

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LON PROTEAZ GENİNİN ÇOKLU KOPYALARININ
STREPTOMYCES COELICOLOR A3(2)'DE HOMOLOG
İFADESİ VE ESHERICHIA COLI 'DE HETEROLOG İFADESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

HALİL YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LON PROTEAZ GENİNİN ÇOKLU
KOPYALARININ STREPTOMYCES
COELICOLOR A3(2)'DE HOMOLOG
İFADESİ VE ESHERICHIA COLI' DE
HETEROLOG İFADESİ ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

HALİL YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK
II. TEZ DANIŞMANI
Dr. ÖĞR. ÜYESİ TUĞRUL DORUK

GEBZE

2019

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**STUDIES ON EXPRESSION OF MULTIPLE
COPIES OF LON PROTEASE GENE
HOMOLOGOUSLY IN STREPTOMYCES
COELICOLOR A3(2) AND
HETEROLOGOUSLY IN ESHERICHIA
COLI**

HALİL YILMAZ
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK
II. THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. TUĞRUL DORUK

GEBZE

2019

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

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Prof. Dr. Fatma Neşe KÖK

ÜYE

: Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Streptomyces türleri uzayan ve dallanan hifler şeklinde vejetatif olarak üreyen gram pozitif toprak bakterileridir. *Streptomyces coelicolor* A3(2) en az 5 farklı antibiyotiği üretebilme özelliğine sahip olup genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir model organizma olarak dikkat çekmektedir. *Streptomyces*'lerde, hücre içi protein homeostazından sorumlu olan ATP bağımlı Lon proteazlar ile ilgili yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Sunulan bu çalışmada, *S. coelicolor* A3(2) Lon proteaz enziminin *Escherichia coli*'de ifadesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile *S. coelicolor* A3(2)'de yüksek düzeyde ifadesinin ikincil metabolizmaya etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada öncelikle, PZR ile çoğaltılan *lon* geni, ekspresyon vektörleri olan pET6xHN-C, pET28a(+) ve pET6xHN-N'e klonlanmıştır. Farklı konaklar kullanılarak yapılan çalışmalarda Lon proteininin ekspresyonu görülmemiştir. Bunun üzerine *lon* geninin kodonları *E. coli*'ye göre optimize edilmiş ve gen pET28a(+) ile pET6xHN-N vektörlerine klonlanmıştır. Yapılan bütün denemelere rağmen kodon optimize *lon* geninin ekspresyonu da farklı *E. coli* hücrelerinde sağlanamamıştır. Daha sonra, *S. coelicolor* A3(2)'de homolog ifadesinin sağlanması için *lon* geni, *E. coli*-*Streptomyces* mekik vektörü olan pSPG'nin gliserol ile uyarılabilen P_{glpF} promotörü altına klonlanmış ve rekombinant vektör *S. coelicolor* A3(2) hücrelerine aktarılmıştır. *lon* geninin ifade edildiği RT-qPCR ile gösterilmiş, ardından olası protein bandı da SDS-PAGE jelde tespit edilmiştir. Yapılan antibiyotik ölçümleri sonucunda, fermentasyonun 120. saatinde rekombinant suşun yaban suşa göre aktinorhodin antibiyotiğini 25 kat, undesilprodigiosin antibiyotiğini ise 21 kat daha fazla ürettiği bulunmuştur. Çalışılan farklı katı besiyerlerinde ise rekombinant suşun yaban suştan daha fazla antibiyotik ürettiği ve sporlanma aşamasına daha erken girdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Escherichia coli*, Lon proteaz, Aktinorhodin, Undesilprodigiosin

SUMMARY

Streptomyces species are gram-positive soil bacteria that grow vegetatively in the form of elongated and branching hyphae. *Streptomyces coelicolor* A3(2) can produce at least 5 different antibiotics and draws attention as a frequently used model organism in genetic studies. Studies on ATP-dependent Lon proteases, which are responsible for intracellular protein homeostasis, are very limited in *Streptomyces*. The aim of this study is to determine the expression, purification and characterization of *S. coelicolor* A3(2) Lon protease enzyme in *Escherichia coli* and to determine the effect of high level expression of *lon* gene on *S. coelicolor* A3(2) secondary metabolism. First, PCR amplified *lon* gene was cloned into expression vectors pET6xHN-C, pET28a (+) and pET6xHN-N. Studies using different hosts showed no expression of Lon protein. The codons of the *lon* gene were then optimized for *E. coli* and the gene was cloned into pET28a(+) and pET6xHN-N vectors. Despite all attempts, expression of the codon optimized *lon* gene was not achieved in different *E. coli* cells. Then, for homologous expression in *S. coelicolor* A3(2), the *lon* gene was cloned under the glycerol-inducible P_{glpF} promoter of the *E. coli-Streptomyces* shuttle vector, pSPG, and later recombinant vector was transferred into *S. coelicolor* A3(2) cells. Expression of the *lon* gene was shown by RT-qPCR, and then putative protein band was detected on SDS-PAGE gel. As a result of antibiotic measurements, it was found that at 120th hour of fermentation, recombinant strains produced 25 times more actinorhodin antibiotic and 21 times more undesilprodigiosin antibiotic than the wild type strain. In addition, it was observed that the recombinant strain of *S. coelicolor* A3(2) produced more antibiotics than wild type and entered the sporulation phase earlier in different solid media.

Key Words: *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Escherichia coli*, Lon protease, Actinorhodin, Undecylprodigiosin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, engin bilgi ve tecrübesini, anlayışını, güler yüzünü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen; sahip olduğu ufukla yolumu aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR'in nezdinde yetişmemde büyük ve değerli katkıları olan bütün hocalarımı en samimi sevgimle yad ediyorum.

Laboratuvarda birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli çalışma arkadaşlarım Fatma Müberra CESUR, Ozan TOPÇU, Ğarip DEMİR, Aslı BAYRAKTAR, Nagihan GENEL, Buse ÇINAR, Mouktar Abdi BARKAD, Çiğdem BOZKURT ve Zeynep Tansu ATASAVUM'a teşekkür ederim.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm maddi ve manevi desteklerinden dolayı değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK, Arş. Gör. Zeynep GİRĖİN ERSOY, Zeynep DEMİR ÖKSÜZ ve Öğr.Gör. Şerif YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Mehmet Masum TEKİN, Ömer İLTAŞ, Bayram KAŞ, Ali KAVAT, Cemal YILDIZ ve Ali KAYNAR'a teşekkür ederim.

Hayatımı anlamlandıran, varlığıyla içimi huzurla dolduran, güler yüzü ve umuduyla hayatıma renk katan değerli nişanlım Dilnur Seda ENGİN'e çalışmam süresince göstermiş olduğu destekten dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu günlere gelmemde büyük emeğı olan, bana her zaman güvenen ve gölgesinde soluklandığım çınar olan fedakâr babam Zeki YILMAZ'a, karşılaştığım zorluklarda her zaman bana umut veren ve verdiğim kararlarda beni destekleyen annem Halise YILMAZ'a, sevgi ve ilgilerini hep üzerimde hissettiğim abim Fatih YILMAZ ve ablam Aynur KAPLAN'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Bilime Katkısı ve Literatürdeki Yeri	2
2. AKTİNOBAKTERİLER	3
2.1. Antibiyotik Üretim Fabrikası Olan Streptomyces'ler	5
2.2. Streptomyces'lerde Antibiyotik Biyosentezi	7
3. AAA+ SÜPERAİLE PROTEAZLAR	10
3.1. Lon Proteaz	11
3.1.1. Lon'un Hücresel Süreçlerdeki Rolü	12
3.1.2. Lon Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu	14
4. LON PROTEAZIN SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP MEKANİZMASINDAKİ YERİ	16
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
5.1. Kullanılan Kimyasallar	18
5.2. Kullanılan Enzimler	18
5.4. Kullanılan Cihazlar	19
5.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	19
5.6. Bakteri Soyları	20
5.7. Besiyerleri	21
5.8. Kullanılan Solüsyon ve Antibiyotikler	22
5.9. Kullanılan Plazmidler	24
5.10. Tasarlanan Primerler	27
6. YÖNTEMLER	29
6.1. <i>S. coelicolor</i> A3(2)'den Kromozomal DNA İzolasyonu	29

6.2. <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> Geninin Restriksiyon Enzim Haritasının Çıkarılması	29
6.3. <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması	30
6.4. Agaroz Jel Elektroforezi	31
6.5. PZR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması	31
6.6. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu	32
6.7. “In Fusion Klonlama” Protokolü	32
6.8. Ligasyon Protokolü	33
6.9. <i>E. coli</i> Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması	34
6.10. Transformasyon Yöntemi	34
6.11. Plazmid İzolasyonu	35
6.12. Olası Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Analizleri	35
6.13. Klonlanan <i>lon</i> Geninin Nükleotit Dizisinin Belirlenmesi	35
6.14. Rekombinant <i>lon</i> Proteaz Enziminin Ekspresyonu	36
6.15. <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> Geninin RNA Düzeyinde Ekspresyonunun Gösterilmesi (RT-qPCR)	36
6.16. Western Blot	37
6.17. Rekombinant pSPG/ <i>lon</i> Plazmidin Alıcı <i>E. coli</i> ET12567 Hücrelerine Aktarımı	39
6.18. Yaban Suş <i>S. coelicolor</i> A3(2)’ye Rekombinant pSPG/ <i>lon</i> Plazmidinin Aktarılması	39
6.19. <i>S. coelicolor</i> A3(2)’den Plazmid İzolasyonu	40
7. BULGULAR	43
7.1. <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> Geninin pET6xHN-C Ekspresyon Vektörüne <i>E. coli</i> ’de Klonlanması	43
7.2.1. <i>lon</i> Geninin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinde İfadesi	45
7.2.2. <i>lon</i> geninin <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) Hücrelerinde İfadesi	46
7.3. Kodonları <i>E. coli</i> ’de ifade edilecek şekilde optimize edilmiş <i>lon</i> geni ile Yapılan Çalışmalar	48
7.3.1. Kodon optimize <i>lon</i> geninin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinde İfadesi	48
7.3.2. Kodon optimize <i>lon</i> geninin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Hücrelerinde İfadesi	50
7.3.3. <i>lon</i> proteininin Western Blot Analizi ile tespit edilmesi	51
7.4. Kodon optimize <i>lon</i> geninin pET6xHN-N Plazmidine Klonlanması ve <i>E. coli</i> ’de Heterolog Ekspresyon Çalışmaları	52
7.4.1. Kodon optimize <i>lon</i> geninin pET6xHN-N plazmidine klonlanması	52

7.4.2. pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt} Üzerindeki Kodon Optimize <i>lon</i> Geninin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Hücrelerinde İfadesi	54
7.4.3. pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt} Üzerindeki Kodon Optimize <i>lon</i> Geninin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerinde İfadesi	55
7.5. <i>lon</i> geninin <i>Streptomyces/E. coli</i> Mekik vektörü pSPG'ye Klonlanması ve Rekombinant Plazmidin <i>S. coelicolor</i> A3(2)'ye Aktarılması	56
7.6. <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> Ekspresyonunun Transkripsiyonel Seviyede Gösterilmesi	59
7.7. Homolog <i>lon</i> Ekspresyonunun Protein Seviyesinde Gösterilmesi	59
7.8. <i>lon</i> Ekspresyonunun Antibiyotik Üretimine Etkisi	60
7.9. Farklı Besiyerlerinde <i>lon</i> Yüksek İfadesinin Antibiyotik Üretimine Etkisi	63
8. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kisaltmalar

μL	: Mikrolitre
σ	: Sigma
α	: Alfa
$\sim$	: Yaklaşık
μM	: Mikromolar
Act	: Aktinorhodin
Amp	: Ampisilin
Apr	: Apramisin
ATP	: Adenozin trifosfat
BamHI	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
Bç	: Baz çifti
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CDA	: Kalsiyum bağımlı antibiyotik
dk	: Dakika
EcoRI	: <i>Escherichia coli</i> endonuclease I
EcoRV	: <i>Escherichia coli</i> endonuclease V
EDTA	: N,N,N,N'-tetrametiletildiamin
HCl	: Hidroklorik asit
HS	: Isı şoku
KCl	: Potasyum klorür
KOAc	: Potasyum asetat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani broth
M	: Molarite
MDa	: Milyon dalton
mg	: Miligram

Mg ⁺²	: Magnezyum iyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mmy	: Metilenomisin
MnCl ₂	: Manganez (II) klorid
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
PCD	: Programlı hücre ölümü
ppGpp	: Guanozin tetrafosfat
PPi	: Pirofosfat
pppGpp	: Guanozin pentafosfat
PPK	: Polifosfat kinaz
PPX	: Ekzopolifosfataz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Red	: Undesilprodigiosin
RNA	: Ribonükleik asit
<i>SalI</i>	: <i>Streptomyces albus</i> endonükleaz I
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sn	: Saniye
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Aktinobakterilerin biyoteknolojide kullanım alanları.	4
2.2: <i>Streptomyces</i> 'lerin yaşam döngüsü.	6
2.3: <i>Streptomyces</i> 'in hücre döngüsü.	7
2.4: <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)'nin ürettiği antibiyotikler.	8
3.1: Lon proteaz'ın domain organizasyonu.	11
3.2: Lon proteazın substrat çeşitliliği ve biyolojik fonksiyonları.	13
4.1: Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında PoliP-Lon kompleksi.	17
5.1: Çalışmada kullanılan belirteçler.	20
5.2: pET6xHN-C ekspresyon vektörü (5765 bç).	24
5.3: pET6xHN-C plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).	24
5.4: pET28a(+) plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).	25
5.5: pET28a(+) ekspresyon vektörü (5369 bç).	25
5.6: A) pET6xHN-N ekspresyon vektörü (5754 bç), B) pET6xHN-N plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).	26
5.7: pSPG mekik vektörü (8149 bç).	26
6.1: <i>S. coelicolor lon</i> (2424 bç) genine ait restriksiyon enzim kesim bölgesi.	30
6.2: Ligasyon protokolünde kullanılan formül.	33
7.1: İzole edilen pET6xHN-C vektörü ve jelden saflaştırılan <i>S. coelicolor lon</i> geninin agaroz jel görüntüsü.	44
7.2: In Fusion reaksiyonun transformasyonu sonrasında büyüyen kolonilerden plazmid izolasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesimi.	44
7.3: <i>S. coelicolor</i> A3(2) lon genine ait 2424 bç'lik fragmanın DNA dizisi.	45
7.4: <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerinden izole edilen pET6xHN-C/ <i>lon</i> rekombinant plazmidin doğrulanması ve rekombinant hücreden protein izolasyonu.	46
7.5: <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) hücrelerinden izole edilen pET6xHN-C/ <i>lon</i> plazmidinin doğrulanması ve protein seviyesinde ekspresyon deneyi.	47
7.6: <i>E. coli</i> 'de <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> geninin ekspresyonunun gerçekleşmesi için değiştirilmesi gereken nükleotitleri gösteren rapor.	48

7.7: pET28a/ <i>lon</i> ^{opt} plazmidinin doğrulanması.	49
7.8: <i>E. coli</i> BL21-pET28a/ <i>lon</i> ^{opt} hücrelerinin 0.5 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi.	50
7.9: <i>E. coli</i> pLysS- pET28a/ <i>lon</i> ^{opt} hücrelerinin sırasıyla 0.5 mM ve 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi.	51
7.10: <i>E. coli</i> pLysS- pET28a/ <i>lon</i> ^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi.	52
7.11: Optimize <i>lon</i> geninin PZR ile çoğaltılması ve izole edilen pET6xHN-N vektörü.	53
7.12: Olası pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt} plazmidi izolasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesim sonuçları.	54
7.13: <i>E. coli</i> pLysS-pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi.	55
7.14: <i>E. coli</i> Rosetta/pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi.	56
7.15: <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>lon</i> geninin ve pSPG plazmid vektörünün NdeI ve SpeI kesimi.	57
7.16: Olası pSPG/ <i>lon</i> rekombinant plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> hücrelerinde plazmid izolasyonu ve NdeI ve SpeI restriksiyon enzim kesimi.	58
7.17: <i>S. coelicolor</i> A3(2)'den izole edilen pSPG/ <i>lon</i> rekombinant plazmidin NdeI ve SpeI restriksiyon enzimleri ile ikili kesimi.	58
7.18: <i>S. coelicolor</i> A3(2) yaban suş ve rekombinant suşta <i>lon</i> geninin ekspresyon düzeyi.	59
7.19: <i>S. coelicolor</i> A3(2) pSPG/ <i>lon</i> rekombinant hücrelerinin % 0.1 gliserol ile uyarılmasıyla elde edilen 24 ve 48. Saat protein örnekleri.	60
7.20: Yaban tip ve rekombinant <i>S. coelicolor</i> A3(2) hücrelerinin zamana bağlı büyüme eğrisi.	61
7.21: Yaban tip ve rekombinant <i>S. coelicolor</i> A3(2) hücrelerinin aktinorhodin antibiyotiğini üretme profilleri.	62
7.22: Yaban tip ve rekombinant <i>S. coelicolor</i> A3(2) hücrelerinin undesilprodigiosin antibiyotiğini üretme profilleri.	63
7.23: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının TSA besiyerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.	64

7.24: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının R2YE besiyerlerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.	64
7.25: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının NBM besiyerlerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.	65

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: Çalışmada kullanılan bakteri soyları.	20
5.2: Çalışmada kullanılan besiyerleri.	22
5.3: Çalışmada kullanılan antibiyotikler.	22
5.4: Çalışmada kullanılan solüsyon ve tamponlar.	23
5.5: Çalışmada kullanılan plazmidlerin genel özellikleri.	27
5.6: Çalışma kapsamında tasarlanan primerler.	28
6.1: <i>lon</i> genini çoğaltmak üzere kurulan PZR reaksiyonu.	31
6.2: <i>lon</i> geninin restriksiyon enzim kesimi reaksiyonu.	32
6.3: “In fusion” klonlama reaksiyonu.	33

1. GİRİŞ

Streptomyces’ler, Actinomycetales sınıfına ait, toprakta yaşayan Gram-pozitif bakteriler olup yüksek G+C oranı, büyük doğrusal kromozomları (>8 Mb) ve morfolojik farklılaşmayı içeren karmaşık bir yaşam döngüsü ile karakterize edilirler. Bilinen toplam 11.900 antibiyotiğin %50’sinden fazlasını ürettiği tahmin edilen Streptomyces’ler; antibiyotikler dışında, immünosupresan madde, anti-kanser ajanı, pestisit gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip ikincil metabolitleri üretmektedirler ve bu nedenle özellikle tarım ve ilaç endüstrisi için çok önemli mikroorganizmalardandır [2], [8], [11], [12].

En az 5 farklı antibiyotiği üretme kapasitesine sahip olan *Streptomyces coelicolor* A3(2), genetik olarak araştırılmış en iyi Streptomyces suşu olup, model bir organizma olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır. *S. coelicolor* A3(2) tarafından üretilen antibiyotiklerin stres cevabı temelli mekanizmalar ile tetiklendiği bilinmektedir [3], [8]. Prokaryotlarda en önemli stres cevap mekanizması olan Sınırlandırılmış cevap (Stringent response) özellikle amino asit açlığında tetiklenmekte ve etkisini alarmon adı verilen ppGpp ve pppGpp molekülleri ile göstermektedir [62], [68]. Kuroda ve arkadaşlarının (2001) *Escherichia coli* için önerdiği mekanizmada, stres durumunda üretilen alarmonlar hücre içinde polifosfat (poliP) polimeri konsantrasyonunun artmasına sebep olmakta ve bu polimerin Lon proteaz ile kompleks oluşturmasıyla ribozomal proteinlerin yıkımı gerçekleştirilmektedir. Elde edilen amino asitler de acil durumdan çıkmak için gerekli proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Bilgimiz dahilinde bu döngünün *E. coli* dışında başka bir organizmada olup olmadığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Laboratuvarımızda yürütülmüş olan farklı projeler çerçevesinde, poliP homeostazisinin bozulması durumunda, artması ya da azalması, ikincil metabolit sentezinin arttığı gösterilmiştir [101]. Bir doktora tezi kapsamında *lon* genini tek kopya halinde genomunda bulunduran mutant *S. coelicolor* suşunun antibiyotik üretiminde dramatik bir artış sağlanmıştır (25-40 kat). Aynı şekilde alarmonların da ikincil metabolizmayı uyardığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir [34].

1.1. Tezin Amacı, Bilime Katkısı ve Literatürdeki Yeri

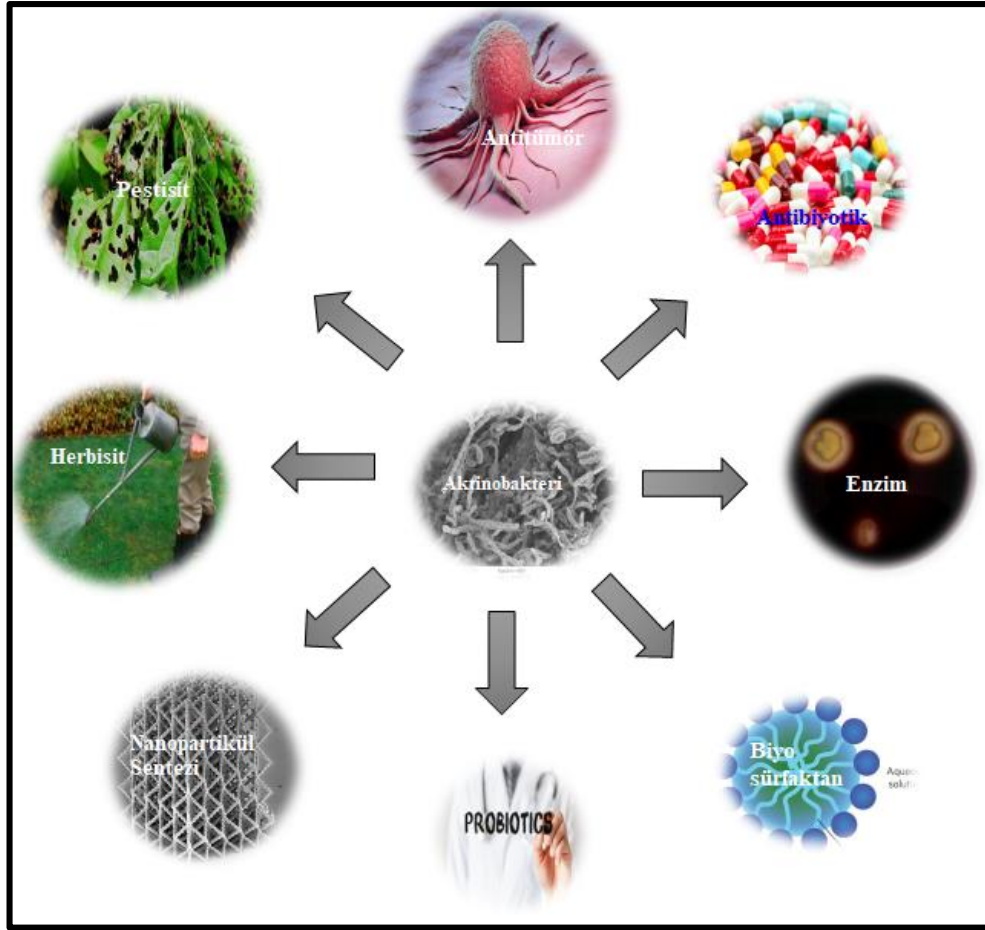
Lon proteaz ile poliP polimerinin kompleks oluşturarak ribozomal proteinleri yıktığı, *E. coli* dışında başka hiçbir organizmada gösterilmemiştir. *lon* geninin tek kopya halinde genomda bulunmasının antibiyotik üretimini tetiklediğinin bilinmesine rağmen [103] çok kopya halinde ifade edildiğinde ikincil metabolizmayı nasıl etkileyeceği de merak konusudur. Sunulan bu çalışmada, *S. coelicolor* A3(2) Lon proteaz enziminin *Escherichia coli*'de ifadesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile *S. coelicolor*'da yüksek düzeyde ifadesinin ikincil metabolizmaya etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *S. coelicolor* A3(2)'ye ait saf Lon proteaz enziminin elde edilmesi, poliP bağlanma çalışmaları için materyal sağlayacak olması bakımından önem taşımaktadır. Çünkü böylece hücrelerin stres ortamına adaptasyonunda poliP'nin ve Lon proteazın önemi ve iş birliği yapıp yapmadıkları ortaya çıkarılacaktır. Bunun yanında, *lon* geninin *S. coelicolor*'da yüksek düzeyde ifade edilmesinin rekombinant suşun büyümesini, ikincil metabolit üretimini nasıl etkilediği de bilinmediğinden, elde edilecek bulgular temel bilime katkı sağlayacaktır.

2. AKTİNOBAKTERİLER

Aktinomisetler, bakteri ve mantar arasında bir yaşam formuna sahip olan, genomik DNA'larında yüksek oranda G+C içeriğine bulunan, Gram-pozitif ve filamentli bakteri grubu olup taksonomik birim olarak bakteri domaini içerisinde bulunan en büyük şubeyi oluşturmaktadır [1]. Bakteri domaini içerisindeki aktinobakteriler 5 alt sınıf, 6 takım ve 14 alttakım şeklinde yerini almaktadır [5]. Çoğu saprofit olan ve toprakta yaşam alanı bulan aktinobakteriler, yaşam döngülerinin büyük bir kısmını, özellikle besin yetersizliğinde, yarı uyku (semidormant) halinde geçirmektedirler [6]. Toprak yüzeyinden 2 m derinliğe kadar bulunabilen aktinomisetler, 1 gram toprakta ortalama 10^6 ile 10^9 hücre olacak şekilde dağılım gösterirler [7]. Toprakta yaşayan diğer bakteriler gibi, termofil olan aktinomisetler bulunmakla beraber, birçoğu mezofil olan aktinomisetler 25-30 °C sıcaklığı arasında optimal büyürler. Sporulasyon sonucunda misel oluşturmaları ile mantarlara benzeyen aktinobakteriler, nukleoid içerisinde organize olmuş kromozoma, peptidoglikan yapıdaki hücre duvarına sahip olması ve bunun yanında antibakteriyel ajanlara karşı duyarlı olmasıyla bakteri domaini içerisinde yer almaktadır [1]. Sahip oldukları geniş çaplı ikincil metabolizma ile şu anda klinik düzeyde kullanılan doğal antibiyotiklerin üçte ikisini üretebilmenin yanında medikal ve endüstriyel açıdan oldukça önemli olan anti-kanser, anti-helmintik ve anti-mantar gibi biyoaktif ikincil metabolitleri de üretebilme kapasitesiyle biyoteknoloji, ilaç ve tarım sektörlerinin vazgeçilmez ayaklarından birini oluşturmaktadırlar (Şekil 2.1) [2], [3]. Aktinobakteri şubesini oluşturan türlere; patojen olan *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* ve *Tropheryma*; toprakta yaşayan *Micromonospora* ve *Streptomyces*; probiyotik olan *Bifidobacterium* vb. bakteriler örnek olarak gösterilebilir [4].

Aktinobakteriler çeşitli alanlardaki önemli uygulamalarda kullanılabilen birincil ve ikincil metabolitlerin üreticisi olarak bilinmektedir. Bununla beraber endüstriyel ölçekte üretilme potansiyeli olan çeşitli biyolojik aktiviteye sahip enzimlerin kaynağı olmaları geleceğin teknolojisi adına umut vericidir. Örnek verilecek olursa bu bakteriler tarafından üretilip dışa salınan amilaz ve lipaz gibi enzimler gıda, tekstil, kağıt ve deterjan endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Proteinleri parçalayan enzim olan proteaz ise aktinobakteri gurubunun en dikkat çekici üyeleri olan

Streptomyces'ler tarafından kültür ortamına salgılanmaktadır. *Streptomyces* içerisinde iyi tanınmış olan *Streptomyces coelicolor* A3(2) bakterisi 60 proteaz, 13 kitinaz, 3 amilaz, 2 pektat liyaz ve 8 selüloz/endoglukanaz enzimlerini üretmektedir [3]. Bu şekilde aktinobakteriler sahip olduğu geniş ve çeşitli metabolik yollar ile toprak ekolojisinde (organik maddelerin dönüşümü ve toprakta humus oluşumu gibi) önemli bir role sahiptirler. Ayrıca antagonistik aktiviteleri sayesinde tohum veya toprak kaynaklı bitkisel hastalıklara neden olan patojenlerle mücadelede önemli yere sahiptirler. Bununla birlikte İmmün cevabını tetikleyen immün düzenleyicileri (immunomodifiers) ve kanser tedavisinde kullanılan enzim inhibitörlerini üretebilmektedirler [4].

