

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

**ÇOK KOPYALI POLİFOSFAT KİNAZ VE
EKZOPOLİFOSFATAZ GENLERİNİN
POTANSİYEL EKSPRESYONUNUN
STREPTOMYCES COELICOLOR 'IN AĞIR
METAL TOLERANSINA VE FOSFAT
DEPOLAMASINA ETKİSİ**

Ümmehan SAVAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2010

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

ÇOK KOPYALI POLİFOSFAT KİNAZ VE
EKZOPOLİFOSFATAZ GENLERİNİN
POTANSİYEL EKSPRESYONUNUN
STREPTOMYCES COELICOLOR 'IN AĞIR
METAL TOLERANSINA VE FOSFAT
DEPOLAMASINA ETKİSİ

Ümmehan SAVAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

GEBZE

2010

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: ÇOK KOPYALI POLİFOSFAT KİNAZ VE EKZOPOLİFOSFATAZ GENLERİNİN POTANSİYEL EKSPRESYONUNUN STREPTOMYCES COELICOLOR 'IN AĞIR METAL TOLERANSINA VE FOSFAT DEPOLAMASINA ETKİSİ

YAZAR ADI: Ümmehan SAVAŞ

Son yıllarda, sanayi ve evsel atıklar nedeniyle ortaya çıkan fosfat ve ağır metal kirliliğinin, biyoteknolojik yöntemlerle biyoremediasyonu önem kazanmıştır. Bütün canlılarda bulunan önemli bir polimer olan polifosfatın ve polifosfat metabolizmasında görevli enzimlerin, atık sulardaki fosfat ve ağır metal kirliliğinin biyoremediasyonla giderilmesinde görev alabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, *S. coelicolor* polifosfat metabolizmasında görev alan *ppk* (polifosfat kinaz) ve *ppx* (ekzopolifosfataz) genlerinin biyoinformatik analizi sonucu, *ppk* geni promotor bileşenleri için belirlenen konsensus dizilerinin, *S. lividans* konsensus dizileriyle örtüştüğü (Chouayekh ve Virolle, 2006) ve *ppx* genine ait herhangi bir promotor bölgesi bulunmadığı gözlenmiştir. Bunun ardından, *S. coelicolor* suşuna ait *ppk* genini taşıyan pHZ1351-*ppk* ve hem *ppk* hem de *ppx* genlerini taşıyan pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitleri elde edilmiş ve *S. coelicolor*'a aktarılmıştır. Bu genlerin yüksek seviyede ifadesinin, hücrelerin farklı stres faktörlerine karşı direnci üzerine ve hücrelerin ortamdaki P_i 'ı ve ağır metalleri (Cd ve Pb) uzaklaştırabilme kapasitelerine etkisi incelenmiştir. Yaban suş ile karşılaştırıldığında, rekombinant suşların optimum değerlerden farklı olan pH ve sıcaklık değerlerine daha dayanıklı oldukları görülmüştür. Ayrıca, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suşun, farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında, yaban ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşlara göre H_2O_2 'e daha hassas olduğu ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra yaban suş ve rekombinant suşların, ortamdaki fosfat uzaklaştırma kapasiteleri ölçülmüş ve yaban suşun fosfat alımı oranının rekombinant suşlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, yaban suş ile karşılaştırıldığında, rekombinant suşların, farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında kadmiyum ve kurşun ağır metallerine dirençliliklerinin daha az olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Polifosfat, Polifosfat Kinaz, Ekzopolifosfataz, Biyoremediasyon.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: THE EFFECT OF POTENTIAL EXPRESSION OF MULTIPLE COPIES OF POLYPHOSPHATE KINASE AND EXOPOLYPHOSPHATASE GENES ON STREPTOMYCES COELICOLOR'S HEAVY METAL RESISTANCE AND PHOSPHATE STORAGE

AUTHOR: Ümmehan SAVAŞ

In recent years, bioremediation of phosphate and heavy metal pollution by biotechnological procedures has become an important issue because of sewage and industrial wastes. Polyphosphate is a significant polymer found in all living species. It is suggested that, polyphosphate and the enzymes of polyphosphate metabolism, may be used in bioremediation of heavy metals and phosphorus in wastewaters.

In this study, bioinformatic analysis of *S. coelicolor ppk* (polyphosphate kinase) and *ppx* (exopolyphosphatase) genes of polyphosphate metabolism showed that the consensus sequences exist in the promoter region of *ppk* gene is similar to that of *S. lividans* (Chouayekh and Virolle, 2002) and *ppx* gene has no promoter region in its upstream. Then, pHZ1351-*ppk* plasmid carrying *S. coelicolor ppk* gene and pHZ1351-*ppkppxp* plasmid carrying both *ppk* and *ppx* genes were constructed and they were used to transform *S. coelicolor*. The effect of overexpression of these genes on resistance of cells to different stress factors and on capacity of the cells to remove Pi and heavy metals (Cd and Pb) from the environment, were tested. When compared with the wild type, recombinant strains are more resistant to extreme pH and temperature. It has shown that recombinant strain carrying pHZ1351-*ppk* plasmid is more sensitive to H₂O₂ than the wild type and the strain carrying pHZ1351-*ppkppxp* plasmid. Phosphate uptake of wild type and recombinant strains is tested and it is found that wild type strain has higher phosphate uptake capacity than recombinant strains. In addition, when compared with wild type strain, in different KH₂PO₄ concentrations, recombinant strains were less resistant to lead and cadmium heavy metals.

Keywords: Polyphosphate, Polyphosphate Kinase, Exopolyphosphatase, Bioremediation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgisini, anlayışını, gülümsemesini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer hocam Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgisini ve önerilerini esirgemeyen Prof. Dr. Füsün Gümüşel'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yurt dışı tecrübesine sahip olma imkanı veren ve laboratuvarını açan, Prof. Dr. Hans Wolf-Watz ve Dr. Thomas Edgren'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim, ağabeyim, arkadaşım ve yardımcı danışmanım olan Arş. Gör. Tuğrul Doruk ve deneylerimde her zaman yardımcı olup, her halime sabırla yaklaşan, temiz kalpli arkadaşım İrem Yalım'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım. Laboratuvarında çalışmayı eğlenceli hale getiren arkadaşlarım Gonca Altın, Haluk Camcı ve Davut Erdoğan' a teşekkür ederim.

Kimsesiz zamanlarımda en değerli kimseler olan, aynı türden olduğumuza inandığım, sahip olduğum en özel insanlara; Arş. Gör. Irmak Şah, Zeynep Birsu Çinçin ve Biriz Arcan'a teşekkür ederim.

Son olarak, maddi ve manevi birçok zorluğa rağmen, okumam için ellerinden geleni yapan, sevgi ve şefkatlerini hiçbir zaman esirgemeyen, biricik aileme bütün kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Polifosfat Oluşumunda ve Yıkımında Rol Alan Enzimler	2
1.1.1. Polifosfat Kinaz (Polifosfat:ADP Fosfotransferaz (PPK) EC 2.7.4.1)	3
1.1.2. Ekzopolifosfataz (Polifosfat Fosfohidrolaz (PPX), EC 3.6.1.11)	7
1.1.3. Endopolifosfataz (Polifosfat Depolimeraz (PPN), EC 3.6.1.10)	8
1.1.4. PoliP:AMP Fosfotransferaz (PAP)	9
1.2. Polifosfat ve Polifosfat Bağımlı Enzimlerin İşlevleri	9
1.2.1. Fosfat Deposu Olarak Polifosfat	9
1.2.2. Enerji Kaynağı Olarak Polifosfat	10
1.2.4. Metal Şelatörü Olarak Polifosfat	11
1.2.5. Polifosfatın Hücre Zarı Oluşumu ve İşlevindeki Rolü	11
1.2.6. Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	12
1.2.7. Sporulasyon	16
1.3. Biyoremediasyon	16
1.3.1. Polifosfatın ve Polifosfat Metabolizmasında Görevli Enzimlerin Biyoremediasyonda Kullanılabilirliği	17
1.3.1.1. Atık Sulardan Fosfat Biyoremediasyonu	17
1.3.1.2. Ağır Metallerin Biyoremediasyonu	18
1.4. Streptomyces	20
1.4.1. Streptomyces Polifosfat Metabolizması	22
1.5. Tez Çalışmasının Amacı	23
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
2.1. Gereçler	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	24

2.1.2.Kullanılan Enzimler	24
2.1.3. Kullanılan Kitler	25
2.1.4.Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	25
2.1.5. Kullanılan Plazmit Vektörler	26
2.1.5.1. pBluescript II SK (-) Fajmid Vektör Sistemi	26
2.1.5.2. pHZ1351 <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> Mekik Vektörü	28
2.1.6. <i>S. coelicolor ppk</i> ve <i>ppx</i> Genlerinin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkarılması	29
2.1.7. Kullanılan Bakteri Soyları	31
2.1.8. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri	31
2.1.9. Kullanılan Cihazlar	38
2.2. Yöntemler	38
2.2.1. <i>S. coelicolor</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	38
2.2.2. <i>ppk</i> , <i>ppx</i> Genlerinin ve <i>ppk</i> promotor bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	39
2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	40
2.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması	42
2.2.4.1. <i>ppk</i> Geninin pBluescript SK(-) Plazmidine Klonlanması	42
2.2.4.2. pSK- <i>ppk</i> Plazmidine <i>ppx</i> Geninin Klonlanması	43
2.2.4.3. pSK- <i>ppk</i> - <i>ppx</i> Plazmidine <i>ppk</i> Promotor Bölgesinin Klonlanması	45
2.2.5. Klonlanan <i>ppk</i> , <i>ppx</i> ve promotor Bölgesi DNA'larının Dizilenmesi	46
2.2.6. <i>ppk</i> ve <i>ppxp</i> Genlerinin pHZ1351 Mekik Vektörüne Klonlanması	46
2.2.7. pHZ1351 Klonlarının <i>E. coli</i> ET12567 Suşuna Aktarılması	48
2.2.8. <i>E. coli</i> 'den Plazmit ve Kozmid İzolasyonu	48
2.2.9. <i>E. coli</i> Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması	49
2.2.10. <i>E. coli</i> Hücrelerinden Kaynatma Yöntemiyle Plazmit İzolasyonu	50
2.3. pHZ1351'e Klonlanan Genlerin <i>S. coelicolor</i> 'a Aktarılması	50
2.3.1. <i>S. coelicolor</i> Protoplastlarının Hazırlanması	50
2.3.2. Protoplast Transformasyonu	51
2.3.3. <i>Streptomyces coelicolor</i> 'dan Plazmit İzolasyonu	51
2.4. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	52
2.4.1. PPK Aktivitesinin Ölçülmesi	53
2.4.2. PPX Aktivitesinin Ölçülmesi	54
2.5. Protein Miktarının Belirlenmesi	54
2.6. Rekombinant <i>Streptomyces coelicolor</i> Suşlarının Farklı	54

Stres Koşullarına Dirençliliğinin Belirlenmesi	54
2.6.1. pH Dirençliliğinin Belirlenmesi	54
2.6.2. Sıcaklık Dirençliliğinin Belirlenmesi	55
2.6.3. H ₂ O ₂ Dirençliliğinin Belirlenmesi	55
2.7. Fosfat Alımının Ölçülmesi	56
2.8. Rekombinant <i>S. coelicolor</i> Suşlarının Ağır Metal Dirençliliğinin Ölçülmesi	57
3. BULGULAR	59
3.1. <i>ppk</i> , <i>ppx</i> Genleri ve <i>ppk</i> Promotor Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	59
3.2. <i>ppk</i> , <i>ppx</i> ve <i>ppk</i> Promotor Bölgesinin Klonlanması	60
3.2.1. <i>ppk</i> Geninin pBleuscript SK(-) Plazmidine Klonlanması	60
3.2.2. <i>ppx</i> Geninin pSK- <i>ppk</i> Plazmidine Klonlanması	61
3.2.3. <i>ppk</i> Promotor Bölgesinin pSK- <i>ppk-ppx</i> Plazmidine Klonlanması	62
3.3. <i>ppk</i> , <i>ppx</i> Genleri İle Promotor Bölgesinin pHZ1351 Mekik Vektörüne Klonlanması	67
3.4. <i>E. coli-Streptomyces</i> Mekik Vektörü pHZ1351'e Klonlanan Genlerin <i>S. coelicolor</i> 'a Aktarılması	70
3.5. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	72
3.5.1. Rekombinant <i>E. coli</i> Suşlarında PPK ve PPX Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi	72
3.5.2. Rekombinant <i>S. coelicolor</i> Suşlarında PPK ve PPX Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi	73
3.6. Rekombinant <i>S. coelicolor</i> Suşlarının Farklı Stres Koşullarına Dirençliliğinin Belirlenmesi	75
3.6.1. pH Dirençliliği	75
3.6.2. Sıcaklık Dirençliliği	77
3.6.3. H ₂ O ₂ Dirençliliği	79
3.7. Fosfat Alımının Ölçülmesi	81
3.8. Rekombinant <i>S. coelicolor</i> Suşlarının Ağır Metal Dirençliliğinin Ölçülmesi	84
5. KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
AckA	Asetat Kinaz
ADP	Adenozin difosfat
ADK	Adenilat Kinaz
AMP	Adenozin monofosfat
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BaCl₂	Baryum Klorür
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
Bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
CDP	Sitidin difosfat
CTAB	Setil trimetilamonyum bromid
EBPR	Arttırılmış Biyolojik Fosfor Uzaklaştırma
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz V
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
EtBr	Etidyum Bromid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DraI	<i>Deinococcus radiophilus</i> endonükleaz I
Fe	Demir
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
HCl	Hidroklorik asit
Hg	Civa
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyo galaktopiranozid
K	Potasyum
kDA	Kilodalton

KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
kJ	Kilojoule
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
Lon	Proteaz La
M	Molar
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Na₂OAc	Sodium Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ni	Nikel
PAH	Poliaromatik hidrokarbon
PAP	Poli-AMP-Fosfotransferaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCB	Poliklor bifenil
Pb(NO)₃	Kurşun nitrat
PEG	Polietilen Glikol
Pi	İnorganik fosfat
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethanesülfonik asit)
PoliP	Polifosfat
ppGpp	Guanozin tetrafosfat
PPK	Polifosfat kinaz
PPN	Endopolifosfataz
PPX	Ekzopolifosfataz
PSI	Guanozin tetrafosfat sentetaz
PstI	<i>Providencia stuartii</i> I endonükleaz

pstA	Fosfat taşıma proteini A
pstB	Fosfat taşıma proteini B
RecA	Rekombinaz A
rpoS	RNA polimeraz sigma faktör (38) geni
Rpm	Dakika başına dönüş
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i> endonükleaz I
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SpoT	Bifonksiyonel (p)ppGpp sentetaz II
TES	N-[Tris-(hidroksimetil)-metil]-2-aminoetansülfonik acit
TCA	Triklor asetik asit
UDP	Üridin dinükleotid
UmuD	DNA polimeraz V, altbirim D
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopranozid
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
XhoI	<i>Xanthomonas vasicola</i> endonükleaz I
Zn	Çinko
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma
σ^{70}	Sigma 70
σ^{38}	Sigma 38
$\text{E}\sigma^{70}$	Sigma 70 içeren holoenzim

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İnorganik polifosfatın kimyasal yapısı.	1
1.2 <i>E.coli</i> polifosfat kinazın (PPK) yapısı.	5
1.3 Seçilen 15 mikroorganizmada polifosfat kinaz (<i>ppk</i>) DNA dizilerinin karşılaştırılması.	5
1.4 <i>E.coli</i> PPX dimer ve olası aktif bölgenin yapısı.	8
1.5 Besin kıtlığı durumunda uyarılan Polifosfat kinaz bağımlı protein yıkımının şematik gösterimi	14
1.6 PoliP tarafından gen ekspresyonu regülasyonunun şematik modeli	15
1.7 <i>MerB-ppk</i> füzyon plazmidi içeren immobilize <i>E.coli</i> hücrelerinde civanın uzaklaştırılmasının şematik modeli	19
1.8 <i>Streptomyces coelicolor</i> yaşam döngüsü	20
1.9 <i>Streptomyces</i> kolonileri tarafından üretilen pigmentli ikincil metabolitler	21
2.1. 1 Kb Moleküler DNA Belirteci	25
2.2 pBluescript SK (+/-) fajmid vektör haritası	28
2.3 pHZ1351 vektörünün çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren haritası	29
2.4 <i>ppk</i> geninin restriksiyon haritası	30
2.5 <i>ppx</i> geninin restriksiyon haritası	30
2.6. pBluescript SK(-) plazmidine <i>ppk</i> geninin klonlanması sonucu oluşan pSK- <i>ppk</i> rekombinant plazmidinin şematik görünümü.	43
2.7. Rekombinant pSK- <i>ppk</i> plazmidine <i>ppx</i> geninin klonlanması sonucu oluşan pSK- <i>ppk-ppx</i> rekombinant plazmidinin şematik görünümü.	44
2.8. Rekombinant pSK- <i>ppk-ppx</i> plazmidine promotor bölgesinin klonlanması sonucu oluşturulan pSK- <i>ppk-ppxp</i> rekombinant plazmidinin şematik görünümü.	46
3.1. Agaroz jelden saflaştırılan <i>ppk</i> ve <i>ppx</i> ile <i>ppk</i> promotor bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünimleri	58
3.2. pSK- <i>ppk</i> plazmidinin restriksiyon endonükleaz ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları	59
3.3. pSK- <i>ppk-ppx</i> plazmidinin restriksiyon endonükleazları ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları	60
3.4. pSK- <i>ppk-ppx</i> plazmidinin restriksiyon endonükleazları ile kesim sonuçları	62
3.5. <i>ppk</i> genine ait dizinin 20. ile 61. bazları arasına ait kromotogram.	64

3.6.	<i>ppx</i> genine ait dizinin 30. ile 70. bazları arasına ait kromotogram	64
3.7.	<i>S. coelicolor</i> 'a ait <i>ppk</i> geni anlamlı DNA dizisi	65
3.8.	<i>S.coelicolor</i> 'a ait <i>ppx</i> geni anlamlı DNA dizisi	66
3.9.	<i>S. coelicolor</i> 'a ait <i>ppk</i> geni promotor bölgesi anlamlı DNA dizisi	66
3.10.	<i>ppk</i> geninin pSK- <i>ppk</i> plazmidinden çıkarılması.	67
3.11.	pHZ1351- <i>ppk</i> plazmidinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanlarının agaroz jelde görünümüleri	68
3.12.	pHZ1351- <i>ppk-ppx</i> plazmidinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanlarının agaroz jelde görünümüleri	69
3.13.	<i>E. coli</i> ET125672'den izole edilen pHZ1351, pHZ1351- <i>ppk</i> , pHZ1351- <i>ppk-ppx</i> plazmidlerinin <i>Hind</i> III restriksiyon enzimi ile kesim sonuçları.	70
3.14.	<i>S. coelicolor</i> 'dan izole edilen pHZ1351, pHZ1351- <i>ppk</i> , pHZ1351- <i>ppk-ppxp</i> plazmidlerinin <i>Xho</i> I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları.	71
3.15.	1-20 µg/ml protein içeren BSA solüsyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	72
3.16.	A. <i>Δppk</i> suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu. B. pHZ1351- <i>ppk</i> plazmidini taşıyan <i>Δppk</i> suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu	74
3.17.	R2YE besiyerinde (pH:5.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	75
3.18.	R2YE besiyerinde (pH:7.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	76
3.19.	R2YE besiyerinde (pH:9.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	77
3.20.	30 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	78
3.21.	37 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	78
3.22.	42 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi	79
3.23.	Yaban tip <i>S. coelicolor</i> 'ın farklı KH ₂ PO ₄ konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde, H ₂ O ₂ 'e dirençliliğinin ölçümü.	80
3.24.	pHZ1351- <i>ppk</i> plazmidini içeren rekombinant <i>S. coelicolor</i> suşunun farklı KH ₂ PO ₄ konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde, H ₂ O ₂ 'e dirençliliğinin ölçümü	80
3.25.	pHZ1351- <i>ppk-ppx</i> plazmidini içeren rekombinant <i>S.coelicolor</i> suşunun farklı KH ₂ PO ₄ konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde, H ₂ O ₂ 'e dirençliliğinin ölçümü	81
3.26.	0,5-7,5 µg/ml PO ₄ içeren standart solüsyonlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	82
3.27.	pHZ1351- <i>ppk</i> ve pHZ1351- <i>ppk-ppx</i> plazmidlerini içeren rekombinant <i>S. coelicolor</i> suşlarının 0,5 mM KH ₂ PO ₄ içeren minimal besiyerinde büyütülmeleri sonucu besiyerinde kalan fosfat miktarlarının karşılaştırılması	83

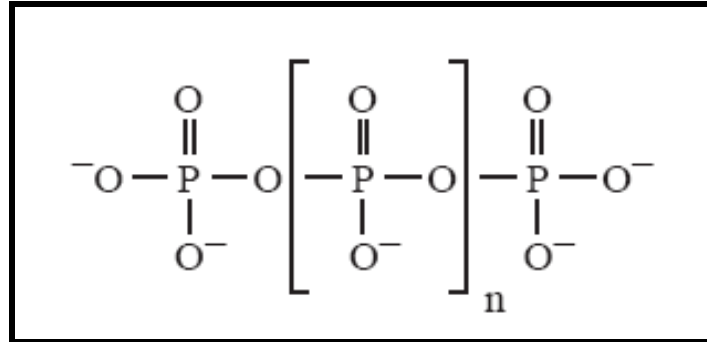
- 3.28.** Yaban tip, pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppx* plazmidlerini içeren rekombinant *S. cerevisiae* suşlarının 0,5 mM KH₂PO₄ içeren minimal besiyerinde büyütülmeleri sonucu besiyerinde kalan fosfat miktarlarının karşılaştırılması **84**

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Polifosfat metabolizmasında görev alan enzimler ve gerçekleştirdikleri reaksiyonlar.	3
1.2 PPK1 ve PPK 2 homologlarını içeren ve içermeyen mikroorganizmalar.	6
2.1 Deneylerde kullanılan plazmidler.	26
2.2 Bu çalışmada kullanılan bakteri soylarının karakteristik özellikleri.	31
2.3 <i>ppk</i> , <i>ppx</i> genleri ve <i>ppk</i> <i>promotor</i> bölgesi için tasarlanmış ileri ve geri primerler.	40
2.4. <i>ppk</i> , <i>ppx</i> ve <i>ppk</i> <i>promotor</i> bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan enzimler, reaksiyon tamponları ve reaksiyon koşulları.	41
3.1 Üst sıvıda ölçülen PPK aktivitesi sonuçları.	73
3.2 Farklı Pb ve KH ₂ PO ₄ konsantrasyonlarında yaban tip ve rekombinant suşların büyüme oranlarının karşılaştırılması	86
3.3 Farklı Cd ve KH ₂ PO ₄ konsantrasyonlarında yaban tip ve rekombinant suşların büyüme oranlarının karşılaştırılması	87

1. GİRİŞ

İnorganik polifosfat (poli P) onlarca ya da yüzlerce ortofosfat (P) rezidüsünün yüksek enerjili fosfoanhidrid bağlarıyla bir araya gelerek oluşturduğu lineer bir polimerdir (Şekil 1.1) (Brown ve Kornberg, 2004). Polifosfat, inorganik fosfatın (Pi) yüksek sıcaklıkta dehidrasyonu ile oluşmuştur ve prebiyotik evrimde bu özelliği sayesinde önemli roller üstlendiği düşünülmektedir (Kornberg ve ark., 1999). Doğadaki tüm bakteri, fungus, bitki ve hayvan hücrelerinde korunmuş olarak varlığını sürdürmektedir. (Brown ve Kornberg, 2004). Polifosfat çok sayıda farklı biyokimyasal özelliklere sahip bir biyomoleküldür. Hücre içinde enerji ve fosfat rezervuarı olarak kullanılması, metalleri şelatlayabilmesi, alkali ortamlarda tampon görevi görmesi, hücreye DNA girişinde kanal görevi yapması, mRNA stabilitesinde görev alması, fosfat biyoremediasyonunda kullanılması, hücrenin normal gelişimini düzenlemesi, hücrenin stres koşullarıyla başa çıkması, bakteriyel hücre kapsüllerinin yapısında bulunması bu özelliklerinden bazılarıdır. PoliP'nin kimyasal yapısının kazandırdığı avantajlardan en önemlisi, iyonize olabilme özelliğidir. Görüldüğü gibi PoliP, hücre içinde esnek ve kararlı yapısıyla birçok metabolik ihtiyaca cevap oluşturan bir polianyondur (Brown ve Kornberg, 2004; Kornberg ve ark., 1999).



Şekil 1.1. İnorganik polifosfatın kimyasal yapısı.

Polifosfat ilk kez mayalardan izole edilmiş ve hücre kuru ağırlığının %10-%20'si kadarını oluşturduğu gözlenmiştir ve sonrasında metakromatik granüller olarak varlıkları bakterilerde de tespit edilmiştir.

Elektron mikroskopunun keşfiyle elektron saçılımı altında gözlenen bu partiküllerin ışığı kırabilen, görüntüden kolayca kaybolan bir yapıya sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Diğer bazı polianyonlar gibi polifosfat, toluidin mavisi gibi bazik boyalara bağlanarak, boyanın absorpsiyonunu daha kısa bir dalga boyuna düşürmektedir (630'dan 530 nm'ye) (Kornberg ve ark., 1999).

PoliP, Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , ve Fe^{+3} gibi katyonları şelatlayabilme özelliğine sahip olduğundan bu iyonların biyolojik rollerini etkileyebilmektedir. Ayrıca bu polimer, Cd^{+2} ve Hg^{+} gibi toksik metalleri ayırma ve uzaklaştırma kapasitesine de sahiptir. (Kornberg ve ark., 1999).

PoliP'nin prebiyotik dünyada her yerde ve çok miktarda bulunması, bu polimerin, evrimsel süreçte önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir. Polianyonik ve yüksek enerjili bir molekül olması nedeniyle çeşitli polimerlerin ve makromoleküllerin bir araya gelmesini ve yönlendirilmesini sağlamış olabileceği ve bu oluşumda PoliP'nin üçüncül yapıdan yoksun olmasının ve şelatlama kapasitesinin etkili olduğu önerilmektedir. Bir fosforilasyon ajanı olarak polifosfatın, alkoller, şekerler, nükleozitler ve proteinlere fosfat verdiği, yağ asitleri ve polipeptidleri oluşturmak için aktif alkil ve amino asitlerle ilişki kurduğu düşünülmektedir. Kısaca PoliP'nin biyotik dünyanın ana polimerleri olan fosfolipidler, nükleik asitler ve proteinlerin bir araya gelmelerini ve yönlendirmelerini kolaylaştırmış olabileceği önerilmektedir (Brown ve Kornberg, 2004).

1.1. Polifosfat Oluşumunda ve Yıkımında Rol Alan Enzimler

Polifosfat polimerinin fonksiyonlarının anlaşılması için, PoliP metabolizmasında görev alan enzimler tanımlanmış, saflaştırılmış ve bu enzimleri kodlayan genler çoğaltılmıştır. Birçok patojen bakteriyi de içine alan mikroorganizmalarda polifosfat metabolizmasında görev alan başlıca enzimler, polifosfat sentezinden sorumlu olan polifosfat kinaz (PPK 1) ve polifosfatı substrat olarak kullanan ve AMP'yi fosforile ederek ADP oluşumunu katalizleyen PoliP-AMP-fosfotransferazlardır (PAP). Diğer hidrolitik enzimler ise ekzopolifosfatazlar (PPX) ve endopolifosfatazlardır (PPN) (Tablo 1.1) (Brown ve Kornberg, 2004).

Tablo 1.1 Polifosfat metabolizmasında görev alan enzimler ve gerçekleştirdikleri reaksiyonlar.

Polifosfat sentezi

Polifosfat kinaz1 (PPK1)
 $n\text{ATP} \leftrightarrow \text{PolyP}_n + n\text{ADP}$

Polifosfat Yıkımı

Polifosfat kinaz2 (PPK2)
 $\text{PolyP}_n + \text{GDP} \leftrightarrow \text{PolyP}_{n-1} + \text{GTP}$

Polifosfat-AMP-fosfotransferaz (PAP)
 $\text{PolyP}_n + \text{AMP} \leftrightarrow \text{PolyP}_{n-1} + \text{ADP}$

Ekzopolifosfataz (PPX)
 $\text{PolyP}_n \rightarrow \text{PolyP}_{n-1} + \text{P}_i$

Endopolifosfataz (PPN)
 $\text{PolyP}_n \rightarrow \text{PolyP}_x + \text{PolyP}_y$
 $x+y = n$ (PPN zinciri rastgele keser)

1.1.1. Polifosfat Kinaz (Polifosfat:ADP Fosfotransferaz (PPK) EC

2.7.4.1)

Enerji bakımından zengin fosfat rezidülerini ATP'den PoliP'ye ve PoliP'den ADP'ye dönüşümlü olarak aktaran polifosfat kinaz enzimi ilk kez Kornberg ve çalışma arkadaşları (1956, 1957) tarafından keşfedilmiştir.

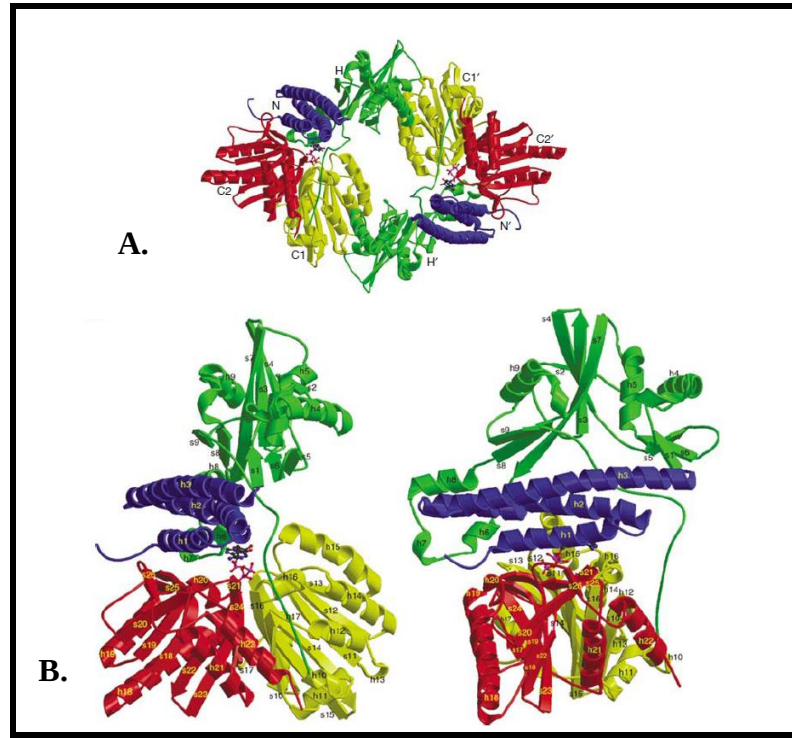
Bu enzim ilk kez *Propionibacterium shermanii* 'den kısmen saflaştırılmış ve yaklaşık 83 kDa moleküler ağırlığında monomerik bir enzim olduğu gösterilmiştir (Robinson ve ark., 1987). 6–80 rezidü uzunluktaki PoliP'nin primer görevi gördüğü reaksiyonda ATP kullanılarak uzun PoliP zincirlerinin sentezinin gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Sentezlenen en uzun PoliP zinciri 750 rezidüye ulaşmaktadır (Robinson ve ark., 1987). PPK hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler arasında oldukça korunmuştur. *Dictyostelium* dışında ökaryotlarda PPK bulunmamaktadır ve bu organizmaya ait PPK enzimi işlevsel olarak bakteriyel PPK'dan farklıdır (Brown ve Kornberg, 2004).

Escherichia coli 'den izole edilen polifosfat kinazın (PPK1), membrana bağlı, 80 kDa moleküler ağırlığında bir homotetramer yapıda olduğu ve *in vivo* koşullarda uzun polifosfat zincirinin (PoliP₇₅₀) ilerleyen sentezinde görev aldığı gösterilmiştir (Ahn ve Kornberg, 1990; Akiyama ve ark., 1992).

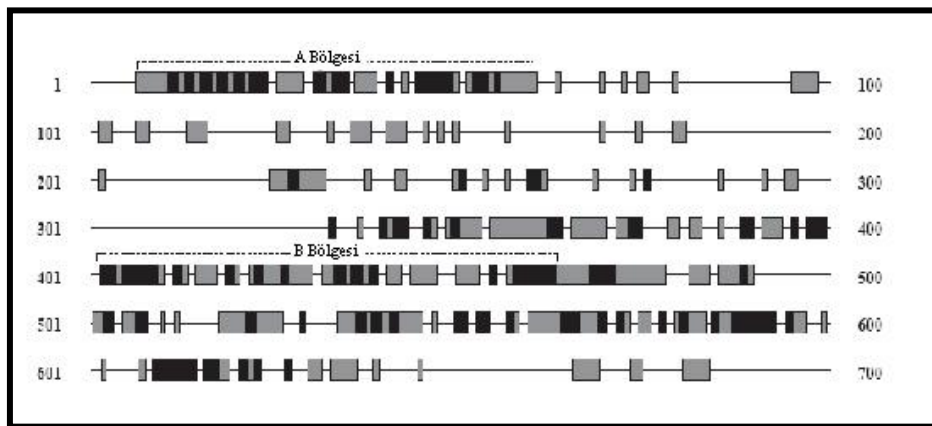
Mg⁺² iyonunu kofaktör olarak kullanan enzimin (Ahn ve Kornberg, 1990) polifosfatlardan ATP sentezini dönüşümlü olarak katalizleyebildiği ortaya çıkarılmıştır (Kornberg, 1957; Murata ve ark., 1988; Ahn ve Kornberg, 1990; Kuroda ve Kornberg, 1997). Aynı zamanda PPK polifosfattan bir pirofosforil grubunu GDP'ye aktararak guanozin tetrafosfat oluşumunu gerçekleştirmektedir. (Gorbel ve ark., 2006, Kato ve ark., 1993). Bu reaksiyon, *E.coli*'den elde edilen saflaştırılmış enzim preparatlarında gerçekleştiği gibi, *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın membran fraksiyonlarında da gözlenmiştir. *ppk1* geninden yoksun *E.coli* mutantlarından elde edilen membran fraksiyonlarında böyle bir aktiviteye rastlanmamıştır. Enzimin substrat özgüllüğünün ADP> GDP>UDP, CDP olduğu gösterilmiştir. Adenozin difosfatı substrat olarak kullanan enzimin guanozin difosfat ile olduğundan iki kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Noguchi ve Shiba, 1998).

E. coli PPK enziminin kristal yapısı tamamen karakterize edilmiştir. Buna göre, PPK'nın dimerizasyonunun PoliP (ileri reaksiyon) ve ATP (geri reaksiyon) sentezi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Her bir PPK monomeri dört yapısal domain ile L-şekilli bir yapıya sahiptir ve bu domainler amino-terminal domaini (N domain), 'head' domaini (H domain) ve iki tane yakından ilişkili karboksi domainleridir (C1 ve C2 domainleri). H-domaini diğer PPK monomerinin C1 domaini ile etkileşime girerek dimer oluşumunu sağlar (Şekil 1.2). PoliP sentezi, PPK'nın otofosforilasyonu ile başlar ve katalitik reaksiyonlar, korunmuş bir yapısal tünel içinde gerçekleşir. Ribozom ve RNA polimerazların görev aldığı moleküler reaksiyonların da tünel içinde gerçekleşmesi, PPK'nın kalıbı olmayan bir polimeraz olarak tanımlanmasına sebep olmuştur. Enzimin bu özelliği sayesinde polimeraz evrimine ışık tutabileceği önerilmiştir (Zhu ve ark., 2005).

E.coli ppk1 geni başta olmak üzere (Akiyama ve ark., 1992), *Klebsiella aerogenes* (Kato ve ark.,1993), *Neisseria meningitidis* (Tinsley ve Gotschlich, 1995), *P. aeruginosa* (Ishige ve ark., 1998), *Acinetobacter* sp. (Geissdorfer ve ark., 1998), *V. cholerae* (Ogawa ve ark., 2000), *Rhodocyclus tenuis* (McMahon ve ark., 2002) ve diğer birçok bakteriye ait *ppk* geni klonlanmış, dizilenmiş ve karakterize edilmiştir. Elde edilen amino asit dizileri farklı bakteriyel türlerde geniş bir homoloji göstermektedir (Şekil 1.3) (Tzeng ve Kornberg, 1998),.



Şekil 1.2. *E. coli* polifosfat kinazın (PPK) yapısı. **A.** Asimetrik birimde PPK dimerinin yapısı; bir PPK molekülünün H-domaininin diğer PPK molekülünün C1 domaini ile etkileşmesi. Her iki alt ünitenin N-terminal domaini (2-106 rezidüleri) mavi ile gösterilmiştir, H-domaini (107-321) rezidüleri yeşil, C-terminaldeki C1 domaini (322-502 rezidüleri) sarı, C2 domaini ise (503-687 rezidüleri) kırmızı ile gösterilmiştir. **B.** PPK monomerinin (80 kDa, 687 aa) sol yandan görünüşü ve 90°'lik dönüş ile sağ yandan görünüşü. Heliksler (h) ve iplikler (s) N ucundan C ucuna doğru işaretlenmiştir. Tüm renkler A şekli ile aynı düzende gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2005).



