HSPR/HAIR) parçası olması nedeniyle ikincil metabolit üretimini etkileyebilecek önemli bir aday olan Lon'un antibiyotik üretimi üzerindeki etkisinin incelendiği yalnızca tek çalışma mevcuttur [51] *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *lon* mutantı ile gerçekleştirilen bu çalışmada, pyoluteorin biyosentez geninin (*plt*B) ekspresyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Lon proteazın antibiyotik üretimi üzerindeki bu negatif etkiyi, *plt* biyosentez gen kümesine ait transkripsiyonel aktivatörü degrede ederek sağladığı öngörülmüştür Ayrıca Lon, bu bakteride daha önceden karakterize edilen antibiyotik üretimi ve stresle ilişkili global regülatörden biri olarak tanımlanmıştır [113]. Bu çalışmada, genel stres cevabının oluşmasından sorumlu sigma faktörü kodlayan *sig*B geninin ekspresyonu rekombinant suşta yaban suşa kıyasla 60., 72. ve 96. saatlerde sırasıyla 2.5, 2.2 ve 1.5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, stresle antibiyotik üretiminin arttığı bilinen *S. coelicolor*'da, ekstra bir kopya *lon* genin varlığının rekombinant suşta stres yarattığını göstermektedir.

*S. coelicolor'*da dallanmış zincirli amino asit katabolizması ile üretilen asetatın aktinorhodin gibi tip II poliketid sınıfına ait antibiyotiklerin üretiminde kullanılan

önemli bir prekürsör olduğu bilinmektedir [133]. Traxler ve arkadaşları açlığın, dallanmış zincirli amino asit (lösin, izölösin, valin) biyosentez yolakları ile ilgili genlerin yanı sıra bu aminoasitlerin biyosentezi için gerekli olan öncüllerin üretildiği yolaklardaki genlerin de uyarımını tetiklediğini göstermişlerdir [134]. Bu durum, stres altında olan rekombinant suşun daha fazla dallanmış aminoasit üretmesi sonucunda yüksek miktarda aktinorhodin sentezlemesiyle ilişkilendirilebilir.

Bakterilerde, önemli stres yanıt mekanizmalarından biri olan sınırlandırılmış cevap sürecinde kritik bir öneme sahip olan Lon proteaz, alarmon sentezi ile birikimi tetiklenen poliP ile bir kompleks oluşturarak spesifik bazı proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir. Yıkım sonucunda elde aminoasitler yeni çevresel koşullara adaptasyonun sağlanması için gerekli olan proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır [8], [52]. Stres altındaki hücrelerde Lon proteazın degradasyon yoluyla antibiyotik biyosentezinde kullanılan öncüllerin üretimini tetikleme ihtimali, rekombinant suşun sahip olduğu fazladan bir kopya *lon* geninin varlığının antibiyotik üretimini ciddi oranda arttırmasıyla ilişkili olabilir. Bunun yanı sıra Paul ve arkadaşları, çeşitli stres koşullarında sentezlenen alarmonların [(p)ppGpp], DksA proteini ile birlikte sekonder metabolitlerin öncüllerinin üretiminde kullanılan çeşitli aminoasit biyosentetik genlerinin promotorlarını doğrudan uyardıklarını göstermişlerdir [68].

Literatürde, sınırlandırılmış cevap alarmonlarının *S. coelicolor*'da ikincil metabolit üretimini tetiklediğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde ppGpp sentezinin uyarımıyla *act* gen kümesine ait 5 tane genin transkripsiyonunun uyarıldığı görülmüştür [12]. Aynı zamanda bakterilerde gen ekspresyonunun global regülatörü olarak tanımlanan bu anahtar molekülün, *Streptomyces* genomunda bulunan aktinorhodin (*act*) ve undesilprodigiosin (*red*) antibiyotik biyosentez genlerinin yolak spesifik aktivatörleri olan ActII-ORF4 ve RedD proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyardığı da bilinmektedir [12], [13], [14]. Bizim çalışmamızda da ScopRA*lon* suşunda *rel*A geninin ekspresyon seviyesinde 60. saatte 2.3 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veri, ekstra bir *lon* geninin varlığı ile stres altında olan hücrede, alarmon sentezinin tetiklenmesiyle antibiyotik üretiminin artmış olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ekspresyon seviyesine bakılan bir diğer gen polifosfat sentezinden sorumlu *ppk* genidir. Rekombinant suşta bu genin ekspresyonunun yaban suşa kıyasla 60., 72. ve 96. saatlerde sırasıyla 5.3, 3.6 ve 5.1 kat arttığı belirlenmiştir.

