

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOMYCES COELICOLOR M145 VE
STREPTOMYCES COELICOLOR A3(2)'NİN Δ PPK
MUTANTLARININ ELDESİ VE KARAKTERİZASYONLARI**

**ĞARİP DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2018**

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***STREPTOMYCES COELICOLOR* M145 VE
STREPTOMYCES COELICOLOR
A3(2)'NİN Δ PPK MUTANTLARININ ELDESİ
VE KARAKTERİZASYONLARI**

**ĞARİP DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK**

**GEBZE
2018**

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

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION
OF *STREPTOMYCES COELICOLOR* M145 AND
***STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2) Δ PPK**
MUTANT STRAINS

ĞARİP DEMİR
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE

2018



GTÜ *Fen Bilimleri* Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun *27/06/2018* tarih ve *2018/33* sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından *19/07/2018* tarihinde tez savunma sınavı yapılan *Ganip DEMİR*'in tez çalışması *Mol. Biy. ve Genetik* Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

ÜYE

: DOÇ. DR. NURİ ÖZTÜRK

ÜYE

: DOÇ. DR. MERAL YÜCE

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Enfeksiyon hastalıklarının ana kaynağı olan bakterilerin islahı konusunda karşılaşılan en büyük problem bakterilerin adaptasyon gösterip direnç kazandığı antibiyotiklerdir. Antibiyotik dirençliliğinin her geçen gün arttığı gerçeğine rağmen, antibiyotiklerin medikal önemi ve ticari değeri tartışılmaz. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık dörtte üçü *Streptomyces*'ler tarafından üretilmektedir. Antibiyotik üretimi, genel olarak farklılaşma, besin kıtlığı ve/veya farklı bir organizmanın varlığı gibi koşullardan etkilenir. İnorganik fosfatların birbirine eklenmesi ile oluşan polifosfat (poliP) polimerinin de antibiyotik üretimine etkisinin olduğu sınırlı sayıda çalışma ile gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında, poliP sentezinden sorumlu ana gen olan *ppk* (polifosfat kinaz) *Streptomyces coelicolor*'un ikincil metabolit üretme kapasiteleri birbirinden farklı olan M145 ve A3(2) suşlarından silinmiş ve mutasyon PZR ve southern blot ile doğrulanmıştır. A3(2) Δppk mutantının yaban tipten yaklaşık 8.5 kat, M145 Δppk mutantının ise yaban tipten yaklaşık 2.6 kat daha fazla aktinorhodin ürettiği bulunmuştur. Suşların PHB biriktirme kapasitelerinde anlamlı bir fark bulunamamış ancak mutant hücrelerdeki TAG miktarının yaban suşlardan daha az olduğu gözlenmiştir. Mutant A3(2) suşunun R2YE'de sporlanması dikkat çekmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen mutant suşlar antibiyotik üretimi ve polifosfat metabolizması arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik çalışmalarda kullanılacak olması bakımından değer taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces coelicolor*, antibiyotik, *ppk*, polifosfat, A3(2) M145.

SUMMARY

The biggest problem in the treatment of bacteria that cause infection diseases is the antibiotic resistance that bacteria gain through adaptation. Despite the fact that antibiotic resistance increases day by day, the medical and commercial value of antibiotics cannot be discussed. About three-quarters of antibiotics that we use today are produced by Streptomycetes. Antibiotic production is generally affected by conditions such as differentiation, nutrient shortage and/or the presence of a different organism. A limited number of studies have shown that polyphosphate (polyP) polymer formed by the incorporation of inorganic phosphates also has an effect on antibiotic production.

In this study, the main gene responsible for polyP synthesis, *ppk* (polyphosphate kinase), was deleted from *Streptomyces coelicolor* M145 and A3(2) strains, which are different from each other by their secondary metabolite producing capacities. Mutation was confirmed by PCR and southern blot. It was found that A3(2) Δppk mutant produced about 8.5 times more actinorhodin than the wild type, and M145 Δppk mutant produced about 2.6 times more actinorhodin than the wild type. There was no significant difference in PHB accumulation between strains, however the amount of TAG in mutant cells was less than the wild type strains. It has been noted that the mutant A3(2) strain is sporulated in R2YE. The mutant strains obtained in this thesis are valuable in the sense that they will be used in future studies to elucidate the relationship between antibiotic production and polyphosphate metabolism.

Keywords: *S. coelicolor*, antibiotic, *ppk*, polyphosphate, A3(2), M145.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübesi, anlayışı ve sabrıyla beni dinleyip bana katlanan ve yaşanan bütün olumsuzluklara rağmen her zaman çalışmam konusunda beni motive edip bana güvenen, güler yüzüyle desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

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

Benden manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Berker Atagün, Şahika Hancı, Rıdvan Çakmakçı, Onur Özden, Ersin Ceylan, Yiğit Koray Babal, Erdem Ergün, Mecbure Nur Akça, Furkan Koçoğulları, Mesut Bunaldı'ya ve bu hayattan erken emekli olmuş F. Ali Türk, Vedat Ellidokuzoğlu, Ahmet Enes Gürbüz, Alparslan Karagüney, Emre Özgün, Nurullah Gündoğdu'ya minnetlerimi sunarım.

Son olarak, beni büyütüp yetiştiren, sadece bu çalışma boyunca değil bütün yaşamım boyunca yanımda olup koşulsuz beni destekleyen annem, babam ve abilerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. POLİFOSFAT POLİMERİ	3
2.1. Prokaryotlarda Polifosfat Sentezi	5
2.2. Ökaryotlarda Polifosfat Sentezi	6
2.3. PoliP’yi Degrede Edebilen Enzimler	7
3. ACTINOMYCETES	10
3.1. Streptomyces’lerin Fizyolojisi ve Antibiyotik Üretimleri	10
4. MATERYAL VE METOD	15
4.1. Materyaller	15
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	15
4.1.2. Kullanılan Enzimler	15
4.1.3. Kullanılan Kitler	15
4.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	16
4.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları	16
4.1.6. Kullanılan Kozmit ve Plazmidler	17
4.1.7. Kullanılan Çözeltiler	17
4.1.8. Kullanılan Besiyerleri	18
4.1.9. Kullanılan Antibiyotikler	20
4.1.10. Kullanılan Cihazlar	20
4.2. Metodlar	21
4.2.1. <i>E. coli</i> ’den Plazmit İzolasyonu	21
4.2.2. <i>E. coli</i> ’den Kozmit İzolasyonu	21

4.2.3. Elektroporasyon Yöntemi	22
4.2.4. <i>S. coelicolor</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	22
4.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri	23
4.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	23
4.2.7. DNA'ların Jelden Geri Kazanılması	23
4.2.8. <i>E. coli</i> Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması	24
4.2.9. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması	24
4.2.10. <i>S. coelicolor</i> Std84 Kozmidinin <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması	25
4.2.11. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini İçeren <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması	26
4.2.12. Std84 Δppk Mutant Kozmidinin Metilasyon Yoksunu <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması	26
4.2.13. Mutant ve Yaban Tip <i>S. coelicolor</i> Hücrelerinde Antibiyotik Ölçümleri	26
4.2.14. Southern Blot	28
4.2.15. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon	28
4.2.16. <i>ppk</i> Prop DNA'sının Hazırlanması	29
4.2.17. Apramisin Prop DNA'sının Hazırlanması	29
4.2.18. Prop'ların İşaretlenmesi, Sinyal Oluşumu ve Tespit Edilmesi	29
4.2.19. Mutant Kozmidin <i>S. coelicolor</i> 'a Transferi	30
4.2.19.1. Konjugasyon	30
4.2.19.2. Protoplast Transformasyonu	31
4.2.20. Poli- β -hidroksibutirat'ın Spektrofotometrik Olarak Ölçümü	32
4.2.21. Neisser Boyama Yöntemi	32
4.2.22. Fourier Kızıl Ötesi Işın Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR)	33
5. BULGULAR	34
5.1. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması	34
5.2. <i>S. coelicolor</i> A3(2) ve <i>S. coelicolor</i> M145 Δppk Mutantlarının Hazırlanması	35
5.2.1. <i>S. coelicolor</i> Std84 Kozmidinin <i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790 Hücrelerine Aktarılması	35

5.2.2. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini Taşıyan <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılarak Mutant Kozmidin Oluşturulması	35
5.2.3. Δppk Mutant Kozmidinin Metilasyon Sistemi Olmayan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması	36
5.3. Δppk Mutant Kozmidinin <i>S. coelicolor</i> A3(2) ve <i>S. coelicolor</i> M145'e Aktarılması	37
5.4. Δppk Mutasyonunun Doğrulanması	38
5.4.1. Mutasyonun PZR ile Doğrulanması	37
5.4.2. Mutasyonun Southern Blot Yöntemi ile Doğrulanması	39
5.5. Yaban Tip Suşları ve Δppk Mutant Suşlarında PoliP'nin Neisser Boyama ile Gösterilmesi	42
5.6. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşların MS ve R2YE Besiyerlerinde Üremesi	43
5.7. Yaban Tip Mutant Suşların Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması	46
5.8. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşlarının PHB Üretimlerinin Karşılaştırılması	49
5.9. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşların Triaçilgliserol (TAG) Miktarlarının FTIR ile Ölçümleri	51
6. SONUÇ	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
~	: Yaklaşık
ACT	: Aktinorhodin
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
Amp	: Ampisilin
Apr	: Apramisin
ATP	: Adenozin trifosfat
<i>Bam</i> HI	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleaz
bç	: Baz Çifti
Ca	: Kalsiyum
CDA	: Kalsiyum Bağımlı Antibiyotik
Chl	: Kloramfenikol
CIA	: Kloroform: İzooamilalkol
CTAB	: Setil trimetilamonyum bromid
EDTA	: N', N', N', N'-Tetrametiletilediamin
FTIR	: Fourier kızıl ötesi ışın dönüşüm spektroskopisi
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HCl	: Hidroklorik asit
<i>Hind</i> III	: <i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
kJ	: Kilojoule
Kn	: Kanamisin
KOH	: Potasyum
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Broth
M	: M

Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mmy	: Metilenomisin
MS	: Mannitol Soya Unu Besiyeri
Na ₂ OAc	: Sodyum Asetat
NaCl	: Sodyum Klorür
NA	: Nalidiksik asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHB	: Poli-β-hidroksibütirat
Pi	: İnorganik fosfat
PoliP	: Polifosfat
ppGpp	: Guanozin tetrafosfat
<i>ppk</i>	: Polifosfat kinaz
PPN	: Endopolifosfataz
PPX	: Ekzopolifosfataz
RED	: Undesilprodigiosin
Rpm	: Dakika başına dönüş
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TE	: Tris-EDTA Tamponu
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
TSB	: Tripton soya besiyeri
TES	: N-[Tris-(hidroksimetil)-metil]-2-aminoetansülfonik asit
<i>XbaI</i>	: <i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
<i>XhoI</i>	: <i>Xanthomonas_vasicola</i> endonükleaz I
μ	: Mikron
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Üç ana poliP grubunun yapısal gösterimi.	2
3.1: Streptomyces'in klasik ve keşifsel büyüme döngüsü.	10
4.1: Çalışmada kullanılan belirteçler.	15
4.2: Primerlerin dizayn ve mutasyonun gerçekleşme biçimi.	25
4.3: Hibridizasyon deneylerinde kullanılacak problemlerin hazırlanması	29
5.1: Mutasyon kasetinin hazırlanması.	33
5.2: Kozmit izolasyonu.	34
5.3: Δppk kozmitlerinin izolasyonu ve doğrulanması.	35
5.4: Olası <i>S. coelicolor</i> Δppk suşlarının seçici besiyerlerinde taranması.	37
5.5: Olası <i>S. coelicolor</i> M145 olası Δppk suşlarının PZR ile taranması.	39
5.6: Southern blotta kullanılmak üzere restriksiyon enzimleri ile kesilerek hazırlanmış kromozomal DNA görüntüleri.	40
5.7: M145 suşu için yapılan hibridizasyon sonuçları.	40
5.8: A3(2) suşu için yapılan hibridizasyon sonuçları.	41
5.9: A3(2)'nin NBM besiyerinde 72. saatte elde edilen mikroskop görüntüleri.	42
5.10: M145'in NBM besiyerinde 72. saatte elde edilen mikroskop görüntüleri.	42
5.11: a) A3(2) yaban tip ve Δppk mutant suşlarının R2YE'deki 144 saatlik fermentasyonu sonucu b) <i>S. coelicolor</i> M145 yaban tip ve Δppk mutant suşlarının R2YE'deki 144 saatlik fermentasyonu sonucu.	43
5.12: R2YE katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon.	44
5.13: MS katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon.	44
5.14: R2YE katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon.	45
5.15: MS katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon.	45
5.16: <i>S. coelicolor</i> yaban tip ve <i>S. coelicolor</i> Δppk suşlarının üreme eğrisi.	47
5.17: Mutant ve yaban tipi hücrelerin Aktinorhodin spesifik aktivitesi.	47
5.18: Mutant ve yaban tipi hücrelerin undecilprodeginin spesifik aktivitesi.	48

5.19:	<i>S. coelicolor</i> M145 yaban tip ve A3(2) yaban tip ve Δppk mutant hücrelerinin PHB üretimlerinin 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü.	49
5.20:	<i>S. coelicolor</i> M145 yaban tip ve A3(2) yaban tip ve Δppk mutant hücrelerinin PHB üretimlerinin 300 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü.	49
5.21:	R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu.	51
5.22:	R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) Δppk suşunun FTIR analiz sonucu.	51
5.23:	NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu.	52
5.24:	NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) Δppk mutant suşunun FTIR analiz sonucu.	52
5.25:	R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu.	53
5.26:	R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 Δppk mutant suşunun FTIR analiz sonucu.	53
5.27:	NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu.	54
5.28:	NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 Δppk mutant suşunun FTIR analiz sonucu.	54

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: <i>E. coli</i> ve <i>S. coelicolor</i> suşları.	15
4.2: Kullanılan kozmit ve plazmitlerin bazı özellikleri.	16
4.3. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	17
4.4: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	18
4.5: Kullanılan antibiyotikler ve onların konsantrasyon değerleri.	19
5.1: PZR'da kullanılan primerler ve PZR sonucunda beklenen bant büyüklükleri.	38

1. GİRİŞ

Streptomyces türleri toprak bakterileri olup gram pozitif filamentöz yapılar ile vejetatif olarak üreyen aerobik sporlu bakterilerdir. Streptomyces'ler biyoteknolojik ve medikal değeri olan birçok ikincil metaboliti üretebilmekte ve kullanılan antibiyotiklerin dörtte üçünü üreten canlılar olmaları bakımından dikkat çekmektedirler. Özellikle antibakteriyel, antifungal ve antiparazitik ilaçların ve immünoşpresan ve antitümör ajanları gibi birçok biyoaktif materyalin üretiminde geniş çapta kullanımı Streptomyces'leri biyoteknolojinin vazgeçilmez canlıları kılmaktadır [33], [32]. Medikal ve biyoteknolojik değeri çok yüksek olan bu tür bakteriler birçok bilim insanı tarafından model organizma olarak kullanılmaktadır [62].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

İnorganik fosfatın ikincil metabolizma üzerindeki negatif etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir [51], [23], [64]. Chouayekh ve Virolle hücrede polifosfat sentezinden sorumlu temel gen olan *ppk* genini silerek elde ettikleri *S. lividans* TK24 mutant suşta katı besiyerinde antibiyotik üretiminde artış görmüşler, böylece PPK'nın bu organizmada antibiyotik üretimini negatif yönde etkilediğini iddia etmişlerdir [49]. *ppk* geni silinmiş *S. coelicolor* A3(2) suşu (Δppk) daha önce laboratuvarımızda hazırlanmış, yaban suşa göre daha fazla antibiyotik ürettiği sıvı kültürlerde ölçülerek gösterilmiş ve *ppk*'nin ikincil metabolizmaya negatif etkisinin bu suş için de geçerli olduğu bulunmuştur [70].

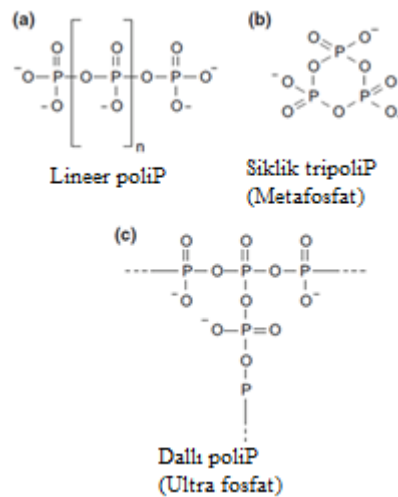
S. coelicolor M145 suşu, *S. lividans* ya da *S. coelicolor* A3(2)'ye göre çok daha fazla antibiyotik üretmektedir. Antibiyotik üretimi ile polifosfat metabolizması arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik çalışmalar kapsamında PPK'nın, yüksek antibiyotik üreticisi bir suşta da aynı negatif etkiyi gösterip göstermeyeceği merak konusudur. Bu tez çalışmasında, A3(2) suşuna göre daha fazla antibiyotik ürettiği bilinen M145 suşunda *ppk* geninin PCR temelli bir metod ile silinmesi, mutasyonun doğrulanması ve elde edilen mutant suşun A3(2) Δppk suşu ile karşılaştırılarak karakterizasyonu amaçlanmıştır. Laboratuvar stoklarımızda bulunan *ppk* geni

silinmiş *S. coelicolor* A3(2) suşunun üretilmesinde sorunlar yaşandığından, tez çalışması kapsamında söz konusu A3(2) mutant suşun, M145 mutant suşu ile beraber tekrar oluşturulması planlanmıştır. Yüksek antibiyotik üreticisi *S. coelicolor* M145 suşunda *ppk* delesyonunun ikincil meabolizmaya etkisi ilk defa bu tez çalışmasıyla gösterilecektir.

2. POLİFOSFAT POLİMERİ

Organizmalar yaşamsal faaliyetlerine devam etmek için enerji gerektiren temel biyosentez ve sinyal iletimini sürdürebilmek amacıyla yüksek enerjili fosfat kaynağına ihtiyaç duyarlar. Fosfat, hücrelerde ortofosfat, serbest fosfat ve polifosfat (poliP) olarak bilinen uzun zincirler formunda bulunur [2]. PoliP hücre içindeki görev ve yapısına göre uzunluğu 3 ile 1000 arasında değişkenlik gösteren fosfat $[PO_3^-]$ gruplarının birbirine yüksek enerjili fosfoanhidrit (P–O–P) bağları ile eklenmesiyle oluşan doğrusal, negatif yüklü polimerlerdir [1].

Kimyasal yapıları göz önüne alındığında poliP üç sınıfa ayrılır: metafosfatlar, lineer polifosfatlar ve son olarak, dallı polifosfatlar (ultra fosfatlar) (Şekil 2.1) [5]. PoliP'nin, volkanların ve okyanusların derinlerinde bulunan hidrotermal yarıklar gibi sıcaklığın oldukça yüksek olduğu koşullarda fosfat kayaçlarının dehidrasyonu ile oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle, prebiyotik zamanlardan beri mevcut olduğu tahmin edilmekte ve bununla birlikte poliP'nin makromoleküllerin bir araya getirilmesinde polianyonik, yüksek enerjili iskelet olarak görev aldığı düşünülmektedir [1], [6]. Bütün bu bilgilerin ışığında yaşamın kökenleri hakkında spekülasyon bir yorumla, poliP'yi içeren ve kullanabilen bir vezikül tarafından kazanılmış bir özelliğin bugünkü fosfat dünyamızın kaynağı haline geldiği düşünülebilir [1].



Şekil 2.1: Üç ana poliP grubunun yapısal gösterimi a) Lineer polifosfatlar, b) Metafosfatlar ve c) Dallı polifosfatlar.

19. yüzyılın sonunda Babes tarafından keşfedilen, ancak birkaç yıllık aktif çalışmadan sonra diğer fosil moleküller gibi poliP ile ilgili çalışmalar da rafa kaldırılmıştır [4]. RNA ve DNA gibi diğer daha karmaşık polianyonların evrimi sırasında oluşan bir kalıntı, hatta kayıp bir dal olarak kabul edilmiştir [2], [3]. Bunun temel nedeni, hücrede önemli bir metabolik rol oynadığını gösteren kanıtların eksikliği ve düşük konsantrasyonlarda poliP'nin varlığını ve boyutunu belirlemek için gerekli yöntemlerin henüz keşfedilmemiş olmasıdır [2].

Polifosfat; arkea, bakteriler, algler, mantarlar, protistler, bitkiler, böcekler ve memeliler gibi bütün canlı organizmalarda bulunan ve canlının birçok yaşamsal faaliyetinde rol oynayan önemli bir polimerdir [1], [5], [7]. Canlı organizmalar arasında bu yaygın dağılımın yanı sıra, poliP rezervlerinin miktarı ve kimyasal yapısı, türlere ve belirli büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilir. Genel olarak, prokaryotlar ve protistler, çok hücreli ökaryotlarla karşılaştırılınca daha yüksek oranda poliP biriktirebilirler [5].

İnorganik fosfat zincirleri, potansiyel fosforile edici ajanlar olarak hem aktif alkil grupları hem de amino asitler ile reaksiyona girerek yağ asitleri ve polipeptidlerin üretiminde rol oynamalarının yanı sıra PoliP'nin hem prokaryotik hemde ökaryotik hücrelerde çok sayıda görevi vardır. Bunları listeleyecek olursak [1], [5], [7], [16], [31];

- Fosfor deposu olarak kullanılır, hücrelerde fosfor homeostazisinde görev alır ve bunların dışında biyosferdeki fosfor döngüsüne katılır.
- İhtiyaç halinde kullanılmak üzere enerji deposu olarak kullanılır.
- Ağır metal detoksifikasyonunda şelatlayıcı ajan olarak kullanılır.
- Durağan büyüme fazında ve organizmanın maruz kaldığı çeşitli stres koşullarında hücrenin adaptasyon ve ilgili yanıtın oluşumunda görev alan genlerin ifadesinden sorumlu olan bakterilerde bir RNA-polimeraz alt birimi olarak işlev gösteren RpoS'in çeşitli sigma faktörleri yardımıyla sentezinin indüklenmesi ve kontrolünde görev alır.
- Bakteriyel hücre hareketinin düzenlenmesi, biyofilm oluşumu, sporulasyon ve virülans gibi hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin düzenlenmesinde görev alır.
- Özellikle amino asit kıtlığı gibi stres koşullarında devreye girerek sınırlandırılmış cevabın RelA, SpoT ve Lon ile birlikte düzenlenmesinde

görev alır. Alarmonların (ppGpp) hücre içindeki seviyelerini düzenleyerek hücre içindeki ikincil mesajların oluşumunu kontrol eder.