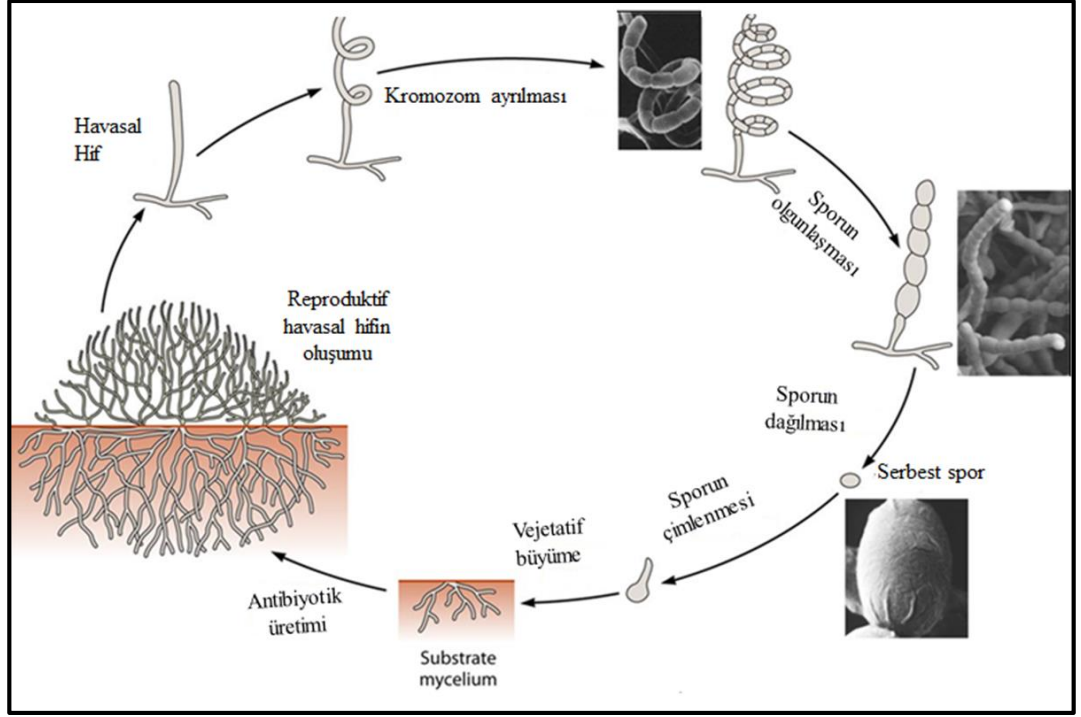


Şekil 2.1: Aktinobakterilerin biyoteknolojide kullanım alanları.

2.1. Antibiyotik Üretim Fabrikası Olan *Streptomyces*'ler

Filogenetik olarak *Streptomyces*, en geniş Aktinobakteri cinsini oluşturup ve Streptomycetaceae ailesinde yer almaktadır. Genetik materyali (DNA) karşılaştırıldığında GC oranı bakımından *Escherichia coli* (%50) gibi diğer bakterilere göre zengin (%70) bir içeriğe sahiptir [3], [8]. *Streptomyces*'ler medikal, veterinerlik ve tarımda kullanılan antibiyotiklerin en önemli kaynakları olarak bilinmektedirler [2]. Çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan antibiyotiklerin %75'i *Streptomyces* türlerinden elde edilmiş olup ayrıca tanımlanan 23.000 ikincil metabolitin %80'i *Streptomyces* türleri tarafından üretilmektedir [8]. Antibiyotikler dışında antifungal, antiviral, antitümör, anti-hipertansif, immünosupresan gibi biyoaktif ikincil metabolitleri de üretmeleri *Streptomyces*'leri biyoteknolojik olarak vazgeçilmez mikroorganizmalar yapmaktadır.

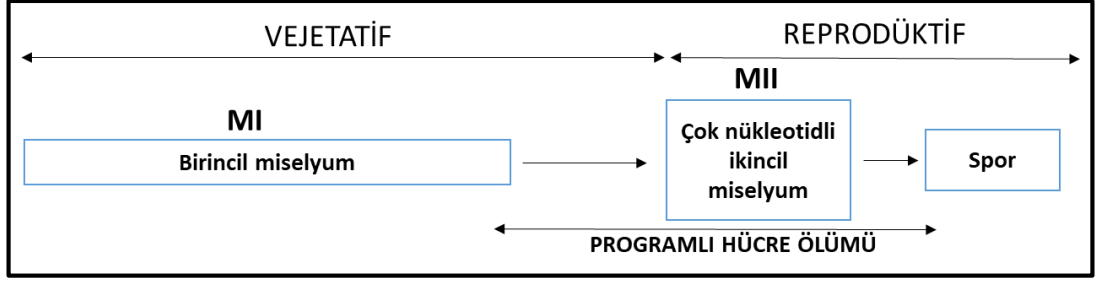
Streptomyces, programlanmış hücre ölümü (PCD) ve sporülasyon evrelerini içeren karmaşık gelişimsel döngüleri olan miselli "çok hücreli" prokaryotik bir model olarak kabul edilir. Katı besiyerinde büyüyen *Streptomyces*'ler substrat miselyum ve havasal miselyum gibi esas olan iki farklı miselyum yapısı oluşturur. *Streptomyces*'lerin gelişimsel döngüleri esas olarak katı kültürlerde meydana gelen sporulasyon aşamalarına odaklanmıştır. Sporun çimlenmesinden sonra tamamen canlı bir vejetatif genç miselyum (MI) yüzeyde yetişir ve bir kısmı programlı hücre ölümüne uğrar. Geriye kalan genç miselyumların segmentleri çok sayıda nükleoid bulunduran ikincil miselyuma (MII) dönüşür [13], [15]. İkincil miselyumlar yüzeye ve agarın içine doğru büyüyerek substrat miselyumunu meydana getirir [12], [13], [14]. Makromoleküler sentezin azalması ile karakterize edilen kısa bir büyüme durması aşamasından (growth arrest phase) sonra hava hifleri substrat miselyumdan dallanarak gelişir. Son olarak, havasal miselyumun uçları hidrofobik spor zincirlerine farklılaşır (Şekil 2.2) [13], [14]. MI, MII ve PCD esas olarak *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 ve *Streptomyces coelicolor* M145'de tarif edilmiştir [13]. Programlanmış hücre ölümü fenomenini içeren bu karmaşık gelişim döngüsü, bakteriyi çok hücreli prokaryotik bir model yapmaktadır [12].



Şekil 2.2: *Streptomyces*'lerin yaşam döngüsü.

Streptomyces venezuelae, *S. griseus*, *Streptomyces albidoflavus* SMF301 ve *Streptomyces brasiliensis* gibi bazı türler dışında *Streptomyces* türlerinin çoğu sıvı kültürde sporlanmazlar. Bu yüzden sekonder metabolit üretimi için çoğu endüstriyel işlem sıvı kültürlerde gerçekleştirilir [18]. Sekonder metabolitler, sıvı kültürde geçici bir büyüme durmasının ardından substrat miselyum tarafından durağan fazda üretilmektedir [15]. Katı kültürde ise sekonder metabolitlerin üretilmesinin başlangıcı havasal misellerin oluşumuna denk gelmektedir [19]. Sıvı kültürlerde *Streptomyces* farklılaşması alanında yapılan çalışmalar büyük ölçüde misel morfolojisi, besin elementlerinin bileşimi ve biyoreaktör tasarımının analizine odaklanmıştır. *Streptomyces*'in sıvı kültürlerinde dört morfolojik sınıf göze çarpmaktadır: “pelet”, “clumps”, “branched hyphae” ve “non-branched hyphae”.

Katı kültürdeki *Streptomyces*'in gelişim evreleri (MI, MII, PCD) ile ilgili yeni bulgular, sıvı kültüre de genişletilmiştir (Şekil 2.3). Katı kültürdekine benzer bir şekilde, vejetatif forma dönüşen spordan, çok çekirdekli misele (MII) farklılaşan genç ve bölmeli miselyum (MI) oluşur. Sıvı kültürde mevcut olan tek misel fazları hidrofobik tabakaları olmayan MI ve MII'dir.



Şekil 2.3: *Streptomyces*'in hücre döngüsü.

Bu şekliyle MII'nin antibiyotik üreten miselyum olduğu gösterilmiştir. Bu, ilk kez antibiyotik üretiminin sıvı kültürlerde farklılaşma ile ilişkilendirildiği çalışma olarak gerçekleştirilmiştir [13], [16], [17]. Ayrıca sıvı kültürlerde MI'nın ömrünün katı ortamdan daha uzun olduğu (katı halde yaklaşık 17 saat, sıvıda yaklaşık 48 saat) bulunmuştur [16], [17].

2.2. *Streptomyces*'lerde Antibiyotik Biyosentezi

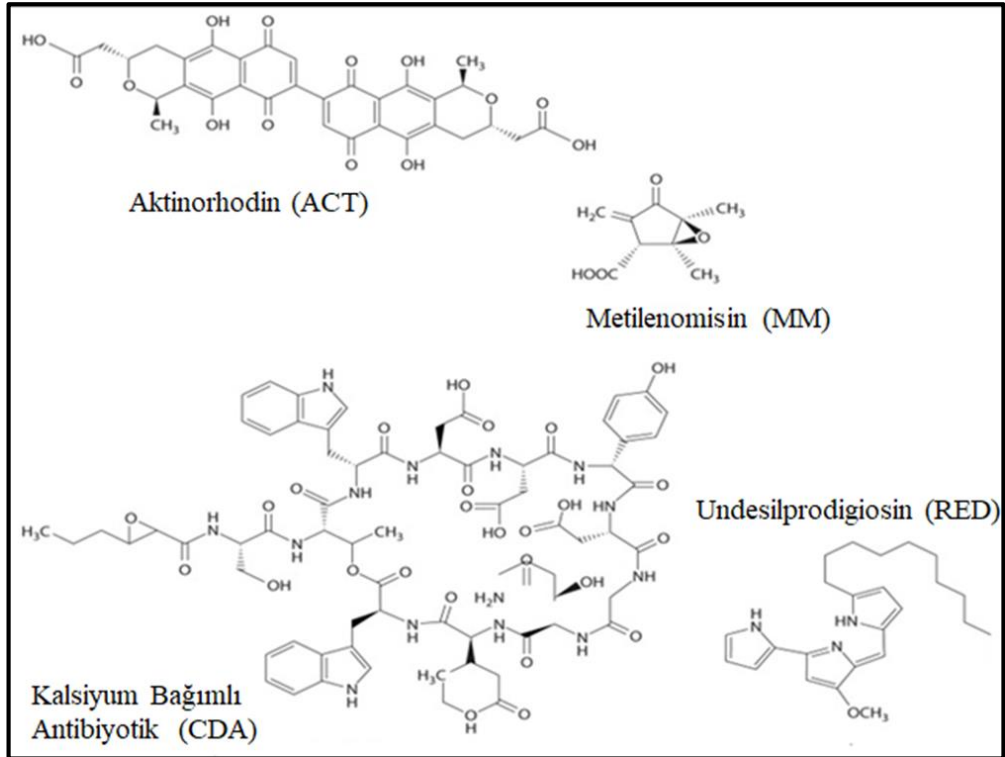
Streptomyces cinsi bakterileri, bol miktarda antibiyotik ve ilgili bileşiklerin kaynağı olup tıbbi olarak önemli antimikrobiyal ve antitümör ajanlarının yarısından fazlasının sağlayıcısıdır. Model organizma olan *Streptomyces coelicolor* A3(2)'de yapılan genetik haritalama çalışmalarıyla, kromozom ve plazmid üzerinde taşınan farklı antibiyotik biyosentez gen kümeleri belirlenmiştir [20]-[23]. Her bir kümenin içerisinde biyosentez genleri dışında regülatör genlerin (cluster-situated regulators [CSRs]) varlığı da tespit edilmiştir [20].

S. coelicolor'ın ürettiği bilinen en az beş farklı antibiyotik bulunmaktadır (Şekil 2.4) [20], [26]. Bunlar Aktinorhodin (ACT), Undesilprodigiosin (REDs), yapısal olarak tamamiyle karakterize edilmemiş Poliketid (CPK), kalsiyum bağımlı antibiyotik (CDA) ve Metilenomisin antibiyotikleridir.

ACT pH-duyarlı medikal olarak zayıf bir antibiyotiktir ve biyosentezi *act* gen kümesinin 5 farklı transkripsiyon ünitesi tarafından kontrol edilmekte olup bu ünitelerinin 4 tanesi birden fazla gen içermektedir. Bu beş transkripsiyon birimi, N-terminalindeki helix-turn-helix (HTH) domaini vasıtasıyla hedef promotörlere bağlanan ve transkripsiyonu aktive eden ActII-ORF4 proteini tarafından düzenlenmektedir. ActII-ORF4, *Streptomyces* antibiyotik düzenleyici proteinler (SARP'ler) adlı bir protein ailesinin kurucu üyesidir [20], [27], [28].

Pirol bazlı Undesilprodigiosin (REDs)'in sentezi ribosomal olmayan peptid sentaz ve yağ asidi sentaz olmak üzere iki ana yolak ile ilişkilendirilmiştir. Undesilprodigiosin sentezinden sorumlu *red* genlerinin regülasyonu RedD ve RedZ adı verilen iki CSRs (cluster-situated regulators) proteinleri tarafından regüle edilmektedir. Biyosentez genlerinin aktivasyonundan sorumlu olan *redD* geni ise RedZ proteini tarafından kontrol edilmektedir [20], [29], [30].

cpk gen kümesi, yapısı hala tespit edilmemiş sarı pigmentli bir poliketid türevidir. Metilenomisin (MM) ise otonom kalabilen veya kromozom içine entegre olabilen büyük bir doğrusal plasmid olan SCP1 üzerindeki *mmy* genleri tarafından kodlanır. *cpk* ve *mmy* genleri küçük bir otoregülatör molekülü ile düzenlenir [20].



Şekil 2.4: *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin ürettiği antibiyotikler.

Antibiyotik üretimi ve morfolojik farklılaşma genellikle açlık veya çevresel değişiklikler hızlı vejetatif büyümenin sonunu getirdiğinde aktive olur. Endüstriyel seviyedeki antibiyotik üretimi fermantasyon koşullarına büyük ölçüde bağlı olup bir yandan besin ve antibiyotik için öncü madde sağlama ile diğer taraftan baskılayıcı etkileri olan karbon, azot ve fosfat kaynakları arasında denge kurulmasına ihtiyaç vardır [20], [25]. *Streptomyces* morfolojisi, besiyeri içeriği ve sekonder metabolit

üretimiyle alakalı çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur [14]. Antibiyotik üretimi gibi sekonder metabolizmaya ilişkin pek çok endüstriyel süreç sıvı besiyerlerinde gerçekleştirilmektedir [14]. İlk etapta, çimlenen spor hücreleri misel yapılarını oluşturur. Genç vejetatif miseller, pelet oluşumunu başlatır. Zamanla hücre yoğunluğu artar ve pelet merkezindeki hücreler ölmeye başlar. Bu aşamada hücre yoğunluğunun azaltılması, daha az sayıda ve daha büyük peletlerin oluşmasına ve ikinci misel oluşumu, antibiyotik üretimi gibi süreçlerin gecikmesine yol açmaktadır. İkinci çok nukleuslu misel gelişimi, hücrelerin ikinci bir büyüme fazına geçmesini sağlar ve böylece aktinorhodin ile undecilprodigosin üretimi başlatılmış olur [14], [15].

İki bileşenli sistem olan PhoR-PhoP (prokaryotlar arasından oldukça yaygın) *Streptomyces coelicolor*'da fosfat kontrolü için başlıca sistem olup, *act* ve *red* genlerinin transkripsiyonunu direkt veya direkt olmayan yollarla etkileyerek ACT ve RED antibiyotiklerinin biyosentezini tetiklemektedir [20], [31], [32].

Amino asit açlığında aktive olan ve ribozoma bağlı bir protein olan RelA tarafından sentezlenen guanozin tetrafosfat (ppGpp) ve pentafosfat (pppGpp) alarmonları rRNA ve tRNA sentezlerini inhibe etmekle beraber bazı stres genlerinin aktivasyonu için alternatif sigma faktörlerinin ifadelerini tetiklemektedir. *relA* mutantlarının ACT antibiyotiğini üretemediği gösterilmiştir. Alarmon birikmesinin RED ve ACT antibiyotiklerinin üretimini tetiklediği farklı çalışmalarla gösterilmiştir [20], [33], [34].

3. AAA+ SÜPERAİLE PROTEAZLAR

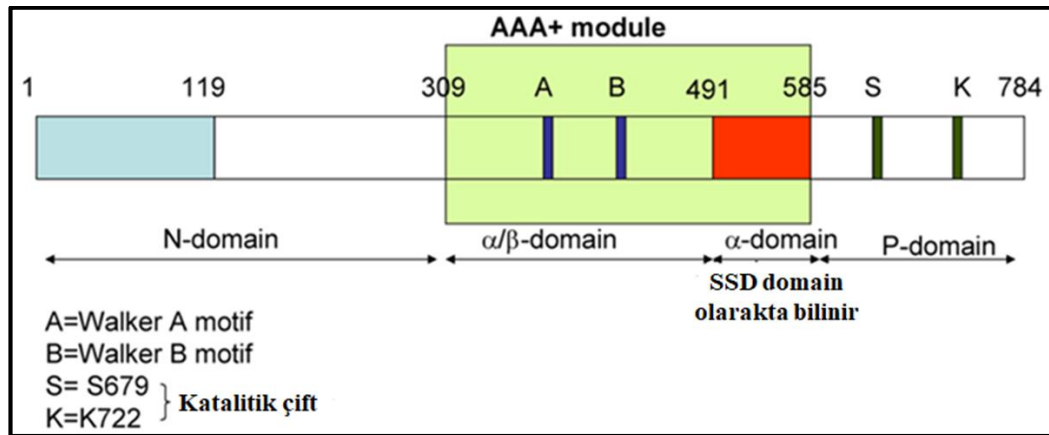
HücreSEL boyuttaki protein yıkımı, protein homeostazında önemli bir role sahip olup protein kalite kontrol ağlarındaki şaperon sistemleri ile birlikte, proteinlerin hücreSEL ortamlarında düzgün çalışmasını sağlar. AAA + proteazları (AAA: hücreSEL faaliyetlerle ilişkili ATPaz'lar), proteinleri tanımak, denature etmek ve parçalamak için yaşamın tüm domainlerinde bulunan çok hassas bir spesifiteye sahip multimerik makinelerdir. AAA + protein süperaillesinin üyeleri prokaryotik hücrelerde protein homeostazının birçok farklı yönüne katkıda bulunmaktadır. ATP-bağımlı proteazlar, kısa ömürlü düzenleyici proteinleri parçalayarak sinyal iletimi, hücre döngüsü ve gen transkripsiyonu gibi hücreSEL süreçleri kontrol eden böylece hücre içi homeostazın kurulmasında oldukça önemli yere sahip proteazlardır. Proteazlar ayrıca yanlış katlanmış ve agregre olmuş proteinleri hücreden temizler ve hücre yüzeyinde adaptif immün yanıtının bir parçası olarak gösterilecek peptidlerin bir kısmını üretir. Örnek olarak, *E. coli*'de AAA+ süperaillesine bağlı olan Lon ve FtsH proteazları verilebilir. Lon proteaz, herbiri 86 kDa molekül ağırlığında olan alt ünitelerden altı kopya içerir ve böylece yaklaşık 520 kDa'luk bir kompleks oluşturmaktadırlar. *E. coli* Lon proteaz, yalnızca yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu değildir, aynı zamanda SOS cevabında birçok önemli düzenleyici fonksiyona sahiptir [35]. Ökaryotların organellerinde, bu fonksiyonlar ClpAP, ClpXP, HslUV, FtsH ve Lon proteazlar gibi proteazom analogları tarafından yerine getirilir. ATP-bağımlı proteazlar nispeten az sekans benzerliği göstermesine rağmen, ortak bir mimariyi paylaşmaktadırlar [45]. Substratın tanınması direkt olarak ATP-bağımlı proteazın AAA+ domaini tarafından veya bir adaptor proteini yardımıyla veya indirekt olarak ek bir domain tarafından yönetilebilir. ATP-bağımlı proteazlar, hedef proteinin N-terminal veya C-terminali'nde lokalize olmuş yapılandırılmamış bir peptit dizisine bağlanırlar.

Bu “parçalama etiketi” (degradation tags)’nin tanınması proteolizis işleminin biricik belirleyicisi olabilir. Örneğin, *E. coli*'de bir kalite kontrol sistemi, biyosentezi normal şekilde tamamlanamayan proteinlerin C-terminaline “ssrA tag” dizisini (AANDENYALAA) ekleyerek bu tamamlanmamış proteinin, eklenmiş etiketi ile ClpXP veya ClpAP gibi proteazlar tarafından hedeflenmesini sağlamaktadır [40]-[44]. Bütün bu proteazlardaki katalitik işlemde sorumlu olan proteolitik alanlar

kompleksin içine derinlere gömülü halde bulunur ve katlanmış proteinlerin içinden geçmesine izin vermemek adına çok dar kanallardan oluşur [2]-[5]. Bu düzenleme, proteinlerin istemeyen parçalanmasını önler. ATPaz alt birimleri, proteolitik kanalın girişinde yer almakta böylece kanalın açılmasını katalize edip degradasyon için hedef proteinlerin seçilmesini ve unfold hale getirilmesini sağlamaktadırlar (Şekil 3.2) [45]-[48].

3.1. Lon Proteaz

İlk olarak *E. coli*'de tanımlanan Lon proteaz, prokaryot organizmalardan ökaryotik organizmalara kadar her çeşit canlıda bulunan önemli bir enzimdir [53], [62]. Lon proteazın tüm kristal yapısı henüz bilinmemesine rağmen *E. coli* Lon'unun karboksil-terminal alanının kristalizasyonu, Lon'un halka şeklinde bir hekzamer oluşturduğunu göstermiştir [54], [62]. Her bir alt birimi 3 domain içeren Lon proteazın domainleri; substratın tanınması ve bağlanması ile ilişkili olan amino-terminal domain, polifosfat ve DNA bağlanmasından sorumlu olan ATPaz domaini (A domain) ve proteolitik aktif bölgeyi içeren karboksil-terminal domain (P domain)'dir (Şekil 3.3). Bununla birlikte A ve P bölgeleri arasında bulunan ilave bir bölgenin, SSD domaininin (sensör ve substrat ayırma domaini), substrat tanınmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece, Lon hem ATPaz hem de proteolitik aktif bölgelerini tek bir polipeptit zincirinde taşır. Bu organizasyon aynı zamanda HflB (FtsH) proteazında da bulunur. Fakat Clp ailesinde bu iki fonksiyon ayrı polipeptit zincirlerinden kodlanır.

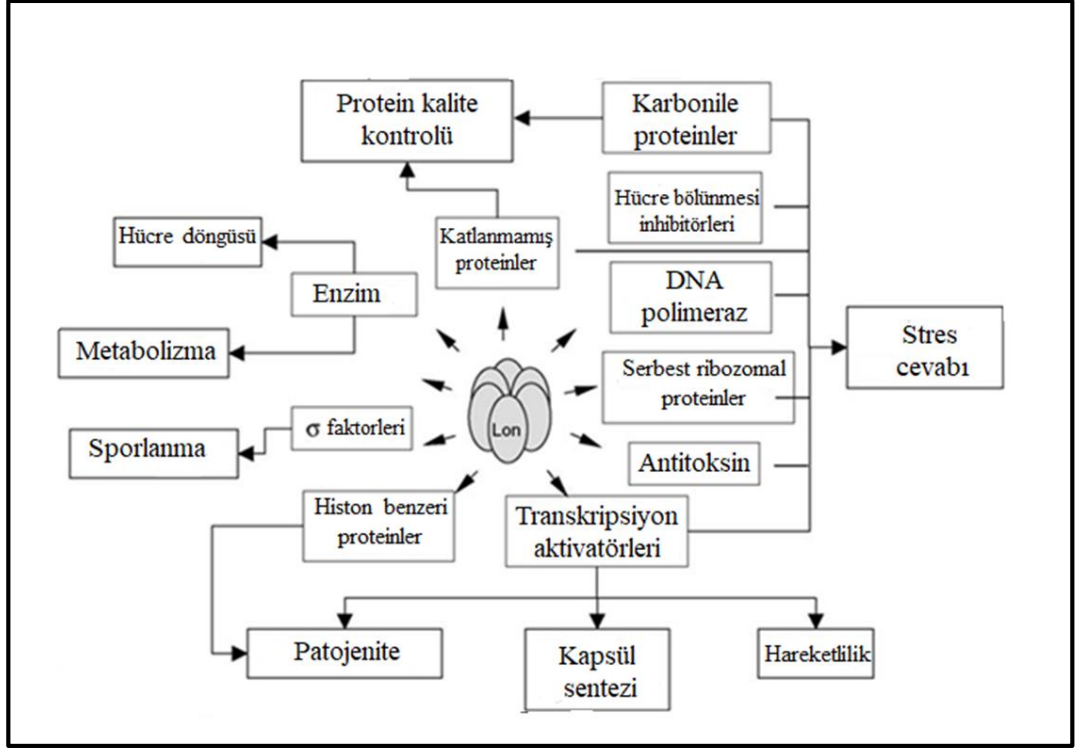


Şekil 3.1: Lon proteaz'ın domain organizasyonu.

3.1.1. Lon'un Hücresel Süreçlerdeki Rolü

Hücre içi homeostazinin korunması adına besin kıtlığı stresine cevap, hücre bölünmesi ve farklılaşması, protein geri dönüşümü kontrol mekanizması (Şekil 3.4) gibi çeşitli mekanizmalarda çok önemli görevleri üstlenen Lon proteaz, prokaryotlardan yüksek yapıli organizmalara kadar çok çeşitli canlı gurubunda bulunmaktadır. Bakterilerde, Lon mutantları, anormal proteinlerin parçalanmasında önemli bir düşüş sergiler ve bu şekliyle Lon'un bir kalite kontrol proteaz olarak rolünü gösterir. *E. coli*'de Lon, bakteriyofaj λ N proteini, SulA hücre bölünme düzenleyicisi, kapsül sentezinin pozitif regülatörü Rcs gibi kısa ömürlü düzenleyici proteinlerin seçici olarak parçalanması için de önemlidir [62]. *Caulobacter crescentus* bakterisinde, Lon seçici olarak Hücre Döngüsü Düzenleyici DNA Metiltransferaz'ı (CcrM) parçalayarak, kromozomal DNA'nın metilasyonunu ve hücresel farklılaşmayı düzenler. *Brucella abortus* ve *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*S. typhimurium*) gibi patojen bakterilerde Lon, merkezi transkripsiyon düzenleyici faktör olan HilA'yı parçalayarak, konakçı istilası için gerekli virölans genlerinin ekspresyonu için doğru zamanlamayı kontrol eder [63]. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*'da Lon indüksiyonunun organizmanın antibiyotik tedavisine karşı adaptif direncine katkıda bulunduğu öne sürölmüştür. Lon'un ayrıca, proteaz aktivitesinden bağımsız olarak bir şaperon benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Memelilerde, endoplazmik retikulum (ER), nükleus ve mitokondri arasındaki bir stres yanıt ağının Lon ekspresyonunu düzenlediğı ve böylece ER stresi ve hipoksi sırasında sitoprotektif bir işlev sağladığı gösterilmiştir [64].

E. coli Lon'unun spesifik olmayan bir şekilde DNA'ya bağlandığı bilinmektedir. Bununla birlikte, insan Lon'u, spesifik olarak insan mitokondriyal DNA'sının tek zincirli GT bakımından zengin bir DNA dizisine bağlanır. Kuroda ve arkadaşlarının *E. coli*'de yaptığı deneylerde ise hem poliP hem de DNA bağlanma yerlerinin Lon'un ATPaz bölgesinde lokalize olduğu bulunmuştur. Bu, poliP'nin neden Lon'a bağlanma için DNA ile rekabet ettiğini açıklar [68].



Şekil 3.2: Lon proteazın substrat çeşitliliği ve biyolojik fonksiyonları.

Genel olarak, *lon* geni yaşamsal bir gen değildir [58]. Bununla birlikte, bazı bakteri türlerinin Lon mutantları, tamamen canlı olsalar bile, bazı hücresel kusurlar sergilerler. Örneğin, Lon katlanmamış protein parçalanmasında rol oynayan ana proteaz olması dolayısıyla *E. coli lon* mutantları anormal proteinleri biriktirir ve ayrıca RcsA ve SulA stabilizasyonu nedeniyle mukoid koloniler ve uzun filamentler oluştururlar [65], [66], [67]. Aynı zamanda *E. coli lon* mutantları besin kıtlığına hızla adapte olamamaktadır, çünkü normalde adaptif enzimlerin sentezi için gerekli olan bir amino asit havuzunu oluşturacak olan serbest ribozomal proteinleri parçalayamamaktadırlar [68]. Bazı bakteriler, örneğin, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* genomlarında bir *lon* ortoloğundan yoksundur, oysa *B. subtilis* ve *M. xanthus* gibi diğer bakteri türleri, *lon* geninin iki kopyasına sahiptir. *M. xanthus*'te *lonV* geninin yaşamsal faaliyetler için çok önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır [62], [69]. *lonV*'nin aksine, aynı organizmada *lonD* (*bsgA*) geninin canlılık için gerekli olmadığı bulunmuştur. *lonD* geni silinmiş *M. xanthus* mutantlarının spor formuna geçemediği gözlemlenmiştir [62].

Ökaryotik organizmalarda, *lon*'un silinmesi hücresel hasara yol açmaktadır. Örneğin mayada yapılan çalışmaya göre *lon* (*Pim1*) mutant suşların solunumda yetersiz olduğu ve fermentasyona uygun olmayan karbon kaynaklarında

büyüyemedikleri görülmüştür [70]. Mitokondriyal proteinlerin birikmesinden kaynaklanan elektronca yoğun inklüzyonlar mitokondriyal matrikste birikme eğilimi göstermektedirler. Memeli hücrelerinde ise mitokondriyal Lon proteaz, oksidatif olarak hasar görmüş proteinleri uzaklaştırır, iç zar komplekslerinin bir araya getirilmesini sağlar ve yaşa bağlı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilir. Mitokondriyal Lon yaşamsal bir protein olup Lon aktivitesinin azalması hücre bölünmesini bozar ve nekroza neden olur. Lon'un tamamen aktivitesinin durdurulması ise apoptoza yol açar [71].