Literatürde, bakterilerde pek çok hücresel proseste görevleri olduğu bilinen poliP'ın antibiyotik üretimi ile ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, Ppk enzimi üretemeyen *S. coelicolor* A3(2) mutantı oluşturularak, *ppk*'nın genomdan silinmesinin aktinorhodin antibiyotiğinin yüksek düzeyde üretilmesine sebep olduğu gösterilmiştir [11]. Bunun yanı *Bacillus thuringiensis* ile yapılan diğer bir çalışmada, *ppk*'nın aşırı ifadesinin endotoksin üretimini 8 kat arttırdığı bulunmuştur [9]. *ppk* geninden yoksun olan *B. thuringiensis* mutant suşunda ise endotoksin üretiminde 2 kat artış sağlanmıştır. Mutant suşların proteomları incelendiğinde, poliP metabolizmasındaki herhangi bir değişikliğin hücrede genel stres durumu yarattığı belirlenmiştir [10]. Tüm bunlar polifosfat metabolizmasındaki herhangi bir değişikliğin strese yol açarak ikincil metabolizmayı etkilediğini göstermektedir. Stres altında olduğunu bildiğimiz rekombinant suşta *ppk* geninin ekspresyon seviyesindeki artışlar antibiyotik üretiminin tetiklenmesine katkı sağlamış olabilir.

Transkripsiyonel analizlere ek olarak, bu çalışmada, polifosfat üretemeyen yüksek antibiyotik üreticisi *S. coelicolor* M145 Δ*ppk* suşunun genomuna pRA*lon* plazmiti aracılığıyla ekstra bir kopya *lon* geni entegre edilerek mutant bir suş (Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$) oluşturulmuştur. Ancak hem Δ*ppk* suşunun mutasyon kaseti hem de pRA*lon* plazmiti apramisin direnç geni taşıdığından, öncelikle bu plazmit üzerindeki apramisin direnç geni yerine streptomisin direnç geni klonlanmış ve oluşturulan bu plazmit M145 Δ*ppk* suşuna aktarılmıştır. Genomuna ektra bir kopya *lon* geni entegre edilmiş olası rekombinant suşlar, öncelikle streptomisin dirençliliğine göre seçilmiş, ardından PCR ile doğrulanmıştır.

S. coelicolor M145 Δ*ppk* mutant suşun yaban suşa göre yaklaşık 5 kat daha fazla antibiyotik ürettiği ve Sco-pRA*lon* suşunun da yüksek antibiyotik üreticisi olduğu bilindiğinden, bu çalışma kapsamında oluşturulan Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ suşunun beklenenin aksine ölçülemeyecek kadar az antibiyotik üretmesi ve normalden çok daha yavaş büyümesi şaşırtıcı bir sonuç olmuştur.

Çeşitli bakterilerle yapılan çalışmalarda poliP miktarının, durağan faz sigma faktörünü kodlayan *rpoS* geninin ekspresyonunu etkilediği görülmüştür. *E. coli'*de yapılan bir çalışmada düşük polifosfat seviyesinin *rpo*S geninin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [82]. Aynı zamanda *Pseudomonas putida* KT2440 Δ*ppk* mutantında *rpoS* promotor aktivitesinin azaldığı görülmüştür [135].