Şekil 1.3. Polifosfat kinaz (*ppk*) DNA dizilerinin 15 mikroorganizmada karşılaştırılması. (Siyah kutular, %100 benzerliği, gri kutular %60 benzerliği göstermektedir) (Kornberg ve ark., 1999).

Zhang ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın PPK1'den yoksun mutantlarında PPK aktivitesine rastlanmıştır. Bu aktivitenin, GDP ve diğer nükleozid difosfatları nükleozit trifosfata çevirmek için ATP yerine PoliP'yi inorganik fosfat kaynağı olarak kullanan bir enzime ait olduğu gösterilmiştir ve bu enzim PPK2 olarak adlandırılmıştır. PPK2, Mn^{+2} ya da Mg^{+2} 'u kofaktör olarak kullanmakta ve geri reaksiyon olan GTP'den GDP sentezini ileri reaksiyondan 75 kat daha fazla gerçekleştirmektedir. Tablo 1.2'de PPK1 ve PPK2 enzimlerini ayrı ayrı ya da birlikte barındıran ve barındırmayan mikroorganizmalar listelenmiştir (Zhang ve ark., 2002).

Tablo 1.2. PPK1 ve PPK 2 homologlarını içeren ve içermeyen mikroorganizmalar (Zhang ve ark., 2002).

PPK2	Sadece PPK1	Ne PPK1 ne de PPK2 içermeyenler
PPK2 ve PPK1	Genomu tamamlanmış	<i>Aeropyrum pernix*</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus*</i>
<i>Burkholderia fungorum</i> (2) [†]	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>E. coli</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Buchnera aphidicola</i> str. Sg
<i>Chlorobium tepidum</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Buchnera</i> sp. APS
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Chlamydia muridarum</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> (2)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>Mesorhizobium loti</i> (2)	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Methanosarcina acetivorans</i> (2)*	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Methanosarcina mazei</i> (2)*		<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Genomu tamamlanmamış	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1*
<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Nostoc punctiforme</i> (2)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 (2)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Prochlorococcus marinus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	<i>Methanococcus jannaschii*</i>
<i>P. aeruginosa</i> (3)	<i>Aphanizomenon</i> sp. TR183	<i>Methanopyrus kandleri*</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)	<i>Aphanizomenon baltica</i>	<i>Methanothermobacter</i>
<i>Ralstonia metallidurans</i> (5)	<i>Arthrobacter</i> sp. KM	<i>thermautotrophicus*</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (2)	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (3)	<i>Dictyostelium discoideum*</i>	<i>Pyobaculum aerophilum*</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	<i>Pyrococcus abyssi*</i>
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	<i>Haloferax volcanii*</i>	<i>Pyrococcus furiosus*</i>
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Pyrococcus horikoshii*</i>
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Microbulbifer degradans</i>	<i>Rickettsia prowazekii</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae*</i>
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe*</i>
	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Sadece PPK2	<i>Nodularia spumigena</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (2)	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Sulfolobus solfataricus*</i>
<i>Magnetococcus MC-1</i> (2)	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Sulfolobus tokodaii*</i>
<i>Plectononema boryanum</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
	<i>Rhodocyclus tenuis</i>	<i>Thermoplasma acidophilum*</i>
	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Thermoplasma volcanium*</i>
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Treponema pallidum</i>
	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
	<i>Streptomyces lividans</i>	
	<i>Thermobifida fusca</i>	
* Arkea		
† Parantez içindeki rakamlar bu organizmada kaçane PPK2 homoloğu olduğunu göstermektedir		
‡ Ökaryot		

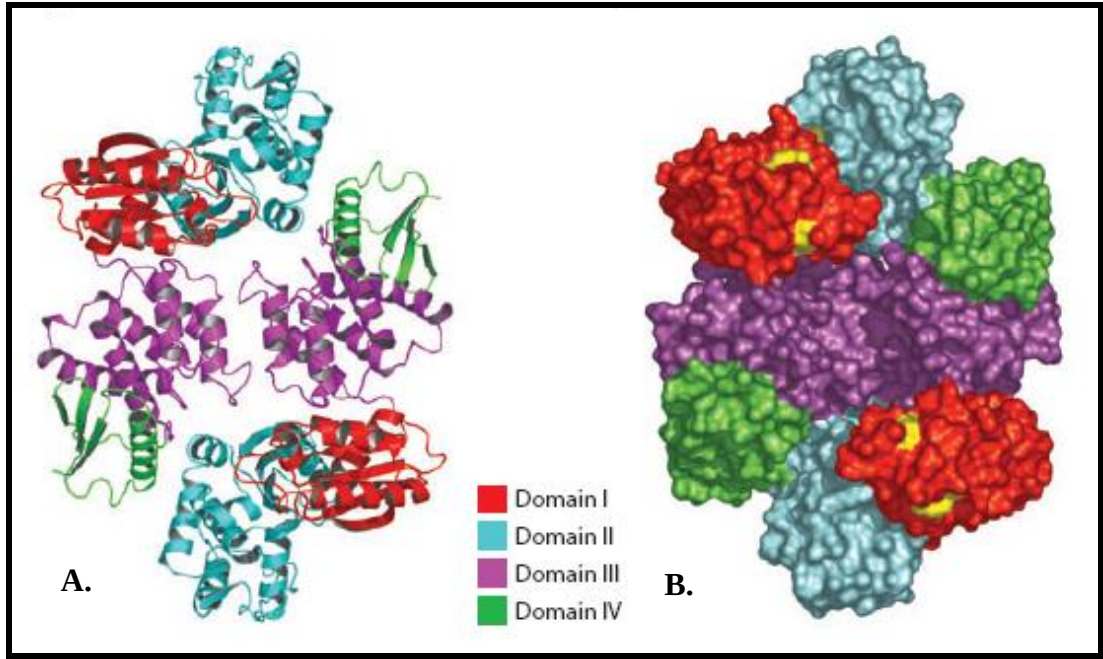
1.1.2. Ekzopolifosfataz (Polifosfat Fosfohidrolaz (PPX), EC 3.6.1.11)

Polifosfat metabolizmasında görev alan enzimlerin en önemlilerinden biri olan ekzopolifosfataz, polifosfat zincirinin ucundan Pi koparmaktadır.

E. coli PPX enzimi 58 kDa ağırlığında homodimer yapıda periferel bir membran proteinidir. Özütlerde ölçülen PPX aktivitesi, PPK enzimininkine yakın olup polifosfat seviyesindeki değişimler bu aktiviteyi çok az etkilemektedir. Polifosfat zincirinin uç kısmından gerçekleştirilen hidroliz sadece tek bir inorganik fosfat kalana kadar devam etmektedir. PPX enzimi, *ppx* geni tarafından kodlanmakta ve *ppk* geninden 7 baz çift aşağıda ve aynı operon içinde bulunmaktadır (Kornberg ve ark., 1999).

PPX aktivitesi, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. flexneri*, *K. aerogenes*, *H. pylori*, and *P. aeruginosa* özütlerinde incelenmiştir (Kornberg ve ark., 1999). *P. aeruginosa* (Miyake ve ark., 1999) ve *Vibrio cholerae* (Ogawa ve ark., 2000) *ppx* genleri klonlanmış ve dizilenmiştir. *E.coli* ve *V. cholerae* da *ppk1* ve *ppx* genlerinin tek bir operonda yer aldığı ve transkripsiyon aktiviteleri arasında bir eş düzenleme olduğu ortaya çıkarılmıştır. *P. aeruginosa*'da *ppx* ve *ppk* genleri birbirine ters yönde bulunmakta ve aynı operonda yer almamaktadır (Miyake ve ark., 1999). Değişik mikroorganizmalarda *ppk-ppx* operonundan yoksun mutantlar karakterize edilmiştir (Lickho ve ark., 2006; Lickho ve ark., 2008, Kornberg ve ark., 2004).

Rangarajan ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli* O157:H7 PPX enziminin kristal yapısı incelenmiş ve dört domainden oluştuğu ortaya çıkarılmıştır. Birbirleriyle yapısal benzerlik gösteren Domain I ve II ribonükleaz-H proteinine benzer bir katlanmaya sahiptir. Domain III, SpoT'nin HD domaininin N-terminali ile yapısal benzerlik gösterirken, en küçük olan Domain IV soğuk-şokla aktive olan ve RNA'ya bağlanan proteinler ile yapısal benzerlikler içermektedir. Olası PPX aktif bölgesi Domain I ve Domain II'nin ortak yüzeyinde bulunmaktadır. PPX'in kristal yapısında bu iki domainin birbirine yaklaşarak 'kapalı' duruma geçtiği gösterilmiştir. PoliP'nin muhtemel bağlanma bölgesinin bu dimer ara yüzünde bulunduğu önerilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *E. coli* PPX dimeri ve enzimin olası aktif bölgesinin yapısı. A. PPX dimerinin kurdele modeli. B. PPX dimerinin ve olası aktif bölgenin moleküler yüzey gösterimi (Rangarajan ve ark., 2006).

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

Endopolifosfataz polifosfat zincirlerinden daha kısa zincirlerin oluşumunu katalizlemektedir. Enzim, memeli hücrelerinde tanımlanmış ve ilk kez *Saccharomyces cerevisiae*'den saflaştırılmıştır (Kulaev ve ark., 2004).

Mayadan saflaştırılan PPN1, koful orijinli 35 kDa moleküler ağırlığında bir homotetramerdir ve *PHM5* geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalar enzimin 78 kDa (674-aa) moleküler ağırlığında bir öncü polipeptid (prePpn1) halinde sentezlendiğini ve bir proteaz ile kesilerek 35 kDa moleküler ağırlığında (352-aa) aktif bir protein oluştuğunu göstermiştir (Shi ve Kornberg 2005). *S. cerevisiae*'da bu enzimi kodlayan genden yoksun mutantlarda minimal besiyerinde sınırlı büyüme ve ölüm görülmüştür (Sethuraman ve ark., 2001). Endopolifosfataz aktivitesi prokaryotlarda gözlenmemiştir (Kumble ve Kornberg, 1996).

1.1.4. PoliP:AMP Fosfotransferaz (PAP)

İlk kez kısmi olarak *Acinetobacter johnsoii* 210A suşundan saflaştırılan 55 kDa moleküler ağırlığındaki poli-AMP fosfotransferaz, polifosfattan kopardığı inorganik fosfatı AMP'ye aktararak ADP oluşumunu katalizlemektedir. Enzimin en yüksek aktivitesi 18–44 arası rezidü içeren polifosfatlarda gözlenmiştir. 3 veya 4 pirofosfat içeren polifosfatlarda enzim aktivitesi gözlenmemiştir (Kulaev ve ark., 2004).

PoliP:AMP fosfotransferaz enziminin hücre için önemi henüz net bir şekilde aydınlatılamamıştır. *E. coli*'de polifosfat kinaz ve adenilat kinaz enzimlerinin birlikte polifosfattan ADP oluşturmaları, PAP enzimine benzer bir aktivite olarak tanınlanmıştır (Ishige ve Noguchi, 2000).

P. aeruginosa'da da yüksek miktarda gözlenen PAP aktivitesinin, çoğunlukla Poli:ADP fosfotransferaz ve adenilat kinaz enzimlerinin birlikte hareket etmesiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (Kulaev ve ark., 2004).

1.2. Polifosfat ve Polifosfat Bağımlı Enzimlerin İşlevleri

1.2.1. Fosfat Deposu Olarak Polifosfat

Metabolizma ve büyüme için gerekli olan inorganik fosfat, kararlı bir yapı olan polifosfat şeklinde depolanmakta ve ekzopolifosfatazlar ile kullanılabilir hale getirilmektedir. Bu polimer, hücre içinde yüksek miktarda inorganik fosfat depolamak için oldukça uygundur ve hücre içinde çok miktarda bulunması ozmotik basınca çok az etki etmektedir. Ayrıca PoliP, serbest Pi ve ATP gibi önemli metabolitlerin seviyesinin düzenlenmesinde önemli bir göreve sahiptir. Tüm organizmalar için fosfat elementinin yaşamsal önemi olması, mikroorganizmaların evrim sürecinde bu elementi polifosfat formunda biriktirme özelliği geliştirmesini sağlamıştır (Harold., 1966).

Mikroorganizma hücrelerindeki polifosfat miktarı ortamdaki fosfat konsantrasyonuna bağlıdır. Fosfat içeriği fazla olan atık sulardaki bakterilerin karakteristik özelliği yüksek miktarda polifosfat biriktirme kapasiteleridir. Aktif çamurdan izole edilen *A. johnsonii*, *Microcylunatus phosphovor* ve *Microthrix parvicella* bu tür bakterilere örnektir (Kulaev ve Kulakovskaya, 2000). Son yıllarda atık sulardaki fosfatın biyoteknolojik olarak uzaklaştırılması amacıyla yüksek miktarda fosfat biriktirebilen rekombinant mikroorganizmalar geliştirmek üzere birçok çalışma yapılmıştır. *E.coli* (Kato ve ark.,1993; Keasling ve ark., 1997) ve *Klebsiella aerogenes*'in (Imazu ve ark., 1998) fosfat metabolizmasında yapılan genetik değişiklikler sayesinde normalden 8-10 kat daha fazla Pi biriktirebildikleri gösterilmiştir.

1.2.2. Enerji Kaynağı Olarak Polifosfat

Polifosfatın yapısındaki fosfoanhidrid bağlarının hidroliziyle açığa çıkan serbest enerji ATP'de olduğu gibi yüksek miktardadır. Termodinamik olarak anhidrid bağının hidrolizi ile açığa çıkan standart serbest enerji, her bir fosfat molekülü için pH 5.0' de yaklaşık 38 kJ'dür (Kulaev ve ark., 2004).

PPK, AMP-fosfotransferaz ve adenilat kinazın yer aldığı mekanizma ile polifosfat hücre içinde bir fosfat kaynağı olarak görev yapmaktadır (Kornberg ve ark., 1999). Zorunlu aerob olan *A. johnsoii* ile yapılan bir çalışmada, polifosfatın, anaerobik koşullarda, bakterinin bir süre canlı kalmasını sağladığı gösterilmiştir (van Veen ark., 1994). Yüksek konsantrasyonda fosfat içeren bir besiyerinde üretilen bu bakteri, anaerobik ortama alındığında oksidatif fosforilasyonun zayıfladığı ve hücrenin ihtiyacı olan enerjiyi polifosfat yıkımından elde ettiği gösterilmiştir. PoliP yıkımı sonucunda oluşan inorganik fosfatın hücre dışına salınımının $\text{MeHPO}_4/\text{H}^+$ simport sistemi yoluyla gerçekleştiği bulunmuştur. Hücre dışına salınan MeHPO_4 ve H^+ birlikte bir proton gradyanı oluşturmaktadır. Proton hareketiyle oluşan bu gücün, hücre içine L-prolin ve L-lizin gibi amino asitlerin alımını ve ATP sentezini arttırdığı bulunmuştur (van Veen ark., 1994).

1.2.4. Metal Şelatörü Olarak Polifosfat

Birçok prokaryotta polifosfatın katyonlarla (Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+}) kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. Örneğin, *Staphylococcus aureus*'ta polifosfatın Ni^{+2} iyonu biriktirebildiği bilinmektedir (Gonzales ve Jensen, 1998). Bu özelliği sayesinde PoliP'nin ağır metal detoksifikasyonunda kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Yüksek miktarda hücre içi polifosfat içeren *Anacystis nidulans* hücrelerinin düşük polifosfat rezervi içerenlere göre Cd^{+2} 'ye daha yüksek direnç gösterdiği gözlenmiştir (Keyhani ve ark., 1996). *E. coli*'de de Cd^{+2} 'ye direncin polifosfat metabolizmasına dayandığı gösterilmiştir (Keasling ve Hupf, 1996).

1.2.5. Polifosfatın Hücre Zarı Oluşumu ve İşlevindeki Rolü

ppk geninin nükleotid dizisi ilk olarak *E. coli*'de tanımlanmış ve daha sonra 100 bakteriyel genomda bulunmuş olup, bunlardan 17 tanesi insanlarda birçok hastalığa neden olan patojenlerdir. Bu organizmalarda, PoliP'nin rolünü açıklayabilmek için PoliP seviyesinin oldukça düşük olduğu PPK1'den yoksun mutantlardaki fenotipik değişimler gözlenmiş ve bu suşların büyüme, hareket, quorum sensing, biyofilm oluşturma, virulans gibi özelliklerinde zayıflama olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Polifosfat metabolizmasının, mikroorganizmaların durağan fazda oluşan stres koşullarında hayatta kalmasını sağladığı bilinmektedir. Rashid ve arkadaşları (1999), patojenlerde bazı virulans faktörlerinin de durağan fazda ifade edildiğini göz önünde bulundurarak, *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *S. enterica*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da *ppk*'dan yoksun mutantlar oluşturmuşlardır. Bu mutant hücrelerde patojeniteye neden olan kamçı hareketliliğinin normal hücreler ile karşılaştırılması sonucunda, hareketlilikte %13 ila %79 oranlarında azalma görülmüştür. *P. aeruginosa* ve *E. coli*'de, mutant suşların, *ppk* genini içeren bir plazmit ile komplementasyonu sonucu hareketliliğin geri kazanıldığı gösterilmiştir (Rashid ve ark., 1999).

P. aeruginosa ile yapılan başka bir çalışmada ise, PPK1'den yoksun mutantlarda hücre zarfında bozulma, planktonik hareketlilikte ve ekzopolimer üretiminde eksiklik, β -laktam antibiyotiği karbenisiline ve kurumaya hassasiyet ortaya çıktığı gösterilmiştir (Fraley ve ark., 2006). Ayrıca yine polifosfat kinaz geninden yoksun mutantlarda quorum sensing ile kontrol edilen virulans faktörleri olan elastaz ve ramnolipid üretiminde azalmalar meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır (Rashid ve ark., 2000). PPK'dan yoksun mutant *Campylobacter jejuni*'de ise bakteri sayısına bağlı olarak kolonizasyonda eksiklik görülmüştür (Candon ve ark., 2007).

1.2.6. Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

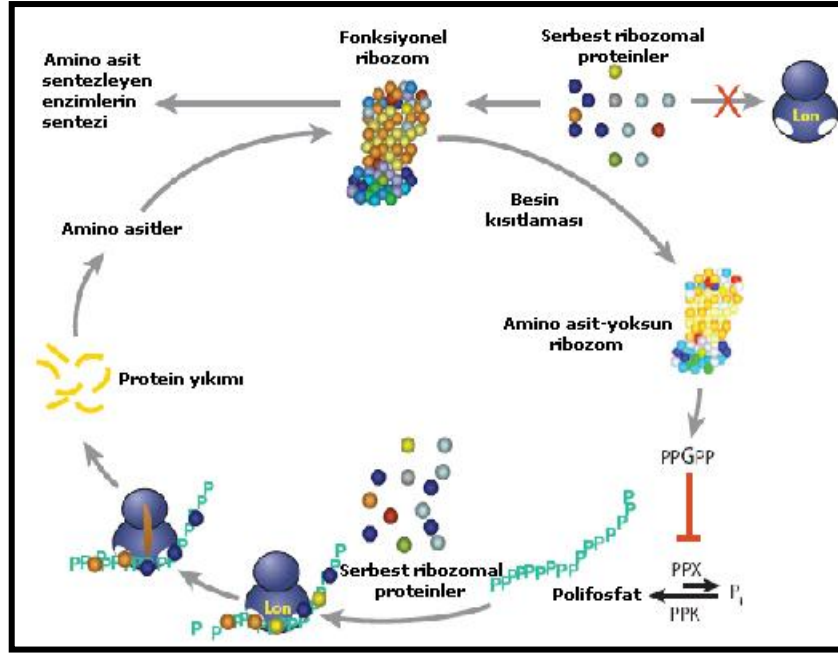
Polifosfat ve polifosfat bağımlı enzimler temel metabolizmada önemli görevlere sahiptir ve yaklaşık beş yüz reaksiyon için genel ATP kaynağıdır. Polifosfat, DNA, RNA ve protein yapısını etkileyebilme özelliği sayesinde temel metabolizmada yer almaktadır (Brown ve Kornberg, 2008). Kusano ve Ishihama (1997), durağan fazdaki hücrelerde RNA polimerazın asidik bileşikler ile kompleks halinde olduğu bilgisinden yola çıkarak, polifosfatın, durağan fazdaki *E. coli* hücrelerine ait RNA polimeraz ile fiziksel ve işlevsel olarak ilişki kurduğunu göstermişlerdir. RNA polimeraz-polifosfat komplekslerinin, transkripsiyon üzerindeki inhibe edici etkisini incelemek için sigma 70 (büyüme fazında ifade edilen genlerin transkripsiyonunda görev alan başlıca sigma faktörü) ve sigma 38 (durağan fazda ifade edilen genleri düzenleyen sigma faktörü) içeren holoenzim komplekslerini kullanmışlardır. Düşük tuz konsantrasyonunda, polifosfat, hem $E\sigma^{70}$ hem de $E\sigma^{38}$ holoenzimlerini inhibe etmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonunda ise $E\sigma^{70}$ işlev göremezken $E\sigma^{38}$ aktivite göstermiştir. Bu sonuçlara göre polifosfatın, yüksek ozmolarite koşullarında ve durağan fazdaki *E. coli* hücrelerinde, RNA polimerazın promotor seçimi kontrolünde görev alabileceği önerilmiştir.

Ishige ve Rao'nun *in vitro* koşullarda elde ettiği deneysel sonuçlara göre polifosfat, histon benzeri proteinler (HUs) ile bağlanmaktadır. Benzer bir durum *P. aeruginosa ppk1* mutantlarında nükleoid kompaktlaşmasındaki eksiklik ile de desteklenmiştir. Bu da PoliP'nin, gen ifadesinin düzenlenmesinde daha önemli görevleri olduğunu önermektedir. (Brown ve Kornberg, 2008).

Transkripsiyon ve DNA yapısının düzenlenmesindeki görevlerinin yanı sıra polifosfat, ribozomlar ile de etkileşime girmektedir. Bu etkileşimin birincil olarak ribozomal proteinlerle olduğu ve bu durumun *in vitro* ve *in vivo* koşullarda transkripsiyonun doğruluğunda etkili olduğu gösterilmiştir (McInerney ve ark., 2006).

Mikrobiyal hücre döngüsünün durağan fazında hücreler, hayatta kalabilmek için birçok stres ve kısıtlılık durumlarıyla baş etmek durumundadırlar. Bu tehlikeler, sıcaklık, kuraklık, radyasyon, oksidanlar, açlık ve rekabettir. Bunlardan biri ya da birkaçıyla karşılaşan hücreler, erken gelişim safhalarında olsalar da gerekli mekanizmaları çalıştırarak PoliP biriktirirler ve böylece birçok sistemin aktive olma sürecini başlatırlar (Kornberg ve ark., 2004). Besin azlığı karşısında uyarılan sistem, düşük fosfat ya da amino asit seviyesi tarafından başlatılmakta ve (p)ppGpp sentetaz I'i (PSI) kodlayan *relA* geninin ifadesi ile guanozin penta (pppGpp) ve tetra-nükleotidlerin (ppGpp) sentezine neden olmaktadır. Bu nükleotidler, PoliP'nin ekzopolifosfataz ile hidrolizini inhibe ederek PoliP birikimini sağlamaktadır (Cashel ve ark., 1996; Kuroda ve ark., 1997).

Yapılan başka bir çalışmada, zengin besiyerinden minimal besiyerine aktarılan *E. coli* hücrelerinin amino asit açlığı durumunda polifosfat biriktirdiği ve PoliP'nin, Lon proteaz ile kompleks oluşturduğu gözlenmiştir. Bu koşullar altında ribozomlar işlev görmediğinden serbest halde bulunan ribozomal alt ünitelerin yıkımı için Lon'un proteaz aktivitesinin 20 kat arttığı gösterilmiştir. Bu proteolitik aktivite ile oluşan amino asitlerin minimal besiyerinde büyümeyi sağlamak için gerekli olan yeni proteinlerin sentezinde kullanıldıkları önerilmiştir (Şekil 1.5) (Kuroda ve ark., 1999, Kuroda ve ark., 2001).

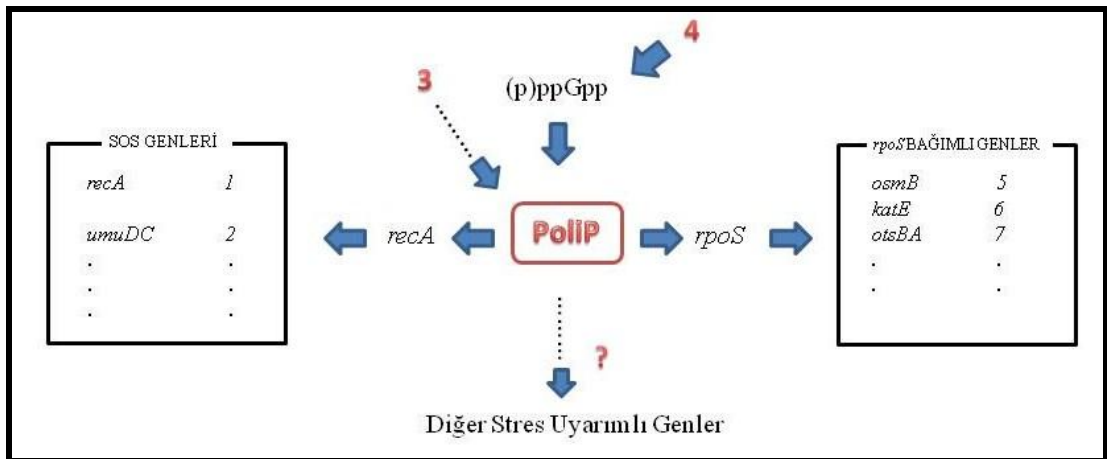


Şekil 1.5. Besin kıtlığı durumunda uyarılan Polifosfat kinaz bağımlı protein yıkımının şematik gösterimi (Rao ve ark., 2009).

E. coli ppk mutantlarının stres koşullarına karşı hassasiyetlerinin belirlenmesini konu alan bir çalışmada, PPK mutantlarının bir oksidant olan H_2O_2 'ye, redoks döngüsü ajanı olan menadiona, sıcaklık ve osmotik değişikliklere karşı hassasiyet gösterdikleri görülmüştür. Bunun yanı sıra, maya ekzopolifosfatazını (scPPX1) yüksek seviyede ifade eden *E. coli* hücrelerinin H_2O_2 ve sıcaklığa *ppk* mutantlarıyla eşit seviyede hassasiyet gösterdikleri görülmüştür (Shiba ve ark., 1999).

rpoS geninin ürünü olan σ^{38} , RNA polimerazın bir alt ünitesidir, yaklaşık 50 genin durağan fazdaki besin yetersizliği, yüksek ozmolarite ve H_2O_2 gibi bazı stres oluşturan koşullarda düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içi polifosfat seviyesi maya ekzopolifosfatazı ile düşürülen hücrelerde H_2O_2 hassasiyeti görülmüştür. Ancak hücreye ekstra *rpoS* geninin aktarılması ile bu hassasiyetin giderildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, PoliP, *rpoS* genini transkripsiyon ve translasyon düzeyinde düzenlemekte ve/veya σ^{38} proteinini post-translasyonel olarak stabilize etmektedir (Shiba ve ark., 1999).

PoliP'ın *rpoS* ekspresyonu üzerindeki etkisinin kanıtlanmasıyla, SOS regülununun elementleri olan DNA-hasarı uyarımlı genlerin polifosfat bağımlılığı da analiz edilmiştir. Maya ekzopolifosfatazının aşırı üretildiği hücrelerde mitomisin C ve UV hasarına direncin azaldığı gösterilmiştir. Normal büyüme koşullarında SOS genleri LexA represör proteininin negatif kontrolü altındadır. LexA proteini, SOS genlerinin operatör bölgesindeki 20 baz çiftlik bir konsensus diziye bağlanmaktadır. DNA hasarının oluşması durumunda RecA proteini tek iplikli DNA'ya bağlanarak aktif hale gelir ve LexA ile etkileşime girerek LexA'nın inaktivasyonuna neden olur. LexA'nın ortadan kaldırılmasıyla, DNA hasarının onarılmasında görevli *umuDC* genlerinin ifadesi sağlanmış olur. *umuDC* ifadesi, PPX1'in aşırı üretildiği ve mitomisin C'ye maruz bırakılan hücrelerde oldukça azalmıştır. Aynı koşullar altında RecA ekspresyonunun da azaldığı görülmüştür. Bu iki genin ifadesinin azalmasının *recA*'nın düşük seviyedeki uyarımına bağlı olabileceği önerilmiştir. Ayrıca azalmış *recA* ekspresyonu SOS regülundaki tüm genlerin yeterince uyarılmadığını işaret etmektedir. Bu bulgular temel alınarak, *recA* ifadesinin uyarılmasında polifosfatın doğrudan görev aldığı ve yeni *recA* mRNA'sının sentezi için PoliP'ın gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu durum *rpoS*'in PoliP bağımlı olmasıyla tutarlılık göstermektedir. PoliP, *rpoS* ve *recA* regülasyonu üzerinden stres-uyarımlı genlerin tetiklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 1.6) (Tsutsumi ve ark., 2000).



Şekil 1.6. Poli P tarafından gen ekspresyonu regülasyonunun şematik modeli. Noktalı oklar hipotetik bağlantıyı göstermektedir. SOS genleri: 1) SOS genlerinin ekspresyonunun ve rekombinasyonun aktivasyonu; 2) erorprone tamiri; 3) DNA hasarı, 4) açıklık. *rpoS* bağımlı genler: 5) ozmotik stres; 6) oksidatif stres; 7) termotolerans (Shiba ve ark., 1999).

1.2.7. Sporulasyon

Sporlar çevresel stres koşullarına karşı en dayanıklı hücre formlarıdır. Polifosfatın spor oluşturan türlerdeki rolü üzerine oldukça az çalışma yapılmıştır. Shi ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada, *Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus*'un PPK1, PPX ve PAP enzimlerini kodlayan genlerden yoksun mutantlarda, hareketlilik ve biyofilm oluşturmada eksiklik gözlenirken, sadece *ppx* geninden yoksun mutantlarda sporulasyonda eksiklikler gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, *Myxococcus xanthus ppk1* mutantlarının çok az sayıda spor oluşturdıkları ve germinasyonda gecikme gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır (Zhang ve ark., 2005).

1.3. Biyoremediasyon

Biyoremediasyon, kontamine olmuş bir ortamın (toprak, sediment, hava, su) iyileştirilmesi veya temizlenmesi amacıyla canlı organizmaların veya enzimlerinin, söz konusu ortama aktarılması ya da çevresel koşulların ayarlanmasıyla endojen faunanın yıkım oranının artırılması gibi işlemleri kapsayan bir yöntemdir.

Hidrokarbonlar (örn. petrol), poliklor bifeniller (PCBs), poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs), farmasötik maddeler, radyoaktif çekirdekler ve metaller gibi birçok maddenin yıkımı, dönüşümü ya da ortamdan uzaklaştırılması doğada var olan mikrobiyal katabolik çeşitlilik yardımıyla biyoremediasyon ve biyodönüştürme metodları ile sağlanabilmektedir.

Son yıllarda metodolojik alanlarda kaydedilen ilerleme ile biyoyıkım sürecinde görev alan mikroorganizmaların genomik, metagenomik, proteomik, biyoinformatik ve diğer ayrıntılı analizleri yapılarak, biyoyıkım yolları ve organizmaların çevre koşullarını değiştirebilme kapasiteleri daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır (Diaz, 2008).

1.3.1. Polifosfatın ve Polifosfat Metabolizmasında Görevli Enzimlerin Biyoremediasyonda Kullanılabilirliği

1.3.1.1. Atık Sulardan Fosfat Biyoremediasyonu

Suni gübreler, endüstriyel ve evsel atıklar nedeniyle atık sularda önemli miktarda inorganik fosfat birikmektedir. Normal koşullar altında inorganik fosfat, alg gelişimi için sınırlayıcı bir faktör olduğundan, doğal sularda bu fosfat birikimi diğer canlıların yaşam alanını kısıtlayan mavi alg gelişimine ve dolayısıyla ötrifikasyona neden olmaktadır (Kulaev ve ark., 2004).

Günümüzde, inorganik fosfatın atık sulardan uzaklaştırılması, normal bakteriyel büyümede gerekli olandan daha fazla fosfat depolayabilen bataklık bakterilerinin polifosfat biriktirebilmeleri özelliğine dayanmaktadır. Bu bakterilerde, çevreden alınan fazla Pi, PoliP granülleri halinde hücre içinde depolanmaktadır. ‘Arttırılmış Biyolojik Fosfor Uzaklaştırma’ (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) olarak adlandırılan bu yöntem düşük maliyetli bir ötrifikasyon kontrol mekanizması olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Kulaev ve ark., 2004).

Normal uygulama koşullarında, aktif çamur ile kentsel atık sulardaki Pi konsantrasyonunun ortalama %20-40 kadarı uzaklaştırılabilmektedir. Aktif çamurun Pi uzaklaştırma kapasitesi, kuru ağırlık temel alındığında %1-2 ile sınırlı olup bakterilerin Pi biriktirme kapasitelerinin, çoğunlukla genetik yöntemler kullanılarak arttırılabileceği önerilmektedir (Kulaev ve ark., 2004).

Ohtake ve arkadaşları (1993), *E. coli* MV1184 suşunun inorganik fosfat biriktirme kapasitesini, Pi metabolizmasında ve taşınmasında görev alan *ppk*, *ackA* (asetat kinaz) ve fosfat uyarımlı taşıma sistemi (*pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*) genlerinin manipulasyonu ile arttırmaya çalışmışlardır. Doğal tipin fosfat içeriği % 1.8 iken *ppk* ve *ackA* genlerinin çoklu kopyalarını içeren suşun fosfat içeriği % 16’ya kadar çıkarılmıştır.

Keasling ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada, *E. coli ppk* geninin kendi doğal promotörü ve uyarılabilir promotorlar altında aşırı ifadesi sonucunda, hücre içine fosfat alımının arttığı ve hücre içi polifosfatın oldukça yüksek bir seviyeye ulaştığı gözlenmiştir.

E. coli’ de polifosfat metabolizmasını değiştirmeyi amaçlayan başka bir çalışmada, polifosfat miktarı yaklaşık $2.0 \mu\text{g}/10^{11}$ hücre iken, *ppk-ppx* operonundan yoksun mutantta 0.16’ya kadar düşmüştür. *ppk* geninin çoklu kopyalarının ifade edildiği hücrelerde ise polifosfat miktarının normale göre 100 kat arttığı gözlenmiştir. *ppk-ppx* mutantının *ppk* genini içeren çok kopyalı bir plazmit ile transformasyonu sonucunda oluşan yeni suşun çok daha hızlı fosfat uzaklaştırabildiği gözlenmiştir. Aynı mutantın, *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte içeren bir plazmit ile transformasyonu sonucunda ise *ppx*’in yüksek miktarda ifadesinin yalnız *ppk* geninin aşırı ifadesi ile oluşan etkiyi azalttığı görülmüştür (Crooke ve ark., 1993).

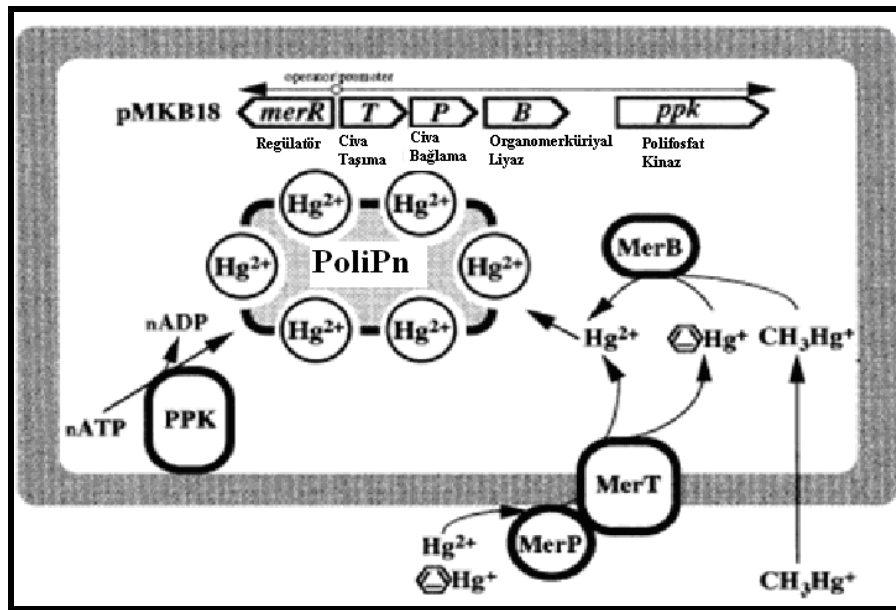
1.3.1.2. Ağır Metallerin Biyoremediasyonu

Mikroorganizmalar, ağır metal dirençliliği için belli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar ağır metal varlığında uyarılarak birincil olarak aktif hale gelmektedir. Ayrıca, ağır metal varlığında uyarılmayan fakat metallere hücrel tolerans göstermeyi sağlayan pasif tolerans mekanizmaları da mevcuttur. Ağır metallerin hücre içi şelasyonunda, uzun zincirli anyonik fosfat polimerleri olan polifosfatların çok önemli fonksiyonları vardır (Keasling ve Hupf, 1996). Bu özelliğiyle PoliP’nin ağır metal biyoremediasyonunda anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kulaev ve ark., 2004).

