

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BLDG VE CCAR REGÜLATÖR PROTEİNLERİNİN *STREPTOMYCES*
CLAVULİGERUS ' TA TUNİKAMİSİN BİYOSENTEZİ ÜZERİNE
ETKİLERİ

Lokman BAŞ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN
2016

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Lokman BAŞ tarafından hazırlanan “BldG ve CcaR Regülatör Proteinlerinin *Streptomyces clavuligerus*'ta Tunikamisin Biyosentezi Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 23/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK
Gebze Teknik Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Kübra ÖZKUL
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../20...

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

23/12/2016

...

Lokman BAŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BLDG VE CCA_R REGÜLATÖR PROTEİNLERİNİN *STREPTOMYCES CLAVULİGERUS* 'TA TUNİKAMİSİN BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Lokman Baş

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Kurt Kızıldoğan

Bir nükleozit antibiyotiği olan tunikamisin yapısal olarak diğer antibiyotiklerden oldukça farklı olup urasil, N-asetilglukozamin (GlcNAc), tunikamin adı verilen 11 karbonlu aminoaloz şeker ve farklı uzunlukta N-açıl yan zincirlerden oluşmaktadır. Tunikamisin bakteri hücre duvarı sentezinin peptidoglikan öncülü lipit I' in oluşumunu hedef aldığı bilinen ilk nükleozit tipi antibiyotik olup aynı zamanda ökaryotlarda erken ara ürün olan dolisilpirofosforil-N-asetilglukozaminin oluşumunu bloke eden protein N-glikolizasyon inhibitörüdür. Dolayısı ile protein glikolizasyonunu ve bakteri peptidoglikan biyosentezini inhibe etmesi bakımından oldukça önemli bir antibiyotiktir. Bu çalışmada, *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*)'ta tunikamisin biyosentezinde rol oynayan düzenleyici mekanizmaların belirlenmesi amacı ile pleiotropik *bldG* ve yolakta konumlanmış *ccaR* regülatör genlerinin tunikamisin biyosentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *bldG* ve *ccaR* genlerinin hücrede yok edilmesinin veya bu genlerin hücrede çoklu ifadeleri/kromozoma entegrasyonlarının tunikamisin biyosentezi ve üretimi üzerindeki muhtemel etkileri bunlara ait vektör kontrolleri ve yabancı suş ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Sadece *bldG* geninin çoklu kopyasını içeren *S. clavuligerus* LB1 ve tek kopyasının kromozoma entegre olduğu *S. clavuligerus* LB2 rekombinant suşları bu çalışmada oluşturulmuştur. Kullanılan diğer manipüle suşlar ise daha önceki çalışmalardan elde edilmiştir. Tunikamisin gen kümesinin ekspresyonunda meydana gelen değişimler qRT-PCR yöntemi ile tespit edilmiş, kontrol ve manipüle *S. clavuligerus* suşlarının tunikamisin üretimleri ise biyoassay ve HPLC yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ışığında, genel anlamda *bldG* regülatör geninin tunikamisin gen ifadeleri üzerinde negatif bir düzenlenmeyle alakalı bir rol üstleniyor olabileceği, *ccaR* regülatör geninin ise tunikamisin gen ifadesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olma potansiyeli taşıdığı fikrine varılmıştır.

Aralık 2016, 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tunikamisin, *bldG*, *ccaR*, *Streptomyces clavuligerus*, qRT-PCR, HPLC

ABSTRACT

Master's Thesis

THE EFFECTS OF BLDG AND CCAR REGULATORY PROTEINS IN
TUNICAMYCIN BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*

Lokman Baş

Ondokuz Mayıs University

Institute of Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Aslıhan Kurt Kızıldoğan

A nucleoside antibiotic tunicamycin differs structurally from other antibiotics by the presence of uracil, N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), tunicamine, a unique aminoaldose sugar with 11-carbon atoms, and N-acyl side chains. Tunicamycin is the first known nucleoside-type antibiotic targeting the formation of peptidoglycan precursor, Lipid I, in cell wall synthesis. In addition, it is also an N-glycosylation inhibitor that blocks the formation of dolichyl-pyrophosphoryl-N-acetylglucosamine (Dol-PP-GlcNAc), an early intermediate in eukaryotes. Therefore, it is a crucial antibiotic to inhibit protein N-glycosylation in eukaryotes and bacterial peptidoglycan biosynthesis. In this study, the effects of *bldG* pleiotropic and *ccaR* cluster-situated regulatory genes in the regulation of tunicamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) were investigated with the aim of deciphering regulatory mechanisms acting on this antibiotic biosynthesis. The possible effects of *bldG* and *ccaR* gene blockage or their multicopy expressions or integrations to the chromosome on the biosynthesis and production of tunicamycin in *S. clavuligerus* were determined by comparison with their respective vector controls and wild type strain. *S. clavuligerus* LB1 carrying multicopy *bldG* gene and *S. clavuligerus* LB2 that has an extra copy of *bldG* integrated into the chromosome have been constructed in this study. The other manipulated strains used were obtained from previous studies. The changes in the expression of tunicamycin gene cluster were determined by qRT-PCR. Tunicamycin production by the wild type and manipulated *S. clavuligerus* strains were compared by bioassay and HPLC methods. It can be concluded that in general, *bldG* regulatory gene might play a role in negative regulation of the gene expression of tunicamycin, whereas the *ccaR* regulatory gene might have the potential to have a positive effect on expression of tunicamycin gene cluster.