Grubumuzda daha önce yapılan çalışmalarda ise polifosfat konsantrasyonunun artması ya da azalmasının stresi tetiklediği gösterilmiştir [9], [10]. Tüm bunlar polifosfat varlığının hücrenin stresle başa çıkabilmesine yardımcı olduğunu göstermektedir.

Δ*ppk* + pRA*lon*$^{+Str}$ mutantında antibiyotik üretiminin gerçekleşmemesi ve büyümenin yavaşlaması, PoliP metabolizmasındaki değişimlerin yarattığı strese ek olarak, ekstra bir kopya *lon* geninin varlığının hücreyi aşırı yüksek stres düzeyine çıkararak yaşamsal faaliyetlere sekte vurmasıyla ilişkilendirilebilir. Bunun yanı sıra elde edilen bu veriler, hücrenin stresle başa çıkması için poliP-Lon kompleksine ihtiyaç duyduğunu da göstermektedir. *E. coli* hücrelerinde, bu kompleksin, strese karşı cevap oluşturmak için ihtiyaç duyulan enzimlerin sentezinde kullanılmak üzere var olan proteinleri yıkarak aminoasit oluşturduğu bilinmektedir [8], [25].

Bu tez çalışması kapsamında yapılan tüm çalışmalar, *E. coli*'de öngürülen Lon proteaz-poliP etkileşiminin *S. coelicolor*'da da var olduğunun ön verilerini sunması ve Lon proteaz, (p)ppGpp ve poliP arasındaki çalışma ağı içerisinde gerçekleşen etkileşimlerin ikincil metabolizmaya olan etkilerinin aydınlatılmasına katkı sağlaması açısından oldukça önemlidir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibiyotik üretiminin regülasyonunun incelendiği çalışmalarda sıklıkla model organizma olarak tercih edilen *Streptomyces coelicolor* suşunda çeşitli genlerin ve strese neden olan farklı çevresel sinyallerin sekonder metabolit gen kümelerinin ekspresyonlarını etkilediği bilinmektedir [14], [95]. Bu çalışma kapsamında rekombinant suşta aktinorhodin (*act*) gen kümesinin yolak spesifik aktivatörü olan *act*II-ORF4 ile undesilprodigiosin (*red*) gen kümesine ait biyosentez genlerinden biri olan *red*K genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve yaban suşa göre önemli artışlar elde edilmiştir. *act* ve *red* gen kümelerinde bulanan diğer genlerin de transkripsiyonel düzeyde çalışılması, bu çalışmanın bulgularının desteklenmesi için önemli olacaktır. Ayrıca, farklı stres koşullarında bu gen kümelerinin düzenlenemesini sağlayan çeşitli global regülatörlere ait genlerin anlatımlarının incelenmesi de oldukça önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen önemli verilerden biri yüksek antibiyotik üreticisi olduğu bilinen Sco-pRA*lon* suşunda *lon* geninin anlatımının da ciddi oranda indüklemesidir. Lon proteaz önemli bir stres regülonunun (HspR/HAIR) parçası olması nedeniyle antibiyotik üretimini etkileyen önemli bir adaydır [51]. *Streptomyces*'lerde Lon geninin transkripsiyonu HspR tarafından baskılanırken ClgR aktivatörü tarafından indüklenmektedir olacaktır [21], [51]. Bu sebeple *lon* ile beraber bu proteinleri kodlayan genlerinde transkripsiyonel analizlerinin yapılması faydalı olacaktır.