Bazı bakterilerin, *Saccharomyces cerevisiae*’nın ve alglerin PoliP granüllerinde Ca^{+2} , K^{+} ve Mg^{+2} gibi katyonların yanı sıra, ağır metallerin de bulunduğu gösterilmiştir (Keasling ve Hupf, 1996). Örneğin, *Anabaena cylindrica*’da alüminyum (Pettersen ve ark., 1985), *Anacystis nidulans*’da titanyum (Crang ve Jensen, 1975), *Plectonema boryanum*’da kurşun (Scott ve Palmer, 1990), *Arthrobacter*, *Pseudomonas* ve *Klebsiella*’da kadmiyum (Scott ve Palmer, 1990) bulunmaktadır.

Saccharomyces cerevisiae'nin polifosfat içeren kofullarında ise demir, kobalt, kadmiyum ve çinko bulunabildiği gözlenmiştir (Gadd, 1986, Klionsky ve ark., 1990; Norris ve Kelly, 1977; Raguzzi ve ark., 1988). Ayrıca, bir alg türü olan *Chlorella pyrenoides*'in polifosfat granüllerinde lityum ve rubidyum biriktirebildiği gösterilmiştir (Peeverly ve ark., 1978).

Rachlin ve arkadaşları (1981), polifosfatın, ağır metallerin detoksifikasyonunda kullanılabileceğini önermişlerdir. Bu hipotez *K. aerogenes* ve *A. johnsoii*'de polifosfat-metal komplekslerinin hücre dışına taşınmasının detoksifikasyonda görev aldığı gösterilmesi ile desteklenmiştir (Aiking ve ark., 1984, Boswel ve ark., 1999). Ayrıca, *E. coli* polifosfat metabolizmasında görev alan *ppk* ve *ppx*'in aşırı ekspresyonu sonucu hücre dışına metal-fosfat komplekslerinin salınmasının artmasıyla ağır metal toleransında artış olduğu gösterilmiştir (Keasling ve ark., 1997). Başka bir çalışmada, hem *K. aerogenes ppk* geninin hem de *Pseudomonas K-62 merT* ve *merP* genlerinin (civa taşıma sisteminde görevli genler) birlikte bulunduğu plazmidi taşıyan *E. coli* hücrelerinde, civa toksisitesinin, polifosfat şelasyonu sayesinde azaldığı görülmüştür (Pan-Hou ve ark., 2001). Ayrıca bu rekombinant hücrelerin alginat üzerine tutuklanarak civanın biyoremediasyonu için kullanılabileceği gösterilmiştir (Şekil 1.7) (Pan-Hou ve ark., 2003).

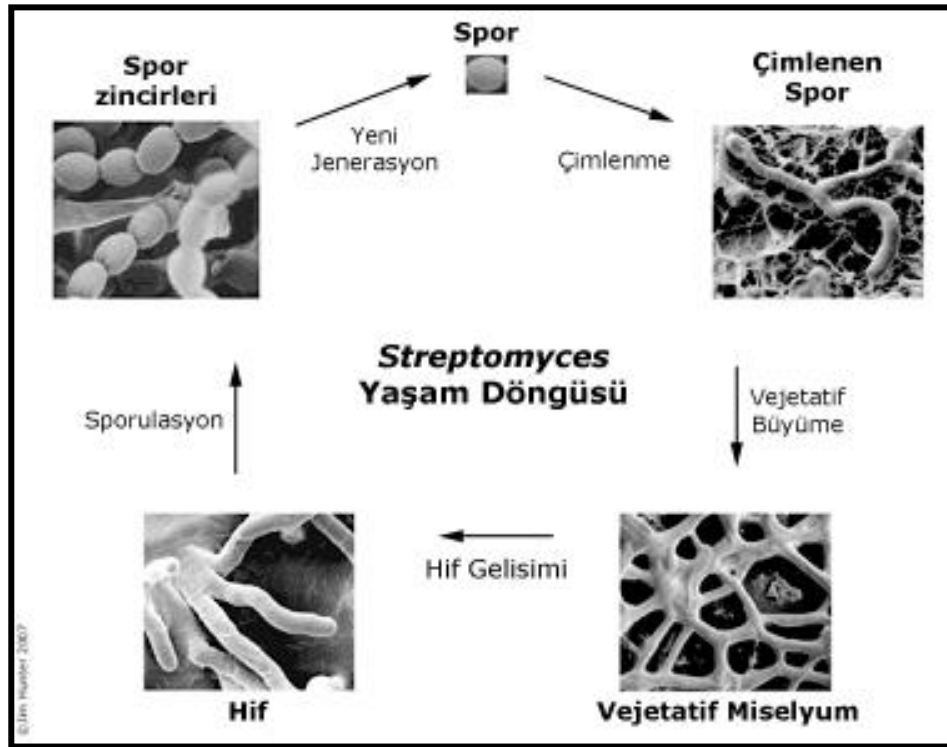


Şekil 1.7. *MerB-ppk* füzyon plazmidi içeren immobilize *E.coli* hücrelerinde civanın uzaklaştırılmasının şematik modeli (Pan Hou ve ark., 2003).

Pan-Hou ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı bir çalışmada, bakteriyel *ppk* genini taşıyan transgenik tütün bitkisinin, civanın (Hg^{+2}) fitoremediasyonunda kullanılabileceği gösterilmiştir. Yapraklarında daha fazla polifosfat biriktiren bu bitkinin, Hg^{+2} içeren agar besiyerinden civayı alarak daha az toksik olan Hg^{+2} -poliP kompleksi halinde dokularında depolayabildiği belirlenmiştir.

1.4. Streptomyces

Streptomyces’ler, *Actinomycetes* ordosuna dahil birçok türü ve varyetesi olan Gram pozitif bakterilerdir (Brock ve Madigan, 1988). GC oranı yüksek (%60-70) olan bu bakteriler, özellikle toprakta bulunan, filamentli, kompleks bir hayat döngüsüne sahip mikroorganizmlardır. Yaşam döngüsü, sporların germinasyonu ile başlar ve substratın dallara ayrılmasıyla oluşan miselyum gelişimi büyüme fazının sonuna kadar devam eder. Hava misellerinin apikal büyümesi durduktan sonra misellerin ucundaki hücreler spora farklılaşır (Şekil 1.8) (Chouayekh ve Virolle, 2002).



Şekil 1.8. *Streptomyces coelicolor* yaşam döngüsü. (www.openwetware.org)

Çok sayıda biyoaktif madde üreten *Streptomyces*'ler endüstriyel açıdan oldukça önemli bakterilerdir. Bu maddeler arasında, başta antibiyotikler (Streptomisin, Kloramfenikol, Neomisin B, Klortetrasiklin, Neomisin, Oksitetrasiklin, Nistatin, Eritromisin, Tetrasiklin, Novobiyosin, Sikloserin, Vankomisin, Kanamisin, Paromomisin) olmak üzere anti-tirozinaz, antioksidanlar, anti-tümör ajanları, enzim inhibitörleri, glukoz izomerazlar, transglutaminazlar gibi endüstriyel açıdan önemli enzimler ve hemolitik bileşikler sayılabilir (Şekil 1.9) (Anzai ve ark., 2008, Whitehurst ve ark., 2009).

Streptomyces'de antibiyotik ve diğer ikincil metabolitlerin üretimi, katı besiyerinde hava misellerinin gelişiminin son fazında, sıvı besiyerinde ise durağan faza girmeden önce başlar (Chouayekh ve Virolle, 2002).



Şekil 1.9. *Streptomyces* kolonileri tarafından üretilen pigmentli ikincil metabolitler.

A. Topraktan izole edilen tipik *Streptomyces* kolonilerinin morfolojileri ve ürettikleri pigmentli biyoaktif maddeler. **B.** *Streptomyces coelicolor* koloni morfolojisinin panoramik görüntüsü. Üretilen mavi renkli metabolit, antibiyotik aktinorhodin, koloninin hidrofobik yüzeyinden damlacıklar halinde besi ortamına salınmaktadır (Thomson ve ark., 2002).

1.4.1. *Streptomyces* Polifosfat Metabolizması

Chouayekh ve Virolle'ün 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, diğer bakteriyel polifosfat kinazlar ile yüksek homoloji gösteren *Streptomyces lividans* polifosfat kinaz geni, PCR ile çoğaltılmış, klonlanmış ve 774 amino asitten oluşan 86.4 kDa büyüklüğünde bir proteini kodladığı gösterilmiştir. Saflaştırılan PPK enziminin, ATP'den polifosfat (ileri reaksiyon) ve polifosfattan ADP'ye Pi aktararak ATP sentezleyen (geri reaksiyon) bir enzim olduğu, ayrıca polifosfat sentezi sırasında ATP varlığında bir fosfoenzim ara formunda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra *ppk* geninin, tek bir promotordan monosistronik bir mRNA'yı ifade ettiği ve genin transkripsiyonunun sıvı minimal besiyeri ortamında, büyümenin geç safhalarında başladığı gösterilmiştir.

Ghorbel ve arkadaşlarının (2006) *Streptomyces lividans* TK24 ile yaptığı bir çalışmada ise fosfat seviyesinin, *ppk* gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve *ppk*'dan yoksun mutant suş üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yeterli inorganik fosfat varlığında *ppk* ekspresyonunun az, ancak belirlenebilir düzeyde olduğu ve ATP yi korepresör olarak kullanan bir represör tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu koşullar altında, yaban tipte, durağan faza geçişle birlikte polifosfat birikimi gerçekleşmiş ancak *ppk* mutantında böyle bir birikim gözlenmemiştir. Sınırlı Pi koşullarında, *ppk* ekspresyonu, yeterli Pi varlığında olduğundan daha fazla gerçekleşmiştir. Bu koşullar altında yaban suşun polifosfat içeriğinin düşük olduğu ancak *ppk* mutantlarında polifosfatların yüksek miktarda ve daha uzun zincirler halinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu durum *ppk* enziminin bir nükleozit difosfatkinaz görevi de görebildiğini kanıtlamıştır.

Chouayekh ve Virolle (2002), PPK'nın, *S. lividans* TK24'te antibiyotik biyosentezinin regülasyonunda görev aldığını ve *ppk* geninin antibiyotik üretimini negatif olarak etkilediğini önermişlerdir. Büyüme besiyerinde Pi seviyesi düşük olduğunda, PoliP rezervinin ve buna bağlı olarak hücrenin enerji seviyesinin de düşük olduğu gösterilmiştir. Aynı koşullarda, ATP oluşturan enzimden yoksun olan *ppk* mutantlarının enerji seviyesinin yabana göre çok daha az olduğu bulunmuştur.

Bu yüzden, Pi kıtlığında enerji seviyesindeki bu açığı kapatmak için, *ppk* mutantları, hücre içinde ATP üretimini sağlayacak merkezi metabolik yolları güçlü bir şekilde aktif hale getirmektedir. Bu aktivasyon, metabolizma yakıtı için yüksek miktarda karbon ve fosfat alımını gerektirir. Aynı grubun başka bir çalışmasında, *ppk* mutant suşun Pho regülonundaki (fosfat sağlayıcı) genlerin (*phoR/phoP*) oldukça uyarılmış olduğu ve buna bağlı olarak glukoz alımının arttığı gösterilmiştir (Ghorbel ve ark., 2006). Bütün bu uyarımların sonucunda, hücre içinde karbon iskeletleri, indirgenmiş kofaktörler (NADH ve NADPH) ve ATP üretimi artmıştır. Antibiyotik üretimi, büyüme yavaşladığı veya durduğu zaman gerçekleştiğinden, ortamdaki Pi miktarının yeterli olmadığı ve bu anahtar bileşiklerin anabolizma için kullanılmadığı koşullarda bir sonraki aşama olan antibiyotik biyosentezinde kullanılacağı önerilmiştir. Pi kıtlığında, bütün bu adaptif olayların yaban suшта da görüldüğü ancak *ppk* mutantlarında oldukça yüksek seviyede gerçekleştiği önerilmiştir (Ghorbel ve ark., 2006).

1.5. Tez Çalışmasının Amacı

Polifosfatın, fosfat ve ağır metal bioremediasyonunda kullanılabilme potansiyeli çok yakın zamanda gösterilmiş ve çok az mikroorganizmada çalışılmıştır. Literatürde, *Streptomyces* türleriyle yapılmış olan ve polifosfatın bioremediasyondaki rolünü kapsayan herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada fosfat birikiminin ve bunun ağır metal toksisitesine dirençteki rolünü anlayabilmek için *S. coelicolor*'ın fosfat metabolizmasının değiştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen olan *S. coelicolor* rekombinant suşların, fosfat ve ağır metal kirliliğinde biyoremediyal araç olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

2-propanol (Merck), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzooamilalkol (Merck), NaCl (Sigma Aldrich), NaOH (Merck), HCl (Riedel de Haen), Tris Baz (Merck), Ampisilin (Sigma Aldrich), Kloramfenikol (Sigma Aldrich), Tiyoestrepton (Sigma Aldrich), Agaroz (Sigma Aldrich), EDTA (Merck), Etidyum Bromid (Sigma Aldrich), Pepton (Merck), Glukoz (Merck), Süktroz (Merck), Maya özütü (Alfa Aeser), Gliserol (Riedel de Haen), KH_2PO_4 (Merck), K_2HPO_4 (Merck), Potasyum Asetat (Merck), CaCl_2 (Merck), PIPES (Fluka), Malt özütü (Merck), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Glisin (Applichem), K_2SO_4 (Merck), TES (Applichem), Kazaminoasit (BD), L-prolin (Applichem), CTAB (Merck), PEG 1000 (Applichem), SDS (Merck), Sodyum Asetat (Merck), Tryptic Soy Broth (Fluka), Bacto Agar (BD), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck), CdCl_2 (Merck), DMSO (Riedel de Haen), IPTG (Sigma Aldrich), X-Gal (Sigma Aldrich), Askorbik Asit (Sigma Aldrich), $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), H_2SO_4 (Merck), Metanol (Riedel de Haen), Triton X-100 (Sigma Aldrich), Hidroksil amonyum-HCl (Merck), KOH (Merck), TCA (Sigma Aldrich), FeCl_3 (Applichem), p-nitrofenil-fosfat (Applichem), Sodyum Tripolifosfat (Sigma- Aldrich).

2.1.2. Kullanılan Enzimler

Lizozim, RNase A, (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), *Pfx*® *Platinum* DNA Polimeraz (Invitrogen Corporation, U.S.) 10X Amplification Buffer, 10X Enhancer, Phusion DNA Polimeraz, 10X GC Buffer, (Fynnzymes Oy. Finland) *Pst*I Restriksiyon Endonükleaz, *Eco*RI Restriksiyon Endonükleaz, *Eco*RV Restriksiyon Endonükleaz, *Xho*I Restriksiyon Endonükleaz, *Xba*I Restriksiyon Endonükleaz, (Jena Bioscience GmbH, Germany) *Bam*HI Restriksiyon Endonükleaz, (MBI,

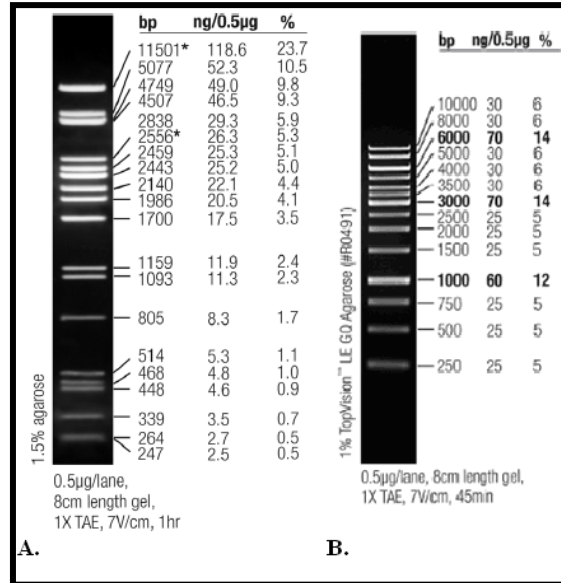
Fermentas AB, Vilnius, Lithuania) *Hind*III Restriksiyon Endonükleaz, (Promega Corporation, Madison, USA) *Sac*I Restriksiyon Endonükleaz, *Dra*I Restriksiyon Endonükleaz, (New England Biolabs Inc. U.S). Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarla gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kitler

Jelden DNA saflaştırma Kiti (GE Healthcare, UK).

2.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Moleküler DNA belirteçleri (MBI Fermentas, O'GeneRuler 1 Kb DNA Ladder, SM1163, MBI Fermentas, Lambda DNA/*Pst*I Moleküler DNA Belirteci SM0361) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kullanılan Moleküler DNA Belirteçleri. A) 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Fermentas, SM1334); B) Lambda DNA/*Pst*I Moleküler DNA Belirteci (Fermentas, SM0361)

2.1.5. Kullanılan Plazmit Vektörler

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan plazmidler

Plazmidler	Dirençlilik belirtici	Dirençlilik	Büyüklik	Kaynaklar
pBluescript II SK (-)	<i>Bla</i>	Ampisilin	3000 bç	Stratagene
pHZ1351	<i>tsr Ltz- sti+</i>	Amp-Tsr	8300 bç	Kieser ve ark., 2000
pBluescript II SK (-)- <i>ppk</i>	<i>Bla, ppk</i>	Ampisilin	5890 bç	Bu çalışma
pBluescript II SK (-)- <i>ppk-ppx</i>	<i>Bla, ppk</i>	Ampisilin	7043 bç	Bu çalışma
pBluescript II SK (-)- <i>ppk-ppxp</i>	<i>Bla, ppk</i>	Ampisilin	7361 bç	Bu çalışma
pHZ1351- <i>ppk</i>	<i>tsr Ltz- sti+</i>	Tiyostrepton	11315 bç	Bu çalışma
pHZ1351- <i>ppk-ppxp</i>	<i>tsr Ltz- sti+</i>	Tiyostrepton	12661 bç	Bu çalışma

2.1.5.1. pBluescript II SK (-) Fajmid Vektör Sistemi

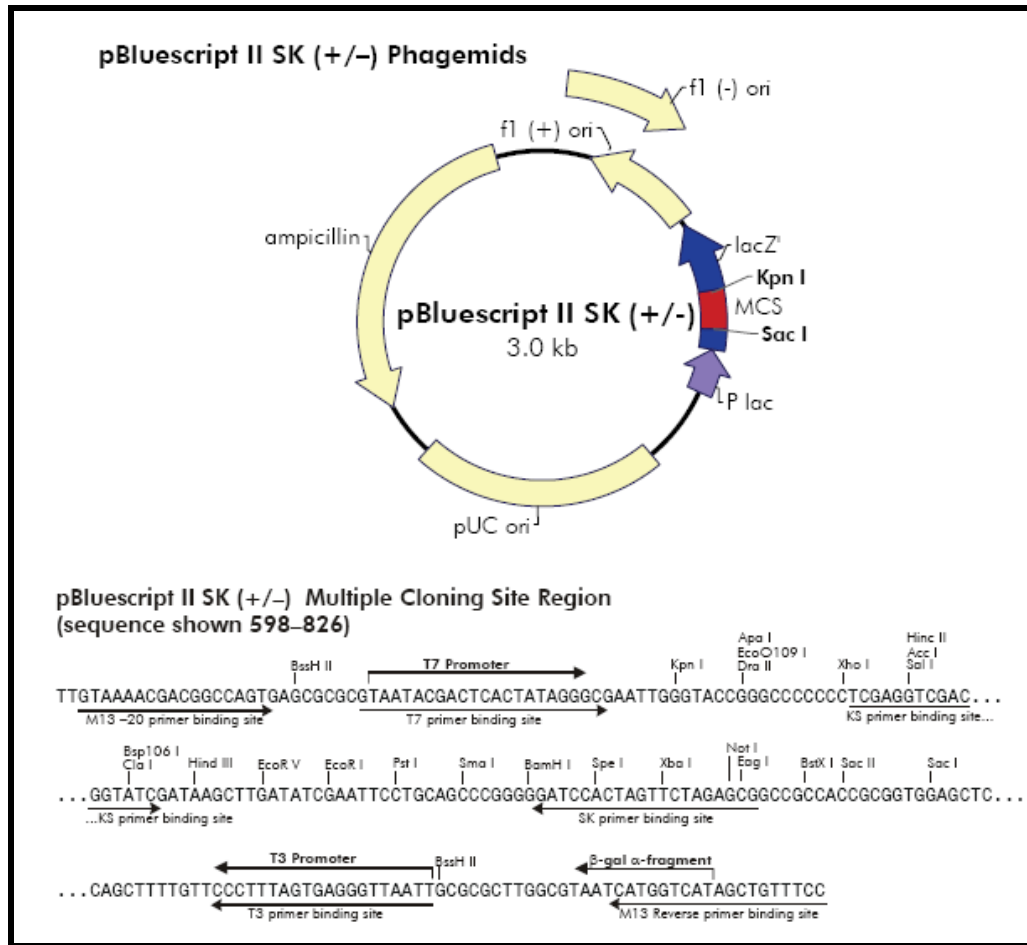
Bu tez çalışmasında pBluescript II SK (-) Fajmid Vektör Sistemi (Stratagene, Lacolla, Canada), *Streptomyces coelicolor*'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile elde edilen *ppk* ve *ppx* genlerini ve *ppk* promotor bölgesini klonlamak için kullanılmıştır (Şekil 2.2)

pBluescript II fajmidleri (faj orijini taşıyan plazmidler), çoğunlukla DNA dizilemesi için iç içe geçmiş delesyonların oluşturulması, *in vitro* RNA transkriptlerinin oluşturulması, gen haritalamasını içeren klonlama ve dizileme süreçlerinin kolaylaştırılması için kullanılan klonlama vektörleridir.

pBluescript II fajmidleri, 21 adet restriksiyon enzim tanıma bölgesini içeren bir çoklu klonlama bölgesi taşımaktadır. Çoklu klonlama bölgesinin her iki tarafında bulunan T7 ve T3 RNA polimeraz promotorları ile *in vitro* RNA sentezi yapılabilmektedir. Transkripsiyonu başlatacak promotor seçimi transkripsiyonun, çoklu klonlama bölgesine klonlanan genin hangi ipliğinden yapılacağını belirlemektedir. Çok kopyalı pBluescript fajmidlerinde, çoklu klonlama bölgesine yerleştirilen PCR ürününün, burada yer alan β -galaktozidaz enziminin α -peptidini kodlayan genin inaktivasyonuna neden olması sonucunda, rekombinant klonların seçici besiyerinde mavi-beyaz koloni seçimi üzerinden tayin edilmesine olanak vermektedir.

pBluescript II (+) ve (-), KS ve SK olarak adlandırılan iki farklı yönde çoklu klonlama bölgesine sahip olacak şekilde düzenlenmiştir. KS yönünde *Kpn I* restriksiyon kesim bölgesi *lacZ* promotoruna yakın ve *Sac I* restriksiyon tanıma bölgesi *lacZ* promotoruna uzak olarak yerleştirilmişken, SK yönünde, *Sac I* bölgesi *lacZ* promotoruna yakın ve *Kpn I* bölgesi ise uzak olacak şekilde yerleştirilmiştir.

pBluescript II fajmidleri tek iplikli (ss) DNA olarak tekrar elde edilebilirler, çünkü 307 baz çifti replikasyon orijini olan ve 454 baz çifti büyüklüğündeki bir f1 faj intergenik bölgesi içerirler. F1 intergenik bölgesinin (-) ve (+) şeklinde yönlenmesi, sırasıyla anlamlı ya da anlamsız tek iplikli DNA'nın yardımcı bir faj ile geri kazanımını sağlamaktadır. Bu tek iplikli DNA dideoksinükleotid dizileme (Sanger metodu) ya da bölgeye özgül mutagenezde kullanılabilmektedir.

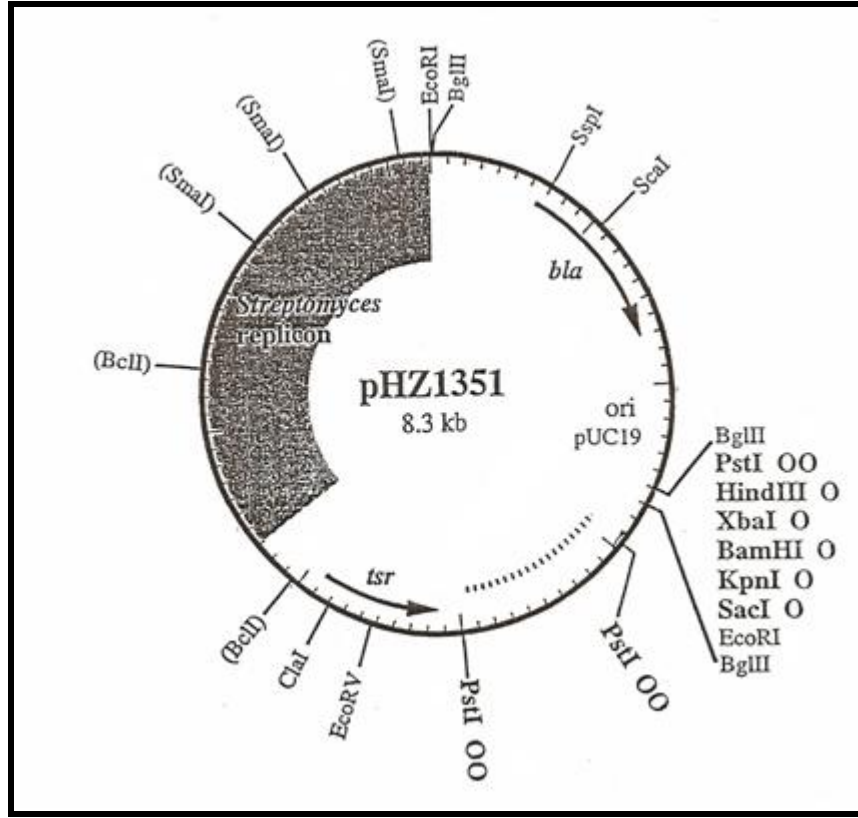


Şekil 2.2. pBluescript SK (+/-) fajmid vektör haritası.

2.1.5.2. pHZ1351 *E. coli*-*Streptomyces* Mekik Vektörü

Streptomyces sp. FR-005 suşunun kromozomal DNA'sından çok kopyalı bir *Streptomyces* replikonu (4 kb) izole edilerek bu replikonu içeren pZH1351 (8.3 kb) bifonksiyonel (mekik) vektör sistemi oluşturulmuştur (Şekil 2.3). Bu plazmit, birçok *Streptomyces* suşuna yüksek transformasyon etkinliği ile aktarılabilmekte, ampisilin dirençlilik geni sayesinde *E. coli*'de, tiyostrepton dirençlilik geni sayesinde de *Streptomyces*'te seçilebilmektedir.

Bu çalışmada, pHZ1351 mekik vektör sistemi, pSK II (-) plazmidine klonlanan genlerin *S. coelicolor*'a aktarılması ve ifadesinin sağlanması amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.3. pHZ1351 vektörünün çoklu klonlama bölgesi ve genel özelliklerini gösteren haritası.

2.1.6. *S. coelicolor* *ppk* ve *ppx* Genlerinin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkarılması

S. coelicolor genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_003888.3), *ppk* (GeneID: 1099585) ve *ppx* (GeneID: 1096180) gen bölgelerinin dizisi StrepDB-The Streptomyces Annotation Server'dan elde edilmiştir. Genlerin restriksiyon enzim haritaları NEBCutter programı ile çıkarılmıştır.

Gen dizilerindeki restriksiyon enzim kesim bölgeleri belirlendikten sonra uygun klonlama ve ekspresyon vektörleri seçilmiş ve bu vektörlerin çoklu klonlama bölgelerine göre her gen için ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.

2.1.7. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu çalışmada kullanılan bakteri soylarının karakteristik özellikleri ve kaynakları Tablo 2.1’de listelenmiştir. *S. coelicolor* spor süspansiyonu Hopwood ve arkadaşlarının (1985) yöntemine göre hazırlanmış ve %20 gliserol içinde -80 °C’ta saklanmıştır. *E. coli* DH5α suşu LB agara çizgi ekim yöntemiyle ekilerek 37 °C’ta büyütülmüş, 4 °C’ta muhafaza edilmiş ve ayda bir alt kültürlenmiştir. *E. coli* ET12567 suşu, 50µg/ml kloramfenikol içeren LB agara çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37 °C’ta büyütülerek, 4 °C’ta saklanmıştır ve ayda bir alt kültürlenmiştir. Bu iki *E. coli* suşunun stokları %50 gliserol içeren LB içerisinde hazırlanarak -80 °C’ta saklanmıştır.

Tablo 2.2. Bu çalışmada kullanılan bakteri soylarının karakteristik özellikleri.

Suş Adı	Genotip/Fenotip	Kaynak
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Yaban tip	Hopwood ve ark., (1985)
<i>E. coli</i> DH5α	F’ ϕ dlacZΔ(lacZYA-argF), U169, supE44λ-, thi-1, gyrA, recA1, relA1 endA1, hsdR17	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> ET12567	dam, dcm, hsdS, cat, tet	McNeil ve ark., (1992)

2.1.8. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

Tüm sterilizasyon işlemleri otoklavda 121°C’ta 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

24:1 Kloroform/İsoamilalkol Karışımı (1 L, v/v)

- 960 ml Kloroform,
- 40 ml İzoamilalkol

Çözelti I

- 25 mM Tris pH 8.0
- 10 mM EDTA pH 8.0
- 50 mM Glukoz

dH₂O ile hazırlanır.

Çözelti II

- 0,2 N NaOH
- % 1 SDS

dH₂O ile hazırlanır.

Çözelti III

- 5 M Potasyum Asetat
- %11.5 Glasiyel Asetik Asit

dH₂O ile hazırlanır.

Tris–Asetat-EDTA (TAE) (50X)

- Tris Baz 242 gr
- Glasiyel Asetik Asit 57,1 ml
- EDTA 0.5 M pH 8.0 100 ml

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

Tris-EDTA (TE) Tamponu

- 1 M Tris-HCl pH 8.0
- 0.5 M EDTA pH 8.0

CaCl₂ Çözeltisi

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

dH₂O ile hazırlanır.

STET Tamponu (1L)

- Sükroz 80 gr
- Triton X-100 5 ml
- 1 M Tris-HCl pH 8 10 ml
- 0.5 M EDTA pH 8 100 ml

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

P(-) Tamponu (800 ml)

- Sükroz 103 gr
- K₂SO₄ 0.24 gr
- MgCl₂.6 H₂O 2.02 gr
- İz Element Solüsyonu*2 ml

dH₂O ile 800 ml'ye tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra, P (+) tamponu elde etmek için her 80 ml P(-)çözeltisi içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir:

- KH₂PO₄ (% 0.5) 1 ml
- CaCl₂.2 H₂O (% 3.68) 10 ml
- TES (% 5.73) pH 7.2 10 ml

***İz element Çözeltisi (1L)**

- ZnCl₂ 40 mg
- FeCl₂.6H₂O 200 mg
- CuCl₂.2H₂O 10 mg
- MnCl₂.4H₂O 10 mg
- Na₂B₄O₇.10H₂O 10 mg
- (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 10 mg

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır.

CTAB/NaCl Çözeltisi

- % 10 CTAB
- 0.7 M NaCl

Transformasyon Tamponu

- | | |
|--|--------|
| • P(-) tamponu | 790 µl |
| • KH ₂ PO ₄ (% 0.5) | 10 µl |
| • CaCl ₂ .2 H ₂ O (% 3.68) | 100 µl |
| • TES (% 5.73) pH 7.2 | 100 µl |
| • PEG 1000 | 330 µl |

STE Tamponu

- % 10.3 Süzkroz
- 25 mM Tris-HCl pH 8
- 25 mM EDTA

Lizis Tamponu

- 0.3 N NaOH
- % 2 SDS

10X PBS (pH 7.3)

- 1.4 M NaCl
- 27 mM KCl
- 100 mM Na₂HPO₄
- 18mM KH₂PO₄

Çözelti A pH 11.25 (100 ml)

- | | |
|---------------------|---------|
| • BCA | 1 gr |
| • Sodyum karbonat | 2 gr |
| • Sodyum tartarat | 0.16 gr |
| • NaOH | 0.4 gr |
| • Sodyum bikarbonat | 0.95 gr |

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Çözelti B (10 ml)

0.4 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 ml dH_2O 'da çözülür ve 4 °C'ta saklanır.

0,004 M $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi (Potasyum Antimonil Tartarat)

0.2743 gr Potasyum antimonil tartarat 100 ml dH_2O 'da çözülür ve 4 °C'ta saklanır.

0,03 M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi (Amonyum Molibdat)

4 gr Amonyum molibdat 100 ml dH_2O 'da çözülür ve 4 °C'ta saklanır.

0,1 M Askorbik Asit Çözeltisi

1,76 gr askorbik asit 100 ml dH_2O 'da çözülür ve 4 °C'ta saklanır.

 $\text{Pb}_2(\text{NO})_3$ Çözeltisi (10 ml, 200 mg/ml)

2 gr $\text{Pb}(\text{NO})_3$ 10 ml dH_2O 'da çözülür ve filtre ile steril edilerek oda sıcaklığında ışıktan koruyarak saklanır.

 CdCl_2 Çözeltisi (10 ml, 200 mg/ml)

2 gr CdCl_2 10 ml dH_2O 'da çözülür ve filtre ile steril edilerek oda sıcaklığında ışıktan koruyarak saklanır.

Ampisilin (10 ml, 100 mg/ml)

1 gr Ampisilin 10 ml dH_2O 'da çözülür ve 0,22 μm por çaplı filtre ile steril edilerek, -20 °C'ta saklanır.

Kloramfenikol (10 ml, 50 mg/ml)

0.5 gr Kloramfenikol 10 ml EtOH 'da çözülür ve 0,22 μm por çaplı filtre ile steril edilerek, -20 °C'ta saklanır.

Tiyostrepton (10 ml, 50 mg/ml)

0.5 gr Tiyostrepton 10 ml DMSO 'da çözülür ve -20 °C'ta saklanır.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside)

0.2 gr X-Gal 10 ml Dimetilformamid içinde çözülür ve ışıktan korunarak -20°C 'ta saklanır.

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside)

1 gr IPTG 10 ml distile su içinde çözülerek $0,22\ \mu\text{m}$ por çaplı filtre ile steril edilir ve ışıktan koruyarak -20°C 'ta saklanır.

Luria Broth (1 L, pH 7.5)

- Tripton 10 g
- Yeast Extract 5 g
- NaCl 10 g

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121°C 'ta 20 dakika otoklavlanır.

JLB (1 L)

- Tripton 12 gr
- Yeast Extract 24 gr
- Gliserol 4 ml

dH₂O ile 900 ml'ye tamamlanır ve 121°C 'ta 20 dakika otoklavlanır ve aşağıdaki steril çözelti eklenir.

JLB Tuzları (100 ml)

- KH₂PO₄ 2,31 gr
- K₂HPO₄ 12,54 gr

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

TSB (Tryptic Soy Broth) (1 L, pH 7.5)

- Tryptic Soy Broth 30 gr

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121°C 'ta 20 dakika otoklavlanır

YEME Besiyeri (1 L)

- Yeast Extract 3 gr
- Malt Extract 3 gr
- Pepton 5 gr
- Glukoz 10 gr

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra aşağıdaki steril çözeltiler eklenir:

- 2.5 M MgCl₂.6H₂O 2 ml
- % 20 Glisin 25 ml

YED Besiyeri (1 L)

- Glukoz 10 gr
- Maya özütü 10 gr

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır.

Minimal Besiyeri (1 L)

- NH₄(SO₄) 1 gr
- K₂HPO₄ 0.5 gr
- MgSO₄.7H₂O 0.2 gr
- FeSO₄.7H₂O 0.01 gr

dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra, 20 ml steril %50'lik glukozdan 4 ml eklenir.

R2YE Besiyeri (800 ml)

- Sükroz 103 gr
- K₂SO₄ 0.25 gr
- MgCl₂.6H₂O 10.12 gr
- Glukoz 10 gr
- Yeast Extract 5 gr
- Kazamino asit 0.1 gr

dH₂O ile 800 ml'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlandıktan sonra her 160 ml besiyeri içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir:

• KH_2PO_4 (% 0.5)	2 ml
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (% 3.68)	16 ml
• TES (% 5.73) pH 7.2	20 ml
• L-prolin (% 20)	3 ml
• 1 N NaOH	1 ml
• İz Element Çözeltisi	0.4 ml

2.1.9. Kullanılan Cihazlar

+ 4 °C Soğutucu (Ariston), -20 °C derin dondurucu (Ariston), -86 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, MINI-SAB CELL CT), Güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Masa Üstü Santrifüj (BACKMAN COULTER, Microfuge 22R), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAVE HVE-50), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Etüv (BINDER, 9010-0078), İnkübatör (Heraeus, D-63450 Herau), Çalkalamalı İnkübatör (Edmund Bühler, KS-15), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), UV Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmart), Mikrodalga Fırın (Kumtel), Sonikatör (BRANSON, Digital Sonifier), Spektrofotometre (BIO-RAD, Smartspec 3000).

2.2. Yöntemler

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

S. coelicolor'dan genomik DNA izolasyonu Hopwood ve arkadaşlarının (1985) geliştirdiği yöntem kullanılarak yapılmıştır. -80 °C'ta saklanan *S. coelicolor* stok spor stoklarının 50 µl'si 20 ml TSB besiyerine inoküle edilerek 4 gün boyunca 30 °C'ta 250 rpm'de üretilmiştir. 50 ml TSB besiyerinin aşılmasında kullanılmış ön kültürle %10 oranında aşıl原因arak hücreler 2 gün daha aynı koşullarda büyütülmüştür.