December 2016, 89 pages

Key Words: Tunicamycin, *bldG*, *ccaR*, *Streptomyces clavuligerus*, qRT-PCR, HPLC

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

“BldG ve CcaR Regülatör Proteinlerinin *Streptomyces clavuligerus*'ta Tunikamisin Biyosentezi Üzerine Etkileri” konulu bu araştırma üzerinde çalışma fırsatını veren; bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN başta olmak üzere, öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde akademik çalışmalarımı sürdüren Arş. Gör. Zafer SEÇGİN, A. Can OLCAY, Fatih BİLGİ, Gürkan BİLİR, Zir. Müh. Ömer TAŞ, Arş. Gör. Ferruh TURAN'a, Zir. Yük. Müh. Kenan KALAY'a ve de değerli çalışma arkadaşlarım Zir. Müh. Çiğdem OTUR ve Zir. Yük. Müh. Büşra ABANOZ'a, ayrıca ihtiyaç duyduğum her an destek ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca, her konuda maddi ve manevi desteğini hissettiğim, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan sevgili aileme ve özellikle tez çalışmalarını esnasında karşılaştığım zorlukları beraber aştığımız kardeşim Türkçe Öğretmeni İdris BAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklendiği için her daim bilim ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasının *bldG* geninin çoklu ifadesinin/kromozoma entegrasyonunun *S. clavuligerus*'ın tunikamisin biyosentezi üzerindeki etkisi ile ilgili olan kısmını PYO.ZRT.1905.14.005 nolu Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne ve 113Z961 nolu desteği projenin diğer tüm aşamalarının tamamlanmasını borçlu olduğum TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2016, Samsun

Lokman BAŞ



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Streptomyces</i> spp.....	1
1.2. Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bir Antibiyotik Üreticisi Olan <i>Streptomyces clavuligerus</i> (<i>S. clavuligerus</i>).....	4
1.3. Tunikamisin; Genel Özellikleri, Yapısı ve Etki Mekanizması	5
1.3.1. Genel özellikleri	5
1.3.2. Tunikamisin yapısı	5
1.3.3. Tunikamisinin etki mekanizmaları.....	7
1.3.3.1. Antiviral etki	7
1.3.3.2. Antibakteriyel etki.....	7
1.3.3.3. Ökaryotlarda N-bağlı glikoprotein biyosentezini inhibisyonu.....	9
1.4. Tunikamisin Biyosentezi.....	11
1.5. Tunikamisin Gen Kümesi	14
1.6. <i>S. clavuligerus</i> 'ta Antibiyotik Biyosentezinin Düzenlenmesi	16
1.6.1. Yolak-özü regülatörler (CSR'ler)	16
1.6.2. Global pleiotropik regülatörler.....	18
1.7. Mevcut Çalışma	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM	23
2.1. Bakteri Suşları, Plazmitler, Besiyerler Ve Kültür Koşulları.....	23
2.2. Besiyerler	25
2.3. Tamponlar ve Çözeltiler.....	25
2.4. Kimyasallar ve Enzimler	25
2.5. <i>S. clavuligerus</i> 'dan genomik DNA izolasyonu	25
2.6. <i>E. coli</i> 'den Manuel Yöntemle ve Kit Kullanarak Plazmit DNA İzolasyonu ..	25
2.7. <i>E. coli</i> Alıcı Hücrelerinin Hazırlanması.....	26
2.8. <i>E. coli</i> Alıcı Hücrelerinin Transformasyonu	26
2.9. Konjugasyon Metodu ile <i>E. coli</i> 'den <i>S. clavuligerus</i> 'a Plazmit DNA Transferi	27
2.10. DNA'nın Manipülasyonu.....	28
2.10.1. Restriksiyon endonükleaz kesimleri	28
2.10.2. Agaroz jel elektroforezi	28
2.10.3. DNA parçalarının agaroz jelden saflaştırılması	28
2.10.4. Ligasyon reaksiyonları	28
2.11. Primer Dizayını	29
2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
2.12.1. Standart PCR.....	29
2.12.2. Koloni PCR	30

2.13. Dizileme Reaksiyonu	30
2.14. Fermentasyon Çalışmaları: Bioassay ve HPLC Analizleri	30
2.14.1. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi	30
2.14.2. Kültürlerdeki tunikamisin üretiminin biyoassay deneyleri ile belirlenmesi	30
2.14.3. HPLC ile tunikamisin miktarının belirlenmesi	32
2.15. RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	33
2.16. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR).....	34
2.17. qRT-PCR Verilerinin Rölatif Kuantifikasyonu.....	35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1. <i>bldG</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması ve pGEM-T® Easy Ara Vektörüne Klonlanması.....	37
3.1.1. <i>S. clavuligerus</i> 'dan genomik DNA izolasyonu.....	37
3.1.2. <i>bldG</i> geninin PCR ile çoğaltılması.....	37
3.1.3. <i>bldG</i> genin pGEM-T® Easy vektörüne klonlanması.....	38
3.2. <i>bldG</i> Geninin pSPG Çoklu Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	39
3.3. <i>bldG</i> Geninin pSET152ErmE*Entegrasyon Vektörüne Klonlanması	40
3.4. Rekombinant <i>E. coli</i> Suşları ve <i>S. clavuligerus</i> Arasında Konjugasyon	42
3.5. Manipüle Suşlarda Tunikamisin Üretiminin Biyoassay ve HPLC Analizi ile Karşılaştırılması.....	45
3.5.1. Kontrol ve manipüle suşlarda DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi	46
3.5.2. Kontrol ve manipüle suşlarda tunikamisin üretiminin biyoassay ile belirlenmesi	47
3.5.3. Kontrol ve manipüle suşlarda tunikamisin üretiminin HPLC analizi ile karşılaştırılması	50
3.6. <i>bldG</i> ve <i>ccaR</i> Regülatör Geni Manipüle Suşlarda Tunikamisin Gen Kümesinin Ekspresyonu.....	54
3.6.1. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 suşunda tunikamisin gen kümesinin amplifikasyon ve ergime eğrileri.....	55
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
EKLER	67
EK 1- <i>BLDG</i> GENİNE AİT SEKANS.....	68
EK 2- KULLANILAN PLAZMİTLER VE DNA MARKÖR.....	69
EK 3- KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ	71
EK 4- BESİYERLERİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ.....	72
EK 5- TAMPONLAR VE SOLÜSYONLAR.....	74
EK 6- KİMYASALLAR VE ENZİMLER.....	77
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