Çalışma kapsamında sınırlandırılmış cevap mekanizmasında alarmonların birikiminden sorumlu *relA* ile polifosfat metabolizmasından sorumlu *ppk* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Çeşitli stres durumlarında, RelA proteininin yanı sıra SpoT proteini de alarmonların sentezinden sorumludur [4]. Ppk enzimi tarafından sentezlenen polifosfat polimerinin yıkımı ise Ppx enzimi tarafından gerçekleşmektedir [6], [7]. Hücrenin stresle başa çıkmasına katkı sağlayan polifosfatın sekonder metabolizmayı etkilediği bilinmektedir [10], [82]. Burada bahsi geçen tüm proteinler, sınırlandırılmış cevabın oluşturulmasını sağlayan ve *E. coli*'de önerilen Lon, alarmon ve polifosfat arasındaki çalışma ağında yer almaktadır. Bu sebeple *ppk* ve *rel*A genine ek olarak *ppx* ve *spo*T genlerinin anlatım seviyelerinin de

rekombinant suşta incelenmesi, bu kompleks ağın *S. coelicolor*'daki varlığının ve antibiyotik üretimine etkisinin belirlenmesine ışık tutacaktır.

Bu çalışmayla ekstra bir kopya *lon* geninin *S. coelicolor* suşunda strese neden olduğu *sig*B geninin ekspresyon seviyesindeki artışla kanıtlanmıştır. Bu çalışmada yer alan tüm genlerin transkripsiyonel analizleri R2YE besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmanın minimal besiyerinde büyütülen hücrelerle yapılmasıyla elde edilecek sonuçlar oldukça merak uyandırıcı olacaktır. Çünkü zaten streste olan hücrede besin yetersizliğinin de etkisiyle gerçekleşecek değişimlerin önemli olacağı düşünülmektedir.

Rekombinant suşun total transkriptom verisinin elde edilmesi, yüksek antibiyotik üretiminin sebeplerini aydınlatacak en kısa ve etkili yol olarak görülmektedir. Ancak, Bucca ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada belirli stres koşullarında *S. coelicolor* suşunda genom çapında yaptıkları analizlerden elde ettikleri transkriptom ve translatom verilerinin her zaman birbiriyle tutarlı olmadığını gösterdiklerinden, rekombinant suşun total proteomunun da çalışılması yararlı olacaktır [136].

Transkripsiyonel analizlere ek olarak gerçekleştirilen bir diğer çalışma kapsamında, kendisi yüksek antibiyotik üreticisi olan M145 Δppk mutant suşun genomuna 1 ekstra *lon* geni entegre edilerek oluşturulan mutant suşun antibiyotik üretemediği ve normalden çok yavaş büyüdüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, polifosfat üretemeyen bu suşta, sınırlandırılmış cevap için gerekli PoliP-Lon kompklesinin oluşamadığı için hücrenin aşırı strese girmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda, Lon ve polifosfatın birbirlerine bağlanıp bağlanmadığının araştırılması, *E. coli*'de öngürülen Lon proteaz-poliP etkileşiminin *S. coelicolor*'daki varlığının belirlenebilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

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

[2] Chater K. F., (2006), "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics", Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 361 (1469), 761-768.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[13] Hesketh A., Sun J., Bibb M., (2001), "Induction of ppGpp synthesis in Streptomyces coelicolor A3 (2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis", Molecular microbiology, 39 (1), 136-144.

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

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

[16] Neuwald A. F., Aravind L., Spouge J. L., Koonin E. V., (1999), "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes", Genome research, 9 (1), 27-43.

[17] Swamy K. S., Goldberg A. L., (1981), "E. coli contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent", Nature, 292 (5824), 652.

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

[19] Rotanova T. V., Melnikov E. E., Khalatova A. G., Makhovskaya O. V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A., (2004), "Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains", European journal of biochemistry, 271 (23-24), 4865-4871.

[20] Cha S. S., An Y. J., Lee C. R., Lee H. S., Kim Y. G., Kim S. J., Kwon K. K., De Donatis G. M., Lee J. H., Maurizi M. R., (2010), "Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber", The EMBO journal, 29 (20), 3520-3530.

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

[22] Gur E. (2013), "The Lon AAA+ protease". "Regulated Proteolysis in Microorganisms", Springer.

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

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

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

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

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

[28] Gur E., Sauer R. T., (2008), "Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA+ protease", Genes & development, 22 (16), 2267-2277.

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

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

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

[32] Chung C. H., Goldberg A. L., (1982), "DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from Escherichia coli", Proceedings of the National Academy of Sciences, 79 (3), 795-799.