Hücreler oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dakika çöktürülmüş ve pelet, 10 ml TE (pH 8.0) tamponunda çözüldükten sonra karışım üzerine 20 mg Lizozim eklenmiştir. Karışımın 1.7 ml'si steril bir ependorf tüpüne ayrıldıktan sonra geri kalan kısmı tekrar kullanılmak üzere -20 °C'ta saklanmıştır. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl RNaz (10 mg/ml) çözeltisi eklendikten sonra 37 °C'ta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışımın üzerine 300 µl 5 M NaCl, 240 µl CTAB/NaCl eklenerek 65 °C'ta 10 dakika inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Karışımın üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenip karıştırıldıktan sonra fazlar birbirinden 11000 rpm'de 5 dakika santrifügasyon ile ayrılmıştır. Üst faz TE tamponu (pH 6-7) ile doyurulmuş fenol ve kloroform:izoamilalkol (24:1) karışımı ile iki kez özütlenmiştir. Daha sonra sulu faz ayrılarak üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 500 µl %70 EtOH ile yıkandıktan sonra kurutularak 100 µl dH₂O'da çözülmüş ve -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.2. *ppk*, *ppx* Genlerinin ve *ppk* promotor bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

S. coelicolor genom dizisi ve Std84 kozmidinin DNA dizisine <http://strepdb.streptomyces.org.uk> adresinden ulaşılarak tasarlanan primerlerin 5' uçlarına pBluescript SK(-) klonlama vektörünün çoklu klonlama bölgelerine uygun şekilde yerleşmesini sağlayacak restriksiyon enzim tanıma bölgeleri eklenmiştir (Tablo 2.2).

ppk ve *ppx* genlerine ait DNA fragmanları, sırasıyla Std84 kozmid DNA'sının ve *S. coelicolor* genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. *ppk* promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında ise yine Std84 kozmid DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır.

Her bir gen için farklı DNA polimeraz enzimleri ve primer bağlanma sıcaklıkları ile yapılan PCR optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi PCR

ürününün elde edildiği reaksiyon koşulları ve tamponları belirlenmiştir. Reaksiyonlar 50 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.3)

Tablo 2.3. *ppk*, *ppx* genleri ve *ppk* *promotor* bölgesi için tasarlanmış ileri ve geri primerler.

Gen	Primer		Restriksiyon Endonükleaz	PCR Ürünü (bp)
<i>ppk</i>	İleri	5'AA <u>CTGCAGA</u> ACCAATGCA TTGGCGCGCAGGAAGCTCGGT G-3'	<i>Pst</i> I	3000
	Geri	5' <u>CGGGATCCC</u> GCGTACGGC GAGGAGGGGTAC -3'	<i>Bam</i> HI	
<i>ppx</i>	İleri	5' <u>GGAATTC</u> CTCGGCGCTCA AATGGGTACCTG -3'	<i>Eco</i> RI	1153
	Geri	5'GCGCAGAACCTCCTCGAC C -3'	----	
<i>ppk</i> <i>promotor</i>	İleri	5' <u>GGAATTC</u> CGTGAGCCTCG CAAGGCTG -3'	<i>Eco</i> RI	318
	Geri	5'AA <u>CTGCAGA</u> ACCAATGCA TTTACGGCGAGGAGGGGGC G -3'	<i>Pst</i> I	

2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan *ppk*, *ppx* ve *promotor* bölgesine ait DNA fragmanları, % 1'lik Agaroz Jele yüklenmiş ve elektroforezden sonra, jel görüntüleme cihazı (UV ışık altında) ile görüntülenerek uygun bantlar steril bistüri yardımıyla kesilip ependorf tüplere aktarılmıştır. DNA fragmanları, Jelden DNA Saflaştırma Kiti (DNA Jel Extraction Kit, GE Health Care) kullanılarak elde edilmiştir. Konsantrasyonları belirlenen DNA'lar -20 °C'ta saklanmıştır.

Tablo 2.4. *ppk*, *ppx* ve *ppk* promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan enzimler, reaksiyon tamponları ve reaksiyon koşulları.

Gen	Enzim	Reaksiyon Bileşenleri (Son Kons.)	Reaksiyon Koşulları
<i>ppk</i>	[®] <i>Pfx</i> Platinum DNA Polimeraz	1X <i>Pfx</i> Amplifikasyon Tamponu 0.3 µM dNTP 1mM MgSO ₄ 1X Enhancer 0.3 µM Primer 2U <i>Pfx</i> DNA Polimeraz	94 °C'ta 3 dk. 94 °C'ta 30 sn. 65 °C'ta 30 sn. 68 °C'ta 3 dk. 68 °C'ta 10 dk. } 25 döngü
<i>ppx</i>	[®] <i>Pfx</i> Platinum DNA Polimeraz	1X <i>Pfx</i> Amplifikasyon Tamponu 0.3 µM dNTP 1mM MgSO ₄ 2X Enhancer 0.3 µM Primer 2U <i>Pfx</i> DNA Polimeraz	94 °C'ta 3 dk. 94 °C'ta 30 sn. 59 °C'ta 30 sn. 68 °C'ta 1,2 dk. 68 °C'ta 10 dk. } 25 döngü
promotor	Phusion DNA Polimeraz	1X Phusion GC Tamponu 200µM dNTP 0,5µM Primer %3 DMSO 1U Phusion DNA Polimeraz	98 °C'ta 2 dk. 98 °C'ta 10 sn. 65 °C'ta 30 sn. 72 °C'ta 10 sn. 72 °C'ta 10 dk. } 25 döngü

2.2.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması

2.2.4.1. *ppk* Geninin pBluescript SK(-) Plazmidine Klonlanması

Ligasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için agaroz jelden saflaştırılan 2 µg *ppk* PCR ürünü ve 1 µg pBluescript SK(-) plazmidi 8U *Bam*HI ve 8U *Pst*I restriksiyon enzimleri ile 37 °C'ta 2 saat süreyle kesilmiştir. Kesim reaksiyonunda son konsantrasyonu 2X olacak şekilde Tango Evrensel Tampon (Fermentas) kullanılmıştır.

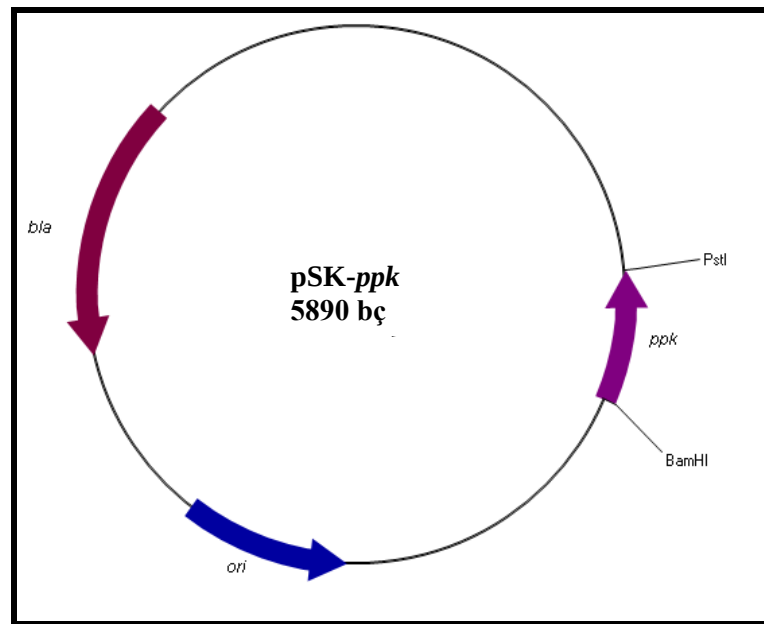
Kesim sonuçları %1'lik agaroz jelde gözlenmiş ve uygun DNA fragmanları jelden saflaştırılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlara göre *Bam*HI-*Pst*I *ppk* fragmanı (25 ng/µl) ve pSK (-) plazmidi (30 ng/µl) ile 3/1 (PCR ürünü/vektör), 4/1 (PCR ürünü/vektör) ve 5/1 (PCR ürünü/vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1X T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Örnekler 16 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

Transformasyon için, 5 µl ligasyon karışımı 100 µl *E. coli* DH5α kompetan hücresi üzerine eklenerek buz içerisinde 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku uygulanarak 2 dakika daha buz içerisinde bekletilmiştir. Üzerine 800 µl LB eklendikten sonra 1 saat 37 °C'ta çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerden 100'er µl, 100 µg/ml ampisilin, 40 µg/ml X-gal ve 0.1 mM IPTG içeren LB agar besiyerlerine yayılmıştır. Petriler 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

Elde edilen transformanlar arasından olası rekombinant klonlar, mavi/beyaz koloni seçimi ile belirlenmiştir. Bu seçim, plazmidin çoklu klonlama bölgesinde bulunan *lac* operonunun ürünü olan β-galaktosidaz enziminin alfa alt biriminin konakçıdaki alfa alt biriminin komplementasyonu sonucunda gerçekleşmektedir. Besiyerine eklenen IPTG bir galaktoz analogudur ve *lacZ* promotorunu uyarmaktadır. Uyarılan promotor β-galaktosidaz üretmekte ve bu enzim, substrat olarak, parçalandığında mavi renk oluşturan X-gal'i kullanmaktadır. Çoklu klonlama bölgesine doğru bir şekilde klonlanan gen, *lac* operonundan enzimin üretimini

engellemekte ve rekombinant kolonilerin beyaz renkte görülmelerine neden olmaktadır.

Bu şekilde elde edilen beyaz renkli olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni ortama çizilerek saf kültürleri hazırlanmıştır. Rekombinant koloniler, ampicilinli besiyerinde gece boyu büyütüldükten sonra her birisinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmitler, uygun restriksiyon endonükleazlar (*Bam*HI, *Pst*I-*Bam*HI ve *Xho*I) ile kesilmiştir. Kesimlerle doğrulanan plazmide pSK-*ppk* adı verilmiştir (Şekil 2.6).



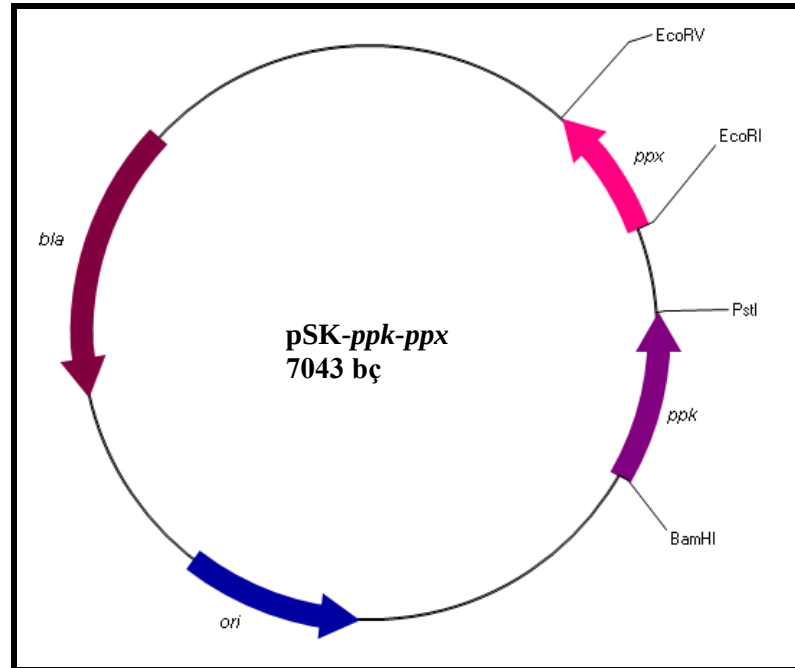
Şekil 2.6. pBluescript SK(-) plazmidine *ppk* geninin klonlanması sonucu oluşan pSK-*ppk* rekombinant plazmidinin şematik görünümü.

2.2.4.2. pSK-*ppk* Plazmidine *ppx* Geninin Klonlanması

pSK-*ppk* plazmidinde, *ppk* geninin altına *ppx* genini klonlamak için, *ppx* geni Tablo 2.3'te belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jelden saflaştırılmıştır. 1.5 µg saflaştırılmış *ppx* PCR ürünü ve 2 µg pSK-*ppk* plazmidi 8U *Eco*RI ve 8U *Eco*RV restriksiyon enzimleri ile 37 °C'de 2 saat süre ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonları 1X *Eco*RI Tamponu (Jena Biosciences) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Kesim reaksiyonları %1'lik agaroz jele yüklenerek 1 saat süreyle yürütülmüş ve 1 kb Moleküler DNA belirteci ile büyüklükleri doğrulanmış ve agaroz jelden saflaştırılmıştır. Tekrar agaroz jelde yürütülerek konsantrasyonları belirlenen *ppx* *EcoRI-EcoRV* fragmanı (70 ng/μl) ve pSK-*ppk* *EcoRI-EcoRV* plazmidi (200 ng/μl) ile 3/1 (PCR ürünü/vektör) ve 4/1 (PCR ürünü/vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonlarında 1U T4 Ligaz, 1X T4 Ligaz tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonlar 16 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. Ligasyon ürünlerinin 5'er μl'si *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmış ve hücreler 100 μg/ml Ampisilin içeren LB agar besiyerlerine yayılmıştır.

Elde edilen transformanların tek koloni halinde yeni besiyerine çizilmesiyle elde edilen saf kültürlerin her birinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmitler uygun restriksiyon enzimleri (*EcoRI-EcoRV*, *XhoI*) ile kesilerek doğrulanmıştır. Bu çalışma sonucunda oluşturulan yeni plazmide pSK-*ppk-ppx* adı verilmiştir (Şekil 2.7).

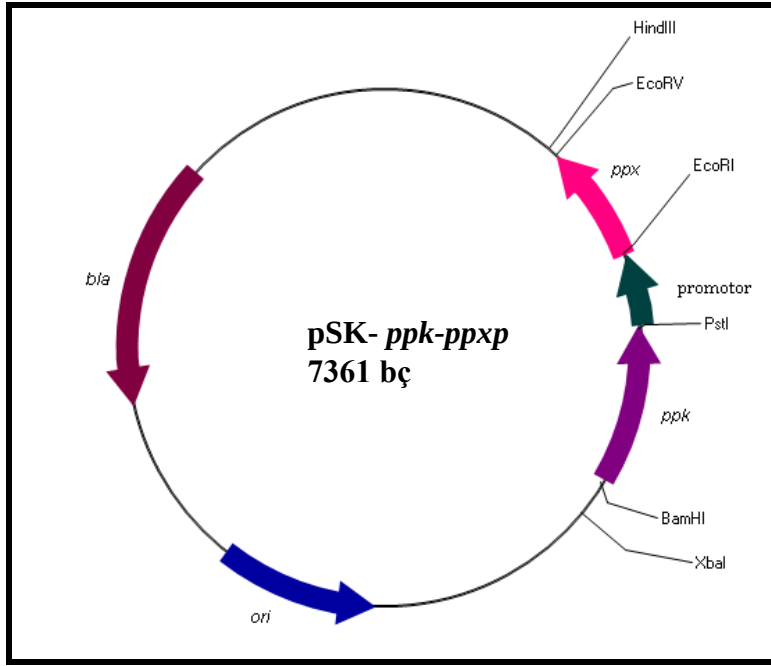


Şekil 2.7. Rekombinant pSK-*ppk* plazmidine *ppx* geninin klonlanması sonucu oluşan pSK-*ppk-ppx* rekombinant plazmidinin şematik görünümü.

2.2.4.3. *pSK-ppk-ppx* Plazmidine *ppk* Promotor Bölgesinin Klonlanması

pSK-ppk-ppx plazmidinde bulunan *ppx* geninin kendi doğal promotörü bulunmamaktadır. *S. coelicolor*'da genin ekspresyonunu sağlamak için *ppk* geninin promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılarak *ppx* geninin önüne klonlanması amaçlanmıştır. Bunun için agaroz jelden saflaştırılan promotor bölgesi PCR ürünü (1 µg) ve *pSK-ppk-ppx* plazmidi (1.5 µg) *EcoRI-PstI* (8'er U) restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Örnekler daha sonra agaroz jele yüklenmiş ve büyüklükleri, 1 kb Moleküler DNA belirteci ile doğrulanmıştır. Jelden DNA saflaştırma kiti (GE Healthcare) ile izole edilen DNA fragmanları, klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

Uygun ikili restriksiyon enzimleri ile kesilen *pSK-ppk-ppx* plazmidi (60 ng/µl) ve *ppk* promotor bölgesi DNA'sı (80 ng/µl) ile 3/1 (PCR ürünü/vektör) ve 4/1 oranlarında (PCR ürünü/vektör) ligasyon reaksiyonu, 1X Ligasyon Tamponu içinde 1U T4 DNA Ligaz ile gerçekleştirilmiştir. Ligasyon karışımları gece boyunca 16 °C'ta inkübe edilmiştir. Her bir ligasyon ürününün 5'er µl'si *E. coli* DH5α suşunun transformasyonunda kullanılmış ve hücreler 100 µg/ml Ampisilin içeren LB agar besiyerlerine yayılarak 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. Elde edilen transformantların tek koloni halinde yeni besiyerine çizilmesiyle elde edilen saf kültürlerin her birisinden kaynatma yöntemiyle plazmid izolasyonu yapılmış ve plazmidler uygun restriksiyon enzimleri (*PstI-EcoRI*, *XhoI*) ile kesilerek doğrulanmıştır. Bu çalışmada oluşturulan bu yeni plazmide *pSK-ppk-ppxp* adı verilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Rekombinant pSK-ppk-ppx plazmidine promotor bölgesinin klonlaması sonucu oluşturulan pSK-*ppk-ppxp* rekombinant plazmidinin şematik görünümü.

2.2.5. Klonlanan *ppk*, *ppx* ve promotor Bölgesi DNA'larının Dizilenmesi

DNA dizilerinin belirlenmesi için, *ppk* genini içeren pSK-*ppk* plazmidi ile *ppx* ve *ppk* promotor bölgesi PCR ürünleri jelden saflaştırıldıktan sonra uygun konsantrasyonlarda İontek Ltd.'ye (İstanbul, Türkiye) gönderilmiştir. *ppk* geninin dizilenmesi için pSK(-) plazmidinde bulunan T3 ve T7 promotorlarına uygun primerler kullanılırken, *ppx* ve promotor bölgesinin dizilenmesi için bu bölgelere özgül ileri ve geri primerler kullanılmıştır.

2.2.6. *ppk* ve *ppxp* Genlerinin pHZ1351 Mekik Vektörüne Klonlanması

ppk geninin pSK-*ppk* plazmidinden uygun enzimlerle çıkarılarak pHZ1351'e klonlanması amaçlanmıştır.

Hem pBluescript plazmidi hem de *ppk* geninin büyüklükleri yaklaşık 3000 baz çifti olduğundan, pSK(-) plazmidini birden fazla yerden kesip *ppk* geninde kesim bölgesi bulunmayan *DraI* restriksiyon endonükleazı kullanılmıştır. Aynı kesim reaksiyonuna *ppk* genini pHZ1351'e klonlamak için kullanılacak olan *XbaI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazları da eklenerek *ppk* geni klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Kesim reaksiyonları 1X Tango Evrensel Tampon (Fermentas) içinde gerçekleştirilmiştir.

pSK-*ppk-ppxp* plazmidi ve pHZ1351 vektörü ise yalnızca *XbaI-HindIII* restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiştir. Klonlamada kullanılacak olan DNA fragmanlarının hepsi jelden izole edilmiştir.

Uygun enzimler ile kesilerek hazırlanan pHZ1351 (80 ng/μl) ile *ppk* (50 ng/μl) ve *ppk-ppxp* (60 ng/μl) DNA fragmanları ile 3/1 (DNA fragmanı/vektör), 4/1 (DNA fragmanı/vektör) oranlarında ligasyon reaksiyonları hazırlanmıştır. Her bir ligasyon reaksiyonu 1U T4 Ligaz ve 1X T4 Ligaz tamponu içermektedir. Ligasyon karışımları gece boyunca 16 °C'de inkübe edilmiştir.

pHZ1351 plazmidi bir mekik vektörü olup *E. coli* replikasyon orijini içerdiğinden altklonlama çalışmaları öncelikle *E. coli* DH5α suşunda gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünlerinin 5'er μl'si, *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine Bölüm 2.4.'te anlatıldığı gibi transformasyon ile aktarılmıştır. Transformasyonda pozitif kontrol olarak pSK(-) plazmidi ve negatif kontrol olarak *XbaI-HindIII* restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiş pHZ1351 vektörü kullanılmıştır. Transformasyon sonrası büyütülen hücrelerin 100'er μl'si 100 μg/ml ampisilin içeren besiyerlerine yayılarak 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. Transformantlardan kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen pütatif rekombinant plazmit DNA'ları enzim kesimleriyle doğrulanmıştır.

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini doğrulamak için, *HindIII*, *ppk* geninin içinden kesen *XhoI*, ve klonlamanın gerçekleştirildiği *XbaI-HindIII* restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

2.2.7. pHZ1351 Klonlarının *E. coli* ET12567 Suşuna Aktarılması

Streptomyces coelicolor A3(2) oldukça güçlü bir metile özgül restriksiyon enzim sistemine sahiptir. *E. coli* K12 ya da *E. coli* DH5 α gibi suşlarda çoğaltılan plazmit DNA'larının, Dam (GA^{Me}TC), Dcm (C^{Me}CA/TGG) ya da Hsd (AA^{Me}CN₆GTGC ve GCA^{Me}CN₆GTT) enzimleri tarafından metillenmesi, *Streptomyces* suşlarının bu plazmidlerle transformasyonunu engellenmektedir (Hopwood ve ark., 2000). Bu nedenle, *E. coli* DH5 α suşunda bulunan pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerinin, *S. coelicolor*'a aktarılabilmesi için öncelikle Dam, Dcm ve HsdS enzimlerinden yoksun olan *E. coli* ET12567 suşuna aktarılıp bu bakteriden izole edilmeleri gerekir.

Bu amaçla, *E. coli* DH5 α suşundan izole edilen pHZ1351-*ppk*, pHZ1351-*ppk-ppxp* ve pHZ1351 plazmitlerinden 5'er μ l, 100'er μ l kompetan *E. coli* ET12567 hücreleriyle karıştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak pSK(-) plazmidi kullanılmıştır. Buz içinde 20 dakika bekletilen hücrelere 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku uygulandıktan sonra 2 dakika daha buz içerisinde bekletilmiş ve daha sonra üzerlerine 800 μ l LB eklenerek 37 °C'ta 1 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler, 100 μ g/ml ampisilin ve 50 μ g/ml kloramfenikol içeren LB agar besiyerine 100'er μ l yayılarak 37 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir.

Elde edilen transformanlardan 3–4 tanesi alınarak ampisilin ve kloramfenikol içeren LB agar petrilere çizilerek büyütülmüş ve kolonilerin her birinden kaynatma yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler restriksiyon enzim analizi ile doğrulanmıştır.

2.2.8. *E. coli*'den Plazmit ve Kozmid İzolasyonu

5 ml JLB içinde 37 °C'ta 12–16 saat büyütülmüş *E. coli* kültürü, oda sıcaklığında 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 200 μ l Çözelti I eklenerek vortekslenmiş ve steril bir ependorf tüpüne alınarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnek üzerine 400 μ l Çözelti II eklenmiş, 5 dakika buz içinde her 2 dakikada bir

kariştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra bu kariştırıma 300 µl Çözelti III eklenerek 10 dakika daha buz içinde her 2 dakikada bir kariştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra örnek 4 °C'ta 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant steril bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Üst sıvı üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Inkübasyon sonrası örnek, oda sıcaklığında 11.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet vakum ile kurutulmuş ve yoğunluğuna göre 50-100 µl dH₂O'da çözülmüştür. Suda çözülen DNA örnekleri üzerine 5 µl RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37 °C'ta 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine toplam hacmin yarısı kadar fenol, yarısı kadar klorofom:izoamilalkol (24:1) kariştırımı eklenerek, 11.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası organik fazdan ayrılan sulu faz ile fenol-kloroform özütlemesi 2 kez daha tekrarlanmıştır. En son elde edilen sulu faz üzerine toplam hacme eşit miktarda kloroform:izoamilalkol (24:1) kariştırımı eklenerek aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Sulu faz üzerine 3 kat hacimde soğuk absolüt etanol eklenerek -20 °C'ta 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnek, 4 °C'ta 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve kurutulan pelet 25-50 µl dH₂O ile çözülenerek -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.9. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

5 ml LB içinde 37 °C'ta gece boyu büyütölmüş *E. coli* DH5α hücreleri, 100 ml LB'ye 1/10 oranında eklenerek OD₆₀₀ 0.4-0.6 arasında bir değere ulaşıncaya kadar 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler iki adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne bölünerek 5 dakika buz içerisinde inkübe edilmiş ve 4 °C'de 3000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet, 4 °C'ta soğutulmuş 5 ml steril CaCl₂ solüsyonu içinde çözülmüş ve 4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Elde edilen pelet tekrar aynı miktarda CaCl₂ çözeltisi içinde çözülmüş ve hücreler buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletler, hücre yoğunluğuna göre 0.5-1 ml soğuk CaCl₂ çözeltisinde çözülenerek, her tüpte 100'er µl olacak şekilde steril ependorf tüplerine bölünmüştür. Daha sonra tüpler hızlıca sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve -80 °C'ta saklanmıştır.

2.2.10. *E. coli* Hücrelerinden Kaynatma Yöntemiyle Plazmit İzolasyonu

E. coli hücrelerinin plazmitlerle transformasyonu sonucu elde edilen tek koloniler steril kürdan ile uygun antibiyotik içeren 700 µl JLB besiyerine ekildikten sonra, 37 °C'ta 12-16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler, oda sıcaklığında 13.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Pelet, 2 mg/ml Lizozim içeren 250 µl STET tamponunda vortekslenerek çözülmüş ve hemen kaynayan su içine alınarak 45 saniye bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerin dibinde oluşan peletler steril kürdan ile uzaklaştırılmış ve üst sıvı üzerine 250 µl izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından örnekler oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletler vakum ile kurutulmuş ve yoğunluğuna göre 20-30 µl dH₂O'da çözülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri hemen %1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edilmiştir.

2.3. pHZ1351'e Klonlanan Genlerin *S. coelicolor*'a Aktarılması

2.3.1. *S. coelicolor* Protoplastlarının Hazırlanması

20 ml TSB'ye yaban tip *S. coelicolor* spor stoğundan 20 µl aşılansarak 30 °C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen bu ön kültür ile 100 µl 2.5 M MgCl₂.6H₂O ve 1.25 ml %20 Glisin eklenen 50 ml YEME besiyerine 1/10 oranında hücre, aşılansmış ve 30 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir. 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilen hücreler, üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra %10.3'lük süktroz ile 2 kez yıkanmıştır. Pelet üzerine 20 ml 2 mg/ml Lizozim içeren P(+) tamponu eklenerek 37 °C'de her 5 dakikada bir dikkatlice karıştırılarak 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında karışımdan örnek alınarak mikroskopta protoplast oluşumu

gözenmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu 2 tane 50 ml'lik santrifüj tüpüne 10'ar ml bölünerek üzerine 15'er ml daha P(+) tamponu eklenmiş ve içine pamuk doldurulmuş steril 5 ml'lik pipet uçlarından buz içerisindeki steril santrifüj tüplerine aseptik koşullarda süzümüştür. Daha sonra protoplast süspansiyonu 4 °C'de 3300 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine 5 ml P(+) tamponu eklenerek tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet 300-350 µl P(+) tamponunda çözülmüş ve buz içindeki steril ependorflara 50'şer µl bölünerek yine buz içerisinde -80 °C'ta gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün tüpler buzdan alınarak protoplast transformasyonu için -80 °C'ta saklanmıştır.

2.3.2. Protoplast Transformasyonu

Protoplast transformasyonu için öncelikle, 790 µl P(-) tamponuna, sırasıyla % 0.5'lik (w/v) KH_2PO_4 'ten 10 µl, % 3.68'lik (w/v) CaCl_2 'den 100 µl, % 5.73'lük (w/v) TES tamponundan (pH 8.3) 100 µl ve 330 µl PEG 1000 eklenerek P (+) tamponu içinde % 25 lik PEG solüsyonu hazırlanmıştır. -80 °C'tan alınan protoplastlar hemen ılık su altında çözdürülerek, üzerine 5 µl DNA (pHZ1351-*ppk*, pHZ1351-*ppk-ppx* veya pHZ1351), 200 µl % 25'lik PEG solüsyonundan eklenmiş ve 2-3 kez pipetlenerek karıştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak seçilen pIJ790 *Streptomyces* plazmit DNA'sı da aynı işlemde geçirilmiştir. Daha sonra karışımlardan 200'er µl alınarak 2 R2YE besiyerine eşit şekilde yayılmıştır. Petriler protoplastların rejenerasyonu için 30 °C 'ta 20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir petrideki hücreler, son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde tiyostrepton içeren steril distile su ile örtülmüş ve tekrar 30 °C'ta inkübe edilmiştir.

2.3.3. *Streptomyces coelicolor*'dan Plazmit İzolasyonu

S. coelicolor'a aktarılan pHZ1351-*ppk*, pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerinin doğruluğunu kanıtlamak için transforman kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

Elde edilen transforman koloniler TSA katı besiyerine çizilerek saf kültürleri elde edilmiştir. Büyüyen kolonilerden birer tanesi steril kürdan ile alınmış ve 50 µg/ml tiyostrepton içeren 20 ml TSB'ye ekilerek 30 °C'ta 4 gün inkübe edilmiştir. 50 µg/ml tiyostrepton içeren 50 ml TSB besiyeri elde edilen bu ön kültür ile 1/10 oranında aşılansarak 48 saat daha aynı koşullarda büyütülmüştür. İnkübasyon sonrası hücreler, 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak oda sıcaklığında 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 5 ml STE tamponu içinde çözülmüş ve üzerine lizozim eklenerek (2 mg/ml) 37 °C'ta 30 dakika bekletilmiştir. Her bir örnek üzerine 3/5 oranında Lizis çözültisi eklenmiş ve 20 sn vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler 10 dakika oda sıcaklığında, 10 dakika da 70 °C su banyosunda sık sık karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler oda sıcaklığına soğutulmuştur. Her bir örneğe 5 ml fenol ve 5 ml kloroform:izoamilalkol (24:1) karışımı eklenerek karıştırılmış ardından 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan sulu faz başka bir steril santrifüj tüpüne alınarak, fenol-kloroform özütlemesi tekrarlanmıştır. Elde edilen sulu faza eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) karışımı eklenerek aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Üst faz tekrar steril bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine, eşit hacimde izopropanol ve 1/10 hacimde 4°C'ta soğutulmuş sodyum asetat (pH 3.8) eklenmiştir.

Örnekler -20 °C'ta 30 dakika bekletilmiş ve daha sonra 4 °C'ta 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler 150-200 µl dH₂O ile çözülmüş ve restriksiyon enzim analizi için -20 °C'ta saklanmıştır.

2.4. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Rekombinant *E. coli* DH5α suşlarında PPK ve PPX enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesi için gece boyu büyütülen ön kültür'den, 50 ml sıvı besiyerine bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ 0.2 olacak şekilde inokülasyonunda kullanılmıştır. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ 1'e ulaştığında, son konsantrasyon 0.7 mM olacak şekilde IPTG ilave edilmiştir. IPTG varlığında 6 saat üretilen hücreler, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pelet 1 kez 1X PBS ile yıkandıktan sonra taze 1X PBS'te çözülerek sonike edilmiştir. Sonikasyon %10 şiddette, 20 sn aralıklar ve 15 sn vuruşlarla buzda gerçekleştirilmiştir.

Hücre özütünün üzerine 1mM olacak şekilde PMSF ve %20 Triton X-100'den 100 µl eklenerek, 4 °C'ta 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant ve pelet birbirinden ayrılarak aktivite deneylerinde kullanılmak üzere 4 °C'ta saklanmıştır.

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan rekombinant *S. coelicolor* suşlarında da PPK ve PPX aktivitesinin belirlenebilmesi için yaban tip ve rekombinant suşlardan yaklaşık 10^8 olacak şekilde spor, 50 ml TSB besiyerine ekilerek 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. 50 ml TSB besiyeri elde edilen ön kültürler ile 1/10 oranında aşılınmış ve 36 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücrelerin 15'er ml'si 4 °C'ta 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler 1 ml 1X PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, 1 ml 1X PBS tamponunda çözülmüş ve %10 şiddette, 20 sn aralıklar ve 15 sn vuruşlarla sonike edilmiştir. Elde edilen hücre özütü üzerine 1mM olacak şekilde PMSF ve 100 µl %20 Triton X-100 eklendikten sonra süpernatant ve pelet ayrı ayrı enzim aktivitesinin belirlenmesi için saklanmıştır.

2.4.1. PPK Aktivitesinin Ölçülmesi

PPK aktivitesinin belirlenmesi için Lee ve arkadaşlarının (2006) yöntemi kullanılmıştır. 150 µl örnek, 850 µl PPK aktivite çözeltisi [0.915 M STPP (Sodyum tripolifosfat), 56 mM Tris-HCl, 11.76 mM MgCl₂, 0.82 M KOH, %5.88 (v/v) Hidroksil Amonyum-HCl] ile birleştirildikten sonra üzerine 1 M'lık ATP'den 10 µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 29 °C'ta 5 dakika inkübe edilen karışım üzerine 1 ml %10 TCA eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.

Son olarak karışım üzerine 4 ml 1M HCl içerisinde % 25 lik FeCl₃ içeren çözelti eklenerek absorbans değerleri 540 nm'de ölçülmüştür. 1 ünite enzim, 1 dakikada 1µM hidroksamik asit üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.4.2. PPX Aktivitesinin Ölçülmesi

PPX aktivitesi tayininde Lee ve arkadaşlarının (2006) yöntemi kullanılmıştır. 50 µl örnek, 950 µl PPX aktivite solüsyonu [0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM *p*-nitrofenil fosfat] ile birleştirildikten sonra, 25 °C'ta 45 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 2 ml 0.5 M KOH eklenmesiyle durdurulmuş ve absorbans değerleri 405 nm'de ölçülmüştür. 1 ünite enzim 1 dakikada 1µM *p*-nitrofenil üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.5. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu tayini için Smith ve arkadaşlarının (1985) BCA yöntemi kullanılmıştır. Mikroplaka kuyularına konulan protein örneklerinin (5-10 µl) üzerine taze hazırlanmış, 50 hacim çözelti A ve 1 hacim çözelti B karışımından 200 µl eklenmiştir. Örnekler, 37 °C'ta 30 dakika inkübe edildikten sonra, absorbans değerleri 490 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi BSA proteini ile hazırlanmıştır.

2.6. Rekombinant *Streptomyces coelicolor* Suşlarının Farklı Stres Koşullarına Dirençliliğinin Belirlenmesi

2.6.1. pH Dirençliliğinin Belirlenmesi

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini içeren *S. coelicolor* suşlarının farklı pH değerlerindeki büyüme eğrileri yaban suşun aynı koşullardaki büyüme eğrisiyle karşılaştırılmıştır. Bunun için her bir suşa ait spor stoğundan 50'şer µl 50'şer ml R2YE zengin besiyerine ekilmiş ve hücreler 30 °C'ta 3 gün inkübe edilmiştir.

Elde edilen bu ön kültürlerden, pH değeri, steril 8N NaOH ve 8N HCl ile 5, 7 ve 9'a ayarlanmış 100'er ml R2YE besiyerine eşit yaş ağırlıkta aşılanmıştır. Mutant suşlar için besiyerlerine 25 µg/ml olacak şekilde tiyostrepton eklenmiştir.

Hücreler 350 rpm'de 30 °C'ta 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Her 24 saatte bir 5 ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler 4000 rpm'de 4 °C'ta 20 dakika santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmış ve pelet iki kez 2 ml steril distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan peletler -80 °C'ta örnek alımı bitene kadar saklanmıştır. Daha sonra peletler 1 ml steril distile su ile çözülerek daha önce ağırlıkları ölçülmüş ısıya dayanıklı plastik kaplar içinde 80 °C'ta 5 gün boyunca kurutulmuştur. Daha sonra ağırlıkları tekrar ölçülerek, elde edilen değerler ile ml'deki kuru ağırlık (mg) hesaplanarak bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

2.6.2. Sıcaklık Dirençliliğinin Belirlenmesi

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerini içeren rekombinat suşlar ile yaban tipin farklı sıcaklıklardaki büyüme eğrilerini belirlemek amacıyla spor stoğundan 50'şer µl 50'şer ml R2YE zengin besiyerine eklenmiş ve 30 °C'ta 3 gün inkübe edilerek ön kültür hazırlanmıştır. Bu ön kültürlerden eşit yaş ağırlıkta 100'er ml R2YE zengin besiyerine ekilmiş ve hücreler 5 gün boyunca 30 °C, 37 °C ve 42 °C'ta 350 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir.

