

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

STREPTOMYCES COELICOLOR'DA OLASI
POLİ- β -HİDROKSİBUTİRAT SENTAZ GENİ
(*phaC*) VE ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ

Zeynep DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE

GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

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

**STREPTOMYCES COELICOLOR'DA
OLASI POLİ- β -HİDROKSİBUTİRAT
SENTAZ GENİ (*phaC*) VE ANTİBİYOTİK
BİYOSENTEZİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Zeynep DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE
GENETİK ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu nun 31.08.2012 tarih ve 2012/20 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/06/12 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep DEMİR'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Sedat TUNCA GEDİK

ÜYE

: Doç. Dr. Meltem YEŞİLGİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: STREPTOMYCES COELICOLOR'DA OLASI POLİ-β-HİDROKSİBUTİRAT SENTAZ GENİ (*phaC*) VE ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ ARASINDAKİ İLİŞKİ.

YAZARIN ADI: ZEYNEP DEMİR

Poli-β-hidroksibutirik asit (PHB) bakteri hücrelerinde granüller halinde depolanan, geri dönüşümlü, suda çözünmeyen, toksik etki göstermeyen, biyoyoumlu ve termoplastik özellik gösteren bir polyesterdir. Endüstriyel önemi dışında PHB, hücre içinde önemli bir karbon ve enerji kaynağı olarak da görev yapar. Hücre zarlarına yapısal destek veren PHB, aynı zamanda sinyal iletiminde de önemli roller oynar.

Literatürde, PHB'nin antibiyotik üretiminde karbon kaynağı olarak görev yapabileceğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır. Bugüne kadar bilğimiz dahilinde PHB üretemeyen mutant suşlarda antibiyotik ölçümü gerçekleştirilmediğinden, bu polimerin antibiyotik biosentezi için sağladığı düşünülen karbonun önemli olup olmadığı bilinmemektedir. Bu konuya açıklık getirilmesi amacıyla, bu çalışmada, *S. coelicolor*'ın PHB sentezinden sorumlu PHA sentaz enzimini kodladığı düşünülen olası *phaC* geni 'PCR temelli' bir metod kullanılarak kromozomdan silinmiş ve PHB üretemeyen mutant suşta antibiyotik üretimi (aktinorhodin, undesilprodigiosin) ölçülmüştür. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, PHB'den sağlanan karbonun antibiyotik üretimi için oldukça önemli olduğunu göstermiştir.

SUMMARY

**TITLE OF THESIS: RELATION BETWEEN PUTATIVE POLY- β -
HYDROXYBUTYRATE SYNTHASE GENE (*phaC*) AND ANTIBIOTIC
BIOSYNTHESIS IN STREPTOMYCES COELICOLOR.**

AUTHOR: ZEYNEP DEMİR

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB), which is stored as granules inside bacterial cells, is a biodegradable, water insoluble, non-toxic, biocompatible and thermoplastic polyester. Other than industrial importance, PHB has an important role as carbon and energy source inside the cell. PHB not only support cell membrane structures but also has important roles in signal transduction.

In the literature, there are studies showing that PHB can function as carbon source for the production of antibiotics. According to our information no antibiotic measurement is carried out in PHB deficient mutant strains, so it is not known how important is the carbon source supplied from PHB for antibiotic biosynthesis. In order to clarify this point, a 'PCR-based' method was used to delete the putative *phaC* gene, encoding PHA synthase responsible for PHB biosynthesis, of *Streptomyces coelicolor* and antibiotic production by the mutant strain deficient in PHB production was measured. The results of this study show that carbon source supplied from PHB is rather important for antibiotic production.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgisini, anlayışını, gülümsemesini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, beni yönlendiren ve her zaman cesaretlendiren saygı değer hocam Doç. Dr. Sedef Tunca Gedik'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgisini ve önerilerini esirgemeyen yakın zamanda kaybettiğimiz merhum Prof. Dr. Füsun Gümüşel'e,

Bu süre zarfında bölümün imkanlarından faydalanmamızı sağlayan bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya,

Aynı laboratuvarı paylaştığımız sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. İnci Özdemir'e,

Yardım istemekten hiç bir zaman çekinmediğim, laboratuvar deneyimi kazanmamda büyük emeği geçen Arş. Gör. Tuğrul Doruk'a

Bir süre bana evini açan, tezimin başından sonuna kadar yardımlarıyla ve güler yüzüyle yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Girgin Ersoy'a,

Laboratuvarda çalışmayı eğlenceli hale getiren, deneylerimde her zaman yardımcı olan arkadaşlarım Aybike Yedekçi, Ceyda Ketenci, Şerif Yılmaz, Tuba Korkmaz, Zişan Asal Kılıç ve Uzman İrem Yalım Camcı'ya,

Son olarak, beni yetiştiren, eğitimimin her döneminde maddi manevi beni destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Streptomyces</i>	1
1.2. Poli- β -hidroksialkanatlar (PHA) ve Poli- β -hidroksi butirat (PHB)	4
1.3. Tez Çalışmasının Amacı	9
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	10
2.1. Gereçler	10
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	10
2.1.2. Kullanılan Enzimler	10
2.1.3. Kullanılan Kitler	11
2.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	11
2.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları	11
2.1.6. Kullanılan Kozmit ve Plazmitler	12
2.1.7. Kullanılan çözeltiler	14
2.1.8. Kullanılan Besiyerleri	17
2.1.9. Kullanılan Antibiyotikler	21
2.1.10. Kullanılan Cihazlar	22
2.2. Yöntemler	22
2.2.1. <i>E. coli</i> 'den Plazmit İzolasyonu	22
2.2.2. <i>E. coli</i> 'den Kozmit İzolasyonu	23
2.2.3. <i>S. coelicolor</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	24
2.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri	24
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	24
2.2.6. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması	25

2.2.7. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması	25
2.2.8. <i>S. coelicolor</i> St2H2 Kozmitinin <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması	27
2.2.9. St2H2 Kozmitini İçeren <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Mutasyon Kasetinin Aktarılması	28
2.2.10. Mutant Kozmitin Metilasyon Sistemi Olmayan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması	29
2.2.11. Mutant Kozmitin <i>S. coelicolor</i> 'a Konjugasyon ile Transferi	29
2.2.12. Southern Blot	30
2.2.12.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon	30
2.2.12.2. Prop DNA'larının Hazırlanması	31
2.2.13. Poli- β -hidroksibutirat'ın Spektrofotometrik Olarak Ölçümü	34
2.2.14. Poli- β -hidroksibutirat'ın (PHB) Sudan Siyahı ile Boyanması	34
2.2.15. Antibiyotik Ölçümleri	35
3. BULGULAR	36
3.1. <i>S. coelicolor</i> Genomunda Olası <i>phaC</i> geninin tespit edilmesi	36
3.2. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması	36
3.3. <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790'nun St2H2 Kozmiti ile Transformasyonu	38
3.4. St2H2 Kozmitini Taşıyan <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 Hücrelerine Mutasyon Kasetinin Aktarılması	38
3.5. Mutant Kozmitin <i>S. coelicolor</i> 'a Transferi ve <i>phaC</i> Mutantlarının Taranması	39
3.6. Mutasyonun Southern Blot ile İspatlanması	40
3.7. Yaban ve Mutant Suşların PHB Üretimlerinin Karşılaştırılması	42
3.7.1. Yaban ve Mutant Suşların Sudan Siyahı ile Boyanması	42
3.7.2. Yaban ve Mutant Suşların PHB Üretimlerinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi	43
3.8. Yaban ve Δ <i>phaC</i> suşlarının Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması	44
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
Amp	Ampisilin
Apr	Apramisin
ATP	Adenozin trifosfat
Bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
Chl	Kloramfenikol
CTAB	Setil trimetilamonyum bromid
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz I
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> endonükleaz V
EDTA	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
EtBr	Etidyum Bromid
FTIR	Fourier kızıl ötesi ışın dönüşüm spektroskopisi
GC	Gaz kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd endonükleaz III
H₂O₂	Hidrojen peroksit
K	Potasyum
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
K₂HPO₄	Potasyum fosfat dibazik
Kn	Kanamisin
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria-Bertani Broth
M	Molar
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Na₂OAc	Sodium Asetat

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHB	Poli- β -hidroksibütirat
Rpm	Dakika başına dönüş
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TES	N-[Tris-(hidroksimetil)-metil]-2-aminoetansülfonik acit
Tsr	Tiyostrepton
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i> endonükleaz I
XhoI	<i>Xanthomonas_ yasicola_</i> endonükleaz I
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
σ	Sigma

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Streptomyces</i> 'lerin hayat döngüsü.	1
1.2. <i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) tarafından üretilen antibiyotikler	3
1.3. Poli- β -hidroksibutirik asit'in genel formülü.	5
1.4. Poli- β -hidroksibutirik asit'in (PHB) biyosentezinde olası metabolik yollar.	7
1.5. Poli- β -hidroksibutirik asit'in (PHB) biyosentez yolu.	6
2.1. Moleküler DNA belirteçleri.	11
2.2. pIJ773 plazmiti	13
2.3. λ Red rekombinasyon plazmidini pIJ790.	14
2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılacak primerlerin tasarlanması.	26
2.5. Apramisin mutasyon kasetinin oluşturulması.	27
2.6. Agaroz jelden saflaştırılan 1369 bp'lik <i>aac(3)IV</i> 'ye ait PCR ürünü.	31
2.7. Agaroz jelden saflaştırılan 945 bp'lik <i>phaC</i> genine ait PCR ürünü.	32
2.8. <i>aac(3)IV</i> ve <i>phaC</i> proplarının kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.	33
3.1. 1382 bp'lik apramisin dirençlilik geni.	37
3.2. Agaroz jelden saflaştırılan mutasyon kaseti.	37
3.3. <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 hücrelerinden izole edilen St2H2 kozmiti.	38
3.4. Mutant kozmitin doğrulanması için yapılan PCR.	39
3.5. Mutasyonun Southern Blot ile ispatlanması.	40
3.6. <i>phaC</i> geninin prob olarak kullanıldığı Southern Blot sonucu.	41
3.7. Apramisin geninin prob olarak kullanıldığı Southern Blot sonucu.	42
3.8. Hücrelerin Sudan Siyahı ile boyanma sonuçları.	43
3.9. <i>S. coelicolor</i> ve <i>S. coelicolor</i> Δ <i>phaC</i> hücrelerinin PHB üretimlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi.	44
3.10. Yaban tip ve Δ <i>phaC</i> suşlarının fermentasyon sırasında, 96. saatte R2YE besiyerindeki renk farklılıkları.	45
3.11. <i>S. coelicolor</i> ve <i>S. coelicolor</i> Δ <i>phaC</i> suşlarının kuru ağırlıklarının karşılaştırılması.	45
3.12. <i>S. coelicolor</i> ve <i>S. coelicolor</i> Δ <i>phaC</i> suşlarının aktinorhodin üretimlerinin karşılaştırılması.	46

3.13. <i>S. coelicolor</i> ve <i>S. coelicolor</i> $\Delta phaC$ suşlarının undesilprodigiosin üretimlerinin karşılaştırılması.	46
---	----

TABLolar DİZİNİ

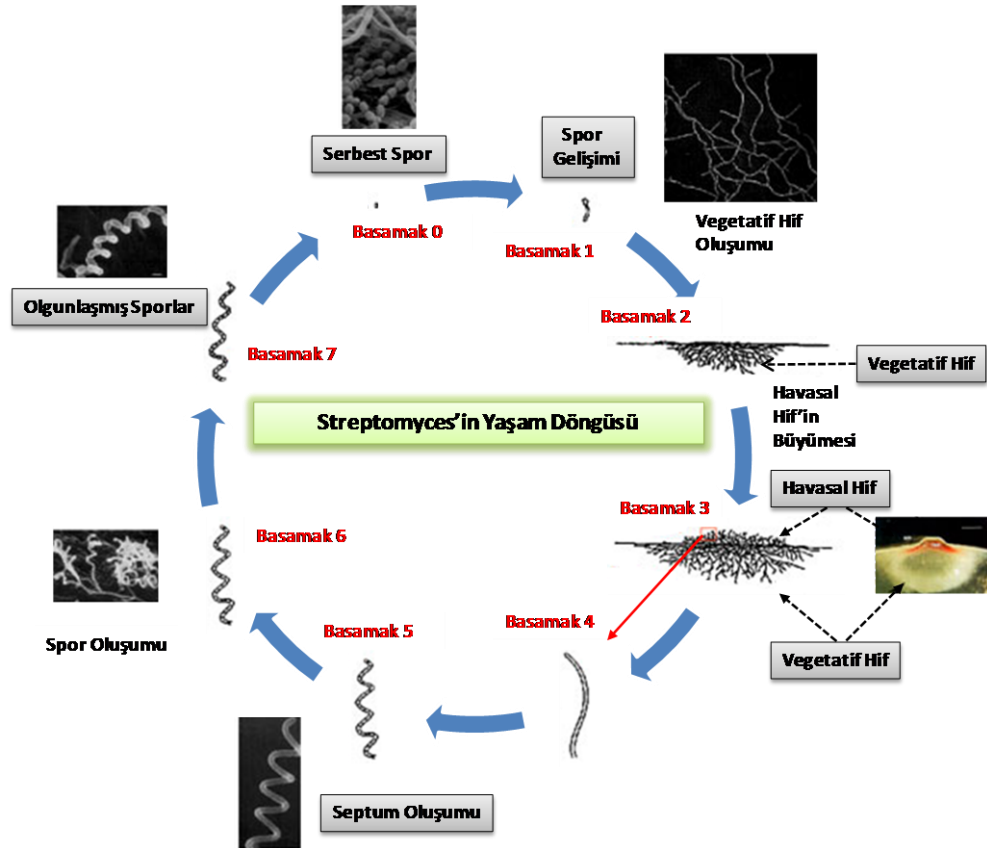
<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri soyları	12
2.2. Deneylerde kullanılan kozmit ve plazmitler	12
2.3. Kullanılan antibiyotikler	21
2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler	26
2.5. <i>aac(3)IV</i> geni ile uyumlu primerler.	31
2.6. <i>phaC</i> geniyle uyumlu primerler uygun primerler.	32

1.GİRİŞ

1.1. *Streptomyces*

Streptomyces'ler, actinomycetales ordosuna ait, toprakta yaşayan Gram pozitif filamentli bakterilerdir. Katı besiyerinde tam olarak bilinmeyen sinyallere tepki olarak substrat iplikçik kümeleri (substrate mycelium) septumlar oluşturarak havaya doğru uzayan spor zincirlerini meydana getirirler. Morfolojik değişim gösteren kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan bu grup bakteriler G+C oranı yüksek (%70-74) uzun lineer bir kromozoma (~8 Mb) sahiptir (Garrity, 2002).

Sıcaklık, pH, CO₂, O₂ ve nem gibi diğer çevresel faktörler topraktaki *Streptomyces*'lerin hayat döngüsünü etkiler (Vionis ve ark., 1998). Hayat döngüsü (Şekil 1.1), sporların çimlenme tüpünü oluşturmasıyla başlar ve daha sonra bu tüpten substrat misel olarak da adlandırılan vejetatif misellerin yayılması gerçekleşir.



Şekil 1.1. *Streptomyces*'lerin hayat döngüsü.