[33] Goldberg A. L., Rock K. L., (1992), "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation", Nature, 357 (6377), 375.

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

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

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

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

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

[39] Gottesman S., Trisler P., Torres-Cabassa A., (1985), "Regulation of capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K-12: characterization of three regulatory genes", Journal of bacteriology, 162 (3), 1111-1119.

[40] Takaya A., Tomoyasu T., Tokumitsu A., Morioka M., Yamamoto T., (2002), "The ATP-dependent lon protease of Salmonella enterica serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on Salmonella pathogenicity island 1", Journal of bacteriology, 184 (1), 224-232.

[41] Brazas M. D., Breidenstein E. B., Overhage J., Hancock R. E., (2007), "Role of lon, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of Pseudomonas aeruginosa to ciprofloxacin", Antimicrobial agents and chemotherapy, 51 (12), 4276-4283.

[42] Breidenstein E. B., Janot L., Strehmel J., Fernandez L., Taylor P. K., Kukavica-Ibrulj I., Gellatly S. L., Levesque R. C., Overhage J., Hancock R. E., (2012), "The Lon protease is essential for full virulence in Pseudomonas aeruginosa", PloS one, 7 (11), e49123.

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

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

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

[46] Van Melderen L., Aertsen A., (2009), "Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis", Research in microbiology, 160 (9), 645-651.

[47] Sutton M. D., Smith B. T., Godoy V. G., Walker G. C., (2000), "The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance", Annual review of genetics, 34.

[48] Wu W.-F., Zhou Y., Gottesman S., (1999), "Redundant In Vivo Proteolytic Activities ofEscherichia coli Lon and the ClpYQ (HslUV) Protease", Journal of bacteriology, 181 (12), 3681-3687.

[49] Phillips T., VanBogelen R., Neidhardt F., (1984), "lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein", Journal of bacteriology, 159 (1), 283-287.

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

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

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

[53] Nishii W., Kukimoto-Niino M., Terada T., Shirouzu M., Muramatsu T., Kojima M., Kihara H., Yokoyama S., (2015), "A redox switch shapes the Lon protease exit pore to facultatively regulate proteolysis", Nature chemical biology, 11 (1), 46.

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

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

[56] Bellier A., Mazodier P., (2004), "ClgR, a novel regulator of clp and lon expression in Streptomyces", Journal of bacteriology, 186 (10), 3238-3248.

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

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

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

[60] Zhou A., He Z., Qin Y., Lu Z., Deng Y., Tu Q., Hemme C. L., Van Nostrand J. D., Wu L., Hazen T. C., (2013), "StressChip as a high-throughput tool for assessing microbial community responses to environmental stresses", Environmental science & technology, 47 (17), 9841-9849.

[61] Srivatsan A., Wang J. D., (2008), "Control of bacterial transcription, translation and replication by (p) ppGpp", Current opinion in microbiology, 11 (2), 100-105.

[62] Raskin D. M., Judson N., Mekalanos J. J., (2007), "Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in Vibrio cholerae", Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (11), 4636-4641.

[63] Atkinson G. C., Tenson T., Hauryliuk V., (2011), "The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life", PloS one, 6 (8), e23479.

[64] Chatterji D., Fujita N., Ishihama A., (1998), "The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the β-subunit of Escherichia coli RNA polymerase", Genes to Cells, 3 (5), 279-287.

[65] Kanjee U., Ogata K., Houry W. A., (2012), "Direct binding targets of the stringent response alarmone (p) ppGpp", Molecular microbiology, 85 (6), 1029-1043.

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

[67] Parshin A., Shiver A. L., Lee J., Ozerova M., Schneidman-Duhovny D., Gross C. A., Borukhov S., (2015), "DksA regulates RNA polymerase in Escherichia coli through a network of interactions in the secondary channel that includes Sequence Insertion 1", Proceedings of the National Academy of Sciences, 112 (50), E6862-E6871.