- Organizmaların birçoğunda hücre içi taşıma işlemlerinde görev alan poliP/poli-β-hidroksibutirat/Ca²⁺ kanallarının oluşumunda görev alır.
- Mayalarda glukoz transferaz enzimleri, ribozom proteinlerin parçalanmasından sorumlu Lon-proteaz, bakterilerdeki SulA/SfiA proteinleri ve hayvanlarda bulunan bazı protein kinazları içeren enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar.
- PoliP, özellikle patojenik bakterilere ve gıdaların bozulmasına sebep olan bakterilere karşı antiseptik özellikler göstermektedir.
- Çeşitli mikroorganizmalarda su tutucu olarak kullanılır bununla birlikte endüstriyel olarak atık suların temizlenmesinde de kullanılır.
- İnsanda kemik dokusu gelişimi de dahil olmak üzere biomineralizasyona görev aldığı tespit edilmiştir.
- Kan pıhtılaşması mekanizmasında ve apoptozda görev aldığı tespit edilmiştir.

2.1. Prokaryotlarda Polifosfat Sentezi

Prokaryotlarda ve bazı mikrobiyal ökaryotlarda da poliP esas olarak polifosfat kinaz 1 (*ppk1*; polifosfat: ADP fosfotransferaz) ile sentezlenir. Bu enzim ATP'den enerji bakımından zengin γ-fosfatın geri dönüşümlü transferini katalize eder ve poliP zincirini uzatır. Reaksiyon iki yönlüdür ancak genellikle sentez yönünde ilerler [8], [5].



ppk1, fosfotransferazlar süper ailesinin bir üyesidir ve ATP kullanılarak poliP sentezinde, nükleosidifosfat kinaz sentezinde, guanosin 5'-tetrafosfat sentezinde görev alır ve otofosforilasyon da yapabilir [9], [5]. Yapılan birçok çalışma *ppk1*'in hücre içinde yaşamsal faaliyetlerin düzenlenmesinde rol alan önemli bir enzim olduğunu göstermiştir. *ppk1* eksikliği büyümenin durağan evresindeki birçok bakterinin hücresel canlılığına ve ısı, UV, pH, antibiyotik gibi çeşitli stres

faktörlerine karşı etkili cevaplar oluşturmaya ciddi oranda zarar vermiştir [1], [10]. Benzer şekilde, *ppk1* geni silinmiş bakteriyel mutantların hücre hareketliliğinde, quorum sensing mekanizmalarında, biyofilm oluşumu ve virülans gibi yaşamsal faaliyetlerini etkileyen özelliklerinde bozulmalar meydana geldiği gösterilmiştir. Bazı mutant hücrelerin şekillerinde ve hücre duvarlarında yapısal kusurlar da gözlenmiştir [10], [11], [12], [13].

Fraley ve arkadaşlarının *Pseudomonas aeruginosa* ile yaptığı çalışmayla *ppk1*'in, poliP sentezinden sorumlu tek enzim olmadığı anlaşılmıştır [11]. Çünkü poliP sentezinin temel enzimi olan *ppk1*'in eksikliğine rağmen, mutant hücrelerdeki poliP'nin yaban tip (YT) hücrelerdeki poliP'nin %20'si kadar olduğu görülmüş ve bu alternatif enzim *ppk2* olarak adlandırılmıştır. *ppk1* ile benzer şekilde, *ppk2*'ye de bitkilerde ve metazoonlarda rastlanmamış ve bakteriyel patojenlerin virülansında rol oynadığı gösterilmiştir. Yine $\Delta ppk2$ mutanlarının ozmotik, besin kıtlığı, aerobik ve antimikrobiyal stres koşullarında yaşamsal faaliyetlerine devam edemedikleri gözlenmiştir [1], [16], [17]. *ppk2*'nin gösterdiği aktivite iki yönden *ppk1*'den farklıdır. Birincisi *ppk1* sadece ATP'yi kullanabilirken, *ppk2* GTP ve ATP'yi eşit bir biçimde verimli olarak kullanabilir. İkinci olarak da *ppk2* poliP sentezinde Mn^{2+} yerine Mg^{2+} tercih etmektedir [14]. Bunun yanında *ppk2* poliP: AMP fosfotransferaz ve poliP: ADP fosfotransferaz olarak da görev yapabilir [15].



PPK2'nin katalizlediği poliP'den GTP sentezlenmesinin (poliP odaklı nükleosit difosfat kinaz aktivitesi, PNDK) ters reaksiyon olan GTP'den poliP sentezlenmesinden 75 kat daha hızlı olduğu da gösterilmiştir [14].

2.2. Ökaryotlarda Polifosfat Sentezi

Bir cıvık mantar olan *D. discoideum*, *ppk1* homologuna (*Ddppk1*) sahip olduğu bilinen birkaç ökaryottan bir tanesidir [3], [1]. *E. coli*'nin *ppk1*'i ile karşılaştırıldığında, *Ddppk1*, ATP bağlanması ve otofosforilasyon için korunmuş bölgeler içerir ancak bilinen herhangi bir protein ile homolojiye sahip olmayan 370 amino asitlik bir N-terminal uzantısına sahiptir [1]. *Ddppk1*'in mutantlarında

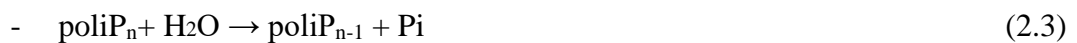
gelişme, sporulasyon ve diğer hücreleri yeme (avcılık) faaliyetlerinde bozukluklar olduğu ayrıca sitokinesis ve hücre bölünmesinin geç aşamalarında hücrelerde çeşitli defektler meydana geldiği görülmüştür. Neredeyse tümü tek çekirdekli olan yaban tip hücrelerinin aksine, *Ddppk1* mutant hücrelerinin yaklaşık %30'unun çok çekirdekli olduğu tespit edilmiştir [8], [1]. *Ddppk1* içermeyen *D. discoideum* mutantlarının *ppk* aktivitesine sahip olduğu gözlenmiş ve bu aktivitenin *Ddppk2* tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir [8], [11]. *Ddppk2* aktivitesine özellikle yüksek miktarda poliP içeren ve hücrelerdeki Ca^{2+} akışında görev alan asidokalsizomlarda rastlanmıştır [18]. Hücrede *Ddppk1* ile birlikte poliP seviyesinin düzenlenmesinden sorumlu olan *Ddppk2* enziminin, aynı zamanda aktin benzeri bir filament polimerize eden aktin-ilişkili bir protein (Arp) kompleksi olarak görev aldığı gösterilmiştir [1] [8], [16].

Mayalarda, hücre çeperinde yer alan mannan biyosentezinde görev alan Dolichyl Diphosphate (polifosfat fosfotransferaz) ve *Neurospora crassa*'da poliP sentez aktivitesi gösteren 3-fosfo-D-gliserol-fosfat (polifosfat fosfotransferaz) proteinleri tespit edilmişse de henüz izole edilip karakterize edilmedikleri için bazı bilimsel otoriteler tarafından poliP ile ilişkileri gözardı edilmektedir. Bununla birlikte yine mayalarda VTC4'ün ATP'den poliP sentezlediği görülmüş, VTC4 proteini olmayan mutant maya hücrelerinin vakuollarında poliP miktarında önemli bir düşüş görülmüştür [16], [19], [20].

2.3. PoliP'yi Degrede Edebilen Enzimler

PoliP'yi degrede edebilen başlıca enzimler Endopolifosfataz (polifosfat depolimeraz), Ekzopolifosfataz (polifosfat fosfohidrolaz), Polifosfat-Glukoz Fosfotransferaz, NAD Kinaz ve PoliP: AMP Fosfotransferaz (PAP) enzimleridir.

PoliP'nin parçalanmasında ve hücre içi poliP metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan en önemli enzimlerden biri olan Exopolifosfataz enzimi poliP zincirinin ucundan Pi 'yi uzaklaştıran enzimdir.

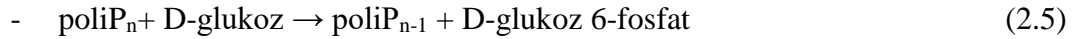


Bakteriler biri *ppx* geni tarafından diğeri ise *gppA* geni tarafından kodlanan exopolifosfataz aktivitesine sahip iki proteine sahiptir [1], [16]. *Pseudomonas*'ın *ppx*'i aşırı ifade eden mutant suşunun biyofilm oluşumunda ve kolonilerinin şeklinde bazı kusurlara sahip olduğu gösterilmiştir [24].

gppA geni tarafından kodlanan enzim, şeker kinaz/aktin/hsp 70 süper ailesine aittir. Bakteriler ve arkea arasında yaygın olarak bulunur, degradasyon için uzun zincirli poliP tercih eder ve lineer poliP'yi 3'lü gruplara kadar ya da binlerce Pi rezidüsüne kadar hidrolize eder. Enzim ayrıca aşağıdaki reaksiyonu gerçekleştirerek pppGpp (Güanozin 5'-trifosfat, 3'-difosfat) ve ppGpp (Güanozin 5'-difosfat, 3'-difosfat) olarak bilinen alarmon moleküllerini sentezler. Bu alarmonlar stres koşullarında özellikle "stringent response" olarak bilinen amino asit açlığına bağlı bakteriyel hücre cevabının oluşumunda önemli rol oynarlar [16], [25].



Aktivitesi ilk önce *Mycobacterium phlei*'de tespit edilen sonra diğeri birçok bakteri türünde varlığı gösterilen Polifosfat-Glukoz fosfotransferaz enzimi fosfat donörü olarak poliP'yi kullanarak glikoz fosforilasyonunu katalizler [16], [21].



Brevibacterium ammoniagenes, *Micrococcus luteus* ve *Corynebacterium ammoniagenes* gibi bazı bakteri türlerinde NAD Kinaz enzimi fosfat donörleri olarak hem ATP hem de poliP'yi kullanarak NAD'nin fosforilasyonunu katalize eder [16] [22].



Ökaryotlarda ise *Saccharomyces cerevisiae*'nin exopolifosfatazı (PPX1) en iyi çalışılmış olan enzimdir. Daha sonra çeşitli ortologları mayalar, mantarlar ve protistlerde de tanımlanmış [16] olan PPX1'in hücre zarında, sitozolde ve

mitokondriyel matrikste bulunduğu belirlenmiştir [28]. *ppx1* geni silinmiş mutantların yaban tip ile karşılaştırıldığında hücre içindeki polifosfatların miktar ve özelliklerinde önemli değişiklikler olmadığı gözlenmiş ve bunun nedeninin bir endopolifosfataz olan PPN1 olduğu anlaşılmıştır [16], [27]. PPN1, Calcineurin benzeri fosfoesteraz süper ailesine ait olan bir bitopik transmembran protein olup serbest Pi residüleri oluşturmadan sadece uzun poliP moleküllerini daha kısa poliP zincirlerine böler [29]. Enzim hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunur ancak en çok mayalarda görülmektedir [1].



Bir endopolifosfataz olan maya PPN1, zengin büyüme koşullarında, Mg^{2+} varlığında bir ekzopolifosfataz olarak davranır. Toksik ağır metallerin bulunduğu ortamda, PPN1'in Co^{2+} bağımlı exopolifosfataz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir [30].

PoliP'yi degrades edebilen diğer bir enzim olan PAP (PoliP: AMP Fosfotransferaz) polifosfattan kopardığı Pi'yi AMP'ye aktararak ADP oluşumunda görev alır [65].



3.ACTINOMYCETES

Hem bakteri hem de mantar özelliklerini gösteren Actinomycetes'ler morfolojik özellikleri göz önüne alınarak ışın demeti (aktis) ve mantar (mykes) anlamına gelen actinomyces olarak adlandırılmışlardır. Actinomycetes'ler gram pozitif bakteriler olup yüksek oranda G+C baz çiftine sahip DNA'ları bulunmaktadır. Hem kara hem de su ekosistemlerinde çokça rastlanmakla birlikte genel olarak toprak bakterileri olarak bilinmektedirler [33].

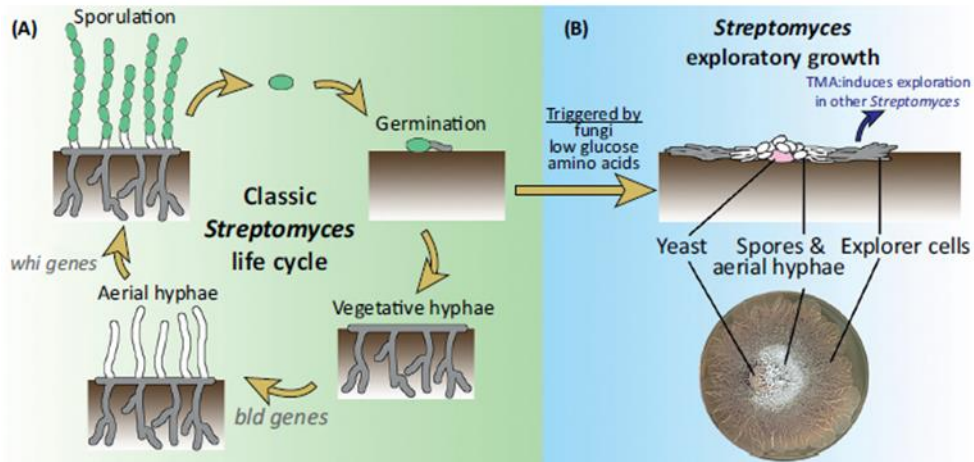
Actinomycetes'ler ölü bitki, hayvan ve mantarların yapılarında bulunan karmaşık polimer yapılarını ayrıştırarak doğada parçalanması uzun zaman alan malzemelerin geri dönüşümünde önemli rol oynarlar. Kimi üyeleri bitki, hayvan, insan patojeni olan *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Propionibacterium*, *Mycobacterium* vb. gibi 15 alt takıma ayrılmıştır. Sekonder metabolit üretiminde kullanıldıklarından biyoteknoloji için oldukça değerli bakteriler olarak kabul edilirler. Tüm biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin %45'i olan yaklaşık 10.000 biyoaktif metabolit Actinomycetes'ler tarafından üretilmektedir [32], [33]. Mevcut klinik kullanımda olan ve doğal olarak bakteriler tarafından üretilen antibiyotiklerin üçte ikisini ve birçok antikanser, antiparazitik ve antifungal bileşikleri üretebilmektedirler. Özellikle *Streptomyces* türleri, uygulamaları olan geniş yelpazede birçok faydalı biyoaktif doğal ürün ürettikleri için endüstriyel olarak önemli mikroorganizmalardır [32], [33]. *Streptomyces*'lerin karmaşık hayat döngüsününün sıcaklık, pH, CO₂, O₂ ve nem gibi diğer çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir [32], [37].

3.1. Streptomyces'lerin Fizyolojisi ve Antibiyotik Üretimleri

Gram pozitif filamentli toprak bakterileri olan *Streptomyces*'ler bilinen beş yüzden fazla üyesiyle Aktinomycet'ler ordosunun üyesi en çok olan Streptomycetaceae sınıfındadır. 8 Mb uzunluğunda ve G+C baz çifti oranı yüksek (%70-78) lineer bir kromozoma sahip olan *Streptomyces*'ler özellikle selüloz, kitin, ksilen, agar gibi çeşitli polisakkaritleri hidrolize etme yeteneklerinden dolayı toprak ekolojisinde anahtar rol oynarlar [32] [35], [34].

Streptomyces'ler doğanın en yetkin kimyagerlerinden biri sayılır çünkü antibiyotikler, immün baskılayıcı ajanlar ve antikanser ajanları gibi çeşitli biyoaktif ikincil metabolitleri yüksek miktarlarda üretebildikleri için medikal ve endüstriyel çalışmalarda büyük ilgi görmektedirler [32].

Streptomyces'in yaşam döngüsü, vejetatif hifler oluşturacak şekilde büyüyen bir sporun çimlenmesiyle başlar, daha sonra hiflerin büyüme ve dallanma süreci ile devam eder, son olarak karmaşık dallı vejetatif miselyum ile sonuçlanır (Şekil 3.1, a). Bu klasik yaşam döngüsünün yanında Jones ve arkadaşlarının Streptomyces'lerin büyüme ortamında bulunan mantarların varlığı ile birlikte keşifsel (exploratory) büyüme olarak adlandırdıkları yeni bir büyüme biçimini başlattığını göstermişlerdir [36]. Keşifsel büyümede, Streptomyces'in bilinen yaşam döngüsü olan vejetatif hif oluşumu ile başlayıp aerial hiflerin oluşumu ile devam eden sporulasyonla sonlanan yaşam döngüsünün dışına çıktığı gözlenmiştir. Explorer (kâşif) adı verilen hücrelerin dallanmayan vejetatif hifler gibi büyüdüğü ve katı besiyeri yüzeylerini hızlı geçme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Keşifsel büyümenin klasik Streptomyces yaşam döngüsü için kritik olan gelişim düzenleyicilerinden *bld* ve *whi* gen gruplarına ihtiyaç duymadığı gösterilmiştir (Şekil 3.1, b) [36].



Şekil 3.1: Streptomyces'in klasik ve keşifsel büyüme döngüsü.

Streptomyces ile ilgili genetik çalışmalar David Hopwood tarafından 1954'te başlatılmış olup genomu hakkındaki bilgilere ise Bentley ve arkadaşlarının *S. coelicolor* A3(2) ve Ikeda ve arkadaşlarının *S. avermitilis* ile yaptığı çalışmalar ışık

tutmuştur [38], [39], [40]. Onaka'nın 2017'de yaptığı çalışmada *Streptomyces*'in 30'dan fazla ikincil metabolit üretme potansiyeline sahip olduğu ancak çoğu metabolit biyosentetik gen kümesinin ifadesinin kriptik veya sessiz olduğu gösterilmiştir [41].

Model organizma olarak kabul edilen *S. coelicolor* farklı kimyasal karakterler gösteren 5 çeşit antibiyotik üretir. Bir poliketit türevi benzoizokromanquinon yapısında olan ve ortamın pH'sına göre mavi/kırmızı renk gösteren zayıf bir antibiyotik olan Actinorhodin (ACT) bunlardan ilki ve en iyi bilinenidir. ACT genlerinin ifadesi *ActII-ORF4* transkripsiyonel faktörleri ile kontrol edilmektedir [43]. Pembe/kırmızı renkli olan Pirol bazlı undesilprodigiosin (RED) geninin ifadesi iki bileşenli *redD* ve *redZ* genlerinin kontrolü ile düzenlenir [43]. Yapısı hala belirlenmemiş bir poliketit türevi antibiyotik olan kriptik poliketid (CPK) ile sarı pigment (γ CPK) *S. coelicolor* tarafından üretilen bir diğer grup antibiyotiktir ve üretimleri *cpk* gen kümesi tarafından kontrol edilir. Sarı renkli pigment oluşumunun besiyeri ortamına bağlı olduğu, glikoz bulunmayan ortamda ve yüksek oranda spor inokülasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir [42]. Lipopeptid kalsiyum bağımlı antibiyotiğin (CDA) biyosentezi, peptid antibiyotikleri üreten büyük modüler non-ribozomal peptid sentetazlarını içerir [43]. *S. coelicolor*'un ürettiği diğer bir antibiyotik olan metilenomisin (MM) büyük bir doğrusal plazmid olan SCP1 plazmidini üzerindeki *mmy* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu plazmidin otonom olarak kalabildiği veya kromozoma entegre olabildiği bilinmektedir [44].

Bilimsel çalışmalarda *S. coelicolor* A3(2)'nin dışında *S. coelicolor* M145 suşu model organizma olarak kullanılmaktadır. *S. coelicolor* M145 suşu, *S. coelicolor* A3(2)'den lineer 365 kb'lik SCP1 ve dairesel 31 kb'lik SCP2 iki plazmidin çıkarılmasıyla elde edilen yüksek antibiyotik üreticisi suştur [40].

Streptomyces'lerde antibiyotik üretimi sıvı kültürlerde genellikle durağan fazın başlangıcında başlar, katı besiyerlerinde ise morfolojik farklılaşmanın başlangıcı ile başlar. *Streptomyces*'lerde antibiyotik üretimini etkileyen faktörler sıralanacak olursa;

- Farklılaşma ve spor oluşumunu kontrol eden *bld* ve *whi* genleri ile birlikte programlanmış hücre ölümünü kontrol eden DasR sistemi [43].

- Sınırlandırılmış cevap mekanizmasını düzenleyen (p)ppGpp ile birlikte RelA proteini [32].
- Besi ortamında bulunan azot ve fosfor kaynaklarının azlığının bazı antibiyotiklerin üremini arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte ortamda kolay metabolize edilen glikoz gibi karbon kaynağı, amonyum ve fosfat iyonlarının bulunmasının antibiyotik üretimini negatif yönde etkilediği görülmüştür. Ayrıca dışardan besi ortamına eklenen inorganik fosfatın da antibiyotik üretimini baskıladığı görülmüştür [46], [47], [48].
- *S. coelicolor*'da 67 tane iki bileşenli kontrol sistemi olduğu bilinmektedir. Bunlardan AbsA1A2, PhoPR, DraRK, AfsQ1Q2 ve CutRS antibiyotik üretiminin düzenlenmesinde rol aldığı bilinen sistemlerden bazılarıdır [45].
- AtrA ve TetR-Like gibi global ve AdpA gibi master regülatörlerin de antibiyotik sentezinde rol oynadığı gösterilmiştir [43].

İnorganik fosfatın ikincil metabolizmaya olan etkisi bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Lounes ve arkadaşları besiyerine dışardan eklenen inorganik fosfatın antibiyotik üretimini azalttığını göstermişlerdir [51]. Benzer şekilde Hobbs ve arkadaşları düşük fosfat konsantrasyonunda antibiyotik üretiminin arttığını bulmuşlardır [23]. Sola - Landa ve arkadaşları *S. lividans*'da fosfat metabolizmasıyla ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol eden iki bileşenli PhoR/PhoP sistemi silinmiş mutantlarda hücre içindeki fosfat miktarının azaldığını ve bunun antibiyotik üretimini arttırdığını göstermişlerdir [64].