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

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

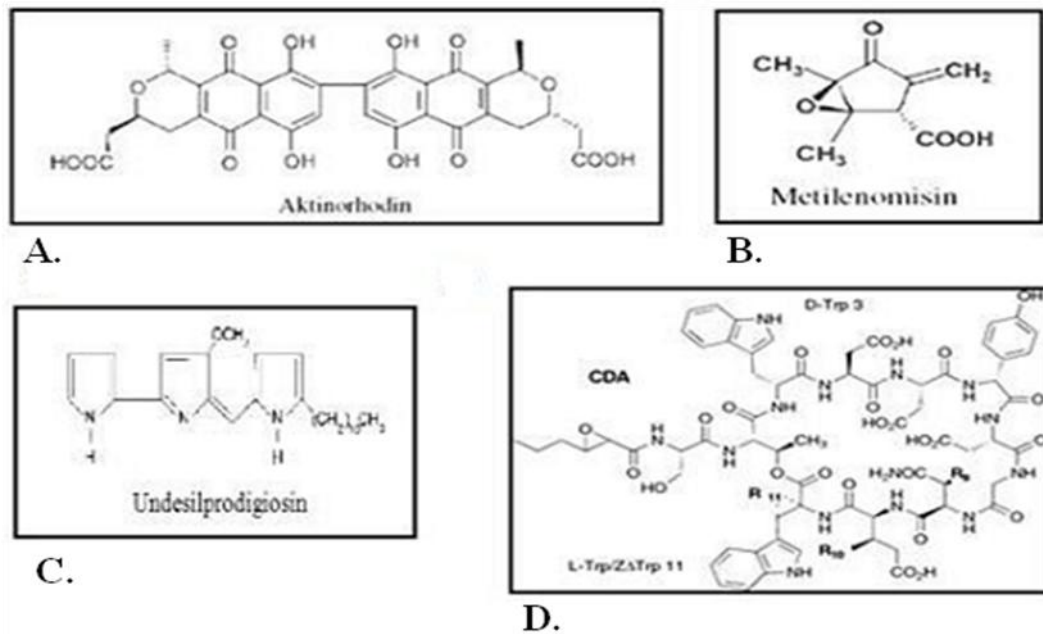
Endüstriyel açıdan oldukça önemli olan *Streptomyces*'ler çok geniş biyoaktivite aralığına sahip çeşitli sekonder metabolitleri yüksek oranda üretmektedirler. Bir çok antibiyotik çeşidi, antitümör ilacı olarak kullanılan adriyamisin, African river blindness hastalığının tedavisinde kullanılan ivermectin, immünosupresan siklosporin FK-506 ile rapamisin ve herbisid olarak kullanılan biyolofofos, bu sekonder yelpazesinin içinde yer alan ürünlere örnek olarak verilebilir (Champness ve Chater, 1994).

Streptomyces'ler, diğer ikincil metabolitlerin yanı sıra ticari antibiyotiklerin %75'ini üretmeleri açısından özellikle önemlidirler (Kieser ve ark, 2000). Antibiyotik üretimi, katı ortamda havasal miselyum gelişiminin sonlarında, sıvı ortamda ise durağan faza geçmeden hemen önce görülür (Bibb, 1996). Genellikle kromozom üzerinde toplu halde bulunan antibiyotik biyosentez genlerinin ifadeleri büyüme fazına bağlı olarak koordine edilirler (Kieser ve ark., 2000).

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

günümüze kadar yapılan çalışmalarda ise *S. coelicolor* A3(2) (Bentley ve ark., 2002) ve *S. avermitilis*'in (Ikeda ve ark., 2003) genom dizileri belirlenmiştir.

Kromozomunun büyüklüğü 8.667.507 bç olan ve anlamlı ürün verdiği tahmin edilen 7.825 geni bulunan *S. coelicolor*, genetik ve yapısal olarak birbiriyle ilişkili dört adet antibiyotik üretmektedir (Şekil 1.2). Mavi aktinorhodin (Act) biyosentetik yolağı (Malpartida ve Hopwood, 1986), kırmızı undesilprodigosin (Red) (Feitelson ve ark., 1985; Malpartida ve ark., 1990) ve kalsiyuma bağlı antibiyotik (CDA) (Chong ve ark.,1998) genleri kromozomda bulunurken, metilenomisin (Mmy) sentezinden sorumlu genler SCP1 plazmidi üzerinde bulunur (Chater ve Bruton, 1985).



Şekil 1.2. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) tarafından üretilen antibiyotikler (Kieser ve ark., 2000) A) Aktinorhodin; B) Metilenomisin; C) Undesilprodigosin; D) CDA.

Streptomyces'lerde, antibiyotik üretiminin nitrojen, fosfor ve karbon kaynaklarındaki azalmayla tetiklendiği bilinmektedir (Martin ve Demain, 1980). Hücredeki enerji eksikliğinin de antibiyotik biyosentezini tetikleyen bir faktör olabileceği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Martin ve ark., 1978; Lounes ve ark., 1996; Ghorbel ve ark., 2006).

Antibiyotik biyosentetik genlerinin ekspresyonunun kompleks düzenleyici mekanizmalar ile kontrol edildiği bilinmektedir. Bazı regülatör genleri, genellikle yolak spesifik olup antibiyotik gen kümelerinde biyosentez, sekresyon ve dirençlilik genleriyle birlikte bulunurken diğer regülatör genleri global düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır (Martin ve ark., 2010).

Yolak spesifik antibiyotik regülatör genlerinin çoğu, moleküler ağırlığı yaklaşık 25 kDa olan SARP (Streptomyces Antibiyotik Regülasyon Proteini) ailesine ait aktivatörleri kodlamaktadır (Wietzorrek ve ark., 1997). Örneğin, *S. coelicolor*'da, *act* (aktinorhodin) ve *red* (undesilprodigiosin) genlerinin ifadesi SARP grubuna ait olan sırasıyla ActII-ORF4 ve RedD spesifik transkripsiyonel aktivatörlerle düzenlenir (Martinez-Hackert ve Stock, 1997; Mizuno ve Tanaka, 1997; Santamarta ve ark., 2002). Mikroorganizmada, besiyerindeki fosfat, karbon ve nitrojen miktarlarının azalmasına cevap olarak bazı sinyal molekülleri üretilerek SARP kodlayan genlerin ekspresyonu başlatılmaktadır. *Streptomyces*'lerde γ -butirolakton yapılı 15 tane sinyal molekülü bulunmuştur (Martin ve ark., 2010).

Streptomyces'lerde ikincil metabolit biyosentezinin kontrolü iki bileşenli sistemler (two-component systems=TCSs) aracılığıyla da gerçekleşmektedir. PhoR-PhoP iki bileşenli sistemi, *Streptomyces*'lerde en iyi çalışılmış sistemlerden bir tanesidir (Martin, 2003; Martin, 2004; Martin, 2010). *Streptomyces*'lerde antibiyotik biyosentezinin regülasyonu için önemli olan bir diğer iki bileşenli sistem ise AbsA1-AbsA2 sistemidir (Martin, 2010). Bu iki bileşenli sistemin, *S. coelicolor*'ın ürettiği dört antibiyotik biyosentezini çok sıkı kontrol ettiği gösterilmiştir (Ryding ve ark., 2002).

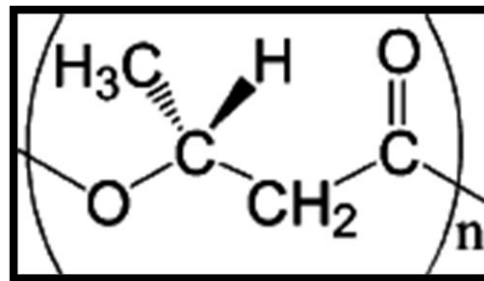
1.2. Poli- β -hidroksialkanatlar (PHA) ve Poli- β -hidroksi butirat (PHB)

Bakteriyel plastik veya biyoplastik de denilen ve petrokimyasal plastiklerin neden olduğu çevresel kirliliğe alternatif olarak ortaya çıkan poli- β -hidroksialkanatlar (PHA), geleneksel plastik potansiyeline sahip, mikrobiyal olarak üretilen polimerlerdir (Anderson ve ark., 1990). Bazı prokaryotlar tarafından hücre

içinde depolanan hidroksialkonik asit polyesterleri olan PHA'lar bakterilerde enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmaktadırlar (Pool ve ark., 1989).

PHA'lar geri dönüşümlü, suda çözünmeyen, toksik etki göstermeyen, biyoyumlu ve termoplastik özellik göstermeleri sebebiyle önemlidirler. Bu özellikleri sayesinde paketleme, ilaç, eczacılık, tarım ve gıda endüstrilerinde kullanılmaya uygundur (Anderson ve ark., 1990).

PHA'lar kısa zincir uzunluklu PHA'lar (C3-C5 hidroksiasit monomerleri) ve orta boy zincir uzunluklu PHA'lar (C6-C16 hidroksiasit monomerleri) olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Valappil ve ark., 2006). Kısa boy zincir uzunluklu alifatik bir polyester olan Poli-β-hidroksibutirik asit (PHB) (Maurice Lemoigne, 1920), yapısında kısa zincirli β-hidroksi yağ asitleri içeren ve tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan en önemli PHA'lardandır (Findlay ve ark., 1983). Yan zincirinde bir metil grubu bulunan PHB'in genel formülü $(C_4HO_2)_n$ şeklindedir (Şekil 1.3). "n" sayısının 35000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabildiği bilinmektedir (Nickerson ve ark., 1981).



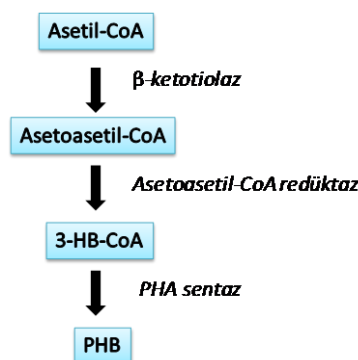
Şekil 1.3. Poli-β-hidroksibutirik asit'in genel formülü.

İlk kez, Lemoigne tarafından, 1920'li yıllarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde tanımlanan PHB'ye sonraki 30 yılda ilgi giderek artmıştır. 1958 yılında Macrae ve Wilkinson (1958), *Bacillus* hücresi içinde bu polimerin sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmayı aydınlatmışlardır. Termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu anlaşılan bu polimerin ilk endüstriyel üretimi 1970'li yıllarda gerçekleşmiş (Anderson ve ark., 1990) ve ilk ticari ürün BIOPOL adıyla patentlenmiştir (Lafferty ve ark., 1988).

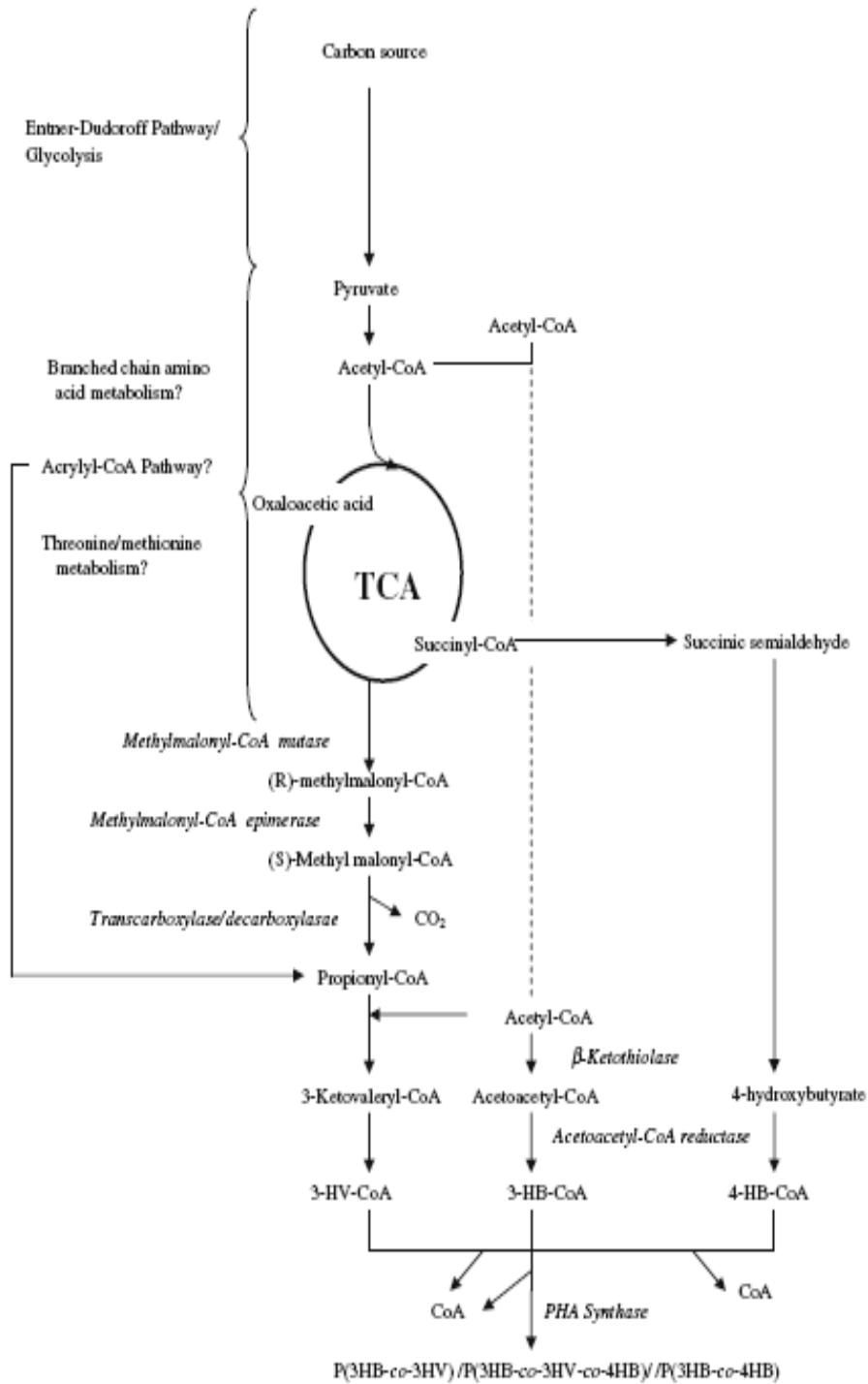
Hücrede bir redoks düzenleyicisi olan PHB (Anderson ve ark., 1990), bakteriyel hücrelerde faz kontrast veya elektron mikroskobu (EM) ile granüller halinde kolaylıkla gözlenebilir. PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (Dunlop ve ark., 1973). Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'ın erime sıcaklığı 157-188 °C olup, bu sıcaklık polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır (Dave ve ark., 1996).

PHB'ın hücrede teşhisi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde Gaz Kromatografisi ve FTIR spektroskopi yöntemleri kullanılabilir (Kansız ve ark., 2000, Misra ve ark., 2000, Yan ve ark., 2000). Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB granüllerinin tespit edilmesi için çoğunlukla lipofilik boyalar (Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III) kullanılmaktadır (Spiekermann ve ark., 1998; Yılmaz ve ark., 2003). Hücreden ayrıştırılan PHB, sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülmek suretiyle 235 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülerek spektrofotometrik olarak da tayin edilebilir (Law ve ark., 1960).

PHB, β -ketotiaz (*phaA*), asetoasetil-CoA redüktaz (*phaB*) ve PHA sentaz (*phaC*) tarafından katalizlenen 3 dizi reaksiyon sonucunda Asetil CoA'dan sentezlenmektedir (Şekil 1.4) (Anderson ve ark., 1990). Hücre içerisinde Asetil CoA'nın kaynağı farklı metabolik yollardan sağlanmaktadır (Şekil 1.5). *S. coelicolor*'da PHB biyosentez yolunda görevli bu üç enzimden iki tanesi (asetoasetil-CoA redüktaz ve β -ketotiaz) Packter ve Flatman (1983) tarafından tanımlanmıştır.



Şekil 1.4. Poli- β -hidroksibutirik asit'in (PHB) biyosentez yolu.



Şekil 1.5. Poli-β-hidroksibutirik asit'in (PHB) biyosentezinde olası metabolik yollar.