ATTC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyon
NRRL	: Tarımsal Araştırma Servisi Koleksiyon
dH ₂ O	: Distile (Saf) Su
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
EtBr	: Etidyum Bromür
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
RT	: Reverse Transkripsiyon
M	: Molar
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı PCR
Kb	: Kilobaz
bç	: Baz Çifti
g	: Gram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
dk	: Dakika
sn	: Saniye
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
cDNA	: Komplementer DNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>S. coelicolor</i> ' ait gelişimsel yaşam döngüsü.....	2
Şekil 1.2. <i>S. lividans</i> ' a ait koloni gelişim safhalarının taramalı mikroskop altında görünümü.....	3
Şekil 1.3. <i>S. clavuligerus</i> tarafından üretilen sekonder bileşiklerin bazıları.....	5
Şekil 1.4. Tunikamisin yapısı ve numaralandırma sistemi	6
Şekil 1.5. Peptidoglikan biyosentez yolağı	8
Şekil 1.6. MraY tarafından katalizlenen lipit I sentezi.....	9
Şekil 1.7. Tunikamisinin GPT tarafından katalizlenen reaksiyon ile ilişkisi.....	10
Şekil 1.8. Tunikamisin biyosentez yolağı	12
Şekil 1.9. Tunikamisin biyosentetik gen kümesinin <i>S. chartreusis</i> ' taki genetik organizasyonu ve <i>S. clavuligerus</i> ile <i>A. mirum</i> 'daki homologları.....	15
Şekil 1.10. <i>S. clavuligerus</i> 'ta klavulanik biyosentezinin regülasyonu	20
Şekil 2.1. Biyoassay deneylerinde kullanılmak üzere TSBYG besiyerlerinde üreyen kültürlerden elde edilen tunikamisin kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 2.2. Tunikamisin standardının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramı	33
Şekil 3.1. <i>S. clavuligerus</i> 'tan izole edilen kromozomal DNA	37
Şekil 3.2. <i>S. clavuligerus</i> 'a ait kromozomal DNA kalıp olarak kullanılarak <i>bldG</i> geninin PCR ile çoğaltılması	38
Şekil 3.3. Rekombinant pLB14 vektörün PCR ve enzim kesimi ile doğrulanması ...	39
Şekil 3.4. pSPG ve pLB14 vektörlerinin <i>NdeI</i> ve <i>SpeI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi	40
Şekil 3.5. Rekombinant pLB1vektörünün PCR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması	40
Şekil 3.6. pLB14 ve pSET152Erme* vektörlerinin <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimi ile kesimi	41
Şekil 3.7. Rekombinant pLB2 vektörünün <i>NdeI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi	42
Şekil 3.8. Rekombinant pLB1ET vektörünün ikili restriksiyon enzim kesimi ve PCR ile doğrulanması	43
Şekil 3.9. Rekombinant pLB2ET vektörünün ikili restriksiyon enzim kesimi ve PCR ile doğrulanması	43
Şekil 3.10. pLB1ET'nin <i>S. clavuligerus</i> 'a konjugasyon ile aktarılması sonrasında CaCl ₂ (a) ve MgCl ₂ (b) içeren MS agarlarda üreyen ekskonjugantların görünümü	44
Şekil 3.11. pLB1ET vektörünü taşıyan rekombinant <i>S. clavuligerus</i> suşunun PCR ile doğrulanması	44
Şekil 3.12. pLB2ET vektörünün kromozoma entegre olduğu rekombinant <i>S. clavuligerus</i> suşunun PCR ile doğrulanması.....	45
Şekil 3.13. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064(□), <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>bldG</i> (■) ve rekombinant suşların, LB1 (▲), LB2(●), pSPG (Δ), pSET152 (○) TSBYG besiyerinde zamana bağlı üreme profilleri	47
Şekil 3.14. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064(■), <i>S. clavuligerus</i> <i>ccaR::aph</i> (□) ve rekombinant suşların pSET-PC(●), AK23(▲), pSPG(Δ), pSET152(○), TSBYG besiyerinde zamana bağlı üreme profilleri.....	47