Chouayekh ve Virolle hücrede polifosfat sentezinden sorumlu temel gen olan *ppk* genini silerek elde ettikleri *S. lividans* Δppk mutantının antibiyotik üretiminde artış görmüşlerdir [49]. PPK'nın bu organizmada antibiyotik üretimini negatif yönde etkilediği bulunmuş ve bunun sebebinin PPK tarafından sentezlenen poliP'nin degradasyonu sonucu oluşan Pi'in antibiyotik üretim yollarını baskılaması olduğu ileri sürülmüştür. Ghorbel ve arkadaşları *S. lividans* yaban tip ve Δppk mutanı ile yaptıkları çalışmada ortamda Pi kalmadığında, hücrenin, poliP stoklarını PPK bağımlı olarak ATP eldesinde kullandığını ifade etmişlerdir [50]. Δppk mutantında enerji açığı oluştuğundan, bu açığı kapatmak için mutant hücrenin, diğer metabolik sentez yollarını devreye sokarak NADH, NADPH ve karbonil yapılarının miktarını arttırdığı ve bunların da antibiyotik sentezinde kullanıldığı gösterilmiştir [50].

Bu çalışma kapsamında, poliP sentezinden sorumlu enzimi ifade eden polifosfat kinaz geni (*ppk*) *S. coelicolor*'un ikincil metabolit üretme kapasiteleri birbirinden farklı olan M145 ve A3(2) suşlarından silinmiş ve bu mutasyonun hücrelerin antibiyotik üretimlerine etkisi gösterilmiştir.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyaller

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Pepton (Bacto™), NaCl (Sigma-Aldrich), Maya özütü (Bacto™), Agar (Merck), NaOH (Merck), SDS (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), D (+) Glukoz (Merck), İzopropanol, Agaroz (Sigma Aldrich), RedSafe (İntron), Kloroform (Merck), Sükroz (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), MOPS (Sigma Aldrich), Gliserol (Riedel de Haen), CaCl₂ (Merck), MgCl₂ (Merck), KCl (Riedel de Haen), KCl (Riedel-de Haen), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), K₂HPO₄ (Merck), K₂SO₄(Merck), TES Buffer (Applichem), Mannitol (Merck), Bacto kazamino asit (BD), EDTA (Merck), %84-88 Gliserol (Sigma Aldrich), Pepton (Merck).

4.1.2. Kullanılan Enzimler

Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), Q5 DNA polimeraz (NEB, Biolabs), Pfx® Platinium DNA Polimeraz (Invitrogen), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XhoI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XbaI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *BamHI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *EcoRV* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), DNA ligaz (Jena Bioscience), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma).

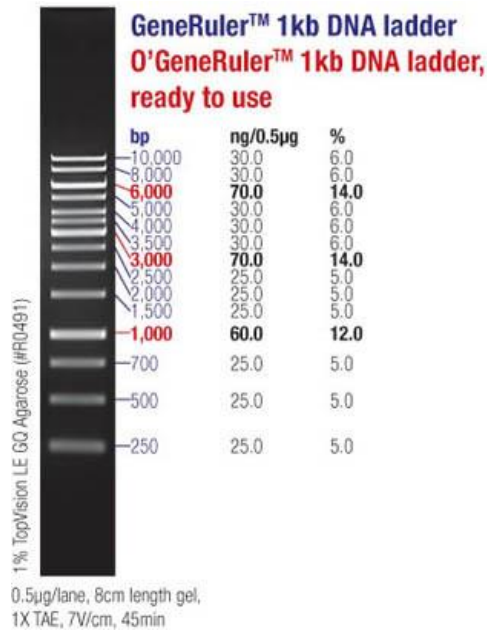
Enzimler ile kurulan kimyasal reaksiyonlar üretici firmaların tavsiye ettiği koşullarda gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Kullanılan Kitler

DNA'ların saflaştırılması işlemlerinde PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon kiti (MN) kullanılmıştır.

4.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Bu çalışmada Şekil 4.1’de gösterilen 1 kb moleküler DNA belirteci kullanılmıştır.



Şekil 4.1: Çalışmada kullanılan 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Thermo, SMO311).

4.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları

Kullanılan bakteri soyları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: *E. coli* ve *S. coelicolor* suşları.

Bakteri Türleri	Genotip	Kaynaklar
<i>E. coli</i> BW25113	<i>K12</i> derivative: Δ <i>araBAD</i> , Δ <i>rhaBAD</i>	[63]
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hdsS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	[71]
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Prototrofik yaban tip	[54]
<i>S. coelicolor</i> M145	A3(2) derivative SCP1, SCP2 plazmitleri çıkarılmış	[40]
<i>S. coelicolor</i> A3(2) Δ <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geninden yoksun suş	Bu çalışma
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geninden yoksun suş	Bu çalışma

4.1.6. Kullanılan Kozmit ve Plazmidler

Tablo 4.2’de çalışmada kullanılan kozmit ve plazmidler özellikleriyle beraber verilmiştir.

Tablo 4.2: Kullanılan kozmit ve plazmitlerin bazı özellikleri.

Kozmit ve Plazmidler	Dirençlilik belirteci	Dirençlilik	<i>oriT</i>	Büyükük	Kaynaklar
Std84	<i>kn</i>	Kanamisin	-	38491 bç	[55]
pIJ773	<i>aac(3)IV</i>	Apramisin	+	1382 bç	[57]
pUZ8002	<i>tra, neo, RP4</i>	Kanamisin	+	70 kb	[69]

4.1.7. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Sterilizasyon işlemi yüksek basınç altında 121°C’ta 15-20 dakika otoklavlanarak yapılmıştır.

Tablo 4.3: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

KULLANILAN ÇÖZELTİLER		
<p>Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X)</p> <ul style="list-style-type: none"> •242 g Tris Baz •57.1 ml Glasiyal asetik asit •100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) <p>Tris-EDTA (TE) Tamponu</p> <ul style="list-style-type: none"> •10 mM Tris-HCl (pH 8) •1 mM EDTA (pH 8) <p>20X SSC (pH 7)</p> <ul style="list-style-type: none"> •3 M NaCl •0.3 M Sodyum sitrat <p>Solüsyon I</p> <ul style="list-style-type: none"> •25 mM Tris (pH 8) •10 mM EDTA (pH 8) •50 mM Glukoz <p>Solüsyon II</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.2 N NaOH •%1 SDS <p>Solüsyon III</p> <ul style="list-style-type: none"> •%60 5M Potasyum asetat •%11.5 Glasiyal asetik asit <p>STE+ Lizozim</p> <ul style="list-style-type: none"> •%10.3 sükröz •25 mM Tris-HCl (pH 8) •25 mM EDTA (pH 8) •2 mg/ml Lizozim 	<p>Lizis Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.3 N NaOH •%2 SDS <p>CTAB/NaCl Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •%10 CTAB •0.7 M NaCl <p>STE Tamponu</p> <ul style="list-style-type: none"> •%10.3 Sükröz •25 mM Tris-HCl pH 8 •25 mM EDTA <p>Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.1 M maleik asit, •5 M NaCl <p>Depürinizasyon Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.25 M HCl <p>Denötralizasyon Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •1.5 M NaCl •0.5 M NaOH <p>Nötralizasyon Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •1.5 M NaCl •0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) •1 mM EDTA <p>Pre-Hibridizasyon Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •5X SSC •%1 Bloklama solüsyonu •%0.1 Sarkosil •%0.02 SDS 	<p>Hibridizasyon Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •Prehibridizasyon solüsyonu+ prob <p>Yıkama Tamponu I</p> <ul style="list-style-type: none"> •2X SSC •%0.1 SDS <p>Yıkama Tamponu II</p> <ul style="list-style-type: none"> •%0.1 SSC •%0.1 SDS <p>Deteksiyon Tamponu (pH 9.5)</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.1 M Tris-HCl •0.1 M NaCl <p>Yıkama Tamponu</p> <ul style="list-style-type: none"> •30 ml Maleik asit Tampon •90 µl Tween 20 <p>Bloklama solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •0.5g bloklama solüsyonu/ 50 ml maleik asit tamponu <p>Antikor solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> •Bloklama solüsyonu kullanılarak 5000 defa seyreltilen Anti-Digoksinin-AP <p>Renk oluşturan substrat</p> <ul style="list-style-type: none"> •Deteksiyon tamponu içinde seyreltilen NBT/BCIP solüsyonu

4.1.8. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 4.4’de gösterilmiştir. Sterilizasyon işlemi yüksek basınç altında 121 °C’ta 15-20 dakika otoklavlanarak yapılmıştır.

Tablo 4.4: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

KULLANILAN BESİYERLERİ		
<p>Luria Bertani Besiyeri</p> <ul style="list-style-type: none">•10 g NaCl•10 g Tripton•5 g Maya özütü <p>dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır ve 121 °C’ta 20 dakika steril edilir [57].</p> <p>2xYT Broth</p> <ul style="list-style-type: none">•16 g Difco Bacto tripton•10 g Difco Bacto maya özütü•5 g NaCl <p>dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır ve 121°C’ta 20 dakika otoklavlanır [57].</p> <p>R2YE Besiyeri</p> <ul style="list-style-type: none">•103 g Sükroz•0.25 g K₂SO₄•10.12 g MgCl₂.6H₂O•10 g Glukoz•0.1 g Kazamino asit•22 g Agar (% 2.2) <p>dH₂O ile 800 ml’ye tamamlanır ve 121°C’ta 20 dakika otoklavlandıktan sonra her 160 ml besiyeri içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir [66].</p> <ul style="list-style-type: none">•2 ml KH₂PO₄ (%0.5)•16 ml CaCl₂.2H₂O (%3.68)•3 ml L-prolin (%20)•20 ml TES Tampon (%5.73, pH 7.2)•0.4 ml iz element solüsyonu*•1 ml NaOH (1N)	<p>Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)</p> <ul style="list-style-type: none">•20 g Mannitol•20 g Agar•20 g Soya nu <p>Çeşme suyu le 1 lt’ye tamamlanır.</p> <p>Mannitol çeşme suyunda çözülür ve 2 g agar, 2 g soya unu içeren 250 ml’lik erlenlere 100’er ml olacak şekilde bölünür. İki defa üst üste 115 °C’ta 15 dk otoklavlanır [57].</p> <p>SOB Besiyeri</p> <ul style="list-style-type: none">•20 g Pepton•5 g Maya özütü•0.5 g NaCl <p>10 ml 250mM KCl dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır. 5M NaOH ile pH 7.0’e ayarlanır. Otoklavlandıktan sonra 2M MgCl₂’den 5 ml eklenir [52].</p> <p>Maya özütü-Malt özütü Besiyeri (YEME)</p> <ul style="list-style-type: none">•3 g Difco maya özütü•5 g Difco Bacto-pepton•3 g Oxoid malt özütü•10 g Glukoz•340 g Sükroz <p>dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır ve 121 °C’ta 20 dakika otoklavlanır [57].</p> <p>Otoklavlandıktan sonra;</p> <ul style="list-style-type: none">•5 mM MgCl₂.6H₂O•%0.5 Glisin ilave edilir.	<p>*İz Element Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none">•40 mg ZnCl₂•200 mg FeCl₃.6H₂O•10 mg CuCl₂.2 H₂O•10 mg MnCl₂.4 H₂O•10 mg Na₂B₄O₇.10H₂O•10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O <p>TBO Besiyeri (pH 6.5)</p> <ul style="list-style-type: none">•20 g Salça•20 g Yulaf•25 g Agar <p>dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır ve 121 °C’ta 20 dakika otoklavlanır.</p> <p>Protoplast P (-) Solüsyonu</p> <ul style="list-style-type: none">•103 g Sükroz•24 g K₂SO₄•2.02 g MgCl₂.6H₂O•2 ml İz element solüsyonu <p>dH₂O ile 800 ml’ye tamamlanır ve 121°C’ta 20 dakika otoklavlanır [57].</p> <p>Protoplast P (+) Solüsyonu</p> <p>Her 80 ml P(-) solüsyonu içine aşağıdaki steril kimyasallar ilave edilir:</p> <ul style="list-style-type: none">•1 ml KH₂PO₄ (%0.5)•10 ml CaCl₂.2H₂O•10 ml TES buffer (%5.73, pH 7.2) <p>Tripton soya besiyeri (TSB)</p> <ul style="list-style-type: none">•%3 Oxoid Tripton Soya besiyeri <p>dH₂O ile 1 lt’ye tamamlanır ve 121°C’ta 20 dakika steril edilir [57].</p>

4.1.9. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyon değerleri.

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

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

4.1.10. Kullanılan Cihazlar

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

4.2. Metodlar

4.2.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

E. coli'den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadalarının metodu takip edilerek yapılmıştır [52]. Plazmit izole edilecek suşlar uygun antibiyotik içeren 50 ml LB'de 37°C'ta 12-16 saat büyütülmüş, sonrasında bakteri kültürü oda sıcaklığında 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 800 µl solüsyon I (TEG) eklenmiş, vortekslenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, karışımlar ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. 5 dakika sonunda her 200 µl'lik karışımın üzerine 400 µl solüsyon II eklenerek 5 dakika boyunca buzda bekletilmiş ve her 2 dakikada bir ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında 300 µl solüsyon III ilave edilip, her 2 dakikada bir yavaşça ters-düz edilerek 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. 10 dakikalık inkübasyonun ardından 14000 rpm'de, 4°C'ta 20 dakika santrifüj uygulanmış ve supernatantlar pipet yardımıyla başka ependorflara aktarılmıştır. Her birinin üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenip karıştırılmış ve 15-60 dakika kadar oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 25°C'ta 11000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sona erdikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp pelet dH₂O'da çözülmüştür. Her bir tüpte bulunan solüsyonun üzerine RNaz (10 mg/ml) eklenerek 37°C'ta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen plazmit, 'PZR Temizleme (clean-up) Jel Ekstraksiyon Kiti (MN)' yardımıyla kolonla saflaştırılmıştır.

4.2.2. *E. coli*'den Kozmit İzolasyonu

E. coli hücrelerinden Std84 kozmidinin izolasyonu için, plazmit izolasyonunda kullanılan metod uygulanmıştır, fakat kozmit kolonlardan geçemeyecek kadar büyük olduğundan (yaklaşık 40.000 bp) RNaz basamağının ardından fenol-kloroform:izoamilalkol (CIA) (24:23:1) ekstraksiyonu yapılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. 1:1 oranında ilave edilen fenol-CIA ile karıştırılan solüsyon, 25°C'ta 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorfa aktarılarak bu

işlem 1 kez daha tekrarlanmıştır. Sonrasında üst faz tekrar yeni bir tüpe alınmış ve üzerine eşit hacimde CIA (24:1) karışımı eklenip karıştırıldıktan sonra 11.000 rpm'de 25°C'ta 5 dakika santrifüj edilerek fenolün solüsyondan iyice uzaklaştırılması sağlanmıştır. Santrifüj sonunda solüsyon başka bir tüpe aktarılmış ve üzerine 3 hacim etanol eklenip -20°C'ta gece boyu ya da -80°C'ta 2 saat bekletilerek DNA çöktürülmüştür. Son olarak 4°C'ta 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet kurutulup dH₂O'da çözülmüştür.

4.2.3. Elektroporasyon Yöntemi

Gust ve arkadaşlarının metoduna göre hazırlanıp -80°C'ta kullanıma hazır bir şekilde tutulan 50 µl'lik elektrokompentan hücreye yaklaşık 100 ng DNA eklenerek, karışıma 200 Ω, 25 µF ve 2,5 kV değerlerinde elektrik akımı uygulanmıştır [53]. Sonrasında üzerlerine, antibiyotiksiz 1 ml soğuk LB eklenip hücreler 30°C'ta 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından seçici antibiyotikleri içeren agar besiyerlerine yayılmış ve 30°C'ta gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

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

S. coelicolor yaban tip ve mutant suşlarından genomik DNA izole etmek için Hopwood ve arkadaşlarının hazırladıkları metod kullanılmıştır [54]. Öncelikle 50 ml TSB besiyerine spor stoklarından 100µl inoküle edilmiş ve 72 saat boyunca 30°C'ta 220 rpm'de hücreler çoğaltılarak ön kültür hazırlanmıştır.

100 ml besiyerine 3 günlük ön kültürden 1/10 oranında ekim yapılmış ve hücreler 48 saat boyunca 30°C'ta 220 rpm'de inkübasyona bırakılarak büyütülmüştür. 2 günün sonunda hücreler 50 ml falkonlara alınıp oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve 8 ml TE tamponunda çözülen hücre peletinin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Elde edilen yaklaşık 8.5 ml karışımın üzerine 500 µl %20 SDS ve 500 µl (10mg/ml) RNaz eklenip 37°C'ta 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatin sonunda karışımın üzerine 1.5 ml 5 M NaCl ve 1.2 ml CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65°C'ta 10-25 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından oda sıcaklığında soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24:1) solüsyonu eklendikten sonra 24-25°C'ta 11000 rpm'de 5 dakika

santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir falkona alınmış ve 1:1 oranında fenol:CIA (25:24:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Aynı işlem iki defa tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz yeni bir falkona aktarılmış ve üzerine 3 hacim etanol eklenip -20°C'ta gece boyu ya da -80°C'ta 2 saat bekletilerek DNA çöktürülmüştür. Son olarak 4°C'ta 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve dH₂O'da çözülmüştür.

4.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

S. coelicolor ve *E. coli* hücrelerinden izole edilen plazmit, kozmit ve kromozomal DNA'larının restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları, enzimlerin üretici firmalarının önerdiği konsantrasyonlar ve koşullarda tavsiye edilen tamponlar kullanılarak yapılmıştır. Kozmit ve plazmit kesimleri 2-5 saat süre ile yapılırken, *S. coelicolor* kromozomal DNA'ların kesimleri gece boyunca yapılmıştır.

4.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

%0.8, %1 veya %1.5'lik konsantrasyonlarda hazırlanmış agaroz jellerde DNA'lar büyüklüklerine göre ayrılmıştır. Jeller 1X TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu 0.05 µl/ml olacak şekilde Red-Safe ilave edilmiştir sıvı jel kasete dökülmüş, donduktan sonra DNA örnekleri 6X DNA yükleme boyası ilave edilip jele yüklenmiş ve içinde yürütme tamponu olarak 1xTAE bulunan elektroforez tankında 90-120 Volt'ta yürütülmüşlerdir.

4.2.7. DNA'ların Jelden Geri Kazanılması

DNA fragmentleri agaroz jelden geri elde edilirken, "PZR Temizleme (cleanup) Jel Ekstraksiyon" kiti (MN) kullanılmış ve üretici firmanın tavsiye ettiği kullanım talimatlarına uyulmuştur.

4.2.8. *E. coli* Kompetan Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli hücrelerinin kompetant hale getirilmesinde Sanders Laboratuvarında geliştirilen metod bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır [55]. Öncelikle *E. coli* hücrelerinden tek koloni seçilip 10 ml LB besiyerine ekilerek 37°C'ta 180 rpm'de 16-20 saat çoğaltılmıştır. Elde edilen bu saf ön kültürden 1/100 oranında, 50 ml antibiyotiksiz LB besiyerine ekim yapılarak 37°C'ta, 180 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Düzenli spektrofotometrik ölçümlerle takip edilen kültür OD600'de 0.4-0.5 değerine ulaştığında falkonlara aktarılmış ve 4°C'ta, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletler buza alınıp 40 ml TfbI solüsyonunda çözülmüştür. Buzda 10 dakika inkübe edildikten sonra tekrar 4°C'ta, 3000 rpm'de, 8 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pelletler tekrar buza alınıp, 1 ml TfbII ile çözülmüştür. Daha sonra hücreler, her birinde 50-100'er ul olacak şekilde buzda bekletilen ependorf tüplerine paylaştırılıp, sıvı azot içinde dondurularak -80°C'ta muhaza edilmiştir.

4.2.9. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması

ppk geninin ifadesini sonlandırmak için PZR tabanlı Gust ve arkadaşlarının geliştirdiği metod kullanılmıştır [53]. Kullanılan bu metod kapsamında seçilen bir antibiyotik direnç geni *S. coelicolor ppk* geninin yerini almaktadır. Çalışmamızda, apramisin direnç geni marker olarak seçilmiştir. PZR reaksiyonlarında apramisin direnç genini (*aac(3)IV*) ve konjugasyon gerçekleşirken plazmidin mobilizasyonunda görev alan *oriT* sekansının bulunduğu mutasyon kasetini taşıyan pIJ773 plazmidi kalıp olarak kullanılmıştır.

pIJ773 plazmidi, iki restriksiyon endonükleaz (*EcoRI* ve *HindIII*) ile kesilmiş ve mutasyon kasetinin hazırlanması esnasında yapılacak PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılacak olan apramisin kaseti elde edilmiştir. 1398 bç uzunluğundaki bu kaset jelden izole edilerek PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır.

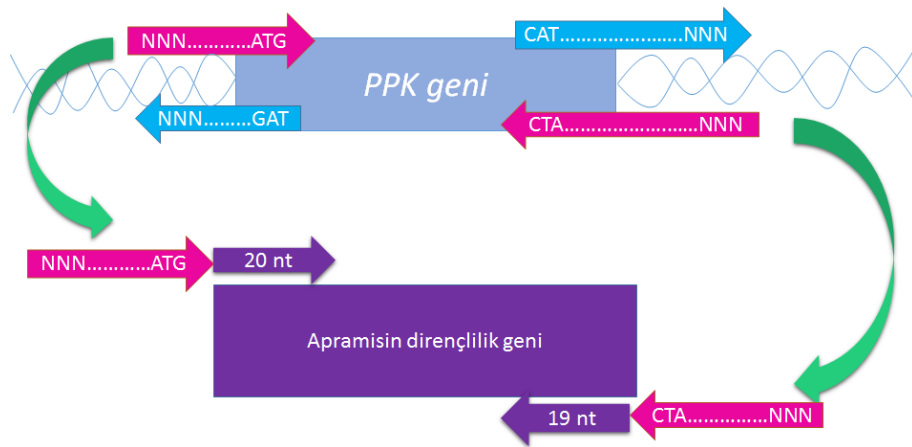
HPLC ile saflaştırılan 59 bç ileri primerin (5'aac cat cga ttc agc cag cct tgc gag gct cac cga atg ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC 3') ve 58 bç geri primerin (5'ggt tcc ggt gga aag tcc gtc gga atg tcc gtc ggg tca TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3') 39 nükleotidlik kısmı, *S. coelicolor* genom dizisine (<http://>

strepdb.streptomyces.org.uk) birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 4.2). İleri primerin (forward) 39 bazlık kısmı *ppk* geninin ön kısmındaki bölgeye uyumlu olup ATG başlangıç kodonuyla bitirilmiş, geri primerin 39 bazlık kısmı ise *ppk* geninin alt kısmındaki bölgeye uyumlu olacak şekilde tasarlanmıştır.