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

[69] Dalebroux Z. D., Swanson M. S., (2012), "ppGpp: magic beyond RNA polymerase", Nature Reviews Microbiology, 10 (3), 203.

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

[71] Hauryliuk V., Atkinson G. C., Murakami K. S., Tenson T., Gerdes K., (2015), "Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology", Nature Reviews Microbiology, 13 (5), 298.

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

[73] Wood H. G., Clark J. E., (1988), "Biological aspects of inorganic polyphosphates", Annual review of biochemistry, 57 (1), 235-260.

[74] Van Dien S. J., Keasling J., (1998), "A Dynamic Model of theEscherichia coliPhosphate-Starvation Response", Journal of theoretical biology, 190 (1), 37-49.

[75] Rao N. N., Gómez-García M. R., Kornberg A., (2009), "Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival", Annual review of biochemistry, 78, 605-647.

[76] Wang L., Yan J., Wise M. J., Liu Q., Asenso J., Huang Y., Dai S., Liu Z., Du Y., Tang D., (2018), "Distribution patterns of polyphosphate metabolism pathway and its relationships with bacterial durability and virulence", Frontiers in microbiology, 9, 782.

[77] Albi T., Serrano A., (2016), "Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer", World journal of microbiology and biotechnology, 32 (2), 27.

[78] Kuroda A., (2006), "A polyphosphate-lon protease complex in the adaptation of Escherichia coli to amino acid starvation", Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 70 (2), 325-331.

[79] Kuroda A., Murphy H., Cashel M., Kornberg A., (1997), "Guanosine tetra-and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 272 (34), 21240-21243.

[80] Rao N. N., Liu S., Kornberg A., (1998), "Inorganic polyphosphate in Escherichia coli: the phosphate regulon and the stringent response", Journal of bacteriology, 180 (8), 2186-2193.

[81] Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A., (1987), "Structure and function of the regulatory genes for the phosphate regulon in Escherichia coli", Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms, 20-25.

[82] Shiba T., Tsutsumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N. N., Kornberg A., (1997), "Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression", Proceedings of the National Academy of Sciences, 94 (21), 11210-11215.

[83] Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.-P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G. P., (2016), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 80 (1), 1-43.

[84] Pathalam G., Rajendran H. A. D., Appadurai D. R., Gandhi M. R., Michael G. P., Savarimuthu I., Naif A. A.-D., (2017), "Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties", Beni-Suef University journal of basic and applied sciences, 6 (2), 209-217.

[85] Anteneh Y. S., Franco C. M. M., (2019), "Whole Cell Actinobacteria as Biocatalysts", Frontiers in microbiology, 10, 77.

[86] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G. P. (2016), "An introduction to actinobacteria". "Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications", IntechOpen.

[87] Baral B., Akhgari A., Metsä-Ketelä M., (2018), "Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges", Synthetic and Systems Biotechnology.

[88] Lewin G. R., Carlos C., Chevrette M. G., Horn H. A., McDonald B. R., Stankey R. J., Fox B. G., Currie C. R., (2016), "Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications", Annual Review of Microbiology, 70, 235-254.

[89] Pettis G. S., (2018), "Spreading the news about the novel conjugation mechanism in Streptomyces bacteria", Environmental microbiology reports, 10 (5), 503-510.

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

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

[92] Harrison J., Studholme D. J., (2014), "Recently published Streptomyces genome sequences", Microbial biotechnology, 7 (5), 373.

[93] Rigali S., Anderssen S., Naômé A., van Wezel G. P., (2018), "Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery", Biochemical pharmacology, 153, 24-34.

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

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

[96] Murphy T. M., Nilsson A. Y., Roy I., Harrop A., Dixon K., Keshavarz T., (2011), "Enhanced intracellular Ca2+ concentrations in Escherichia coli and Bacillus subtilis after addition of oligosaccharide elicitors", Biotechnology letters, 33 (5), 985-991.

[97] Kawai K., Wang G., Okamoto S., Ochi K., (2007), "The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in Streptomyces spp", FEMS microbiology letters, 274 (2), 311-315.