Şekil 3.15. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 suşu ile <i>bldG</i> ve <i>ccaR</i> genleri manipüle suşlarda ve bunların vektör kontrollerinde volumetrik tunikamisin üretimlerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 3.16. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 suşu ile <i>bldG</i> ve <i>ccaR</i> genleri manipüle suşlarda ve bunların vektör kontrollerinde spesifik tunikamisin üretimlerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.17. HPLC analizi sonucunda elde edilen tunikamisin standardı (0.1 mg/ml)'na ait kromatogram	50
Şekil 3.18. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 ve manipüle suşlarda tunikamisin örneklerine ait kromatogramlar	51
Şekil 3.19. Tüm bakterilerden elde edilen RNA örnekleri.....	55
Şekil 3.20. Optimize edilmiş koşullarda <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064'de <i>hrdB</i> referans geni ve de <i>tun</i> gen kümesine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon (ergime) eğrileri	56
Şekil 3.21. qRT-PCR ile <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 kontrol suşuna kıyasla <i>S. clavuligerus</i> $\Delta bldG$, <i>S. clavuligerus</i> LB1, <i>S. clavuligerus</i> LB2 ve vektör kontrolleri <i>S. clavuligerus</i> pSPG ve <i>S. clavuligerus</i> pSET152'de tunikamisin gen kümesindeki genlerin rölatif ifade değerleri.....	59
Şekil 3.22. qRT-PCR ile <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 kontrol suşuna kıyasla <i>S. clavuligerus</i> <i>ccaR::aph</i> , <i>S. clavuligerus</i> pAK23, <i>S. clavuligerus</i> pSET-PC ve vektör kontrolleri <i>S. clavuligerus</i> pSPG ve <i>S. clavuligerus</i> pSET152'de tunikamisin gen kümesindeki genlerin rölatif ifade değerleri.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bergey'in Sistematik Biyoloji kitabına dayalı olarak yapılan <i>Streptomyces</i> sınıflandırması.....	1
Çizelge 2.1.. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler.....	24
Çizelge 2.2. Standart bir PCR reaksiyonu ve uygulanan koşullar.....	30
Çizelge 2.3. Biorad CFX96 cihazında Real time PCR koşulları.....	34
Çizelge 3.1. HPLC ile belirlenen her bir suşa ait tunikamisin üretimleri.....	50
Çizelge 3.2. İzole edilen RNA örneklerinin nanodrop analiz sonuçları.....	55
Çizelge 3.3. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064'te <i>tun</i> gen kümesine ait genlerin amplifikasyon eğrileri ve ergime analizlerine ait Ct ve Tm değerleri...	58
Çizelge 3.4. qRT-PCR sonuçlarına göre elde edilen rölatif ifade değerleri	60



1. GİRİŞ

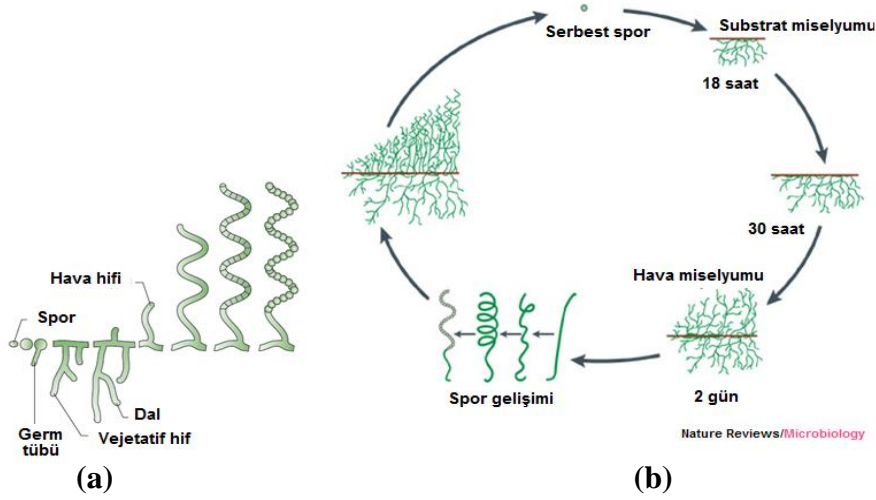
1.1. *Streptomyces* spp.

Streptomyces, Actinomycetes ailesine üye olan büyüleyici bir cinstir. Gram-pozitif, filamentli, spor oluşturan ve zorunlu aerobik olan bu bakteriler yüksek G-C oranına sahip (%70-74) lineer kromozom taşırlar. Birçok streptomiset, toprakta yaşayan saprofitik mikroorganizmalar olmakla birlikte, deniz ve tatlı su gibi habitlarda ve de ayrıca bitki (örneğin, *S. scabies*) ve hayvanlar (örneğin balık akciğerinde hastalık semptomlarına neden olan *S. griseus*) üzerinde yaşamaya uyum sağlamışlardır (Hopwood, 2007; Chater vd, 2010; Kurt, 2011). Bergey' in Sistematik Biyoloji kitabına göre yapılan sınıflandırma Çizelge 1.1'de verilmektedir (Garrity vd, 2004; Kurt, 2011).

Çizelge 1.1. Bergey'in Sistematik Biyoloji kitabına dayalı olarak yapılan *Streptomyces* sınıflandırması

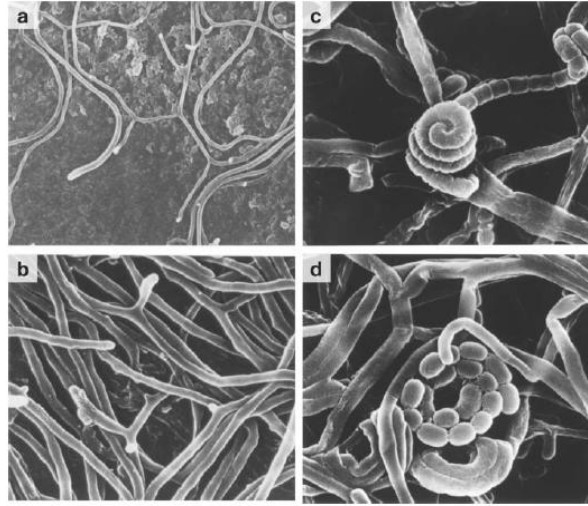
Domain	<i>Bacteria</i>	Takım I	<i>Actinomycetales</i>
Şube BXIV	<i>Actinobacteria</i>	Alttakım XIV	<i>Streptomycineae</i>
Sınıf I	<i>Actinobacteria</i>	Aile I	<i>Streptomycetaceae</i>
Altsınıf V	<i>Actinobacteridae</i>	CinsI	<i>Streptomyces</i>