Yapılan araştırmalarda, bakterinin üremesi ve PHB birikimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, bakteri gelişiminin eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye

ulaşmaktadır (McCool ve ark., 1996). Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Lee, 1996). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Nickerson ve ark., 1981, Benoit ve ark., 1990). Bazı *Bacillus* türlerinde spor oluşumu için önemli olduğu gösterilen PHB'nin (Anderson ve ark., 1990) *Clostridium* sporlarının olgunlaşması için gerekli olan bileşiklerin sentezinde de karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Emeruwa ve Hawırko, 1973).

Ayrıca PHB'nin, nitrojen fiksasyonunda enerji kaynağı olarak görev yaparak *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* ile baklagiller arasındaki simbiyotik yaşamda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Anderson ve ark., 1990). Bu polimer, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin plazma membranlarında, ökaryotik membran fraksiyonlarında bulunmaktadır. Mitokondri ve mikrozoimler yüksek konsantrasyonlarda PHB içermektedir. Hücre zarlarında bulunan PHB, polifosfatlar ile birlikte hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun regülasyonunda ve kalsiyum sinyal iletiminde rol oynayabilmektedir (Anderson ve ark., 1990). *Methylobacterium extorquens* AM1 ile yapılan bir çalışmada, PHB üretemeyen mutant suşların bazı besiyerlerinde üreme kusurları gösterdikleri bulunmuştur (Korotkova ve ark., 2002).

PHB'nin antibiyotik üretiminde karbon kaynağı olarak görev yapabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. İlk kez Kannan ve arkadaşları (1970), PHB'nin *Streptomyces* türlerinde karbon kaynağı olarak kullanıldığını öne sürmüşlerdir. Daha sonra, PHB'nin, *Streptomyces venezuelae*'da kloramfenikol biyosentezinde primer metabolit olarak kullanılan asetil-CoA'nın minor kaynağı olabileceği gösterilmiştir (Ranade ve Vining, 1993). *Streptomyces hygroscopicus* ile yapılan başka bir çalışmada ise PHB'nin degradasyonu ile açığa çıkan butyryl-CoA'nın makrolid ascomycin FK250 üretiminde kullanıldığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2000). Verma ve arkadaşları (2002), *S. coelicolor* A3(2) M145'te aktinorhodin konsantrasyonunun artışına paralel olarak hücre içinde PHB konsantrasyonunun düştüğünü gözlemleyerek, bu polimerin antibiyotik üretiminde prekürsör kaynağı olarak görev yapabileceğini öne sürmüşlerdir (Verma ve ark., 2002). Bütün bu çalışmalarda, PHB'nin antibiyotik üretimi için karbon kaynağı sağladığı öne sürülse de bunun kesinleşmesi için PHB üretemeyen mutant suşlara ihtiyaç vardır. Bu tez

çalışmasında, *S. coelicolor* A3(2)'nin PHA sentaz enzimini kodlayan olası *phaC* geninin kromozomdan silinmesi ve PHB üretmemesi beklenen mutant suş ile yaban suşun antibiyotik üretimlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

1.3. Tez Çalışmasının Amacı

Literatürde, PHB'nin antibiyotik üretiminde karbon kaynağı olarak görev yapabileceğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır (Ranade ve Vining, 1993; Wu ve ark., 2000; Verma ve ark., 2002). Bugüne kadar bilgimiz dahilinde PHB üretemeyen mutant suşlarda antibiyotik ölçümü gerçekleştirilmediğinden, bu polimerin antibiyotik biyosentezi için sağladığı düşünülen karbonun ne kadar elzem olduğu/olmadığı bilinmemektedir. Bu konuya açıklık getirilmesi amacıyla, bu çalışmada, genetik olarak en iyi çalışılmış ve genom dizisi bilinen *S. coelicolor*'ın PHA sentaz enzimini kodlayan olası *phaC* geninin 'PCR temelli' bir metod kullanılarak silinmesi ve PHB üretemediği gösterilen mutant suşun antibiyotik üretiminin yaban suş ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

NaHCO₃ (Merck), CaCl₂ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), K₂SO₄(Merck), Tris (Merck), Dodesilsülfat (Merck), Triton X-100 (Sigma Aldrich), L-arabinoz (Merck), EDTA (Merck), Maleik asit (Merck), Pepton (Merck), MgCl₂6H₂O (Merck), Agaroz (Sigma Aldrich), Etidyum bromid (Sigma Aldrich), L-prolin (Applichem), Agar (Merck), NaOH (Merck), Sükröz (Merck), KOH (Merck), %87 Gliserol (Riedel de Haen), D (+) Glukoz (Merck), KH₂PO₄ (Merck), KCl (Riedel de Haen), PIPES (Fluka), NaCl (Sigma-Aldrich), Magnezyum sülfat heptahidrat (Fluka), Fenol (Riedel de Haen), Kloroform (Riedel de Haen), İzoamil alkol (Merck), 2-propanol (Merck), Asetik asit (Riedel de Haen), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Hidroklorik asit(Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), Metanol (Riedel de Haen), CTAB (Merck), Poli-β-Hidroksibütirat (Sigma Aldrich) TES Buffer (Applichem), Bacto kazamino asit (BD), Mannitol (Merck), Tween 20 (Merck), Sarkozil (Sigma Aldrich), Aseton (Riedel de Haen), Eter (Merck), Sülfürik Asit (Fluka)

2.1.2. Kullanılan Enzimler

Phusion DNA Polimeraz (Fynnzymes), *Taq* DNA polimeraz (Fermantas), *Pfx*® *Platinum* DNA Polimeraz (Invitrogen), *EcoRI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XhoI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *XbaI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *HindIII* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), *BamHI* Restriksiyon Endonükleaz (Fermantas), DNA ligaz (Jena Bioscience), Ribonükleaz A (Fermantas), Lizozim (Sigma), *KpnI* (Fermantas).

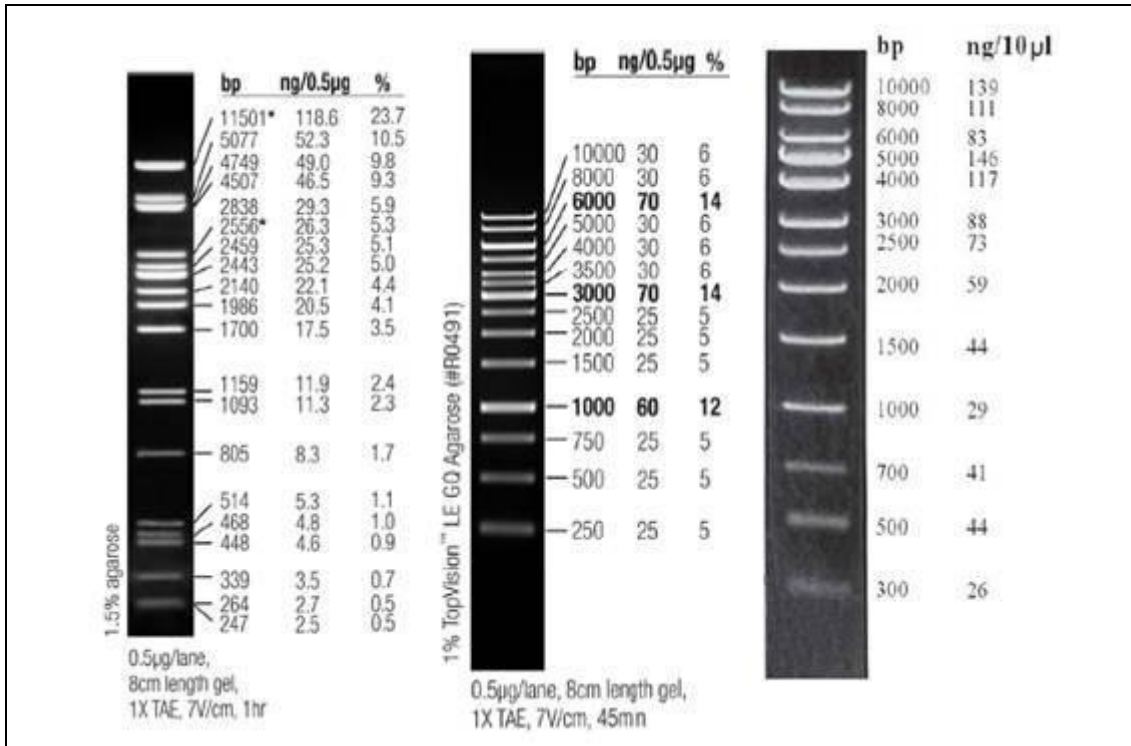
Enzim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği tamponlarda gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kitler

Gfx DNA ve jel saflaştırma kiti (GE Healthcare), DIG DNA işaretlemeve tespit kiti (Roche).

2.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

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



A.

B.

C.

Şekil 2.1. Moleküler DNA belirteçleri. A. Lambda DNA/*Pst*I belirteci (Fermentas).

B. 1 kb Moleküler DNA belirteci (Fermentas) C. 1 kb mavi DNA belirteci (Bioron)

2.1.5. Kullanılan Bakteri Soyları

Kullanılan bakteri soyları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri soyları

Bakteri türleri	Genotip	Kaynaklar
<i>E. coli</i> BW25113	<i>K12 derivative:</i> <i>ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i>	Datsenko ve Wanner, 2000
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	MacNeil ve ark., 1992
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	OriT- RP4 derivative	Kieser ve ark., 2000
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Prototrofik yaban tip	Hopwood ve ark., 1999
<i>S. coelicolor</i> Δ <i>phaC</i>	<i>phaC</i> geninden yoksun suş	Bu çalışma

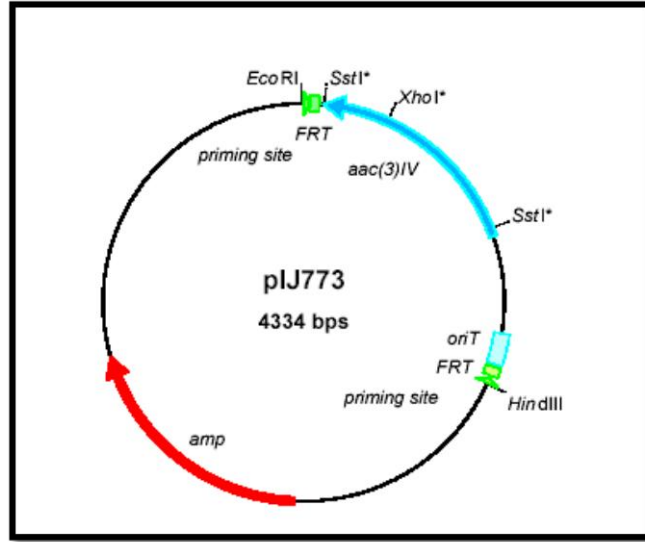
2.1.6. Kullanılan Kozmit ve Plazmitler

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

Tablo 2.2. Deneyleerde kullanılan kozmit ve plazmitler

Kozmit ve Plazmidler	Dirençlilik belirteci	Dirençlilik	<i>oriT</i>	Büyükük	Kaynaklar
St2H2	<i>neo, bla</i>	Kanamisin Ampisilin	-	43330bç	Sanger Enstitüsü
pIJ773	<i>aac(3)IV</i>	Apramisin	+	1382 bç	Gust ve ark., 2002
pIJ790	<i>cat, bla</i>	Kloramfenikol, Ampisilin	-	6084 bç	Gust ve ark., 2002
pUZ8002	<i>Neo</i>	Kanamisin	+	70 bç	Wang ve ark., 2001
pBluescript II SK (-)	<i>bla</i>	Ampisilin	-	3000 bç	Stratagene

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



Şekil 2.2. pIJ773 plazmiti

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

araC: arabinoz aktivatörünü kodlar.

bet: tek zincirli DNA'ya bağlanan proteini kodlar.

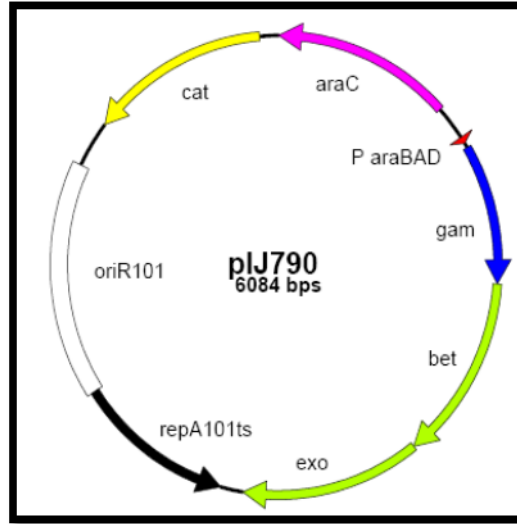
cat: kloramfenikol direnç geni.

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

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

P araBAD: L-arabinoz ile indüklenebilen promotor.

repA 101ts: sıcaklık duyarlı replikasyon orijini.



Şekil 2.3. λ Red rekombinasyon plazmidi pIJ790.

2.1.7. Kullanılan çözeltiler

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

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

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

Tris-EDTA (TE) Tamponu

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

20x SSC (pH 7)

- 3 M NaCl
- 0.3 M Sodyum sitrat

Solüsyon I

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

Solüsyon II

- 0.2 N NaOH
- % 1 SDS

Solüsyon III

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

Lizis Solüsyonu

- 0.3 N NaOH
- %2 SDS

CaCl₂ Solüsyonu

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

CTAB/NaCl Solüsyonu

- % 10 CTAB
- 0.7 M NaCl

Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)

- 0.1 M Maleik asit
- 5 M NaCl

Depürinizasyon Solüsyonu

- 0.25 M HCl

Denötralizasyon Solüsyonu

- 1.5 M NaCl
- 0.5 M NaOH

Nötralizasyon Solüsyonu

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

Pre-Hibridizasyon Solüsyonu

- 5x SSC
- % 1 Bloklama solüsyonu
- % 0.1 Sarkozil
- % 0.02 SDS

Hibridizasyon Solüsyonu

- Prehibridizasyon solüsyonu + DIG ile işaretlenmiş prob

Yıkama Tamponu I

- 2xSSC

- % 0.1 SDS

Yıkama Tamponu II

- % 0.1 SSC
- % 0.1 SDS

Belirleme (detection) Tamponu (pH 9.5)

- 0.1 M Tris-HCl
- 0.1 M NaCl

Yıkama Tamponu

- 30 ml Maleik asit tamponu
- 90 µl Tween 20

Bloklama Solüsyonu

- 0.5 g bloklama ajanı/ 50 ml maleik asit tamponu

Antikor Solüsyonu

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

Renk Oluşturan Substrat

- Deteksiyon tamponu içinde seyreltilen NBT/BCIP solüsyonu

2.1.8. Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani Besiyeri (LB)

- 10 g NaCl
- 10 g Tripton

- 5 g Maya özütü

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

2xYT Broth

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

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

Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME)

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

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

Otoklavlandıktan sonra;

- 5mM MgCl₂.6H₂O

- % 0.5 Glisin ilave edilir.

Tripton soya besiyeri (TSB)

- % 3 Oxoid Tripton Soya besiyeri

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

Mannitol Soya Unu Besiyeri (MS)

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

Çeşme suyu ile 1 lt'ye tamamlanır. Mannitol çeşme suyunda çözülür ve 2 g agar, 2 g soya unu içeren 250 ml'lik erlenlere 100'er ml olacak şekilde bölünür. İki defa 115 °C'ta 15 dk otoklavlanır (Gust ve ark., 2002).

SOB Besiyeri

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

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır. 5N NaOH ile pH 7'ye ayarlanır. Otoklavlandıktan sonra 2M MgCl₂'den 5 ml eklenir (Sambrook ve ark., 1989).