[98] Yu Z., Zhu H., Zheng G., Jiang W., Lu Y., (2014), "A genome-wide transcriptomic analysis reveals diverse roles of the two-component system DraR-K in the physiological and morphological differentiation of Streptomyces coelicolor", Applied microbiology and biotechnology, 98 (22), 9351-9363.

[99] Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J.-Y., Tomono A., Horinouchi S., (2005), "AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in Streptomyces griseus", Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 69 (3), 431-439.

[100] Wang R., Mast Y., Wang J., Zhang W., Zhao G., Wohlleben W., Lu Y., Jiang W., (2013), "Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in S treptomyces coelicolor", Molecular microbiology, 87 (1), 30-48.

[101] Uguru G. C., Stephens K. E., Stead J. A., Towle J. E., Baumberg S., McDowall K. J., (2005), "Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in Streptomyces coelicolor", Molecular microbiology, 58 (1), 131-150.

[102] Hutchings M. I., Hoskisson P. A., Chandra G., Buttner M. J., (2004), "Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of Streptomyces coelicolor A3 (2)", Microbiology, 150 (9), 2795-2806.

[103] Urem M., van Rossum T., Bucca G., Moolenaar G. F., Laing E., Świątek-Połatyńska M. A., Willemse J., Tenconi E., Rigali S., Goosen N., (2016), "OsdR of Streptomyces coelicolor and the dormancy regulator DevR of Mycobacterium tuberculosis control overlapping regulons", mSystems, 1 (3), e00014-00016.

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

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

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

[107] Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A. W., Hopwood D. A., Van Wezel G. P., (2008), "Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces", EMBO reports, 9 (7), 670-675.

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

[109] Chouayekh H., Virolle M. J., (2002), "The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in Streptomyces lividans", Molecular microbiology, 43 (4), 919-930.

[110] 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.

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

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

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

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

[115] MacNeil D. J., Occi J. L., Gewain K. M., MacNeil T., Gibbons P. H., Ruby C. L., Danis S. J., (1992), "Complex organization of the Streptomyces avermitilis genes encoding the avermectin polyketide synthase", Gene, 115 (1), 119-125.

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

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

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

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

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

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

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

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

[124] Livak K. J., Schmittgen T. D., (2001), "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method", methods, 25 (4), 402-408.

[125] Li S., Wang W., Li X., Fan K., Yang K., (2015), "Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for Streptomyces coelicolor", Scientific reports, 5, 15840.

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

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

[128] Rocha D. J., Santos C. S., Pacheco L. G., (2015), "Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis", Antonie van Leeuwenhoek, 108 (3), 685-693.

[129] Craney A., Hohenauer T., Xu Y., Navani N. K., Li Y., Nodwell J., (2007), "A synthetic luxCDABE gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria", Nucleic acids research, 35 (6), e46.

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

[131] Bilyk B., Luzhetskyy A., (2014), "Unusual site-specific DNA integration into the highly active pseudo-attB of the Streptomyces albus J1074 genome", Applied microbiology and biotechnology, 98 (11), 5095-5104.

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

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

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

[135] Nikel P. I., Chavarría M., Martínez-García E., Taylor A. C., de Lorenzo V., (2013), "Accumulation of inorganic polyphosphate enables stress endurance and catalytic vigour in Pseudomonas putida KT2440", Microbial cell factories, 12 (1), 50.

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

[137] Demir Ğ., (2018), “Streptomyces coelicolor M145 ve Streptomyces coelicolor A3(2)'nin Δppk Mutantlarının Eldesi ve Karakterizasyonları’’, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[138] Cesur MF., (2018), ‘’ Sınırlandırılmış Cevaptan Sorumlu RelA Geninin Streptomyces Coelicolor Suşunda Antibiyotik Üretimine Etkisi’’, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

ÖZGEÇMİŞ

Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, 21 Mayıs 1992 yılında Ankara'da doğdu. 2016 yılında İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.