Kültürlerden 24 saatte bir 5 ml örnek alınmış, alınan örnekler 4000 rpm'de 15 dakika çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletler iki kez 2 ml steril distile su ile yıkanmış ve -80 °C'ta örnek alımı bitene kadar muhafaza edilmiştir. Daha sonra peletler 1 ml steril distile suda çözülmüş ve önceden ağırlıkları belirlenmiş ısıya dayanıklı plastik kaplarda 80 °C'ta 5 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin ağırlıkları tekrar ölçülerek ml'deki kuru ağırlık (mg) belirlenmiş ve elde edilen değerler ile büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

2.6.3. H₂O₂ Dirençliliğinin Belirlenmesi

Bu deney ile *ppk* ve *ppx* genlerinin çoklu kopyalarını içeren mutant suşlar ile yaban suşun, farklı dört KH₂PO₄ konsantrasyonunda oksidatif strese hassasiyetlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bunun için KH_2PO_4 eklemeyen, 0.37 mM, 1.85 mM ve 3.7 mM KH_2PO_4 içeren R2YE katı besiyerine yaklaşık 10^6 sayıda olacak şekilde bakteri sporları yayılmıştır. Hemen ardından, 10 µl 100 mM H_2O_2 emdirilmiş Whatman kağıdından hazırlanmış steril diskler petrilerin tam ortasına yerleştirilmiştir. Bakteriler 30 °C'ta 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası disklerin etrafında oluşan inhibisyon halkaları ölçülmüştür.

2.7. Fosfat Alımının Ölçülmesi

Rekombinant ve yaban suşların, bulundukları sıvı ortamdan P_i alımları Ohtake ve arkadaşlarının (1985) askorbik asit yöntemi ile ölçülmüştür. Her bir suş için 10^7 sayıda spor, 1,85 mM KH_2PO_4 içeren 100 ml YEME besiyerine inoküle edilmiştir. Rekombinant suşlar için besiyerine 25 µg/ml olacak şekilde tiyostrepton eklenmiştir. 30 °C'ta 350 rpm'de çalkalamalı olarak 5 gün boyunca inkübe edilen kültürlerden her 24 saatte bir 5 ml örnek alınarak üst sıvı ve pelet ayrı ayrı - 80 °C'ta saklanmıştır. Üst sıvı, besiyerinde bulunan fosfat miktarını belirlemede kullanılmıştır.

Bakterilerin fosfat alımları minimal besiyerinde de ölçülmüştür. Rekombinant ve yaban suşları, yaklaşık 10^6 spor olacak şekilde 50 ml YED besiyerine ekilmiş ve 3 gün boyunca 30 °C'ta 250 rpm'de üretilmişlerdir. 120 ml YED besiyerine elde edilen bu ön kültürden 1/10 oranında hücre aşılansarak 20 saat daha aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler, oda sıcaklığında 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmişlerdir. Peletler %0.9 NaCl solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler yaş ağırlıkları eşit olacak şekilde 0.25, 0.5 ve 1 mM KH_2PO_4 içeren Minimal Besiyerine ekilmiş ve 30 °C'ta 350 rpm'de çalkalamalı olarak 5 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sırasında yarım saat ya da 1 saatlik aralıklarla 5'er ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler santrifüj edilerek, üst sıvı, fosfat alımı analizi için 4 °C'ta saklanmıştır.

Besiyerindeki fosfat miktarının belirlenmesi için, 5 ml 1/10-1/30 oranında sulandırılmış örnek üzerine 800 µl reaksiyon karışımı (5 N H₂SO₄ çözeltisinden 50 ml, 0.004 M potasyum antimonil tartarat çözeltisinden 5 ml, 0.03 M amonyum molibdat çözeltisinden 15 ml, 0.1 M askorbik asit çözeltisinden 30 ml) eklenmiştir. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 880 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değeri, farklı fosfat konsantrasyonları ile hazırlanmış standart eğri yardımıyla analiz edilerek üst sıvının fosfat içeriği hesaplanmıştır.

2.8. Rekombinant *S. coelicolor* Suşlarının Ağır Metal Dirençliliğinin Ölçülmesi

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan *S. coelicolor* suşlarıyla yaban suşun, farklı konsantrasyonlarda Cd ve Pb ağır metallerine toleransları karşılaştırılmıştır.

Besiyeri olarak fosfat konsantrasyonunun ayarlanabildiği R2YE zengin katı besiyeri seçilmiştir. Farklı fosfat konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerlerine, değişik konsantrasyonlarda Cd ve Pb eklenerek bakterilerin bu şartlarda üremeleri karşılaştırılmıştır.

Cd için; 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 µg/ml, Pb için; 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 2400, 3200, 6400 ve 7200 µg/ml konsantrasyonları seçilmiştir. Hiç fosfat eklenmemiş ya da 0.37 mM ve 1.85 mM KH₂PO₄ eklenen besiyerlerine, belirlenen konsantrasyonlarda Cd ve Pb eklenerek petri kaplarına dökülmüştür.

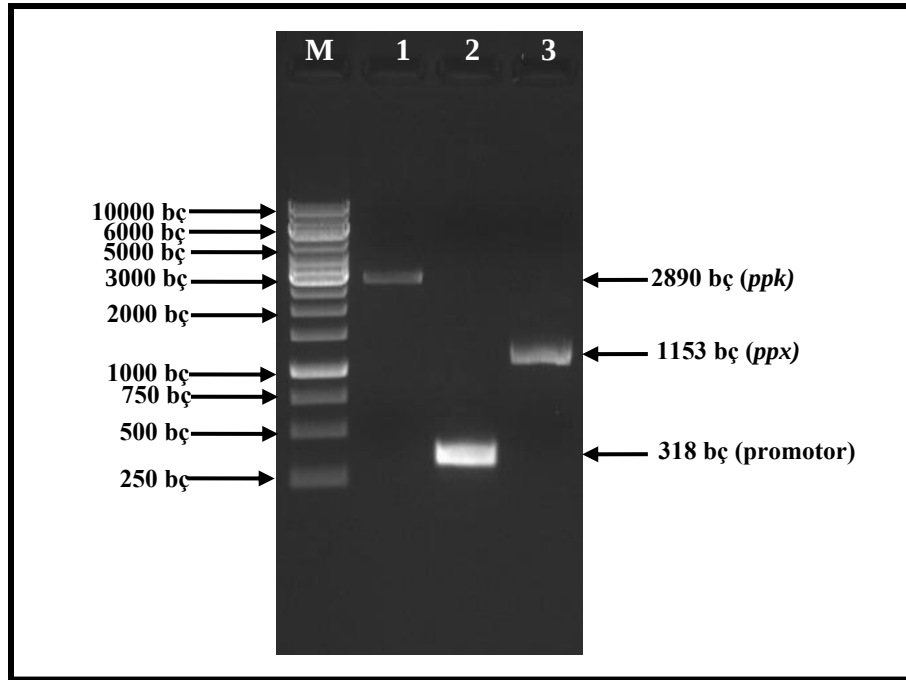
Petrilere, sıvı TSB besiyerinde her bir suşun 3 gün büyütülmüş kültürlerinden (eşit yaş ağırlıkta olacak şekilde) 50'şer µl yayılmıştır. Bakteriler 30 °C'ta 3 gün inkübe edilerek büyüme oranları karşılaştırılmıştır.

Pozitif kontrol olarak her bir suş, ağır metal içermeyen fakat farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında hazırlanmış R2YE besiyerlerine ekilmiştir. Rekombinant suşlar için besiyerine 50 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde tiyostrepton eklenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *ppk*, *ppx* Genleri ve *ppk* Promotor Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

S. coelicolor genom dizisi temel alınarak, *ppk* ve *ppx* genleri ile *ppk* geninin promotor bölgesi, her bir gene özgül tasarlanan ileri ve geri primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Farklı DNA polimeraz enzimleri ve tutunma sıcaklıkları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır (Tablo 2.2). *ppk* ve *ppx* genleri, Pfx DNA polimeraz enzimi ile, promotor bölgesi ise Phusion DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılmıştır. *ppk* geni için 65 °C, *ppx* geni için 59 °C ve promotor bölgesi için ise 65 °C tutunma sıcaklıkları uygulandığında özgül ampliconlar elde edilmiştir. PCR ürünlerinin büyüklükleri moleküler DNA belirteci ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve DNA fragmanları jelden saflaştırılmıştır (Şekil 3.1).

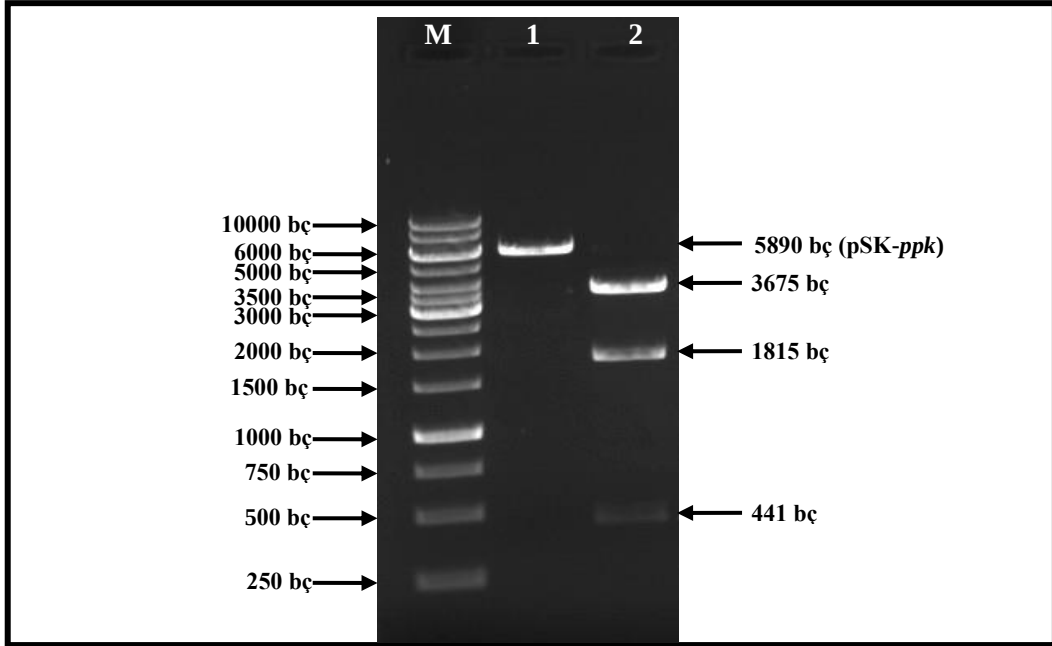


Şekil 3.1. Agaroze jelden saflaştırılan *ppk*, *ppx* ve *ppk* promotor bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroze jeldeki görünüşleri. M) 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1) *ppk* (2890 bp); 2) *ppx* (1153 bp) 3) promotor (318 bp).

3.2. *ppk*, *ppx* ve *ppk* Promotor Bölgesinin Klonlanması

3.2.1. *ppk* Geninin pBleuscript SK(-) Plazmidine Klonlanması

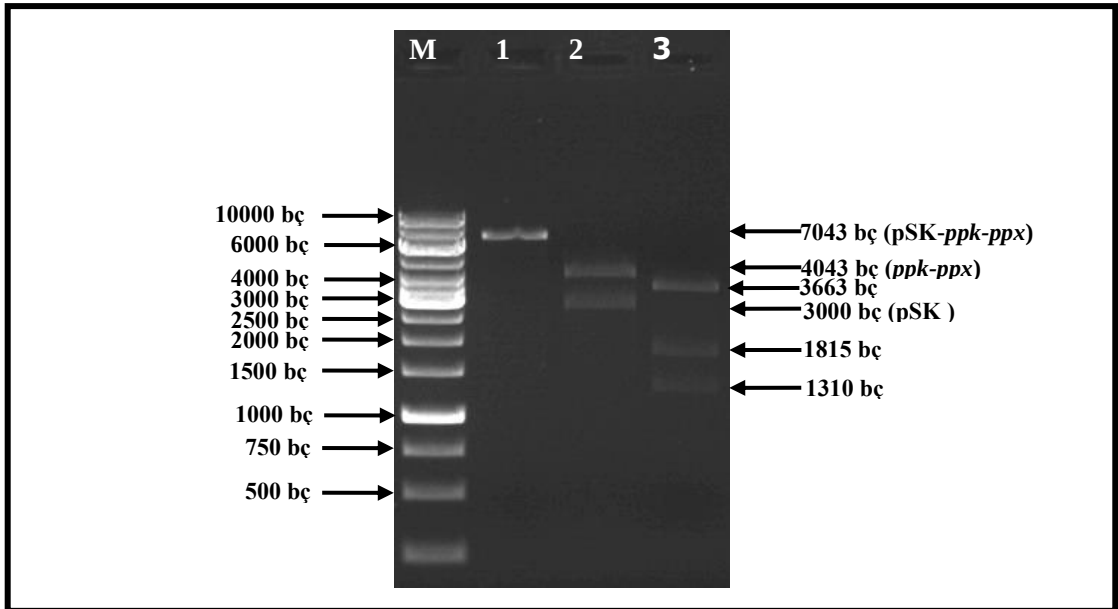
PCR ile çoğaltılan, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla *Pst*I ve *Bam*HI kesim bölgeleri bulunan *ppk* geni ve klonlama vektörü olarak seçilen pBleuscript SK(-) (3000 bç) plazmidi söz konusu enzimlerle kesilip birbirine ligasyon ile bağlanmıştır. Ligasyon ürünleri, *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Transformanlar mavi-beyaz koloni seçimi ile taranmıştır. Beyaz renkli olası rekombinant kolonilerden plazmitler izole edilmiş ve *Xho*I ile kesilerek hedef genleri içerdiği düşünülen rekombinant plazmit/ plazmidler elde edilmiştir. Bunların içinden bir tanesi seçilerek rekombinant plazmidin (pSK-*ppk*) doğruluğu *Bam*HI ve *Xho*I enzim kesimleriyle gösterilmiştir (Şekil 3.2). pSK-*ppk* plazmid DNA'sı sadece *Bam*HI ile kesildiğinde, agaroz jelde beklendiği gibi 5890 bç büyüklüğünde tek bir fragman görülürken, *ppk* geninin içinde 2 kesim bölgesi bulunan *Xho*I restriksiyon endonükleaz ile kesildiğinde beklenen 3675, 1815 ve 441 bç büyüklüğünde üç bant gözlenmiştir.



Şekil 3.2. pSK-*ppk* plazmidinin restriksiyon enzim kesim sonuçları. M) 1 kb'lık moleküler DNA belirteci; 1) pSK-*ppk* plazmidinin *Bam*HI ile kesimi (5890 bç); 2) pSK-*ppk* plazmidinin *Xho*I ile kesimi (yukarıdan aşağıya sırasıyla; 3675 bç, 1815 bç, 441 bç).

3.2.2. *ppx* Geninin pSK-*ppk* Plazmidine Klonlanması

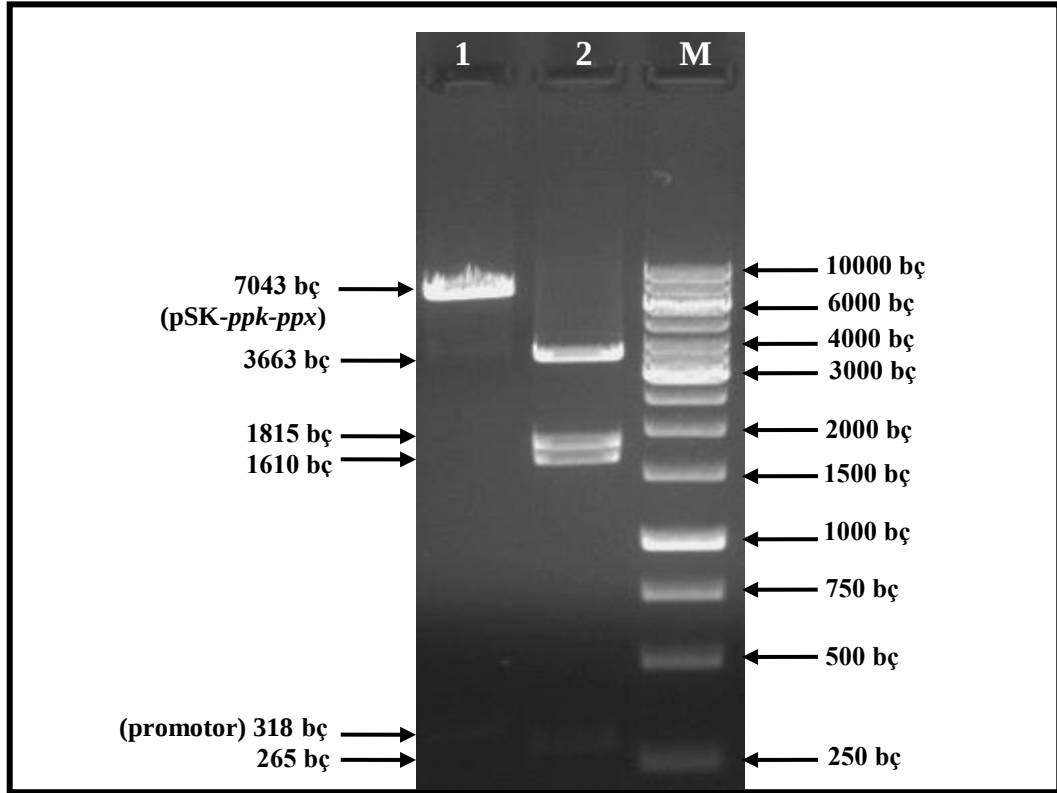
Restriksiyon enzim analizi ile doğrulanmış pSK-*ppk* plazmid, *EcoRI* ve *EcoRV* restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek agaroz jelden saflaştırılmıştır. Aynı enzimlerle kesilen ve jelden saflaştırılan *ppx* (1153 bp) geni, pSK-*ppk* plazmidine ligasyon ile bağlanmıştır. Ligasyon ürünleri, *E. coli* DH5a suşuna aktarıldıktan sonra, elde edilen transformanlardan izole edilen plazmitler arasında *ppx* geninin klonlandığı pütatif plazmitler, restriksiyon enzim kesimleri ile tespit edilmiş ve içlerinden bir tanesi seçilerek doğrulanmıştır (Şekil 3.3). *ppx* genini içerdiği düşünülen pSK-*ppk* rekombinant plazmit DNA'sı sadece *EcoRV* ile kesildiğinde agaroz jelde görülmesi beklenen bant yaklaşık 7043 bp büyüklüğünde iken, *XbaI*-*HindIII* restriksiyon endonükleazları ile kesildiğinde beklenen bantlar 3000 bp büyüklüğündeki pSK plazmid ve yaklaşık 4043 bp büyüklüğündeki *ppk-ppx* genlerine ait bantlardır. Rekombinant plazmid, *XhoI* ile kesildiğinde ise 3663, 1815, 1310 ve 265 bp büyüklüğüne karşılık gelen bantların görülmesi beklenmektedir. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi enzim kesimleri sonucunda görülmesi beklenen DNA fragmanları elde edilmiştir.



Şekil 3.3. pSK-*ppk-ppx* plazmidinin restriksiyon enzimleri kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları. M) 1 kb Moleküler DNA belirteci; 1) pSK-*ppk-ppx* plazmidinin *EcoRV* ile kesimi (7043 bp); 2) pSK-*ppk-ppx* plazmidinin *XbaI*-*HindIII* ile kesimi sonucu oluşan *ppk-ppx* (4043 bp) ve pSK (3000 bp) fragmanları; 3) pSK-*ppk-ppx* plazmidinin *XhoI* restriksiyon enzim kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya sırasıyla; 3663 bp, 1815 bp, 1310 bp).

3.2.3. *ppk* Promotor Bölgesinin pSK-*ppk-ppx* Plazmidine Klonlanması

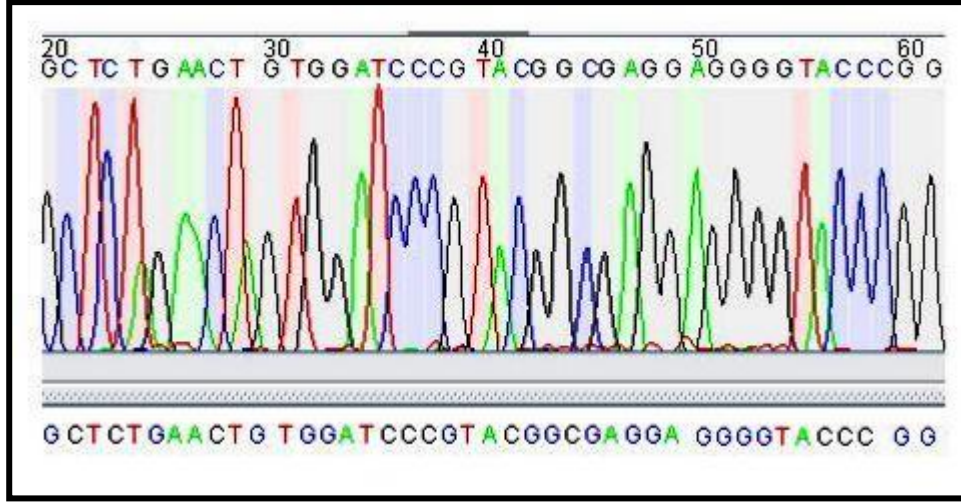
Rekombinant pSK-*ppk-ppx* plazmidinde bulunan *ppx* geninin önüne 318 bp büyüklüğündeki *ppk* promotor bölgesinin klonlanması için *ppk* promotor bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünü, *Pst*I-*Eco*RI ile kesilmiş ve aynı kesim bölgelerinden pSK-*ppk-ppx* plazmidine ligasyon ile bağlanmıştır. Ligasyon ürünleri *E. coli* DH5 α suşuna transformasyon ile aktarılmış ve elde edilen transformanlardan izole edilen rekombinant plazmitler bir dizi restriksiyon enzim analizi ile doğrulanmıştır. Promotor bölgesini içeren pSK-*ppk-ppxp* plazmidini *Pst*I-*Eco*RI ile kesildiğinde 7043 bp büyüklüğünde promotor bölgesini içermeyen pSK-*ppk-ppx* plazmidine ve 318 bp büyüklüğündeki promotor bölgesine eşdeğer iki bant görülmesi gerekmektedir. Rekombinant plazmit *ppk* ve *ppx* genlerinin içinde kesim bölgesi bulunan *Xho*I restriksiyon endonükleaz ile de kesilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda agaroz jelde yaklaşık 3663 bp, 1815 bp, 1610 bp ve 265 bp büyüklüğünde bantlar görülmesi gerekmektedir. Şekil 3.4'te görüldüğü üzere beklenen bantlar agaroz jelde gözlenmiş ve rekombinant plazmidin doğruluğu kanıtlanmıştır.



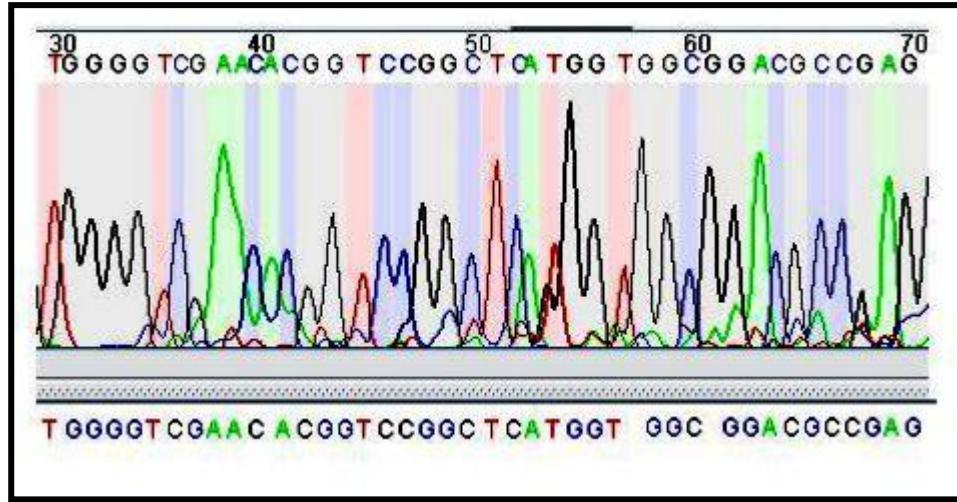
Şekil 3.4. pSK-*ppk-ppx* plazmidinin restriksiyon enzimleri kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları. 1) pSK-*ppk-ppx* plazmidinin *Pst*I ve *Eco*RI ile kesimi sonucu oluşan pSK-*ppk-ppx* (7043 bç) ve promotor (318 bç) fragmanları; 2) pSK-*ppk-ppx* plazmidinin *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya sırasıyla; 3663 bç, 1815 bç, 1610 bç ve 265 bç); M) 1 kb Moleküler DNA belirteci.

3.2.4. Klonlanan *ppk*, *ppx* Genleri ile *ppk* Promotor Bölgesinin Nükleotit Dizisinin Belirlenmesi

ppk geninin nükleotid dizisinin belirlenmesinde pBluescript SK (-) plazmit DNA'sında bulunan T3 ve T7 promotoruna uygun primerler kullanılırken, *ppx* geninin ve *ppk* promotor bölgesinin nükleotid dizilerinin belirlenmesinde genlere özgül ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Elde edilen dizilere ait kromotogram örnekleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir. Bu diziler NCBI veritabanındaki DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.5. *ppk* genine ait dizinin 20. ile 61. bazları arasında ait kromotogram.

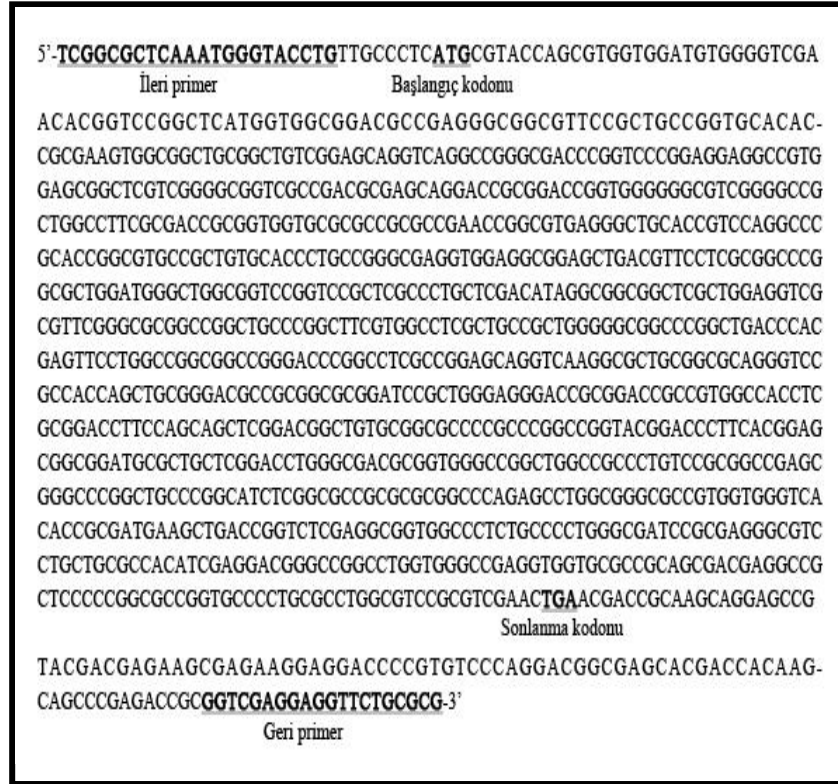


Şekil 3.6. *ppx* genine ait dizinin 30. ile 70. bazları arasında ait kromotogram.

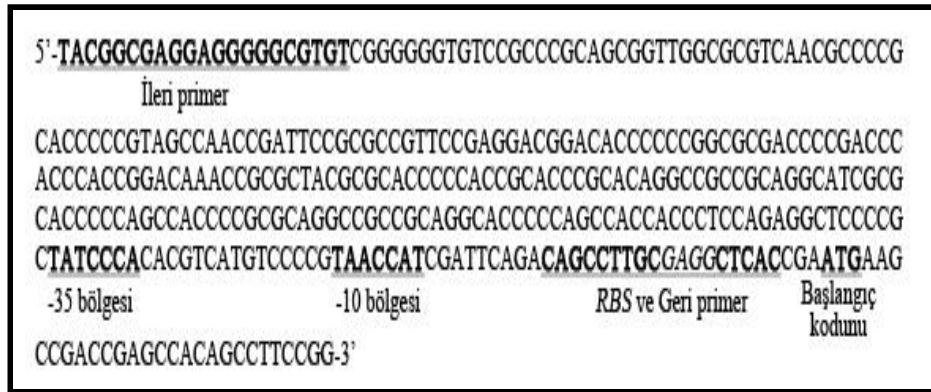
Klonlanan *ppk* ve *ppx* genlerine ait DNA dizilerinin daha önce Hopwood ve arkadaşları (2002) tarafından rapor edilen *S. coelicolor* A3(2) genomundaki (NCBI Gene Databank, NC_003888.3) *ppk* (GeneID: 1099585) ve *ppx* (GeneID: 1096180) gen dizilerine (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7) birebir uygunluk gösterdiği ortaya konmuştur.



Şekil 3.7. *S. coelicolor ppk* geninin DNA dizisi. Altı çizili ve koyu renkli yazılmış DNA dizileri 5'→3' yönüne doğru sırasıyla ileri primer, -35 bölgesi, -10 bölgesi, ribozom bağlanma bölgesi (RBS), başlangıç kodonu, sonlanma kodonu ve geri primer bölgelerini göstermektedir.



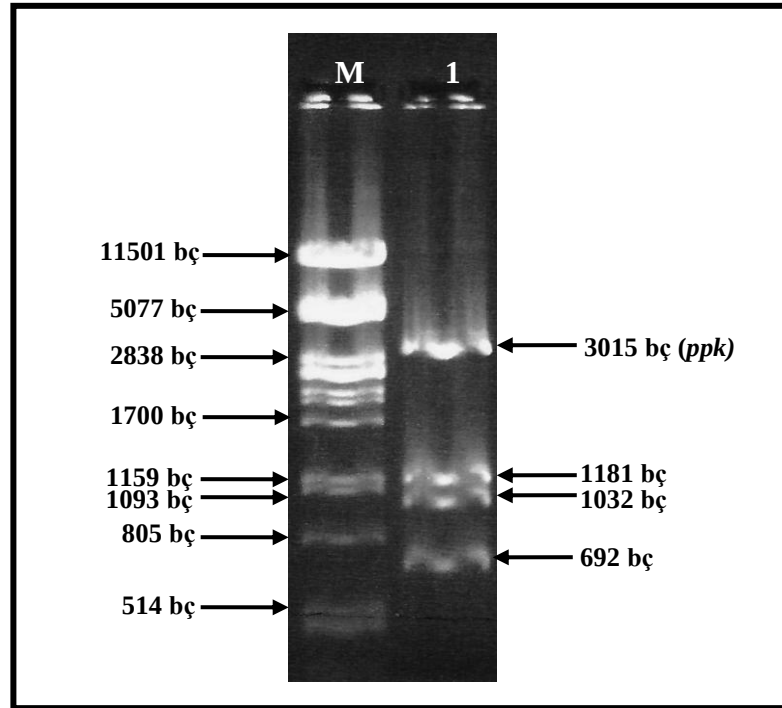
Şekil 3.8. *S. coelicolor*'ın *ppx* geninin DNA dizisi. Altı çizili ve koyu renkli diziler 5'→3' yönüne doğru sırasıyla ileri primer, başlangıç kodonu, sonlanma kodonu ve geri primer bölgelerini göstermektedir.



Şekil 3.9. *S. coelicolor*'ın *ppk* geni promotor bölgesinin DNA dizisi. Altı çizili ve koyu renkli yazılmış DNA dizileri 5'→3' yönüne doğru sırasıyla ileri primer, -35 bölgesi, -10 bölgesi, italik yazılmış bölge Ribozom bağlanma bölgesini (RBS), kalın ve altı çizili bölge geri primer ve başlangıç kodonunu göstermektedir.

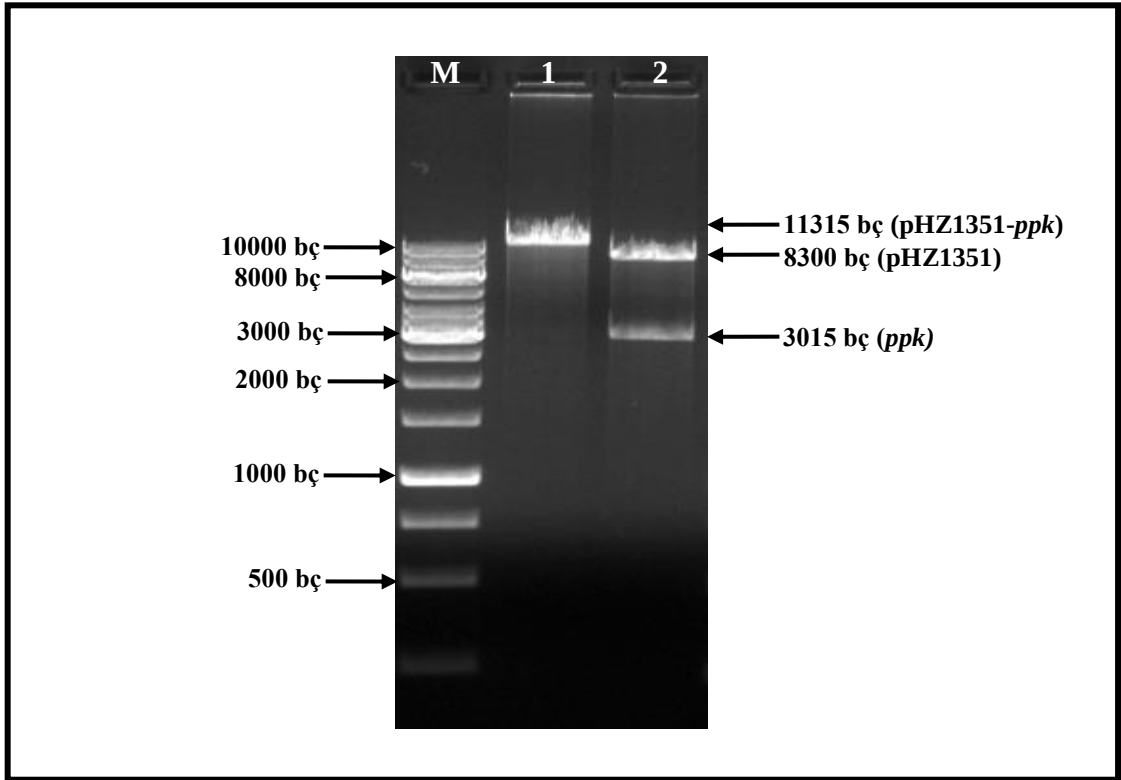
3.3. *ppk*, *ppx* Genleri İle Promotor Bölgesinin pHZ1351 Mekik Vektörüne Klonlanması

pSK-*ppk* ve pSK-*ppk-ppxp* rekombinant plazmitlerinden enzim kesimleri ile çıkarılan *ppk* ve *ppk-ppxp* genleri ayrı ayrı pHZ1351 vektörüne aşağıdaki anlatıldığı gibi klonlanmıştır. pBluescript SK(-) vektörünün ve *ppk* geninin aynı büyüklükte (~3000 bç) olması nedeniyle, *ppk* genini çıkarabilmek için pSK vektöründe 3 tane kesim bölgesi bulunan *Dra*I restriksiyon enzimi kullanılmıştır. *ppk* genini, pHZ1351 vektörünün (8300 bç) *Xba*I ve *Hind*III bölgesine klonlanmak için aynı kesim reaksiyonuna *Xba*I ve *Hind*III enzimleri de eklenmiştir. Bu kesim reaksiyonu sonucunda; *ppk* genine ait 3015 bç büyüklüğünde bir bant ve pSK vektörüne ait 1181, 1032, 692 ve 19 bç büyüklüğünde 4 bant görülmesi beklenmektedir. Şekil 3.8’de kesim sonucunda agaroz jelde beklenen DNA fragmanları görülmüştür. 3015 bç büyüklüğündeki *ppk* genine karşılık gelen bant agaroz jelden kesilerek saflaştırılmış ve *Xba*I-*Hind*III ile kesilmiş 8300 bç büyüklüğündeki pHZ1351 vektörüne ligasyon ile bağlanmıştır.



Şekil 3.10. *ppk* geninin pSK-*ppk* plazmidinden çıkarılması. M) Lambda DNA/*Pst*I Moleküler DNA belirteci; 1) pSK-*ppk* plazmidinin *Dra*I, *Xba*I ve *Hind*III ile kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya sırasıyla 3015 bç, 1181 bç, 1032 bç, 692 bç).