R2YE Besiyeri

- 103 g Sükroz
- 0.25 g K_2SO_4
- 10.12 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 10 g Glukoz
- 0.1 g Kazamino asit
- 22 g Agar (% 2.2)

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

- 2 ml KH_2PO_4 (% 0.5)
- 16 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (% 3.68)
- 3 ml L-prolin (% 20)
- 20 ml TES Tampon (% 5.73, pH 7.2)
- 0.4 ml iz element solüsyonu*
- 1 ml NaOH (1N)

***İz Element Solüsyonu**

- 40 mg $ZnCl_2$
- 200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
- 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

- 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- 10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
- 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

TBO Besiyeri (pH 6.5)

- 20 g Salça
- 20 g Yulaf
- 25 g Agar

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanır (Aparicio ve ark., 1999).

2.1.9. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kullanılan antibiyotikler

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

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

2.1.10. Kullanılan Cihazlar

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

2.2. Yöntemler

2.2.1. *E. coli*'den Plazmit İzolasyonu

E. coli'den plazmit izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemi ile yapılmıştır. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB'de 37 °C'ta 12-16 saat büyütülmüş kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pelet üzerine 200 µl solüsyon I (TEG) eklenmiş, vortekslenmiş ve ependorf tüpüne alınmıştır. 5 dk sonunda üzerine 400 µl Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dk'da bir karıştırılarak 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 5 dk buzda bekletildikten sonra 300 µl Solüsyon III eklenip, her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de, 4 °C'ta 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka bir tüpe alınarak, 0.6 hacim izopropanol eklenip, karıştırılmıştır. En az 15 dk kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 11000 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, pelet dH₂O'da çözülmüştür.

Solüsyon üzerine RNaz (10mg/ml) eklendikten sonra 1 saat 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Bu şekilde izole edilen plazmit, DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti ile (GE healthcare) saflaştırılmıştır.

2.2.2. *E. coli*'den Kozmit İzolasyonu

E. coli hücrelerinden St2H2 kozmitinin izolasyonu LiCl'ün kullandığı yöntem (Sambrook ve ark., 2001) ile yapılmıştır. Uygun antibiyotik içeren 100 ml LB'de 12-16 saat üretilen kültür, oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra pelet üzerine 5 ml Solüsyon I eklenmiş, vorteks yardımıyla karıştırılmış ve üzerine son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde lizozim eklenerek 10 dk buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 10 ml Solüsyon II eklenerek karıştırılmış ve her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda bekletilmiştir. 10 dk buzda bekletildikten sonra 7.5 ml Solüsyon III eklenip, her 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk boyunca buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de, 4 °C'ta 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant başka bir falkona steril gazlı bez yardımıyla süzülerek alınmış ve üzerine 12 ml izopropanol eklenip, karıştırılmıştır. En az 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 2 ml dH₂O'da çözülüp, üzerine 2ml 5M LiCl eklenerek 15 dk buz içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 4 °C'ta 4500rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra başka bir falkona alınan süpernatant üzerine 10 ml %100 EtOH eklenerek -20 °C'ta en az 2 saat bekletilmiştir. Üzerine son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde RNaz eklenerek 30 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. RNaz aşamasından sonra fenol kloroform:izoamilalkol (CIA) (25:24:1) ekstraksiyonu yapılmıştır. Üst faz yeni bir ependorfa alınarak bu işlem en az 3 kez tekrarlanmıştır. Üst faz alınarak üzerine eşit hacimde CIA (24:1) karışımı eklenip karıştırıldıktan sonra 11000 rpm'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edilerek fenolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Su fazındaki DNA, 3 hacim etanol ile -20 °C'ta 2 saat bekletilerek çöktürülmüştür. 4 °C'ta 14000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra pelet kurutulup dH₂O'da çözülmüştür.

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

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

50 ml besiyerine bu ön kültürden 1/10 oranında ekim yapılarak hücreler 48 saat 30 °C'ta inkübe edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 4500 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve 10 ml TE tamponunda çözülen peletin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Karışımın 1.7 ml'si steril bir tüpe ayrıldıktan sonra geri kalanı -20 °C'ta saklanmıştır. 1.7 ml karışımın üzerine 50 µl %20 SDS ve 50 µl (10mg/ml) RNaz eklendikten sonra, 37 °C'ta 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 300 µl 5 M NaCl ve 240 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'ta 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnek üzerine eşit hacimde CIA (24:1) solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında 11000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz fenol:CIA (25:24:1) solüsyonu ile muamele edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra ayrılan üst faz üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenerek 11000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Pelet %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve dH₂O'da çözülmüştür.

2.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

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

2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Nükleik asitlerin, elektroforez yöntemi ile agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılmaları sağlanmıştır. %0.8 veya %1' lik agaroz jeli, 1xTAE tamponu kullanılarak hazırlanmış ve son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr ilave

edilmiştir. DNA yükleme tamponu ilave edilen örnekler, agaroz jele yüklenerek, içinde yürütme tamponu olarak 1xTAE bulunan elektroforez tankında 80-120 Volt'ta yürütülmüşlerdir.

2.2.6. İzole Edilen DNA'nın Agaroz Jelden Geri Kazanılması

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

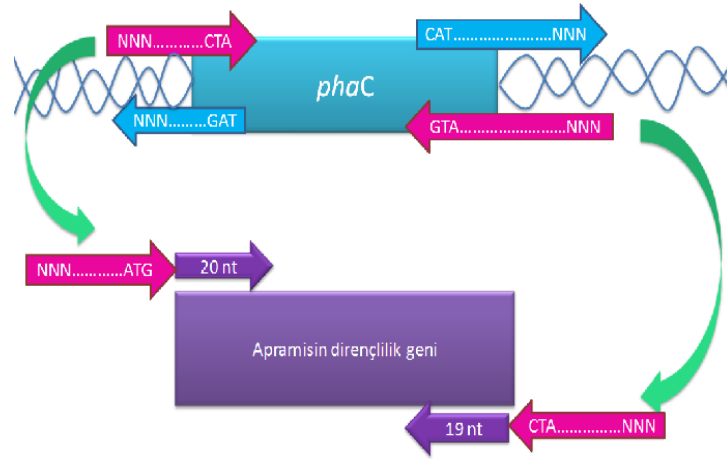
2.2.7. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması

phaC geninin blokasyonu için PCR temelli bir yöntem kullanılmıştır (Gust ve ark., 2003). Bu yöntemde, seçilen bir antibiyotik direnç geni *S. coelicolor phaC* geninin yerini almaktadır. Bu çalışmada, apramisin direnç geni belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında apramisin direnç genini (*aac(3)IV*) ve konjugasyon sırasında plazmitin mobilizasyonunu sağlayan *oriT* bölgesinin bulunduğu mutasyon kasetini taşıyan pIJ773 plazmidi kalıp (template) olarak kullanılmıştır.

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

PHA sentaz enzimini kodlayan *phaC* geninin delesyonu için HPLC ile saflaştırılmış uzun (59 ve 58 bp) primerler (Tablo 2.4) kullanılmıştır. Primerlerin 39 nükleotidlik kısmı, *S. coelicolor* genom dizisine (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) birebir uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. Geri primerin (reverse) 39 bazlık kısmı *phaC* geninin ön kısmındaki bölgeye uyumlu olup ATG başlangıç kodonuyla bitirilmiştir. Geri primerin 3' kısmı (20 bç'lik) ise apramisin kasetinin ön kısmına uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir.

Yine aynı şekilde ileri primerin (forward) 39 bazlık 5' kısmı *phaC* geninin alt kısmındaki bölgeyle uyumlu olacak şekilde ve CTA bitiş kodonuyla bitirilmiştir. İleri primerin 3' kısmı (19 bç'lik) ise apramisin kasetinin arka kısmına uyumlu olacak şekilde düzenlenmiştir (Şekil 2.4). Bu iki primer, *phaC* geninde, sadece ATG ve CTA kodonları kalacak şekilde bir delesyona sebep olacaktır (Tablo 2.4)



Şekil 2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılacak primerlerin tasarlanması.

Tablo 2.4. Mutasyon kasetinin hazırlanmasında kullanılan primerler

İleri Primer	5' CAT GGC GGC CCC GCG ACC TGA TCC GCC GGA CAG CGC CTA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3'
Geri Primer	5' ATG TCC CGA CGC GTG GCG AGG ACC ACA CTC CGA GGC ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC 3'

Kalıp olarak pIJ773'ten elde edilen apramisin direnç geni ve uzun primerler kullanılarak *Pfx* DNA polimeraz enzimi ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5). 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 2 dakika,
- primer bağlanması 62 °C'ta 45 saniye ve
- polimerizasyon 68 °C'ta 90 saniye olacak şekilde kurulmuştur.

Reaksiyon, 94 °C'ta 2 dakikalık bir denatürasyon işlemi ile başlamış ve 68 °C'ta 5 dakikalık ek bir polimerizasyon aşaması ile tamamlanmıştır.



Şekil 2.5. Apramisin mutasyon kasetinin oluşturulması.

2.2.8. *S. coelicolor* St2H2 Kozmitinin *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Aktarılması

pIJ790 plazmiti *E. coli* BW25113 içinde yer almaktadır ve bu plazmit kloramfenikol dirençlilik geni (*cat*) ve sıcaklığa duyarlı replikasyon orijini içermektedir. *E. coli* BW25113 kompetan hücreleri CaCl₂ yöntemiyle hazırlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Hücreler, kloramfenikol içeren 10 ml LB besiyerine ekilerek 30 °C'ta gece boyunca üretilmiştir. Kloramfenikol içeren 100 ml LB besiyerine bu ön kültürden 1/100 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda abzorbans değeri 0.4-0.6'ya ulaşana kadar 30 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. 2 santrifüj tüpüne eşit bir şekilde bölünen kültür, 5 dk buzda bekletildikten sonra 4 °C'ta 3000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Peletler 10'ar ml soğuk CaCl₂ solüsyonunda çözülmüş ve ardından 4 °C'ta 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 defa tekrar edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra peletler 1ml

soğuk CaCl_2 solüsyonunda çözülmüş ve soğuk ependorf tüplere dağıtılmıştır. Hücreler, sıvı azot içinde hızlı bir şekilde dondurularak $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kaldırılmışlardır.

phaC genini taşıyan St2H2 kozmiti, *E.coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). 50-80 ng arasında farklı konsantrasyonlarda St2H2 kozmiti, kompetan hücrelerle birleştirilerek bu karışım buzda 30 dk bekletilmiştir. Hücrelere, $42\text{ }^\circ\text{C}$ 'ta 45 sn ısı şoku uygulanmış ve ardından buzda 2 dk bekletilmiştir. Steril koşullarda üzerine 800 μl LB eklenen hücreler, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler, Amp (100 $\mu\text{g/ml}$) + Kn (50 $\mu\text{g/ml}$) + Chl (25 $\mu\text{g/ml}$) içeren LB katı besiyerlerine ekilerek $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'ta gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.9. St2H2 Kozmitini İçeren *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Mutasyon Kasetinin Aktarılması

St2H2 kozmitini içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 kompetan hücreleri Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre yukarıda (2.2.8) anlatıldığı gibi ön kültürden 1/100 oranında alınarak Amp (100 $\mu\text{g/ml}$), Kn (50 $\mu\text{g/ml}$), Chl (25 $\mu\text{g/ml}$) ve 10 mM L-arabinoz içeren 100 ml SOB-MgSO₄ besiyerinde abzorban değeri 0.4-0.6'ya gelinceye kadar üretilip, hazırlanmıştır.

Mutasyon kaseti, St2H2 kozmiti içeren *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine, yine 2.2.8 bölümde anlatılan yöntemle aktarılmıştır. *E. coli* BW25113 içerisinde mutasyon kaseti ile kozmit arasında çift rekombinasyon (double cross-over) olayının gerçekleşmesi pIJ790 plazmidinin görevidir. *phaC* geni ile apramisin kasetinin yer değiştirdiği kozmiti taşıyan transformanlar Apr (50 $\mu\text{g/ml}$) + Kn (50 $\mu\text{g/ml}$) + Amp (100 $\mu\text{g/ml}$) içeren LB agarda seçilmişlerdir. Elde edilen mutant kozmitin doğruluğu PCR reaksiyonu ile doğrulanmıştır.

2.2.10. Mutant Kozmitin Metilasyon Sistemi Olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması

CaCl₂ metodu (Sambrook ve ark., 1989) ile hazırlanan kompetan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri, *phaC* geni ile apramisin kasetinin yer değiştirdiği kozmit ile transform edilmiştir. Mutant kozmiti taşıyan transformanlar, Apr (50 µg/ml) ve Amp (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerlerinde seçilmişlerdir.

2.2.11. Mutant Kozmitin *S. coelicolor*'a Konjugasyon ile Transferi

Mutant kozmiti taşıyan *E. coli* ET12567/pUZ8002 ön kültüründen, Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) + Chl (25 µg/ml) içeren 55 ml LB besiyerine, 1/10 oranında ekim yapılmıştır. Hücreler, 600 nm dalga boyunda aborbans değeri 0.4'e ulaşana kadar 37 °C'ta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler iki kez antibiyotik içermeyen LB ile yıkanarak, 5 ml LB'de çözülmüştür. Bu sırada, her bir konjugasyon denemesi için 500µl 2xYT besiyerine 10⁸ sayıda *S. coelicolor* sporu ilave edilerek, sporlara 50 °C'ta 10 dk sıcaklık şoku uygulanmış ve sonrasında oda sıcaklığında soğumaya bırakılmışlardır. 0.5 ml *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri ile 0.5 ml *S. coelicolor* sporları karıştırılarak, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve sıvının büyük bir kısmı dökülerek, hücreler kalan ~50 µl sıvıda çözülmüştür. Hücrelerden, 10⁻¹-10⁻⁴ aralığında seri dilüsyonlar hazırlanarak, her dilüsyondan 100'er µl antibiyotik içermeyen MS + 10 mM MgCl₂ agar besiyerine ekilmiştir. 30 °C'ta 16-20 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerleri, besiyerindeki son konsantrasyon 25 µg/ml NA ve 50 µg/ml apramisin olacak şekilde antibiyotik içeren 1 ml dH₂O ile kaplanarak inkübasyona devam edilmiştir.

Konjugasyon sonucunda NA ve apramisin içeren MS besiyerinde üreyen hücreler arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği (apramisine dirençli, kanamisine hassas) hücreleri seçebilmek için konjugantlar hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren TSA besiyerlerine ekilerek taranmıştır. Bunlar içinden NA+Apr besiyerinde üreyip de NA+Apr+Kn besiyerinde üremeyen *S. coelicolor* konjugantları, olası çift rekombinasyon mutantları olarak seçilmişlerdir.

2.2.12. Southern Blot

Southern blot yöntemi Sambrook ve arkadaşları'na (1989) göre yapılmıştır. Öncelikle kromozomal DNA örnekleri ayrı ayrı *XhoI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA fragmanlarının jelden membrana aktarımı blotlama sistemi (Amersham) ile sağlanmıştır. 2xSSC solüsyonu ile yıkanan membranın üzerinde bulunan agaroz jelden DNA'ların aktarımı 40-50 mbar ile vakum altında gerçekleşmiştir. Agaroz jelin yüzeyi, sırası ile 30'ar dk süreyle depürinizasyon solüsyonu, denötralizasyon solüsyonu, nötralizasyon solüsyonu ile kaplanmış ve son olarak 90 dk süreyle 20xSSC solüsyonu ile kaplanmıştır. Membrana transfer edilmiş DNA fragmanları UV ışığı ile (4 dk) membrana sabitlenmişlerdir. Membran 2xSSC ile yıkanarak adi filtre kağıdı arasında 4°C'ta saklanmıştır.