İleri primerin 3' 20 bp'lık bölgesi ise mutasyon kasetinin ön kısmına uyumlu bir biçimde tasarlanmışken geri primerin 3' kısmı (19 bp'lık) mutasyon kasetinin arka kısmına uyumlu olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu iki primer ile hazırlanan mutasyon kaseti, *ppk* geninde, sadece ATG ve TGA kodonları kalacak şekilde bir delesyona sebep olacaktır (Şekil 4.2).

100 µl'lik PCR reaksiyonu, 1X Pfx Amplifikasyon tamponunda, 1 mM MgSO₄, 10mM dNTP karışımı, ileri ve geri primerlerin her birinden 50 pmol, 80 ng kalıp DNA ve 2.5 U Taq DNA polimeraz ile gerçekleştirilmiştir. Toplam 35 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü,

- denatürasyon 94°C'ta 120 saniye,
- primer bağlanması 65°C'ta 45 saniye ve
- polimerizasyon 70°C'ta 90 saniye olacak şekilde kurulmuştur.



Şekil 4.2: Primerlerin dizayn ve mutasyonun gerçekleştirilme biçimi.

4.2.10. *S. coelicolor* Std84 Kozmidinin *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması

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

kompetan hücreleri Sanders Laboratuvarında geliştirilen metod ile hazırlanmıştır [55]. Üzerinde *ppk* geni bulunan Std84 kozmidini, *E. coli* BW25113/ pIJ790 hücrelerine Gust ve arkadaşlarının hazırladıkları elektroporasyon metodu ile aktarılmıştır [53]. 30°C'ta 1 saat inkübe edildikten sonra hücreler, Amp (100 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren LB agar besiyerlerine ekilerek 30°C'ta bir gece inkübe edilmiştir.

4.2.11. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini İçeren *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması

Std84 kozmidini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 kompetan hücreleri Sanders Laboratuvarında geliştirilen metod ile hazırlanmıştır [55]. Hücreler, Amp (100 µg/ml), Kn (50 µg/ml), Chl (25 µg/ml) içeren 100 ml LB besiyerinde üretilmiştir. Mutasyon kaseti Std84 kozmidini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine Gust ve arkadaşlarının hazırladıkları elektroporasyon metodu ile aktarılmış ve transformanlar Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Amp (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerinde seçilmişlerdir [53].

4.2.12. Std84 *Appk* Mutant Kozmidinin Metilasyon Yoksunu *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması

Sanders Laboratuvarında geliştirilen metod ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri, *ppk* geni ile apramisin kasetinin yer değiştirdiği mutant kozmit (Std84 *Appk*) ile transform edilmiştir [55]. Transformanlar Kn (50 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) + Amp (100 µg /ml) içeren LB katı besiyerlerinde 37°C'de büyütülmüştür.

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

TSB'de 2 gün boyunca sonrasında hücre sayıları eşitlenerek antibiyotik içermeyen 100 ml R2YE besiyerine 3'er tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. 144 saatlik fermantasyonun 24., 48., 72., 96., ve 144. saatlerinde her bir kültürden 5 ml örnek alınmış, alınan örneklerin 1 ml'si antibiyotik ölçümünde kullanılmak üzere -20°C'ta

saklanmıştır. Geri kalan 4 ml'lik kısım ise kuru ağırlık ölçümünde kullanılmak üzere 2 defa dH₂O ile yıkandıktan sonra -20°C'a kaldırılmıştır.

Spesifik aktivitenin belirlenmesinde kullanılacak pellet miktarlarının belirlenmesi için -20°C'ta saklanan örnekler 1 ml dH₂O'da çözülmüş ve daha önce ağırlıkları hassas terazi ile belirlenmiş kurutma kaplarına aktarılmış ve 80°C'ta 3-4 gün kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra hücre ağırlıkları ölçülmüştür.

Aktinorhodin ve undesilprodigiosin antibiyotiklerinin ölçümü Kieser ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemi ile yapılmıştır [56]. -20°C'taki örnekler alınıp eritildikten sonra üzerlerine 250 µl 5 M KOH eklenmiş ve gece boyunca 4°C'ta tutulmuştur. İnkübasyonun sonunda örnekler 13000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş, süpernatantlar aktinorhodin miktarının tayini için 640 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Blank olarak bakterilerin büyütüldüğü R2YE besiyeri kullanılmıştır.

Üretilen undesilprodigiosin miktarının belirlenmesi için peletler iki defa 0.5 M HCl ile yıkanmış sonrasında 4°C, 13.000 rpm, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak her örneğe 1 ml 0.5 M metanol-HCl eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatin sonunda örnekler 4°C'ta, 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip süpernatantlar spektro küvetlerine alınarak 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Blank olarak 0.5 M metanol-HCl kullanılmıştır. Antibiyotik ölçümlerinde ihtiyaç halinde dilüsyonlar blank olarak kullanılan solüsyonlar ile yapılmıştır. Antibiyotik aktivitelerinin ölçümünde;

$$Abs = \epsilon \cdot x [M] \quad (4.1)$$

formülünden yararlanılmıştır. Aktinorhodin için ϵ değeri 25230, undesilprodigiosin için ise ϵ değeri 100500 olarak alınmıştır. Formüller kullanılarak hesaplanan molarite değerleri 10⁶ ile çarpılarak, nM cinsinden konsantrasyonlar elde edilip kuru ağırlığa bölünerek spesifik aktiviteler belirlenmiştir. Mutant ve yaban tip arasındaki antibiyotik üretim farkının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesinde t-test yöntemi kullanılmıştır.

4.2.14. Southern Blot

Southern blot Sambrook ve arkadaşlarının önerdikleri prosedüre göre yapılmıştır [52]. Öncelikle mutant ve yaban tip suşlardan izole edilen kromozomal DNA örnekleri *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleazlar ile ayrı ayrı kesilerek %1.5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen DNA fragmantlarının jelden membrana aktarılması blotlama sistemi (Amersham) kullanılarak 40-50 mbar vakum altında gerçekleştirilmiştir. 2xSSC solüsyonu ile yıkanan membranın üzerinde bulunan agaroz jelin yüzeyi 30'ar dakika sürelerle sırasıyla depürinizasyon solüsyonu, denötralizasyon solüsyonu, nötralizasyon solüsyonu ile kaplanmış ve ardından 90 dakika boyunca 20xSSC solüsyonu ile kaplanan jeldeki DNA fragmanlarının membrana aktarımı gerçekleştirilmiştir. DNA'ların membrana sabitlenmesi için membranın her bir yüzeyine 4 dakika boyunca UV ışığı uygulanmıştır. Son olarak membran 2xSSC solüsyonu ile yıkayıp filtre kağıdı arasında 4°C'ta saklanmıştır.

4.2.15. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

XhoI ve *XbaI* restriksiyon endonükleazları ile ayrı ayrı kesilen DNA örneklerinin aktarıldığı membranlar prehibridizasyon solüsyonu içerisinde 37°C'ta 5 saat boyunca hibridizasyon fırınında inkübasyona bırakılmıştır. *XhoI* ile kesilmiş kromozomal DNA örneklerine sahip membran *ppk* probu ile *XbaI* ile kesilmiş olan kromozomal DNA örneklerine sahip membran ise *apramisin* probu ile 37°C'ta hibridizasyon fırınında gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İlgili DNA'ları işaretlemek için kullandığımız problemleri içeren hibridizasyon solüsyonları tekrar kullanılmak üzere -20°C'ta muhafaza edilmiştir. Hibridizasyon basamağından sonra membran yıkama tamponu I ile çalkalanarak 15'er dakikalık sürelerle 2 defa yıkılmış, yıkama işlemi yıkama tamponu II ile 55°C'ta 25 dakikalık 2 tekrarla devam etmiştir. Daha sonra membran maleik asit yıkama tamponunda 5 dakika durulanmış ve sonrasında 100 ml blotlama solüsyonunda 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat boyunca 20 ml antikor muamele edilen membran 100 ml maleik asit yıkama tamponunda 15'er dakikalık süre ile 2 defa yıkandıktan sonra 20 ml tespit (detection) tamponu ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Membranın

yüzeyi taze hazırlanmış 10 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta bantların oluşumu gözlenene kadar bekletilmiştir. Renk reaksiyonu membranın dH₂O ile yıkanmasıyla sonlandırılmıştır.

4.2.16. *ppk* Prop DNA'sının Hazırlanması

Hibridizasyon deneylerinde kullanılacak *ppk* probunun hazırlanması için, 1815 bç uzunluğundaki *ppk* geni pSK-*ppk* plazmidinden (Ümmühan Savaş'ın yüksek lisans tez çalışması) *Xho*I restriksiyon endonükleaz kesiminden sonra agaroz jelden saflaştırılmıştır.

4.2.17. *Apramisin* Prop DNA'sının Hazırlanması

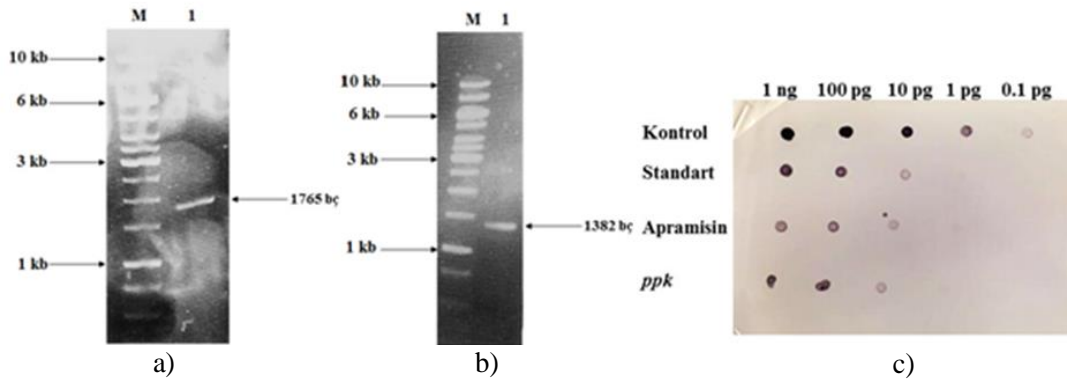
Δppk mutantının ispatlanmasında prop olarak kullanılacak olan 1382 bç uzunluğundaki *apramisin* direnç geni (*aac*(3)IV), pIJ773 plazmidinden *Eco*RI ve *Hind*III fragmanı olarak elde edilmiş ve jelden saflaştırılmıştır.

4.2.18. Prop'ların İşaretlenmesi, Sinyal Oluşumu ve Tespit Edilmesi

Digoksinin DNA işaretleme ve tespit kiti (Roche) ile üreticilerin tavsiye ettiği şekilde işaretlenen *aac*(3)IV ve *ppk* problemlerinin seri dilüsyonları hazırlanmış ve pozitif yüklü naylon membrana 1'er µl'si 1ng, 100pg, 10pg, 1pg ve 0,1pg konsantrasyonlarında sırasıyla emdirilmiştir. DNA'lar 4 dakika UV ışığı altında tutularak membrana sabitlenmiştir. Membran ilk olarak 20 ml maleik asit tamponunda 15-25°C'ta çalkalanarak 2 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından sırası ile 10 ml bloklama ve 10 ml antikor solüsyonlarında 30'er dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Membran, 10 ml yıkama tamponunda 15'er dakikalık sürelerle 2 defa yıkandıktan sonra, 10 ml tespit (detection) tamponunda 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Son olarak 5 dk'lık inkübasyonun bitiminde taze hazırlanmış 2 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta inkübe edilmiş 15 dakikalık periyotlarla kontrol edilmiştir. Boyama reaksiyonunu sonlandırmak için membran 1

1 dakika steril dH₂O ile yıkanmıştır. Prob DNA'larının digoksin ile işaretlendiği, kontrol ve standart sonuçlarına bakılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Hibridizasyon deneylerinde kullanılacak problemlerin hazırlanması. a) *ppk* geninin iç bölgesinden PCR ile çoğaltılan DNA fragmanı b) *aac(3)IV* (apramisin) genine ait fragman c) *aac(3)IV* ve *ppk* problemlerinin etkinliklerinin kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.

4.2.19. Mutant Kozmidin *S. coelicolor*'a Transferi

4.2.19.1. Konjugasyon

Konjugasyon için Gust ve arkadaşlarının hazırladıkları metod takip edilmiştir [57]. Std84 Δppk mutant kozmiti taşıyan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri 37°C'ta gece boyu, Kn (50 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) antibiyotiklerini içeren LB besiyerinde büyütülmüş ve ertesi gün 1/10 oranında olacak şekilde aynı antibiyotikleri içeren 55 ml LB'ye ekim yapılmıştır. Hücre kültürü, 600 nm dalga boyunda aborbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37°C'ta inkübasyona bırakılmıştır (200 rpm). Kültürler istenilen OD600 değerine ulaştığında 4°C'ta, 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, sonrasında hücreler 2 defa içerisinde antibiyotik bulunmayan LB ile yıkanarak, 1 ml LB'de çözülmüştür. Yıkama işlemlerinin devam ettiği esnada, her bir konjugasyon denemesi için 500 µl 2xYT besiyerine 1 µl ve 1.5 µl 10^8 *S. coelicolor* sporu eklenip, 4°C'ta 10 dakika ısı şokuna maruz bırakılmış sonrasında oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Sporlar soğutulduktan sonra, 500 µl *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücresi ile karıştırılmıştır. Akabinde 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıp, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet dipte kalan ~50 µl'lik besiyerinde çözülmüştür.

Hücrelerden, 10^{-1} - 10^{-4} aralığında seri dilüsyonlar yapılmış ve 100'er µl antibiyotiksiz R2YE agar besiyerine ekilmiştir. 30°C'ta 16-20 saat inkübe edilen hücrelerin üzerleri, R2YE agar besiyerindeki son konsantrasyonu 25 µg/ml NA ve 50 µg/ml apramisin içerecek şekilde antibiyotikli 1 ml dH₂O ile kaplanarak inkübasyona devam edilmiştir.

Elde edilen konjugant koloniler, çift rekombinasyon olayının meydana gelip gelmediğini anlamak için hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren R2YE besiyerine hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren R2YE besiyerine ekilmiş ve bunlardan NA+Apr'ye dirençli NA+Apr+Kn hassas olan olası mutant suşlar taranmıştır.

4.2.19.2. Protoplast Transformasyonu

S. coelicolor A3(2) ve M145 suşlarının protoplastları Hopwood ve arkadaşlarının metodu kullanılarak hazırlanmıştır [54]. TSB besiyerinde büyütülmüş *S. coelicolor* ön kültüründen, 100 µl 2.5 M MgCl₂.6H₂O ve 1.25 ml %20 glisin içeren 50 ml YEME besiyerine 1/10 oranında ekim yapılmıştır. 20 saat boyunca 30°C'ta 250 rpm'de büyütülen hücreler, sonrasında oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip %10.3 sükröz ile iki defa yıkanmıştır. Elde edilen pelet, 20 ml 2 mg/ml lizozim içeren P(+) solüsyon ile çözülmüş sonrasında hücreler 30°C'ta, her 5 dakikada bir dikkatlice karıştırılarak 45 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her 15 dakikada bir mikroskop altında protoplast oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra bu karışım, protoplastları misellerinden ayırmak için içerisi pamuk ile gevşekçe doldurulmuş 5 ml'lik pipet ucu yardımıyla filtre edilmiş devamında 3300 rpm'de 4°C'ta 7 dakika santrifüj edilmiş ve ardından pellet P(+) solüsyonu ile 2 defa yıkanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pelet 300 µl P(+) buffer'da çözülerek, ependorf tüplerine 50'şer µl olacak şekilde dağıtılmış ve buz içinde -80°C'ta yavaşça dondurulmuştur.

Her bir transformasyon deneyi için, öncelikle -80°C'tan alınan 50 µl protoplast, çeşme suyuna tutularak hızlıca çözülüp buza alınmıştır. Her bir protoplastın üzerine hızlıca 5 µl rekombinant plazmitin DNA'sı eklenmiş (*E. coli* ET12567 hücrelerinden izole edilmiştir) ve 200 µl %25 PEG + P(+) karışımı ilave edilmiş ve tüm bileşenler pipet yardımıyla 2-3 defa karıştırılmıştır.

Protoplastlar iki R2YE agar besiyerine eşit hacimde yayılarak ekilmiş ve 30°C'ta 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. 20 saatlik inkübasyonun ardından petriyerler, agar besiyerindeki son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde apramisin içeren 1 ml dH₂O ile kaplanmış ve 30°C'ta inkübasyona devam edilmiştir.

4.2.20. Poli-β-hidroksibutirat'ın Spektrofotometrik Olarak Ölçümü

Hücreler üç gün boyunca TSB besiyerinde 30°C'ta çoğaltılmıştır. Ön kültürlerden eşit ağırlıkta hücre alınarak Nitrojen Bazal Besiyeri ve R2YE besiyerine 3 tekrarlı ekilmiş ve 72 saat boyunca 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 72 saatin sonunda hücreler 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatantlar uzaklaştırılıp peletler 2 defa dH₂O ile yıkanmış ve sonrasında peletler 48 saat boyunca 80°C'de kurutulmuştur. 2 gün boyunca kuruyan peletlerin üzerine 10 ml çamaşır suyu eklenmiş ve 37°C'de 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 12 saat sonra solüsyon 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış ve peletler sırasıyla 10 ml dH₂O, aseton ve dietil eter ile yıkanmıştır. Eter ile yıkandıktan sonra peletlerin üzerine 5 ml kaynar kloroform eklenmiş ve eklenen kloroformun oda sıcaklığında çeker ocakta buharlaşması beklenmiştir. Kloroform tamamen uçtuktan sonra kalan çökelti üzerine 10 ml H₂SO₄ eklenerek 10 dakika boyunca kaynayan suda inkübasyona bırakılmış sonrasında örneklerin oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiş devamında örneklerin sırasıyla 280 nm ve 300 nm'de optikal yoğunlukları ölçülmüştür.

4.2.21. Neisser Boyama Yöntemi

Hücre içindeki polifosfatların gözlenmesi için neisser boyama yapılmıştır. R2YE ve NBM besiyerlerinde 3 gün boyunca büyütülen bakterilerden 3. günün sonunda bir miktar alınıp lam üzerine yayılmış ve fikse edilmiştir. Sonrasında Neisser-A ve Neisser-B boya çözeltilerinden hazırlanan karışım ile 30 saniye muamele edilmiştir. Distile su ile yıkanan preparata 10 damla lugol damlatılıp 5 saniye beklenmiş, ardından tekrar yıkanan preparata 10 damla Neisser- C çözeltisi damlatılmış, 10 saniyelik inkübasyonun ardından distile su ile yıkanıp kurutulan örnek mikroskop altında incelenmiştir.

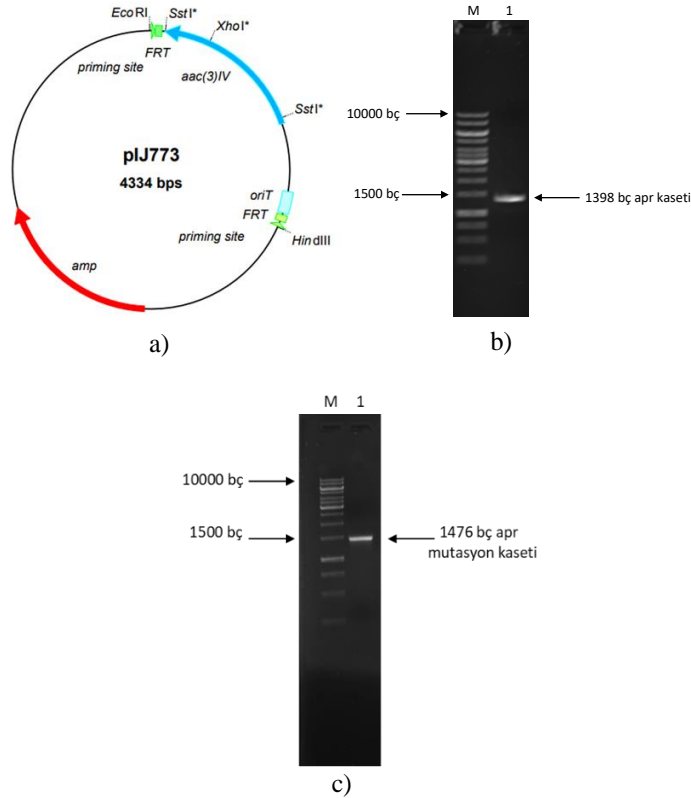
4.2.22. Fourier Kızıl Ötesi Işın Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR)

R2YE ve NBM besiyerlerinde 3 gün boyunca büyütülen bakteriler distile su ile 2 defa yıkandıktan sonra -80°C’de muhafaza edilmiştir. Sonrasında yüksek basınç altında dondurulup toz haline getirilmiş bakteriler FTIR ile taranmıştır.

5. BULGULAR

5.1. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması

Hücrede poliP üretiminden sorumlu ana gen olan *ppk* geninin silinmesi için Gust ve arkadaşlarının geliştirdiği PZR temelli REDIRECT metodu kullanılarak seçici direnç geni apramisininin *ppk* geni ile yer değiştirmesi sağlanmıştır [57]. Apramisin geni pIJ773 plazmidinden (Şekil 5.1, a) *EcoRI* ve *HindIII* ile kesilmiş (Şekil 5.1, b) ve mutasyon kasetinin hazırlanması için yapılacak PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır. Apramisin direnç geni ve *ppk* geninin başlangıç ve bitiş kodonlarının üst ve alt bölgeleriyle uyumlu dizilere sahip olan primerler kullanılarak yapılan PZR sonucu 1476 bç'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 5.1, c).