3.1.2. Lon Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu

E. coli, *Bacillus subtilis* ve *Streptomyces lividans*'ta yapılan çalışmalarda, *lon* geninin, ısı şoku (HS) regulonunda yer aldığı gösterilmiştir. Fakat *lon* geninin ifadesinin ısı ile uyarılması genel bir özellik olmayıp *M. xanthus* ve *B. brevis* organizmalarının *lon* genleri ısı ile uyarılmamaktadır [57], [62]. Mikroorganizmaya bağlı olarak, HS genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesi ya pozitif ya da negatif kontrol altındadır. *E. coli*'de, HS regulonunun transkripsiyonel aktivasyonuna σ^{32} faktörü aracılık eder. Normal koşullar altında, DnaK moleküler şaperon sistemi ve ATP-bağımlı proteazlar, özellikle HflB, σ^{32} faktörünün etkisiz hale gelmesine katkıda bulunur.

HS koşulları altında, DnaK ve proteazların ilgisinin katlanmamış proteinlere kayması sonucunda, σ^{32} faktörünün konsantrasyonu artar ve HS gen ekspresyonunu yönlendirir. HS genlerinin spesifik sigma faktörleriyle transkripsiyonel aktivasyonu prokaryotlarda genel bir özellik değildir. Bakteriyel türlerin çoğunda, HS genleri normal şartlar altında spesifik represörler tarafından negatif olarak düzenlenir. Yine de sonuç aynıdır ve moleküler şaperonlar ile ATP bağımlı proteazlar, kendi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle ederek kendi sentezlerini düşürür. *S. lividans* *lon* geni, HspR (ısı şoku protein regülatörü) / HAIR (HspR ile ilişkili ters tekrarlama) regulonunda yer almaktadır [58]. Normal koşullar altında bu regulon, DnaK şaperon ve HspR baskılayıcı arasında oluşan kompleks tarafından negatif olarak kontrol edilir. Isı şoku altında, DnaK yanlış katlanmış proteinlerle etkileşime girerek HspR'yi serbest bırakır ve bu haliyle HspR, HAIR regulonunu regüle eden genleri represe edemez duruma gelir.

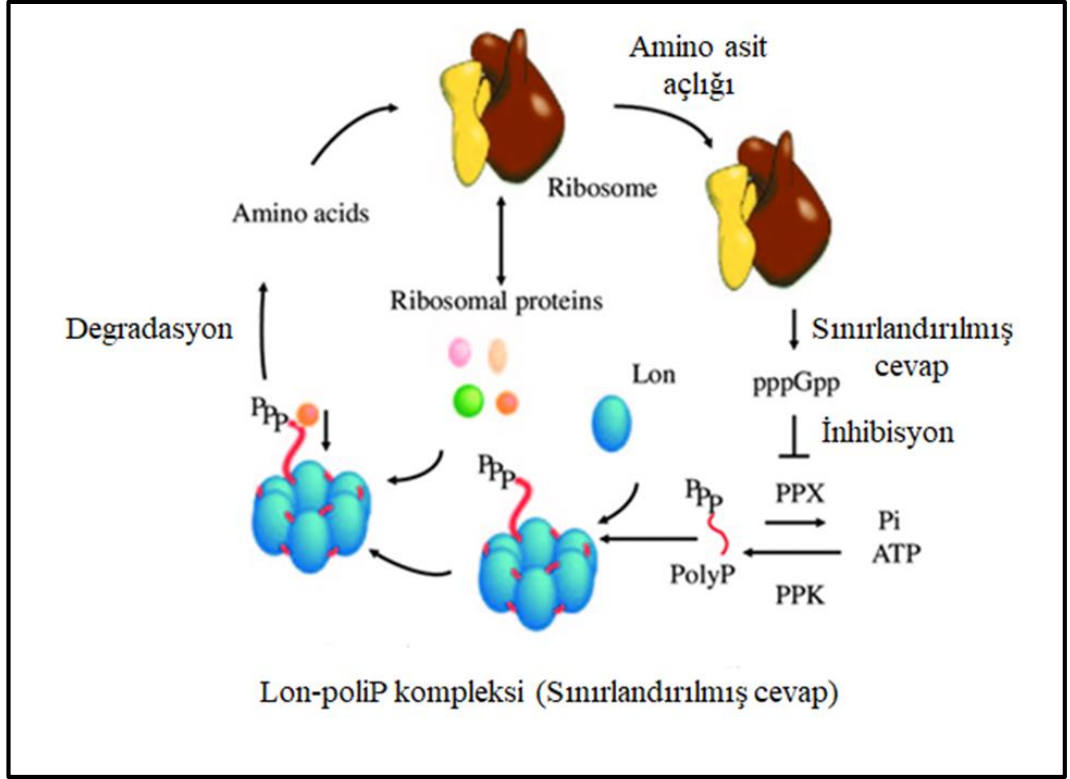
HspR'ın negatif kontrolü altında olduğu bilinen *S. lividans lon* geninin aynı zamanda ClgR'nin pozitif kontrolü altında olduğu bilinmektedir [59], [62]. ClgR, hücre döngüsü sırasında belirli bir zamanda geniş çaplı bir degradasyon için Lon sentezini tetikleyebilir. ClgR ayrıca ClpP ve ClpC proteazlarının gen ekspresyonunu da pozitif olarak düzenlemektedir. ClgR'nin aynı zamanda Clp proteinleri tarafından parçalanması, HS düzenleme ağıında σ^{32} için olduğu gibi bir geri besleme döngüsüne tabi olabileceğini göstermektedir [60], [62].

4. LON PROTEAZIN SINIRLANDIRILMIŞ CEVAP MEKANİZMASINDAKİ YERİ

1950'lerden bu yana, prokaryotlarda amino asit açlığı koşulları altında protein degradasyonunun arttığı bilinmektedir [88], [89]. Amino asit açlığının hücrede tRNA ve rRNA sentezini durdurduğu ve bu mekanizmanın “Sınırlandırılmış cevap” olarak isimlendirildiği bilinmektedir [88], [90]. Sınırlandırılmış cevap, besin kıtlığı açısından strese maruz kalmış hücrelerde kilit bir sinyalleşme molekülü olan guanosin tetrafosfat (ppGpp)'a bağlıdır. ppGpp'in sentezi, boş ribozomların ve yüklenmemiş transfer RNA'larının (bağlı amino asitleri olmayan tRNA'lar) varlığında indüklenir. Bu molekül, amino asit açlığının neden olduğu transkripsiyonel etkilerin çoğunu bütünleştirir. Hızlı büyüme ile alakalı proteinlerin ve ribozomal proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu kapatır ve tükenmiş metabolitleri takviye eden biyosentetik yollar için gereken genleri çalıştırır. Bu metabolik tepkiler, hücrelerin amino asit açlığından kaçmalarını sağlamak ve yeni çevre koşullarına uyum sağlamak için çok önemlidir. Eğer ortam aniden amino asitlerce fakir duruma gelirse, yeni enzimler sadece protein geri dönüşümü tarafından serbest bırakılan amino asitlerden sentezlenebilir [88]. Bu nedenle, açlık dönemlerinde stabil olan proteinlerin geri dönüşümü artmaktadır.

Amino asit açlığı sırasında, ATP'ye bağlı proteazların proteinleri bozması, bu özel duruma uyum için gerekli olan spesifik enzimlerin (örneğin, amino asit biyosentetik enzimlerin) sentezi için kullanılacak olan amino asit havuzunu arttırmak için uyarılır [62], [74]. Besin kaynağının azalması ve açlığın başlangıcında *E. coli*, ortofosfat rezidülerinin doğrusal bir polimeri olan poliP'yi biriktirir. PoliP, Lon'a bağlanır ve aktivitesini serbest ribozomal proteinlere, örneğin S2, L9, L13'e yönlendirir. Bu nedenle, poliP, serbest ribozomal proteinlerin parçalanmasını Lon aracılığı ile uyararak *E. coli* hücrelerinin amino asit açlığından kurtulmasına yardımcı olur (Şekil 4.1) [62], [68]. PoliP'nin sadece Lon'un substrat tercihini etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda enzimin oligomerik durumunu da etkilediği görülüyor [62], [75]. Şaşırtıcı bir şekilde ppGpp, poliP birikimi için de gerekli olup amino asit açlığı sırasında RelA proteini tarafından sentelenen ppGpp, poliP'yi parçalayan enzim olan ekzopolifosfataz enziminin (PPX) aktivitesini inhibe ederek poliP'nin birikmesini sağlamaktadır. pppGpp ve ppGpp alarmonlarının sentezinden sorumlu olan relA ve

spoT genleri mutasyona uğratılmış olan bir *E. coli* mutan, poliP birikimini gerçekleştiremediği görülmüştür[88], [91], [92]. Bu sebeple amino asit açlığı gibi stres koşullarında poliP-Lon kompleksinin yönlendirilmiş olarak amino asit kaynağı oluşturmak üzere protein parçalamasının hücre için hayati öneme sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1: Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında PoliP-Lon kompleksi.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Tris (Merck), EDTA (Merck), D (+) Glukoz (Merck), KOAc, İzopropanol, Agaroz (Sigma Aldrich), Pepton (Bacto™), NaCl (Sigma-Aldrich), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), K₂HPO₄ (Merck), K₂SO₄ (Merck), TES Buffer (Applichem), Maya özütü (Bacto™), Agar (Merck), NaOH (Merck), SDS (Merck), MBISafe Dye™ nükleik asit boyama solüsyonu (İNTRON Biotechnology), Asetik asit (Riedel de Haen), Mannitol (Merck), Bacto kazamino asit (BD), Fenol (Sigma Aldrich), Kloroform (Sigma Aldrich), İzosamil alkol (Sigma Aldrich), %99 Gliserol (Sigma Aldrich). Pepton (Merck), Süktroz (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), MOPS (Sigma Aldrich), CaCl₂ (Merck), MgCl₂ (Merck), KCl (Riedel de Haen), Metanol (Sigma Aldrich), CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Merck).

5.2. Kullanılan Enzimler

T4 DNA ligaz (Jena Bioscience), Ribonükleaz A (Thermo Scientific™), Lizozim (Sigma), *EcoRV* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), *XhoI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), *Sall* Restriksiyon Endonükleaz (Jena Bioscience), *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), *NdeI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), *BamHI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™), Klenow Fragment (Merck) ve Q5 DNA polimeraz (NEB, Biolabs), *SpeI* Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™).

5.3. Kullanılan Kitler

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kiti (MN, Germany), NucleoSpin® Plasmid QuickPure Plazmit İzolasyon Kiti (MN, Germany), NucleoSpin® RNA İzolasyon Kiti (MN, Germany), In-Fusion® HD Klonlama kiti (Clontech®), His-tagged rekombinant protein purification His60 Ni Superflow Resin (Clontech®),

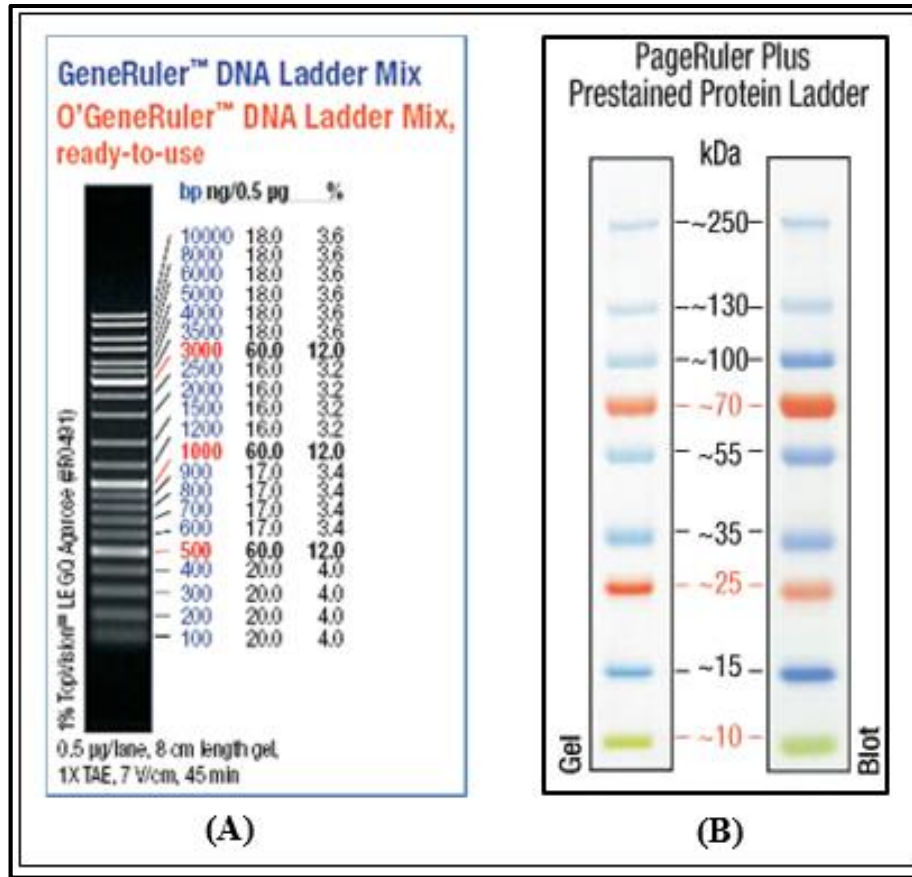
iPierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kiti (Thermo Scientific™), Iscript Advanced cDNA Synthesis KIT, cSYBR Green qPCR ana karışımı (Bio-rad Laboratories, ABD).

5.4. Kullanılan Cihazlar

-80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), +4 °C ve -20 °C Buzdolabı (Arçelik), Masa Üstü Santrifüj (VWR, Microsent 17R), Ultrasantrifüj (Beckman Coulter™ Avanti™ J-30I Centrifuge), Dikey Elektrophorez Sistemi (Bio-Rad Mini-Sab Cell CT), AgaroZ Jel Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystem, c600), Yatay Elektrophorez Sistemi (Biorad, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (Biorad, PowerPac Basic), Otoklav (Hırayama, Hicla HVE-50), BioSpec-nano (UV1800 Shimadzu/Biotech), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Spektrofotometre (Biorad, Smartspec 3000), Su banyosu (Techne, TE-10A Tempette), Buz makinesi (Bar-Line BF85), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), Mikrodalga Fırın (Samsung), Western Blot Transfer Tankı (Hoefer TE22), Western Blot Yürütme Tankı (Hoefer SE260), Western Blot Güç Kaynağı (Hoefer RS300 B), Membran Görüntüleme Cihazı (Biorad), RT-PCR StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.5. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

AgaroZ jel yürütülmesi deneyinde DNA moleküler belirteç olarak (MBI Fermantas, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Marker, SM0311); SDS-PAGE çalışmasında ise Protein Belirteci (Thermo Fisher Scientific, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, SM0671 ve BioLab, Protein Ladder 10-250kDa, P7703S) kullanılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Çalışmada kullanılan belirteçler. **A)** 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Fermantas, SMO311), **B)** Protein Belirteci (Fermantas SM0671).

5.6. Bakteri Soyları

Yapılan çalışmada kullanılan ve genetik manipülasyon yapılan bakteri soyları Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1: Çalışmada kullanılan bakteri soyları.

Bakteri Türleri	Genotip Özellikleri	Kaynak
<i>E. coli</i> TG-1	$\Delta(lac-pro) supE thi hsd5/F'$ $traD36 proA^+B^+lacI^q \Delta(lacZ)$ M15	[78]
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>sup44, relA1</i> λ-, (σ80 dLacZAM15), <i>D(lacZYA-argF)</i> U169	[77]
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	[79]

Tablo 5.1: Devam.

<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	dam, dcm, hsdS, cat, tet/ tra, neo, RP4	[80]
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Prototrofik yaban tip	[81]
<i>E. coli</i> TG-1/pET6xHN-C/ <i>lon</i>	pET6xHN-C/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>E. coli</i> TG-1/pET6xHN-N/ <i>lon</i> ^{opt}	pET6xHN-N/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>E. coli</i> TG-1/pET28a/ <i>lon</i> ^{opt}	pET28a/ <i>lon</i> ^{opt} plazmidini taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>E. coli</i> TG-1/pSPG/ <i>lon</i>	pSPG/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>E. coli</i> ET12567/ pSPG/ <i>lon</i>	pSPG/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002) pSPG/ <i>lon</i>	pSPG/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma
<i>S. coelicolor</i> A3(2)/pSPG/ <i>lon</i>	pSPG/ <i>lon</i> plazmidi taşıyan rekombinant suş	Bu çalışma

5.7. Besiyerleri

Sunulan çalışmada *E. coli* hücrelerinin büyütülmesi için Luria Bertani ve bu besiyerinin katı hali olan Luria Bertani Agar kullanılmıştır. *S. coelicolor* A3(2) mikroorganizması için ise daha kompleks ve zengin besiyerleri kullanılmıştır (Tablo 5.2). Çalışılan bakteri soyuna göre gerekli miktarlarda besiyerlerine ampisilin (100 µg/mL), apramisin (50 µg/mL), kanamisin (50 µg/mL) ve/veya kloramfenikol (25 mg/ml) antibiyotikleri eklenmiştir. Hazırlanan besiyerleri 121 °C'ta 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.

Tablo 5.2: Çalışmada kullanılan besiyerleri.

Besiyeri Adı	Besiyeri İçeriği
Luria Bertani (LB) (pH 7.0) – 1 L	10 g Pepton, 5 g Maya özütü, 10 g NaCl
Trypton Soya Broth (TSB)	Toz halde bulunan besiyerinin 30 gramı 1 L dH ₂ O’da çözülür.
Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS) - 1 L	20 g Mannitol, 20 g Soya Unu, 20 g Agar
2xYT Broth	5 g NaCl, 10 g Difco Bacto maya özütü, 16 g Difco Bacto pepton
R2YE (1 L)	0.25 K ₂ SO ₄ , 10 g Glukoz, 103 g Sükroz, 10.12 g MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.1 g Kazamino asit
R2YE’ye Eklenen Solüsyonlar	25 ml TES Tamponu (% 5.73, pH 7.2), 20 ml CaCl ₂ .2H ₂ O (% 3.68), 2.5 ml KH ₂ PO ₄ (% 0.5), 3.75 ml L-Prolin (% 20), 1.25 ml NaOH (1 N), 0.5 ml İz Element Solüsyonu (40 mg ZnCl ₂ , 200 mg FeCl ₃ .6H ₂ O, 10 mg CuCl ₂ .2H ₂ O, 10 mg MnCl ₂ .4H ₂ O, 10 mg Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O , 10 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O)
TBO Besiyeri (1 L)	20 g Salça, 20 g Yulaf, 25 g Agar
Maya özütü-Malt özütü Besiyeri (YEME)	3 g Maya özütü, 5 g Pepton, 3 g Malt özütü, 10 g Glukoz , 340 g Sukroz, 5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O, % 0.5 Glisin

5.8. Kullanılan Solüsyon ve Antibiyotikler

Bu çalışma kapsamında kullanılan solüsyon ve antibiyotik çeşit ve isimleri sırasıyla Tablo 5.3 ve Tablo 5.4’de gösterilmiştir.

Tablo 5.3: Çalışmada kullanılan antibiyotikler.

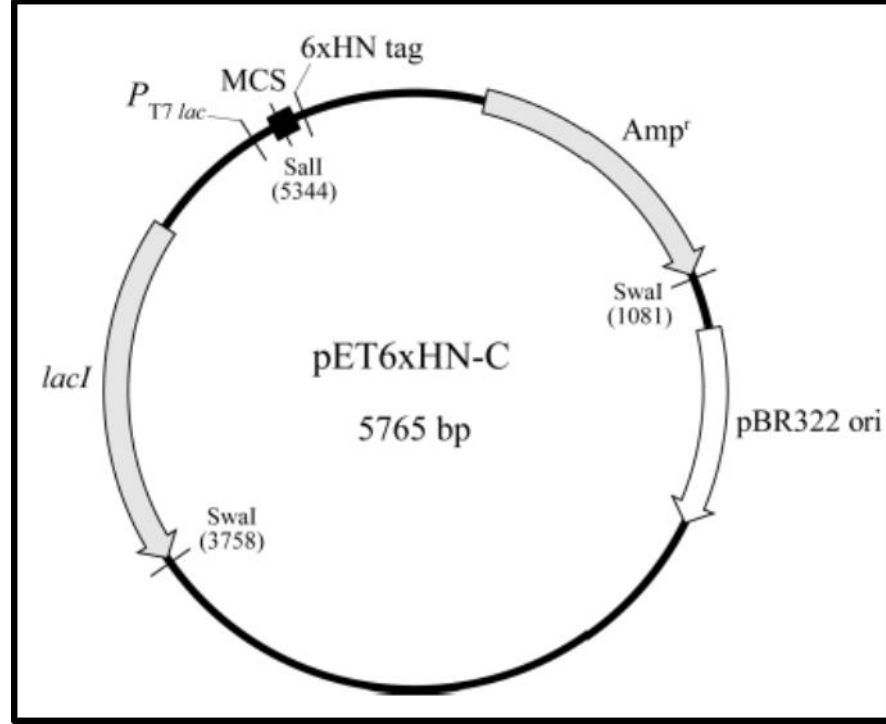
Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E. coli</i> ’de kullanılan konsantrasyon (µg/ml)	<i>Streptomyces</i> ’de kullanılan konsantrasyon (µg/ml)
Apramisin (Apr)	50	50	50
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Kanamisin (Kn)	50	50	50
Kloramfenikol ¹ (Chl)	50	25	-
Nalidiksik asit ² (NA)	25	-	25

Tablo 5.4: Çalışmada kullanılan solüsyon ve tamponlar.

Solüsyon ve Jeller		Tamponlar
Solüsyon I (4 °C) •25mM Tris (pH 8) •10 mM EDTA (pH 8) •50 mM Glikoz Solüsyon II •0.2 N NaOH •% 1 SDS Solüsyon III (4 °C) •% 60 5M Potasyum asetat •% 11.5 Glasiyal asetik asit Liziz Solüsyonu (4 °C) •1 M Tris-HCl (pH 8) •0.5 M EDTA (pH 8) •1 M Sükröz Alkalın Solüsyonu (4 °C) •10 N NaOH •% 20 SDS SDS Jeli (%12'lik): Ayırma jeli (4 ml) •1.28 ml dH ₂ O •1.6 ml %30 Akrilamid •1.04 ml 1.5 M Tris •40 µl %10 SDS •40 µl %10 APS •5 µl TEMED Commasie Blue (SDS PAGE için) •% 50 Metanol •% 0.05 Commasie •% 10 Asetik asit •% 40 dH ₂ O Protoplast P (-) Solüsyonu (800 ml) •103 g Sükröz •24 g K ₂ SO ₄ •2.02 g MgCl ₂ .6H ₂ O •2 ml İz element solüsyonu TBS-Tween Solüsyonu %0.1'lik Tween-20, 1X TBS Solüsyonuna eklenir. Bloklama Solüsyonu %5 (w/v) yağsız süt tozu, %0.1 Tween-20, 1X TBS içinde Çözülür.	Tfbl (4 °C) •1M MnCl ₂ •1 M KCl •1 M CaCl ₂ •% 75 Gliserol TfbII (4 °C) •1 M Na-MOPS •1 M CaCl ₂ •1 M KCl •% 75 Gliserol STET (4 °C) •8 g Sükröz •% 0.5 Triton X-100 •1 M Tris-HCl •0.5 M EDTA % 40 Gliserol (50 ml) (4 °C) •23 ml % 99 gliserol •27 ml dH ₂ O Yoğunlaştırma jeli (1.5 ml) •1.28 ml dH ₂ O •1.6 ml %30 Akrilamid •1.04 ml 1.5 M Tris •40 µl %10 SDS •40 µl %10 APS •5 µl TEMED Destaining Solüsyonu (SDS PAGE için) •% 50 Metanol •% 10 Asetik asit •% 40 dH ₂ O Protoplast P(+) Solüsyonu 80 ml P(-) solüsyonu + steril 1 ml KH ₂ PO ₄ (% 0.5) + 10 ml CaCl ₂ .2H ₂ O + 10 ml TES buffer (% 5.73, pH 7.2) 5 M KOH (200 ml) •56.11 g KOH •200 ml dH ₂ O 0.5 M HCl (200 ml) •9.85 ml %37 HCl •190.15 ml dH ₂ O 0.5 M Metanol-HCl (200 ml) •9.85 ml %37 HCl •190.15 ml Metanol	50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) (1 L) •242 g Tris Baz •57.1 ml Glasiyal asetik asit •100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) Tris-EDTA (TE) Tamponu •10 mM Tris-HCl (pH 8) •1mM EDTA (pH 8) 50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) (1 L) •242 g Tris baz •57.1 ml Glasiyal asetik asit •100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) Liziz Tamponu (Sonikasyon) (pH 7.4) •20 mM Sodyum fosfat tamponu •50 mM Sodyum klorür •5 mM İmidazol Sodyum fosfat Tamponu (Sonikasyon) (20 mM) •0.185 g NaH ₂ PO ₄ •0.427 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O SDS-PAGE: 2X Yürütme tamponu (1 L) •28.8 g Glisin •6.04 g Tris •2 g SDS •1.8 L dH ₂ O 4X SDS Yükleme Tamponu •2 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8) •0.8 g SDS •4 ml % 100 gliserol •0.4 ml β-merkaptotanol •1.0 ml 0.5 M EDTA •8 mg bromofenol mavisi •2.6 ml dH ₂ O Islak Transfer Tamponu (1 Lt) •3.03 g Tris •144 g Glisin •1 ml %10 SDS •%10 metanol 10X TBS Tamponu (1L) (pH: 8.0) •30 g Tris •80 g NaCl •2 g KCl

5.9. Kullanılan Plazmidler

T7 promoter'una sahip pET6xHN-C (5765 bç) (Şekil 5.2 ve Şekil 5.3) plazmidi *lon* geninin fazlaca ekspresyonu için kullanılmıştır. Sahip olduğu ampisilin dirençlilik geni sayesinde rekombinant (pET6xHN-C/*lon*) plazmidin *E. coli*'de seçilmesini sağlamaktadır.

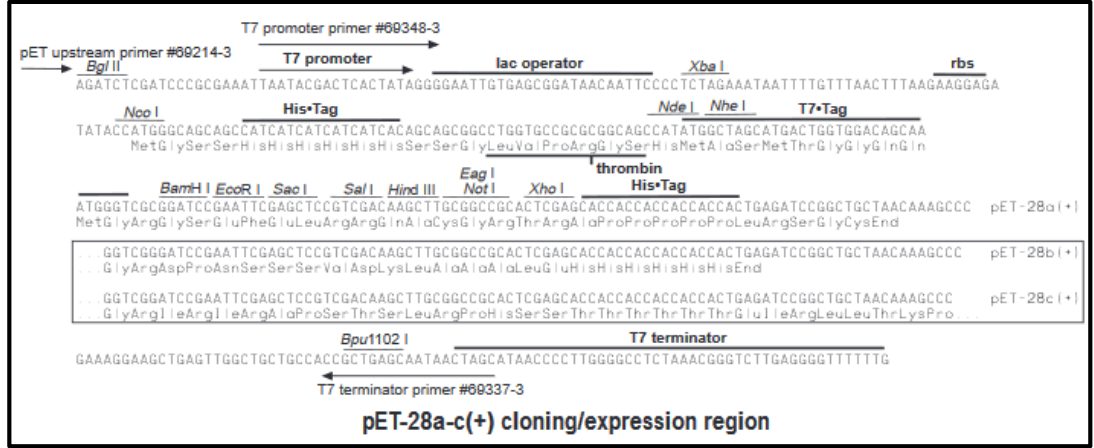


Şekil 5.2: pET6xHN-C ekspresyon vektörü (5765 bç).

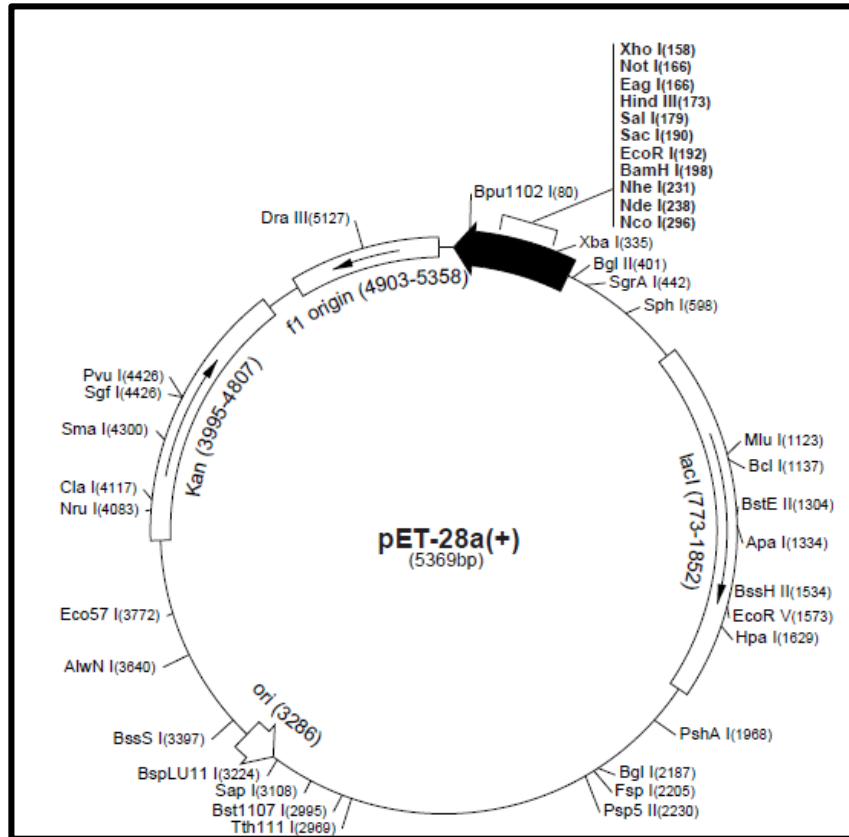
	RBS				NcoI		StuI			SalI		BglII		HindIII				
5313	AGA	AGG	AGA	TAT	ACC	ATG	GGT	AAG	GCC	TCT	GTC	GAC	CAG	ATC	TCT	AAG	CTT	
						Met	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Asp	Gln	Ile	Ser	Lys	Leu	
	EcoRI			NotI		Thrombin cleavage site						PstI						
5364	GCG	AAT	TCT	GGC	GGC	CGC	CTG	GTT	CCG	CGT	GGC	TCT	CCG	GGC	GCT	GCA	GGT	
	Ala	Asn	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	
	6xHN tag										PacI		PacI		XbaI			
5415	CAT	AAT	CAT	AAT	CAT	AAT	CAT	AAT	CAT	AAT	CAC	AAT	TAA	TTA	ATT	AAT	CTA	GAG
	His	Asn	His	Asn	His	Asn	His	Asn	His	Asn	His	Asn	***	Stop				
													codon					

Şekil 5.3: pET6xHN-C plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).