2.2.12.1. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

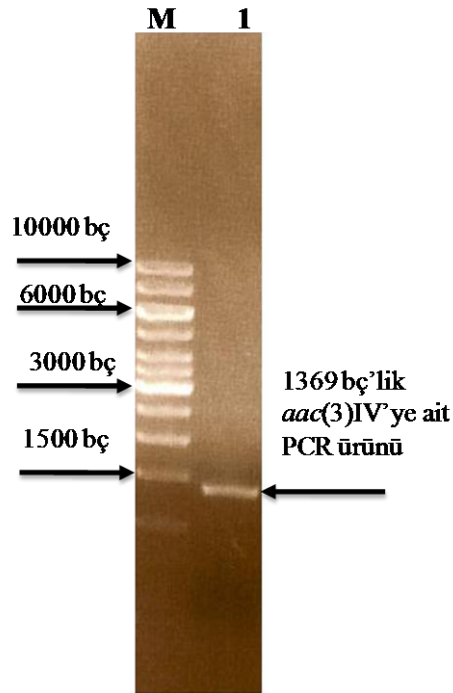
XhoI ve *XbaI* ile ayrı ayrı kesilmiş kromozomal DNA örneklerini taşıyan membranlar prehibridizasyon solüsyonu içinde 42 °C'ta 5 saat hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir. *XhoI* ile kesilmiş kromozomal DNA örneklerini taşıyan membran, *phaC* probu ile *XbaI* ile kesilmiş kromozomal DNA örneklerini taşıyan membran ise apramisin probu ile gece boyunca 42 °C'ta hibridizasyon fırınında inkübe edilmişlerdir. İçinde prop bulunan hibridizasyon solüsyonları daha sonraki kullanıma kadar -20 °C'ta saklanmışlardır. Hibridizasyondan sonra membran, yıkama tamponu I ile oda sıcaklığında 2 defa 15'er dk çalkalanarak ve yıkama tamponu II ile 42 °C'ta 2 defa 25'er dk çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkamalardan sonra membran, maleik asit yıkama tamponunda 5 dk durulanıp, 100 ml bloklama solüsyonunda 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk blotlama solüsyonuyla inkübasyonun ardından, en az 2 saat süreyle 20 ml antikor solüsyonunda inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 ml maleik asit yıkama tamponunda 2 defa 15'er dk yıkanan membran, 20 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Membran, taze hazırlanmış 10 ml renk veren solüsyonla (NBT/BCIP) kaplanarak karanlıkta bekletilmiştir. Renk reaksiyonu membranın dH₂O ile yıkanmasıyla durdurulmuştur.

2.2.12.2. Prop DNA'larının Hazırlanması

Prop olarak kullanılacak olan apramisin direnç geni (*aac(3)IV*), pIJ773 plazmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla kurulan Taq polimeraz enzimi ve apramisin genine uygun kısa primerler (Tablo 2.5) ile PCR sonucunda elde edilmiştir (Şekil 2.6). 1369 bç'lik *aac(3)IV*'ye ait PCR ürünü agaroz jelden, DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak elde edilmiştir.

Tablo 2.5. *aac(3)IV* geni ile uyumlu primerler.

İleri Primer	ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC
Geri Primer	TGT AGG CTG GAG CTG CTT C

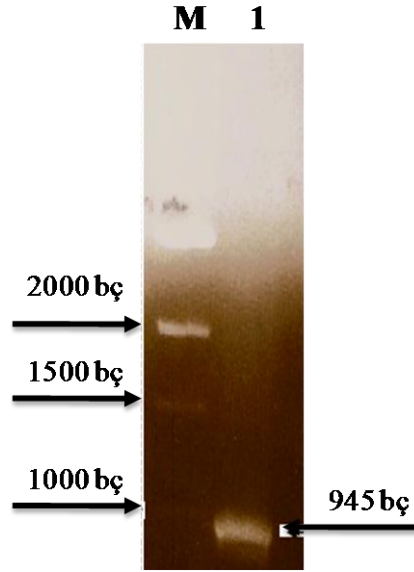


Şekil 2.6. Agaroz jelden saflaştırılan 1369 bç'lik *aac(3)IV*'ye ait PCR ürünü. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 1369 bç'lik *aac(3)IV*'ye ait PCR ürünü

Prop olarak kullanılacak olan *phaC* geni, St2H2 kozmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla kurulan *Phusion* polimeraz enzimi ve *phaC* genine uygun primerlerin kullanıldığı (Tablo 2.6) PCR ile elde edilmiştir. *phaC* genine ait 945 bç'lik PCR ürünü agaroz jelden DNA ve Jel Bant purifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 2.7).

Tablo 2.6. Δ *phaC* geniyle uyumlu primerler uygun primerler.

İleri Primer	ACC CGG GCC GAG AAC CAG TG
Geri Primer	GCG GCC GCC CTT GTC CT

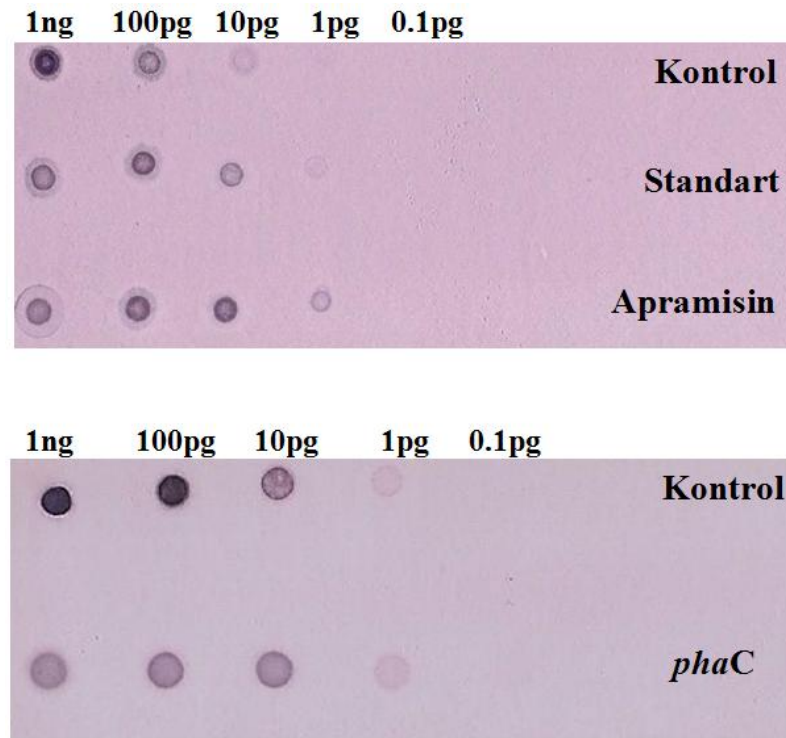


Şekil 2.7. Agaroz jelden saflaştırılan 945 bç'lik *phaC* genine ait PCR ürünü. M:1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Fermentas); 1: 945 bç'lik *phaC* genine ait PCR ürünü.

DIG DNA işaretleme ve tespit kiti (Roche) ile, üreticilerin önerdiği şekilde işaretlenen *aac(3)IV* ve *phaC* proplarının seri dilüsyonları hazırlanarak (1 ng, 100pg, 10 pg, 1 pg ve 0.1 pg) 1'er µl'si pozitif yüklü naylon membrana sırasıyla emdirilmiş ve UV ışığı altında membrana sabitlenmiştir. Membran, öncelikle 20 ml maleik asit tamponunda 15-25 °C'ta çalkalanarak 2 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, sırası ile 10 ml bloklama solüsyonunda ve 10 ml antikor solüsyonunda 30'ar dk bekletilmiştir. Membran, 10 ml yıkama tamponunda 2 kez 15'er dk yıkandıktan sonra, 10 ml tespit tamponunda 5 dk inkübe edilmiştir. Bütün inkübasyonlar düşük rpm'de gerçekleştirilmiştir.

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

Şekil 2.8'da görüldüğü gibi, kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında, prop olarak kullanılacak *aac(3)IV* ve *phaC* genleri digoksijenin ile başarılı bir şekilde işaretlenmiştir.



Şekil 2.8. *aac(3)IV* ve *phaC* proplarının kontrol DNA'sı ile karşılaştırılması.

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

Yaban tip, tek ve çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant hücreler üç gün süreyle YEME besiyerinde üretilmiştir. Üç gün sonunda ön kültürlerden eşit ağırlıkta hücre alınarak Nitrojen Bazal Medium'a ekilmiş ve 72 saat boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatantlar atılıp, peletler 24 saat boyunca 80 °C'de kurutulmuştur. Kuruyan peletlerin üzerine 20 ml çamaşır suyu eklenip 37 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant atılıp, pelet sırasıyla 10 ml dH₂O, aseton ve eter ile yıkanmıştır. En son eter yıkamasından sonra pelet üzerine 5 ml kloroform eklenmiş ve eklenen kloroformun oda sıcaklığında çeker ocak altında uçması beklenmiştir. Kloroform uçtuktan sonra kalan çökelti üzerine 10 ml H₂SO₄ eklenerek 10 dk boyunca kaynayan suda inkübe edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra sırasıyla 235 nm, 250 nm, 280 nm ve 300 nm'de optikal yoğunlukları ölçülmüştür.

2.2.14. Poli- β -hidroksibutirat'ın (PHB) Sudan Siyahı ile Boyanması

Yaban tip, tek ve çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant hücreler üç gün süreyle YEME besiyerinde üretilmiştir. Üç gün sonunda ön kültürlerden eşit ağırlıkta hücre alınarak Nitrojen Bazal Medium'a ekilmiş ve 72 saat boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda hücreler 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Peletten bir miktar alınarak lam üzerine yayılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Pelet kuruduktan sonra ateş ile sabitlenerek preparat hazırlanmış ve 10 damla "A-Glutaraldehyd çözeltisi" ile örtülmüştür. 1 dk sonra "A-Glutaraldehyd çözeltisi" 1 dk boyunca distile suyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sonra preparat 10 damla "B-Sudan Siyahı çözeltisi" ile 5 dk süre ile örtülmüş, ardından 10 damla "C-Alkolik renksizleştirici" ile kaplanarak ve 15 saniye inkübe edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. 15 saniye distile suyla yıkanan preparat 10 damla "D- Hematoksilin çözeltisi Gill-3" ile örtülmüş ve 5 dk sonra çözelti 1 dk boyunca distile suyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde boyanan preparat havada kurutulmuş ve mikroskop altında incelenmiştir.

2.2.15. Antibiyotik Ölçümleri

phaC geninden yoksun mutant ve yaban suşlar ile 96 saatlik bir fermentasyon yapılmıştır. Mutant suş antibiyotik eklenmemiş R2YE besiyerinde üretilmiştir. Fermentasyonun 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde her bir suştan 5 ml örnek alınmış, bunun 1 ml'si antibiyotik ölçümü için -20 °C'a, 4 ml'si kuru ağırlık ölçümü için 2 kez dH₂O ile yıkandıktan sonra -20 °C'a kaldırılmıştır.

Undesilprodigiosin ve aktinorhodin antibiyotikleri Kieser ve arkadaşlarının (2000) spektrofotometrik yöntemi ile ölçülmüştür. -20 °C'tan alınan 1 ml'lik örnekler eritilerek, her birine 250 µl 5M KOH ilave edilip karıştırıldıktan sonra gece boyunca 4 °C'ta inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek, pelet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Aktinorhodin, süpernatantta 640 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Pelet 0.5 M HCl ile 2 kez yıkanmış ve 1 ml 0.5 M metanol-HCl karışımında 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışım, 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra undesilprodigiosin süpernatantta 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Antibiyotik aktiviteleri, $Abs = \epsilon \times [M]$ formülü ile hesaplanmıştır. Formülde, aktinorhodin için saf örneğin ϵ değeri 25230, undesilprodigiosin için saf örneğin ϵ değeri ise 100500 olarak alınmıştır.

Spesifik aktivite hesabı için hücrelerin kuru ağırlıkları kullanılmıştır. Kuru ağırlık ölçümü için -20 °C'a kaldırılan peletler eritilerek kurutma kaplarına alınmış ve 4 gün boyunca 80 °C'ta kurutulduktan sonra ağırlıkları (mg/ml) ölçülmüştür. Antibiyotik aktiviteleri (nmol) kuru ağırlığa (mg) bölünerek spesifik aktiviteleri elde edilmiştir.

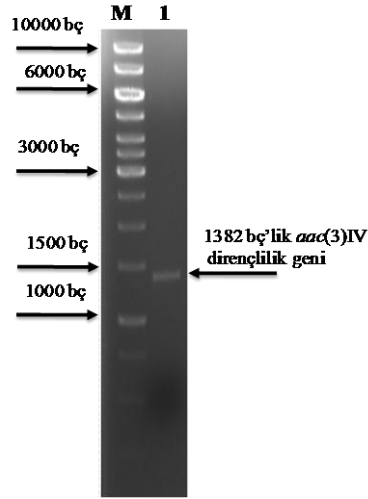
3. BULGULAR

3.1. *S. coelicolor* Genomunda Olası *phaC* Geninin Tespit Edilmesi

S. coelicolor A3(2) genomu incelendiğinde PHB üretiminden sorumlu *phaC* genine özgü herhangi bir açık okuma bölgesinin (ORF) tanımlanmadığı görülmüştür. PHB ürettiği daha önceki çalışmalarla (Kannan ve Rehacek, 1970; Manna ve ark., 1999; Verma ve ark., 2002) gösterilmiş olan *S. coelicolor*'da bu genin tespit edilmesi için *Streptomyces* türlerinde daha önceden çalışılmış ve dizisi bilinen *phaC* genleri taranmıştır. Tarama sonucunda sadece *Streptomyces aureofaciens*'e ait genom dizisinde olası bir *phaC* geni bulunmuş ve bu genin nükleotit dizisi ve kodladığı düşünülen protein dizisi kullanılarak *S. coelicolor* A3(2)'in genomu taranmıştır. Sonuç olarak, *S. aureofaciens*'in olası *phaC* geninin nükleotit dizisi ile, *S. coelicolor* A3(2)'in genomundaki SCO7613 gen bölgesinin nükleotit dizisinin % 75 oranında benzediği ortaya çıkmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Daha sonra *S. aureofaciens*'in olası *phaC* geninin kodladığı düşünülen protein dizisi ile *S. coelicolor* A3(2)'in SCO7613 gen bölgesinden kodlanan protein dizisi karşılaştırılmış ve iki proteinin % 45 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

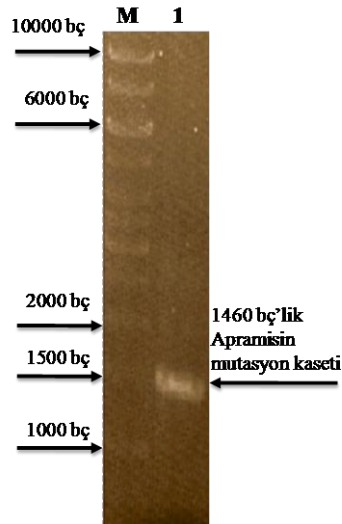
3.2. Mutasyon Kasetinin Hazırlanması

S. coelicolor genomundan olası *phaC* geninin silinmesi için PCR temelli bir yöntem (Gust ve ark., 2003) kullanılmış ve apramisin direnç geninin *phaC* geninin yerini alması sağlanmıştır. Mutasyon kasetinin hazırlanması için, PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan 1382 bp'lik apramisin dirençlilik geni, pIJ773 plazmidinden *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek jelden izole edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 1382 bç'lik apramisin dirençlilik geni. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); 1: *EcoRI-HindIII* endonükleazlar ile kesilen pIJ773 plazmidinin agaroz jel görüntüsü.