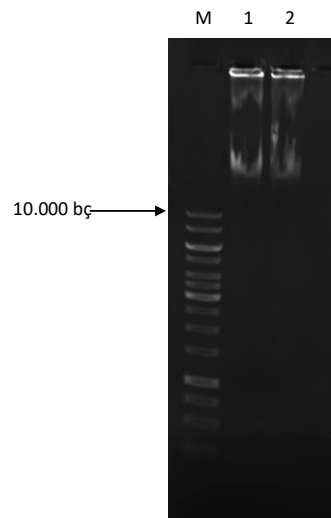


Şekil 5.1: Mutasyon kasetinin hazırlanması a) pIJ773 plazmidinin yapısı. b) pIJ773 plazmidinin apramisin geni içeren *EcoRI* ve *HindIII* fragmanı M: Marker (Thermo). 1: 1398 bç apr kaseti. c) PZR ile elde edilmiş apr mutasyon kaseti. M: Marker (Thermo). 1: 1467 bç mutasyon kaseti.

5.2. *S. coelicolor* A3(2) ve *S. coelicolor* M145 Δppk Mutantlarının Hazırlanması

5.2.1. *S. coelicolor* Std84 Kozmidinin *E. coli* BW25113/ pIJ790 Hücrelerine Aktarılması

E. coli BW25113 suşu içinde yer alan pIJ790 plazmidi, kloramfenikol direnç geni (*cat*) ve sıcaklığa duyarlı replikasyon orijini (30°C’de replike olabilirken, 37°C’de replike olamamaktadır) taşımaktadır. Bu plazmit ayrıca arabinoz operonunun kontrolü altında bulunan ve homolog rekombinasyonun gerçekleşmesini sağlayan rekombinazları da içermektedir. Üzerinde *ppk* geni bulunan Std84 kozmidini izole edilerek (Şekil 5.2) kompetan *E. coli* BW25113 hücrelerine aktarılmıştır. Std84 kozmidini taşıyan hücreler Amp (100 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerinde 30°C’de seçilmişlerdir.



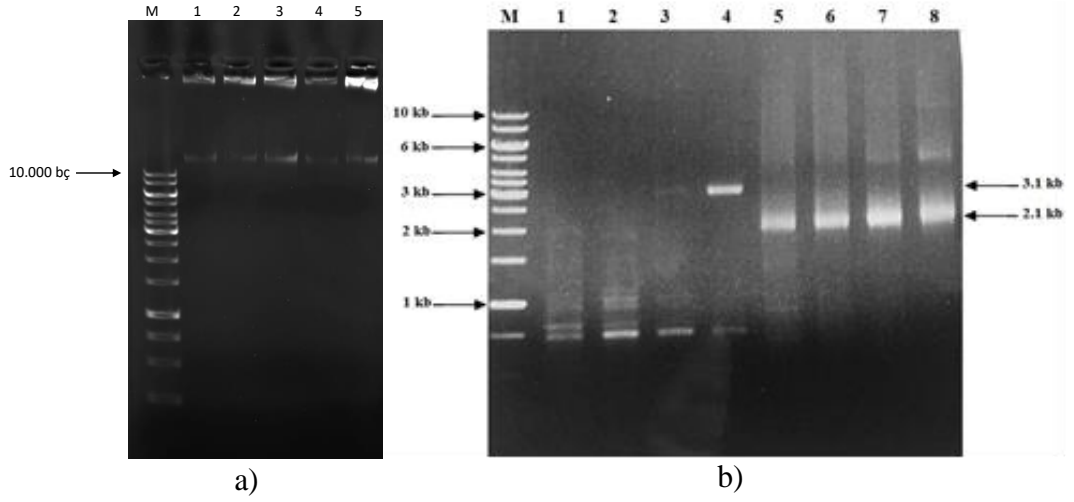
Şekil 5.2: Kozmit izolasyonu. M: Marker (Thermo). 1,2: Std84 Kozmidini.

5.2.2. Mutasyon Kasetinin Std84 Kozmidini Taşıyan *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılarak Mutant Kozmidin Oluşturulması

Std84 kozmidini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 hücreleri Amp (100 µg/ml), Kn (50 µg/ml), Chl (25 µg/ml) ve 10 mM L-arabinoz içeren 100 ml SOB-MgSO₄ besiyerinde üretilerek kompetan hale getirilmiştir. PCR ile oluşturulan 1476 bp’lik

mutasyon kaseti bu kompetan hücrelere elektroporasyon metodu ile aktarılmış ve hücreler Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Amp (100 µg/ml) içeren LB agarda seçilmişlerdir.

Kozmit üzerinde *ppk* geninin silindiğini ispatlamak için olası Std84 Δppk kozmitlerini taşıyan hücrelerden kozmit izolasyonu yapılmış (Şekil 5.3, a) ve bunlardan bir tanesi PZR'da kalıp olarak kullanılmıştır. Mutant kozmitte *ppk* geninin (2542 bp) yerini apramisin direnç geni (1382 bp) alacağından mutant kozmitin kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonda 3.1 kb yerine beklenildiği gibi 2.1 kb'lik DNA fragmanı elde edilmiştir (Şekil 5.3, b).



Şekil 5.3: Δppk kozmitlerinin izolasyonu ve doğrulanması a) İzole edilen pütatif Δppk kozmitleri. b) Farklı bağlanma sıcaklıklarında (50°C, 55°C, 60°C, 65°C) F-*ppk* ve R-*ppk* primerlerinin (Tablo 5.1) kullanıldığı PZR reaksiyon sonuçları. M: Belirteç (Fermentas) 1-4: Yaban tip Std84 ile yapılan PZR sonuçları 5-8: Std84 Δppk ile yapılan PZR sonuçları.

5.2.3. Δppk Mutant Kozmidinin Metilasyon Sistemi Olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması

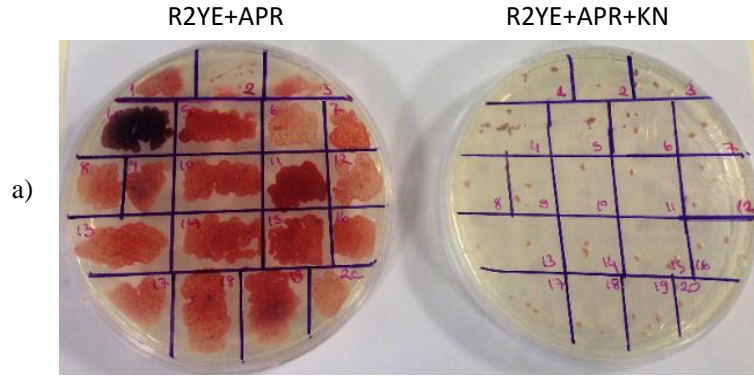
S. coelicolor'ın oldukça güçlü bir metil-spesifik restriksiyon sistemi bulunmaktadır. Elde edilen mutant kozmidin *S. coelicolor*'a transferi ancak DNA metilasyon sisteminden yoksun bir ara konakçı (*E. coli* ET12567) sayesinde mümkün olacağından, bu aşamada pUZ8002 plazmidini taşıyan *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılmıştır. Sanders Laboratuvarı'nda geliştirilen metod ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreler, mutant kozmit (Std84 Δppk) ile transform

edilmiştir [55]. Transformantlar, Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25µg/ml) antibiyotiklerini içeren besiyerinde seçilmişlerdir. Doğrulanmış transformantlardan bir tanesi seçilerek *S. coelicolor* A3(2) ve M145 suşları ile konjugasyon deneylerine saklanmıştır.

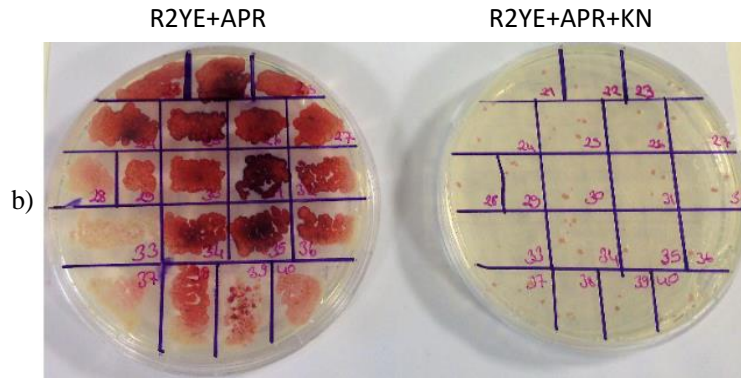
5.3. Δ appk Mutant Kozmidinin *S. coelicolor* A3(2) ve *S. coelicolor* M145'e Aktarılması

Mutant kozmit, *S. coelicolor*'ın iki ayrı suşuna (A3(2) ve M145) hem konjugasyon hem de protoplast transformasyonu yöntemleriyle aktarılmıştır [56]. Değişik koşulların denendiği farklı konjugasyon ve protoplast transformasyonu deneyleri sonucunda NA (nalidiksik asit) ve apramisin içeren R2YE besiyerinde üreyen hücreler seçilmiş ve bunların arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği (apramisine dirençli, kanamisine hassas) hücreler taranmıştır. Bunun için aynı hücre hem NA+Apr içeren hem de NA+Apr+Kn içeren R2YE besiyerlerine ekilmiş ve bunların içinden NA+Apr besiyerinde üreyip de NA+Apr+Kn besiyerinde üremeyen *S. coelicolor* hücreleri, olası çift rekombinasyon mutantları olarak seçilmişlerdir (Şekil 5.4).

M145



A3(2)



Şekil 5.4: Olası *S. coelicolor* Δ *ppk* suşlarının seçici besiyerlerinde taranması. a) M145 olası mutantların NA ve APR içeren ve aynı hücrelerin NA, APR ve KN içeren R2YE besiyeri üzerindeki üreme durumları. b) A3(2) olası mutantların NA ve APR içeren ve aynı hücrelerin NA, APR ve KN içeren R2YE besiyeri üzerindeki üreme durumları.

5.4. *Δppk* Mutasyonunun Doğrulanması

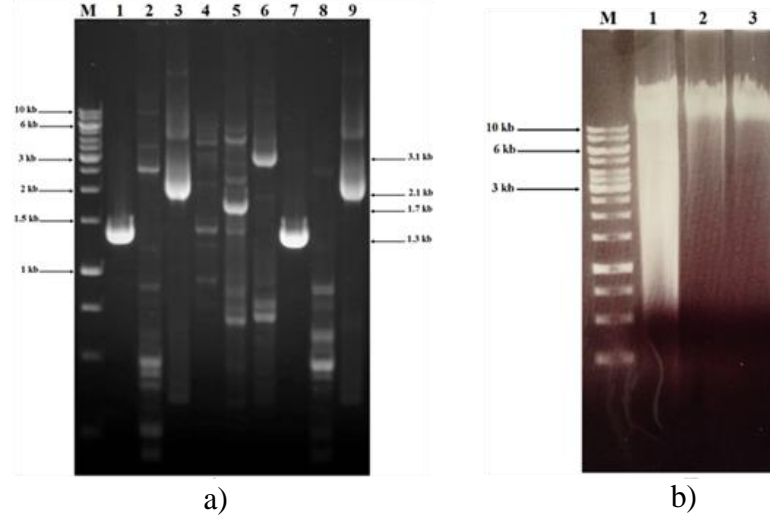
5.4.1. Mutasyonun PZR İle Doğrulanması

Çift rekombinasyon olayının meydana geldiği olası mutant suşların doğrulanması için PZR yapılmıştır. NA+Apr besiyerinde üreyip de NA+Apr+Kn besiyerinde üremeyen rastgele iki koloniden yapılan PCR sonucunda beklenen bant büyüklükleri (Tablo 5.1) elde edildiğinden (Şekil 5.5, a), bu iki suştan kromozomal DNA izole edilmiş (Şekil 5.5, b) ve Southern Blot hibridizasyon deneyleri için hazır hale getirilmiştir. Aynı basamaklar olası *S. coelicolor* A3(2) mutantları için de

yapılmış ama örnek olarak sadece M145 mutasyonunun doğrulanması için yapılan PZR sonuçları verilmiştir.

Tablo 5.1: PZR’da kullanılan primerler ve PZR sonucunda beklenen bant büyüklükleri.

Primer Çifti	Kullanıldıkları deney ve dizisi	Ürün boyları	
		Yaban suş	Rekombinant suş
F-ppk R-ppk	Yaban tipte <i>ppk</i> geninin çoğaltılması. Rekombinant suşlarda ise <i>ppk</i> geni yerine geçen <i>apr</i> geninin çoğaltılması.	3.1 kb	2.1 kb
F-ppk (prob) R-ppk (prob)	Yaban tipte <i>ppk</i> geninin içinden seçilen bölgenin çoğaltılması. Rekombinant suşlarda ise <i>ppk</i> geni olmayacağından ürün beklenmemektedir.	1.7 kb	-
F_apr R_apr	Rekombinant suşlarda <i>apr</i> genlerinin çoğaltılması. Yaban suшта ise <i>apr</i> geni olmayacağından ürün beklenmemektedir.	-	1.4 kb

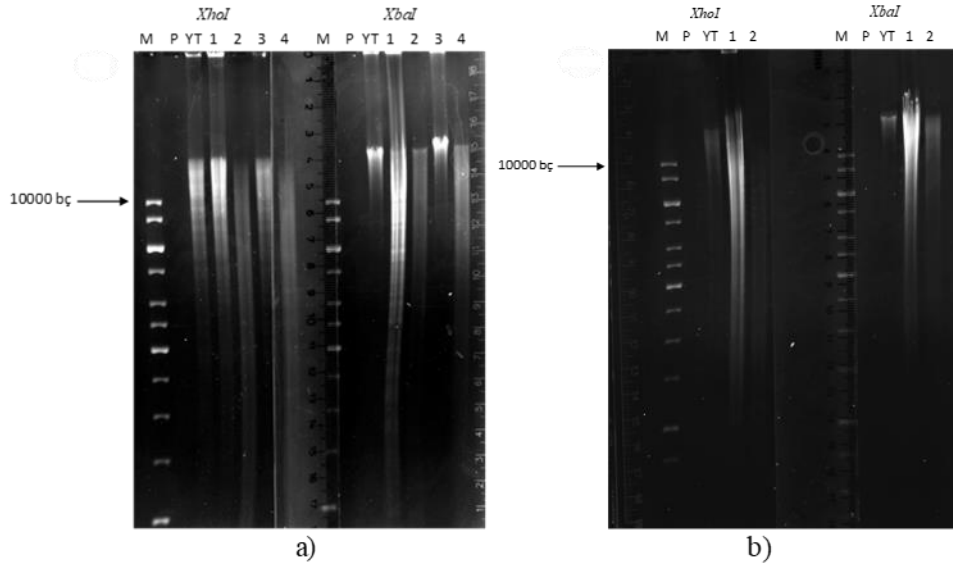


Şekil 5.5: Olası *S. coelicolor* M145 olası Δppk suşlarının PZR ile taranması. a) Apramisin ve *ppk* primerleri ile yapılan PZR sonuçları M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo), 1, 2, 3: 1 no'lu koloni için yapılan PZR sonuçları; 4, 5, 6: Yaban tip ile yapılan PZR 7, 8, 9: 2 no'lu koloni için yapılan PZR sonuçları b) M145 yaban tip ve olası mutant genomik DNA izolasyon sonuçları. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Thermo), 1: Yaban tip, 2: 1 no'lu koloni; 3: 2 no'lu koloni.

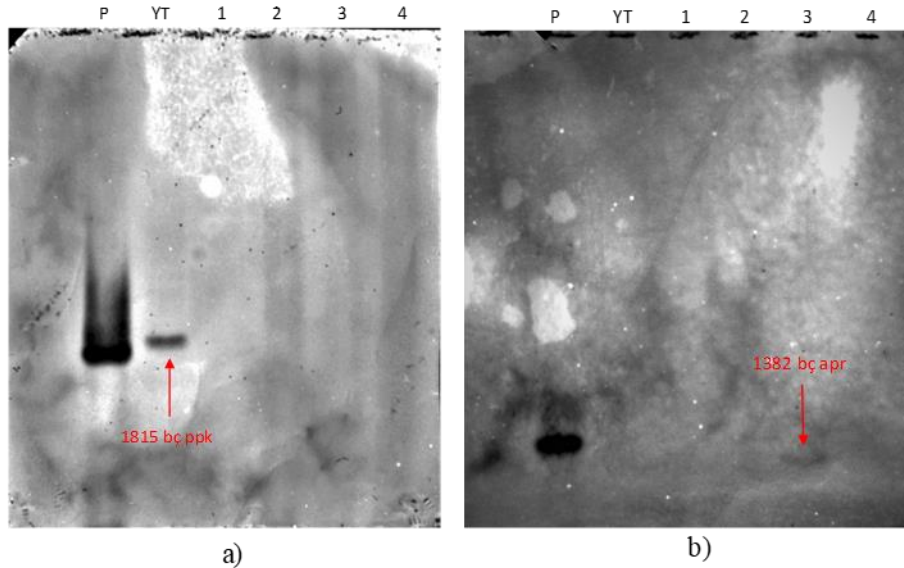
5.4.2 Mutasyonun Southern Blot Yöntemi ile Doğrulaması

PZR reaksiyonları ile doğrulanan olası *ppk* mutant suşlarından ve yaban tip *S. coelicolor* A3(2) ve M145 hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar, *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş ve gece boyunca yürütülmüştür (Şekil 5.6).

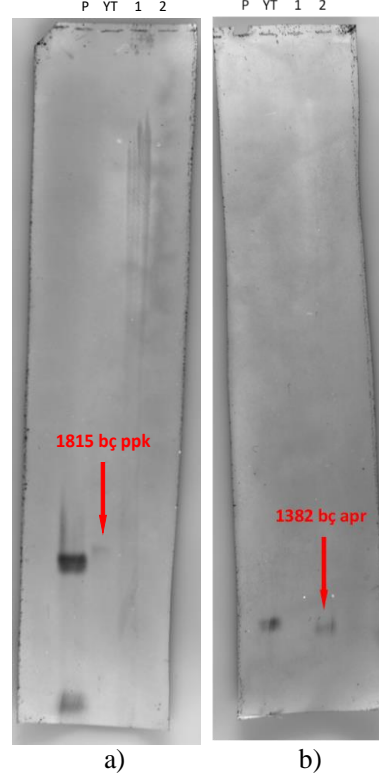
Kesilmiş DNA'lar, southern blot yöntemi ile naylon membrana aktarılmış, *ppk* ve *apr* problrarı kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirilmiş ve mutant suşlarda *ppk* geninin olmadığı onun yerine apramisin geninin bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 5.7, Şekil 5.8).



Şekil 5.6: Southern blotta kullanılmak üzere restriksiyon enzimlerle kesilerek hazırlanmış kromozomal DNA görüntüleri a) Farklı konsantrasyonlardaki M145 Mutant ve yaban tip DNA örneklerinin *XhoI* ve *XbaI* RE ile kesim görüntüleri. *XhoI* ile yapılan kesim için; P: *ppk* prop YT: yaban tip 1, 2, 3, 4: Olası Δppk mutantları. *XbaI* ile yapılan kesim için; P: *apr* prop YT: yaban tip 1, 2, 3, 4: Olası Δppk mutantları. b) Farklı konsantrasyonlardaki A3(2) olası mutant ve yaban tip DNA örneklerinin *XhoI* ve *XbaI* RE ile kesim görüntüleri. *XhoI* ile kesim için; P: *ppk* prob, YT: yaban tip, 1, 2: Olası Δppk mutantları. *XbaI* ile kesim için; P: *apr* prob, YT: yaban tip, 1, 2: Olası Δppk mutantları.



Şekil 5.7: M145 suşu için yapılan hibridizasyon sonuçları a) M145 Δppk mutant ve yaban tip genomik DNA'larının *ppk* prob ile hibridizasyonu. P: *ppk* prob, YT: yaban tip, 1, 2, 3, 4: Olası Δppk mutantları. b) M145 mutant ve yaban tip genomik DNA'larının *apr* prob ile hibridizasyonu. P: *apr* prob, YT: yaban tip, 3: *apr* bandı.

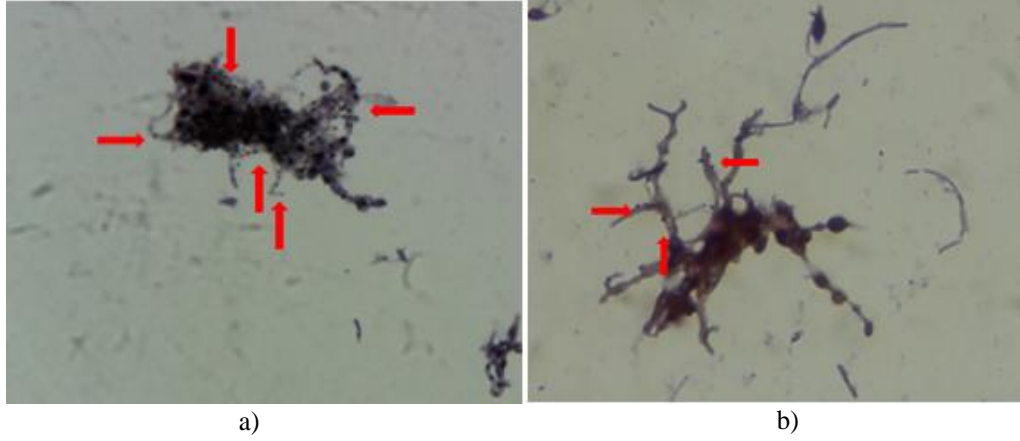


Şekil 5.8: A3(2) için yapılan hibridizasyon sonuçları a) A3(2) Δppk mutant ve yaban tip genomik DNA'larının *ppk* prob ile hibridizasyonu. P: *ppk* prob, YT: yaban tip, 1, 2: Olası Δppk mutantları. b) A3(2) Δppk mutant ve yaban tip genomik DNA'larının *apr* prob ile hibridizasyonu. P: *apr* prob, YT: yaban tip, 1, 2: Olası Δppk mutantları.