Streptomyces spp. apikal büyüme, dallanma ve morfogenezi filamentli funguslara benzemektedir. Bu cinsin karmaşık yaşam döngüsü dört evreye ayrılır: (i) serbest sporun çimlenmesi, (ii) vejetatif miselin oluşması, (iii) hava misellerinin gelişimi-çok çeşitli sekonder metabolitleri üretme yeteneğinin kazanılması ve (iv) spor morfogenezi (Flärdh, 2003; Goriely & Tabor, 2003; Chater, 2006; Kurt, 2011) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *S. coelicolor*' ait gelişimsel yaşam döngüsü; (a) Flärdh & Buttner (2009), (b) <http://twistedbacteria.blogspot.com/2007/08/streptomyces-theyre-twisted.html>

Sporlar uç kısımlarındaki uzantılar ile çimlenerek uzun filamentli hifleri meydana getirirler. Bu hiflerin bir kısmı besin içerisinde büyümekle birlikte bir kısmı ise besinlerin yüzey kısmında büyüyerek dallanırlar ve substrat miselyumunu oluştururlar (vejetatif üreme evresi). Bu evreyi hava misellerinin gelişimi takip eder. Katı besiyerinde üreyen mikroorganizma bu gelişim döneminde herhangi bir besin yokluğu veya diğer sinyal/uyarılarla bağlı olarak sekonder metabolitleri üretir. Sıvı kültürlerde ise sekonder metabolitlerin üretimi genellikle üremenin durgunluk fazıyla sınırlı olup çoğu kez besin sınırlanmasının bir göstergesi olarak ortaya çıkar. Bu yaşam döngüsü, hava hiflerinin hücre bölünmesine uğraması ve gri pigment karakteristiğine sahip serbest sporları oluşturması ile tamamlanır (Goriely & Tabor, 2003; Flärdh & Buttner, 2009; Chater vd, 2010; Kurt, 2011) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. *S. lividans*' a ait koloni gelişim safhalarının taramalı mikroskop altında görünümü (a) Genç vejetatif misel, (b) Hava dalları oluşturan olgun vejetatif miseller, (c) Prespor formunu veren hava hifleri, (d) Olgun spor zincirleri (Hopwood, 2006)

Streptomyces spp. antibakteriyel ve antifungal antibiyotikleri, sideroforları, antitümör ajanlarını, bitki büyümesini teşvik eden faktörleri, herbisit ve immunosüpressör gibi birçok biyolojik açıdan aktif sekonder metabolitleri, ayrıca enzim ve enzim inhibitörleri gibi çok çeşitli maddeleri üretebilen oldukça önemli bir cinstir (Oskay, 2009). Şimdiye kadar keşfedilen tüm sekonder metabolitlerin %66'sı Actinomycetes tarafından üretilmekte ve bunların da %70-80 oranındaki kısmı *Streptomyces* cinsi tarafından üretilmektedir (Challis & Hopwood, 2003). *Streptomyces*'in karakteristik misel oluşumu büyük ölçekli fermantasyonlarda sekonder metabolit üretim verimliliğini etkileyen önemli bir faktördür (Flärdh, 2003; Kurt, 2011).

Actinomycetes grubu 5 ila 9 megabazlık (Mb) büyük bir genoma sahip olup bu genomun %5-10' u sekonder metabolit biyosentezinde görev almaktadır (Baltz, 2008). *Streptomyces*' lerin bir diğer çarpıcı özelliği ise büyük bir linear koromozoma sahip olmalarıdır. Bu kromozomlar yapısal genleri içeren bir çekirdek bölgesinden ve horizontal gen transferi ile kazanılmış koşullu adaptif genlerden oluşan iki "kol" kısmından meydana gelmektedir. Ayrıca, *Streptomyces*' te 12 kb'dan yüzlerce kilobaz (kb) büyüklüğüne kadar değişik boyutlarda olabilen dairesel ve lineer plazmitler bulunmaktadır ve lineer plazmitler sekonder metabolit üretiminde rol almaktadırlar (Hoch vd, 1993; Chang & Cohen, 1994; Kieser, 2000; Kurt, 2011). *Streptomyces*' te replikasyon *oriC* adı verilen tipik bir merkezi orijinden iki yönlü olarak gerçekleşmektedir. Lineer plazmit ve kromozomların replikasyonu sırasında kesintili zincirdeki replikasyon bu zincirin 5' ucunda bulunan terminal proteinin varlığı ile

sağlanmaktadır. Ayrıca, lineer kromozom ve plazmitlerin her iki uç kısmında, büyüklüğü 1 ila 550 kb arasında değişen ve palindromik dizilerden oluşan terminal tekrarlar (terminal inverted repeats-TIRs) bulunmaktadır (Huang vd, 1998; Hopwood, 2006). *Streptomyces* lineer kromozomunda, TIR' ler yardımıyla uç bölgelerindeki nükleotit dizilerinde gerçekleşen rekombinasyonun ardından devingen düzenlenmeler sonucunda dairesel kromozomların oluştuğu ve ayrıca oransız krossing over yoluyla büyük terminal kopmalar ve çoğalmalar gerçekleştiği tespit edilmiştir (Volf & Altenbuchner, 1998).