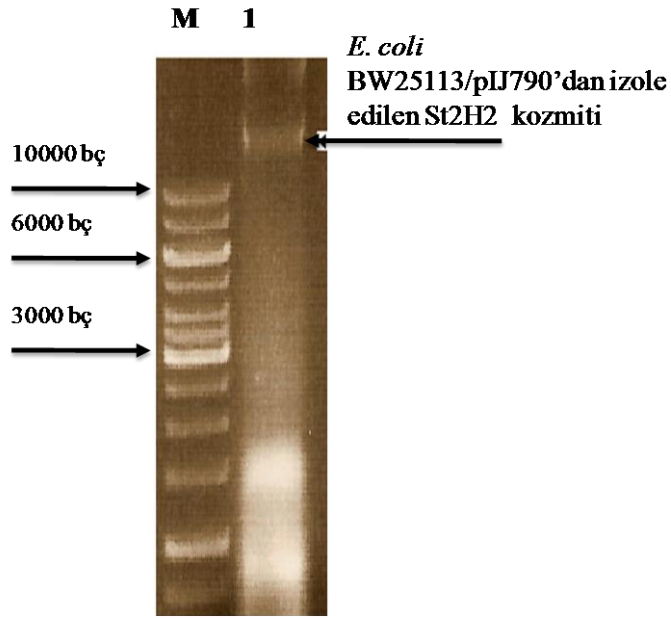
Apramisin kasetinin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 1460 bç'lik mutasyon kaseti elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Agaroz jelden saflaştırılan mutasyon kaseti. M: 1 kb'lık moleküler DNA belirteci (Bioron); 1: PCR sonucu elde edilen 1460 bç'lik apramisin mutasyon kasetinin agaroz jelden saflaştırılması.

3.3. *E. coli* BW25113/pIJ790'nun St2H2 Kozmiti ile Transformasyonu

Üzerinde olası *phaC* geni bulunan St2H2 kozmiti, *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Ampisilin ve kanamisine dirençli transformanlardan herhangi bir tanesi seçilerek kozmit varlığı gösterilmiştir (Şekil 3.3).

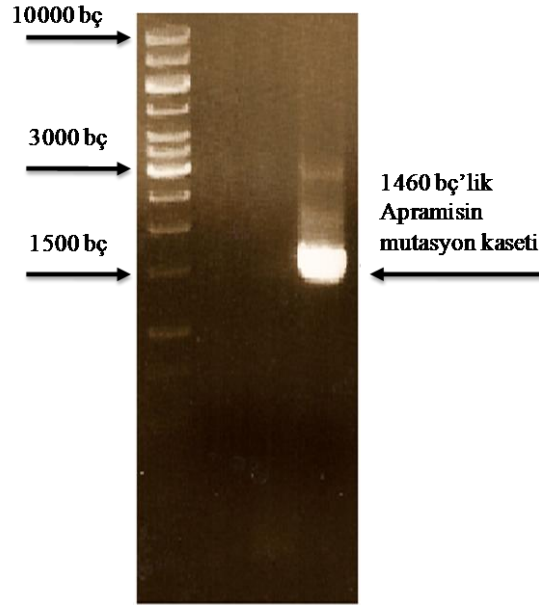


Şekil 3.3. *E. coli* BW25113/pIJ790 hücrelerinden izole edilen St2H2 kozmiti. M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron), 1: St2H2 kozmiti.

3.4. St2H2 Kozmitini Taşıyan *E. coli* BW25113/pIJ790 Hücrelerine Mutasyon Kasetinin Aktarılması

St2H2 kozmitini taşıyan *E. coli* BW25113/pIJ790 kompetan hücrelerine, olası *phaC* geninin başlangıç kodonunun alt bölgesiyle ve bitiş kodonunun üst bölgesiyle aynı homolog dizileri taşıyan 1460 bp'lık mutasyon kaseti transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Ampisilin, kanamisin ve apramisine dirençli transformanlar arasından, *aac(3)IV* ile kozmit üzerinde bulunan *S. coelicolor phaC* genleri arasında çift rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutant kozmiti taşıyan klonlar taranmış ve

phaC geninden yoksun St2H2 kozmidini taşıyan *E. coli* hücreleri elde edilmiştir. Transformanlar arasından bir tanesi seçilerek mutant kozmidin doğruluğu apramisin mutasyon kasetiyle uyumlu primerler kullanılarak PCR ile ispatlanmıştır (Şekil 3.4). Pozitif kontrol olarak *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen *phaC* genini taşıyan St2H2 kozmitinin kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda, sadece mutasyon kasetine özgül 1460 bç'lik DNA fragmanı (mutasyon kaseti) gözlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Mutant kozmitin doğrulanması için yapılan PCR. M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron), 1: St2H2 kozmitinin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu, 2: *E. coli* BW25113/pIJ790'dan izole edilen mutant kozmitin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu.

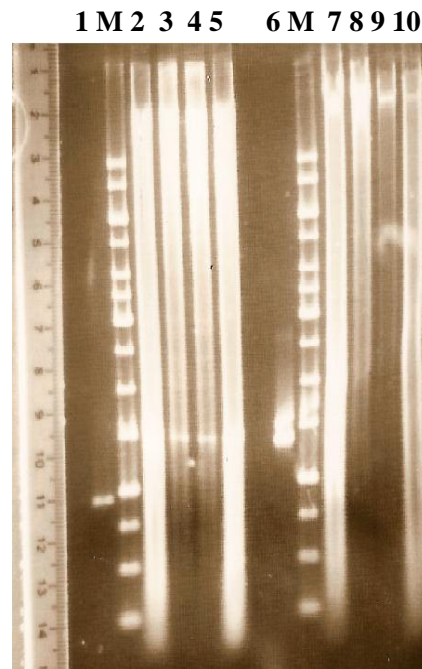
3.5. Mutant Kozmitin *S. coelicolor*'a Transferi ve *phaC* Mutantlarının Taranması

E. coli BW25113/pIJ790 hücrelerinden izole edilen mutant kozmidin, çok güçlü metil spesifik restriksiyon sistemi bulunan *S. coelicolor*'a konjugasyon ile aktarılabilmesi için öncelikle metilasyon sistemi olmayan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılması için Sambrook ve arkadaşlarının (1989) transformasyon yöntemi kullanılmıştır.

Mutant kozmiti taşıyan *E. coli* ET12567/pUZ8002 ile *S. coelicolor*'ın konjugasyonu Kieser ve arkadaşlarının (2000) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Nalidiksik asit (NA) ve apramisin (Apr) içeren MS besiyerinde üreyen konjugantlar arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği (Apramisine dirençli, kanamisine hassas) olası mutantlar hem NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) içeren hem de NA (25 µg/ml) + Apr (50 µg/ml) + Kn (50 µg/ml) içeren TSA besiyerlerinde taranmıştır. Sonuçta, 360 konjugant arasından çift rekombinasyon olayının meydana geldiği 47 tane olası mutant hücre elde edilmiştir. Bunlardan 2 tanesi seçilerek mutasyon Southern blot ile ispatlanmıştır.

3.6. Mutasyonun Southern Blot ile İspatlanması

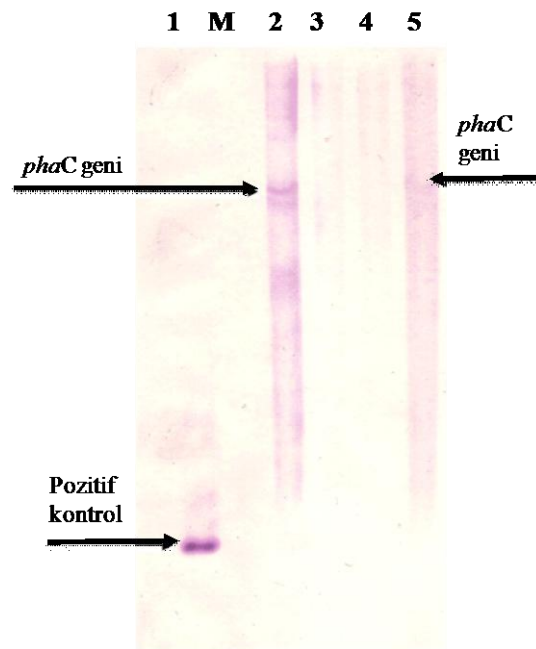
Yaban tip *S. coelicolor* ve olası *S. coelicolor* $\Delta phaC$ suşlarından kromozomal DNA izolasyonu yapılarak, DNA'lar *phaC* genini tespit etmek için *XhoI* ile ve apramisin mutasyon kasetini tespit etmek için *XbaI* ile kesilmişlerdir (Şekil 3.5).



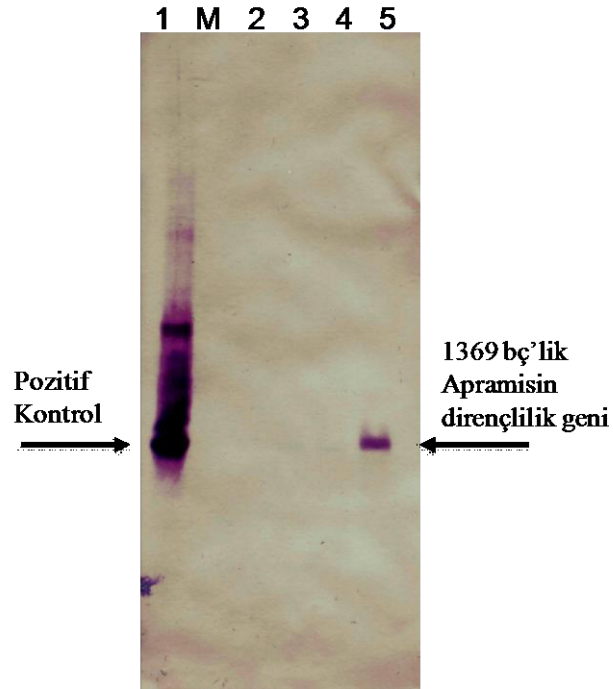
Şekil 3.5. Mutasyonun Southern Blot ile ispatlanması. 1: 945 bç'lik *phaC* geni (pozitif kontrol); 2: *XhoI* ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü; 3, 4: *XhoI* ile kesilmiş çift rekombinasyonun gerçekleştiği olası mutant suşların kromozomal DNA'larının agaroz jel görüntüsü; 5: *XhoI* ile kesilmiş tek

rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşun kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü; M: 1 kb'lık DNA belirteci (Bioron); 6: 1369 bp'lık apramisin dirençlilik geni (pozitif kontrol); 7: *Xba*I ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü; 8, 9: *Xba*I ile kesilmiş çift rekombinasyonun gerçekleştiği olası mutant suşların kromozomal DNA'larının agaroz jel görüntüsü; 10: *Xba*I ile kesilmiş tek rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşun kromozomal DNA'sının agaroz jel görüntüsü.

*Xho*I ile kesilmiş kromozomal DNA'ların *phaC* probu ile hibridizasyonu sonucunda, yaban suşta ve tek rekombinasyon olayının meydana geldiği mutant suşta *phaC* genini içinde bulunduran 6094 bp'lık DNA bandı gözlenirken, çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşlarda aynı bant gözlenmemiştir (Şekil 3.6). *Xba*I ile kesilmiş kromozomal DNA'ların *aac(3)IV* probu ile hibridizasyonu sonucunda, tek ve çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşlarda 1382 bp'lık DNA bandı gözlenmiş, fakat yaban suşta bu bant gözlenmemiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. *phaC* geninin prob olarak kullanıldığı Southern Blot sonucu. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron); 1: 945 bp'lık *phaC* geni (pozitif kontrol); 2: *Xho*I ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sı; 3, 4: *Xho*I ile kesilmiş çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşların kromozomal DNA'ları; 5: *Xho*I ile kesilmiş tek rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşun kromozomal DNA'sı.

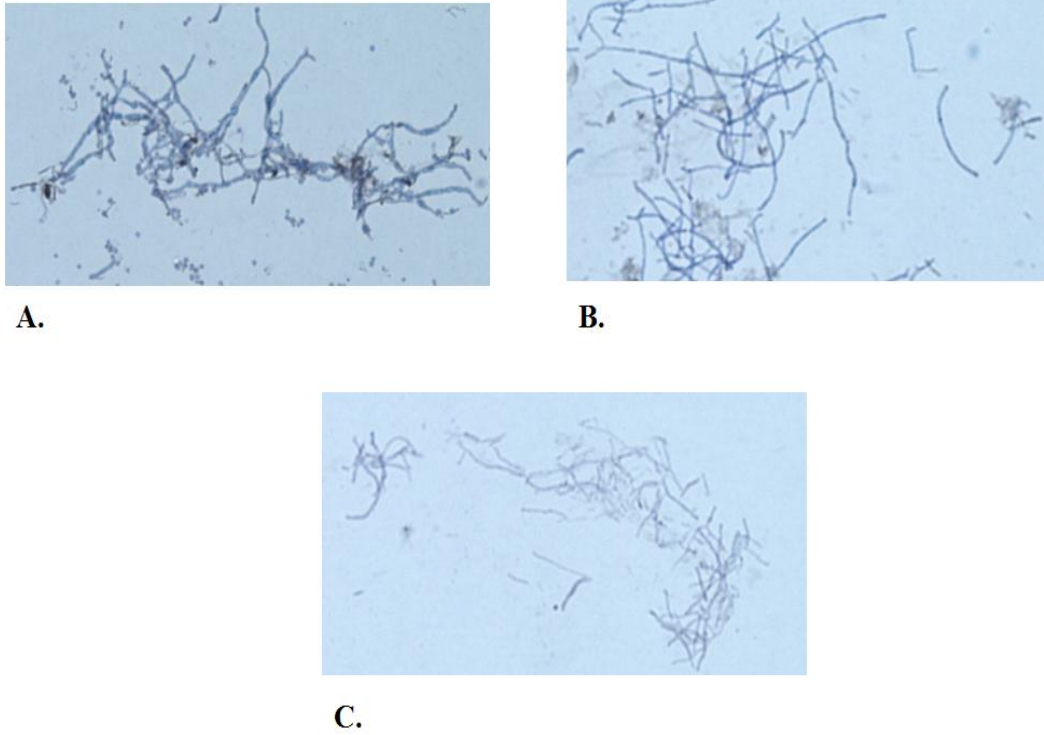


Şekil 3.7. Apramisin geninin prob olarak kullanıldığı Southern Blot sonucu. M: 1 kb DNA belirteci (Bioron) 1: 1369 bç'lik Apr dirençlilik geni (pozitif kontrol); 2: *Xba*I ile kesilmiş yaban suş kromozomal DNA'sı; 3, 4: *Xba*I ile kesilmiş çift rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşların kromozomal DNA'ları; 5: *Xba*I ile kesilmiş tek rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşun kromozomal DNA'sı.