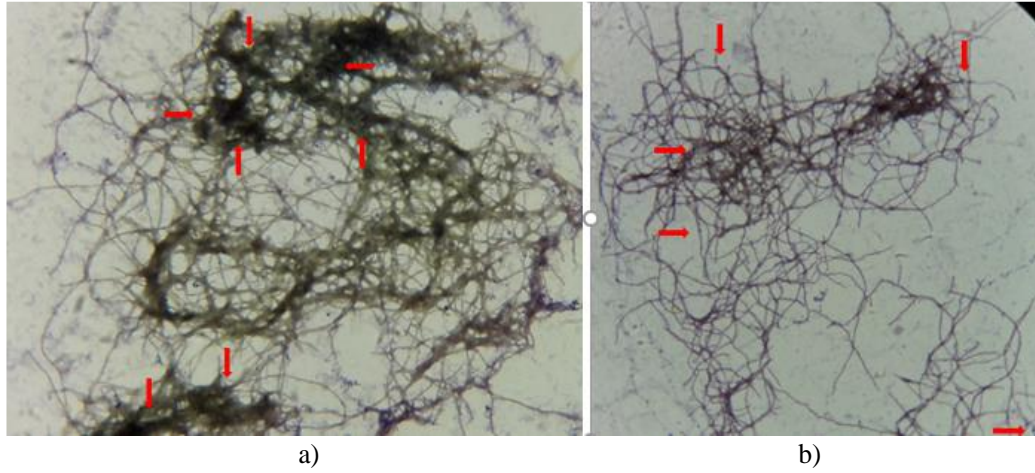
5.5. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşlarında PoliP'nin Neisser Boyama ile Gösterilmesi

ppk mutantları ve yaban tip hücrelerin poliP biriktirme karakterindeki değişimi gözlemek için neisser boyama metodunu kullanılmıştır. Bunun için bakteriler NBM ve R2YE besiyerlerine ekilmiş 72 saat sonra boyanmıştır.

Işık mikroskopu ile yapılan incelemelerde M145 Δppk ve A3(2) Δppk hücrelerinde poliP birikiminin yaban suşlara göre çok daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.9, Şekil 5.10).



Şekil 5.9: A3(2)'nin NBM besiyerinde 72. saatte elde edilen mikroskop görüntüleri. a) A3(2) yaban tip hücrelerinde biriken poliP miktarı b) *ppk* mutant hücrelerinde biriken poliP miktarı. Örnekler 100X mercekle gözlemlenmiştir.

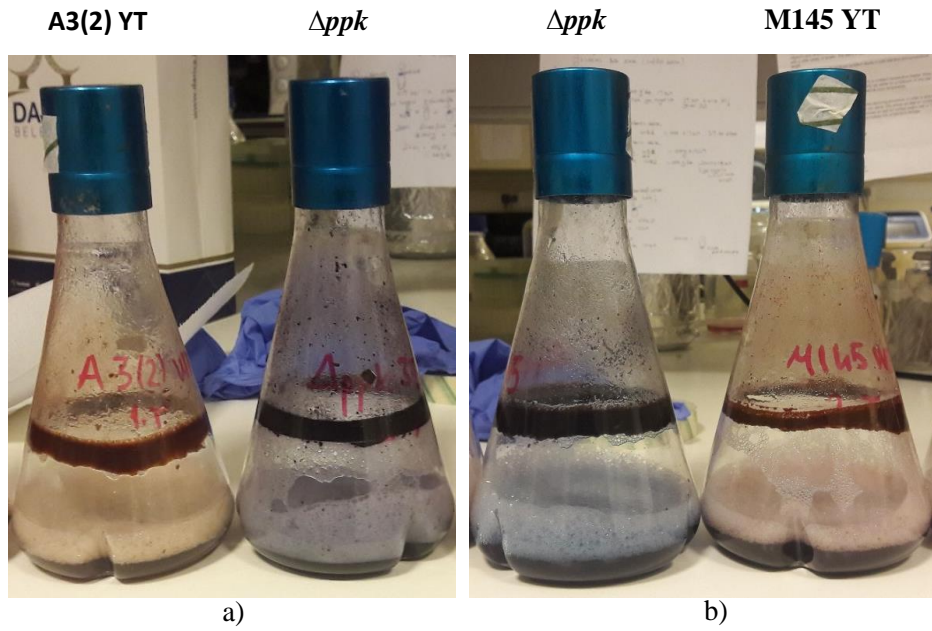


Şekil 5.10: M145'in NBM besiyerinde 72. saatte elde edilen mikroskop görüntüleri. a) M145 yaban tip hücrelerinde biriken poliP miktarı b) *ppk* mutant hücrelerinde biriken poliP miktarı. Örnekler 100X mercekle gözlemlenmiştir.

5.6. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşların MS ve R2YE Besiyerlerinde Üremesi

S. coelicolor M145 yaban tip ve A3(2) yaban tip suşları ile Δppk mutant suşlarının, hem antibiyotik üretimlerindeki farklarını daha iyi ayırtmak için hem de farklı besiyerlerindeki davranışlarını gözlemlemek için farklı katı ve sıvı besiyerlerine ekim yapıp genel karakteristik özellikleri incelenmiştir. Yaban tip ve mutant suşların R2YE sıvı besiyerinde 144 saatlik fermentasyon sonrasındaki

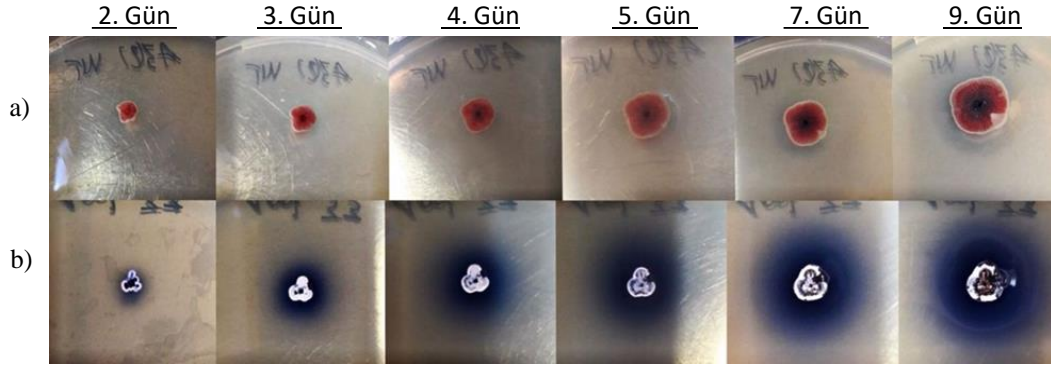
görüntüleri Şekil 5.16’da verilmiştir. Mutant suşların yaban suşlardan çok daha fazla antibiyotik ürettiği görülmektedir.



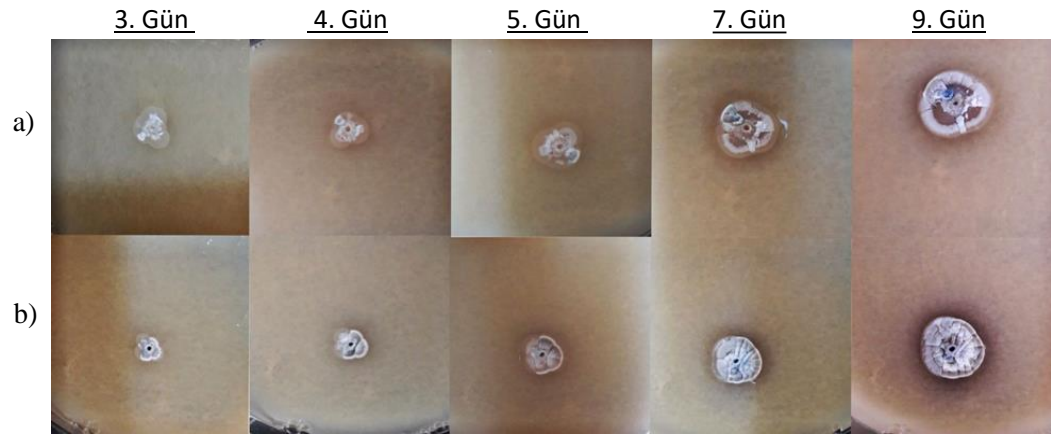
Şekil 5.11: a) A3(2) yaban tip ve Δppk mutant suşlarının R2YE’deki 144 saatlik fermentasyonu sonucu b) *S. coelicolor* M145 yaban tip ve Δppk mutant suşlarının R2YE’deki 144 saatlik fermentasyonu sonucu.

S. coelicolor M145 ve A3(2) yaban tip suşları ile Δppk mutant suşları R2YE ve MS+10mg/ml Ca^{2+} katı besiyerlerine ekilmiş ve 9 günlük inkübasyon boyunca fotoğraflanarak hem antibiyotik üretimi hem de sporlanma karakterleri incelenmiştir.

A3(2) yaban tip hücrelerinin R2YE’de sporlanmadığı ve antibiyotik üretiminin mutant A3(2) Δppk mutanta göre daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.12). MS besiyerinde ise A3(2) yaban tipin mutant göre daha geç sporlandığı ve antibiyotik üretiminin mutant suşa göre daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.13).

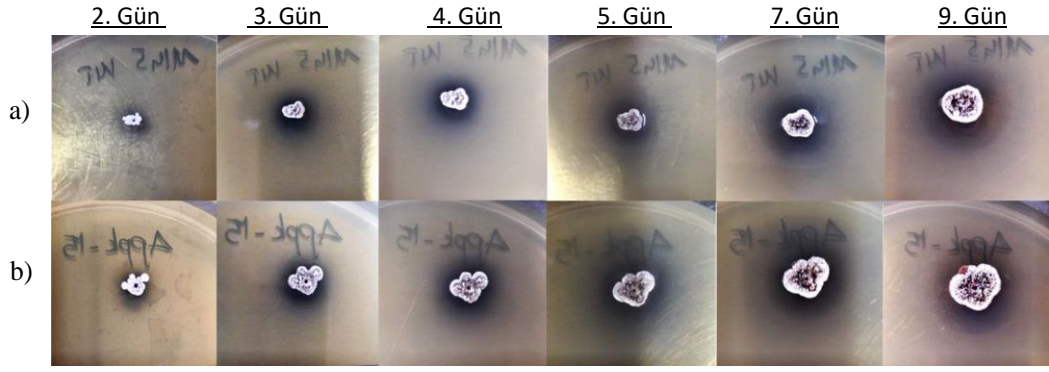


Şekil 5.12: R2YE katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon. a) A3(2) yabancı tip.
b) A3(2) Δppk mutant.

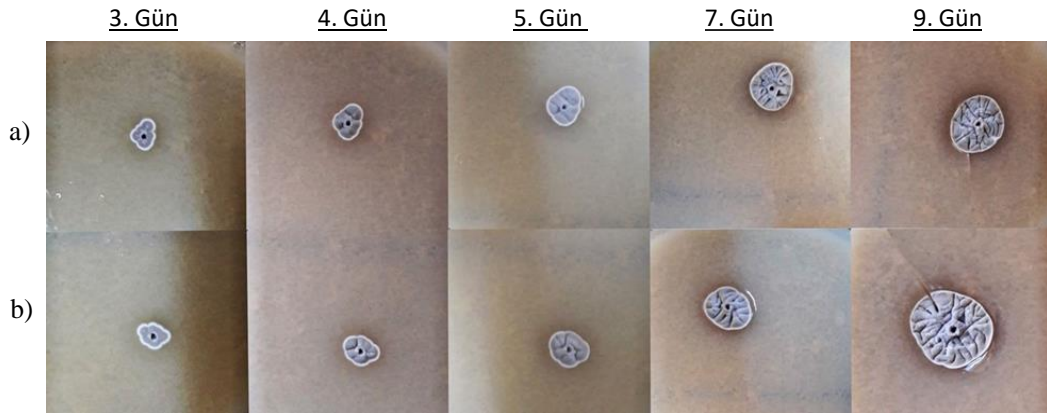


Şekil 5.13: MS katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon. a) A3(2) yabancı tip.
b) A3(2) Δppk mutant.

M145 yabancı tip ve mutant suşu hem R2YE’de hem de MS’de sporlanmıştır. Mutant ve M145 yabancı tip suşunun antibiyotik üretimlerinde gözle görülür derecede bir fark görülmemiştir (Şekil 5.14, Şekil 5.15).



Şekil 5.14: R2YE katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon. a) M145 yaban tip.
b) M145 Δppk mutant.



Şekil 5.15: MS katı besiyerindeki 9 günlük inkübasyon. a) M145 yaban tip.
b) M145 Δppk mutant.

5.7. Yaban Tip Mutant Suşların Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması

S. coelicolor M145 ve A3(2) yaban tip suşları ile Δppk mutant suşlarının, undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotiklerinin üretimlerindeki farkları görebilmek için besiyeri içeriği oldukça zengin olan R2YE sıvı besiyeri kullanılmıştır. 144 saat devam eden fermentasyon süresince farklı zaman aralıklarında örnekler alınmış, hücrelerin üremeleri ve antibiyotik ölçümleri karşılaştırılmıştır. Yaban tip ve mutant hücrelerinin üremelerinde çok büyük bir fark görülmemiştir (Şekil 5.16). Sadece A3(2) Δppk mutantının ilk 48 saatte yaban suşa göre daha az ürediği tespit edilmiştir. Bu fark fermentasyonun ilerleyen saatlerinde kapanmıştır.

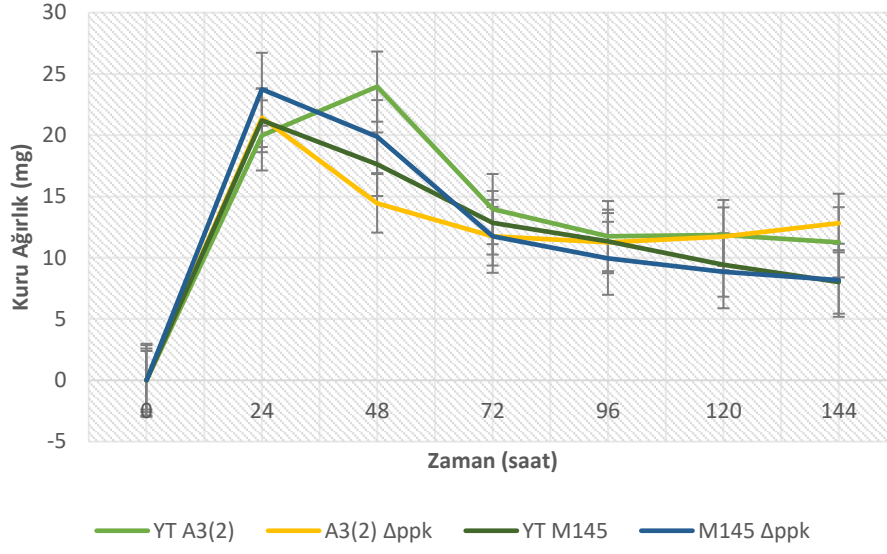
M145 yaban suşun aktinorhodin üretimi 120. saatte en yüksek değerine ulaşmış ve bu noktadan sonra aktinorhodin üretiminde az bir miktar azalma meydana gelmiş ve bu durum fermentasyonun son saatine kadar devam etmiştir. M145'in Δppk mutant suşun aktinorhodin üretimi ise 24. saatten itibaren artmaya başlamış, 48. ve 72. saatler arasında artış miktarında bir azalma meydana gelmişse de 72. saatten sonra yine artarak devam etmiştir. Fermentasyonu sonlandırdığımız 144. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır. 144. saatte Δppk mutant suşun yaban tip suştan yaklaşık 6 kat daha fazla aktinorhodin ürettiği gözlenmiştir (Şekil 5.17). Bütün fermentasyon değerlendirildiğinde ise yapılan iki uçlu t-testine göre M145 Δppk mutant suşun yaban tipten yaklaşık 2.5 kat daha fazla aktinorhodin ürettiği bulunmuştur (Şekil 5.17).

A3(2) yaban tip suşun aktinorhodin üretimi 96. saatte en yüksek değerine ulaşmış ve ilerleyen saatlerde aktinorhodin üretimi bu seviyeye yakın bir seyir izlemiş ve bu durum fermentasyonun son saatine kadar devam etmiştir. A3(2)'in Δppk mutant suşu ise en yüksek aktinorhodin antibiyotik üretim seviyesine 72. saatte ulaşmış, bu noktadan sonra üretim miktarında biraz azalma olmuştur. Fermentasyonu sonlandırdığımız 144. saatte mutant suşun yaban tipe göre yaklaşık 5 kat daha fazla aktinorhodin ürettiği tespit edilmiştir. Ancak bütün fermentasyon değerlendirildiğinde yapılan iki uçlu t-testine göre mutant suş yaban tipten yaklaşık 8.5 kat daha fazla aktinorhodin üretmiştir (Şekil 5.17).

Undesilprodigiosin spesifik üretim değerleri karşılaştırıldığında A3(2) yaban tip ve Δppk mutant suşlarının undesilprodigiosin üretiminde yapılan t-test (two-paired) sonuçlarına göre anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 5.18).

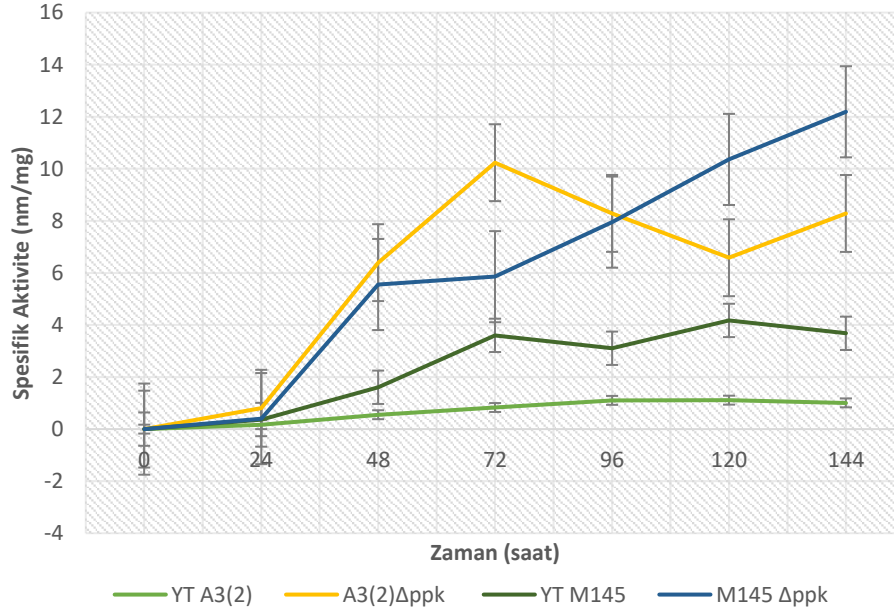
M145 yaban tipin en yüksek undesilprodigiosin üretim değerine 96. saatte ulaşmış olduğu, bu saatte mutant suştan yaklaşık 3 kat daha fazla undesilprodigiosin ürettiği görülmüştür. M145 Δppk mutant suşu ise en yüksek üretim değerine 72'nci saate ulaşmış ve bu saatten sonra undesilprodigiosin üretimi fermentasyonun sonuna kadar yatay bir seyir izlemiştir. M145 yaban tip ve Δppk mutant suşlarının undesilprodigiosin üretim değerleri ile yapılan t-test (two-paired) sonuçlarına göre M145 Δppk mutant suşun undesilprodigiosin üretiminde yaban tipe göre yaklaşık 2.5 kat bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.18).

BÜYÜME EĞRİSİ



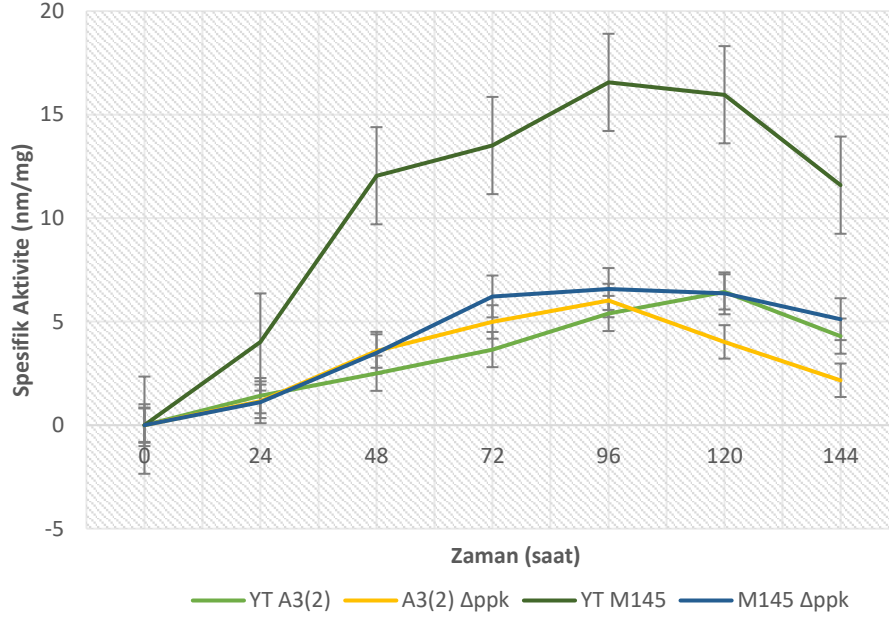
Şekil 5.16: *S. coelicolor* yaban tipi ve *S. coelicolor* Δppk suşlarının üreme eğrisi. 30°C'ta çalkalamalı 3 tekrarlı olarak 2 farklı zamanda fermentasyon deneyi yapıлып ortalamaları alınmıştır.

AKTİNORHODİN



Şekil 5.17: Mutant ve yaban tipi hücrelerin Aktinorhodin spesifik aktivitesi. 30°C'ta çalkalamalı 3 tekrarlı olarak 2 farklı zamanda fermentasyon deneyi yapıлып ortalamaları alınmıştır.

UNDESİLPRODİGİOSİN



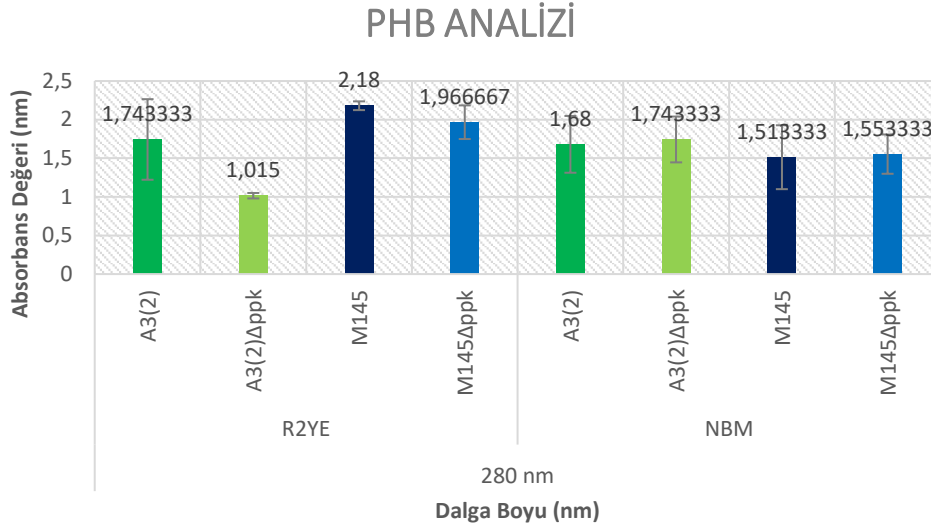
Şekil 5.18: Yaban tip ve mutant suşlarının spesifik Undesilprodigiosin spesifik aktivitesi. 30°C'ta çalkalamalı 3 tekrarlı olarak 2 farklı zamanda fermentasyon deneyi yapıp ortalamaları alınmıştır.