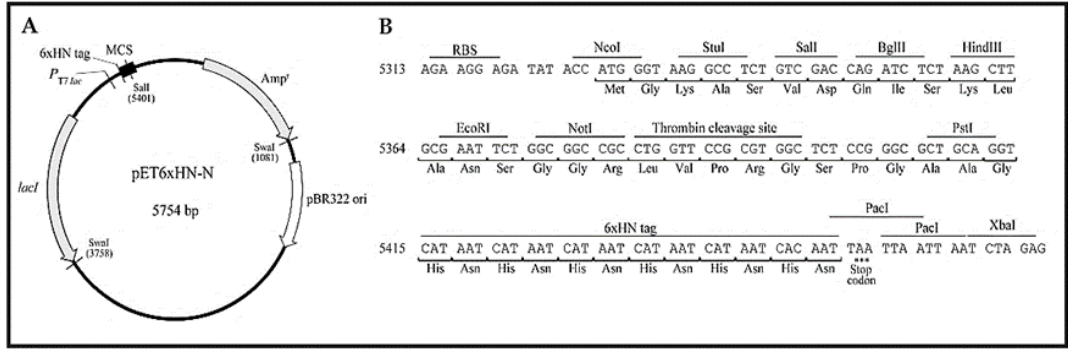
Ayrıca nükleotitleri optimize edilen *lon* geninin (*lon*^{opt}) klonlama ve ekspresyonu için birer ekspresyon vektörleri olan pET28a(+) (5369 bp) (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5) ve pET6xHN-N (5754 bp) (Şekil 5.6) plazmidleri kullanılmıştır. Seçilimi sağlamak üzere bu plazmidler sırasıyla kanamisin ve ampisilin dirençlik geni bulundurmaktadırlar.



Şekil 5.4. pET28a(+) plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).

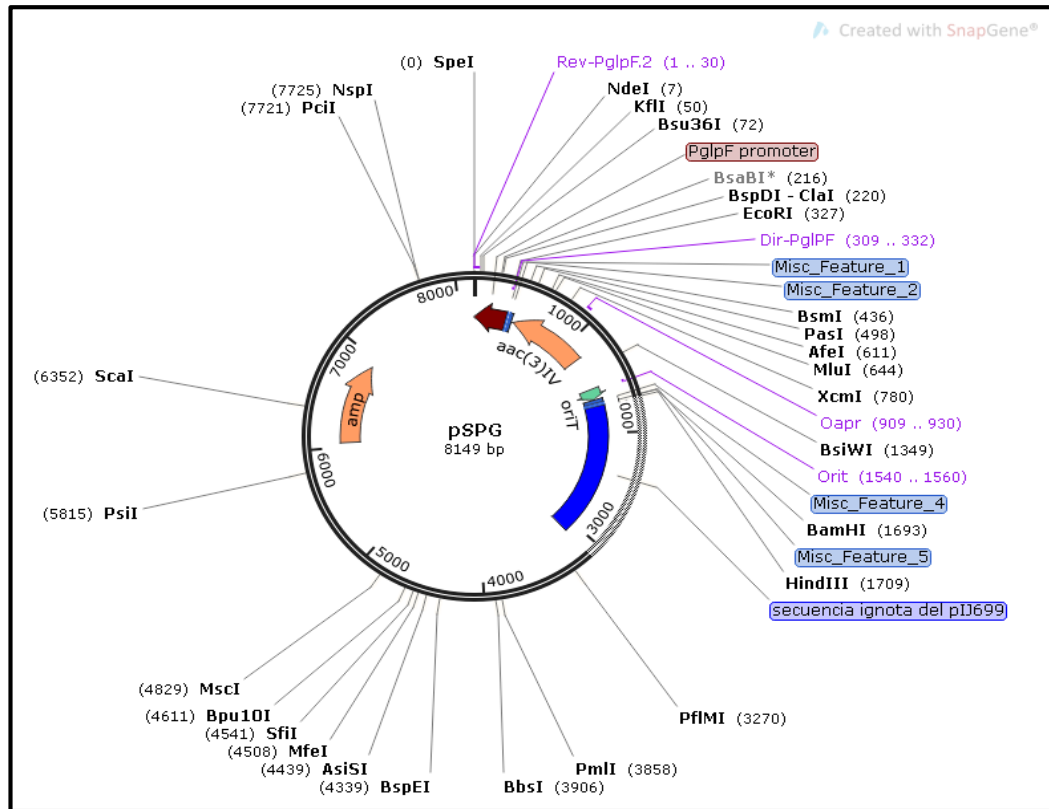


Şekil 5.5: pET28a(+) ekspresyon vektörü (5369 bp).



Şekil 5.6: A) pET6xHN-N ekspresyon vektörü (5754 bç), B) pET6xHN-N plazmidinin çoklu klonlama bölgesi (MCS).

Çalışmada kullanılan pSPG plazmid vektörü 19 Mayıs Üniversitesi Doç. Dr. Aslıhan Kurt Kızıldoğan'dan temin edilmiştir. pSPG plazmidi (Şekil 5.7) 40-300 arasında değişen kopya sayısına sahip, pIJ699 türevli bir *E. coli*/Streptomyces mekik vektörüdür [83]. Bu vektör, gliserol alım yolağında görevli bir promotora (*P_{glpF}*) sahiptir. Promotorun indüklenmesi, gliserol aracılığıyla düzenlenir [84]. Çalışma kapsamında kullanılan plazmid vektörler Tablo 5.5'de sıralanmıştır.



Şekil 5.7: pSPG mekik vektörü (8149 bç).

Tablo 5.5: Çalışmada kullanılan plazmidlerin genel özellikleri.

Plazmidler	Promoter	Dirençlilik belirteci	Dirençlilik	Büyükölük	Kaynak
pET6xHN-C	T7	<i>amp</i>	Ampisilin	5765 bç	Clontech
pET6xHN-N	T7	<i>amp</i>	Ampisilin	5754 bç	Clontech
pET28a(+)	T7	<i>kn</i>	Kanamisin	5369 bç	GenScript
pSPG	P_{glpF}	<i>Amp</i> <i>apr</i>	Ampisilin Apramisin	8149 bç	[83]

5.10. Tasarlanan Primerler

Yapılan tez çalışması kapsamında tasarlanan primerler Tablo 5.6’da listelenmiştir. StCB12 kozmidi üzerinde yer alan *S. coelicolor* A3(2)’ye ait olan *lon* (SCO5285) geni *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgesinde pET6xHN-C ekspresyon plazmidine klonlamak üzere Lon_Cterm_Infusion_F ve Lon_Cterm_Infusion_R primerleri tasarlanmıştır. Bununla birlikte nükleotit dizisi optimize edilmiş olan *lon* geninin (*lon*^{opt}) *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgesine klonlamak üzere Lon_OPTM_*Hind*III_F ve Lon_OPTM_*Eco*RI_R primerleri tasarlanmıştır. *S. coelicolor lon* geninin overekspresyon çalışması için mekik plazmid vektör olan pSPG’ye *lon* genini *Nde*I ve *Spe*I restriksiyon enzim kesim bölgelerine klonlamak üzere pSPG_*lon*_F_histaq ve pSPG_*lon*_R primerleri tasarlanmıştır. Ayrıca *lon* geninin RNA seviyesinde ekspresyonunu göstermek üzere qPCR’da kullanılmak üzere *lon*_qPCR_F ve *lon*_qPCR_R primerleri tasarlanmıştır. Bununla beraber kontrol için kullanılacak Housekeeping genleri için ise *gyrA*_F ve *gyrA*_R primerleri tasarlanmıştır.

Tablo 5.6: Çalışma kapsamında tasarlanan primerler.

Primer İsmi	Primer Dizisi
Lon_Cterm_Infusion_F	5' CCAGATCTCTAAGCTTATGGCTGCTGAGTCCGCC 3'
Lon_Cterm_Infusion_R	5' CAGAATTCGCAAGCTTCGCTGCGACCGGAACCTC 3'
Lon_OPTM_HindIII_F	5' CCCAAGCTTATGGCGGCGGAAAGCGCG 3'
Lon_OPTM_EcoRI_R	5' CGGAATTCTTACGCCGCCACCGGCAC 3'
pSPG_lon_F_histaq	5' ATAATTCCATATGCATCATCATCATCACCATATGGCTGCTGAGTCCGCC 3'
pSPG_lon_R	5' ACTAGTTCACGCTGCGACCGGAACCT 3'
lon_qPCR_F	5' AGCTGGTGAAGGAGTACA 3'
lon_qPCR_R	5' TCAGGAACGGCGAGTAG 3'
gyrA_F	5' GGTACACCGAGTGCAAGAT 3'
gyrA_R	5' GTCGTAGTTGTCCGTGAAGT 3'

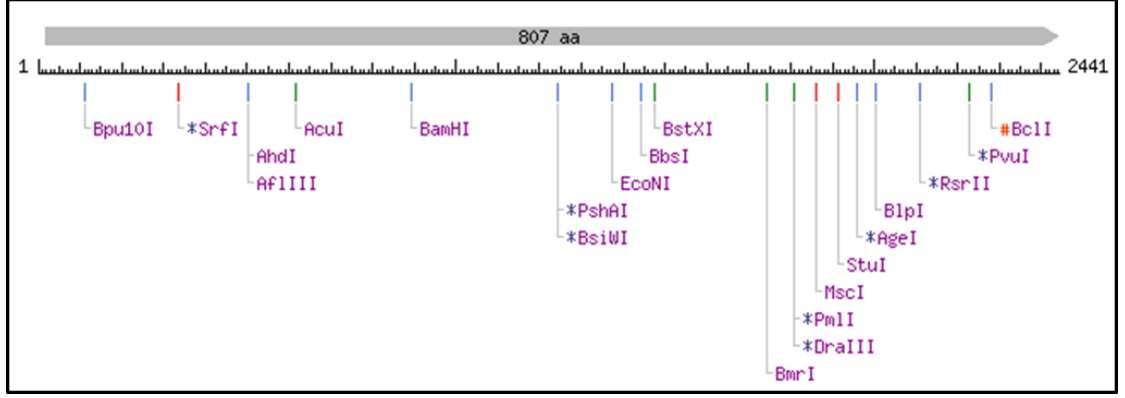
6. YÖNTEMLER

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

S. coelicolor A3(2) genomik DNA'sı Hopwood ve arkadaşları'na (1985) göre izole edilmiştir. 20 ml TSB besiyerine stok spor solüsyonundan 50 µl inoküle edilerek, 4 gün boyunca 30 °C'ta 220 rpm'de üretilmiştir. 50 ml besiyerine bu ön kültürden 1/10 oranında ekim yapılarak hücreler 48 saat 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve 10 ml TE tamponunda çözülen peletin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Karışımın 1.7 ml'si steril bir tüpe ayrıldıktan sonra geri kalanı -20 °C'ta saklanmıştır. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl (10 mg/ml) RNaz eklendikten sonra, 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 300 µl 5 M NaCl ve 240 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24:1) solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında 11000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz fenol:CIA (25:24:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 0.6 hacim izopropanal eklenerek 11000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Pelet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve dH₂O'da çözülmüştür. Elde edilen genomik DNA, 'PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon Kiti (MN)' yardımıyla kolonla saflaştırılmıştır.

6.2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin Restriksiyon Enzim Haritasının Çıkarılması

S. coelicolor A3(2) genom dizisi (NCBI Gene Databank AL645882.2) dikkate alınarak *lon* gen dizisini içeren bölgenin restriksiyon enzim haritasının çıkartılması NEBcutter program ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bütün klonlamalarda seçilecek olan restriksiyon enzim bölgeleri gen içerisinde bulunmayan fakat kullanılacak olan plazmid vektörlerin çoklu klonlama bölgelerinde bulunanlardan seçilmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1: *S. coelicolor* A3(2) *lon* (2424 bp) genine ait restriksiyon enzim kesim bölgesi.

6.3. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin PZR ile Çoğaltılması

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılacak *lon* genine ait DNA fragmanları, *S. coelicolor* A3(2)'den elde edilen kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. *S. coelicolor* A3(2) genom dizisi (NCBI Gene Databank AL645882.2) dikkate alınarak *lon* gen dizisini içeren bölgeyi çoğaltmak üzere primerler tasarlanmıştır (Tablo 5.6). *S. coelicolor lon* geni 2424 bp uzunluğundadır. Klonlama stratejisi için In-Fusion® HD Cloning Kit'i kullanıldı. Tasarlanan primerler kullanılan kitin kullanma talimatına göre hazırlanmış olup, primerlerin 15 bazı vektöre komplement, 18 bazı ise *lon* genine komplement olarak tasarlanmış ve 1 bazı restriksiyon endonükleaz kesim bölgesini tamamlamak üzere eklenmiştir.

Oluşacak PZR ürününün vektör ile ligasyonunun sağlanması için ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerlerin 5' ucuna, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesine uygun şekilde yerleştirmesini sağlayacak *HindIII* restriksiyon endonükleazına ait tanıma dizileri (*HindIII*-5'-AAGCTT-3') eklenmiştir. Restriksiyon endonükleazların seçiminde, kullanılacak enzimlerin *lon* geninde kesim yapmamasına ve vektörün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesinin olmasına dikkat edilmiştir.

PZR reaksiyonu toplam 25 µl hacimde yapılmış olup PZR içeriği ve programı Tablo 6.1' de özetlenmiştir.

Tablo 6.1: *lon* genini çoğaltmak üzere kurulan PZR reaksiyonu.

PZR İÇERİĞİ (25 µL)	PZR PROGRAMI
5 µL 5X Q5 Reaksiyon Tamponu	98 °C 3 dk
5 µL 5X Q5 High GC Enhancer	98 °C 10 sn denatürasyon
1,25 µL 10 µM İleri Primer	55 °C - 70 °C 30 sn tutunma (annealing) 35
1,25 µL 10 µM Geri Primer	Döngü
0,5 µL Kalıp Genomik DNA	72 °C 100 sn uzama
0,5 µL 10MM dNTPs	72 °C 5 dk
0,25 µL Q5 DNA Polimeraz	4 °C ∞
11,5 µL dH ₂ O	

Reaksiyon, bir termal döngü (MJ Research INC, PTC-200 USA) cihazında toplam 35 döngü olarak yürütülmüştür.

PZR ürünleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezi yürütülmüş ve sonuç jel görüntüleme cihazı gözlenmiştir.

6.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Nükleik asitleri, büyüklüklerine göre ayırmak için agaroz jel elektroforezi yöntemine başvurulmuştur. % 0.8'lik (w/v) agaroz jel, 1X TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve 100 ml'ye 5µl olacak şekilde Red Safe kimyasalı ilave edilmiştir. Kasete döküldükten sonra yükleme tamponu ilave edilen DNA örnekleri 1/10 hacminde 6X yükleme boyası eklenip, karıştırılarak jele yüklenmiştir. Daha sonra örnekler, içinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankında 90-95 Volt'ta 45-50 dk yürütülmüştür.

6.5. PZR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

PZR ile çoğaltılan *lon* genine ait DNA fragmanı, %0.8'lik agaroz jele yüklenmiş ve jeldeki fragman yaklaşık 45 dakika 95 V'da elektroforez ile yürütülmüştür. Elektroforezden sonra, jel görüntüleme cihazı ile görüntülenen uygun bantlar steril bistüri ile kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen jel parçacıklarında bulunan DNA fragmanını saflaştırmak için Jelden DNA Saflaştırma Kiti kullanılmıştır.

(Nucleospin Gen and PCR Clean-Up, MN). Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde saflaştırılan DNA, konsantrasyonu ölçüldükten sonra -20 °C’de saklanmıştır.

6.6. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu

Ligasyon reaksiyonu için gerekli olan gen fragmenti ve plazmidin kesimi uygun enzim/ enzim kombinasyonları kullanılarak yapılmıştır (Tablo 6.2). Kesim reaksiyonu üretici firmanın önerdiği tampon çözeltiler içerisinde ve uygun sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Gen fragmenti uygun koşullarda 3-4 saat kesilirken, yoğunluğu fazla olan plazmid ise gece boyu kesime bırakılmıştır.

Tablo 6.2: *lon* geninin restriksiyon enzim kesimi reaksiyonu.

RESTRIKSİYON BİLEŞENLERİ	SON KONSANTRASYON	HACIM
pET6xHN-C plazmid DNA	7500 ng	30 µl (250 ng/µl)
<i>Hind</i> III (NEB)	100 Ünite	5 µl
Fast Digest Tamponu	1X	5 µl
dH ₂ O	10 µl	10 µl
Toplam	50 µl	50 µl

6.7. “In Fusion Klonlama” Protokolü

lon geninin pET6xHN-C vektörüne klonlanması, ticari olarak satılan “In-Fusion HD Cloning Kit” ile gerçekleştirilmiştir. Klonlama işleminde T4 DNA ligaz enzimi yerine “In-Fusion” enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim, PZR ile üretilmiş DNA fragmanı ve belirlenen restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal (linear) hale getirilmiş vektörün birleştirilmesinden sorumludur. Bu işlemi, söz konusu DNA fragmanlarının (PZR ürünü ile vektör) uç kısımlarındaki 15’er nükleotitik çıkışan (overlap) DNA dizilerini tanıyarak gerçekleştirir. Bu dizilerin söz konusu PZR ürününe eklenmesi için, primer tasarlanırken, doğrusal hale getirilmiş vektörün uç kısımlarındaki 15’er nükleotitik DNA dizileri üreticinin belirlediği şekilde primer dizilerine eklenir. Bu çıkışan DNA dizileri sayesinde, yönlü klonlama kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. pET6xHN-C vektörüne “In Fusion HD Cloning Kit”

aracılığıyla *lon* geninin klonlanması için, vektörün çoklu klonlama bölgesinde yer alan enzimlerden biri olan ve *lon* genini kesmeyen *Hind*III enzimi kullanılmıştır.

Öncelikle pET6xHN-C plazmiti, *Hind*III enzimi ile kesilmiş ve jelden izole edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pET6xHN-C plazmidi ve PZR sonucu elde edilen *lon* geni, agaroz jele yüklenerek, ng/μl cinsinden miktar tayini yapılmıştır. Kitte önerildiği üzere, her iki örnek de 100 ng olacak şekilde reaksiyona eklenmiş (Tablo 6.3) ve 50 °C’ta 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından ligasyon reaksiyonu *E. coli* TG-1 hücrelerine transformasyon yöntemi kullanılarak transforme edilmiştir.

Tablo 6.3: “In fusion” klonlama reaksiyonu.

REAKSIYON KARIŞIMI	10 μL
5x “in fusion” enzimi ön karışımı	2 μL
<i>Hind</i> III enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş pET6xHN-C plazmidi (jelden saflaştırılmış)	3 μL (~100 ng)
Pzr sonucu elde edilen <i>lon</i> geni (jelden saflaştırılmış)	2 μL (~ 100 ng)
dH ₂ O	3 μL

6.8. Ligasyon Protokolü

S. coelicolor A3(2) *lon* genini pSPG plazmidine *Nde*I ve *Spe*I restriksiyon endonükleaz bölgelerine klonlamak, ayrıca nükleotitleri optimize edilen *lon*^{opt} genini de pet6xHN-N plazmid vektöre *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz bölgelerinden klonlamak üzere Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirdikleri ligasyon protokolü uygulanmıştır. Ligasyonda kullanılacak plazmit (vektör) ve genin (insört) konsantrasyonları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Şekil 6.2).

$$ng (lon) = \frac{ng (plazmit) \times lon (kb)}{plazmit (kb)}$$

Şekil 6.2: Ligasyon protokolünde kullanılan formül.

Ligasyon reaksiyonları vektör:insört oranı 1:3, 1:5, 1:7 ve 1:10 olacak şekilde kurulmuştur. Hesaplanan oranlarda plazmid vektör ve genin üzerine 1 μl T4 DNA

Ligaz tamponu eklenmiştir. Daha sonra her bir reaksiyona 1 µl T4 DNA Ligaz enzimi eklenerek son hacim dH₂O ile tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 16 °C’ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

6.9. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak *E. coli* TG-1 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonu için Green ve ark. (2013) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu prosedüre göre, kompetan hale getirilecek hücreler 5 ml LB besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C sıcaklık ve 180 rpm’de büyümeye bırakılmıştır. Büyüyen bu ön kültürün 1 ml’si 50 ml antibiyotiksiz LB besiyerine inoküle edilmiş ve bu şekilde 37 °C sıcaklık ve 180 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümlerle hücre yoğunluklarındaki artış düzenli olarak takip edilmiş ve 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (OD600) 0.4-0.5 aralığına ulaştığında, kültürler 4 °C’ta, 3000 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Supernatantı uzaklaştırılan peletler buza alınarak 40 ml TfbI solüsyonunda çözünmüştür. Buzdaki 10 dk’lık inkübasyonun sonunda 4 °C’ta, 3000 rpm’de, 8 dk santrifüj yapılmıştır. Peletler tekrar buza alındıktan sonra 1 ml TfbII solüsyonu içerisinde çözülmüştür. Hücreler, her birinde 100 µl olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılıp, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak -80 °C’a kaldırılmıştır.

6.10. Transformasyon Yöntemi

-80 °C’de 100 µl olarak ependorf içinde bulunan *E. coli* TG-1 ve ET12567 kompetan hücreleri alınarak üzerlerine 5 µl In Fusion veya Ligasyon reaksiyonundan eklenmiştir. Daha sonra buzda 30 dakika bekletilmiş ve hemen ardından hücrelere 42 °C’de 45 saniyelik ısı şoku uygulanmış ve sonrasında buzda 2 dakika bekletilmiştir. Her bir tüpe 900 µl antibiyotiksiz LB besiyeri eklenip 37 °C’de, 180 rpm’de 80 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından hücreler ampisilin içeren LB agar (50 µg/ml amp) besiyerine tek koloniler elde etmek üzere ekilmiştir. 37 °C’de gece boyu inkübasyondan sonra LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) içeren besiyerinde üreyen olası rekombinant hücreler toplanmış ve yeni besiyerine ekilerek saf kültür hazırlanmıştır.

6.11. Plazmid İzolasyonu

Olası plazmitleri içeren kolonilerin tespitinde Holmes ve arkadaşlarının (1981) geliştirdiği yöntemden yararlanılmıştır [85]. Bu yöntem kapsamında 1 ml LB/Ampisilin (50 µg/ml amp) besiyerinde gece boyu büyütülen hücreler, 4 °C'ta 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Peletlere, 250 µl STET eklendikten sonra vortekslenerek hızlıca çözülmüştür. Kaynar suda 45 sn inkübasyona bırakılan ependorf tüpleri sonrasında 4°C'ta 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Protein ve hücresel atıkların bulunduğu pelet kısmı uzaklaştırılarak, sıvı faz yeni ependorflara aktarılmıştır. Her bir tüpe 250 µl izopropanol eklenerek en az 15 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun ardından izopropanol tamamen uzaklaştırılıp, peletler 25'er µl dH₂O ile çözülmüştür. İzolasyon sonrası elde edilen plazmitler agaroz jel'de yürütülüp görüntülenmiştir.

6.12. Olası Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Analizleri

İzole edilen olası rekombinant plazmidin doğruluğu tek (pET6xHN-C/*lon* *Hind*III) ve çift (pET6xHN-C/*lon* *Bam*HI ve *Eco*RI) restriksiyon endonükleaz kesimleri ile belirlenmiştir. Tek enzim kesimleri için 100 ng pET6xHN-C/*lon* DNA'sı, 1X Fast Digest Tamponu, 20 U endonükleaz *Hind*III içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat boyunca kesilmiştir. Çift kesim reaksiyonu için ise 100 ng pET6xHN-C/*lon* DNA'sı, 1X Fast Digest Tamponu, 20 U endonükleaz *Bam*HI ve 20 U endonükleaz *Eco*RI içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat boyunca kesilmiştir. Kesim reaksiyonu bittikten sonra reaksiyon karışımı %0.8'lik agaroz jele, moleküler DNA belirteci varlığında yüklenmiş ve 95 V'da 1 saat yürütülerek genin varlığı UV altında görüntülenmiştir.

6.13. Klonlanan *lon* Geninin Nükleotit Dizisinin Belirlenmesi

E. coli TG-1 hücrelerine transforme edilen pET6xHN-C/*lon* rekombinant plazmidindeki *lon* geninin nükleotit dizisi İntek Ltd. Şti. firmasına yaptırılan dizi analizi ile belirlenmiştir. Universal T7 promoter ve T7 Terminator primerleri kullanılarak yapılan dizi analizleri sonucunda *lon* geninin pET6xHN-C vektörüne

doğru bir biçimde (in frame) klonlandığı kanıtlanmıştır. Ayrıca dizileme sonucu elde edilen gen dizisi Blast programına yüklendiğinde *S. coelicolor* A3(2) *lon* genine % 100 oranda benzediği gösterilmiştir.

6.14. Rekombinant Lon Proteaz Enziminin Ekspresyonu

pET6xHN-C, pET6xHN-N, pET28a(+) ve pSPG plazmitleri üzerinde *S. coelicolor* A3(2) *lon* veya *lon^{opt}* genini içeren rekombinant BL21 (DE3) ve Rosetta (DE3) *E. coli* hücreleri ampicilin veya kanamisin (50 µg/ml amp) içeren sıvı LB'de gece boyu büyütüldükten sonra 1/20 oranında taze LB besiyerine ekilmişlerdir. İkincil kültürler 37 °C'de, 200 rpm'de, optik yoğunlukları 600 nm'de 0.6'ya gelene kadar büyümeye bırakılmışlardır. Kültürler istenen OD (optical density) değerine ulaştığı zaman kültür son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmıştır. Kültürlerden 2'şer saat arayla 1'er ml örnek alınarak 37 °C'de, 200 rpm'de 4 saat büyütülmüştür. Kontrol grubu olarak *lon* geni içermeyen ve boş plazmid içeren *E. coli* hücreleri benzer şekilde 0.5 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat büyütülmüştür. Kültürlerin IPTG ile uyarılmasından önceki ve sonraki protein ekspresyon profilleri %12'lik SDS-PAGE'de gözlenmiştir.

6.15. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin RNA Düzeyinde Ekspresyonunun Gösterilmesi (RT-qPCR)

RNA ekstraksiyonu için hücre peletleri, lizozim içeren TE çözeltisinde çözüldükten sonra 37 °C'ta 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Üreticinin talimatlarına göre küçük modifikasyonlarla RNA İzolasyon Kiti (Macherey-Nagel, Almanya) ile toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu sırasında olası DNA kirlenmesi, Deoxyribonuclease I (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak elimine edilmiştir. RNA numunelerinde kontamine olmuş DNA yokluğu, PZR reaksiyonları ile doğrulanarak RNA konsantrasyonu ve saflığı, spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir.

cDNA, 300 ng toplam RNA kullanılarak Iscript Advanced cDNA Synthesis KIT'i (Bio-rad Laboratories, ABD) ile sentezlenmiştir. Üreticinin önerilerine göre hazırlanan reaksiyon karışımları primer dimer oluşumunu ortadan kaldırmak için 70 °C'ta 5 dakika inkübe edilmiştir. Birinci sarmal için cDNA sentezi koşulları sırasıyla

şöyledir: 5 dakika boyunca 25 °C'de, 60 dakika boyunca 46 °C'de ve 5 dakika boyunca 85 °C. Kantitatif RT-PCR için RT-PCR StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), toplam 20 µl hacimde 500 nM primer (her biri) ve 25 ng cDNA içeren cSYBR Green qPCR ana karışımı (Bio-rad Laboratories, ABD) kullanılmıştır. Termal profil, 98 °C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonundan sonra 95 °C'de 15 saniyelik 40 devir ve 60 °C'de 1 dk olarak belirlenmiştir. Her bir cDNA örneği bağımsız deneylerde iki kez ölçülmüştür. Transkripsiyonel analiz için kullanılan primerler, web tabanlı bir araç olan “primer 3” ile tasarlanmış olup primer çiftlerin sekansları Tablo 5.6.'da verilmiştir. Hedef genin ekspresyon seviyesi, *gyrA* geninin seviyesine normleştirilmiş olup gen ekspresyon seviyeleri, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler iki bağımsız biyolojik örneklerle yapılmıştır.