3.7. Yaban ve Mutant Suşların PHB Üretimlerinin Karşılaştırılması

3.7.1. Yaban ve Mutant Suşların Sudan Siyahı ile Boyanması

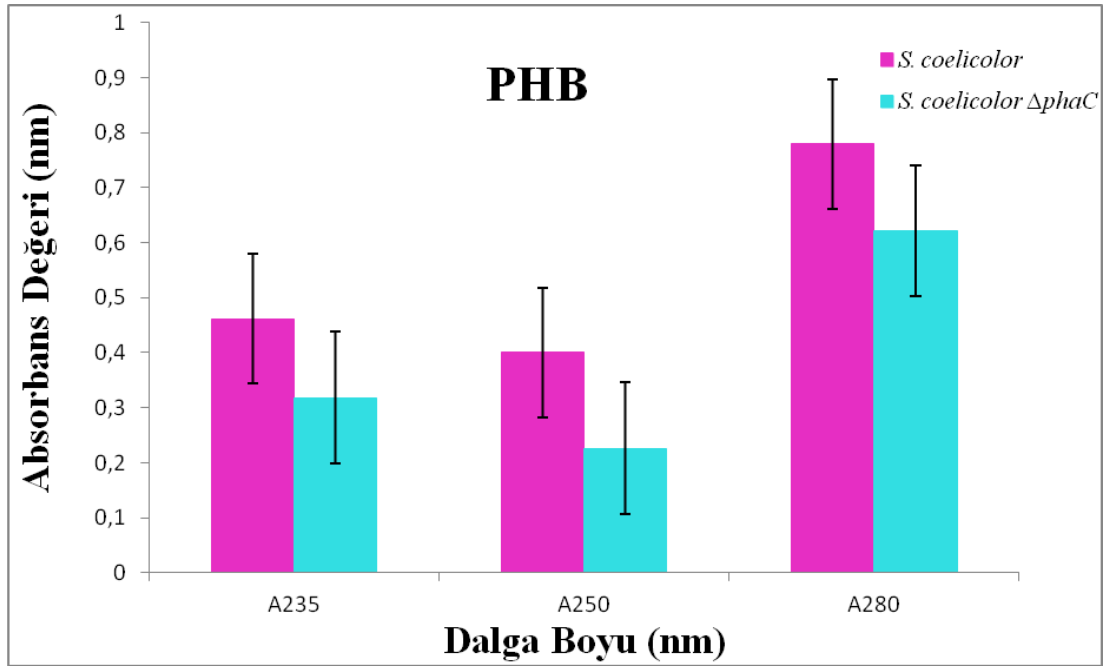
Yaban tip *S. coelicolor* ve tek ve çift rekombinasyonların gerçekleştiği mutant *S. coelicolor* kolonileri 2.2.14 bölümünde anlatılan yöntemle Sudan Siyahı ile boyanmıştır. Boyama sonucu hücre içindeki PHB granülleri koyu mavi renkli olarak ışık mikroskop altında gözlenmiştir. PHB granülleri yaban *S. coelicolor*'da ve tek rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutant *S. coelicolor* suşunda koyu mavi/siyah renkli, yuvarlak, zincir şeklinde gözlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Hücrelerin Sudan Siyahı ile boyanma sonuçları. A. Yaban tip *S. coelicolor* hücreleri. B. *S. coelicolor* $\Delta phaC$ (çift rekombinasyon olayının gerçekleştiği mutant suş) hücreleri. C. Tek rekombinasyonun gerçekleştiği mutant *S. coelicolor* hücreleri. PHB granülleri ışık mikroskopu altında koyu mavi/siyah renkli boncuklar şeklinde gözlenmektedir.

3.7.2. Yaban ve Mutant Suşların PHB Üretimlerinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Yaban tip ve $\Delta phaC$ hücrelerinin PHB üretimlerini karşılaştırmak için 2.2.13 bölümünde anlatılan spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Şekil 3.9’da görüldüğü gibi ölçümler 3 ayrı dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve hepsinde de yaban soyun $\Delta phaC$ suşuna göre daha az PHB ürettiği gözlenmiştir.



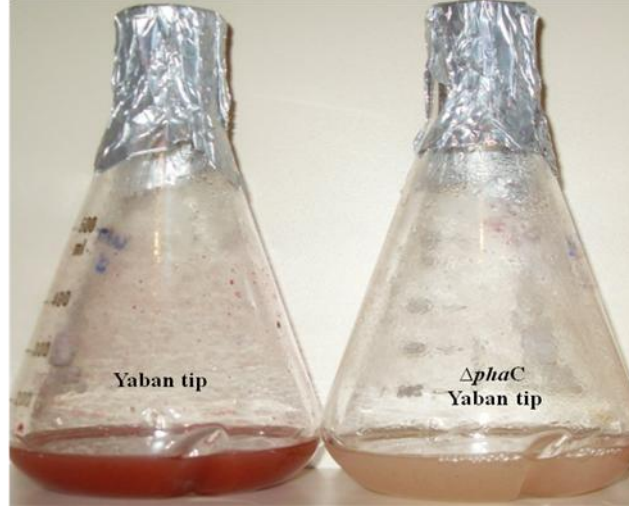
Şekil 3.9. *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* Δ *phaC* hücrelerinin PHB üretimlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi. Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

Yaban tip ve mutant suşun PHB üretimlerini sudan siyahı ile boyanarak ve spektrofotometrik olarak ölçülerek karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda mutant suştaki PHB üretiminin yaban suşa göre azalmış olduğu gözlenmiştir. Böylelikle *S. coelicolor* A3(2)'in genomunda bulunan SCO7613 gen bölgesinin PHB üretiminden sorumlu PHA sentaz genine ait olabileceği gösterilmiştir.

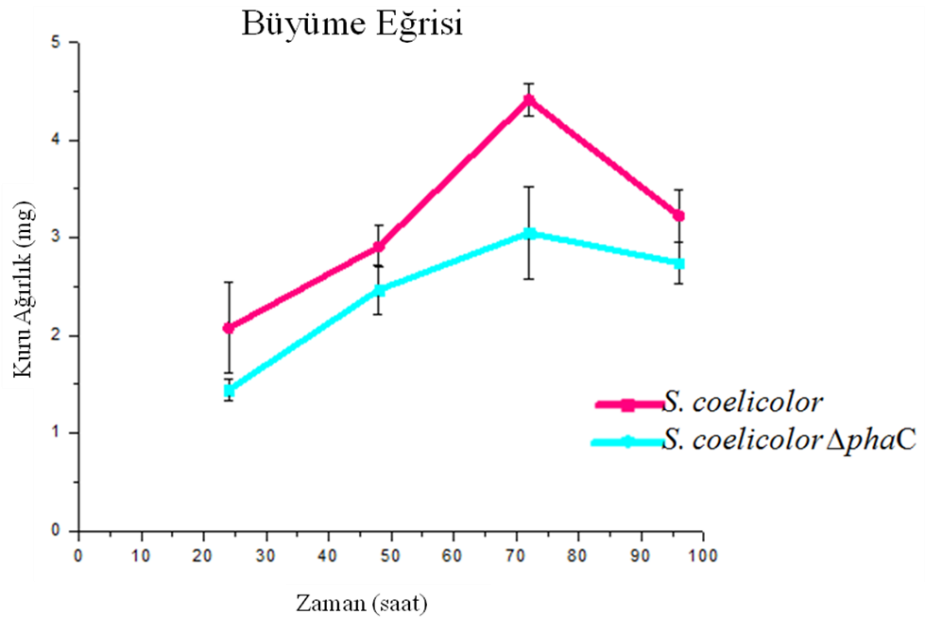
3.8. Yaban ve Δ *phaC* suşlarının Aktinorhodin ve Undesilprodigiosin Üretimlerinin Karşılaştırılması

Hücrelerin antibiyotik üretimleri 2.2.15 bölümünde anlatılan yöntemle R2YE besiyerinde ölçülmüştür. Antibiyotik ölçümlerinin yapıldığı fermentasyon sırasında, antibiyotik üretiminin bir göstergesi olan renk değişimlerine bakıldığında, yaban suşa, kırmızıya doğru gittikçe koyulaşan bir renk değişimi gözlenirken, mutant suşa renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 3.10). Fermentasyon boyunca yaban tip ve mutant suşun üremeleri de karşılaştırılmış ve çok büyük bir farklılık olmadığı hatta mutant suşun aynı koşullarda yaban suşa göre biraz daha iyi ürediği gözlenmiştir (Şekil 3.11).

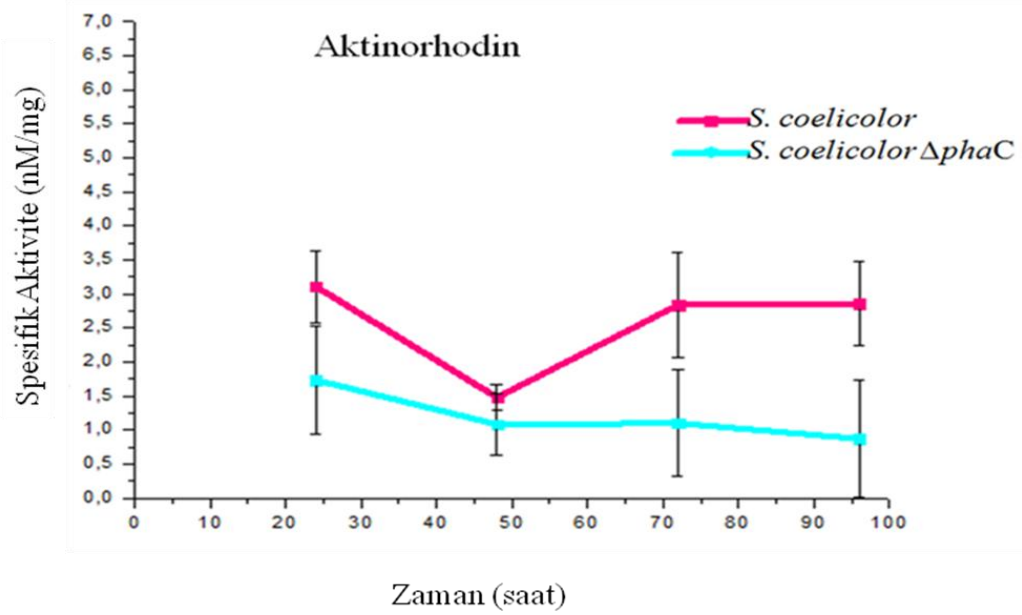
Antibiyotik ölçüm sonuçlarına göre yaban suşun aktinorhodin üretiminin $\Delta phaC$ suşuna göre, 96. saatte yaklaşık 3.5 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.12). Undesilprodigosin üretimleri karşılaştırıldığında ise 96. saatte yaban suşun, mutant suşa göre yaklaşık 2.5 kat daha fazla antibiyotik ürettiği gözlenmiştir (Şekil 3.13).



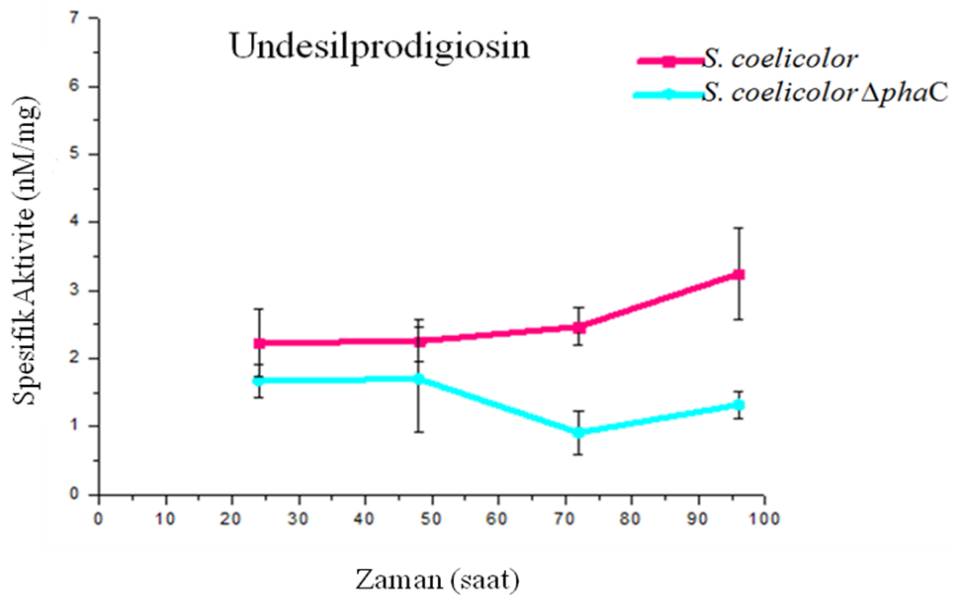
Şekil 3.10. Yaban tip ve $\Delta phaC$ suşlarının fermentasyon sırasında, 96. saatte R2YE besiyerindeki renk farklılıkları.



Şekil 3.11. *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* $\Delta phaC$ suşlarının kuru ağırlıklarının karşılaştırılması. Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.12. *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* Δ phaC suşlarının aktinorhodin üretimlerinin karşılaştırılması. Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.13. *S. coelicolor* ve *S. coelicolor* Δ phaC suşlarının undesilprodigiosin üretimlerinin karşılaştırılması. Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Streptomyces 'ler, *Actinomycetes* ordosuna dahil birçok türü ve varyetesi olan gram pozitif bakterilerdir (Brock ve Madigan, 1988). GC oranı yüksek (% 60-70) olan bu bakteriler, özellikle toprakta bulunan, filamentli, kompleks bir hayat döngüsüne sahip mikroorganizmlardır.

Çok sayıda biyoaktif madde üreten *Streptomyces* 'ler endüstriyel açıdan oldukça önemli bakterilerdir. Ürettikleri maddeler arasında, başta antibiyotikler olmak üzere anti-tirozinazlar, anti-oksidanlar, anti-tümör ajanları, enzim inhibitörleri, glukoz izomerazlar, transglutaminazlar gibi endüstriyel açıdan önemli bileşikler sayılabilir (Anzai ve ark., 2008, Whitehurst ve ark., 2009). *Streptomyces*'de antibiyotik ve diğer ikincil metabolitlerin üretimi, katı besiyerinde hava misellerinin gelişiminin son fazında, sıvı besiyerinde ise durağan faza girmeden önce başlar (Chouayekh ve Virolle, 2002).

Polihidroksialkanatlar (PHA) bazı prokaryotlar tarafından hücre içinde depolanan hidroksialkonik asit polyesterleridir. PHA'lar geri dönüşümlü, suda çözünmeyen, toksik etki göstermeyen, biyoyumlu ve termoplastik özellik gösteren polyesterlerdir. Bu özellikleri sayesinde PHA'lar paketlenme, ilaç, eczacılık, tarım ve gıda endüstrilerinde kullanılmaya uygundur (Anderson ve ark., 1990). Alifatik bir polyester olan Poli- β -hidroksibutirik asit (PHB) (Maurice Lemoigne, 1920) en önemli PHA'lardandır (Lenz ve ark., 2004). PHB, β -ketotiaz (*phaA*), asetoasetil-CoA redüktaz (*phaB*) ve PHA sentaz (*phaC*) tarafından katalizlenen 3 dizi reaksiyon sonucunda Asetil CoA'dan sentezlenmektedir (Anderson ve ark., 1990).

Bu tez çalışması, *S. coelicolor*'da PHB'den sağlanan karbon kaynağının antibiyotik üretimi için önemini ortaya çıkaran bulguları içermektedir. Çalışmada, *S. coelicolor*'ın PHB üretiminden sorumlu kilit enzimi kodladığı düşünülen olası *phaC* geni PCR temelli bir yöntem ile kromozomdan silinmiştir. Mutasyonun oluşturulması için öncelikle, *phaC* geninin başlangıç kodonunun önündeki ve bitiş kodonunun altındaki diziler ile homoloji gösteren diziler taşıyan seçici kaset (apramisin kaseti) ile kozmit (St2H2) üzerinde bulunan *phaC* geninin yer

değiştirmesi sağlanmıştır. Rekombinasyon olayı, λ *red* (*gam*, *bet*, *ex*) genlerini taşıyan pIJ790 plazmidi ile (Datsenko ve Wanner, 2000) *E. coli*'de gerçekleştirilmiş, bu sayede öncelikle *phaC* geninden yoksun mutant kozmit elde edilmiştir. *S. coelicolor*'ın güçlü bir metil-spesifik restriksiyon sistemi bulunduğundan mutant kozmidin *S. coelicolor*'a konjugasyon ile aktarılmasında DNA metilasyon sisteminden yoksun *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri kullanılmıştır. Mutant kozmidin *E. coli*'den *Streptomyces*'e konjugasyon ile transferi “*tra*” genlerini taşıyan pUZ8002 plazmidi sayesinde gerçekleşmiştir. *Actinomycete*'lerde konjugasyon ile gen aktarımı oldukça pratik, az zaman alan ve güvenilir bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında mutant kozmidin *S. coelicolor*'a konjugasyon ile aktarılmasında ve ekskonjuganlar arasından mutant suş Δ *phaC*'nin seçilmesinde önemli bir problem ile karşılaşılmamıştır. Çalışmada kullanılan PCR bazlı yöntem daha önce de birçok çalışmada başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Tunca ve ark., 2007; Mendes ve ark., 2007; Lu ve ark., 2007)

Gerçekleştirilen mutasyon PCR ve “Southern hibridizasyon yöntemi” ile doğrulanmıştır. Mutasyonun PCR ile ispatlanması için apramisin dirençlilik geniyle uyumlu primerler kullanılmış ve sadece çift ve tek rekombinasyonun gerçekleştiği mutant suşlarda istenilen bantlar gözlenmiş, yaban suş kromozomal DNA'sının kullanıldığı reaksiyonda ise apramisin genine spesifik bant oğalmamıştır. Böylece apramisin direnç geninin sadece mutant suşlarda olduğu PCR ile gösterilmiştir.