5.8. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşların PHB Üretimlerinin Karşılaştırılması

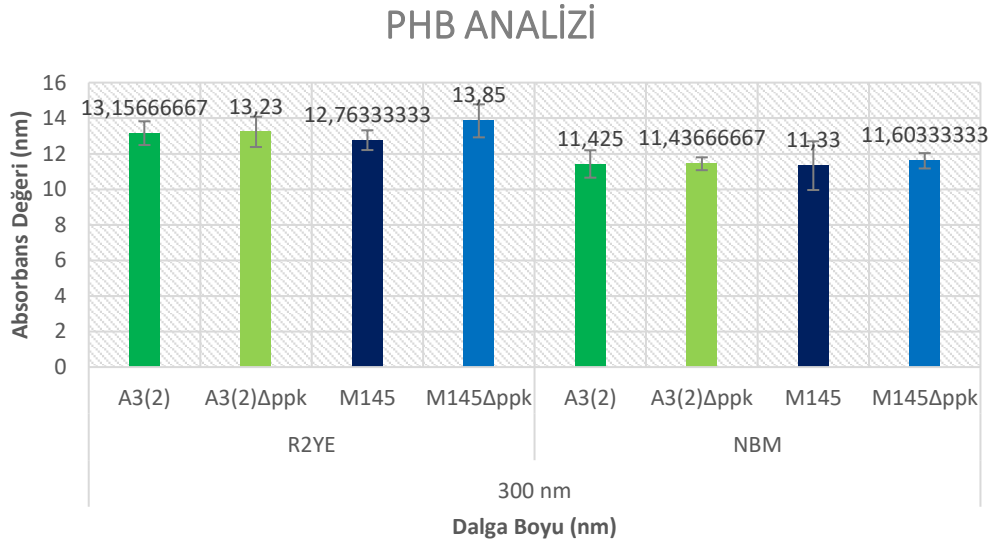
Streptomyces'lerin ürettiği PHB'nin antibiyotik üretimiyle ilişkisi olup olmadığı konusunda bilinen sadece birkaç yayın bulunmaktadır. PHB'nin degrades edilmesiyle elde edilen butyryl-CoA ve asetil-CoA'nın kloramfenikol ve makrolid ascomycin FK250 biyosentezinde öncül olarak kullanıldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [67], [68]. Verma ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla *S. coelicolor* M145'te aktinorhodin üretiminin artması ile birlikte hücre içinde PHB konsantrasyonunun düştüğünü gözlemiş ve PHB'nin degrades edilmesi ile elde edilen asetil-CoA'nın aktinorhodinin öncülü olarak kullanıldığını iddia etmiştir [60].

Aktinorhodin üretiminde önemli oranda artış görülen Δppk suşlarının PHB üretimlerinde bir farklılık olup olmadığını anlamak için, bütün suşlar R2YE ve NBM sıvı besiyelerinde büyütülmüş ve PHB üretimleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki ayrı dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümler

sonucunda yaban tip ve Δppk suşların PHB üretiminde t -test sonucuna göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.19; Şekil 5.20).



Şekil 5.19: *S. coelicolor* M145 yaban tip ve A3(2) yaban tip ve Δppk mutant hücrelerinin PHB üretimlerinin 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü.



Şekil 5.20: *S. coelicolor* M145 yaban tip ve A3(2) yaban tip ve Δppk mutant hücrelerinin PHB üretimlerinin 300 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü.

5.9. Yaban Tip ve Δppk Mutant Suşların Triaçilgliserol (TAG) Miktarlarının FTIR ile Ölçümleri

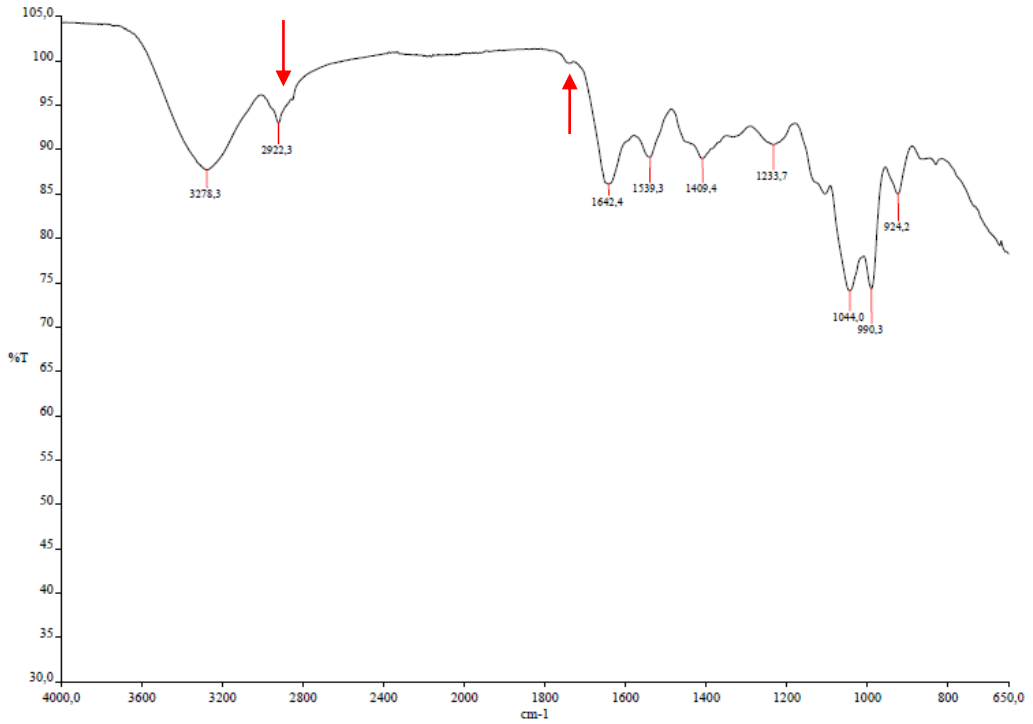
Esnault ve arkadaşları farklı seviyelerde aktinorhodin üreten suşların TAG birikimlerini ve antibiyotik üretim miktarlarını karşılaştırmıştır [61]. Zayıf bir antibiyotik üreticisi olan *S. lividans*'ın, glikolitik metabolizmanın göstergesi olan yüksek TAG içeriğine sahip olduğu, buna karşılık yüksek antibiyotik üreticisi *S. coelicolor* M145'in ise polifosfat (PoliP) depolarını aktif olarak tükettiği ve son derece yüksek ATP / ADP oranına ve düşük TAG içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında mutant suşların TAG miktarlarındaki değişimlerin tespit edilmesi için bütün suşlar R2YE ve NBM besiyerlerinde 3 gün üretilmiş ve peletler liyofilize edilip toz haline getirilerek Fourier kızıl ötesi ışın dönüşüm spektroskopisinde (FTIR) 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasında taranmıştır. TAG'de bulunan yağ asitlerindeki CH_2 ve ester karbonilin spesifik bantlarına bakılmıştır. 2959 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandının yerleri incelenerek TAG miktarında meydana gelen değişimler gözlenmiştir (Şekil 5.23-5.30).

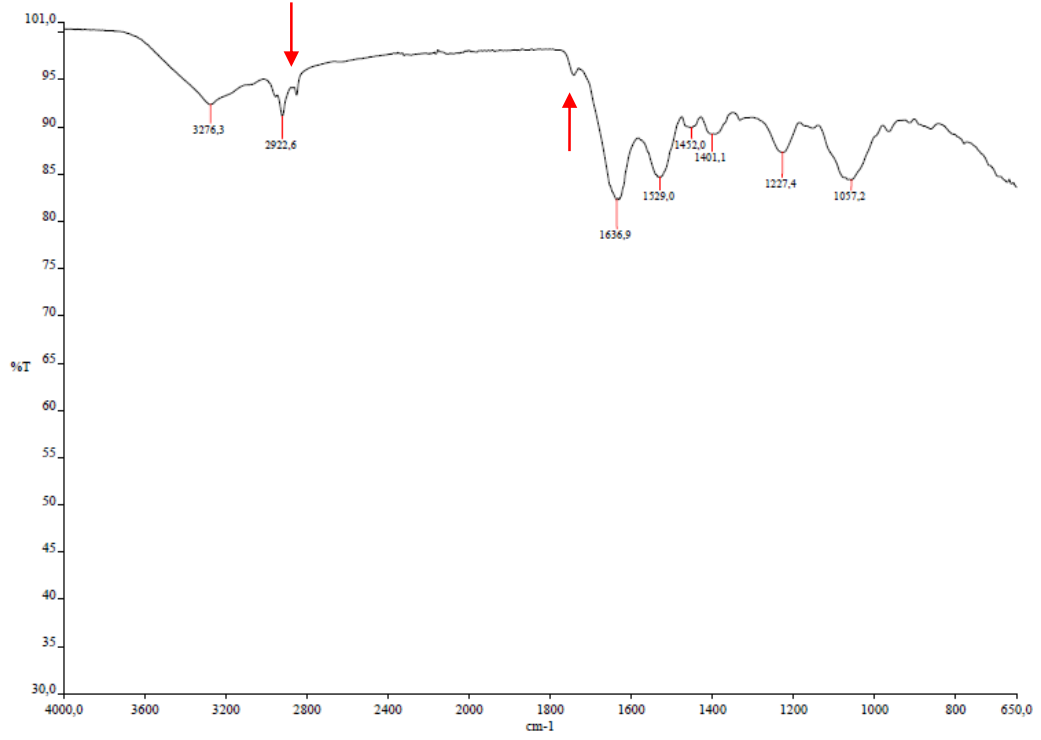
R2YE ve NBM besiyerlerinde büyütülen A3(2) Δppk mutant hücrelerinde yaban tipten farklı olarak söz konusu bantların görülmediği tespit edilmiştir. Benzer durum belirgin olmamakla beraber M145 Δppk mutant ve yaban tipte de gözlenmiştir.



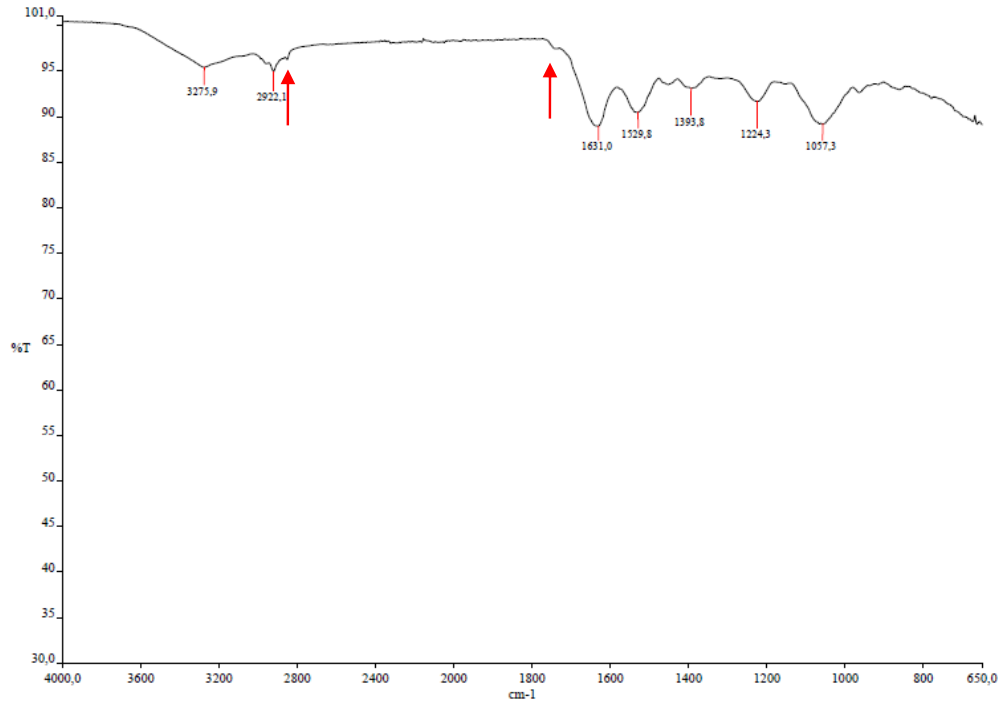
Şekil 5.21: R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) yabancı tip şuşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



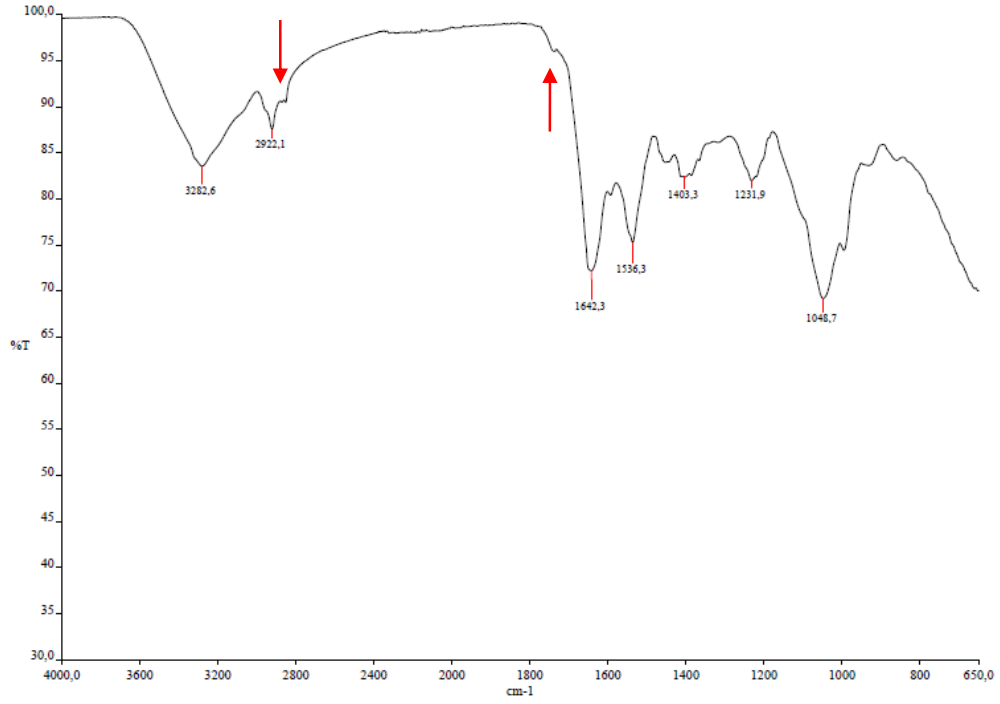
Şekil 5.22: R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) Δppk mutant şuşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



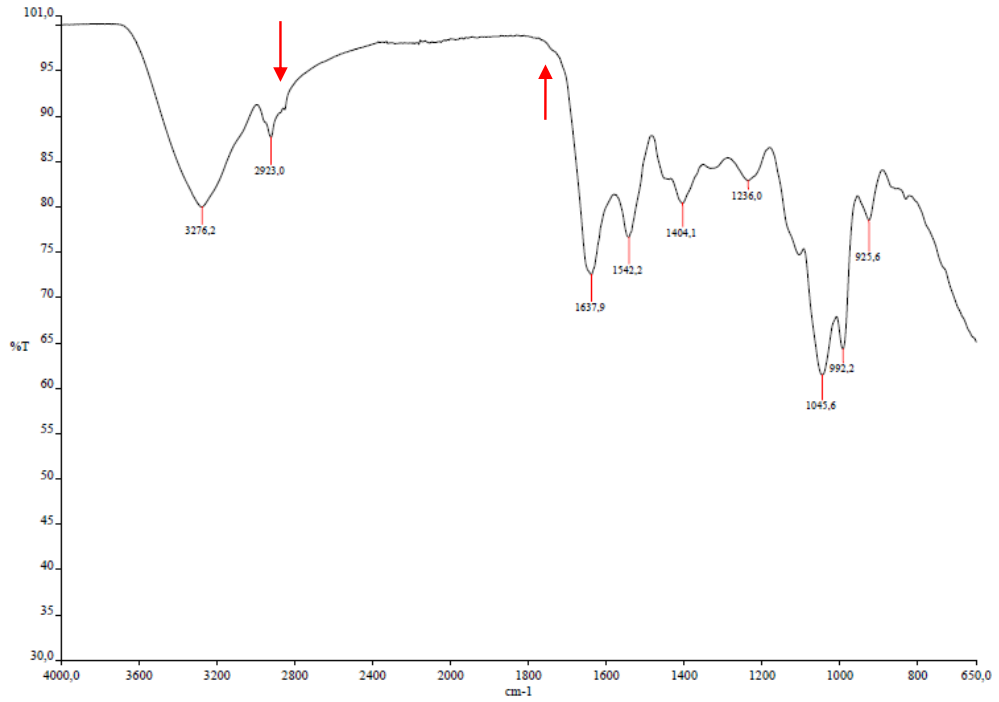
Şekil 5.23: NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm⁻¹ arasında yer alan C-H ve 1740 cm⁻¹ yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



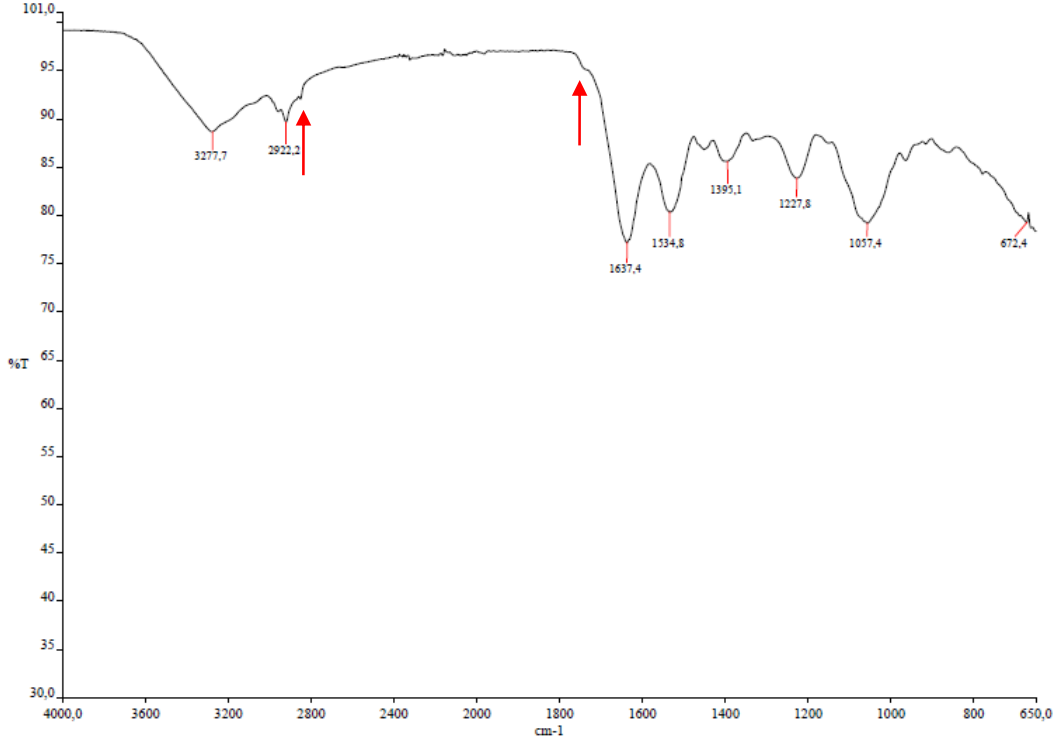
Şekil 5.24: NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen A3(2) Δppk mutant suşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm⁻¹ arasında yer alan C-H ve 1740 cm⁻¹ yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



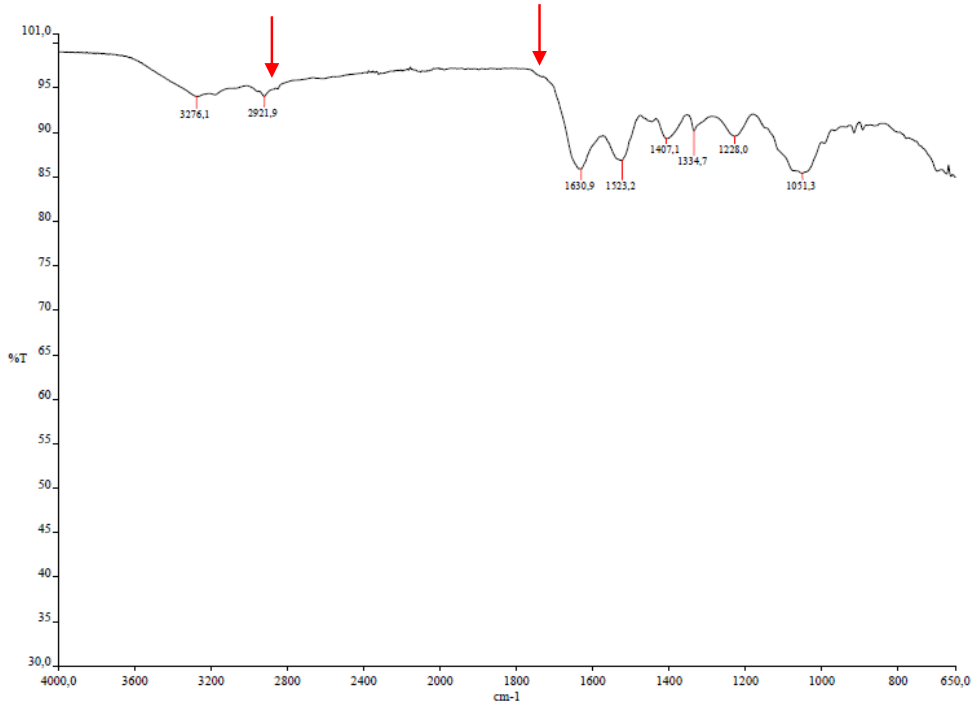
Şekil 5.25: R2YE besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 yabancı tip suşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



Şekil 5.26: R2YE besiyerinde inkübe edilen M145 Δppk mutant hücresinin FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



Şekil 5.27: NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 yaban tip suşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.