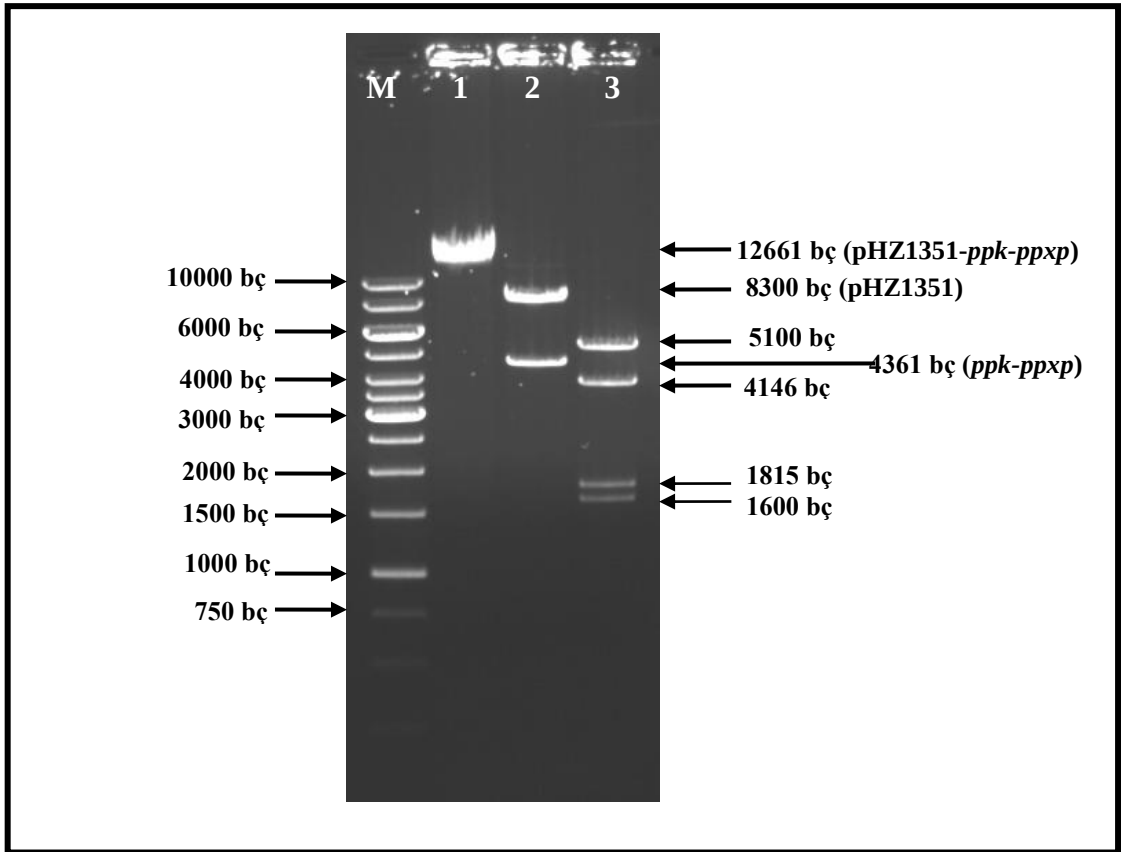
Ligasyon ürünleri *E. coli* DH5 α suşuna aktarılmış ve elde edilen transformanlardan olası rekombinant plazmitler izole edilmiştir. Bu plazmitlerden bir tanesi seçilerek doğruluğu, *Hind*III ve *Xba*I-*Hind*III kesimleriyle test edilmiştir. Rekombinant pHZ1351-*ppk* plazmidinin *Hind*III kesimi sonucunda, beklendiği gibi 11315 bç büyüklüğünde bir DNA fragmanı elde edilirken, *Xba*I-*Hind*III ikili enzim kesimi sonucunda 8300 bç'lik pHZ1351 vektörüne ve yaklaşık 3015 bç büyüklüğündeki *ppk* genine eşdeğer iki bant elde edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.11. pHZ1351-*ppk* plazmidinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları M) 1 kb Moleküler DNA Belirteci; 1) pHZ1351-*ppk* plazmidinin *Hind*III ile kesimi sonucu oluşan pHZ1351-*ppk* (11315 bç) fragmanı; 2) pHZ1351-*ppk* plazmidinin *Xba*I ve *Hind*III ile kesimi sonucu oluşan *ppk* (3015 bç), ve pHZ1351 (8300 bç) fragmanları.

pSK-*ppk-ppxp* plazmidinin *Xba*I-*Hind*III ile kesilmesiyle elde edilen yaklaşık 4361 bç büyüklüğündeki *ppk-ppx* ve promotörü içeren bant (*ppk-ppxp*) agaroz jelden saflaştırılmış ve aynı enzimler ile kesilen pHZ1351 vektörüne ligasyon ile bağlanmıştır. Ligasyon ürünlerinin *E. coli* DH5 α suşuna aktarılmasıyla elde edilen transformantlardan plazmit izolasyonu yapılmıştır. Olası rekombinant plazmitlerin doğruluğu restriksiyon enzim analizi ile belirlenmiştir.

Plazmidin *Hind*III ile kesilmesiyle agaroz jelde 12661 bç büyüklüğünde bir bant görülmesi beklenirken, *Xba*I-*Hind*III ile kesiminden, *ppk-ppxp* bölgesine ait 4361 bç ve pHZ1351 vektörüne ait 8300 bç büyüklüğünde bir bant beklenmektedir. Ayrıca plazmidin *Xho*I ile kesilmesi sonucu 5100, 4146, 1815 ve 1600 bç büyüklüğünde 4 bant görülmesi gerekmektedir. Şekil 3.10'da görüldüğü üzere kesim reaksiyonları sonucunda beklenen bantların elde edilmesiyle rekombinant plazmidin doğruluğu gösterilmiştir.

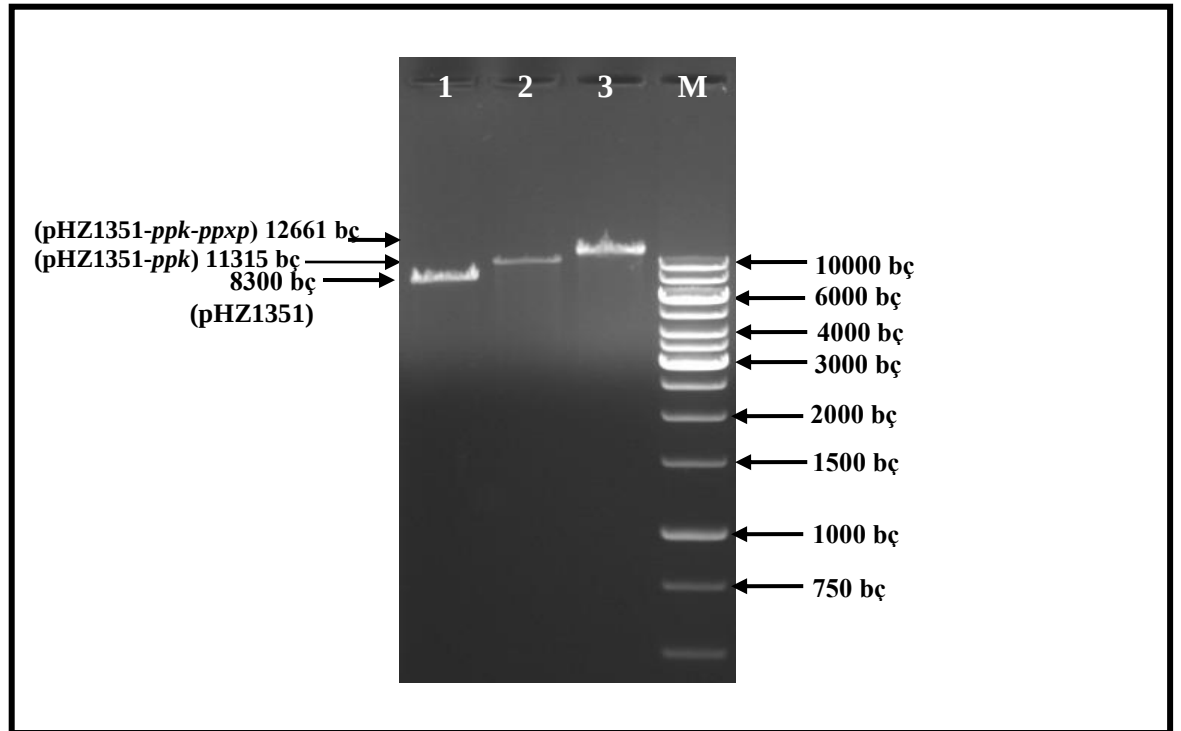


Şekil 3.12. pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları. M) 1 kb Moleküler DNA Belirteci; 1) pHZ1351-*ppk-ppx* plazmidinin *Hind*III ile kesimi sonucu oluşan doğrusal pHZ1351-*ppk-ppxp* (12661 bç) fragmanı; 2) pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidinin *Xba*I ve *Hind*III ile kesimi sonucu oluşan *ppk-ppxp* (4361 bç), ve pHZ1351 (8300 bç) fragmanları; 3) pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidinin *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla; 5100 bç, 4146 bç, 1815 bç, 1600 bç).

3.4. *E. coli*-*Streptomyces* Mekik Vektörü pHZ1351'e Klonlanan Genlerin *S. coelicolor*'a Aktarılması

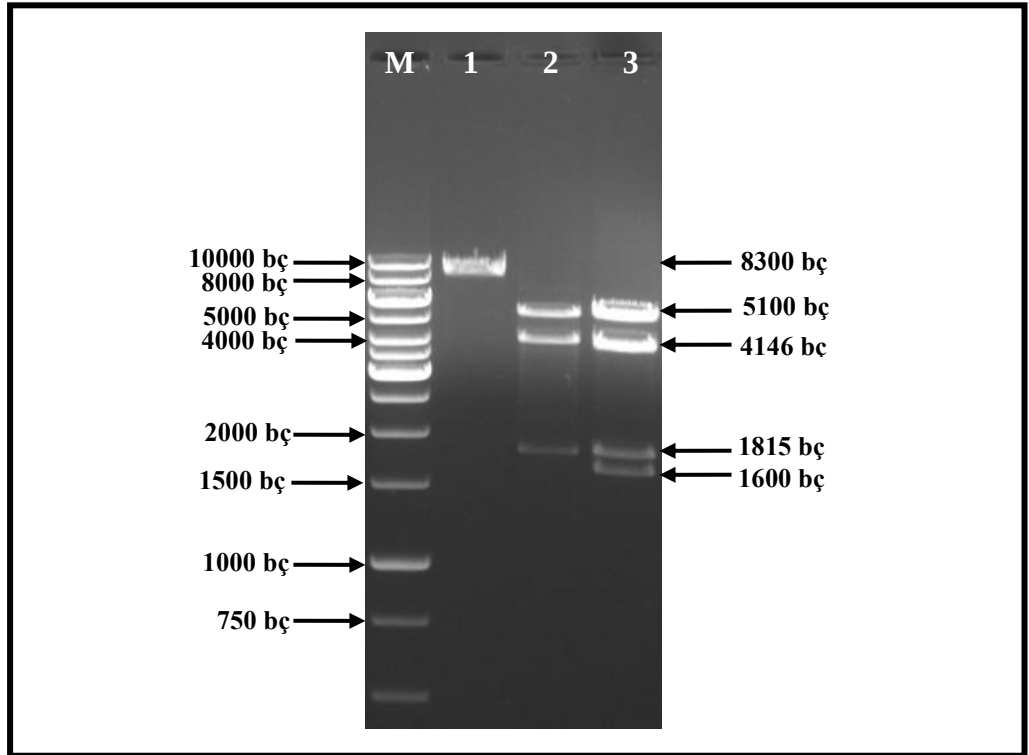
Plazmidlerin, çok güçlü bir restriksiyon sistemi olan *S. coelicolor*'a aktarılabilmesi metilasyon yoksunu bir ara konakçıyla mümkündür. Elde edilen pHZ1351 rekombinant plazmit DNA'larının *S. coelicolor*'a aktarılmasında ara konakçı olarak metilasyon yoksunu *E.coli* ET12567 suşu kullanılmıştır.

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitleri ve pHZ1351 vektörü transformasyon ile *E. coli* ET12567 suşuna aktarılmış ve elde edilen transformanlardan plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerin *Hind*III ile kesimleri sonucunda beklenen 11315 bç'lik pHZ1351-*ppk* fragmanı, 12661 bç'lik pHZ1351-*ppk-ppxp* fragmanı ve 8300 bç'lik pHZ1351 fragmanı elde edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.13. *E.coli* ET125672'den izole edilen pHZ1351, pHZ1351-*ppk*, pHZ1351-*ppk-ppx* plazmidlerinin *Hind*III ile kesimi oluşan DNA fragmanları. 1) pHZ1351 (8300 bç) fragmanı; 2) pHZ1351-*ppk* (11315 bç) fragmanı; 3) pHZ1351-*ppk-ppxp* (12661 bç) fragmanı.

E. coli ET12567 suşundan izole edilen pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmit DNA'ları ve pHZ1351 vektörü, protoplast transformasyonu ile *S. coelicolor*'a aktarılmıştır. Elde edilen *S. coelicolor* transformanlardan plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmidlerin doğruluğu *Xho*I restriksiyon enzim kesimiyle gösterilmiştir. Beklenildiği gibi, pHZ1351'in kesimi sonucunda 8300 bç'lik fragmanı, pHZ1351-*ppk* plazmidinin kesimi sonucunda 5100 bç, 4146 bç ve 1815 bç fragmanları, pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidinin kesimi sonucunda 5100 bç, 4146 bç, 1815 bç ve 1610 bç büyüklüğünde DNA fragmanları elde edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.14. *S. coelicolor*'dan izole edilen pHZ1351, pHZ1351-*ppk*, pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerinin *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA fragmanları. M) 1 kb Moleküler DNA Belirteci; 1) pHZ1351 (8300 bç) *Xho*I fragmanı; 2) pHZ1351-*ppk* plazmidinin *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya sırasıyla; 5500 bç, 4000 bç, 1815 bç); 3) pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidinin *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantlar (yukarıdan aşağıya sırasıyla; 5100 bç, 4146 bç, 1815 bç ve 1600 bç).

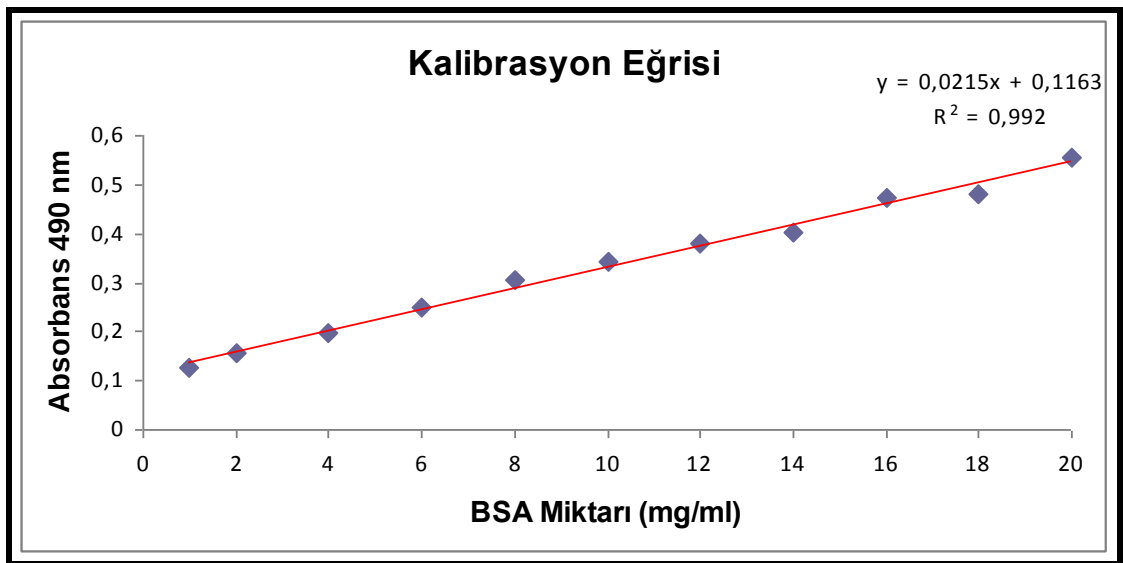
3.5. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

3.5.1. Rekombinant *E. coli* Suşlarında PPK ve PPX Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

pBluescript SK(-) plazmidine klonlanan *ppk* ve *ppx* genlerinin aktif bir şekilde ifade edilip edilmediğinin anlaşılması için PPK, PPX enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür.

Enzim aktivitesi ölçümlerinde, pSK-*ppk* ve pSK-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan rekombinant *E. coli* DH5α suşları ile negatif kontrol olarak plazmit taşımayan *E. coli* DH5α suşundan elde edilen hücre özütleri ya doğrudan ya da amonyum sülfat çöktürmesi uygulandıktan sonra (%35-60) kullanılmıştır. Genlerin *lac* promotorundan ifadelerinin gerçekleşmesi beklendiğinden, promotor IPTG ile uyarılmıştır.

Enzim ölçümleri hücre özütlerinin hem peletleri hem de üst sıvıları kullanılarak yapılmıştır. BSA proteininin değişik konsantrasyonlarıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.15. 1-20 µg/ml protein içeren BSA solüsyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

PPK aktivitesi ölçümlerinde rekombinant plazmitleri taşıyan klonlar ile kontrol grubu arasında bir fark gözlenmemiştir (Tablo 3.1). PPX aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan yöntem ile anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Hem PPK hem de PPX enzim ölçümlerinin tekrarlandığı deneylerde yine aynı sonuçlar elde edilmiştir.

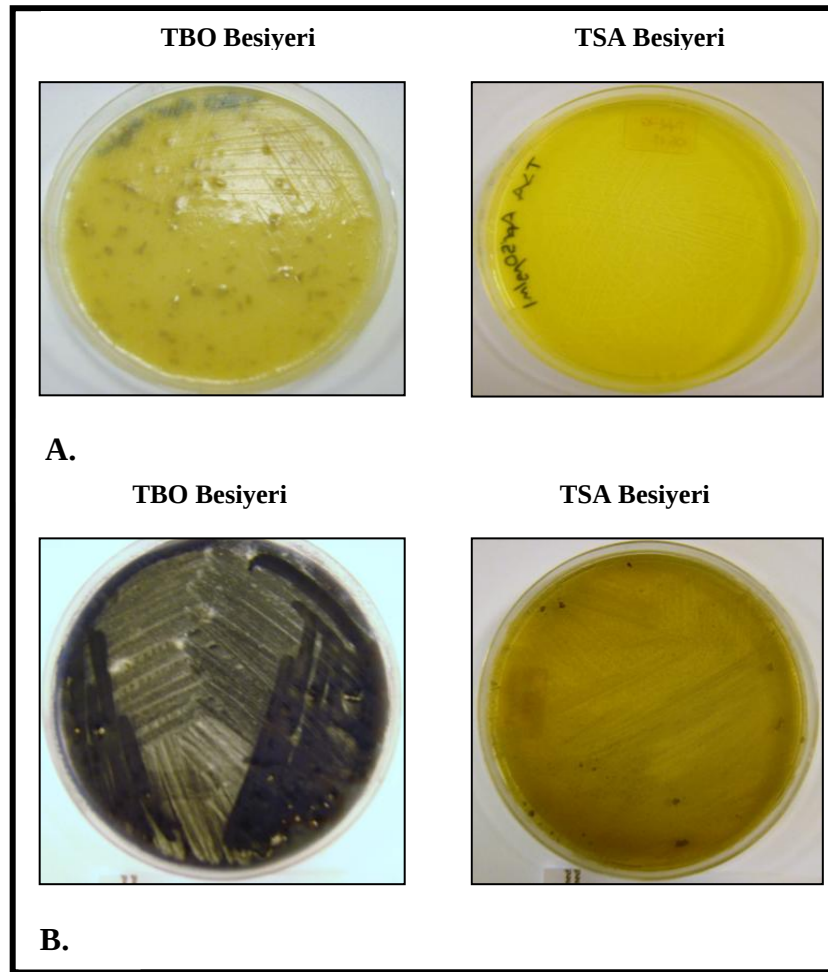
Tablo 3.1. Üst sıvıda ölçülen PPK aktivitesi sonuçları

Örnek	Absorbans (540 nm) PPK Aktivitesi	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (Abs./mg)
DH5 α	0.895	3.2	0.120
DH5 α + pSK (-)	0.966	3.3	0.118
DH5 α + <i>ppk</i>	1.00	4.4	0.110
DH5 α + <i>ppk-ppxp</i>	0.918	3.5	0.103

3.5.2. Rekombinant *S. coelicolor* Suşlarında PPK ve PPX Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

pSK-*ppk* ve pSK-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan *E. coli* DH5 α suşlarında enzim aktivitesi belirlenemediğinden rekombinant *S. coelicolor* ve yaban tip suşlarından elde edilen hücre özütlerinde PPK ve PPX aktivitesinin irdelenmesine karar verilmiştir. Ancak, rekombinant suşlardaki PPK aktivitesi yaban tipinki ile karşılaştırıldığında yine herhangi bir fark gözlenmemiştir. Suşların PPX aktivitesi ölçümlerinden ise bir sonuç alınamamıştır. Hem *E. coli* hem de *Streptomyces* hücre özütleriyle yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinden anlamlı sonuçlar alınamadığından, enzim aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan yöntemin uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

ppk geninin ifade edilip edilemediğinin belirlenebilmesi için laboratuvarımızda oluşturulan *ppk* geninden yoksun *S. coelicolor* suşundan yararlanılmıştır. *ppk* geninden yoksun *S. coelicolor* suşu sadece zengin besiyerinde üreyebilirken TBO ve TSA besiyerinde üreyememektedir (Şekil 3.14.A). Bu tez çalışmasında oluşturulan pHZ1351-*ppk* plazmidi, *ppk* geninden yoksun mutant suşa aktarıldığında mutasyonun komplementasyonunu sağlayarak suşun mutant özelliklerini giderebilmiştir (Şekil 3.14.B). Ayrıca aynı çalışmada, *ppk* mutant suşa, katı besiyerinde gözlenen antibiyotik üretimindeki artışın, pHZ1351-*ppk* plazmidinin mutant suşa aktarılması ile normal seviyeye indiği de gösterilmiştir (Yalım, 2010). Bu sonuçlardan yola çıkılarak, bu tez çalışmasında elde edilen pHZ1351 plazmidinin taşıdığı *ppk* geninin aktif bir şekilde ifade edildiği önerilmiş ve rekombinant *S. coelicolor* suşlarının karakterizasyonuna devam edilmesine karar verilmiştir.



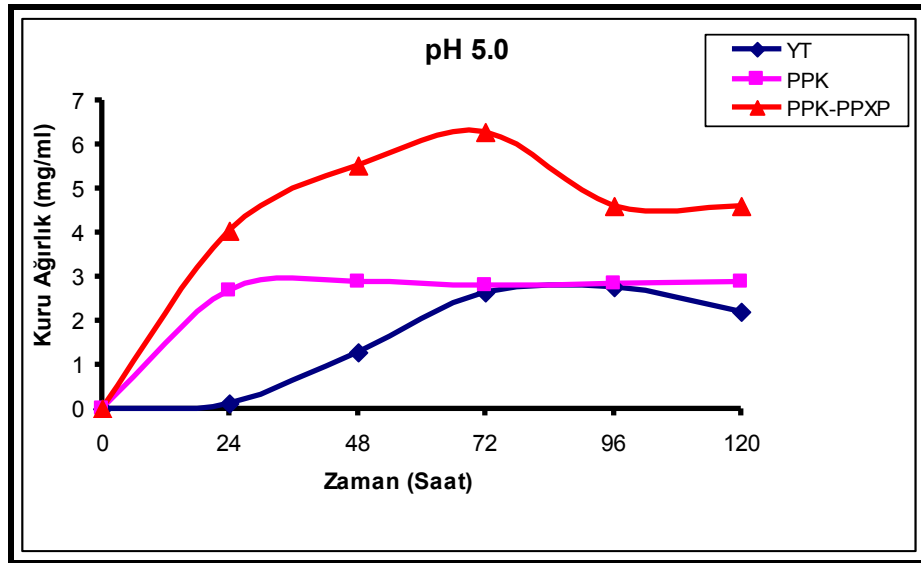
Şekil 3.16. A. Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu. **B.** pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan Δppk suşun TBO ve TSA katı besiyerlerinde üreme durumu (Yalım, 2010).

3.6. Rekombinant *S. coelicolor* Suşlarının Farklı Stres Koşullarına Dirençliliğinin Belirlenmesi

3.6.1. pH Dirençliliği

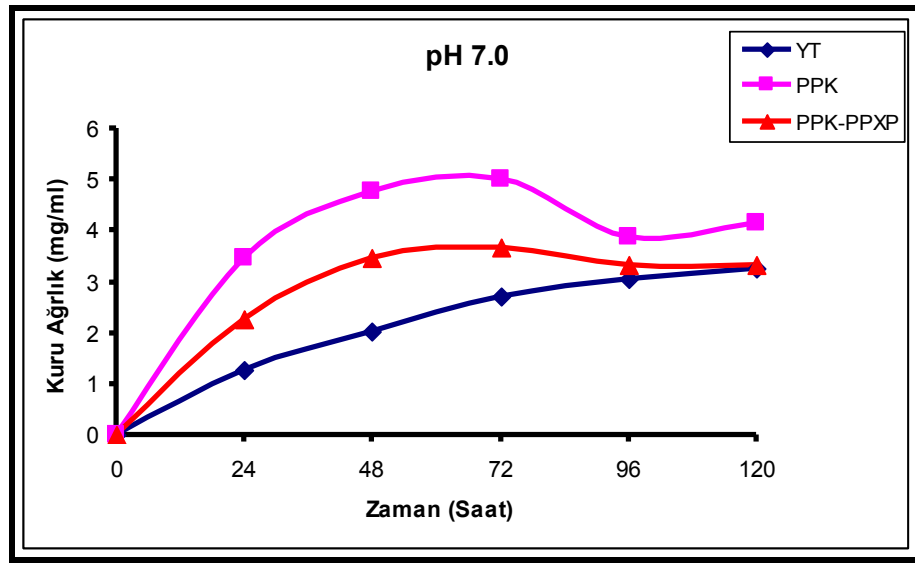
ppk genini ve *ppk-ppxp* genlerini birlikte yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen *S. coelicolor* rekombinant suşları ile yaban tipin farklı pH derecelerindeki büyüme eğrilerini karşılaştırmak için hücreler, pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0 olacak şekilde ayarlanmış sıvı R2YE besiyerinde 5 gün boyunca üretilmişlerdir. Her 24 saatte bir alınan örneklerin kuru ağırlıklarına göre suşların büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 3.15; Şekil 3.16; Şekil 3.17).

Rekombinant suşların asidik ortamda (pH 5.0) üremeleri yaban suşun üremesiyle karşılaştırıldığında; pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşun, yaban tipe göre 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu ve bu pH derecesine diğer suşlardan daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suşun aynı besiyeri koşullarında üremesi ise yaban suşunki ile hemen hemen aynıdır. Ayrıca, yaban tip 72. saatte durağan faz girerken pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suş 48. saatte durağan faza girmiştir. pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suşun ise 24. saatte durağan faza girdiği gözlenmiştir (Şekil 3.15).



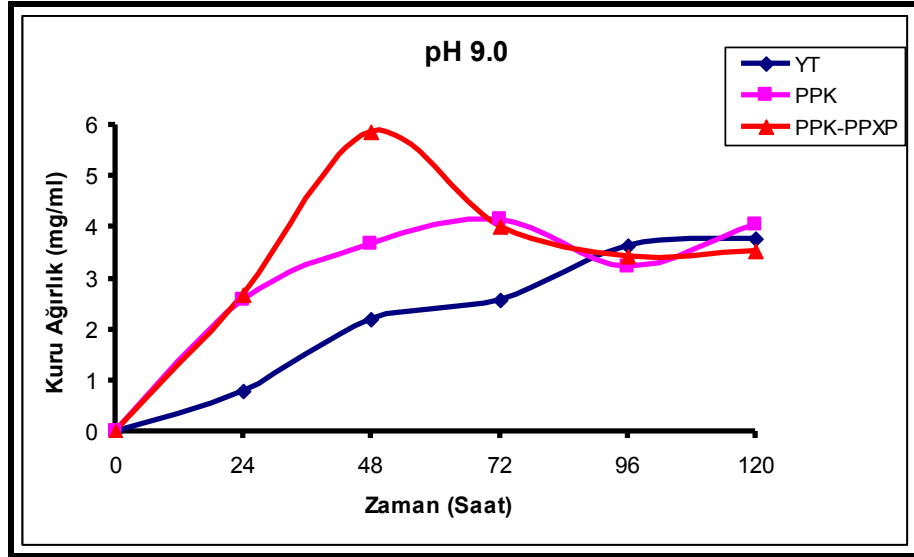
Şekil 3.17. R2YE besiyerinde (pH 5.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

S. coelicolor için optimum pH değeri olan pH 7.0'de, yaban tip ve rekombinant suşların R2YE besiyerinde 72. saatte durağan faza girdikleri görülmüştür. Bunun yanında, 72. saate kadar, *ppk* genini yüksek seviyede ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun kuru ağırlık miktarının yaban tipin kuru ağırlık miktarından yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte yüksek oranda ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun ilk 72 saatteki kuru ağırlık miktarı yaban tipin kuru ağırlık miktarından yaklaşık 2 kat daha fazladır. Aynı suşun 96. saatten itibaren ölüm fazına girerek kuru ağırlığının yaban tipinki ile hemen hemen eşitlendiği gözlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.18. R2YE besiyerinde (pH 7.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

Yaban ve rekombinant suşların bazik ortamdaki büyüme eğrileri pH 9.0'a ayarlanmış R2YE besiyerinde karşılaştırmıştır. *ppk* ve *ppx* geninin birlikte ifade edildiği suşun, yaban tip ve *ppk*'yı yüksek oranda ifade eden suşa göre daha yoğun ürettiği gözlenmiştir. Ayrıca, *ppk* genini fazla ifade ettiği düşünülen suşun da aynı koşullarda yaban tipe göre bazik ortama daha dirençli olduğu gözlenmiştir. *ppk* ve *ppx* geninin birlikte ifade edildiği suşun, 48. saatte yaban tipe göre 3 kat ve pHZ1351-*ppk* suşuna göre ise 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. *ppk* geninin yüksek miktarda ifade edildiği suşun da, 48. saatte yaban tipe göre 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu pH derecesinde, üç suşun da 72. saatte durağan faza girdiği gözlenmiştir (Şekil 3.17).

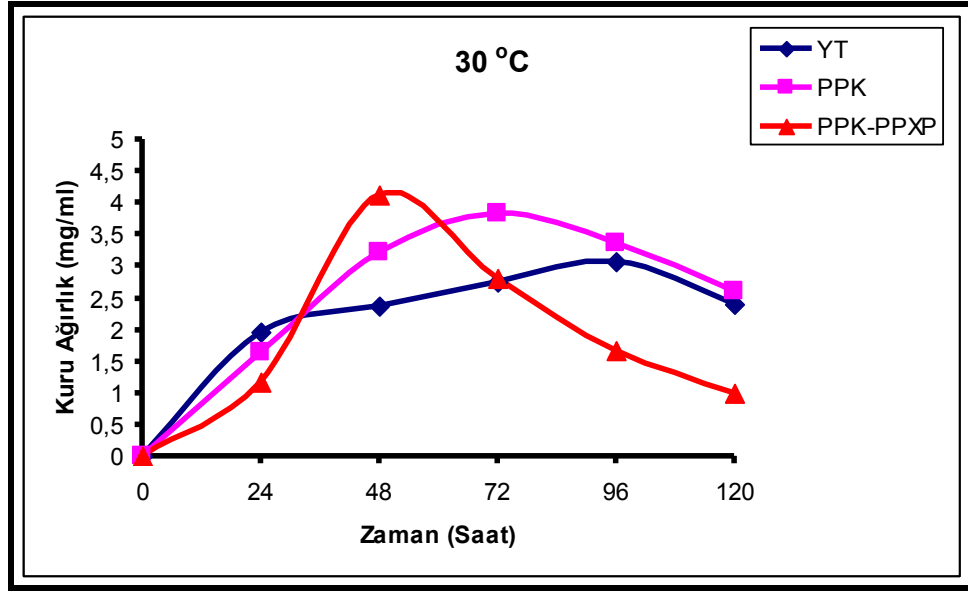


Şekil 3.19. R2YE besiyerinde (pH 9.0) üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

3.6.2. Sıcaklık Dirençliliği

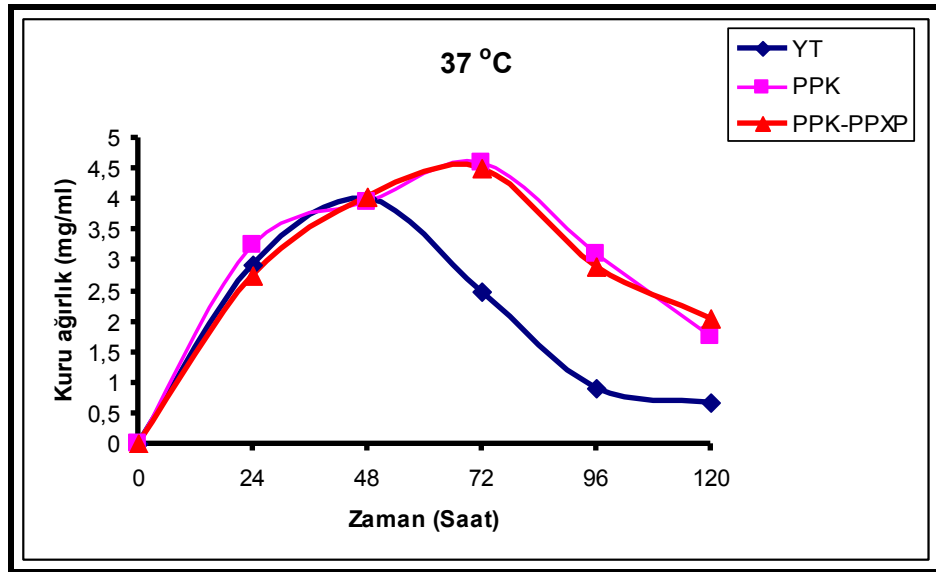
pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerini taşıyan rekombinant *S. coelicolor* suşlarının farklı sıcaklık derecelerindeki büyüme eğrileri yaban tipin büyüme eğrisi ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, 30 °C, 37 °C ve 42 °C’te büyütülen bakterilerden 5 gün boyunca 24 saatte bir örnek alınarak, örneklerin kuru ağırlıklarına göre büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 3.18; Şekil 3.19; Şekil 3.20).

Yaban tip *S. coelicolor*’ın optimum büyüme sıcaklığı olan 30 °C’te büyütülen rekombinant suşların büyüme eğrileri yaban tipinki ile karşılaştırıldığında, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suş ile yaban tipin 72. saatten sonra durağan faza geçtiği görülmüştür. pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerin ise 48. saatten sonra kısa bir durağan fazda kaldığı ardından hücrelerin hızla ölüm fazına geçtiği görülmüştür. Ayrıca pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suş ile pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşun 48. saatte yaban suşa göre sırasıyla yaklaşık 1 ve 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. *ppk* genini yüksek miktarda ifade eden suşun kuru ağırlığının 72. saatte de yaban suşunkinden 1 kat fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.18).



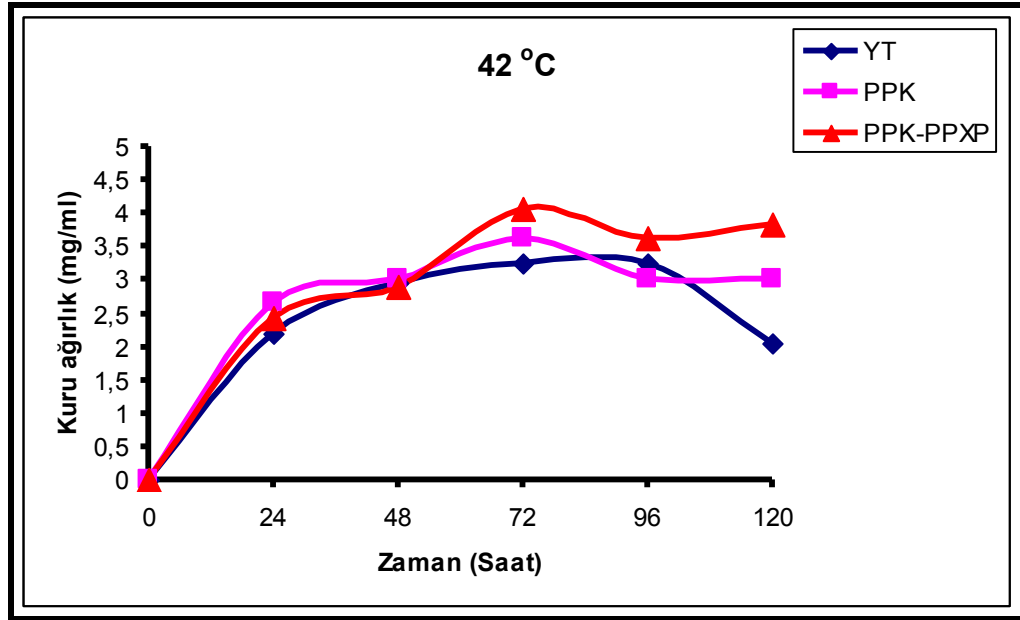
Şekil 3.20. 30 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

Yaban ve rekombinant suşların 37 °C'ta büyütülmesi sonucu elde edilen büyüme eğrilerinde 72. saate kadar fark görülmezken 72. saatte rekombinant suşların yaban tipe göre yaklaşık 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip oldukları ve bu sıcaklık derecesine daha dirençli oldukları görülmüştür. Bununla birlikte yaban tipin ölüm fazı 48. saatte başlarken, rekombinant suşların 48. saatte durağan faza yeni girdikleri ve ancak 72.saatten sonra ölüm fazına geçtiği görülmüştür (Şekil 3.19).



Şekil 3.21. 37 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

42 °C'ta büyütülen rekombinant suşların ve yaban tipin büyüme eğrileri karşılaştırıldığında, hücrelerin kuru ağırlıklarında çok büyük bir fark olmadığı, ancak rekombinant suşların durağan fazının 120. saatte hala devam ettiği görülürken yaban tipin 96. saatten sonra ölüm fazına geçtiği görülmüştür (Şekil 3.20).