6.16. Western Blot

S. coelicolor A3(2) *lon* geninin protein seviyesinde ifadesinin belirlenmesi için uygun antibiyotik ve gliserol konsantrasyonu içeren R2YE besiyerine yaban suş (WT), pSPG plazmidini taşıyan rekombinant suş (WT+pSPG) ve *lon*'un çoklu kopyasını taşıyan rekombinant suş (WT+LON) ekilerek belirli saatlerde 5 ml'lik örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 2-3 defa TE tamponunda yıkanmış olup hücre peletleri protein izolasyonu için sıvı azotta dondurularak – 80 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Hücre peletlerinden protein izolasyonu yapmak için sonikasyon yöntemine başvurulmuştur. Her bir örneğe 1 ml liziz tamponu eklenerek peletlerin sonikasyon cihazı yardımıyla mekanik olarak parçalanması sağlanmıştır. Sonikasyon işlemi süresince örnekler buzda bekletilmiş olup hücre peletleri %30 genlik (amplitude) ve 20 sn süreyle 3 kez sonikasyona maruz bırakılmışlardır. Sonikasyon ile parçalanan hücreler +4 °C sıcaklık 13.00 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatantlar protein örneği olarak kullanılmış olup total protein ölçümü ile miktarları belirlenmiştir.

Süpernatantlar steril ependorflarda toplanıp, içerdikleri protein miktarını belirlemek için ‘Commassie Plus (Bradford) Assay’ yöntemi kullanılmıştır. Bradford deneyi örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Mikroplaka kuyucuklarına 20’şer µl dH₂O eklenmiş ve üzerine farklı konsantrasyonlardaki BSA standartlarından (250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml ve 2000 µg/ml) 10’ar µl yüklenmiştir. Sonikasyon sonucu elde edilen protein örnekleri ise 1:5 oranında dilüe edilerek her bir kuyucuğa 2’şer µl konulmuştur. Mikroplaka içerisindeki her bir örneğe

200'er µl 'Coomassie Plus Reagent' eklenip, mikroplakalar en az 30 dk karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 595 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) % 0.1 aniyonik deterjan SDS varlığında, Laemli (1970) tarafından tanımlanan % 12 ayırma jeli ve % 5 yükleme jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dikey jel elektroforezi için Bio-Rad Mini-Slab Cell CT kullanılmıştır. 15 µl hücre peleti örnekleri %1 SDS içeren 4X örnek tamponu ile karıştırılarak kaynar suda 5 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra protein örnekleri moleküler ağırlık belirteci ile birlikte jele yüklenmiştir ve jel 120 V'da yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue-R250 ile boyanmış ve daha sonra boyadan arındırma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Proteinlerin oluşturduğu bantlar moleküler ağırlık belirtecindeki ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılmış ve proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir.

Proteinler SDS-PAGE'te yürütüldükten sonra direkt olarak jelden nitroselüloz membrana yarı ıslak sistemi kullanılarak aktarılmıştır. Pozitif (+) kutuba yakın koyulan Membran iki whatman kağıdının arasına sıkıştırılarak sandviç yapılmıştır. Transfer işlemi 12 V'ta 60 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için Protein transfer edilmiş olan nitroselüloz membran TBS-T tamponu içerisinde hazırlanan %5'lik süt tozu ile en az 60 dakika inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra membran gece boyu +4 °C'de birincil antikor ile müamele edilmiştir. Antikor uygulanmış membran TBS-T tamponu ile üç defa yıkanmıştır. Daha sonrasında HRP- konjuge ikincil antikor (anti-mouse veya anti-rabbit, TBS-T'de 1:5000 dilüe edilmiş) oda sıcaklığında shaker üzerinde 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membran üç defa TBS-T tamponu ile yıkanmıştır.

Membran Femto ECL substratı kullanılarak Chemidoc™ XRS+ cihazında görüntülenmiştir. 300 saniyede 25 fotoğraf alınmıştır. Görüntünün işlenmesi Image Lab Software 3.0. programı ile gerçekleştirilmiştir.

6.17. Rekombinant pSPG/*lon* Plazmidin Alıcı *E. coli* ET12567 Hücrelerine Aktarımı

E. coli TG-1 hücrelerinden izole edilen pSPG/*lon* rekombinant plazmidi, pUZ8002 plazmidi içeren ve içermeyen metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 hücrelerine aktarılmıştır. pUZ8002 plazmidi içermeyen *E. coli* ET12567 hücrelerine plazmidin aktarımı ısı şoku transformasyon yöntemi ile gerçekleştirilmişken, pUZ8002 plazmidini taşıyan *E. coli* ET12567 hücrelerine ise elektroporasyon yöntemi ile transfer edilmiştir. pUZ8002 plazmidi sahip olduğu oriT bölgesi ve taşıdığı tra genleri sayesinde taşınan plazmitlerin farklı alıcı hücrelere aktarımında rol oynamaktadır [86].

Elektroporasyonda her 100 µl elektokompetan hücrenin üzerine ~ 200 ng/µl pSPG/*lon* rekombinant plazmidi eklenmiştir. Hücre ve plazmit karıştırılıp, soğuk elektroporasyon kuvvetlerine alınmıştır. Hücreleri içeren küvet Bio-Rad GenePulser II elektroporatörüne yerleştirilip *E. coli* için tanımlı bir program seçilerek (200 Ω, 25 µF ve 2.5 kV) elektrik akımı uygulanmıştır. Akım uygulanması sonucunda beklenen ‘time constant’ değeri 4.5-4.9 ms aralığındadır ve çalışmada bu değer beklenen aralığın içinde çıkmıştır.

Elektroporasyon işleminin ardından küvet içerisinde bulunan hücrelere 700 µl antibiyotiksiz soğuk LB besiyeri eklenip hücreler yeni ependorf tüpüne alınmıştır. 37 °C’ta 1 saatlik inkübasyonun ardından hücreler, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve Apr (50 µl/ml) içeren LB katı besiyerlerine ekilip, 37 °C’ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

6.18. Yaban Suş *S. coelicolor* A3(2)’ye Rekombinant pSPG/*lon* Plazmidinin Aktarılması

Konjugasyon Yöntemi için Gust ve arkadaşlarının (2002) protokolü uygulanmıştır [93]. Rekombinant (pSPG/*lon*) plazmidi taşıyan pUZ8002 *E. coli* ET12567 hücresi, Chl (25 µg/ml), Kn (50 µg/ml) ve Apr (50 µg/ml) içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C’ta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bu ön kültürden, antibiyotikli 10 ml LB besiyerine 1/100 oranında ekim yapılarak ve hücrelerin 600 nm dalga boyutundaki absorbans değeri (OD600) 0.4’e ulaşana kadar 37 °C’ta inkübasyona bırakılmıştır. OD600 değeri sağlandığında, kültürler 4 °C’ta,

4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve 2 kez 10'ar ml antibiyotiksiz LB besiyeri ile yıkanmıştır. Yıkama işlemleri devam ederken, her bir konjugasyon denemesi için 500 µl 2xYT besiyerine 1 µl ve 1.5 µl 10^8 *S. coelicolor* A3(2) sporu eklenip, 4 °C'ta 10 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Yıkama işleminin ardından *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri tekrar 4500 rpm'de 10 dk çöktürülerek pelet, 1 ml LB besiyerinde çözünmüştür. Sporların soğutulmasının ardından, 500 µl *S. coelicolor* A3(2) sporu ile 500 µl *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücresi karıştırılmıştır. Daha sonra 6000-7000 rpm'de 1-2 dk santrifüj uygulanıp, süpernatant boşaltılmış ve pelet dipte kalan ~ 50 µl'lik sıvıda çözölmüştür. Hücreler 10^{-2} ve 10^{-4} oranlarında seyreltilip, 10 mM MgCl₂ içeren antibiyotiksiz MS agar besiyerlerine ekilmiştir. 30 °C'ta 20 saatlik inkübasyonun ardından MS besiyerine son konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde NA ve apramisin uygulanmıştır.

6.19. *S. coelicolor* A3(2)'dan Plazmid İzolasyonu

Rekombinant plazmidi taşıyan *S. coelicolor* A3(2) konjugantlarından plazmid izolasyonu için, Hopwood ve arkadaşlarının (1985) yöntemi uygulanmıştır [81]. Gerekli antibiyotikleri içeren (Nalidiksik asit (NA) ve apramisin) 50 ml TSB besiyerinde büyütölen *S. coelicolor* A3(2) kültürü 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan pelet 10 ml STE solüsyonunda çözölüp üzerine 200 µl (50 mg/ml) lizozim eklenmiştir. 37 °C'ta, 45-60 dk'lık inkübasyonun ardından 5 ml taze hazırlanmış alkalın solüsyonu ilave edilip, 20-30 sn vortekslenerek iyice karışması sağlandı. Oda sıcaklığında, 10 dk'lık inkübasyonun ardından 65 °C'ta 20 dk bekletilen örnek, 5 dk buzda soğutulmuştur. Daha sonra üzerine 10 ml soğuk solüsyon III eklenip, 10 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresi boyunca her iki dakikada bir yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra, 4500 rpm'de, 4 °C'ta, 15 dk santrifüj uygulanıp, falkona 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir. -20°C'ta gece boyu inkübasyonun ardından, oda sıcaklığında 4500 rpm'de, 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra süpernatant atılıp, kurutulan pelet 40 µl dH₂O'da çözölmüştür. 14 µl RNaz (10mg/ml) eklenip, 37 °C'ta, 30 dk inkübe edilmiştir. İzole edilen plazmid, PZR Temizleme (clean-up) Kiti (MN) yardımıyla kolon ile saflaştırılmıştır.

Ölçölen absorbans değöerlerine göre her bir öörnekten 60 µg protein alınarak steril ependorflara aktarılmış ve üzerine 4X SDS yükleme boyası eklenmiştir. Boya ve öörnek karışımı 5 dakika kaynar suda inkübe edildikten sonra öörnekler % 10'luk SDS-PAGE

jellerine yüklenmiş ve 110-115 voltta yürütülerek proteinlerin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

6.20. *S. coelicolor* A3(2)'de Antibiyotik Ölçümü

Antibiyotik ölçüm deneyinde ön kültürden ekim yapılmadan önce miktarları eşitlenen rekombinant ve yaban tip hücreler 3'er tekrarlı olacak şekilde 100 ml R2YE besiyerine ekilmiştir. pSPG/*lon* rekombinant plazmidi taşıyan ve sadece pSPG plazmidini taşıyan hücrelerin kültürlerine Apr (50 µg/ml) eklenmiştir. Yaban tip kültürlerin bir kısmına (WT/0.25) %0.25 gliserol eklenirken, kalan kısmına (WT) herhangi bir şey uygulanmamıştır. pSPG plazmidini (WT+pSPG) ve pSPG/*lon* rekombinant plazmidini taşıyan rekombinant hücrelerin (WT+LON) ise tamamı %0.25 gliserolle uyarılmıştır. Fermentasyon süresi boyunca 24 saatte bir (24, 48, 72, 96 ve 120 saat) her bir hücre kültüründen 5 ml örnek alınmıştır. Alınan örneğin 1 ml'si antibiyotik ölçümünde, kalan 4 ml'si ise kuru hücre ağırlığının belirlenmesi için kullanılmıştır. Antibiyotik ölçümü için ayrılan örnekler doğrudan -20 °C'a kaldırılmıştır. Ağırlık tayininde kullanılacak örnekler ise 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve peletler 2 kez dH₂O ile yıkanıp -20 °C'a bırakılmıştır.

Kuru ağırlık ölçümü için peletler -20 °C'tan alınıp, 1'er ml dH₂O ile çözülerek ağırlıkları belirli olan kurutma kaplarına alınmıştır. Örnekler, 80 °C'ta 3-4 gün kurutulup ağırlıkları (mg/ml) ölçülmüştür. Kap ağırlıkları, toplam ağırlıktan çıkartılarak kuru hücre ağırlıkları belirlenmiştir.

Antibiyotik ölçüm deneylerinde Kieser ve arkadaşlarının (2000) geliştirdiği spektrofotometrik ölçüm yöntemi uygulanmıştır [87]. -20 °C'tan alınan örneklerin üzerine 250 µl 5 M KOH eklenip, karıştırılarak bir gece boyunca 4 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 4 °C'ta, 13.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş oluşan süpernatantlar yeni ependorflara aktarılmıştır. Aktinorhodin antibiyotiği 640 nm dalga boyunda doğrudan süpernatant üzerinden ölçülürken (blank olarak R2YE kullanılarak), undesilprodigiosin antibiyotiğinin ölçümü pelet üzerinden gerçekleştirilmiştir. Öncelikle pelet 2 kez 0.5 M HCl ile yıkanmış (4 °C, 13.000 rpm, 5 dk) ve her bir örneğe 1 ml 0.5 M metanol-HCl eklenerek, 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışım 4 °C'ta, 13000 rpm'de 15 dk çöktürülüp, undesilprodigiosin antibiyotiği süpernatantta, 530 nm dalga boyunda

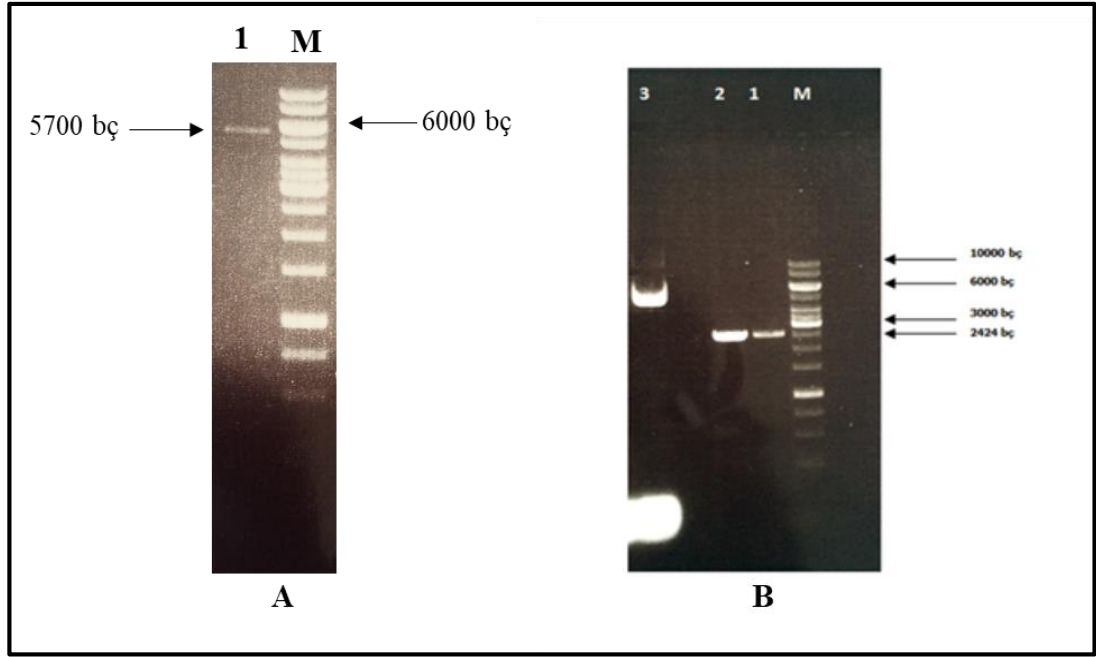
ölçülmüştür. Blank olarak metanol-HCl solüsyonunun kullanıldığı undesilprodigiosin ölçümlerinde ihtiyaç halinde dislasyonlar da bu solüsyon ile yapılmıştır.

$Abs = \epsilon \times [M]$ formülü, farklı kültürlerdeki antibiyotik aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Formülde yer alan ϵ değeri aktinorhodin için 25230, undesilprodigiosin antibiyotiği için ise 100500'dür. Formülden hesaplanan molarite değerleri 10^6 ile çarpılarak, nM cinsinden konsantrasyonlar belirlenmiştir. Daha sonra bulunan sonuçlar mg cinsinden kuru ağırlıklara bölünerek her bir hücre kültürü için spesifik antibiyotik aktivite değerleri tespit edilmiştir. Rekombinant ve yaban tip hücrelerin antibiyotik aktiviteleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığının belirlenmesinde t-test yöntemi kullanılmıştır.

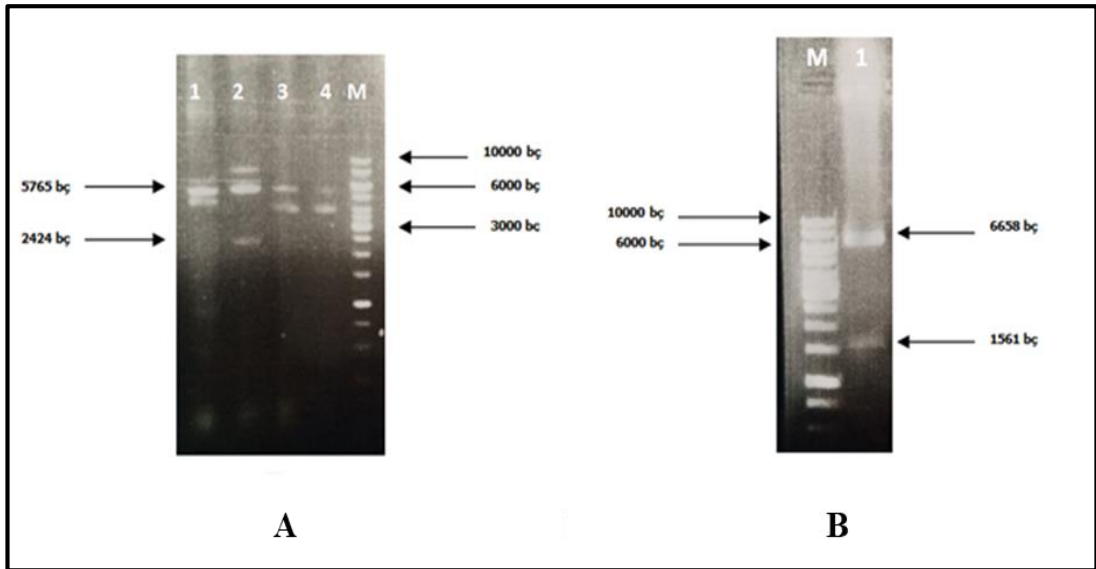
7. BULGULAR

7.1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Geninin pET6xHN-C Ekspresyon Vektörüne *E. coli*'de Klonlanması

S. coelicolor A3(2) *lon* genini çoğaltmak için kalıp DNA olarak *S. coelicolor* A3(2) organizmasına ait kromozomal DNA ve Tablo 5.6'de verilen ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları 55, 60, 65 ve 70 °C olmak üzere 4 farklı PZR reaksiyonu kurulmuş olup en iyi bağlanma 65 °C sıcaklıkta gözlenmiştir. *Hind*III enzimi ile kesilmiş pET6xHN-C plazmidi ve *lon* geni jelden saflaştırılmıştır (Şekil 7.1). In Fusion kitinin önerdiği şekilde ligasyon reaksiyonu kurulmuş ve ligasyon ürünleri *E. coli* TG-1 hücrelerine transformasyon ile aktarılmıştır. Transformantlardan olası rekombinant plazmidler izole edilerek *Hind*III ile kesilmiştir. Kesim sonucunda Şekil 7.2A'nın 2. kuyusundaki plazmidin doğru olabileceği görülmüş, bunun üzerine aynı plazmid *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon endonükleazları ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda beklenildiği üzere 6658 bp ve 1561 bp olmak üzere iki adet bant gözlenmiştir (Şekil 7.2B). Dizi analizi sonucunda pET6xHN-C vektörüne klonlanmış DNA fragmanının *S. coelicolor* A3(2) *lon* genine ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 7.3). Böylece *lon* geni pET6xHN-C vektöründe bulunan T7 promotorunun altına çerçeve kayması olmayacak şekilde klonlanmıştır. Rekombinant plazmide bu çalışmada pET6xHN-C/*lon* adı verilmiştir.



Şekil 7.1: İzole edilen pET6xHN-C vektörü ve jelden saflaştırılan *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin agaroz jel görüntüsü. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); A) 1. pET6xHN-C plazmid vektörünün *Hind*III ile kesimi; B) 1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* geni (60 ng/μl); 2. *S. coelicolor* A3(2) *lon* geni (90 ng/μl); 3. pET6xHN-C vektörü.



Şekil 7.2: In Fusion reaksiyonunun transformasyonu sonrasında büyüyen kolonilerden plazmid izolasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesimi. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1-4. Olası pET6xHN-C/*lon* rekombinant plazmidleri; B) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. pET6xHN-C/*lon* plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI ile kesimi.

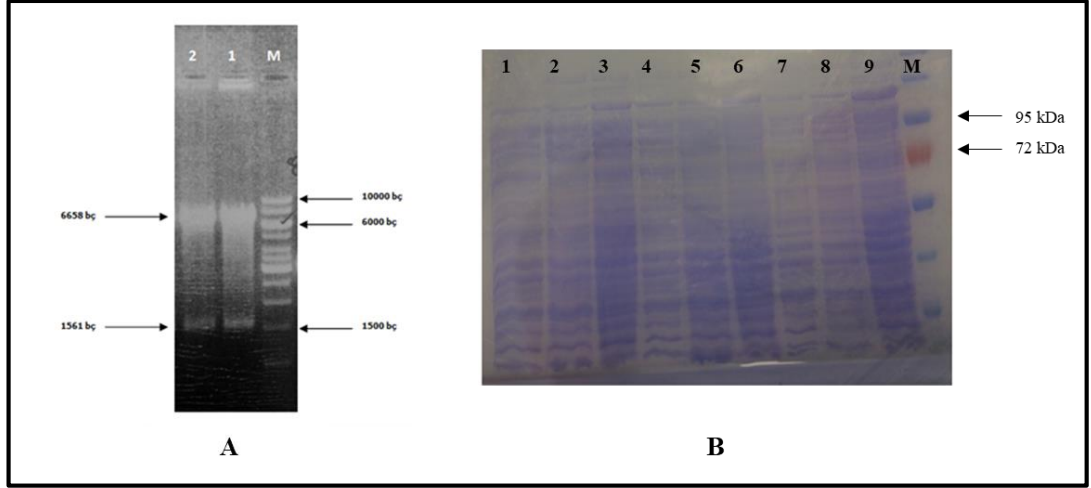
```
AAGCTTATGGCTGCTGAGTCCGCCGCTTCACACCGCTCACCCCTGCCCGTGCTGCC
GCTCGACGACGAAGTGGTCCTGCCCGGCATGGTCGTCCCCCTGGACCTGAGCGAC
GCCGAGGTACGGGGCCGCGGTGGAGGCCGCCAGGCCGCCAGGTCCGAGCCC
GGCAAGCCCCGCGTCCTCCTCGTCCCGCGCATCGACGGCACGCACGCCGCCACCG
GCGTGCTCGGCACGGTCGAGCAGGTGGGCCGCTGGCCGACGGCGACCCGGGCG
CCCTGATCCGCGGCCGGGGCCGGGTGCGCATCGGCCGCCGGCACCCACGGCCCCG
GCGCCGCGCTCTGGGTCGAGGGCACCCGGGTGACGAGACCGTTCCCGATCCGC
TGCCCGGCCAGGTGCGCGAGCTGGTGAAGGAGTACAAGGCGCTCGCCACCGCCT
GGCTGCGCAAGCGCGGCGCCTGGCAGTCGTGACCGGGTCCAGGCCATCGACGA
CGTGTCGCGCTCGCCGACAACTCCCGGCTACTCGCCGTTCTTGACCACCGAGCA
GAATGTCGAACTGCTGGAGACCACCGACCCGGTCGCCCGCCTGAGATCGCCACCC
AGCAGCTGCGCGACCACTCGCCGAGCAGACGTGCGCGAGACCATCGCCAAGACGT
CCAGGAGGCGTCGACAGCAGCAGCCGCGAGTTCTGCTGCTCGCAGCTCGAAGCGT
CCGCAGGACTGGCCGAGATCAACGCGCAGCAGGAGGCAGGGTTCCGACGACTAC
GCGCCCTGGTCCAAGCCGCACTGCCGGAAGTTCCCGAGCCGCCCTCAGAGTGCCAA
CTGAACGTCTCCAGTCCAGGTCTGAATCACTGGGTCAGAA
```

Şekil 7.3: *S. coelicolor* A3(2) *lon* genine ait 2424 bp'lik fragmanın DNA dizisi. Kalın olarak gösterilen diziler açık okuma çerçevesini ifade etmektedir. ATG: başlangıç kodonu.

7.2. *lon* Geninin Heterolog Ekspresyonu İçin Farklı *Escherichia coli* Hücreleriyle Yapılan Çalışmalar

7.2.1. *lon* Geninin *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinde İfadesi

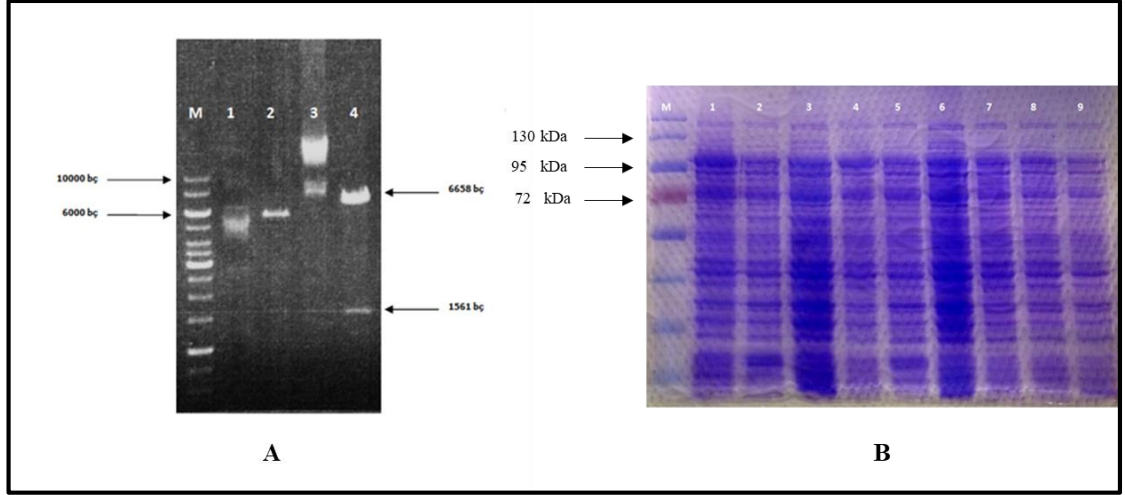
Elde edilen rekombinant pET6xHN-C/*lon* plazmid, ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmış ve plazmidin varlığı *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesilerek doğrulanmıştır (Şekil 7.4). Rekombinant plazmid taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri farklı besiyerlerinde, farklı IPTG konsantrasyonlarında, farklı sıcaklıklarda büyütülmüş ancak SDS-PAGE'de Lon proteaz'ın moleküler ağırlığına denk gelen (87 kDa) bir protein bandı elde edilememiştir (Şekil 7.4).



Şekil 7.4: *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden izole edilen pET6xHN-C/*lon* rekombinant plazmidin doğrulanması ve rekombinant hücreden protein izolasyonu. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1-2. pET6xHN-C/*lon* plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI ile kesimi; B) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-3. BL21-pET6xHN-C/*lon*, BL21-pET6xHN-C ve BL21 hücrelerinin 2. saat örnekleri; 4-6. BL21-pET6xHN-C/*lon*, BL21-pET6xHN-C ve BL21 hücrelerinin 4. saat örnekleri; 6-9. BL21-pET6xHN-C/*lon*, BL21-pET6xHN-C ve BL21 hücrelerinin 6. saat örnekleri.

7.2.2. *lon* geninin *E. coli* Rosetta (DE3) Hücrelerinde İfadesi

E. coli BL21 (DE3) hücresinde ekspresyonun gerçekleşmeme nedeni translasyon aşamasında bir problemin neden olabileceği düşünülmüştür. Organizmaların kodon kullanma sıklıkları ve çeşitleri birbirinden farklıdır. SDS jelde *lon* genine ait protein bandı görülmemesinin, *E. coli* BL21 suşunda bulunan tRNA'ların *S. coelicolor* A3(2) *lon* mRNA'sında var olan kodonlara uygun olmadığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu sebeple, ekspresyonu sağlamak ve ekspresyon düzeyini yükseltmek amacıyla AGG, AGA, AUA, CUA, CCC ve GGA kodonlarını tanıyacak tRNA'ları kodlayan genleri taşıyan bir *E. coli* suşu olan Rosetta (DE3) hücresi kullanılmıştır. Rekombinant plasmid bu hücrelere aktarılarak, restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulanmış, ardından farklı koşullarda yapılan deneylerde *Lon* proteaz'a ait olabilecek protein bandı yine elde edilememiştir (Şekil 7.5).



Şekil 7.5: *E. coli* Rosetta (DE3) hücrelerinden izole edilen pET6xHN-C/*lon* plazmidinin doğrulanması ve protein seviyesinde ekspresyon deneyi. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. pET6xHN-C vektörü; 2. pET6xHN-C plazmidinin *Hind*III ile kesimi; 3. pET6xHN-C/*lon* plazmidini; 4. pET6xHN-C/*lon* plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI ile kesimi; B) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-3. Rosetta, Rosetta-pET6xHN-C ve Rosetta-pET6xHN-C/*lon* hücrelerinin 2. saat örnekleri; 4-6. Rosetta, Rosetta-pET6xHN-C ve Rosetta-pET6xHN-C/*lon* hücrelerinin 4. saat örnekleri; 6-9. Rosetta, Rosetta-pET6xHN-C ve Rosetta-pET6xHN-C/*lon* hücrelerinin 6. saat örnekleri.

Karşılaşılan bu problemi çözmek için Genscript şirketi aracılığı ile *S. coelicolor* A3(2) *lon* mRNA'sının kodonları *E. coli*'ye göre optimize ettirilmiştir (Şekil 7.6). Kodonları optimize edilmiş *lon* genini taşıyan pET28a/*lon*^{opt} plazmidi ile ekspresyon deneylerine devam edilmiştir.