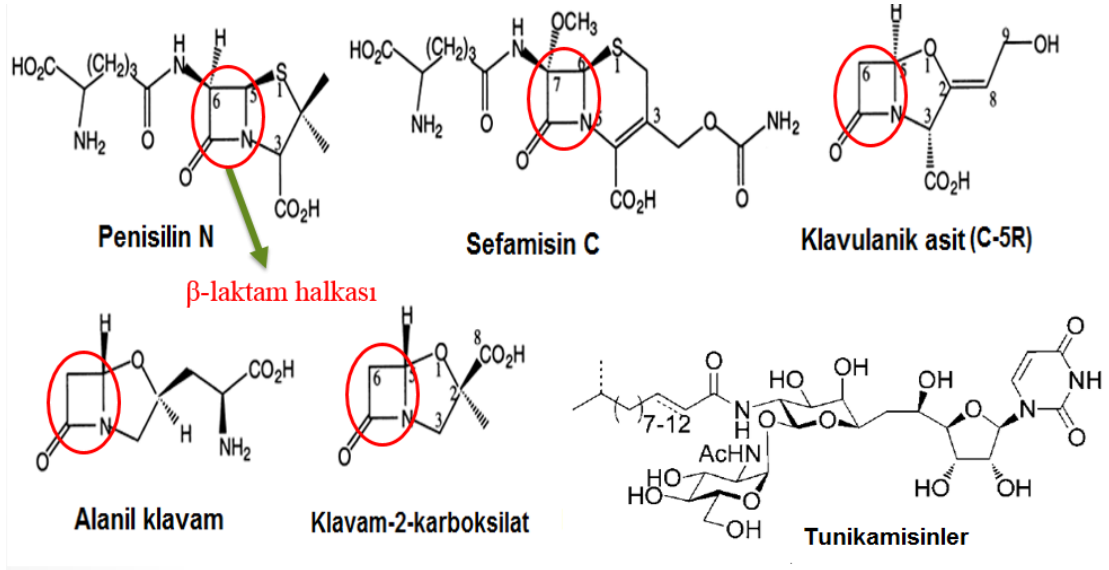
Streptomyces spp. sahip olduğu güçlü restriksiyon bariyerlerinden dolayı transformasyonu oldukça zor olan bir cinstir. Bu restriksiyon bariyer sistemi farklı bakterilere ait DNA' nın *Streptomyces* konakçısına transferini zorlaştırır (Matsushima vd, 1987; Kurt, 2011).

Streptomyces coelicolor (A3) (Bentley vd, 2002), *S. avermitilis* (Ikeda vd, 2003), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Medema vd, 2010) ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 (Song vd, 2010)'a ait genom dizileri yayımlanmıştır. Bu bakterilerin genom büyüklükleri sırasıyla 8.8, 9, 6.8 ve 6.7 Mb 'dır.

1.2. Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bir Antibiyotik Üreticisi Olan *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*)

Streptomyces clavuligerus ilk kez Güney Amerika'daki bir toprak örneğinden izole edilmiş ve izole edilen 1852 suş arasından sefalosporin üreticisi olarak karakterize edilmiştir. Kulup şeklindeki yan zincirlerinin varlığından dolayı "küçük kuluplar taşıyan" anlamına gelen "*clavuligerus*" adı verilmiştir. Bu tür, Tarımsal Araştırma Servisi Koleksiyonu tarafından NRRL3585 ve Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonunda ise ATCC27064 olarak kayıt altına alınmıştır. Tıp suş NRRL3585 (=27064)' dir (Higgins & Kastner, 1971).

Yapılan antibiyotik araştırmaları sonucunda *S. clavuligerus* 20'den fazla sekonder metabolit üretebilme kabiliyeti onun biyoteknolojik açıdan çok önemli bir kaynak olarak değerlendirmesini sağlamıştır. Bunlardan bir kısmı β -laktam antibiyotikleri, antitümör ajanları, antifungaller ve β -laktamaz- inhibitörleridir (Thai vd, 2001) (Şekil 1.3). Ayrıca *S. clavuligerus*, tıbbi açıdan çok değerli bir sekonder metabolit olarak bir nükleozit antibiyotiği tunikamisini üretmektedir.



Şekil 1.3. *S. clavuligerus* tarafından üretilen sekonder bileşiklerin bazıları (Thai vd, 2001; Price & Tsvetanova, 2007)

1.3. Tunikamisin; Genel Özellikleri, Yapısı ve Etki Mekanizması

1.3.1. Genel özellikleri

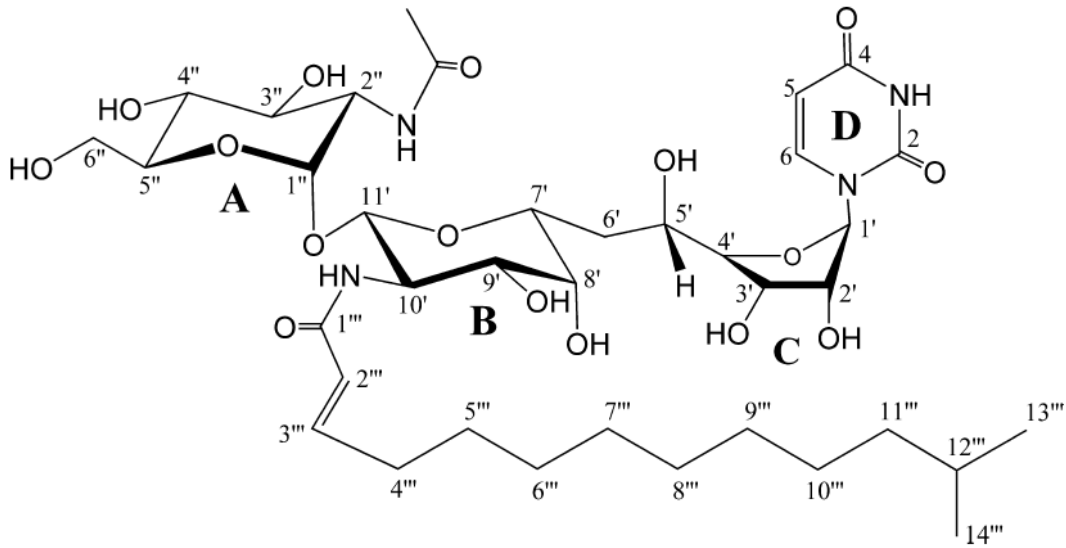
Tunikamisinler nükleozit antibiyotikleri grubu üyesidirler. Bakteri peptidoglikan biyosentezinin ve ökaryotlarda N-bağlantılı protein glikolizasyonunun inhibisyonunu sağlamaktadırlar (Wyszynski, 2010).