Mutasyonun Southern Blot ile ispatlanmasında ise *phaC* (PHA sentaz) ve *aac(3)IV* (apramisin) genlerine özğü 2 ayrı propp kullanılmıştır. Hibridizasyon sonucunda, *aac(3)IV* genine özğü bant sadece mutant suş kromozomal DNA'sında gözlenirken, yaban suşta gözlenmemiştir. Aynı şekilde *phaC* genine spesifik bant sadece yaban suş DNA'sında bulunurken, mutant suşta söz konusu DNA bandı gözlenmemiştir.

phaC geninden yoksun *S. coelicolor* suşunda (Δ *phaC*) öncelikle PHB üretimi ölçülmüştür. PHB granülleri Sudan Siyahı, Nile Red ve Nile Blue gibi boyalar ile boyanarak (Yılmaz ve ark., 2003) gözlenebilirken, PHB'nin spektrofotometrik olarak ölçülmesi (Law ve ark., 1960), Gaz kromatografisi (GC) (Braunegg ve ark., 1978) ve FTIR spektroskopisi ile analiz edilmesi (Zagreba ve ark., 1990) de mümkündür. Bu

çalışma kapsamında PHB hem boyanarak gözlenmiş hem de spektroskopik olarak ölçülmüştür.

Besiyerine eklenerek, agarlı petrilere PHB'nin gözlenmesi için kullanılan Nile Red ve Nile Blue boyalarının Gram-negatif bakteriler için daha uygun olduğu bilindiğinden (Spiekermann ve ark., 1998), bu çalışmada, yaban suş ile mutant suşun ürettiği PHB granüllerini gözlemleyebilmek için Sudan siyahı kullanılmıştır. Boyama sonuçlarına göre, yaban tip *S. coelicolor* kolonilerinde çok sayıda koyu mavi/siyah renkli, yuvarlak, zincir şeklinde PHB granülleri gözlenirken, *S. coelicolor* Δ phaC kolonilerinde PHB granüllerinin sayısının oldukça az olduğu gözlenmiştir.

PHB'nin spektrofotometrik olarak tayininde Law ve arkadaşlarının (1960) yöntemi kullanılmıştır. 235 nm, 250 nm, 280 nm ve 300 nm'de yapılan ölçümlere göre mutant suşun yaban suşa göre daha az PHB ürettiği gösterilmiş, 235 nm'de bu farkın yaklaşık 2 kat kadar olduğu bulunmuştur. Hem boyama sonuçları hem de spektrofotometrik sonuçlar, bu çalışmada elde edilen mutant suşun PHB üretiminin azaldığını göstermiştir. Her ne kadar FTIR, gaz kromatografisi ve enzim aktivitesi ölçüm sonuçlarına göre daha sağlıklı karar verilebilirse de bu çalışma kapsamında *S. coelicolor* genomunda bulunan SCO7613'ün PHB üretiminden sorumlu olan PHA sentaz enzimini kodladığı yani olası *phaC* geni olduğu önerilebilir.

Mutant suş ile yaban suşun antibiyotik ölçümleri karşılaştırıldığında ise mutant suşta hem aktinorhodin hem de undesilprodigiosin antibiyotiklerinin üretiminde azalma olduğu bulunmuştur. Fermentasyonun 96. saatinde mutant suşun yaban suşa göre yaklaşık 3.5 kat daha az aktinorhodin ve 2.5 kat daha az undesilprodigiosin ürettiği görülmüştür.

Literatürde, *Streptomyces*'lerin ürettiği PHB polimerinin antibiyotik üretimiyle bağlantısı olup olmadığı konusunda bilgimiz dahilinde sadece birkaç yayın bulunmaktadır. PHB'nin degradasyonu ile oluşan butyryl-CoA ve asetil-CoA'nın kloramfenikol ve makrolid ascomycin FK250 biyosentezinde kullanıldığı gösterilmiştir (Ranade ve ark., 1993; Wu ve ark., 2000). Verma ve arkadaşları (2002) ise, *S. coelicolor* A3(2) M145'te aktinorhodin konsantrasyonunun artışına paralel olarak hücre içinde PHB konsantrasyonunun düştüğünü gözlemleyerek, bu polimerin

antibiyotik üretiminde prekürsör kaynağı olarak görev alabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmalarda, PHB'nin antibiyotik üretimi için karbon kaynağı sağladığı öne sürülse de bu bilginin kesinlik kazanması için PHB üretemeyen mutant suşlara ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasıyla, yaban suşa göre PHB üretimi oldukça az olan mutant bir suş elde edilmiş ve antibiyotik ölçüm sonuçları PHB'den sağlanan karbonun *S. coelicolor*'da antibiyotik üretimi için oldukça önemli olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. **Anderson, A. ve Dawes, E.,** (1990), “Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates”, *Microbiological Reviews*, 54: 450-472.
2. **Anzai, K., Ohno, M., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Tamura, T., Komaki, H., Miyadoh, S., Harayama S. ve Ando, K.,** (2008), “Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of producing bioactive compounds among strains preserved at NITE/NBRC”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 287-295.
3. **Arias, P., Fernandez-Moreno, M.A., ve Malpartida, F.,** (1999), “Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein”, *Journal of Bacteriology*, 181: 6958–6968.
4. **Benoit, T. G., Wilson, G. R. ve Baugh, C. L.,** (1990), “ Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1”, *Letters in Applied Microbiology*, 10: 15-18
5. **Bentley, S. D. ve Chater, K. F.,** (2002), “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, *Nature*. 417: 141-147
6. **Bibb M.,** (2005), “Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*”, *Current Opinion in Microbiology*, 8: 208-215
7. **Bibb, M.,** (1996), “The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, Colworth Prize Lecture, *Microbiology*, 142: 1335–1344.
8. **Braunegg, G., Lefebvre, G. ve Genser, K.L.,** (1998), “Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects”, *Journal of Biotechnology*, 65: 127-161.
9. **Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. ve Fuller, R. C.,** (1991), “The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*”, *Archives Microbiology*, 155: 337-340.
10. **Brock, T. D. ve Madigan, M. T.,** (1988), *Biology of Microorganisms*, pp. 60-112, Prentice hall international Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

11. **Chater, K.F. ve Bruton, C.J.**, (1985), “Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered”, *The EMBO Journal*, 4: 1893–1897.
12. **Chater, K.F.**, (2001), “Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) a checkpoint multiplex?”, *Current Opinion in Microbiology*, 4: 667-673.
13. **Chouayekh, H. ve 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.
14. **Comeau Y., Hall K. ve Oldham W.K.**, (1988), “Determination of Poly- β -hydroxybutyrate and Poly(β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas liquid chromatography”, *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2325–2327.
15. **Dave, H., Ramakrishna, C. ve Desai, J. D.**, (1996), “Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403” *Indian Journal of Experimental Biology*, 34: 216-219.
16. **Dunlop, W. F. ve Robards, A. W.**, (1973), “Ultrastructural Study of Poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus* “, *Journal of Bacteriology*, 114: 1271-1280.
17. **Emeruwa A.C. ve Hawirko R.Z.**, (1993),”Poly- β -Hydroxybutyrate Metabolism During Growth and Sporulation of *Clostridium botulinum*”, *Journal of Bacteriology*, 116: 989-993.
18. **Findlay, R. H. ve White, D. C.**, (1983), “Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 71-78
19. **Ghorbel, S., Kormanec, J., Artus A. ve Virolle, M.J.**, (2006), “Transcriptional Studies and Regulatory Interactions between the *phoR-phoP* Operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* Genes of *Streptomyces lividans* TK24”, *Journal of Bacteriology*, 188: 677-686.
20. **Gust B., Kieser T. ve Chater K.F.**, (2002), “PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK.
21. **Hong K., Sun S., Tian W., Chen G.Q. ve Huang W.**, (1999), “A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier

- transform infrared spectroscopy”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:523-526.
22. **Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J. ve Kieser, H.M.**, (1985), “Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual”, John Innes Foundation, Norwich.
 23. **Hopwood, D.A.**, (1999), “Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*”, *Microbiology*, 145: 2183-2202.
 24. **Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. ve Omura, S.**, (2003), “Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*”, *Nature Biotechnology*, 21: 526-531.
 25. **Kannan, L.V. ve Rehacek, Z.**, (1970), ”Formation of poly-bhydroxybutyrate by Actinomycetes”, *Indian Journal of Biochemistry*, 7:126–129.
 26. **Kansız, M., Billman-jacobe, H. ve McNaughton, D.**, (2000), “Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of Mid- infrared Spectroscopy and multivariate statistics”, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3415-3420.
 27. **Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A.** (2000), “Practical *Streptomyces* genetics”, The John Innes Foundation, Norwich, England.
 28. **Korotkova, N., Chistoserdova, L. ve Lidstrom, M.E.**, (2002), “Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthesis in the Facultative Methylophilic *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and Mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*”, *Journal of Bacteriology*, 184: 6174-6181.
 29. **Lafferty, R. M., Korsatko, B. ve Korsatko, W.**, (1988), *Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid*, *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
 30. **Law J.H. ve Slepecky R.A.**, (1961), “Assay of poly-[3-hydroxybutyric acid]”, *Journal of Bacteriology*, 82:33-36
 31. **Lee, S. Y.**, (1996), “Bacterial Polyhydroxyalkanoates”, *Biotechnology and Bioengineering*, 49:1-14.

32. **Lenz R. W. ve Marchessault R.H.**, (2005), “Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology”, *Biomacromolecules*, 6: 1–8.
33. **Lounes, A., A. Lebrihi, C. Benslimane, G. Lefebvre, ve P. Germain**, (1996), “Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story”, *Journal of Bacteriology*, 186: 5197-5201.
34. **Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., ve Hopwood, D.A.**, (1990), “Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin”, *Gene*, 93: 91–99.
35. **Manna, A., Banerjee, R. ve Paul, A.K.**, (1999), “Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*”, *Current Microbiology*, 39: 153-158.
36. **Martin, J.F. ve Demain, A.L.**, (1980), “Control of antibiotic biosynthesis”, *Microbiological Reviews*, 44: 230-51.
37. **Martin J. F. ve Liras P.**, (2010), “Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*”, *Current Opinion in Microbiology*, 13: 263-73.
38. **Martin J.F. ve Flores F.J.**, (2004), “Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA–protein complexes with iron boxes”, *Biochemical Journal*, 380: 497-503.
39. **Martínez-Hackert, E. ve Stock, A.M.**, (1997), “Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors”, *Journal of Molecular Biology*, 269: 301–312.
40. **McCool, G.J. ve Cannon, M.C.**, (1999), “Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*”, *Journal of Bacteriology*, 181: 585-592.
41. **McCarthy, A.J. ve Williams, S.T.**, (1992), “Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental,” A Review, *Gene*, 115: 189-192.
42. **Mizuno, T. ve Tanaka, I.**, (1997), “Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators”, *Molecular Microbiology*, 24: 665–667.

43. **Misra, A.K., Thakur, M.S., Srinivas, P. ve Karanth, N.G.,** (2000), “Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganism using Fourier transform infrared spectroscopy”, *Biotechnology Letters*, 22: 1217-1219.
44. **Nickerson, K.W., Zarnick W.J. ve Kramer, V.C.,** (1981), “Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*”, *The FEMS Microbiology Letters*, 12: 327-331.
45. **Packter, N.M. ve Flatman, S.,** (1983), “Characterization of acetoacetyl-CoA reductase (3-oxoreductase) from *Streptomyces coelicolor*: its possible role in polyhydroxybutyrate biosynthesis”, *Biochemical Society Transactions*, 11:598-599.
46. **Pool, R.,** (1989), “In search of the plastic potato”, *Science*, 245:1187-1189.
47. **Ranade, N. ve Vining, L.C.,** (1993), “Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*”, *Canadian Journal of Microbiology*, 39:377-383.
48. **Ryding, N.J., Anderson, T.B. ve Champness, W.C.,** (2002), “Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by absA, encoding a cluster-linked two-component system”, *Journal of Bacteriology*, 184:794-805.
49. **Sambrook, J., MacCallum, P. ve Russell, D.,** (2000), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
50. **Sambrook, J. ve Maniatis, T.,** (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
51. **Santamarta, I., Rodríguez-García, A., Pe´rez-Redondo R., Martín, J.F. ve Liras, P.,** (2002), “CcaR is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*”, *Journal of Bacteriology*, 184:3106–3113.
52. **Sola-Landa, A., Moura, R.S. ve 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*, 100: 6133–6138.
53. **Takano, E., Gramajo, H.C., Strauch, E., Andres, N., White, J. ve Bibb, M.J.,** (1992), “Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator

gene accounts for growth-phasedependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, *Molecular Microbiology*, 6: 2797–2804.

54. **Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. ve Martin, J. F.,** (2006), “Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of *DmdR1* to an iron box in the promoter of the *desA* gene”, *The FEBS Journal*, 274:1110–1122.
55. **Wang, Z., Crawford, D.L., Pometto, III.A.L. ve Rafii, F.,** (1989), “Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem”, *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 535-543.
56. **Whitehurst, J. ve Van Oort, M.,** (2009), *Enzymes in Food Technology*, Blackwell Publishing, pp-19, USA.
57. **Wietzorrek A. ve Bibb M.,** (1997), “A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold”, *Molecular Microbiology*, 25: 1181-1184.
58. **Wu K., Chang L., Revill 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
59. **Valappil S. P., Boccaccini A. R., Bucke C. ve Roy I.,** (2007), “Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 1–17.
60. **Verma S., Bhatia Y., Valappil S.P. ve Roy I.,** (2002), “A possible role of poly-3 hydroxybutyric acid in antibiotic production in *Streptomyces*”, *Archives of Microbiology*, 179: 66-9.
61. **Vionis, A.P., Katsifas, E.A. ve Karagouni, A.D.** (1998), “Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms,” *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 103-115.
62. **Yan, Y., Wu, Q. ve Zhang, R.,** (2008), “Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter*

vinelandii UWD characterized by ^{13}C NMR”, *FEMS Microbiology Letters*, 193: 269-273.

63. **Yılmaz M. ve Beyatlı Y.**, (2003), “Biyoplastik: poli- β -hidroksibutirat (PHB)”, *Orlab online mikrobiyoloji dergisi*, 9:1-33.
64. **Zagreba, E.D. Bonartseva, G.A. ve Myskina, V.L.**, (1990), “Relationship between poly- β -hydroxybutyrate content and nitrogenase and hydrogenase activity in some strains of *Rhizobium*”, *Microbiology*, 58: 742-745

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Demir, 1 Mart 1986'da, İstanbul'da doğdu. 2005 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2009 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.