Şekil 5.28: NBM besiyerinde 72 saat inkübe edilen M145 Δppk mutant suşunun FTIR analiz sonucu. Oklar 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H ve 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C = O ester germe bandını göstermektedir.

6. SONUÇ

Bakterilerden yüksek ökaryotlara kadar bütün organizmalarda bulunan polifosfatın (poliP) hücre içerisinde çok önemli görevleri bulunmaktadır. Enerji ve fosfat kaynağı olmasının yanında poliP'nin enzim aktivitelerini düzenlediği, çok sayıda genin kontrolünde görev aldığı, bakterilerde virülans ve biyofilm oluşumunu etkilediği, ökaryotlarda, apoptoz, kan pıhtılaşması ve kemik gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir [1], [5], [16], [31]. Bütün bu rollerinin dışında poliP'nin bakterilerde ikincil metabolizmayı etkilediğini gösteren sınırlı sayıda çalışma da bulunmaktadır. Örneğin, Chouayekh ve Virolle hücre içinde polifosfat sentezinden sorumlu temel gen olan *ppk* genini sildiklerinde *S. lividans*'ın antibiyotik üretiminde artış görmüşlerdir [49]. Her ne kadar antibiyotik ölçümü yapmamış olsalar da, hücrenin katı kültürdeki davranışından ve oluşturduğu renk değişikliğinden PPK'nın antibiyotik üretimini negatif yönde etkilediğini iddia etmişlerdir. Bu negative etkinin sebebinin ise PPK tarafından sentezlenen poliP'nin degradasyonu sonucu oluşan Pi'nin antibiyotik üretim yollarını baskılaması sonucunda olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında *S. coelicolor*'ın antibiyotik üretme kapasiteleri birbirinden farklı olan A3(2) ve M145 suşlarında *ppk* geni silinmiş ve bu mutasyonun antibiyotik üretimine etkisi incelenmiştir. Öncelikle Std84 kozmidi üzerinde bulunan *S. coelicolor ppk* geninin, başlangıç ve bitiş bölgelerinin yukarısında ve aşağısında bulunan dizilerle homoloji gösteren apramisin kaseti ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. Rekombinasyon, λ RED (gam, bet, ex) rekombinasyon plazmidi pIJ790 kullanılarak yapılmıştır [63]. Elde edilen Δppk Std84 kozmidi *S. coelicolor* A3(2) ve *S. coelicolor* M145'e aktarılmış ve Δppk mutantları hem PZR hem de southern blot yöntemleri ile doğrulanmıştır. Δppk mutant suşlarında daha az poliP biriktiği Neisser boyama yöntemiyle gösterilmiştir.

Mutant suşların farklı besiyerlerinde üreme, sporlanma ve antibiyotik üretim profilleri incelenmiştir. A3(2) Δppk mutantının yaban tipten farklı olarak R2YE katı besiyerinde sporlanması dikkat çekmiştir. 144 saatlik fermentasyon sonucunda yapılan antibiyotik ölçümleri *S. coelicolor* A3(2) Δppk mutantının yaban tipten yaklaşık 8.5 kat daha fazla aktinorhodin ürettiğini ve undesilprodigosin üretiminde

yapılan t-test sonucunda anlamlı bir değişimin olmadığını göstermiştir. Bu sonuç Chouayekh ve Virolle'ün 2002 yılında *S. lividans* TK24 ile yaptıkları çalışmayla örtüşmektedir [49]. Hem *S. coelicolor* A3(2) Δ *ppk* hem de *S. lividans* TK24 Δ *ppk* suşlarında aktinorhodin biyosentezinde artış gözlenmiş, undesilprodigiosin üretimi ise bu mutasyondan etkilenmemiştir. Chouayekh ve Virolle fosfat kıtlığı durumunda aktinorhodin biyosentezini düzenleyen *actII-ORF4* geninin ifadesinin arttığını, *redD* geninin ifadesinde bir değişiklik olmadığını bulmuşlar, böylece mutasyonun transkripsiyonel düzeyde etki yaratarak antibiyotik üretimini etkilediğini göstermişlerdir [49]. Aktinorhodin üretimi fosfat ile düzenlenirken undesilprodigiosin üretiminin fosfat yokluğundan etkilenmediği görülmüştür. Aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretimlerinin farklı besin kaynaklarına göre farklı şekilde düzenlendiği daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir [51], [23].

S. coelicolor M145 Δ *ppk* mutantının ise aktinorhodin üretiminde yaklaşık 2.6 katlık bir artış gözlemlenmesine karşın undesilprodigiosin üretiminde yaklaşık 2.5 katlık bir düşüş gözlenmiştir. Undesilprodigiosin üretiminde düşüş görülmesi aktinorhodin ve undesilprodigiosin biyosentezlerinin farklı bir şekilde düzenlendiğini destekleyen sonuçlardır.

Yapılan antibiyotik ölçümlerinde M145 ve A3(2) yaban tip hücrelerinin antibiyotik üretimleri ve sporlanma karakterlerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Şekil 5.14'de görüldüğü gibi 144 saatlik inkübasyonun sonunda M145 yaban tip suş A3(2) yaban tip suştan yaklaşık 3 kat daha fazla antibiyotik üretmiştir. Ayrıca 144. saatte *S. coelicolor* M145 Δ *ppk* mutantının aktinorhodin üretim miktarının A3(2) yaban tip suştan yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Bunun yanı sıra M145 yaban tipin R2YE katı besiyerinde sporlanmasına karşın A3(2) yaban tip suşun sporlanmadığı görülmüştür. M145 ve A3(2) arasındaki sporlanma ve antibiyotik üretim farkının sebebi olarak M145 suşunun lineer SCP1 ve halkasal SCP2'den yoksun olması gösterilebilir. Çünkü SCP1 plazmidinin üzerinde antibiyotik üretimiyle doğrudan ilişkili olan sporlanma ve aerial hif oluşumunu kontrol eden *bldA* bağımlı TTA operonu ile *Wbl* ve *SapC*, D, E gibi antibiyotik üretimini etkileyen bazı genlerin olduğu bilinmektedir [58].

S. coelicolor A3(2) ve M145 yaban ve Δ *ppk* mutant suşlarında antibiyotik üretimde meydana gelen değişikliklerin moleküler sebeplerini aydınlatmak için hücrede antibiyotik sentezinden ve stres koşullarına verilecek cevapların

düzenlenmesinden sorumlu olan *relA* *spoT* gibi temel genlerin transkripsiyonel analizlerinin yapılması önem taşımaktadır. Bununla birlikte mutasyonun hücrede protein düzeyinde meydana getirdiği değişimlerin gözlenmesi için proteomik analizlerin yapılması polip metabolizması ile antibiyotik üretimi arasındaki ilişkiye ışık tutulması da yapılması gerekenler arasındadır.

Verma ve arkadaşları *S. coelicolor* M145 suşunda enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılan PHB'nin miktarının durağan faza kadar arttığını sonrasında aktinorhodin ve undesilprodigiosin üretiminin artışı ile azalmaya başladığını göstermişler ve antibiyotik üretiminde kullanılan acetyl-CoA'nın öncül kaynağının PHB olduğunu öne sürmüşlerdir [60]. Bunun için tez çalışması kapsamında yaban ve mutant suşların PHB miktarları karşılaştırılmıştır. Δppk mutant ve yaban tip suşlar besince zengin (R2YE) ve fakir (NBM) besiyerlerine ekilmiş ve 72 saatlik inkübasyon sonucu PHB miktarları ölçülmüştür. Suşların PHB miktarlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Çalışmamız kapsamında sadece üremenin 72. saatindeki PHB miktarlarına bakılmıştır. Daha sağlıklı veriler elde etmek için fermentasyon boyunca daha sık aralıklarla örnekler alınarak deney tekrar edildiğinde aktinorhodin üretimi ile PHB birikimi arasındaki ilişki daha iyi anlaşılacaktır.

Le Marechal ve arkadaşları yüksek antibiyotik üreticisi suşlarda TAG miktarının daha az olduğunu gözlemlemiş ve bunun temel sebebinin TAG'nin degradasyonu ile elde edilen acetyl-CoA'nın antibiyotik üretiminde kullanılması olduğunu ileri sürmüştür [59]. Esnault ve arkadaşları da *S. lividans* yaban tip, Δppk mutant ve M145 yaban tip suşlarının TAG miktarlarının tespitinde FTIR tekniğinin kullanılabileceğini göstermiştir [61]. Bu çalışma kapsamında TAG'de bulunan yağ asitlerindeki CH_2 'lerin gerilmesi ile elde edilen 2959 ve 2852 cm^{-1} arasında yer alan C-H bantlarının ve ester karbonilin 1740 cm^{-1} yakınında bulunan C=O ester germe bandının hücrede bulunan TAG'lerin miktarının belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. [61].

Tez kapsamında R2YE ve NBM besiyerlerinde 3 gün büyüttüğümüz *S. coelicolor* A3(2) ve M145 yaban tip ve Δppk suşlarının TAG miktarlarını karşılaştırmak için FTIR metodu kullanılmış ve Esnault ve arkadaşlarının (2017) aldığı sonucu destekleyen veriler elde edilmiştir. Özellikle R2YE besiyerinde

büyüyen A3(2) Δppk suşunda 2959, 2852 cm^{-1} ve 1740 cm^{-1} bantlarının kaybolduğu gözlenmiştir.

Besince fakir NBM besiyerinde büyüyen suşların TAG miktarlarına bakıldığında A3(2) Δppk suşunda 2853 cm^{-1} ve 1740 cm^{-1} bantlarının R2YE'deki kadar belirgin olmasa da azaldığı gözlenmiştir.

M145 yaban ve mutant tip suşları besince fakir NBM besiyerine ekilmiş ilgili bantların yaban tipte bile belirginliği az olduğundan sağlıklı bir değerlendirme yapılamamıştır.

Kısaca yapılan TAG ölçümlerine göre zengin besiyerinde daha fazla miktarda antibiyotik üreten hücrelerde TAG miktarının daha az olduğu görülmüştür. Ancak aynı deney besince fakir NBM'de yapıldığında benzer sonuçlar alınamamış ve TAG birikimi ile antibiyotik üretimi arasındaki ilişkinin besin ortamına göre değiştiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca TAG ve antibiyotik üretimi arasındaki ilişki arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için sadece 72. saat örnekleriyle yapılan ölçümlerin yeterli olmayabileceği hatta FTIR yerine TAG miktarının tayininde GS-MS gibi daha hassas metodların kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kısaca bu tez çalışması kapsamında *S. coelicolor* A3(2) ve M145 yaban tip Δppk suşları PZR tabanlı REDIRECT metodu kullanılarak oluşturulmuş ve mutasyon PZR ve southern blot yöntemleriyle ispatlanmıştır. Oluşturulan Δppk mutant suşların aktinorhodin üretiminde yaban tipte karşılaştırıldığında önemli bir artış gözlenmiştir. Yine bu çalışma kapsamında hücrede karbon kaynağı olarak kullanılan PHB ve TAG miktarları ile antibiyotik üretimi arasındaki ilişki incelenmiştir. PHB biriktirme kapasitelerinde mutant ve yaban suşlar arasında anlamlı bir fark bulunamamış ancak R2YE sıvı besiyerinde antibiyotik üretimi fazla olan mutant hücrelerdeki TAG miktarının yaban tipten daha az olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A., (2009), “Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival.” *Annual Review of Biochemistry*, 78,605–647.
- [2] Jiménez J., Bru S., Ribeiro M.P., Clotet J., (2016), “Polyphosphate: popping up from oblivion.”, *Current Genetics*, 63(1):15-18.
- [3] Kornberg, A., Rao N.N., Ault-Rich, D., (1999), “Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions.”, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 23,1–18
- [4] Babes V., (1895) “Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben-und Kapselbildung pathogener Bakerien.” *Zitschr f Hygiene* 20(1),412 437
- [5] Albi T., Serrano A., (2016), “Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer.”, *World J Microbiol Biotechnol.* 32(2), 27
- [6] Wang L., Yan J., Wise M.J., et al., (2018), “Distribution patterns of polyphosphate Metabolism Pathway and Its Relationships With Bacterial Durability and Virulence.”, *Frontiers in Microbiology*, 9, 782.
- [7] Brown M.R., Kornberg A., (2004), “Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16085–16087.
- [8] Zhang H., Gomez-Garcia M.R., Shi X., Rao N.N., Kornberg A., (2007), “Polyphosphate kinase1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42),16486–16491
- [9] Tzeng C.M., Kornberg A., (2000), “The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis.”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6),3977–3983
- [10] Brown M.R., Kornberg A., (2008), “The long and short of it polyphosphate, *ppk* and bacterial survival.”, *Trends in Biochemical Sciences* ,33(6),284–290
- [11] Fraley C.D., Rashid M.H., Lee S.S, Gottschalk R., Harrison J., Wood P.J., Brown M.R., Kornberg A., (2007), “A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104,3526 –3531

- [12] Rashid M.H., Rumbaugh K., Passador L., Davies D.G., Hamood A.N., Iglewski B.H., Kornberg A., (2000), "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(17), 9636–9641.
- [13] Sanyal S., Banerjee S.K., Banerjee R., Mukhopadhyay J., Kundu M., (2013), "Polyphosphate kinase 1, a central node in the stress response network of *Mycobacterium tuberculosis*, connects the two-component systems *MprAB* and *SenX3-RegX3* and the extracytoplasmic function sigma factor, sigma E.", Microbiology, 159(Pt 10), 2074–2086.
- [14] Zhang H., Ishige K., Kornberg A., (2002), "A polyphosphate kinase (*ppk2*) widely conserved in bacteria.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 16678–83
- [15] Ishige K., Noguchi T., (2000), "Inorganic polyphosphate kinase and adenylate kinase participate in the polyphosphate: AMP phosphotransferase activity of *Escherichia coli*.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(26), 14168–14171.
- [16] Kulakovskaya T., Kulaev I., (2013), "Enzymes of Inorganic polyphosphate Metabolism Biomedical Inorganic Polymers" In: E. Werner, G. Müller, Editors, "Progress in Molecular and Subcellular Biology."
- [17] Sureka K., Sanyal S., Basu J., Kundu M., (2009), "Polyphosphate kinase 2: a modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria.", Molecular Microbiology, 74, 1187–1197
- [18] Zhang H., Gomez-Garcia M.R., Brown M.R.W., Kornberg A., (2005), "Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 2731–35
- [19] Hothorn M., Neumann H., Lenherr E.D., Wehner M., Rybin V., Hassa P.O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A.G., Herrmann C., Scheffzek K., Mayer A., (2009), "Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase.", Science, 324, 513–516
- [20] Kulaev I.S., (1994), "Inorganic polyphosphate functions at various stages of cell evolution.", Journal of Biological Physics, 20, 255–273
- [21] Szymona M., (1957), "Utilization of inorganic polyphosphates for phosphorylation of glucose in *Mycobacterium phlei*.", Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biology, 1 5, 79–381

- [22] Kawai S., Mori S., Mukai T., Suzuki S., Yamada T., Hashimoto W., Murata K., (2000), "Inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase of *Micrococcus flavus* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276,57–63
- [23] Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., Oliver, S.G., (1989), "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 272-277.
- [24] Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A., Chavez F.P., (2010), "New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: a cellular and proteomic study.", *BioMed Central Microbiology* 10,7
- [25] Albi T., Serrano A., (2014), "Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*.", *Microbiology* 160(Pt 9),2067–2078.
- [26] Kuroda A., (2006), "A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation.", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70,325–331
- [27] Lichko L., Kulakovskaya T, Pestov N., Kulaev I., (2006), "Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes.", *Bioscience Reports*, 26:45–54
- [28] Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S., (2006), "Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*.", *Biochemistry (Moscow)*, 71,1171–1175
- [29] Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A., (2001), "The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15),8542–8547.
- [30] Andreeva N., Trilisenko L., Eldarov M., Kulakovskaya T., (2015), "Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities.", *PLOS ONE*, 10(3), e0119594
- [31] Kulakovskaya T.V., Vagabov V.M., Kulaev I.S., (2011), "Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook.", *Process Biochemistry*, 47, 1-10.
- [32] Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel, GP., (2016), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria.", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

- [33] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G. P., (2016), "An Introduction to Actinobacteria.", *Actinobacteria Dharumadurai Dhanasekaran*, IntechOpen, 6(9), 111-133
- [34] Urem M., Swiatek-Polatynska, M. A., Rigali S. & van Wezel G. P., (2016), "Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*.", *Molecular Microbiology* 102, 183–95
- [35] Hasani A., Kariminik A., Isaazadeh K., (2014), "Streptomyces: characteristics and their antimicrobial activities.", *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1), 63-75.
- [36] Jones S.E., Elliot M.A., (2017), "Streptomyces exploration: competition, volatile communication and new bacterial behaviours.", *Trends in Microbiology*, 26,3167–3170
- [37] Vionis A.P., Katsifas E.A., Karagouni A.D., (1998), "Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms.", *Antonie van Leeuwenhoek*,73, 103-115.
- [38] Bentley S. D., Chater K. F., (2002), "Complete genome sequence of the model actinomycete *S. coelicolor* A3(2)." *Nature*, 417(6885),141-7.
- [39] Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S., (2003), "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*.", *Nature Biotechnology*, 21, 526-531.
- [40] Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Haris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford, K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J. Hopwood D.A., (2002), "Complete genome sequence of the model actinomycete *S. coelicolor* A3(2).", *Nature*, 417, 141-147.
- [41] Onaka H., (2017), "Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes." *The Journal of Antibiotics*, (Tokyo) 70,865– 870
- [42] Pawlik K., Kotowska M., Kolesinski P., (2010), "*S. coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk.", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19,147–151.

- [43] Liu G., Chater K.F., Chandra G., Niu G., Tan H., (2013), “Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in Streptomyces”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 112–143.
- [44] O’Rourke S., Wietzorrek A., Fowler K., Corre C., Challis G.L., Chater K.F., (2009), “Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *S. coelicolor*.”. *Molecular Microbiology*, 71,763–778.
- [45] Hutchings M.I., Hoskisson P.A., Chandra G., Buttner M.J., (2004), “Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *S. coelicolor* A3(2).”, *Microbiology*, 150,2795–2806.
- [46] Martin J.F., Demain A.L., (1980), “Control of antibiotic biosynthesis.”, *Microbiological Reviews*, 44, 230-51.
- [47] Lorenzetti R., Lancini G. (1993). “Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites.” In: Editor G. Lancini and R. Lorenzetti, Plenum Publishing Corporation Company, New York. 236 pp.
- [48] Liras P., Asturias J.A., Martín J. F., (1990), “Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis.”, *Trends in Biotechnology*, 8(7),184-9.
- [49] Chouayekh H., Virolle M.J., (2002), “The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*.” *Molecular Microbiology*, 43,919–930.
- [50] Ghorbel S., Smirnov A., Chouayekh H., Sperandio B., Esnault C., Kormanec J., Virolle M.J., (2006), “Regulation of *ppk* expression and in vivo function of *ppk* in *Streptomyces lividans* TK24.”, *Journal of Bacteriology*. 188:6269–6276.
- [51] Lounes, A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P., (1996), “Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate.”, *Journal of Bacteriology*, 186.16.5197-5201.
- [52] Sambrook, J., MacCallum, P., Russell, D., (2000), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)”, In: Editors Irwin N., Janssen K.A., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [53] Gust B., Challis G. L., Fowler K., Kieser T., Chater K. F., (2003), “PCR targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4),1541-6.
- [54] Hopwood D., (1999), “Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico.”, *Microbiology*, 145(1), 2183-2202.
- [55] Sanders C., (2011), “*E. coli*: Sanders Lab Protocols.” 1–85.

- [56] Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood, D.A., (2000), "Practical *Streptomyces* genetics.", The John Innes Foundation, Norwich, England.
- [57] Gust B., Kieser T., Chater K.F. (2002), " PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2).", John Innes Centre, 3(2), 1-39. A., 100:1541–6.
- [58] Bentley S., et al., "SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Molecular Microbiolog*, 51(6),1615–28.
- [59] Le Marechal P., Decottignies P., Marchand C.H., Degrouard J., et al., (2013), "Comparative proteomic analysis of *Streptomyces lividans* wild-type and *ppk* mutant strains reveals the importance of storage lipids for antibiotic biosynthesis.", *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5907–5917.
- [60] Verma S., Bhatia Y., Valappil S.P., and Roy I., (2002), "A possible role of poly-3 hydroxybutyric acid in antibiotic production in *Streptomyces*.", *Archives of Microbiology*, 179, 66-9.
- [61] Esnault C., Dulermo T., Smirnov A., Askora A., David M., Deniset-Besseau A., Holland I.B., Virolle M.J., (2017), "Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145." *Scientific Reports*, 2017,7,200.
- [62] Jean-Luc P., and Philippe M., (2002), "Global Analysis of *Streptomyces*.", In Antoine Danchin Editor, Caister Academic Press Wymondham, UK 59-84.
- [63] Datsenko K.A., Wanner B.L., (2000.) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97,6640 – 6645.
- [64] Sola-Landa A., Moura R.S., Martin J.F., (2002), "The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6133–6138.
- [65] Cornelus, F. C., Bonting, G., Kortsee, J. J., Zehnder, J. B., (1991), "Properties of Polyphosphate: AMP Phosphotransferase of *Acinetobacter* Strain 210A", *Journal of Bacteriology* 173(20): 6484-6488.
- [66] Murray M.G., Thompson W.F., (1980), "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.", *Nucleic Acids Research.*", 4321–4325.
- [67] Ranade N., and Vining L.C., (1993), "Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*", *Canadian Journal of Microbiology*, 39:377-383.

- [68] Wu K., Chang L., Reville P.W., Katz L. ve Reeves C.D., (2000), "The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *Ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units.", *Gene*, 251: 81-90.
- [69] Wang Z., Crawford Don L., Anthony L. P, Rafii F, (1989), "Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem.", *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 535-543.
- [70] Yalın İ., (2010), "Polifosfat kinaz yoksunluğunun *streptomyces coelicolor*'da antibiyotik biyosentezine etkisi" Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [71] MacNeil, D. J. et al, (1992) "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector.", *Gene*, 111, 61-68.

ÖZGEÇMİŞ

Ğarip Demir, 1989 yılında Diyarbakır'da doğdu. 2016'da Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamlayıp, aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.