Optimized	61	GAAGTG TTT CTG CCGGT ATG TTTGCCG CTG SAT CTGAGC ATCGGAAGTT CGTG CG
Original	61	GAAGTGGTCCTGCCCGCATGGTCGCCCTGGACCTGAGCGACGCCGAGGTACGGGCC
Optimized	121	GCGGTGGAG CGGC CGAG CGCGCGCG CTAGCGAG CCGGCAAGCCGCGT TTCTGCTG
Original	121	GCGGTGGAGGCCGCCAGGCCGCCAGGTCGAGGCCGCAAGCCCGCGTCTCTCTC
Optimized	181	GTGCGCGTATT GATGGC ACCACGCGCG ACCGGT TTCTGGGCA CGTT GAACAAGTT
Original	181	GTCCCGGCATGACGGCACGACGCCGCCACCGCGCTGCTCGGCACGGTCGAGCAGGTC
Optimized	241	GG CCGT CTG CGGAT GGC GAT CCG GGTGCG CTGATC CGTGGTCGTGGT CGT TTCT ATC
Original	241	GGCCGCTGGCGACGGGACCGGGCGCCCTGATCCGCGCGCGGGCGGGTGCGCATC
Optimized	301	GGTGCGG CACCACC GGT CCGGCG CGCGCT GTGG TTGAGGG CACC CGTGTGGATGAA
Original	301	GGCGCGGCACCACCGGCCGGCGCGCGCTGTGGTTCGAGGGCACCGGGTCGACGAG
Optimized	361	ACC GTGCCG ACCCGCTG CCGGCCAGGTGGCG GAGCTGTTGAAG GAATATAAGGCGCTG
Original	361	ACCGTTCCGATCCGCTGCCCGCCAGGTGCGCGAGCTGGTGAAGGAGTACAAGGCGCTC
Optimized	421	GCGACCG CGTGCGT CGTAAACGTGGTGG CGTGG CAAGTGGTGAC CGT TTT CAGCGGATC
Original	421	GCCACCGCCTGGCTGCGCAAGCGCGCGCCTGGCAGGTGTCGACCGGGTCCAGGCCATC
Optimized	481	GATGACGTTAG CGCG CTGGCGGATAACAGCGGCTATAG CCGTTCTGACCA CGGAACAA
Original	481	GACGAAGTGTCCGCGCTGCGCGACAACCTCCGGCTACTCGCCGTTCTGACCA CGGAGCAG
Optimized	541	AAAGTGAACT GCTG GAA ACCACCGACCC GGTTGCGCGT CTGAAG ATTGCG ACCCAG CAA
Original	541	AAGGTGAACTGCTGGAGACCA CGACCCGGT CGCCCGCTGAAGATCGCCACCCAGCAG
Optimized	601	CTG CGTGAT CAC CTGGCGGAGCAAGATGTTGCGGAA ACCATC CGGAAGGATGTG CAG GAA
Original	601	CTGCGGACCACTCGCCGAGCAGGACGTGCGCGAGACCATCGCCAAGGACGTCCAGGAG
Optimized	661	GGCGTGGAT AAGCAGCAGCGT GAG TTT CTGCTG CGTCTCAACTGGAGGCGGTG CGT AAG
Original	661	GGCGTCGACAAGCAGCAGCGGAGTTCTGCTGCGCGCCAGCTCGAAGCGGTCCGCAAG
Optimized	721	GAACTGCGTGA AA TTAACGGCGAGCAAGAGGGTGAA GAG AGCGAT GACTAC CGTGGCGGT
Original	721	GAGCTGCGCGAGATCAACGGCGAGCAGGAGGGCGAGGAGTCCGACGACTACCGGCCCGG
Optimized	781	GTGGAAGCGCG GACCTG CCGAGAAAGTGCGTGAAGCGGCGCTGAAAGAAAGTG GACAAG
Original	781	GTGAGGCCCGGACCTGCCCGAGAAGGTCCGCGAGGCCGCGCTCAAGGAGGTGACAAG

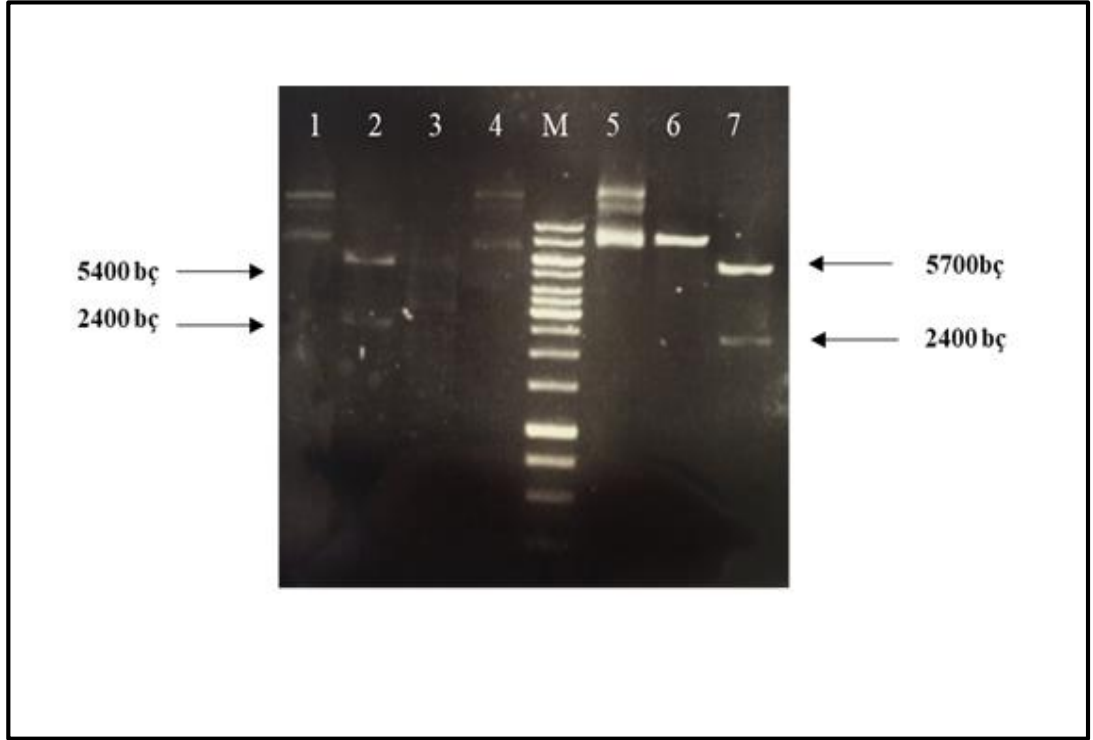
Şekil 7.6: *E. coli*'de *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin ekspresyonunun gerçekleşmesi için değiştirilmesi gereken nükleotitleri gösteren rapor. Kırmızı renk ile işaretlenmiş nükleotitler değişen nükleotitleri ifade etmektedir.

7.3. Kodonları *E. coli*'de ifade edilecek şekilde optimize edilmiş *lon* geni ile Yapılan Çalışmalar

7.3.1. Kodon optimize *lon* geninin *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinde İfadesi

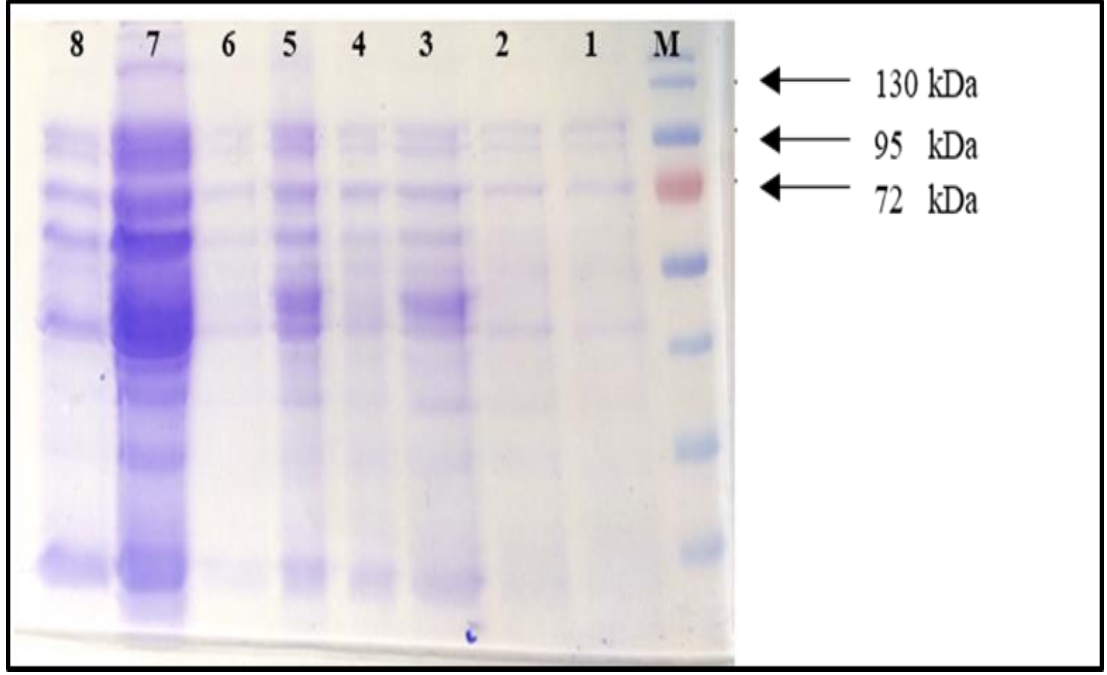
Genscript şirketi aracılığıyla pET28a(+) vektörüne klonlanmış kodon optimize *lon* geni, optimizasyondan sonra kaybolan ya da oluşan restriksiyon enzim kesim

bölgeleri dikkate alınarak farklı restriksiyon enzimleri ile kesilip doğrulanmıştır (Şekil 7.7).



Şekil 7.7: pET28a/*lon*^{opt} plazmidinin doğrulanması 1. pET28a/*lon*^{opt} plazmid; 2. pET28a/*lon*^{opt} plazmidinin *Nde*I ve *Xho*I ile kesimi; 3. pET28a/*lon*^{opt} plazmidinin *Bam*HI ile kesimi; 4. pET28a/*lon*^{opt} plazmidinin *Hind*III ile kesimi; M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 5. pET6xHN-C/*lon* plazmid; 6. pET6xHN-C/*lon* plazmidinin *Bam*HI kesimi; 7. pET6xHN-C/*lon* plazmidinin *Hind*III ile kesimi.

Optimize *lon* geninin ekspresyonunu sağlamak için pET28a/*lon*^{opt} vektörü *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Promotorun uyarılması için 0.5 mM IPTG kullanılmış ve uyarılan hücrelerden çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Bu örneklerden proteinler izole edilmiş ve SDS-PAGE sonucunda Lon proteaz'a ait olabilecek protein bandı yine elde edilememiştir (Şekil 7.8).

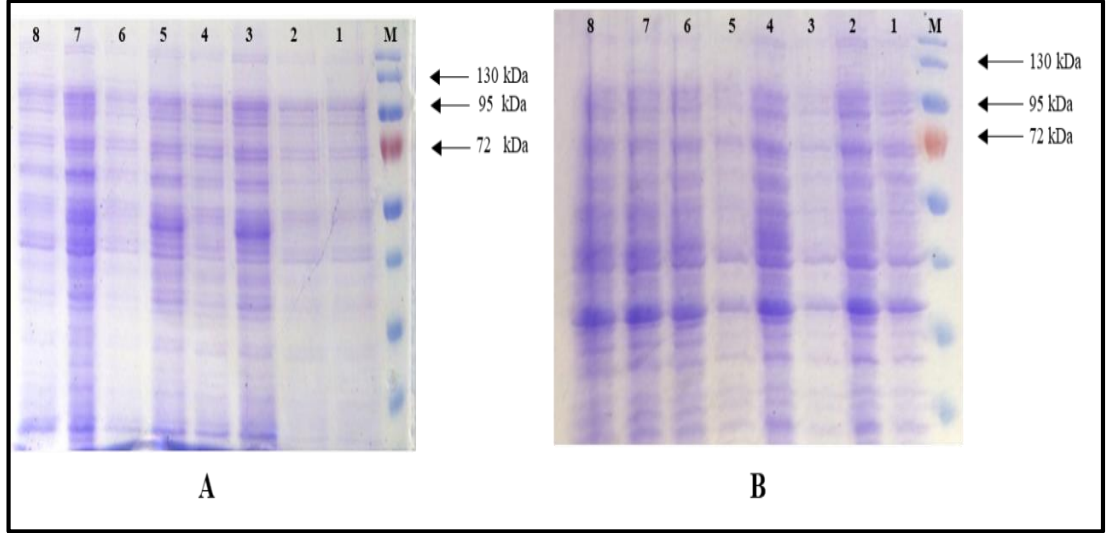


Şekil 7.8: *E. coli* BL21-pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 0.5 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi. M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. BL21 ve BL21- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 0. saat örnekleri; 3-4. BL21 ve BL21- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 2. saat örnekleri; 5-6. BL21 ve BL21- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 4. saat; 7-8. BL21 ve BL21- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 6. Örnekleri.

Deney, farklı IPTG konsantrasyonlarında, farklı üreme sıcaklıklarında ve farklı zamanlarda alınan örneklerle tekrarlanmış fakat yine ekspresyon gözlenmemiştir. Ekspresyon denemelerine devam etmek için bu kez farklı bir ekspresyon hücre hattı olan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücresi kullanılmıştır.

7.3.2. Kodon optimize *lon* geninin *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Hücrelerinde İfadesi

lon geninin yüksek düzeyde ifade edildiğinde hücre için toksik olabileceği düşünüldüğünden, *E. coli* BL21(DE3) pLysS hücre hattının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu *E. coli* suşunun genomunda lacUV5 promotörü kontrolü altında T7 RNA Polimeraz geni bulunmaktadır. T7 RNA Polimeraz enzimin aktivitesi, pLysS plazmidi üzerinde bulunan T7 lizozimi ile kontrol altında tutulmakta, böylece T7 promotörü altında var olan genin bazal seviyede ekspresyonu sağlanmaktadır. pET28a/*lon*^{opt} rekombinant plazmidi *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücrelerine aktarılmış ve ekspresyon deneyi yapılmıştır (Şekil 7.9).

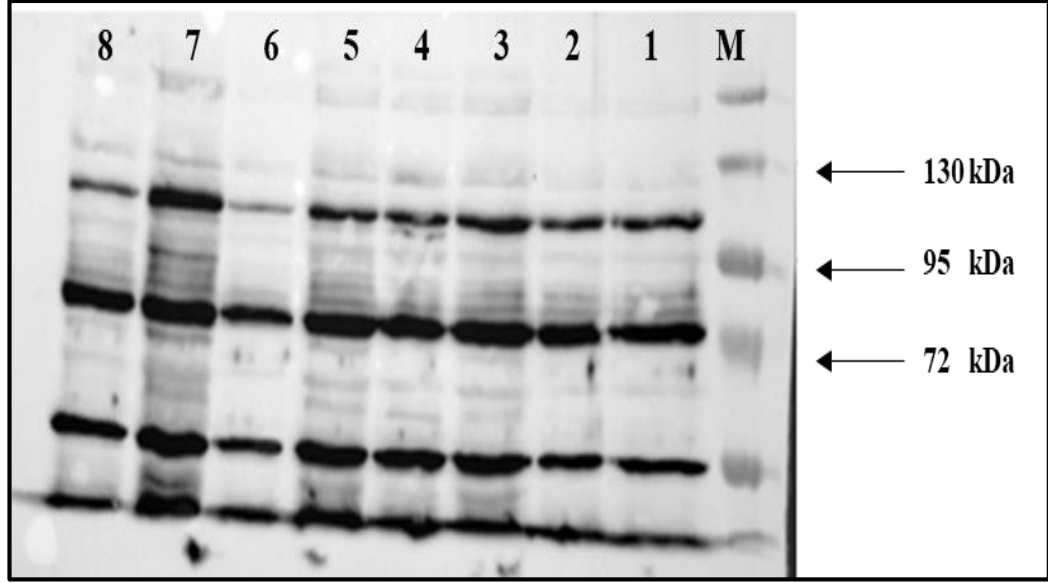


Şekil 7.9: *E. coli* pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin sırasıyla 0.5 mM ve 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi. A) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 0. Saat örnekleri; 3-4. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 2. saat örnekleri; 5-6. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 4. saat örnekleri; 7-8. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 6. saat örnekleri.

Deney, farklı IPTG (0,5 mM ve 1,0 mM) konsantrasyonları, farklı üreme sıcaklıkları ve farklı örnek alma saatleri gibi faktörler değiştirilerek tekrarlanmış fakat Lon proteaz'a ait olabilecek protein bandı yine elde edilememiştir.

7.3.3. Lon proteininin Western Blot Analizi ile tespit edilmesi

Lon Proteaza ait protein bantları SDS-PAGE'de görülemeyince daha spesifik sonuç alabilmek için western blot analizi gerçekleştirilmiştir. pET28a(+) plazmidine klonlanmış olan kodon optimize *lon* geni, N-terminus ucunda His-tag takısı olacak şekilde ifade edilmektedir. Anti-his antikoru kullanılarak yapılan western blot analizinde Lon proteaza ait protein bandı görülememiştir (Şekil 7.10).

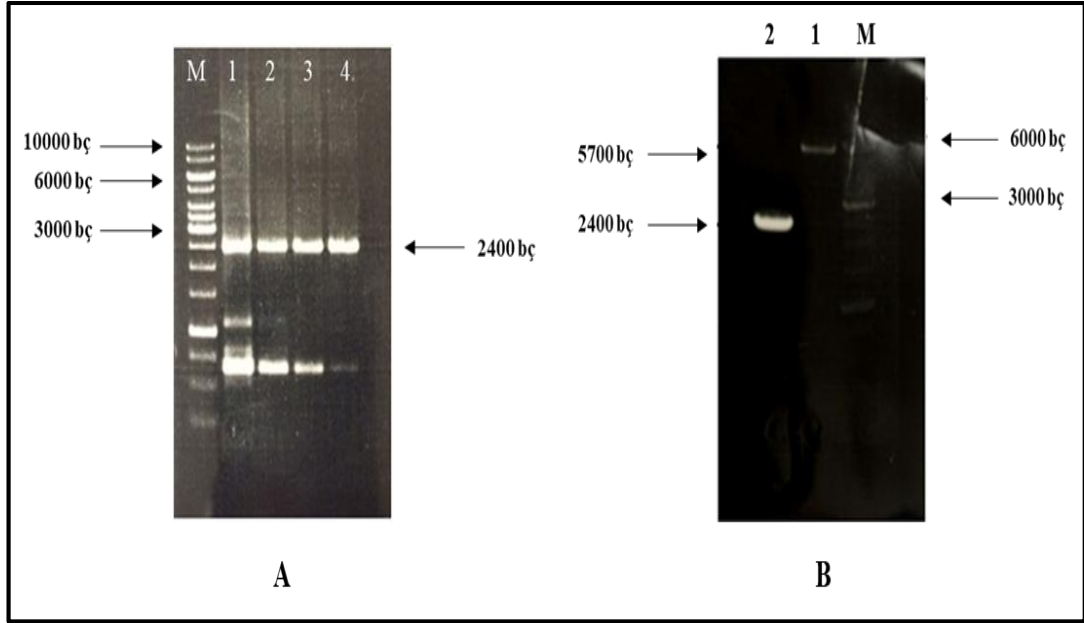


Şekil 7.10: *E. coli* pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi. M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 2. saat örnekleri; 3-4. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 4. Saat örnekleri; 5-6. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} hücrelerinin 6. saat örnekleri; 7-8. pLysS ve pLysS- pET28a/*lon*^{opt} 24. saat örnekleri.

7.4. Kodon optimize *lon* geninin pET6xHN-N Plazmidine Klonlanması ve *E. coli*'de Heterolog Ekspresyon Çalışmaları

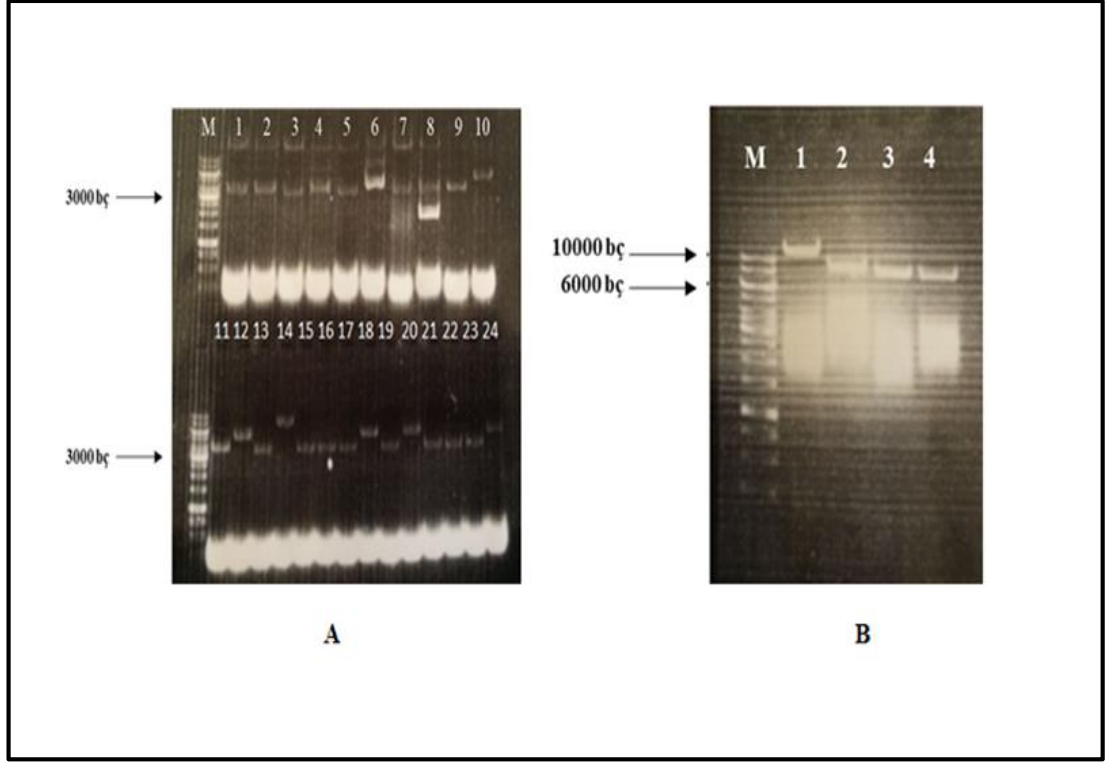
7.4.1. Kodon optimize *lon* geninin pET6xHN-N plazmidine klonlanması

pET28a(+) vektörüne klonlanmış halde olan kodon optimize *lon* geninin farklı *E. coli* suşlarında ekspresyon çalışmalarından bir sonuç alınamayınca genin başka bir plazmide klonlanması kararlaştırılmıştır. Bu karar doğrultusunda *lon*^{opt} geni, pET6xHN-N plazmidinin *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgelerine klonlanmıştır. Bunun için öncelikle PCR ile çoğaltılmış *lon*^{opt} geni ve pET6xHN-N vektörü *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon endonükleaz ile kesilerek, jelden saflaştırılmıştır (Şekil 7.11).



Şekil 7.11: Optimize *lon* geninin PZR ile çoğaltılması ve izole edilen pET6xHN-N vektörü. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb DNA ladder); 1-4. Sırasıyla *lon* geni (Primer bağlanma sıcaklığı 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C); B) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. pET6xHN-N plazmidinin *Hind*III ve *Eco*RI kesimi (90 ng/ µl) 2. *S. coelicolor* A3(2) optimize *lon* geni *Hind*III ve *Eco*RI kesimi (250ng/µl).

Ligasyon reaksiyonu sonrası gerçekleştirilen transformasyon ile elde edilen transformantlardan izole edilen olası rekombinant plazmidler (Şekil 7.12A) *Nco*I restriksiyon endonükleaz ile kesilerek agaroz jelde yürütülmüşlerdir (Şekil 7.12B). Bu kesim sonucunda 8100 bp uzunlukta DNA fragmanı görülen plazmidler doğru kabul edilmiş ve rekombinant plazmide pET6xHN-N/*lon*^{opt} adı verilmiştir.

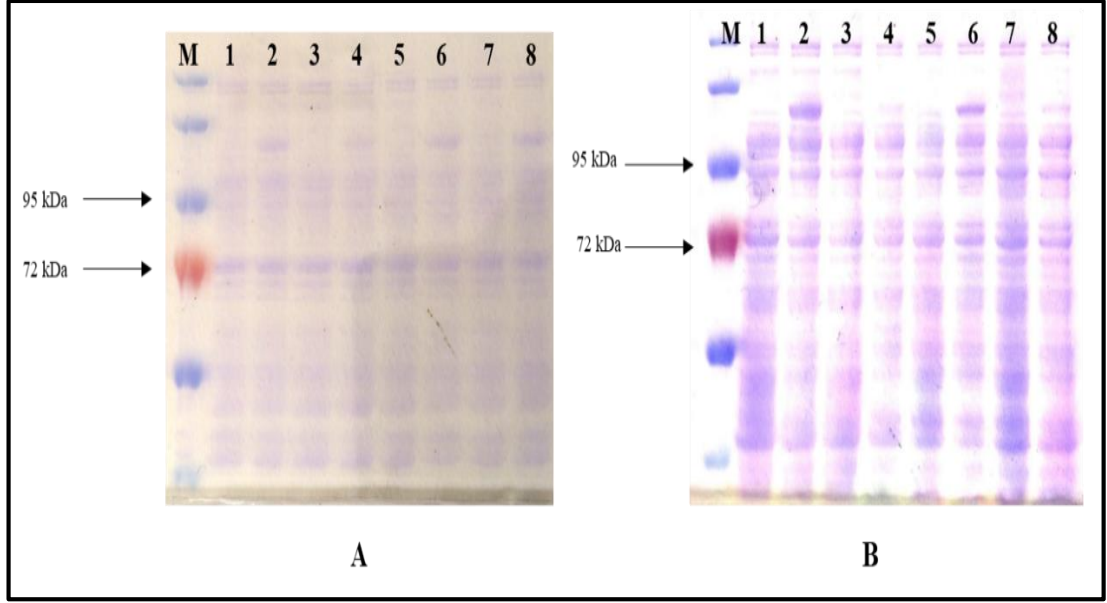


Şekil 7.12: Olası pET6xHN-N/*lon*^{opt} plazmidi izolasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesim sonuçları. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo); 1-24. Mini Prep. Sonuçları; B) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 2-4. Olası pET6xHN-N/*lon*^{opt} rekombinant plazmidlerinin *Nco*I ile kesimi.

7.4.2. pET6xHN-N/*lon*^{opt} Üzerindeki Kodon Optimize *lon* Geninin *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Hücrelerinde İfadesi

pET6xHN-N plazmid vektörüne klonlanan *lon*^{opt} geninin ekspresyonu için ilk olarak ekspresyon suşu olan *E. coli* pLysS hücresi denenmiştir. Promotorun uyarılması için 1.0 mM IPTG kullanılmış ve uyarılan hücrelerden çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Bu örneklerden proteinler izole edilmiş ve SDS-PAGE sonucunda Lon proteaz'a ait olabilecek protein bandı elde edilememiştir (Şekil 7.13).

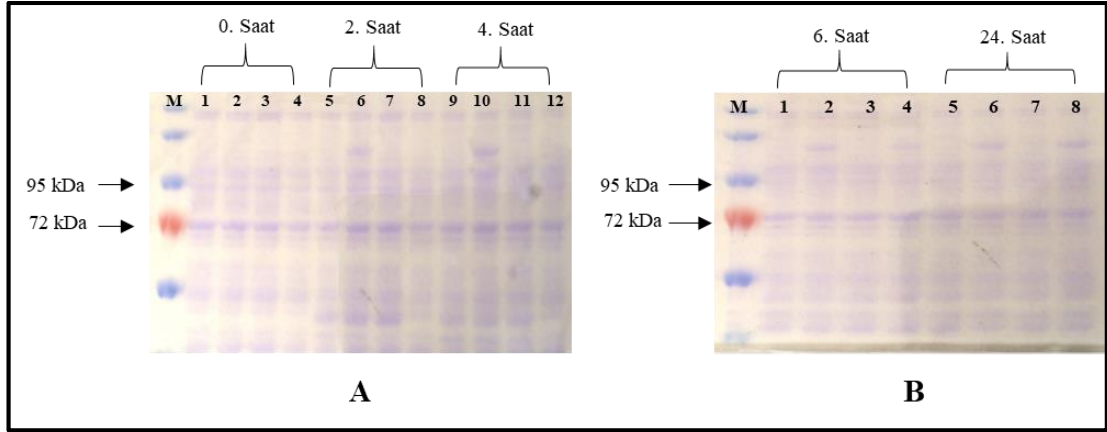
E. coli BL21 (DE3) pLysS hücrelerinde yapılan ekspresyon deneyi farklı IPTG konsantrasyonları, farklı üreme sıcaklıkları ve farklı örnek alma saatleri gibi faktörler değiştirilerek tekrarlanmış fakat yine ekspresyon gözlenmemiştir.



Şekil 7.13: *E. coli* pLysS-pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi. A) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. pLysS hücrelerinin 0. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 3-4. pLysS- pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 0. saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 5-6. pLysS hücrelerinin 2. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 7-8. pLysS- pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 2. saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; B) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. pLysS-hücrelerinin 4. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 3-4. pLysS- pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 4. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 5-6. pLysS hücrelerinin 6. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 7-8. pLysS- pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 6. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri.