Tunikamisin ilk defa 1971 yılında Takatsuki ve arkadaşları tarafından antibiyotik aktivitelerini belirlemek üzere taranan 4000 üzerinde *Actinomyces* suşunun arasından *Streptomyces lysosuperificus* türü toprak bakterisinden izole edilmiştir (Takatsuki vd, 1971; Wyszynski, 2010). 1979 yılında ise aynı antibiyotiğin '*S. clavuligerus*' tarafından üretildiği belirlenmiştir. Ardından, 1980 yılında tunikamisin *Streptomyces chartreusis* suşlarından izole edilmiştir (Wyszynski, 2010).

1.3.2. Tunikamisin yapısı

Tunikamisin yapısı; urasil, N-asetilglukozamin (GlcNAc), olağandışı bir yapı olan 11 karbonlu 2-aminodialdoz şekeri (tunikamin) ve değişik uzunluklu bir N- açıl yağ asidi zincirinden oluşmaktadır. Bütün tunikamisin ailesi üyelerinin çekirdek yapısı sıradışı bir özelliğe sahiptir. Sıradışı yapı; bir C-C bağıyla kuyruk kuyruğa bağlanmış riboz ve 6-deoksi-galaktozamin rezidülerinden oluşan benzersiz 11 karbon-dialdoz tunikamin

olarak bilinir. Bu psödodisakkaritin bir ucunda N-glikozidal bağlı bir urasil grubu, diğesinde ise α , β -trehaloz olarak da bilinen, indirgemeyen (non-reducing) α , β -1,1 glikozidik bağ ile bağlanmış bir *N* asetil- *D*-glukozamin (GlcNAc) rezidüsü bulunur. Tunikamisin ailesinin çeşitliliği, bu ortak tunikamisin iskelet yapısının azotuna bağlanmış (*N*-bağlı) açıl halkasının doğasından ileri gelmektedir Doğal tunikamisin kompleksi, 10 ya da daha fazla sayıda farklı *N*-bağlı açıl zincirlerinin kombinasyonu ile meydana gelir. Tunikamisin homologları yağ asidi yan zincirlerinin uzunluk, dallanma ve saturasyon bakımından varyasyonu ile oluşmaktadır (Tsvetanova & Price, 2001; Price & Tsvetanova, 2007) (Şekil 1.4). Doğal tunikamisin ailesi antibiyotiklerinin, (mikospodinler, streptovirüdinler, MM19290 ve korinetoksinler) *N*-açıl zincirlerindeki farklılıklar ve/veya 5,6-dihidrourasilin uraçille yer değiştirmesi haricinde, tüm türevleri yapısal olarak benzerdir ve büyük olasılıkla, benzer biyosentetik metabolik yollara sahiptirler (Eckardt, 1983; Price & Tsvetanova, 2007).



Şekil 1.4. Tunikamisin yapısı ve numaralandırma sistemi, **A**; α -bağlı *D*-GlcNAc, **B**; β -bağlı psödo-GalNAc, **C**; psödo *D*-ribosil, **D**; *N*-bağlı urasil (Price & Tsvetanova, 2007)

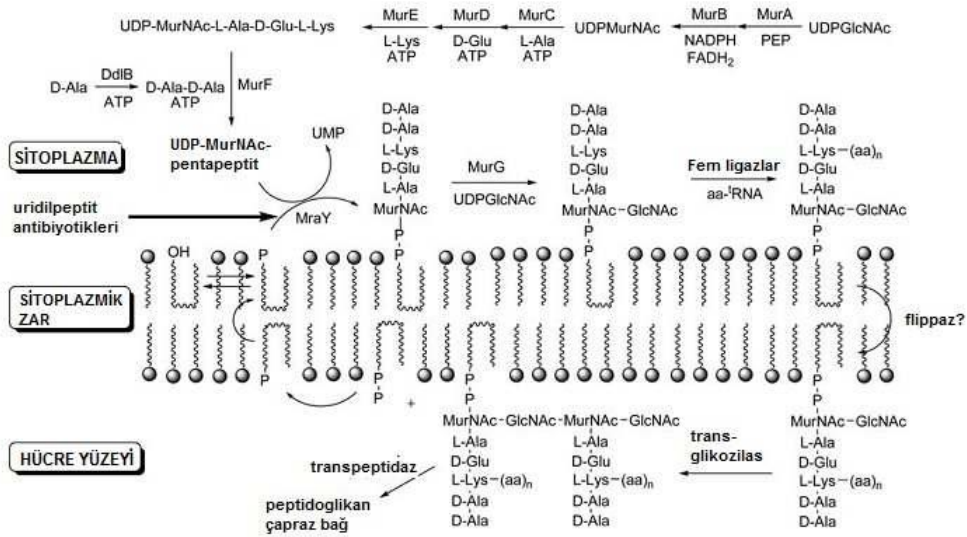
1.3.3. Tunikamisinin etki mekanizmaları

1.3.3.1. Antiviral etki

Tunikamisin hayvan ve bitki virüslerine, gram pozitif bakterilere, maya ve funguslara karşı aktif bir glukozamin antibiyotığıdır. Tunikamisinin hücre kültürlerindeki Newcastle Hastalık virüsü ve herpes simplex virüsünün çoğalmasını inhibe ettiği ve ayrıca tütün yapraklarında tütün mozaik virüsünün neden olduğu lezyon oluşumunu baskıladığı yapılan ilk karakterizasyon çalışmalarında tespit edilmiştir (Takatsuki, 1971). DNA, RNA ve protein sentezi dahil olmak üzere, virüsün yaşam döngüsünün farklı aşamaları, antibiyotik için birer hedef olarak sıralı bir şekilde açığa çıkarılmıştır.