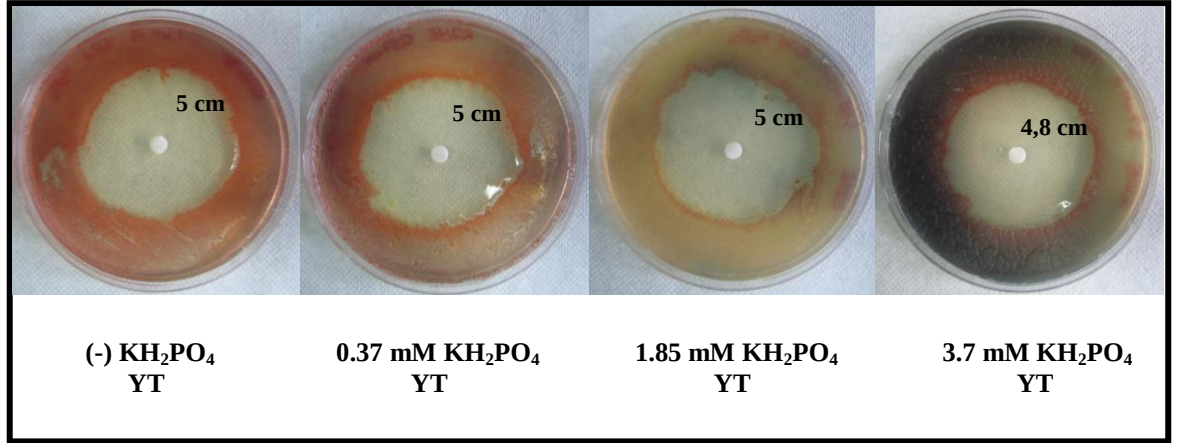


Şekil 3.22. 42 °C'ta üretilen hücrelerin kuru ağırlıklarına (mg/ml) göre oluşturulan büyüme eğrisi.

3.6.3. H₂O₂ Dirençliliği

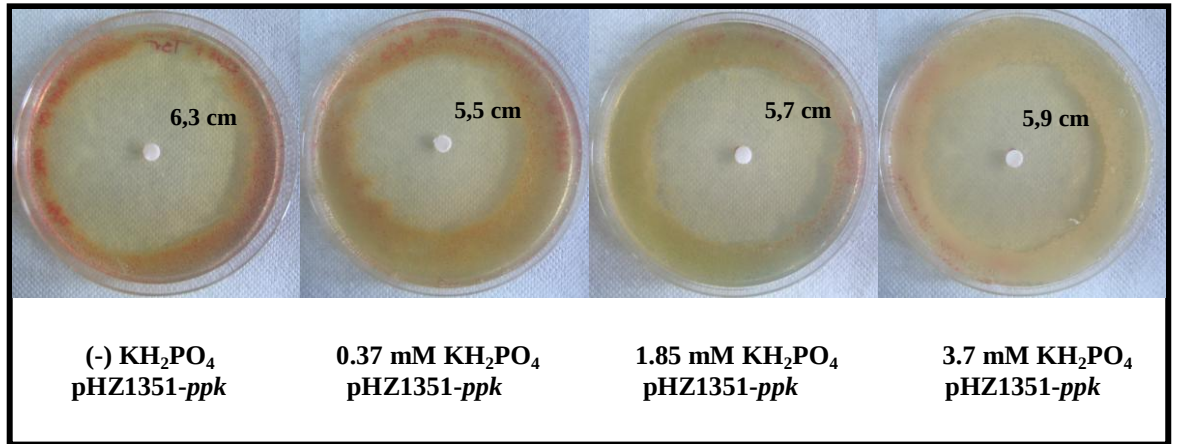
Rekombinant suşların ve yaban tipin oksidatif strese karşı dayanıklılıklarının karşılaştırılması, farklı KH₂PO₄ konsantrasyonlarında hazırlanmış R2YE zengin besiyeri içeren petrilerin ortasına 10 µl 100 mM H₂O₂ emdirilmiş Whatman kağıdından hazırlanmış steril diskler yerleştirilerek yapılmıştır. İnkübasyondan sonra disk etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.

KH₂PO₄ içermeyen ve 0.37 mM ile 1.85 mM KH₂PO₄ içeren besiyerlerinde, yaban suşun H₂O₂'ye hassasiyeti değişmezken, 3.7 mM KH₂PO₄ içeren besiyerinde inhibisyon halkasının çok az küçüldüğü yani bu fosfat konsantrasyonunda yaban tipin oksidatif strese daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Şekil 3.21).



Şekil 3.23. Yaban tip *S. coelicolor*'ın farklı KH₂PO₄ konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde H₂O₂'ye dirençliliğinin ölçümü.

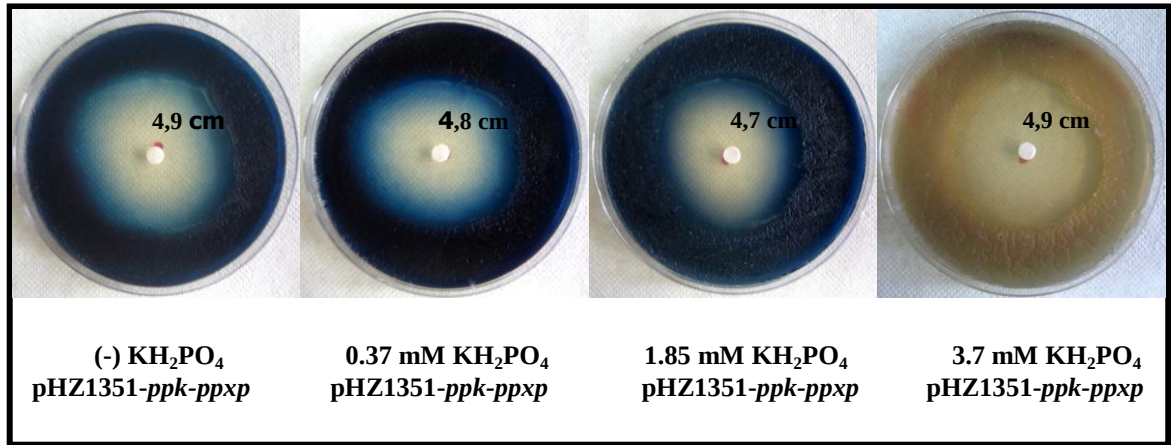
ppk genini çok miktarda ifade ettiği düşünülen rekombinant *S. coelicolor* suşunda, besiyerine KH₂PO₄ eklenmediğinde inhibisyon halkasının yaban tipe göre oldukça arttığı gözlenmiştir. Diğer KH₂PO₄ konsantrasyonlarında da yaban tipe göre inhibisyon halkasının çapının daha büyük olduğu görülmüştür. KH₂PO₄ içermeyen besiyerinde bu suşun oksidatif strese oldukça hassas olması dikkat çekicidir (Şekil 3.22).



Şekil 3.24. pHZ1351-*ppk* plazmidini içeren rekombinant *S. coelicolor* suşunun farklı KH₂PO₄ konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde H₂O₂'ye dirençliliğinin ölçümü.

pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan ve *ppk* ile *ppx* genini birlikte daha fazla ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun H₂O₂ inhibisyon halkalarının ölçümleri Şekil 3.21'de görülmektedir.

Bu suşun oksidatif strese direnci ile yaban tipin aynı strese direnci arasında çok fark yoktur. Ancak bu suşun KH_2PO_4 içermeyen ve 0.37 mM ile 1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde çok yüksek miktarda antibiyotik ürettiği görülmektedir (Şekil 3.23).



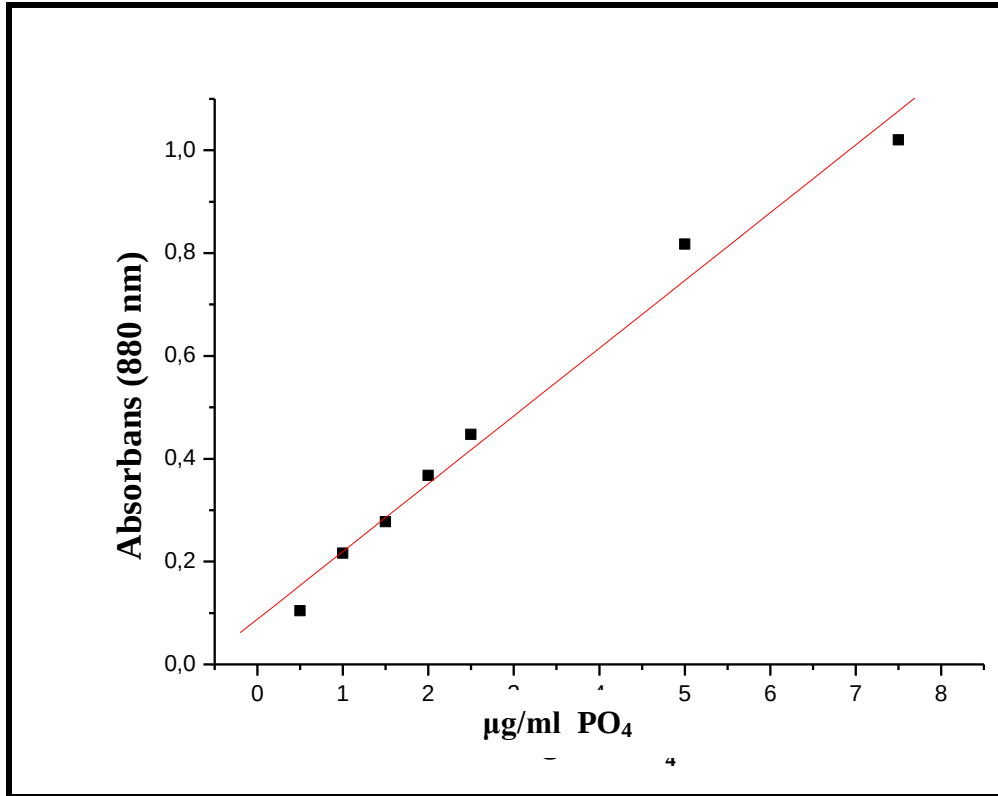
Şekil 3.25. pHZ1351-ppk-ppxp plazmidini içeren rekombinant *S. coelicolor* suşunun farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları içeren R2YE besiyerinde H_2O_2 'ye dirençliliğinin ölçümü.

3.7. Fosfat Alımının Ölçülmesi

Fosfat alımının ölçümü için kullanılan yöntem, bakterinin üretildiği besiyerinden hücre içine taşıdığı fosfat miktarına bağlı olarak besiyerinde geriye kalan fosfat miktarının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Öncelikle yaban tip ve rekombinant *S. coelicolor* suşları yaklaşık 10^6 spor olacak şekilde 1.85 mM KH_2PO_4 içeren YEME besiyerine ekilmiş ve 5 gün boyunca üretilerek her 24 saatte bir örnek alınmıştır. Örneklerin santrifüjlenmesi ile elde edilen üst sıvıda bulunan PO_4 miktarı Ohtake ve arkadaşlarının (1985) yöntemi ile belirlenmiştir.

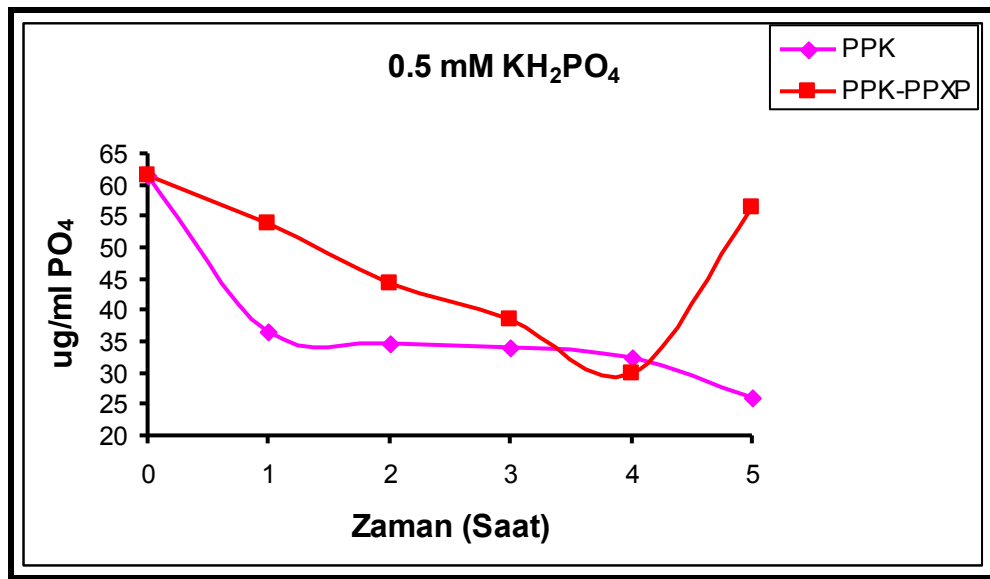
Yaban ve rekombinant suşlarının YEME besiyerinden fosfat uzaklaştırmaları arasında belirgin bir fark görülmemiştir (veriler gösterilmemiştir). Elde edilen sonuçlar, içerdiği fosfat miktarı tam olarak bilinmeyen YEME besiyerinin, fosfat alımı tayininde kullanılması için uygun bir besiyeri olmadığını göstermiştir.

Bunun üzerine hücrelerin, içerisindeki fosfat miktarının bilindiği ve ayarlanabildiği minimal besiyerinde büyütülmesine karar verilmiştir. Bu amaçla öncelikle YED besiyerinde ön kültür olarak yüksek miktarda üretilen yaban tip ve rekombinant suşlar, % 0.9'luk NaCl ile iki kez yıkanarak eşit yaş ağırlıkta olacak şekilde, ayrı ayrı 0.25 mM, 0.5 mM ve 1 mM KH_2PO_4 içeren minimal besiyerlerine ekilmişlerdir. Kùltürlerin 6. ve 24. saatte örnekleri alınarak üst sıvılarında bulunan fosfat miktarı ölçülmüştür. Yaban tip ve rekombinant suşların 24. saatte üst sıvıda bulunan fosfat miktarları 6. saatte bulunan fosfat miktarlarından oldukça fazla çıktığından hücrelerin bu minimal besiyerinde üreyemedikleri ve 24. saatte lizise uğramaya başladıkları sonucuna varılmıştır. Bunun üzerine hücreler tekrar aynı miktarlarda KH_2PO_4 içeren minimal besiyerlerine ekilmiş ve bu defa ilk 5 saat boyunca saatte bir örnek alınarak üst sıvıdaki fosfat miktarları ölçülmüştür. Şekil 3.24'de farklı miktarlarda PO_4 içeren standart fosfat solüsyonları ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi görölmektedir.



Şekil 3.26. 0.5-7.5 $\mu\text{g/ml PO}_4$ içeren standart solüsyonlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Örneklerin üst sıvılarındaki fosfat miktarının, besiyerinin başlangıç fosfat miktarı ile karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlara göre 0.5 mM KH_2PO_4 konsantrasyonunda hücrelerin fosfat alımını düzenli bir şekilde gerçekleştirmekte oldukları gözlenmiştir. Şekil 3.25’de pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerini taşıyan rekombinant suşlardan alınan örneklerin üst sıvılarındaki 1/10 oranında seyreltilerek yapılan ölçüm sonuçları görülmektedir. Deney sırasında yaban tipe ait kültür kaybedildiğinden rekombinant suşlar yaban tip ile karşılaştırılamamıştır.

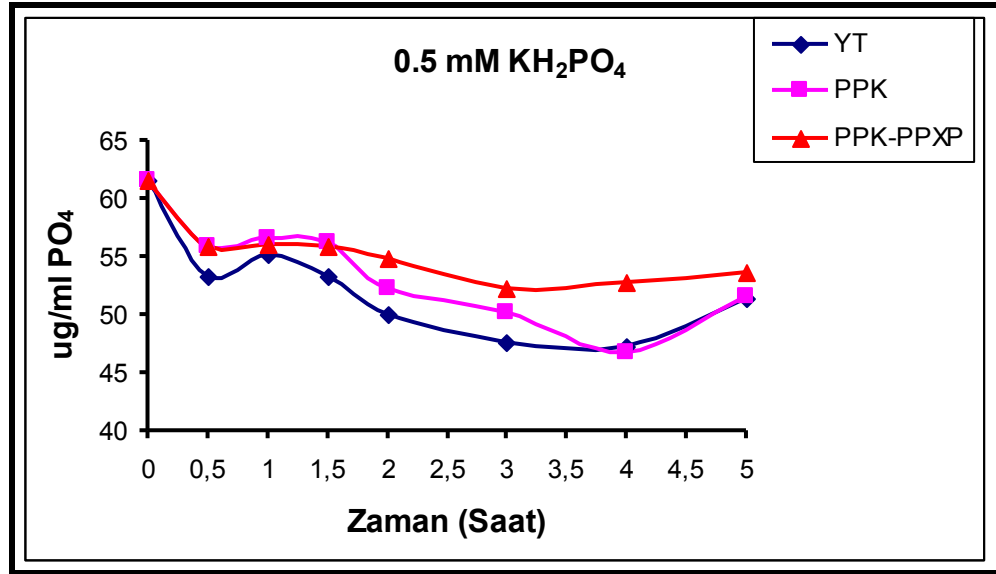


Şekil 3.27. pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerini içeren rekombinant *S. coelicolor* suşlarının 0.5 mM KH_2PO_4 içeren minimal besiyerinde üretilmeleri sonucu besiyerinde kalan fosfat miktarlarının karşılaştırılması.

Bu sonuçlara göre pHZ1351-*ppk* plazmidi içeren rekombinant suş, 1. saatte pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini içeren suşa göre besiyerinden yaklaşık 2 kat daha fazla fosfat uzaklaştırmakta, sonrasında 4. saate kadar fosfat alımında bir değişme göstermemektedir. Aynı suşun 4. saatten sonra besiyerinden tekrar fosfat almaya başladığı görülmüştür. *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suş ise 4. saate kadar düzenli bir şekilde besiyerinden fosfat almakta ancak 5. saatte besiyerinde fosfat miktarı birden artmaktadır.

Yapılan bu deney rekombinant suşların fosfat alımlarının yaban tip *S. coelicolor* ile karşılaştırılabilmesi amacıyla tekrarlanmıştır. Suşların besiyerinden fosfat uzaklaştırma kapasiteleri arasında çok fark görülmemekle beraber yaban

suşun, rekombinant suşlara göre ortamdan biraz daha fazla fosfat uzaklaştırdığı görülmüştür. Rekombinant suşlarla elde edilen sonuçlar bir önceki deney sonuçlarıyla karşılaştırıldığında ise fosfat alımının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.26). Aynı besiyerinde aynı suşlarla benzer sonuçların alınamamasının, ikinci tekrarda hücrelerin YED besiyerinde üretilen ön kültürlerin homojen olarak ürememelerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.



Şekil 3.28. Yaban tip, pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidlerini içeren rekombinant *S. coelicolor* suşlarının 0.5 mM KH₂PO₄ içeren minimal besiyerinde üretilmeleri sonucu besiyerinde kalan fosfat miktarlarının karşılaştırılması.

3.8. Rekombinant *S. coelicolor* Suşlarının Ağır Metal Dirençliliğinin Ölçülmesi

pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan *S. coelicolor* suşlarıyla yaban suşun farklı konsantrasyonlarda Cd ve Pb ağır metallerine toleransları karşılaştırılmıştır. Her iki ağır metal için 10 farklı konsantrasyon seçilerek yapılan bu deneyde kontrol olarak sadece pHZ1351 plazmidini içeren *S. coelicolor* suşu ve yaban tip kullanılmıştır. Sıvı kültürde üretilen yaban suş ve rekombinant suşların yaş ağırlıkları eşitlenerek besiyerleri üzerine ekim yapılmıştır.

Seçilen Pb konsantrasyonlarındaki büyüme oranları karşılaştırıldığında, yaban tipin, rekombinant ve pHZ1351 plazmidini taşıyan kontrol suşlarına göre daha yüksek Pb konsantrasyonlarında üreyebildiği gözlenmiştir.

Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları göz önüne alındığında, KH_2PO_4 eklenmeyen besiyerinde, yaban suşun 1600 $\mu\text{g/ml}$ Pb konsantrasyonunda, pHZ1351 plazmidini içeren kontrol suşunun 400 $\mu\text{g/ml}$, pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan rekombinant suşların ise 800 $\mu\text{g/ml}$ Pb içeren besiyerinde üreme gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 3.2).

0.37 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde, yaban tipin en son üreme gösterdiği konsantrasyon yine 1600 $\mu\text{g/ml}$ Pb içeren besiyeri iken, pHZ1351 plazmidini taşıyan suş 800 $\mu\text{g/ml}$ Pb konsantrasyonunda, rekombinant suşlar ise en son 400 $\mu\text{g/ml}$ Pb içeren besiyerinde üreyebilmişlerdir (Tablo 3.2).

1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde kontrol suşu hariç yaban ve rekombinant suşların üreme oranlarının diğer KH_2PO_4 konsantrasyonlarına göre daha yüksek olduğu dikkat çekicidir. Bu fosfat konsantrasyonunda, yaban tip 2400 $\mu\text{g/ml}$ Pb içeren besiyerinde üreme göstermiştir. pHZ1351 plazmidini taşıyan suş yine 800 $\mu\text{g/ml}$ Pb konsantrasyonunda üreyebilirken, rekombinant suşların üreme gösterdikleri Pb konsantrasyonu 1600 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar çıkmıştır (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Farklı Pb ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında yaban tip ve rekombinant suşların büyüme oranlarının karşılaştırılması (Çift artı (++) üremenin çok olduğunu, tek artı (+) üremenin azaldığını, eksi işareti (-) üreme olmadığını göstermektedir). [YT: Yaban Tip; pHZ: pHZ1351 plazmidini taşıyan suş; PPK: pHZ1351-*ppk* plazmidini içeren rekombinant suş; PPK-PPXP: pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini içeren rekombinant suş]

	(-) KH_2PO_4				0.37 mM KH_2PO_4				1.85 mM KH_2PO_4			
Pb($\mu\text{g/ml}$)	YT	pHZ	PPK	PPK-PPXP	YT	pHZ	PPK	PPK-PPXP	YT	pHZ	PPK	PPK-PPXP
50	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
100	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
200	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
400	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
800	++	-	+	+	++	+	-	-	++	+	++	++
1600	+	-	-	-	+	-	-	-	++	-	+	+
2400	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Seçilen Cd konsantrasyonlarındaki büyüme oranları karşılaştırıldığında ise yaban tipin yine rekombinant suşlar ve kontrol suşuna göre daha yüksek Cd konsantrasyonlarında üreyebildiği gözlenmiştir. Sonuçlar farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarına göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde, yaban tipin, KH_2PO_4 içermeyen, 0.37 mM ve 1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerlerinde 300 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreme gösterdiği görülmüştür. KH_2PO_4 eklenmeyen besiyerinde, pHZ1351 taşıyan kontrol suşunun ancak 50 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebildiği, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suşun ise 100 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebildiği gözlenmiştir. pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşun ise 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreme göstererek Cd'a diğer rekombinant suşlardan daha dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.3).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnorganik polifosfat, bütün canlı türlerinde bulunan ve evrimsel süreçte rol aldığı düşünülen önemli bir polimerdir. Polifosfat ve polifosfat bağımlı enzimler, özellikle prokaryotlarda temel metabolizmada yer alarak stres koşullarına karşı hücrenin direncini arttırmakta ve ATP başta olmak üzere NTP'lerin oluşumunda fosfat donörü görevi görmektedir. Bakterilerin patojen özelliklerinin korunmasında etkili olan bu biyopolimer, hücre zarının yapısına da katılmaktadır

Biyoremediasyon çalışmalarının literatüre girmesiyle birlikte, son yılların en önemli sorunu olan çevre kirliliğinin giderilmesinde rekombinant organizmaların kullanılabileceği gündeme gelmiştir. Son yıllarda, polifosfat metabolizmasının, atık sulardeki fosfat kontaminasyonunun giderilmesinde ve ağır metal biyoremediasyonunda kullanılabileceği görüşü önem kazanmıştır (Brown ve Kornberg, 2008; Keasling ve ark., 1997).

Başta *E. coli* olmak üzere birçok bakterinin, polifosfat metabolizmasında görev alan, polifosfat ve ATP'nin dönüşümlü sentezinden sorumlu polifosfat kinaz ve polifosfat zincirlerini inorganik fosfata parçalayan ekzopolifosfataz enzimleri saflaştırılmış ve bu enzimleri kodlayan genler çoğaltılmıştır (Brown ve Kornberg, 2004). *E. coli* (Ohtake ve ark. 1993; Keasling ve ark., 1997; Crooke ve ark., 1993) ve *K. aerogenes* (Ohtake ve ark., 1998) ile yapılan çalışmalarda, bu genlerin yüksek seviyede ifadesi ile oluşturulan rekombinant mikroorganizmaların fosfat biyoremediasyonunda kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

PoliP'nin yapısında, Ca^{+2} , K^{+} ve Mg^{+2} gibi katyonların bulunmasının yanı sıra, belli bakterilerin, *Saccharomyces cerevisiae*'nin ve alglerin poliP granüllerinde ağır metallerin de bulunduğu gösterilmiştir (Keasling ve Hupf, 1996). Ağır metallerin hücre içi şelasyonunda, uzun zincirli anyonik fosfat polimerleri olan polifosfatların çok önemli işlevleri vardır (Keasling ve Hupf, 1996).

E. coli'de yapılan çalışmalarda, *ppk* ve *ppx* genlerinin yüksek seviyede ifade edilmesi sonucu, hücrelerin, Cd^{+2} ve Hg^{+} gibi ağır metallere toleransında artış olduğu ve polifosfat metabolizmasında meydana getirilen bu genetik değişiklik ile ağır metallerin detoksifikasyonu ve dolayısıyla biyoremediasyonunun mümkün olabileceği açığa çıkarılmıştır (Rachlin ve ark., 1981; Aiking ve ark., 1984; Boswel ve ark., 1999; Keasling ve ark., 1998; Pan-Hou ve ark., 2001; Pan-Hou ve ark., 2003).

Streptomyces'ler, ticari antibiyotiklerin % 75'i başta olmak üzere çok çeşitli biyoaktif bileşikler üreten, endüstriyel açıdan önemli bakterilerdir. *S. lividans* TK24 suşu ile yapılan üç çalışma, *Streptomyces* polifosfat metabolizmasının aydınlatılmasına yönelik bulgular içerse de bu bakterilerde, PoliP'nin hücre metabolizmasındaki rolleri henüz tam anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalarda, *S. lividans* TK24 suşuna ait *ppk* geni klonlanarak, karakterize edilmiş ve fosfat metabolizmasındaki düzenleyici rolü açığa çıkarılmıştır (Ghorbel ve ark., 2006a; Ghorbel ve ark., 2006b). Aynı grubun yaptığı çalışmalardan bir diğerinde, *ppk* geninin delesyonu sonucu antibiyotik üretiminin arttığı ve bu genin ürünün antibiyotik biyosentezini negatif yönde etkilediği bulunmuştur (Chouayekh ve Virolle, 2002).

Literatürde, bilginiz dahilinde, *Streptomyces* türlerinin polifosfat metabolizmasının genetik olarak değiştirilerek biyoremediasyonda kullanılabilme potansiyellerini gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu tez çalışmasında, *S. coelicolor* A3(2) suşuna ait *ppk* geninin tek başına ve *ppx* geni ile birlikte klonlanarak, yüksek seviyede ifade edilmeleri sonucu, hücrelerin, çeşitli stres koşullarına (sıcaklık, pH, H_2O_2) karşı direnç mekanizmalarının gözlenmesi ve aynı zamanda fosfat ve ağır metal biyoremediasyonu için uygunlukları araştırılmıştır.

S. coelicolor *ppk* ve *ppx* genlerinin biyoinformatik analizi sonucu, bu iki genin diğer bazı bakteriyel genomlardan farklı olarak operon halinde organize olmadığı ve kromozomun farklı bölgelerinde yer aldığı görülmüştür.

Söz konusu genlerin üst ve alt bölgelerinin incelenmesi sonucunda, *ppk* geninin, herhangi bir operona dahil olmadığı, *ppx* geninin ise *pstABC* fosfat taşıma sistemine ait operon içerisinde yer aldığı düşünülmektedir. Ayrıca, *ppk* ve *ppx* genleri kromozom üzerinde birbirine ters yönde bulunmaktadır. Bu genlere ait promotor bölgelerinin varlığını araştırmak için yapılan analizler sonucu, *S. coelicolor* *ppk* genine ait, -10 (5'-TAACCA-3') ve -35 (5'-TATCCC-3') konsensus dizilerinin, Chouayekh ve Virolle'ün (2002) yaptığı çalışma ile belirlenen *S. lividans* *ppk* geninin promotor bileşenlerine ait konsensus diziler ile birebir örtüştüğü görülmektedir. Aynı çalışmada, *S. lividans* *ppk* geninin iki promotor bileşeni arasında 17 bç bulunduğu ve ribozom bağlanma bölgesinin (GAGG), translasyon başlama kodonunun 9 nükleotid öncesinde yer aldığı bulgusunun, *S. coelicolor* *ppk* geni için de geçerli olduğu gözlenmiştir. *ppx* geni üzerine yapılan analizler, bu genin herhangi bir promotor bölgesine sahip olmadığını ve muhtemel *pstABC* fosfat taşıma sistemine ait operon içerisinde yer aldığını göstermiştir. Bütün bu bilgiler değerlendirilerek, bu çalışmada, *ppk* geninin, kendi doğal promotorundan, *ppx* geninin ise *ppk* genine ait promotor bölgesinden ifade edilmeleri sağlanmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada, *S. coelicolor* A3(2) *ppk* ve *ppx* genleri ile *ppk* genine ait promotor bölgesi, klonlama çalışmalarında kullanılacak restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini de taşıyan ileri ve geri primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonları ile elde edilmiş ve öncelikle pBluescript vektörüne klonlanmıştır. İlk olarak *ppk* geni pBluescript vektörüne klonlanarak, pSK-*ppk* plazmidi elde edilmiştir. Elde edilen pSK-*ppk* plazmidinin yanında ayrıca *ppx* genini *ppk* promotorundan ifade edecek olan pSK-*ppk-ppxp* plazmidi de genlerin birlikte ifadelerini sağlamak amacıyla *ppx* genleri ile *ppk* genine ait promotor bölgesinin pSK-*ppk* plazmidine klonlanmasıyla hazırlanmıştır. pSK-*ppk* plazmidi üzerindeki *ppk* geni, T3 ve T7 promotoruna uygun primerler kullanılarak, *ppx* ve promotor bölgesi PCR ürünleri ise kendilerine özgül primerler kullanılarak yapılan dizi analizleri sonucunda, *ppk* ve *ppx* gen dizilerinin, daha önce Hopwood ve arkadaşları (2002) tarafından belirlenen diziler ile bire bir uygunluk gösterdiği bulunmuştur.

pBluescript vektörüne klonlanan *ppk* ve *ppx* genleri daha sonra uygun restriksiyon enzimleri ile çıkarılarak, ayrı ayrı *ppk* ve *ppk-ppxp* DNA fragmanları halinde *E. coli-Streptomyces* mekik vektörü olan pHZ1351 plazmidi üzerinde

öncelikle *E. coli* DH5 α hücrelerinde klonlanmış, daha sonra bu hücrelerden izole edilen rekombinant plazmitler metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 suşuna aktarılmıştır. Son olarak bu suştan izole edilen rekombinant pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitleri protoplast transformasyonu ile *S. coelicolor*'a aktarılmış ve bu suşlardan geri izole edilen rekombinant plazmitler uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek doğrulanmıştır.

PPK ve PPX enzimlerinin aktif bir şekilde üretildiğini gözlemlemek için, rekombinant pSK plazmitlerini taşıyan *E. coli* DH5 α suşlarından hazırlanan hücre özütlerinde, PPK ve PPX enzim aktiviteleri ayrı ayrı ölçülmüştür. Genlerin *lac* promotorundan ifadelerinin gerçekleşmesi beklendiğinden, promotor IPTG ile uyarılmıştır. Ancak, bu ölçümlerde kontrol olarak kullanılan *E. coli* DH5 α ile rekombinant suşların PPK aktiviteleri arasında bir fark gözlenmemiştir. Aynı şekilde, rekombinant *S. coelicolor* suşlarına ait hücre özütlerinde ölçülen PPK enzim aktivitesinde de, yaban tip ve pHZ1351 vektörünü içeren *S. coelicolor* kontrol suşlarının enzim aktiviteleri ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark görülmemiştir. Rekombinant *E. coli* ve *Streptomyces* suşlarının PPX enzim aktivitesi ölçümleri ise anlamlı sonuçlar vermemiştir. Elde edilen bu sonuçların, her iki enzim aktivitesi için kullanılan yöntemlerin hassas olmamasından ve/veya söz konusu enzimler saflaştırılmadığı için hücre özütlerinde başka birçok protein ve eklenen proteaz inhibitörüne rağmen hücre içi/dışı proteazların bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da, PPK ve PPX enzim aktivitelerinin çoğunlukla, saflaştırılmış PPK ve PPX enzimleriyle radyoaktif fosfatın kullanıldığı daha hassas yöntemlerle ölçüldüğü gözlenmiştir (Crooke ve ark., 1992; Crooke ve ark., 1993).

Enzim aktivitelerinden sonuç alınamaması üzerine *ppk* geninin ifade edilip edilemediğinin belirlenebilmesi için laboratuvarımızda oluşturulan *ppk* geninden yoksun *S. coelicolor* suşundan (İrem Yalım'ın tez çalışması) yararlanılmıştır. Bu tez çalışmasında oluşturulan pHZ1351-*ppk* plazmidi, *ppk* geninden yoksun ve TBO ve TSA besiyerlerinde üreyemeyen *S. coelicolor* suşuna aktarıldığında, mutasyonun komplementasyonunu sağlayarak suşun mutant özelliklerini giderebilmiştir.

pHZ1351 plazmidi üzerindeki *ppk* geninin aktif bir şekilde ifade edildiği düşünülmüş ve rekombinant *S. coelicolor* suşunun karakterizasyonuna devam edilmesine karar verilmiştir. Karakterizasyon için yapılan ön çalışmalarda, *ppx* genini pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidi üzerinde taşıyan suş, yaban ve *ppk* geninin çoklu kopyalarını taşıyan suşlardan farklı sonuçlar verdiği için, klonlanan *ppx* geninin ürününün aktif olabileceği düşünülerek karakterizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Rekombinant suşların pH, sıcaklık ve oksidatif stres gibi farklı stres koşullarındaki üremeleri yaban tip ile karşılaştırılmıştır. İlk olarak rekombinant *S. coelicolor* suşları ve yaban tipin asidik (pH 5.0), nötral (pH 7.0) ve bazik (pH 9.0) R2YE besiyerlerindeki üremeleri izlenmiştir. Rekombinant suşların ve yaban tipin asidik ortamda (pH 5.0) inkübasyonu ile oluşturulan büyüme eğrilerinde, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suşun 24. saatte durağan faza girdiği ve 120. saate kadar hücre miktarının değişmediği görülmüştür. Yaban tipinde bu pH derecesinde üreme 24. saatten sonra başlamıştır. Ayrıca, yaban tip 72. saatte durağan faza girerken pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suş 48. saatte durağan faza girmiştir. pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşun yaban tipe görece 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu ve bu pH derecesine daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

Candida humicola (McGrath ve Quinn, 2000) ve *Burkholderia cepacia*'nın (Mullan ve ark., 2002) asidik (pH 5.5) ortamda büyütülmeleri sonucu, daha fazla polifosfat biriktirdikleri ve hücre içine taşınan fosfat miktarının arttığı ortaya çıkarılmıştır. Bu durum, büyüme süresince pH 5.5'te oluşturulan polifosfatın, hidrojen iyonlarını toplayarak bir katyon yakalama mekanizması oluşturduğu şeklinde açıklanmıştır. Polifosfatın polianyonik yapısı göz önüne alındığında, bu polimerin hücre içi tamponlama sistemi olarak da görev yaptığı önerilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, PPK enzimini yüksek seviyede ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun, PPK enziminin aktif olarak çalışması sonucu, yaban tipe görece daha fazla polifosfat sentezleyebileceği ve böylece durağan fazda yaban tipten daha kısa sürede asidik ortama adapte olarak canlılığını devam ettirebileceği önerilmektedir. PPK ve PPX enzimlerini yüksek seviyede ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun ise asidik ortamda yine PPK enziminin yüksek aktivitesi ile çok miktarda polifosfat biriktirerek hücre içi pH homeostatisini sağlayabileceği düşünülmektedir. PPX enziminin artan aktivitesi ile de bu polifosfatların hidrolizinin

hızlanmasıyla oluşan inorganik fosfatın hem PPK enzimi ile hem de hücre içindeki diğer NTP kinazların aktivitesiyle ATP sentezinin artmasına neden olarak durağan fazda hücrenin enerji ihtiyacını karşılayabileceği düşünülmektedir.

S. coelicolor'ın optimum pH değeri olan 7.0'ye ayarlanmış R2YE besiyerinde yaban tip ve rekombinant suşların 72. saatte durağan faza girdikleri görülmüştür. 72. saate kadar, *ppk* genini yüksek seviyede ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun kuru ağırlık miktarının yaban tipin kuru ağırlık miktarından yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte yüksek oranda ifade ettiği düşünülen rekombinant suşun ise 72 saate kadarki kuru ağırlık miktarı yaban tipin kuru ağırlık miktarından yaklaşık 2 kat daha fazladır. Aynı suşun 96. saatten itibaren ölüm fazına girerek kuru ağırlığının yaban tipinki ile hemen hemen eşitlendiği gözlenmiştir.