7.4.3. pET6xHN-N/*lon*^{opt} Üzerindeki Kodon Optimize *lon* Geninin *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerinde İfadesi

Ekspresyon denemelerine devam etmek için bu kez farklı bir ekspresyon hücre hattı olan *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta hücresi denenmiştir (Şekil 7.14). Rosetta hücre hattında da ekspresyon görülemeyince, *lon* geninin *S. coelicolor* A3(2)'da homolog ifadesinin büyümeye ve antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere çalışmalar yön değiştirmiştir.

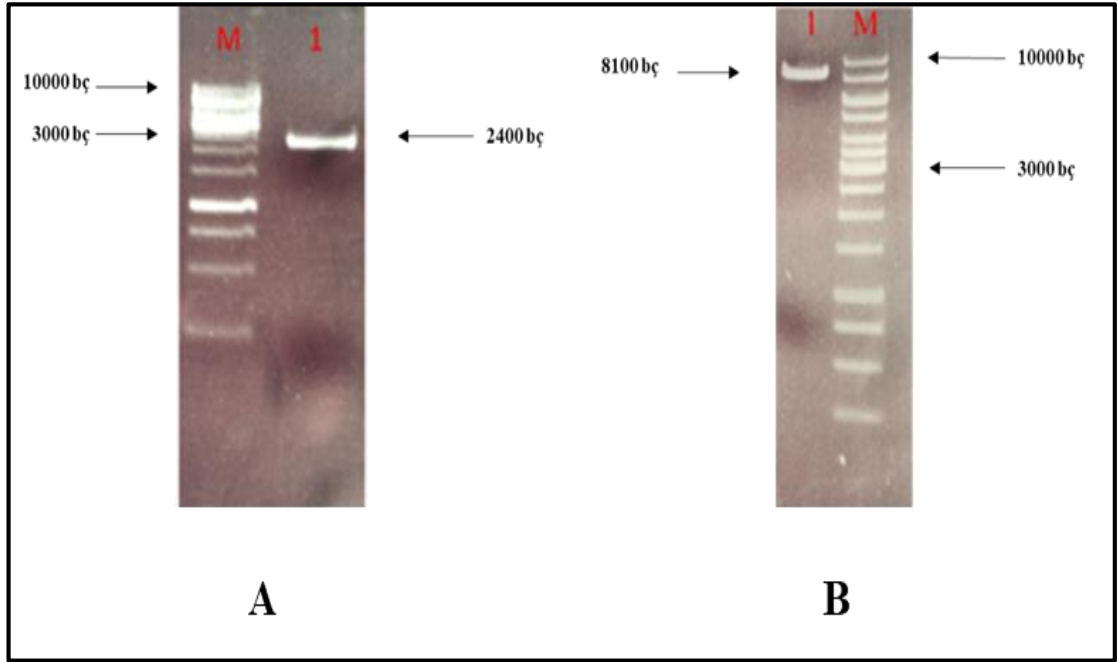


Şekil 7.14: *E. coli* Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 1.0 mM IPTG ile indüklenmesiyle yapılan ekspresyon deneyi. A) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. Rosetta hücrelerinin 0. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 3-4. Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 0. saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 5-6. Rosetta hücrelerinin 2. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 7-8. Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 2. saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 9-10. Rosetta hücrelerinin 4. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 11-12. Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 4. saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; B) M. Protein marker (Fermantas SM0671). Sırayla; 1-2. Rosetta hücrelerinin 6. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 3-4. Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 6. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 5-6. Rosetta hücrelerinin 24. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri; 7-8. Rosetta/pET6xHN-N/*lon*^{opt} hücrelerinin 24. Saat indüklenmemiş ve indüklenmiş örnekleri.

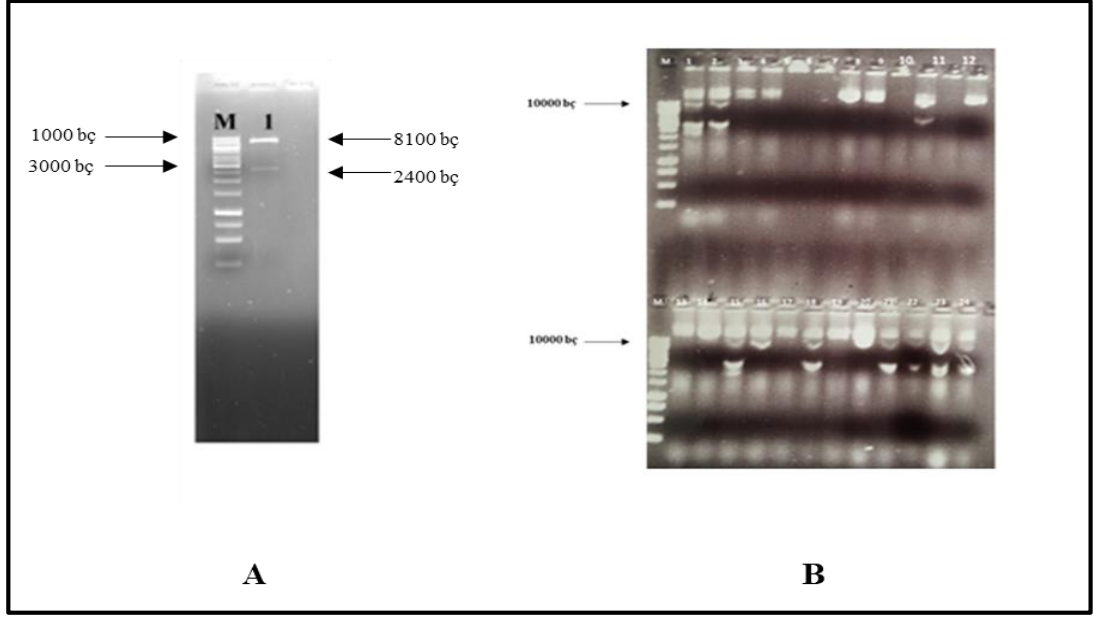
7.5. *lon* geninin *Streptomyces/E. coli* Mekik vektörü pSPG'ye Klonlanması ve Rekombinant Plazmidin *S. coelicolor* A3(2)'ye Aktarılması

S. coelicolor A3(2) *lon* geninin çoklu kopyasının *Streptomyces*'te ikincil metabolit üretimi üzerindeki etkisini araştırmak üzere *lon* geni bir mekik vektörü olan pSPG plazmidinin *Nde*I ve *Spe*I restriksiyon enzim kesim bölgelerine gliserol ile uyarılabilen bir promotor altına klonlanmıştır. pSPG plazmidine *lon* genini klonlamak üzere tasarlanan primerlere, daha sonraki protein çalışmalarında kullanılmak üzere HisTag'ı ifade eden nükleotit dizisi de eklenmiştir (Tablo 5.6). *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin pSPG plazmid vektörüne klonlanması için *lon* geni PZR reaksiyonu ile çoğaltılıp, *Nde*I ve *Spe*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. pSPG vektörü de aynı enzimlerle kesilerek ligasyona hazır hale getirilmiştir (Şekil 7.15). Ligasyon ürünleri *E. coli* TG-1 hücrelerine aktarılmış ve transformant hücrelerden plazmidler izole

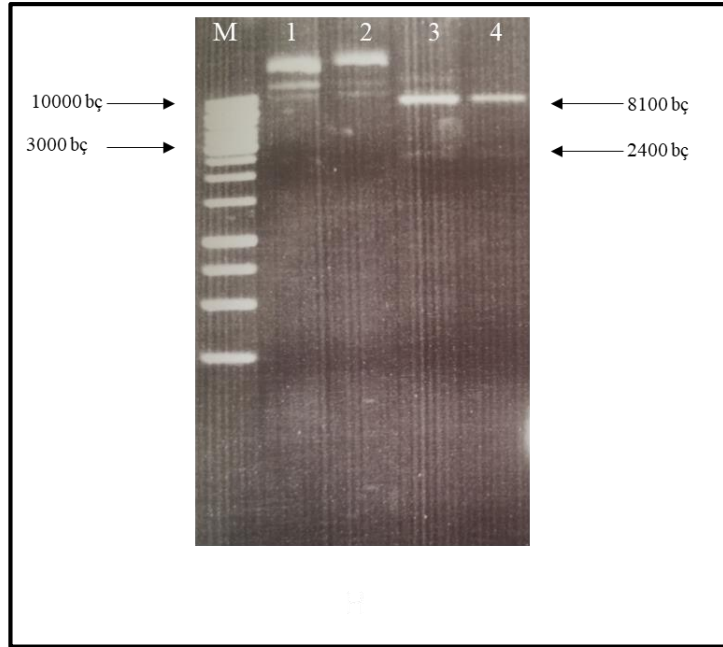
edilerek, olası rekombinant plazmid *NdeI* ve *SpeI* kesimi ile doğrulanmıştır (Şekil 7.16). Rekombinant plazmide bu çalışmada pSPG/*lon* adı verilmiş ve *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri aracılığı ile *S. coelicolor* A3(2)'ye konjugasyon ile aktarılmıştır. *S. coelicolor* A3(2)'dan izole edilen plazmidler *NdeI*/*SpeI* enzimleriyle kesilerek, beklenen pSPG plazmidine ait ~ 8 kb ve *lon* genine ait ~ 2.4 kb'lık iki bant gözlenmiştir (Şekil 7.17).



Şekil 7.15: *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin ve pSPG plazmid vektörünün *NdeI* ve *SpeI* kesimi. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin *NdeI* ve *SpeI* kesimi. B) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. pSPG plazmid vektörünün *NdeI* ve *SpeI* kesimi.



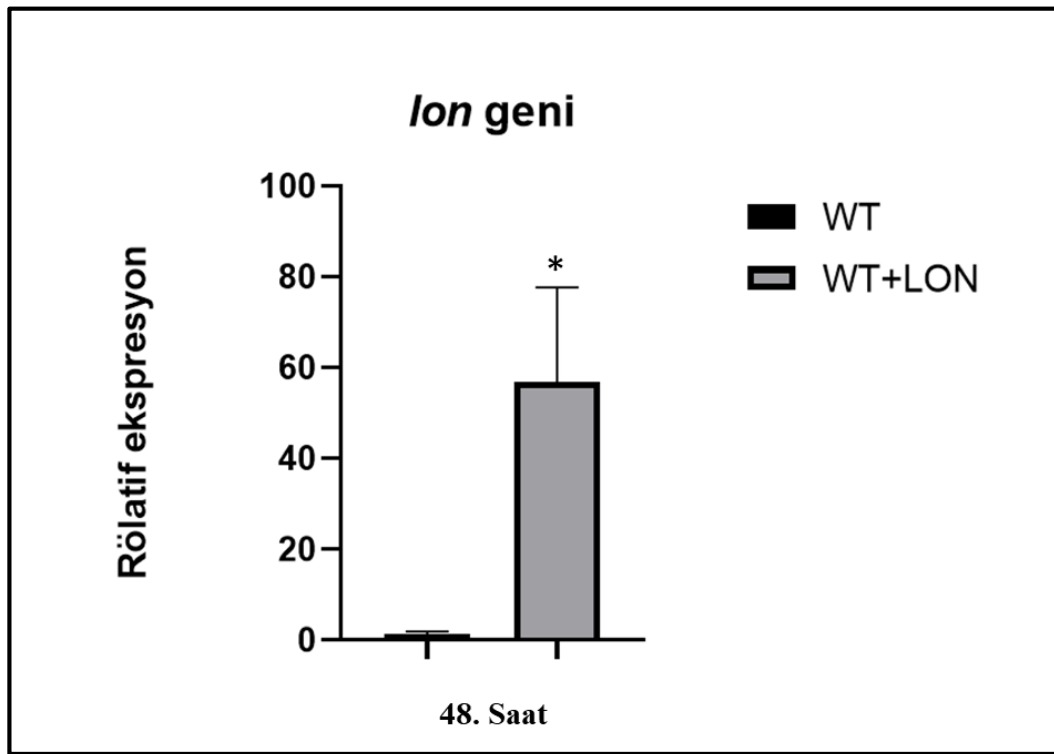
Şekil 7.16: Olası pSPG/*lon* rekombinant plazmidini taşıyan *E. coli* hücrelerinde plazmid izolasyonu ve *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzim kesimi. A) M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1. pSPG/*lon* plazmidinin *NdeI* ve *SpeI* ikili kesimi; B) M .1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); 1-24. Olası rekombinat pSPG/*lon* rekombinant plazmidleri.



Şekil 7.17: *S. coelicolor* A3(2)'den izole edilen pSPG/*lon* rekombinant plazmidin *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile ikili kesimi. M. 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo 1 kb Plus DNA ladder); A) 1-2. *S. coelicolor* A3(2)'den izole edilen pSPG/*lon* rekombinant plazmid; B) 3-4. pSPG/*lon* rekombinant plazmidinin *NdeI* ve *SpeI* ikili kesimi.

7.6. *S. coelicolor* A3(2) *lon* Ekspresyonunun Transkripsiyonel Seviyede Gösterilmesi

pSPG/*lon* vektöründe bulunan promotörü uyarmak için rekombinant *S. coelicolor* A3(2) hücreleri % 0.25 gliserol varlığında büyütülmüş ve fermentasyonun 48. saatinde alınan örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve DNA kontaminasyonunu yok etmek üzere DNaz uygulanmıştır. DNaz uygulanmış RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan PZR sonucunda, örneklerde DNA kontaminasyonu olmadığı teyid edilmiştir. Yapılan RT-qPCR deneyi sonucunda rekombinant suşun yaban tip suş'a göre 48. saatte *lon* genini 56 kat daha fazla ifade ettiği bulunmuştur (Şekil 7. 18).



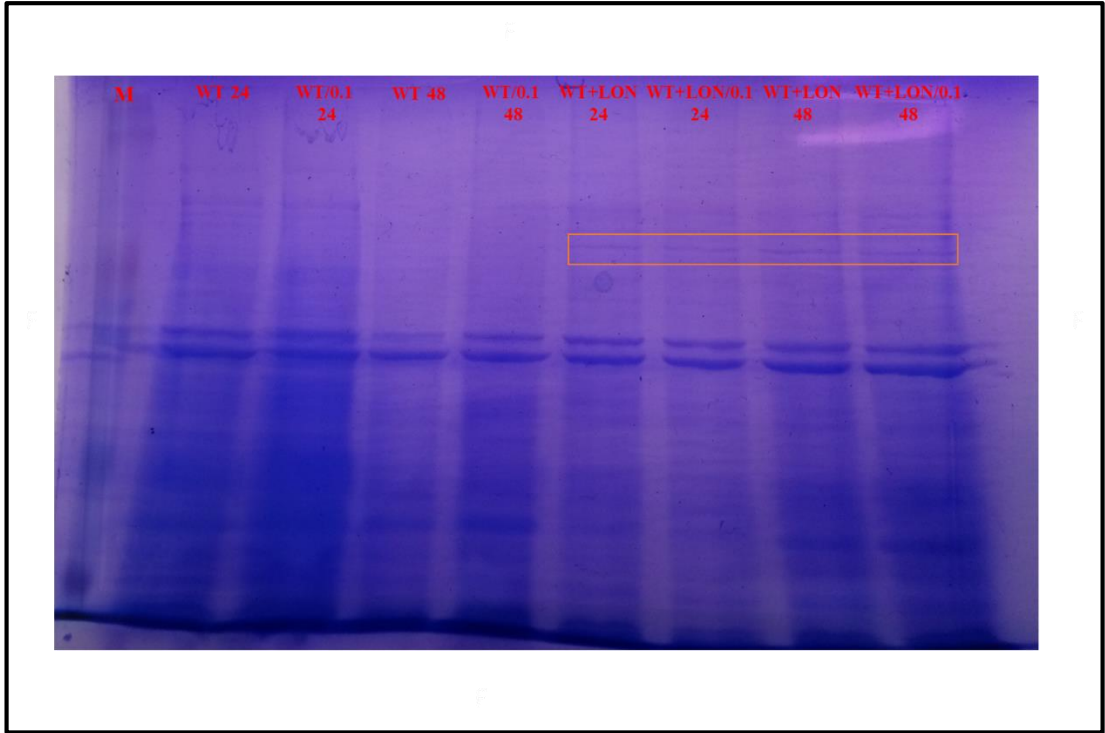
Şekil 7.18: *S. coelicolor* A3(2) yaban suş ve rekombinant suшта *lon* geninin ekspresyon düzeyi.

7.7. Homolog *Lon* Ekspresyonunun Protein Seviyesinde Gösterilmesi

Çok kopyalı olan pSPG plazmid vektörü üzerindeki *lon* geninin *S. coelicolor* A3(2)'de protein düzeyinde ifadesinin gösterilmesi amacıyla yaban tip hücre (WT) ve

lon'u çok kopyalı olarak ifade eden rekombinant hücre hattı (WT+LON) %0.1 gliserol ile uyarılmıştır.

Fermentasyon sonucunda alınan hücre örneklerinden elde edilen proteinler SDS-PAGE'de yürütülmüştür (Şekil 7.19). Commasie blue boyası ile boyanan protein jelinde *lon* genini çok kopyalı olarak taşıyan hücre hatları (WT+LON ve WT+LON/0.1) yaban tip hücre hattında olmayan bir band profili göstermektedir. Görüntülenen jele göre *lon* ekspresyonu az da olsa yaban tip hücre hattına göre daha fazla olup yapılan klonlama çalışması sonucunda pSPG plasmid vektörü üzerinde olan *lon* geninin eksprese olduğu kanıtlanmıştır.

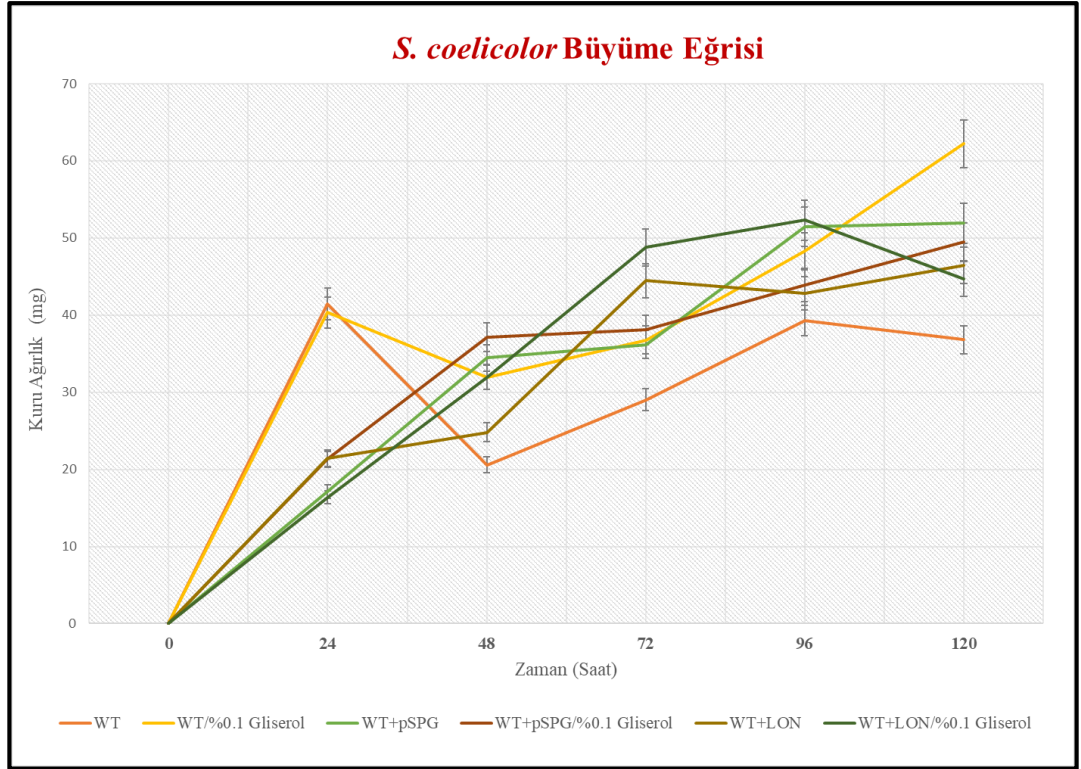


Şekil 7.19: *S. coelicolor* A3(2) pSPG/*lon* rekombinant hücrelerinin % 0.1 gliserol ile uyarılmasıyla elde edilen 24 ve 48. Saat protein örnekleri. M. Protein marker (Fermantas SM0671).

7.8. Lon Ekspresyonunun Antibiyotik Üretimine Etkisi

Antibiyotik üretiminin ölçülmesi amacıyla yapılan fermentasyon deneyi R2YE besiyerinde gerçekleştirilmiş olup rekombinant hücrelerin bulunduğu kültürlerle apramisin (50 µg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. 3 tekrarlı yapılan antibiyotik ölçüm

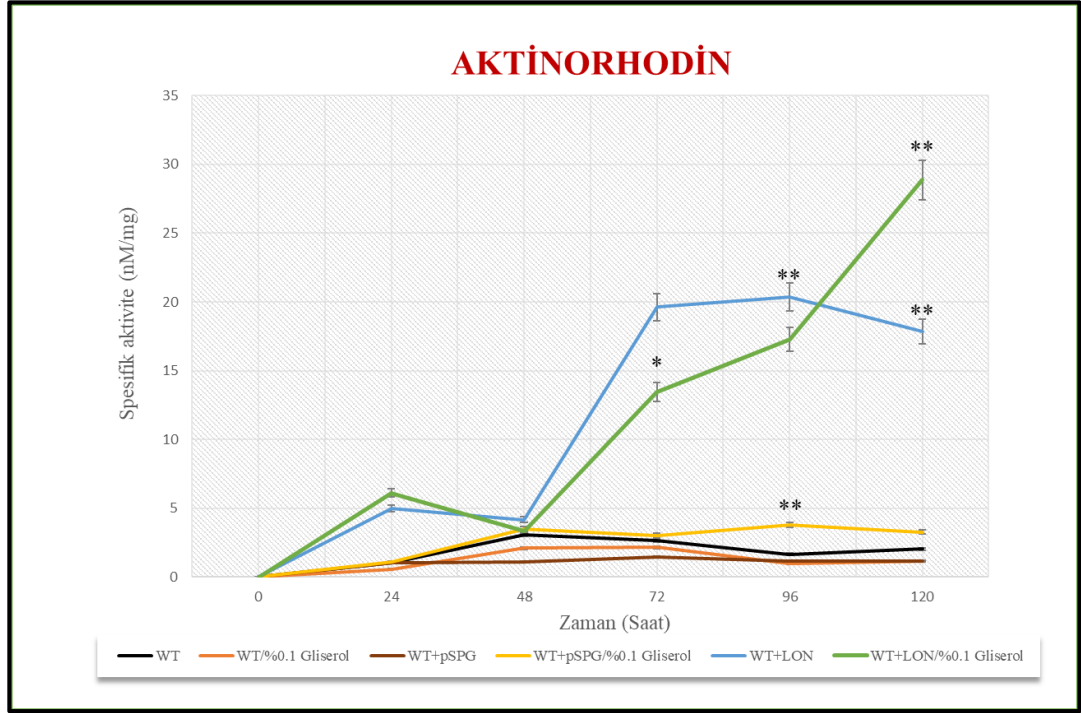
deneyinde % 0.1 gliserol ile indüklenen ve indüklenmeyen yaban tip ve rekombinant hücreler 120 saat boyunca inkübatörde büyütülmüştür. Her 24 saatte kültürlerden örnek alınarak büyüme grafiği (Şekil 7.20) ve antibiyotik ölçüm grafiği (Şekil 7.21 ve Şekil 7.22) oluşturulmuştur. Hücrelerin 120 saatlik büyüme profili incelendiğinde çoğunlukla gliserol ile uyarılmanın hücrelerde büyümeyi tetiklediği ve özellikle 48. saatten sonra *lon*'u fazla ifade eden hücre hattının (WT+LON/%0.1 Gliserol) büyümesinin tetiklendiği görülmüştür. Gliserol ile uyarılan yaban tip hücrelerin gliserol ile uyarılmayanlara kıyasla daha çok büyüdüğü gözlenmiştir. Ayrıca rekombinant plazmidleri içeren hücrelerin yaban tip hücrelere kıyasla büyümelerinin tetiklendiği görülmüştür.



Şekil 7.20: Yaban tip ve rekombinant *S. coelicolor* A3(2) hücrelerinin zamana bağlı büyüme eğrisi.

%0.1 gliserollü ortamda büyütülen rekombinant ve yaban tip hücrelerin spesifik aktinorhodin aktivitesi kıyaslandığında; özellikle 72. saatten itibaren aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (p -değeri ≤ 0.05). Rekombinant hücreler, yaban tip suşlara göre ~15-25 kat daha fazla aktinorhodin üretmiştir. Özellikle 120. saate bakıldığında gliserol ile uyarılmış rekombinant suşun

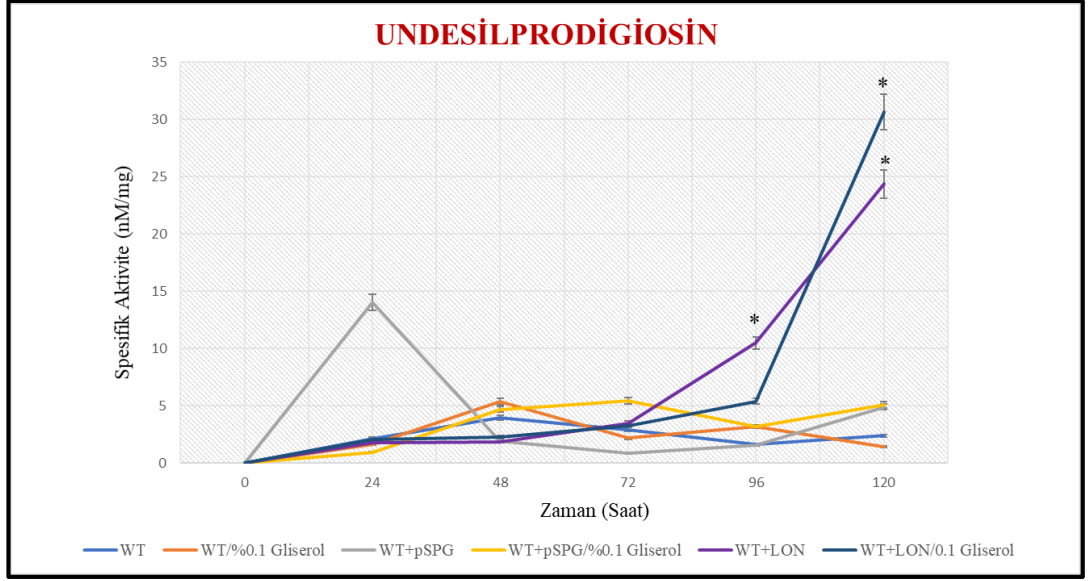
gliserol ile uyarılmış yaban tip hücreye göre aktinorhodin antibiyotiğini 25 kat daha fazla ürettiği gözlenmiştir (Şekil 7.21).



Şekil 7.21: Yaban tip ve rekombinant *S. coelicolor* A3(2) hücrelerinin aktinorhodin antibiyotiğini üretme profilleri.

Undesilprodigiosin antibiyotiğinin spesifik aktivitesinin incelenmesinde yine bağımlı örneklem testi uygulanmıştır. Test sonucunda gliserollü ve gliserolsüz ortamda büyütülen yaban tip hücrelerin undesilprodigiosin aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Özellikle 48. saat itibarıyla *lon*'u çok kopyalı olarak ifade eden rekombinant suşun yaban tip ve pSPG plazmidini taşıyan suşlara göre çok fazla antibiyotik ürettiği ve bu oranın bazı saatlerde 21 kata kadar yükseldiği gözlemlenmiştir. 96. saate kadar antibiyotik üretim profilleri benzerlik gösteren suşlarda, bu saatten sonra *lon*'u çokça ifade eden suşta antibiyotik üretiminde ani bir artış görülmüştür (Şekil 7.22).

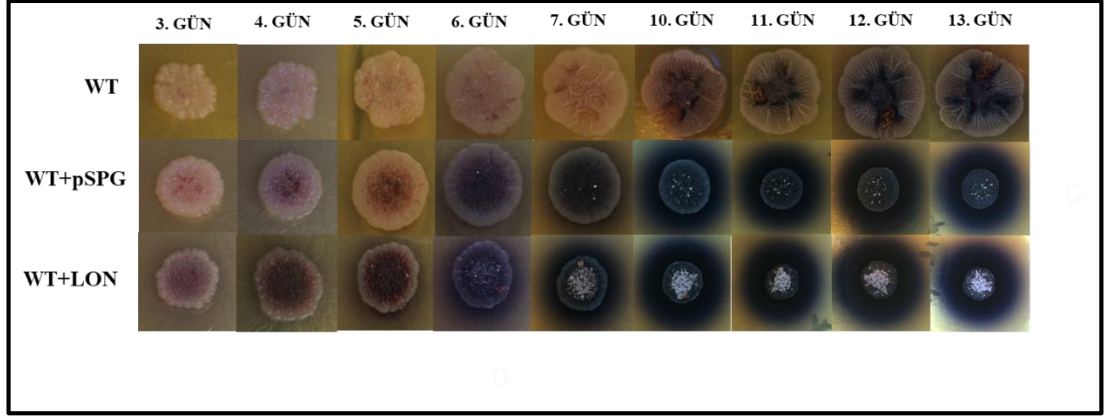
Sonuç olarak, *lon*'nun yüksek düzeyde ifade edildiği rekombinant hücreler her iki antibiyotiği de aynı koşuldaki yaban tip hücrelerden daha fazla üretmiştir.



Şekil 7.22: Yaban tip ve rekombinant *S. coelicolor* A3(2) hücrelerinin undesilprodigiosin antibiyotik üretim profilleri.

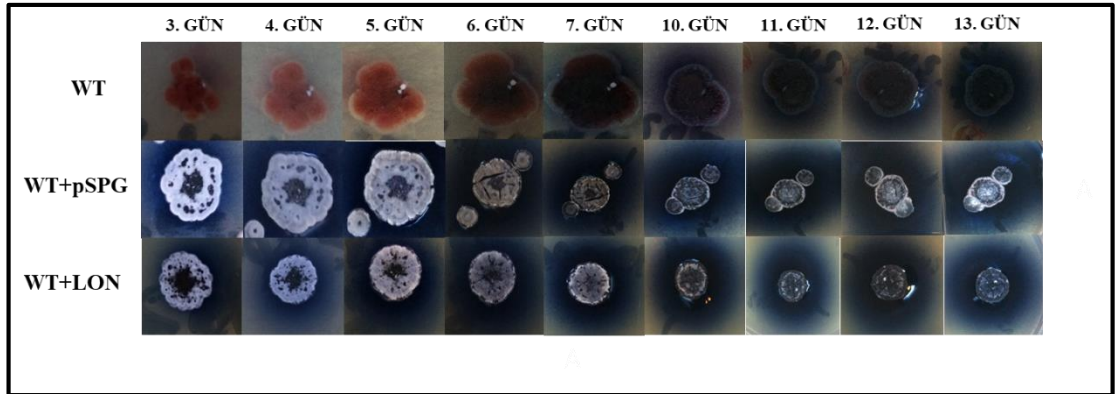
7.9. Farklı Besiyerlerinde Lon Yüksek İfadesinin Antibiyotik Üretimine Etkisi

lon genini çok kopyalı olarak bulunduran *S. coelicolor* A3(2) rekombinant hücrelerinin farklı besiyerlerindeki büyüme, sporlanma ve antibiyotik üretim profilini gözlemlemek üzere petri kaplarında hazırlanmış olan R2YE, TSA, NBM besiyerlerine ekim yapılmıştır (Şekil 7.23, Şekil 7.24 ve Şekil 7.25). TSA besiyerine ekilen rekombinant suşun yaban tip hücreye göre daha erken sporlanmaya başladığı ve antibiyotik üretimi açısından ciddi bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan pSPG plazmidini taşıyan rekombinant suşun da yaban tip hücreye göre daha fazla antibiyotik ürettiği gözlemlenmiş ancak *lon*'u çok kopyalı taşıyan rekombinant suşa göre daha az bir üretim profili sergilemiştir (Şekil 7.25).



Şekil 7.23: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının TSA besiyerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.

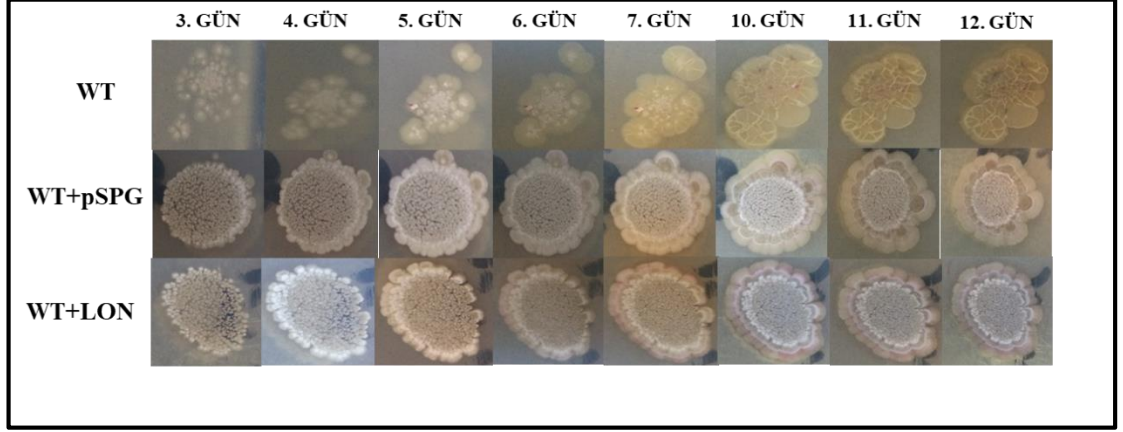
R2YE zengin besiyerinde büyütülen rekombinant suşun yaban tip hücreye göre daha erken antibiyotik ürettiği ve sporlanmaya başladığı gözlemlenmiştir. TSA besiyeri ile karşılaştırıldığında R2YE besiyerinde üç farklı hücre hattının daha çok antibiyotik ürettiği gözlemlenmiştir. Sıvı R2YE besiyerinde WT+LON hücre hattının her ne kadar çok daha fazla antibiyotik ürettiği gözlemlense de katı R2YE besiyerinde büyütülen WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının antibiyotik üretimi açısından benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 7.26).



Şekil 7.24: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının R2YE besiyerlerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.

NBM minimal besiyerine ekilen hücrelerin TSA besiyerindeki hücrelere göre daha az büyüdüğü ve antibiyotik üretmediği gözlemlenmiştir. NBM besiyerinde *lon*'u

çok kopyalı olarak ifade eden suşun yaban tip hücreye göre daha iyi büyüdüğü ve sporlanma evresine daha erken geçtiği gözlemlenmiştir (Şekil 7.27).



Şekil 7.25: WT, WT+pSPG ve WT+LON hücre hatlarının NBM besiyerlerinde sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri.

8. TARTIŞMA VE SONUÇ

ATP bağımlı Lon proteaz, bakterilerin hücrel farklılaşması da dahil olmak üzere farklı fizyolojik süreçlerde önemli roller oynayan enzim olup stres yanıtı regulonu olan HspR/HAIR'ın bir parçasıdır. Bakterilerden insana kadar ATP bağımlı Lon proteaz, protein kalite kontrolünde önemli enzimlerden biridir. Bu çalışma, *S. coelicolor* A3(2) *lon* geninin *E. coli*'de heterolog ekspresyonu ve *S. coelicolor* A3(2)'de homolog ekspresyonu için yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

Öncelikle *S. coelicolor* A3(2) *lon* geni, *E. coli*'de bir ekspresyon vektörü olan pET6xHN-C'de *Hind*III restriksiyon enzim kesim bölgesine klonlanmış fakat farklı konak hücrelerle yapılan tüm denemelerde *lon* geninin protein seviyesinde ifade edildiğine dair herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Heterolog ekspresyon çalışmalarında yaşanan en önemli problemlerden birinin klonlanan genin kodon dizileri ile klonlamanın yapıldığı konak hücrenin kodonları tanıyan t-RNA'larının uyuşmamasıdır [96]. Bu bilgi dahilinde, GenScript şirketi aracılığı ile *lon* geninin protein seviyesinde ekspresyonunu kolaylaştırmak üzere kodon optimizasyonu yaptırılmıştır. pET28a(+) plazmid vektörüne klonlanmış olan optimize *lon* geni (*lon*^{opt}) çeşitli *E. coli* ekspresyon hücrelerinde ve farklı IPTG konsantrasyonlarında uyarılmasına rağmen protein seviyesinde yine ekspresyona rastlanılmamıştır. *lon*^{opt} geni T7 promotörü içeren pET6xHN-N plazmid vektörüne klonlanmış ve bu rekombinant plazmid kullanılarak farklı *E. coli* suşlarında ekspresyon deneyleri yapılmıştır. Yapılan tüm deneylerde protein seviyesinde rekombinant suşla yaban suş arasında bir farklılık görülmemiştir.

Baneyx ve ark.'nın belirttiği gibi *E. coli*'de heterolog olarak ifade edilen büyük ve fazlaca domaine sahip olan proteinlerin tranlasyon aşamasında tam olarak ifade edilemediği bunun için bazı modölatör ve şaperonların gerekli olduğu söylenmiştir [97]. Bununla beraber katlanma problemlerinin görüldüğü ve yanlış katlanan rekombinant proteinlerin konak hücrede inklüzyon parçacıkları oluşturduğu bilinmektedir [98]. *E. coli*'deki başarısız ekspresyon çalışmalarının sebebi olarak yanlış katlanan proteinlerin hücre içerisinde inklüzyonlar halinde birikmesinden kaynaklandığı düşünülerek tez çalışmasına, *lon* geninin *S. coelicolor* A3(2)'de homolog ekspresyon çalışmaları ile devam edilmiştir. Bunun için öncelikle *lon* geni,

üzerinde *S. clavuligerus*'a ait gliserol ile uyarılabilen P_{glpF} promotörü bulunan *E. coli*-*Streptomyces* mekik vektörü pSPG'ye klonlanmış ve *S. coelicolor* A3(2)'ye konjugasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Rekombinant suşta *lon*'un yüksek düzeyde ifade edildiği RTqPCR ile gösterilmiş ve Lon yüksek üretiminin bakteriyel büyümeyi baskılamadığı gözlenmiştir. Hatta besiyerine antibiyotik eklenmesine rağmen rekombinant suşun yaban tip hücrelerden daha iyi büyüdüğü gözlenmiştir. Ayrıca, besiyerine eklenen gliserolün yaban tip hücrelerde de belli saatlerde büyümeyi teşvik ettiği gözlenmiştir. Ilic' ve arkadaşları da gliserolün *Streptomyces hygroscopicus* CH-7 suşunda büyümeyi tetiklediğini göstermişlerdir [99]. Bizim bulgularımızın tersine *E. coli* gibi canlılarda *lon*'un yüksek seviyede ifadesinin büyümeyi negatif olarak etkilediği bulunmuştur [17], [33]. *Streptomyces*'lerin farklı gelişim evrelerine sahip çok kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olmaları sebebiyle, metabolizmalarını *E. coli*'den farklı olarak düzenledikleri için böyle bir farklılığın bulunması normal karşılanmıştır.

Rekombinant suşta yaban suşa göre aktinorhodin antibiyotiğinde 25 kat ve undesilprodigiosin antibiyotiğinde 21 kat daha fazla antibiyotik üretimi gözlemlenmiştir. Genomunda ekstra 1 kopya *lon* geni bulunan *S. coelicolor* A3(2)'nin (Sco-pRA*lon*) da aynı antibiyotikleri sırasıyla 34 ve 9 kat daha fazla ürettiği bilinmektedir [103]. Bu tez çalışmasında oluşturulan rekombinant suşun aktinorhodin üretiminin, Demir ve arkadaşlarının (2019) bulgularından daha az olduğu bulunmuştur. Bu durum, *lon*'un plazmit üzerinde yüksek ifade edilmesi yüzünden, hücre içinde metabolik bir düzensizliğin oluşmuş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda rekombinant plazmidin hücre içinde stabil kalabilmesi için eklenen antibiyotiğin de bu farka sebep olmuş olabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur.

Rekombinant suşta Lon'un yüksek konsantrasyonda bulunmasının büyümeyi olumsuz etkilememesi, hatta teşvik edici olması, bununla beraber yüksek düzeyde antibiyotik üretmesi, büyüme ve ikincil metabolit üretimi arasındaki ilişki düşünüldüğünde ilginç bir bulgudur. Sınırlandırılmış cevap mekanizmasında Lon proteazın amino asit açlığı stresi sırasında amino asit kaynağı oluşturmak üzere protein degradasyonu yapmak gibi çok önemli bir görevi vardır. *S. coelicolor* A3(2)'de çok kopyalı olarak *lon*'un bulunması, doğrudan protein degradasyonu yoluyla antibiyotik biyosentezi için daha fazla öncülün üretilmesini sağlayarak üretimi arttırmış olabilir. Ayrıca, hücre stres altındaysa, stres ile sentezlenen alarmonların (ppGpp ve

pppGpp'in), aktinorhodin de dahil olmak üzere bazı sekonder metabolitlerin öncüsü olan birkaç amino asit biyosentetik geninin transkripsiyonunu doğrudan uyardığı da gösterilmiştir [95]. Ama hücre çok stres altındaysa büyümesinin de etkilenmesi gerektiği halde bu çalışmada, rekombinant hücrenin büyümesinin olumlu etkilendiği bulunmuştur. Rekombinant hücredeki stres ile ilgili genlerin transkripsiyonel analizi ile bu durum aydınlatılabilir.

Yüksek miktarda sekonder metabolit üreten stabil *Streptomyces* suşlarının geliştirilmesi, biyoteknoloji alanında oldukça dikkat çekici hale gelmiştir. Bilgimiz dahilinde *S. coelicolor* A3(2)'nin ürettiği renkli antibiyotik olan aktinorhodin medikal alanda kullanılmamasına rağmen son zamanlarda toksik etkiye sahip boyalar yerine endüstride kullanılmak üzere test edildiği bilinmektedir [102]. Bu çerçevede, tez çalışması kapsamında elde edilen yüksek antibiyotik üreticisi suşun endüstriyel alanda kullanılma potansiyeli olabilir.

Gelecekteki çalışmalarda, bu rekombinant suşun daha detaylı karakterize edilmesiyle, Lon'un, *Streptomyces*'lerin morfolojisini ve hücre bölünmesini nasıl etkilediği, daha farklı metabolik yolları etkileyip etkilemediği ortaya çıkarılabilir. Bu çalışmada her ne kadar *lon* geninin protein seviyesinde ekspresyonu gösterilmişse de üretilen proteinin işlevsel olup olmadığı incelenmemiştir. Sonraki çalışmalarda, saflaştırılan proteinin aktif Lon proteaz olduğu gösterilmelidir. Ayrıca kapsamlı bir araştırmayla, yüksek seviyede *lon* ifadesinin hücrenin genel proteomuna etkisi incelenebilir.

Özetle bu tez çalışmasında, sınırlandırılmış cevapta önemli rol oynayan ve protein yıkımından sorumlu olan Lon proteazı kodlayan gen, *S. coelicolor* A3(2)'de yüksek düzeyde ifade edilmiş ve rekombinant suşun antibiyotik üretiminde ciddi bir artış sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel, G. P., (2016), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- [2] Chater K. F., (2006), "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 761-768.
- [3] de Lima E., da Silva I. R., Martins M. K., de Azevedo J. L., de Araújo J. M., (2012), "Antibiotics produced by Streptomyces", *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471.
- [4] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G. P., (2016), "An Introduction to Actinobacteria", 6(9), 111-133.
- [5] Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Buss H., J., Trujillo M., E., Kämpfer P., Whiteman W., B., (2012), "Road map of the phylum Actinobacteria", p 1–28. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY.
- [6] Mayfield I., Williams T., Ruddick M., Hatfield L., (1972), "Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil". *Soil Biol Biochem* 4,79–91.
- [7] Goodfellow M., Williams T., (1983), "Ecology of actinomycetes", *Annu. Rev. Microbiol.*, 37,189 –216.
- [8] Khattab A. I., Babiker E. H., Saeed H., (2016), "Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites", *International Current Pharmaceutical Journal*, 5(2), 27-32.
- [9] O⁻mura S., Ikeda H., Ishikawa J., (2001), "Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites", *Proc Natl Acad Sci.*, 98,12215–20.
- [10] Khan T., (2011), "Streptomyces associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products" *Environ Microbiol Black Sci Pub.*, 13,391–403.
- [11] Karandikar A., Sharples G. P., Hobbs G., (1997), "Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) under nitrate-limited conditions", *Microbiology*, 143(6), 3581-3590.
- [12] Lo Grasso L., Martino D. C., Alduina R., (2016), "Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes", *Basics Biotechnol. Appl. InTech.*, 24(1), 177-195.

- [13] Yagüe P., López-García M. T., Rioseras B., Sánchez J., Manteca Á., (2013), "Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: State-of-the-art and future perspectives", *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 79-88.
- [14] Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sanchez J., (2008), "Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3877-3886.
- [15] Rioseras B., López-García M. T., Yagüe P., Sánchez J., Manteca Á., (2014), "Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production", *Bioresource Technology*, 151, 91-198.
- [16] Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sánchez J., (2008), "Mycelium differentiation and antibiotic production in liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*", *Appl Environ Microbiol.*, 74, 3877– 3886.
- [17] Manteca A., Claessen D., Lopez C., Sánchez J., (2007), "Aerial hyphae in solid cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event", *FEMS Microbiol lett.*, 274, 118–125.
- [18] Manteca A., Sanchez J., (2010), "Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production", *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 560-566.
- [19] Bibb M. J., (2005), "Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes", *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 208-215.
- [20] Liu G., Chater K. F., Chandra G., Niu G., (2013), "Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in Streptomyces", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(1), 112- 143.
- [21] Rudd B., A., (1978), "Genetics of pigmented secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*" University of East Anglia, Norwich, United Kingdom.
- [22] Rudd BA, Hopwood DA., (1979), "Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2)", *J. Gen. Microbiol.*, 114, 35– 43.
- [23] Rudd A., Hopwood A., (1980), "A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster", *J. Gen. Microbiol.* 119, 333–340.
- [24] Nett M., Ikeda H., Moore S., (2009), "Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes", *Nat. Prod. Rep.*, 26, 1362– 1384.
- [25] Owen A., Pascoe B., Kallifidas D., Paget S., (2007), "Zinc-responsive regulation of alternative ribosomal protein genes in *Streptomyces coelicolor* involves zur and sigmaR", *J. Bacteriol.*, 189, 4078–4086.
- [26] Hopwood A., (2007), "Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers", Oxford University Press, New York, NY.

- [27] Iqbal M., Mast Y., Amin R., Hodgson A., Wohlleben W., Burroughs J., (2012), “Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: characterizing key regulators of nutrient depletion responses”, *Nucleic acids Res.*, 40(12), 5227–5239.
- [28] Wietzorrek A., Bibb M., (1997), “A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpRlike DNA-binding fold.”, *Mol. Microbiol.*, 25, 1181–1184.
- [29] Cerdeno A.M., Bibb J., Challis L., (2001), “Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes”, *Chem. Biol.*, 8, 817– 829.
- [30] White J., Bibb M., (1997), “bldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade”, *J. Bacteriol.*, 179, 627– 633.
- [31] Santos-Beneit F., Barriuso M., Fernandez-Martinez T., Martinez- Castro M., Sola-Landa A., Rodriguez-Garcia A., Martin F., (2011), “The RNAPolymerase omega factor RpoZ is regulated by PhoP and has an important role in antibiotic biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 7586 –7594.
- [32] Sola-Landa A., Moura S., Martin F., (2003), “The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6133– 6138.
- [33] Hesketh A., Sun J., Bibb M., (2001), “Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis”, *Mol. Microbiol.*, 39, 136 –144.
- [34] Kang G., Jin W., Bibb M., Lee J., (1998), “Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 168, 221–226
- [35] Sauer R. T., (2004), “Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines”, *Cell*, 119, 9–18.
- [36] Schmidt M., (2005), “Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine”, *Biol. Chem.*, 386, 725–737.
- [37] Ito K., Akiyama Y., (2005), “Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 211–231.
- [38] Bukau B., (2006), “Molecular chaperones and protein quality control”, *Cell*, 125, 443–451.
- [39] Burton M., Baker A., (2005), “Remodeling protein complexes: insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase”, *Protein Sci.*, 14, 1945–1954.

- [40] Withey J., H, Friedman D., I., (2003), "A salvage pathway for protein structures: tmRNA and trans-translation", *Annu. Rev. Microbiol.*, 57,101–123.
- [41] Siddiqui M., (2004), "Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates", *Genes Dev.*, 18, 369–374.
- [42] Hinnerwisch J., (2005), "Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation", *Cell*, 121, 1029–1041.
- [43] Gonzalez M., (2000), "Subunit-specific degradation of the UmuD/D' heterodimer by the ClpXP protease: the role of trans recognition in UmuD stability", *EMBO J.*, 19, 5251–5258.
- [44] Neher S. B., (2006), "Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon", *Mol. Cell*, 22,193–204.
- [45] Baumeister W., Walz J., Zuhl F., Seemu" ller E., (1998), "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease", *Cell*, 92,367-380.
- [46] Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J., Deshaies J., (2000) "Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes", *Mol. Biol. Cell*, 11,3425-3439.
- [47] Leggett S., Hanna J., Borodovsky A., Crosas B., Schmidt M., Baker T., Walz T., Ploegh H., Finley D., (2002), "Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function", *Mol. Cell*, 10,495-507.
- [48] Larsen N, Finley D., (1997), "Protein translocation channels in the proteasome and other proteases", *Cell*, 91,431-434.
- [49] Lee C., Schwartz M. P., Prakash S., Iwakura M., Matouschek A., (2001), "ATPdependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal", *Mol. Cell*, 7,627-637.
- [50] Kisselev F., Akopian N., Woo M., Goldberg L., (1999), "The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation", *J. Biol. Chem.*, 274,3363-3371.
- [51] Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren A., Tatematsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., (1997), "Proteolysis of the phage lambda CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*", *Mol. Microbiol.*, 24,1303-1310.
- [52] Collins A, Tansey P., (2006), "The proteasome: a utility tool for transcription?", *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16,197-202.
- [53] Swamy K.H., Goldberg A.L., (1981), "*E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent", *Nature*, 292,652–654.

- [54] Botos, I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J.E., Khalatova A.G., Rasuloval F., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A., (2004), "The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site", *J. Biol. Chem.*, 279,8140–8148.
- [55] Gonzalez M., Rasuloval F., Maurizi M.R., Woodgate R., (2000), "Subunit-specific degradation of the UmuD/D heterodimer by the ClpXP protease: The role of trans recognition in UmuD_ stability", *Embo J.*, 19,5251–5258.
- [56] Griffith K.L., Shah I.M., Wolf R.E., (2004), "Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons", *Mol.Microbiol.*, 51,1801–1816.
- [57] Ito K., Udaka S., Yamagata H., (1992), "Cloning, characterization, and inactivation of the *Bacillus brevis lon* gene", *J. Bacteriol.*, 174, 2281–2287.
- [58] Sobczyk A., Bellier A., Viala J., Mazodier P., (2002), "The *lon* gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress response regulon in actinomycetes", *Microbiology*, 148,1931– 1937.
- [59] Bellier A., Mazodier P., (2004), "ClgR, a novel regulator of *clp* and *lon* expression in *Streptomyces*", *J. Bacteriol.*, 186, 3238–3248.
- [60] Engels S., Ludwig C., Schweitzer J.E., Mack C., Bott M., Schaffer S., (2005), "The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*", *Mol. Microbiol.*, 57,576–591.
- [61] Simon L.D., Tomczak K., St John A.C., (1978), "Bacteriophages inhibit degradation of abnormal proteins in *E. coli*", *Nature*, 275,424–428.
- [62] Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G., Van Melderen L., (2006), "Biological roles of the Lon ATP-dependent protease", *Res. Microbiol.*, 157,701–713.
- [63] Takaya A., Tomoyasu T., Tokumitsu A., Morioka M., Yamamoto T., (2002), "The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1", *J. Bacteriol.*, 184,224–232.
- [64] Hori O., Icinoda F., Tamatani T., Yamaguchi A., Sato N., Ozawa K., Kitao Y., Miyazaki M., Harding H., P., ROn D., Tohyama M., Stern D., M., Ogawa S., (2002), "Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease", *J. Cell Biol.*, 157,1151–1160.
- [65] Maurizi M.R., Trisler P., Gottesman S., (1985), "Insertional mutagenesis of the *lon* gene in *Escherichia coli*: Lon is dispensable", *J. Bacteriol.*, 164,1124–1135.

- [66] Schoemaker J.M., Gayda R.C., Markovitz A., (1984), "Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the *sulA* protein, a key to lon-associated filamentation and death", J. Bacteriol., 158,551–561.
- [67] Torres-Cabassa A.S., Gottesman S., (1987), "Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis", J. Bacteriol., 169,981–989.
- [68] Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A., (2001), "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*", Science, 293,705–708.
- [69] Tojo N., Inouye S., Komano T., (1993), "Cloning and nucleotide sequence of the *Myxococcus xanthus lon* gene: Indispensability of lon for vegetative growth", J. Bacteriol., 175,2271–2277.
- [70] Van Dyck L., Langer T., (1999), "ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", Cell. Mol. Life Sci., 56, 825–842.
- [71] Bota D.A., Ngo J.K., Davies K.J., (2005) "Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death", Free Radic. Biol. Med., 38,665–677.
- [72] Calmann M.A., Marinus M.G., (2003), "Regulated expression of the *Escherichia coli dam* gene", J. Bacteriol., 185,5012–5014.
- [73] Mascarenhas J., Volkov A.V., Rinn C., Schiener J., Guckenberger R., Graumann P.L., (2005), "Dynamic assembly, localization and proteolysis of the *Bacillus subtilis* SMC complex", BMC Cell Biol., 6-28.
- [74] Miller C.G., (2005), "Protein degradation and proteolytic modification, *Escherichia coli* and Salmonella", Cellular and Molecular Biology, 938–954.
- [75] Nishii W., Suzuki, T., Nakada M., Kim Y.T., Muramatsu T., Takahashi K., (2005) "Cleavage mechanism of ATP-dependent Lon protease toward ribosomal S2 protein", FEBS Lett., 579,6846–6850.
- [76] Kuroda, A., (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 142-64.
- [77] Hanahan D., (1983), "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids", Journal of Molecular Biology, 166(4), 557-580.
- [78] Carter P., Bedouelle H., Winter G., (1985), "Improved oligonucleotide sitedirected mutagenesis using M13 vectors", Nucleic Acids Res., 13,4431–4443.
- [79] MacNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H., MacNeil T., (1992), "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector", Gene, 111(1), 61-68.

- [80] Gust B., Challis G. L., Fowler K., Kieser T., Chater K. F., (2003), "PCR targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100,1541–6.
- [81] Hopwood D., (1999), "Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico", *Microbiology*, 145(1), 2183-2202.
- [82] Gust B., Kieser T., Chater K., (2002), "PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", *John Innes Centre*, 3(2), 1-39.
- [83] Kurt Kızıldoğan A., Vanlı J. G., Mutlu A., Sertdemir İ., Özcengiz G., (2017), "Genetic engineering of an industrial strain of *Streptomyces clavuligerus* for further enhancement of clavulanic acid production", *Turkish Journal of Biology*, 41(5530), 342-353.
- [84] Wang L., Tahlan K., Kaziuk T. L., Alexander D. C., Jensen S. E., (2004), "Transcriptional and translational analysis of the *ccaR* gene from *Streptomyces clavuligerus*", *Microbiology*, 150(12), 4137-4145.
- [85] Holmes D. S., Quigley M., (1981), "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids", *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193-197.
- [86] Paget M. S. B., Chamberlin L., Atrih A., Foster S. J., Buttner M., (1999), "Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)", *J Bacteriol.*, 181(1), 204-211.
- [87] Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A., (2000), "Practical *Streptomyces* genetics", *The John Innes Foundation*, 185(7), 2338-2345.
- [88] Kuroda A., (2006), "A Polyphosphate-Lon Protease Complex in the Adaptation of *Escherichia coli* to Amino Acid Starvation", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (2), 325-331.
- [89] Sussman A. J., Gilvard C., (1969), "Protein turnover in amino acid-starved strains of *Escherichia coli* K-12 differing in their ribonucleic acid control." *J. Biol. Chem.*, 244, 6304-6306.
- [90] Cashel M., Kalbacher B., (1970), "The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V. Characterization of nucleotide associated with stringent response." *J. Biol. Chem.*, 245, 2309-2318.
- [91] Kuroda A., Murphy H., Cashel M., Kornberg A., (1997), "Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.*, 272, 21240-21243.
- [92] Harold F. M., (1963), "Accumulation of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. I. Relationship to growth and nucleic acid synthesis." *J. Bacteriol.*, 86, 216-221.

- [93] Gust B., Kieser T., Chater K., (2002), "PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", John Innes Centre, 3(2), 1-39.
- [94] Stirrett K., Denoya C., Westpheling J., (2009), "Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the Type II polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent", Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36 (1),129-137.
- [95] Hesketh A., Chen WJ., Ryding J., Chang S., Bibb M., (2007), "The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", Genome biology, 8 (8), 16.
- [96] Nieuwkoop T., Claassens N. J., Oost J., (2019), "Improved protein production and codon optimization analyses in *Escherichia coli* by bicistronic design", Microb. Biotechnol., 12(1), 173-179.
- [97] Baneyx F., Mujacic M., (2004), "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*", Nature biotechnology, 22, 1399-1408.
- [98] Carrió M.M., Corchero J.L., Villaverde A., (1998), "Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria", FEMS Microbiol. Lett., 169, 9–15.
- [99] Ilić S. B., Konstantinović S. S., Gojgic' G., Dragis'a C., Savic' S., Veljkovic' V. B., (2013), "The impact of glycerol and some carbohydrates on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7", Med Chem Res., 22,934-937.
- [100] Whistler C. A., Stockwell V. O., Loper J. E., (2000), "Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5", Applied and Environmental Microbiology, 66(7), 2718-2725.
- [101] Camci I.Y., Doruk T., Avican U., Gedik S. T., (2012), "Effect of polyphosphate kinase deficiency on antibiotic production *Streptomyces coelicolor*", Turk. J. Biol., 10.3906, 1110-19.
- [102] Web 1, (2017), <https://www.asm.org/Articles/2017/November/bacterial-dyes-in-fashion>, (Erişim tarihi: 04/11/2017).
- [103] Demir Z., Bayraktar A., Tunca S., (2019), "One extra copy of *lon* gene cause a dramatic increase in actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2)", Current Microbiology, DOI: 10.1007/s00284-019-01719-3.

ÖZGEÇMİŞ

Halil YILMAZ, 15 Aralık 1992’de Adana’da doğdu. 2011 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2016 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Halil YILMAZ 2018 yılından itibaren Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.