Yaban ve rekombinant suşların bazik ortamdaki büyüme eğrileri pH 9.0'a ayarlanmış R2YE besiyerinde karşılaştırılmıştır. *ppk* ve *ppx* geninin birlikte ifade edildiği düşünülen suşun, yaban tip ve *ppk*'yı yüksek oranda ifade ettiği düşünülen suşa göre daha yoğun ürettiği gözlenmiştir. Ayrıca, *ppk* genini fazla ifade ettiği düşünülen suşun da aynı koşullarda yaban tipe göre bazik ortama daha dirençli olduğu görülmüştür. *ppk* ve *ppx* geninin birlikte ifade edildiği suşun, 48. saatte yaban tipe göre 3 kat ve pHZ1351-*ppk* suşuna göre ise 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. *ppk* geninin yüksek miktarda ifade edildiği düşünülen suşun da, 48. saatte yaban tipe göre 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu pH derecesinde, üç suşun da 72. saatte durağan faza girdiği gözlenmiştir.

Alkali ortamda büyütülen *Dunaliella salina* (Pick ve Weiss, 1990, Pick ve ark., 1991) ve *Saccharomyces cerevisiae* (Castro ve ark., 1995) hücrelerinde büyük oranda polifosfat yıkımı gözlenmiş ve bu yıkım sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının hücre içi pH'nın düzenlenmesinde görev aldığı ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada, PPK enzimini yüksek seviyede ürettiği düşünülen suşun polifosfat miktarının, yaban suştan fazla olduğu düşünüldüğünde, bu suшта yıkılan polifosfatların oluşturduğu H^+ iyonlarının daha fazla olduğu ve besiyerinin pH'sını optimum pH'ya daha rahat indirdiği olasılığı öne sürülebilir. PPK ve PPX enzimini yüksek seviyede ürettiği düşünülen suşun ise, polifosfat hidrolizini de hızlandırması nedeniyle diğer iki suşa

göre hücre içi pH düzenlemesini daha kolay gerçekleştirebildiği önerilebilir. Bu olasılıkların kesinleştirilebilmesi, her bir deney için üç ayrı suştan belli aralıklarda alınacak örneklerin polifosfat miktarlarının ölçülerek karşılaştırılmasıyla mümkün olabilir.

Diğer bir stres faktörü olarak, bu çalışmada, farklı sıcaklık dereceleri (30 °C, 37 °C, 42 °C) denenmiş ve bu sıcaklıklarda yaban ve rekombinant suşların üremeleri karşılaştırılmıştır.

Yaban tip *S. coelicolor*'ın optimum büyüme sıcaklığı olan 30 °C'ta büyütülen rekombinant suşların büyüme eğrileri yaban suşun üreme eğrisiyle karşılaştırıldığında, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suş ile yaban tipin 72. saatten sonra durağan faza geçtiği görülmüştür. pHZ1351-*ppk-pppx* plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerin ise 48. saatten sonra kısa bir süre durağan fazda kaldığı ardından hücrelerin hızla ölüm fazına geçtiği görülmüştür. Bu durumun, merkezi metabolizmanın düzenlenmesinde çok önemli rolleri bulunan polifosfat konsantrasyonunu düzenleyen PPK ve PPX enzimlerinin yüksek miktarda üretilmesinin hücrede yarattığı metabolik bir dengesizliğe bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suş ile pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suşun 48. saatte yaban suşa göre sırasıyla yaklaşık 1.5 ve 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. *ppk* genini yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suşun kuru ağırlığının 72. saatte de yaban suşunkinden 2 kat fazla olduğu görülmüştür. pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan rekombinant suşun bu sıcaklıkta yaban suştan daha iyi üreyebilmesinin, gerektiğinde ATP sentezinde kullanılabilecek olan serbest fosfatı sağlayacak polifosfat rezervlerinin, yaban suşa göre daha fazla olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yaban ve rekombinant suşların 37 °C'ta büyütülmesi sonucu elde edilen büyüme eğrilerinde, 72. saatte rekombinant suşların yaban tipe göre yaklaşık 2 kat daha fazla kuru ağırlığa sahip oldukları ve bu sıcaklık derecesine daha dirençli oldukları görülmüştür. Bununla birlikte yaban tipin ölüm fazı 48. saatte başlarken, rekombinant suşların 48. saatte durağan faza yeni girdikleri ve ancak 72. saatten sonra ölüm fazına geçtiği görülmüştür. Rekombinant suşların enerji düzeyleri yaban

suşa göre oldukça yüksek olabileceğinden bu stres yaratan sıcaklığa karşı dirençliliklerinin yaban suşa göre daha fazla olduğu önerilmektedir. Bu sıcaklıkta her iki rekombinant suşun üreme eğrilerinin birbirine çok benzer olduğu gözlenmiştir.

42 °C'ta üretilen rekombinant suşlar ve yaban suşun büyüme eğrileri karşılaştırıldığında, kuru ağırlıklarında çok büyük bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak rekombinant suşların durağan fazı 120. saatte hala devam ederken yaban suşun 96. saatten sonra ölüm fazına geçtiği gözlenmiştir.

ppk ve *ppx* genlerinden yoksun mutant *E. coli* hücreleriyle yapılan bir çalışmada, mutant suşun polifosfat miktarının oldukça az olduğu ve minimal besiyerinde, durağan fazda uygulanan ısı şokuna (55 °C) yaban tipe göre daha hassas olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, mutasyonun, *ppk* genini içeren bir plazmit ile komplementasyonu sonucu hücrelerin hassasiyetinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Ayrıca, durağan fazdaki genlerin düzenlenmesinden sorumlu olan *rpoS* geninin, bu mutant suşta yüksek miktarda ifadesinin de hücrelerin ısı şoku hassasiyetini ortadan kaldırdığı bulunmuştur. *ppk* geninin yüksek miktarda ifade edildiği *E.coli* hücrelerinin ise yaban tipe göre 100 kat daha fazla polifosfat biriktirdiği görülmüştür. (Crooke ve ark., 1993; Rao ve Kornberg, 1995; Tsutsumi ve ark., 1999).

Bu çalışmada, *E. coli* ile yapılan çalışmadan farklı olarak, *ppk* ve *ppk-ppxp* genlerini yüksek seviyede ifade ettiği düşünülen rekombinant *S. coelicolor* suşlarının, *Streptomyces*'ler için optimum büyüme sıcaklığı olan 30 °C dışındaki sıcaklıklarda (37 °C ve 42 °C) yaban suşa görece durağan fazda daha dirençli oldukları gözlenmiştir. *E. coli* ile yapılan çalışmada minimal besiyeri kullanıldığı, bu çalışmada ise *Streptomyces* suşlarının zengin bir besiyeri olan R2YE'de üretildiği göz ardı edilmemelidir.

Bu çalışmada, yaban ve rekombinant suşların oksidatif strese karşı dirençliliği de karşılaştırılmıştır. Hücreler farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında hazırlanmış R2YE besiyerlerine ekilerek petrilerin ortasına 100 mM H_2O_2 emdirilmiş diskler yerleştirilmiş, üremenin ardından, disk etrafında oluşan inhibisyon halkaları ölçülerek karşılaştırmalar yapılmıştır. Ölçülen zonların büyüklüklerine göre

pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suşun H_2O_2 'ye yaban suştan daha hassas olduğu, pHZ1351-*ppk-ppx* suşunun ise yaban suş ile neredeyse eşit oranda hassasiyet gösterdiği gözlenmiştir.

Streptomyces'lerde *ppk* ve *ppx* genlerinin yüksek seviyede ifadesinin, hücrenin stres koşullarına karşı direncini nasıl etkilediğini konu alan herhangi bir çalışma bulunmadığından bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *ppk* geninden yoksun mutantlar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, *S. lividans* ve *S. coelicolor* *ppk* geninden yoksun mutantların R2YE besiyerinde H_2O_2 hassasiyetlerinin arttığı ortaya çıkarılmış ve fosfat kısıtlılığı durumunda bu hassasiyetin daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Ghorbel ve ark., 2006; Yalım, 2010). Bu çalışmaların ortak sonucuna göre, *ppk* genini yüksek miktarda ifade eden *S. coelicolor* hücrelerinin oksidatif strese, yaban suşa göre daha dayanıklı olması beklendiği halde, bulguların bu beklentinin tam tersi yönünde olması dikkat çekicidir. Bu rekombinant suşta, fosfatın kısıtlı olduğu koşullar ile karşılaştırıldığında, 0.37 mM KH_2PO_4 konsantrasyonunda oksidatif strese hassasiyetin azaldığı görülmüştür. Yine aynı suşta 1.85 mM ve 3.7 mM KH_2PO_4 konsantrasyonlarında hücrelerin H_2O_2 'ye hassasiyetlerinin tekrar artmasının, *ppk* geninin yüksek miktarda ifade edilme olasılığına bağlı olarak hücre içi fosfat konsantrasyonunun yüksek olmasının yarattığı toksik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumda yüksek hücre içi fosfat konsantrasyonu nedeni ile merkezi metabolik yolların uyarılması sonucunda indirgenmiş kofaktörlerin üretimi artmaktadır. Bu indirgenmiş kofaktörlerin üretimi, solunum zincirinin oksidatif kapasitesini aştığında, reaktif oksijen türleri (H_2O_2 , O_2^- ve OH^-) hücre içinde birikerek oksidatif stres oluşturmaktadır.

Ayrıca PPK ve PPX enzimini çok miktarda ürettiği düşünülen rekombinant suşun H_2O_2 hassasiyetinin yaban suş ile neredeyse eşit olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, artan PPX enzim aktivitesi yoluyla oluşturulan P_i 'in hücre dışına salınması ve hücre içi fosfat konsantrasyonunun düşürülmesiyle, hassasiyetin azalmasını sağladığı öne sürülebilir.

Çevresel stresin çeşidine bağlı olarak, farklı sinyal iletim mekanizmalarına sahip olan *Streptomyces* suşlarında, değişik stres koşullarına karşı farklı sigma faktörleri yardımıyla cevap oluşturulmaktadır. Bu çalışmada, test edilen stres koşullarına karşı oluşturulan cevapta hangi sigma faktörlerinin görev aldığı ve bu sigma faktörleriyle polifosfat metabolizmasının ilişkisinin olup olmadığı konularının aydınlatılması için daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen rekombinant suşların ve yaban suşun ortamdan fosfat uzaklaştırabilme kapasiteleri, iki ayrı besiyeri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bunun için öncelikle YEME besiyeri denenmiştir. Besiyerindeki fosfat miktarının belirlenmesinde kullanılan yöntemin, fosfat konsantrasyonuna göre renk oluşumuna bağlı olması yüzünden R2YE besiyeri bu deneylerde özellikle kullanılmamıştır. Çünkü, her ne kadar fosfat konsantrasyonu ayarlanabiliyorsa da bu besiyeri, *S. coelicolor*'ın renkli antibiyotik üretimini desteklemektedir. Bu yüzden antibiyotik üretiminin gerçekleşmeyeceği ya da minimumda gerçekleşeceği YEME besiyeri seçilmiştir. Ön kültür hazırlamadan, doğrudan yaban ve rekombinant suşların spor stoklarından, 1.85 mM KH_2PO_4 içeren YEME besiyerine ekim yapılmış ve 120 saat boyunca kültürlerden örnek alınmıştır. Bu örneklerin üst sıvılarında bulunan PO_4 miktarının, standart fosfat konsantrasyonlarına göre oluşturulan kalibrasyon eğrisi temel alınarak ölçülmesi sonucunda, yaban tip ve rekombinant suşların, inkübasyon süresince besiyerinden fosfat uzaklaştırdığı ancak aralarında belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. YEME, tanımlanmış bir besiyeri olmadığından ve içerdiği fosfat miktarı tam olarak bilinmediğinden bu besiyerinin fosfat alımı deneyleri için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bunun üzerine, yaban tip ve rekombinant suşların fosfat uzaklaştırma kapasiteleri, fosfat konsantrasyonunun bilindiği ve ayarlanabildiği minimal besiyerinde ölçülmüştür. Bu bakterilerin fosfat alımlarının ölçülebildiği uygun KH_2PO_4 miktarını belirlemek amacıyla, yaban tip ve rekombinant bakteriler, 0.25, 0.5 ve 1 mM konsantrasyonlarında KH_2PO_4 eklenen besiyerlerinde üretilerek 6. ve 24. saatlerde kültürlerden örnek alınmıştır. 24. saatte alınan örneklerdeki fosfat konsantrasyonunun 6. saattekilere göre arttığı gözlenmiş ve bu durumun hücrelerin minimal besiyerinde üreyemeyip lizise uğramasından ve hücre içindeki fosfat içeren bileşiklerin degradasyonundan ya da Pi 'in hücre dışına taşınmasından

kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine bu deney 5 saat boyunca saatte bir örnek alınarak tekrarlanmıştır. Deney sonucunda, yaban ve rekombinant suşların, kısa zaman aralıklarında, yalnızca 0.5 mM KH_2PO_4 konsantrasyonu içeren minimal besiyerinde düzenli olarak ve belirlenebilir düzeyde fosfat alımı gerçekleştirdikleri bulunmuştur.

Ancak bu deney sırasında yaban suşa ait kültürün kaybedilmesi nedeniyle, sadece rekombinant suşların fosfat alımı kapasiteleri birbirleriyle karşılaştırılabilmiştir. Bu sonuçlara göre, *ppk* genini yüksek düzeyde ifade eden suşun, 1. saatte pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini içeren suşa göre besiyerinden yaklaşık 2 kat daha fazla fosfat uzaklaştırdığı gözlenmiştir. Daha sonra bu suşun besiyerinden fosfat alımında 5. saate kadar bir değişme görülmemiştir. *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suşun ise 4. saate kadar düzenli bir şekilde besiyerinden fosfat aldığı ancak 5. saatte besiyerindeki fosfat miktarının arttığı görülmüştür. Bu artışın yine hücrelerin lizise uğramasından ya da hücre içindeki fosfat miktarının doyuma ulaşarak Pi 'ın dışarı taşınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu deney, rekombinant suşların fosfat alımlarının yaban tip *S. coelicolor* ile karşılaştırılabilmesi amacıyla tekrarlanmıştır. Yaban suşun, rekombinant suşlara göre ortamdan biraz daha fazla fosfat uzaklaştırdığı görülmüş ve rekombinant suşların, bir önceki deney sonuçlarıyla karşılaştırıldığında fosfat alımının azaldığı gözlenmiştir. Aynı besiyerinde aynı suşlarla benzer sonuçların alınamamasının, ikinci tekrarda hücrelerin YED besiyerinde üretilen ön kültürlerin homojen olarak ürememelerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Hücre içi fosfat homeostasisinin korunmasında görev alan birçok genin/gen bölgesinin hücrenin fosfat alımı kapasitesinin arttırılmasında önemli olduğu bilinmektedir. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada, fosfat metabolizması ve taşınmasında görev alan fosfat uyarımlı taşıma sistemi *pst* operonu, polifosfat sentezi için ATP oluşumunda görev alan asetat kinaz (*ackA*) ve polifosfat kinaz (*ppk*) genleri, ayrı ayrı ve birlikte *E. coli*'de yüksek seviyede ifade edilmiştir. Bunun sonucunda, en yüksek fosfat alımı oranının, *ppk* ve *ackA* genlerini birlikte ifade eden suшта gerçekleştiği görülmüştür (Ohtake ve ark., 1993).

Ayrıca, *ppk* geni ve *pst* operonunu yüksek seviyede ifade eden suşta, fosfat alımının, dolayısıyla hücre içi fosfat miktarının maksimum seviyeye ulaşması sonucunda fosfatın besiyerine salındığı gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada, *S. lividans phoR-phoP* genlerinden yoksun mutantlar oluşturularak bu mutantların fosfat alımı kapasiteleri gözlenmiş ve mutant hücrelerin yaban suşa göre fosfat alımını gerçekleştirmediği ortaya çıkarılmıştır (Sola-Landa ve ark., 2002).

E. coli ve *S. lividans* ile yapılmış çalışmalar göz önüne alındığında, bu çalışmada, *S. coelicolor*'da, yalnızca polifosfat metabolizmasının genetik olarak değiştirilmesinin, elde edilen rekombinant suşlarda fosfat alımının arttırılması için yeterli olmayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ayrıca rekombinant ve yaban suşların Cd ve Pb ağır metallerine dirençliliği test edilmiştir. Bunun için, pHZ1351, pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan rekombinant suşların ve yaban suşın ve farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarını (0 mM, 0.37 mM, 1.85 mM) içeren, 10 farklı Cd ve Pb konsantrasyonunda hazırlanmış zengin katı besiyeri R2YE'deki üremeleri karşılaştırılmıştır.

KH_2PO_4 eklenmeyen besiyerinde, yaban suş 1600 µg/ml Pb, pHZ1351 plazmidini içeren kontrol suşu 400 µg/ml Pb, pHZ1351-*ppk* ve pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmitlerini taşıyan rekombinant suşları ise 800 µg/ml Pb içeren besiyerinde üreyebilmişlerdir.

0.37 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde ise, yaban suş 1600 µg/ml Pb içeren besiyerinde üreyebiliyorken, pHZ1351 plazmidini taşıyan suş 800 µg/ml Pb ve rekombinant suşlar en son 400 µg/ml Pb içeren besiyerinde üreyebilmişlerdir.

1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde, yaban suş 2400 µg/ml Pb, pHZ1351 plazmidini taşıyan suş 800 µg/ml Pb, rekombinant suşları ise 1600 µg/ml Pb içeren besiyerinde üreyebilmişlerdir.

Pb içeren R2YE besiyerinde farklı KH_2PO_4 konsantrasyonları göz önüne alındığında, seçilen üç KH_2PO_4 konsantrasyonunda da yaban suşun, rekombinant suşlardan daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bütün suşların, 1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde diğer KH_2PO_4 konsantrasyonlarına göre daha fazla Pb içeren konsantrasyonda üreyebildiği ve yaban suşun rekombinant suşlardan yine daha dirençli olduğu sonucu elde edilmiştir.

Hücrelerin, farklı Cd konsantrasyonlarındaki büyüme oranları karşılaştırıldığında ise yaban suşun, rekombinant ve kontrol suşlarına göre yine daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Yaban suşun, KH_2PO_4 içermeyen, 0.37 mM ve 1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerlerinde 300 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreme gösterdiği görülmüştür. KH_2PO_4 eklenmeyen besiyerinde, pHZ1351 taşıyan kontrol suşu ancak 50 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebilmişken, pHZ1351-*ppk* plazmidini taşıyan suş 100 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebilmiştir. Aynı koşullarda pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan suş ise 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreme göstermiştir.

0.37 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde, pHZ1351 plazmidini taşıyan kontrol suşun 100 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreme gösterdiği, *ppk* genini yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suşun ise ancak 25 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebildiği gözlenmiştir. pHZ1351-*ppk-ppxp* plazmidini taşıyan rekombinant suş 150 $\mu\text{g/ml}$ Cd içeren besiyerinde üremiştir.

1.85 mM KH_2PO_4 içeren besiyerinde, *ppk* genini yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suşun 50 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebildiği gözlenirken, *ppk* ve *ppx* genlerini birlikte yüksek oranda ifade ettiği düşünülen suşun ise 100 $\mu\text{g/ml}$ Cd konsantrasyonunda üreyebildiği gözlenmiştir.

Özet olarak, *ppk* ve *ppx* genlerini yüksek miktarda ifade ettiği düşünülen suşun, inorganik fosfat konsantrasyonu arttıkça Cd'a dirençliliğinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, pHZ1351-*ppk* plazmidini içeren suşun KH_2PO_4 içermeyen ortamda, 0.37 mM ve 1.85 mM KH_2PO_4 içeren ortamlara göre Cd'a dirençliliğinin daha fazla olduğu ortaya çıkarılmıştır.

E. coli'de yapılan bir çalışmada, *ppk* ve *ppx* genlerinden yoksun mutant suşa aynı genlerin çok kopyalı bir plazmit üzerinde aktarılmasıyla, genlerin yüksek seviyede ifade edilmesi sağlanmış ve kadmiyuma dirençli suşlar bu şekilde elde edilmiştir. *E. coli* mutant suşlarda, *ppk* geninin artan ifadesi sonucunda yüksek miktarda oluşturulan polifosfatın, ağır metali bünyesinde biriktirdiği, PPX enziminin fazla üretimi ile de metal-polifosfat komplekslerinin hidrolizi sonucunda metallerin fosfatla beraber hücre dışına salındığı sonucuna varılmıştır (Keasling ve Hupf, 1995; Keasling ve ark., 1997). Bu çalışmada, *ppk-ppxp* genlerinin çok kopyalı pHZ1351 vektörü üzerinde yaban suşa aktarılmasıyla elde edilen rekombinant suşların, yaban suşla karşılaştırıldığında ağır metallere karşı dirençli olmadığı görülmüştür. Bunun, *ppk* ve *ppx* genlerinin yüksek miktarda ifadelerinin sağlanması için yapılan genetik değişiklikler sonucunda, metabolik bir denge içinde bulunan yaban suş hücrelerinde polifosfat konsantrasyonunun değişmesiyle, bu homeostasis durumunun bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *E. coli* ile yapılan çalışmada ise, *ppk-ppx* genlerinin, bu genlerden yoksun mutant suşa aktarılması sayesinde, merkezi metabolizmanın düzenlenmesinde çok önemli rolleri bulunan bu iki enzimden yoksun olan mutant suşun eksikliği giderildiğinden böyle bir dengesizlik yaşanmadığı öngörülmektedir.

Başka bir çalışmada, *ppk* geni ve civa uyarımlı taşıma sisteminde görevli genlerin *E. coli*'de birlikte ifadesi ile civa biyoremediasyonu gerçekleştirilmiştir (Pan-Hou ve ark., 2001). Bu tez çalışmasında, rekombinant suşlarda, sadece polifosfat metabolizmasından sorumlu genlerin çoklu kopyalarının bulunması, ağır metal dirençliliklerinin artmasını sağlayamamıştır. Bu rekombinant suşlara ayrıca ağır metal uyarımlı taşıma sisteminde görevli genlerin de aktarılmasının hücrelerin ağır metal dirençliliğinin artmasında önem taşıdığı düşünülmektedir.

K. aerogenes ile yapılan çalışmada ise hücrelerin kadmiyuma direncinin besiyerindeki sülfür ve inorganik fosfatın artmasına bağımlı olduğu gösterilmiştir (Aiking ve ark., 1984). Bu durumda, rekombinant suşların ağır metal dirençliliklerinin farklı içeriklere sahip besiyerlerinde ölçülmesinin de sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, *S. coelicolor*'ın polifosfat metabolizmasının değiştirilmesiyle elde edilen rekombinant *S. coelicolor* suşlarının, değişik stres faktörlerine (sıcaklık, oksidatif stres, pH) karşı direncindeki değişimleri ve bu suşların fosfat ve ağır metal kirliliğinde biyoremedial araç olarak kullanılabilme potansiyellerini araştıran ön çalışmaları içermektedir. Bu çalışmada, klonlanan genlerin aktif ürünü olup olmadığının test edileceği deneyler (RT-PCR ve SDS PAGE vb.), bu konuyla ilgili ileride yapılacak çalışmalar arasında öncelikli sıradadır. Bu çalışma kapsamında, genlerin aktif ürünü olduğu doğrudan gösterilememiş, ancak yapılan komplementasyon ve dirençlilik deneylerinin sonuçlarına göre dolaylı olarak genlerin aktif oldukları çıkarımında bulunulmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, farklı içeriklere sahip besiyerlerinin, farklı ağır metallerin, farklı plazmitlerin (*Streptomyces*'e gen aktarımı için), farklı enzim aktivitesi yöntemlerinin test edileceği daha ayrıntılı araştırmalara öncülük etmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. **Ahn, K. and Kornberg, A.** 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 265:11734–11739.
2. **Aiking, H., Stijnman, A., Van Garderen, C., Van Heerikhuizen, H. and Van Riet, J.** 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(2):374–377.
3. **Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** 1993. An exopolyphosphatase of *Echerichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633–39
4. **Anzai, K., Ohno, M., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Tamura, T., Komaki, H., Miyadoh, S., Harayama S., Ando, K.** 2008. Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of producing bioactive compounds among strains preserved at NITE/NBRC. *Appl. Microbiol. Biotech.* 80(2): 287-295.
5. **Benitez, J. A., Jahid, I. K., Silva, A. J.** 2006. Polyphosphate Stores Enhance the Ability of *Vibrio cholerae* To Overcome Environmental Stresses in a Low-Phosphate Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11): 7043–7049.
6. **Boswell, C. D., Dick, R. E. and Macaskie, L.E.** 1999. The effect of heavy metals and other envinronmetal conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. *Microbiology.* 145, 1711–1720.
7. **Brock, T. D., Madigan, M. T.** 1988. Biology of Microorganisms. Prentice hall international Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp. 60-112.
8. **Brown, M. R. and Kornberg, A.** 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:16085–87

9. **Brown, M. R. and Kornberg, A.** 2008. The long and short of it polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem Sci.* 33(6):284–90
10. **Candon, H., Allan, B., Fraley, C., Gaynor, E.** 2007. Polyphosphate Kinase 1 Is a Pathogenesis Determinant in *Campylobacter jejuni*. *Journal Of Bacteriology.* 189(22):8099–8108.
11. **Cashel, M., Gentry, D. R.** 1996. Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol. Microbiol.*,19, 1373–1384.
12. **Castro, C. D., Meehan, A., Koretsky, A. P., Domach, M. M.** 1995. *In situ* ³¹P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4448–4453.
13. **Chen, W., Palmer, R. J. and Kuramitsu, H. K.** 2002. Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 70:4708–15
14. **Chouayekh, H. and Virolle, M. J.** 2002. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* 43:919–30
15. **Crang, R., Jensen, T.** 1975. Incorporation of titanium in polyphosphate bodies of *Anacystis nidulans*. *J. Cell Biol.* 67: 80a
16. **Crooke, E., Akiyama, M., Kornberg, A.** The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. 1992. *J. Biol. Chem.* 267(31): 22556-61.
17. **Crooke, E., Masahiro, S., Akiyama B., Narayana, N., Kornberg, A.** 1993. Genetically Altered Levels of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Chem.* 269(9), 6290–6295.

18. **Diaz, E.** 2008. Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Pres.
19. **Fraley, C. D. Rashid M. H., Lee, S., Gottschalk, K. R., Wood, H. J., Pauline J., Brown, M. R. W., Kornberg, A.** 2007. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 (9): 3526–3531.
20. **Gadd, G. M.** 1986. Fungal responses towards heavy metals,. Microbes in Extreme Environments. 83–110. Academic Press, London.
21. **Geissdörfer, W., Ratajczak, A. and Hillen, W.** 1998. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 encoding a putative polyphosphate kinase is induced by phosphate starvation. *Appl Environ Microbiol*. 64:896–901.
22. **Ghorbel, S., Kormanec, J., Artus, A., Virolle, M.** 2006a. Transcriptional Studies and Regulatory Interactions between the *phoR-phoP* Operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* Genes of *Streptomyces lividans* TK24.. *J. Bacteriol*. 188(2): 677–686.
23. **Ghorbel, S., Smirnov, A., Chouayekh, H., Sperandio, B., Esnault, C., Kormanec, J., Virolle M.** 2006b. Regulation of *ppk* Expression and In Vivo Function of *ppk* in *Streptomyces lividans* TK24. *J. Bacteriol.*, 188(17), 6269–6276.
24. **Gonzales, H. and Jensen, T. E.** 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Stafilococcus aureus*. *Microbios*. 93, 179–185.
25. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
26. **Harold, F. M.** 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism and functions. *Bacteriol. Rev.* 30, 772–794

27. Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, D. P, Ward, J. M. Schremp, H. (1985) Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich.

28. Hopwood D.A., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation Norwich.

29. Hopwood, D.A., Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kleser, T., Larke, L.,Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbino-witsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R.,Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell,B.G., Parkhill, J. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141–147.

30. Imazu, K., Tanaka, S., Kuroda, A. Kato, Y. A. J., Ohtake H. 1998. Enhanced Utilization of Phosphonate and Phosphite by *Klebsiella aerogenes*. *App. Environ. Microbiol.* 64(10), 3754–3758.

31. Ishige, K., Kameds, A., Noguchi, T. and Shiba, T. 1998. The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.* 5, 157–162.

32. Kato, J., Yamada, K., Muramatsu, A., Ohtake, H. 1993. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from waste water. *Appl. Environ.Microbiol.* 59, 3744–3749.

33. Kato, J., Yamamoto, T., Yamada, K. and Othake, H. 1993. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. *Gene.* 137, 237–242.

34. **Keasling, J. D., Van Dien, S. J., Pramanik, J.** 1997. Engineering Polyphosphate Metabolism in *Escherichia coli*: Implications for Bioremediation of Inorganic Contaminants. *Biotech. Bioengin.* 58, NOS. 2 & 3.
35. **Keasling, J. D.** 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annu. New York Acad. Sci.* 829, 243–249.
36. **Keasling, J. D. and Hupf, G. A.** 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 743–746.
37. **Keyhani, S., Lopez, J. L., Clark, D. S. and Keasling, J. D.** 1996. Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios.* 88, 105–114.
38. **Kim, K.S., Rao, N.N. and Kornberg, A.** 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7675–80
39. **Kim, H. J., Yang, K. Cho, Y., B. H., Kim, K. Y., Lee, M. C., Kim Y. H., Anderson, A. J., . Kim, Y. C.** 2007. Transcript Accumulation from the *rpoS* Gene Encoding a Stationary-Phase Sigma Factor in *Pseudomonas chlororaphis* Strain O6 Is Regulated by the Polyphosphate Kinase Gene. *Current Microbiology.* 54: 219–223.
40. **Kiyono, M., Omura, H., Omura, T., Murata, S. and Pan-Hou, H.** 2003. Removal of inorganic mercurials by immobilized bacteria having fusion plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 274–78
41. **Kornberg, A., Kornberg, S.R. and Simms, E.S.** 1956. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 20: 215–27
42. **Kornberg, S. R.** 1957. Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 26: 294–300

- 43. Kornberg, A., Rao, N.N. and Ault-Rich'e, D.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89–125
- 44. Kumble, K. and Kornberg, A.** 1996. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* 271:27146–51
- 45. Kulaev, I., Kulakovskaya, T.** 2000. Polyphosphate And Phosphate Pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 709–34.
- 46. Klionsky, D. J., Herman, P. K., Emr, S. D.** 1990. The fungal vacuole: Composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54: 266–292.
- 47. Kulaev, I. S., Vagabov, V. M., Kulakovskaya, T. V.** 2004. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphate. *John Wiley & Sons, Inc.* Second Edition.
- 48. Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A.** 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272: 21240–21243
- 49. Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, T., Kato, J., Takiguchi, N. and Ohtake, H.** 1999. Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14264–14269
- 50. Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J. and Ikeda, T.** 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*. 293:705–8
- 51. Kuroda, A. and Kornberg, A.** 1997. Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 439–442.
- 52. Kusano, S. and Ishihama, A.** 1997. Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes Cells*. 2, 433–441.

53. Lee, S. J., Lee, Y. S., Lee, Y. C., Choi; Y. L. 2006. Molecular characterization of polyphosphate (PolyP) operon from *Serratia marcescens*; *J. Basic Microbiol.* 46(2), 108–115.

54. Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., Kulaev, I. 2006. Inorganic Polyphosphates and Exopolyphosphatases in Cell Compartments of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Under Inactivation of PPX1 and PPN1 Genes. *Biosci Rep.* 26: 45–54

55. Lichko, L. P., Kulakovskaya, T. V., Kulakovskaya, E. V., Kulaev I. S. 2008. Inactivation of *PPX1* and *PPN1* Genes Encoding Exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* Does not Prevent Utilization of Polyphosphates as Phosphate Reserve *Biochemistry (Moscow)*. 73 (9): 985-989

56. MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H. , MacNeil, T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61–68.

57. McMahon, K. D., Dojka, M. A., Pace, N. R., Jenkins, D. and Keasling, J. D. 2002. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4971–4978.

58. McInerney, P., Mizutani, T. and Shiba, T. 2006. Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity *in vitro* and *in vivo*. *Mol Microbiol.* 60: 438–447

59. Mcgrath, J. W., Quinn J. P. 2000. Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the Yeast *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9): 4068–4073.

60. Miyake, T., Shiba, T., Kameda, A., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K. and Noguchi, T. 1999. The gene for an exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.* 6, 103–108.

61. **Mullan, A., Quinn, P., McGrath, J.W.** 2002. Enhanced Phosphate Uptake and Polyphosphate Accumulation in *Burkholderia cepacia* Grown under Low-pH Conditions. *Microb Ecol.* 44: 69–77.
62. **Murata, K., Uchida, T., Kato, J. and Chibata, I.** 1988. Polyphosphate kinase: Distribution, some properties and its application as an ATP regenerating system. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1471–1477.
63. **Noguchi, T. and Shiba, T.** 1998. Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1594–96.
64. **Norris, P. R., Kelly, D. P.** 1977. Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Micro.* 99: 317–324.
65. **Ogawa, N., Tzeng, C.M., Fraley, C.D. and Kornberg, A.** 2000. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182: 6687–93
66. **Ohtake, H., Takahashi, K., Tsuzuld, Y., Toda, K.** 1985. Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Water Res.* 19: 1587–1594.
67. **Pan-Hou, H., Kiyono, M., Kawase, T., Omura, T., Endo, G.** 2001. Evaluation of *ppk*-Specified Polyphosphate as a Mercury Remedial Tool. *Biol. Pharm. Bull.* 24(12) 1423—1426.
68. **Pan-Hou, H., Kiyono, M., Omura, H., Omura, T., Murata, S.** 2003. Removal of inorganic and organic mercurials by immobilized bacteria having *mer-ppk* fusion plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62: 274–278.
69. **Pan-Hou, H., Nagata, T., Kiyono, M.** 2006. Engineering expression of bacterial polyphosphate kinase in tobacco for mercury remediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 777–782.

70. **Pettersson, A., Kunst, L., Bergman, B., Roomans, G. M.** 1985. Accumulation of aluminum by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: An x-ray energy-dispersive microanalysis study. *J.Gen. Micro.* 131: 2545–2548.

71. **Peverly, J. H., Adamec, J. and Parthasarathy, M. V.** 1978. Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant.Physiol.* 62, 120–126.

72. **Pick, U., Bental, M., Chitlaru, E., Weiss, M.** 1990. Polyphosphate hydrolysis a protective mechanism against alkaline stress. *FEBS.* 274:15-18

73. **Pick U, Weiss M.** 1991. Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 97: 1234–1240.

74. **Rachlin, J. W., Jensen, T. E., Baxter, M., Jani, V.** 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 11: 323–333.

75. **Raguzzi, F., Lesuisse, E., Crichton, R. R.** 1988. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 231: 253–258.

76. **Rangarajan, E.S., Nadeau, G., Y., Li, Wagner, J. and Hung M.N.** 2006. The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J.Mol. Biol.* 359: 1249–60

77. **Rao, N.N. and Kornberg A.** 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 1394–400

78. **Rashid, M.H., Rao, N.N. and Kornberg A.** 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225–27

79. **Rashid, M.H. and Kornberg, A.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed swimming swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4885–90
80. **Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D.G. and Hamood, A.N.** 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9636–41
81. **Robinson, N.A, Clark, J.E. and Wood, H.G.** 1987. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that polyphosphates are primers and determination of the size of the synthesized polyphosphate. *J Biol Chem.* 262(11): 5216-22.
82. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor, New York.
83. **Scott, J. A., Palmer, S. J.** 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 221–225.
84. **Sethuraman, A., Rao, N.N. and Kornberg, A.** 2001. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 8542–47
85. **Shi, X., Rao, N.N., Kornberg, A.** 2004. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 17061–65
86. **Shi, X., Kornberg, A.** 2005. Endopolyphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates. *FEBS Lett.* 579: 2014–48
87. **Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K., Noguchi, T.** 2000. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Moscow)*, 65, 315–324.

88. Shirai, M., Kakada, J., Shibata, K., Morshed, M. G., Matsushita T., Nakazawa, T. 2000. Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.*, 49, 513–519.
89. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson B. J., Klenk; D. C. 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Analytical Biochemistry*; 150(1), 76–85.
90. Sola-Landa, A., Moura, R. S., Martin, J. F. 2002. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (10): 6133–6138.
91. Thomson, C. J., Fink, D., Nguyen, L. D. 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence *Genome Biolog.* 3(7): 10201–10204.
92. Tinsley, C.R. and Gotschlich, E.C. 1995. Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infect. Immun.* 63: 1624–30
93. Tsutsumi, K., Munekata, M. and Shiba, T. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim Biophys Acta.* 1493: 73–81
94. Tzeng C. M. and Kornberg, A. 1998. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 29: 381–382
95. Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N. and Zehnder, A. J. B. 1994. Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *J. Biol. Chem.* 269, 29509–29514

- 96. Whitehurst, J., Van Oort, M.** 2009. Enzymes in Food Technology. Blackwell Publishing, USA. pp-19.
- 97. Yalım, İ.** 2010. *Streptomyces coelicolor* Polifosfat Kinaz (*ppk*) Geni Yoksunluğunun Antibiyotik Sentezine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, GYTE.
- 98. Zhang, H., Ishige, K. and Kornberg, A.** 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16678–83
- 99. Zhang, H., Rao, N.N., Shiba, T. and Kornberg, A.** 2005. Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: motility, development, and predation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:13416–20
- 100. Zhu, Y., Huang, W., Lee, S.S. and Xu, W.** 2005. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Rep.* 6: 681–87.

ÖZGEÇMİŞ

Ümmehan Savaş, 29 Temmuz 1983'te İstanbul'da doğdu. 2001 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2006 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.