1.3.3.2. Antibakteriyel etki

Tunikamisinler bakteri hücre duvarı sentezinin güçlü inhibitörleridirler. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikandan oluşur. Peptidoglikan, birbirini izleyen N-asetil müramik asit (MurNAc) ve N-asetil glukozaminin (GlcNAc) β -1,4-glikozidik bağlı polisakkaritinden meydana gelmektedir. MurNAc, bir 3-O-laktül yan zinciri taşıyan GlcNAc rezidüsünden oluşmaktadır (Şekil 1.5). Bakterilerde peptidoglikan biyosentezindeki ilk aşama, sitoplazmada UDP-MurNAc pentapeptidinin oluşturulmasıdır. UDP-MurNAc'ın oluşturulması için fosfoenolpiruvat (PEP) metabolik öncülü olan UDP-GlcNAc'ye parçalanır. Hücre içi peptidoglikan oluşumu Mur A ve Mur B enzimleri tarafından katalizlenen ve UDP-GlcNAc' in UDP-MurNAc' e dönüşüm reaksiyonu ile devam eder.

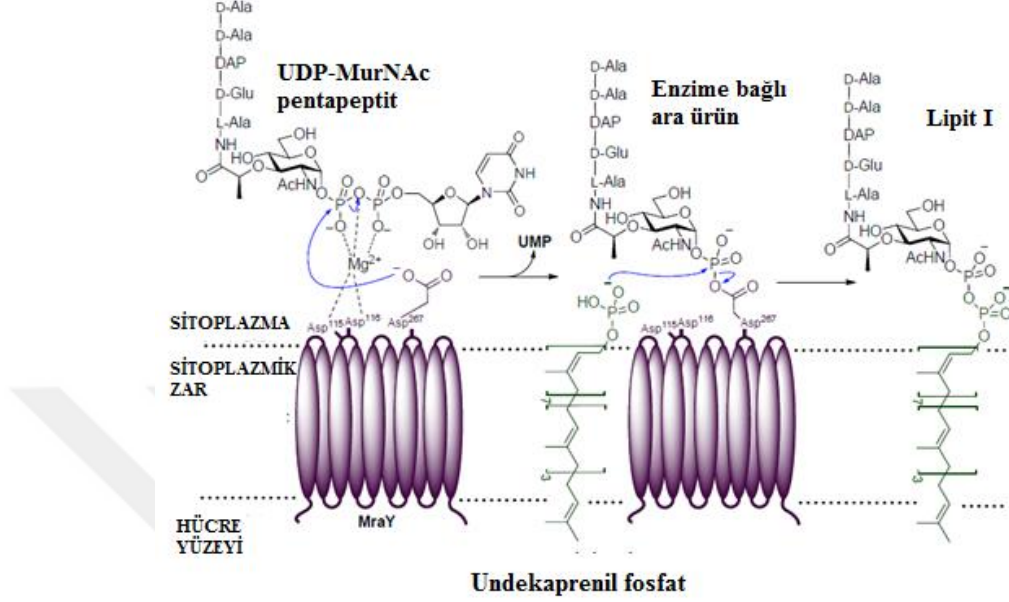


Şekil 1.5. Peptidoglikan biyosentez yolağı (Winn vd.,2010)

L-alaninden başlayarak ardarda beş aminoasit UDP-MurNAc'in laktil altyapısına bağlanır ve Mur C tarafından katalize edilen reaksiyon ürünü olarak UDP-MurNAc-L-Ala meydana gelir. Ardından, UDP-MurNAc-L-Ala'nın UDP-MurNAc-pentapeptit'e dönüşmesinde ATP-bağımlı ligazlar olan Mur D, Mur E ve Mur F rol oynamaktadır. Son olarak, UDP-MurNAc-pentapeptit membrana-bağlı lipit ağı undekaprenil (Un) fosfata bağlanır ve lipit'i meydana getirir. Bu reaksiyon bakteri membran proteini translokaz I (MraY) aracılığıyla gerçekleştirilir. Translokaz II (Mur G) tarafından katalize edilen diğer GlcNAc biriminin eklenmesi lipit II'yi oluşturur ve peptidoglikan biyosentezinin hücre içi kısmını tamamlar. Daha sonra, bir flippaz proteini bu ileri düzey ara ürünü, transglükozilaz enzimleri (penisilin bağlama protein ailesinin bir kısmı) tarafından polimerize edildiği yer olan sitoplazmik membranın diğer tarafına götürüp getirir. Undekaprenol fosfat lipit taşıyıcısı bu noktada serbest kalır ve hücreye geri döner. Oluşan polisakaritlerin karşılıklı bağlanması transpeptidazlar (penisilin bağlama protein ailesinin bir kısmı) sayesinde gerçekleşir. Hücre dışı kısımda peptidoglikan oluşumu belirtildiği gibi trans-glikolizasyon ve transpeptidasyon reaksiyonlarıyla tamamlanır (Wyszynski, 2010).

Tunikamisinler, bakteri hücre duvarı sentezi üzerindeki güçlü inhibitör etkilerini kilit roldeki peptidoglikan öncülü undekaprenil-pirofosforil-N-asetilmüramil pentapeptit (Lipit I) oluşumunu katalize eden MraY'yi hedef alarak gösterirler. Yapıları substrat analogu gibi rol oynar ve aktif bölgeyi engelleyerek transfer reaksiyonunun geçiş durumunu taklit eder (Kimura & Bugg, 2003; Xu vd, 2004; Winn vd, 2010)

(Şekil 1.6). MraY'nin diğer inhibitörleri genellikle uridilpeptit ve yağ açıl nükleozit antibiyotiklerinden oluşur (Tkacz & Lampen, 1975; Wyszynski, 2010).



Şekil 1.6. MraY tarafından katalizlenen lipit I sentezi (Wyszynski, 2010)

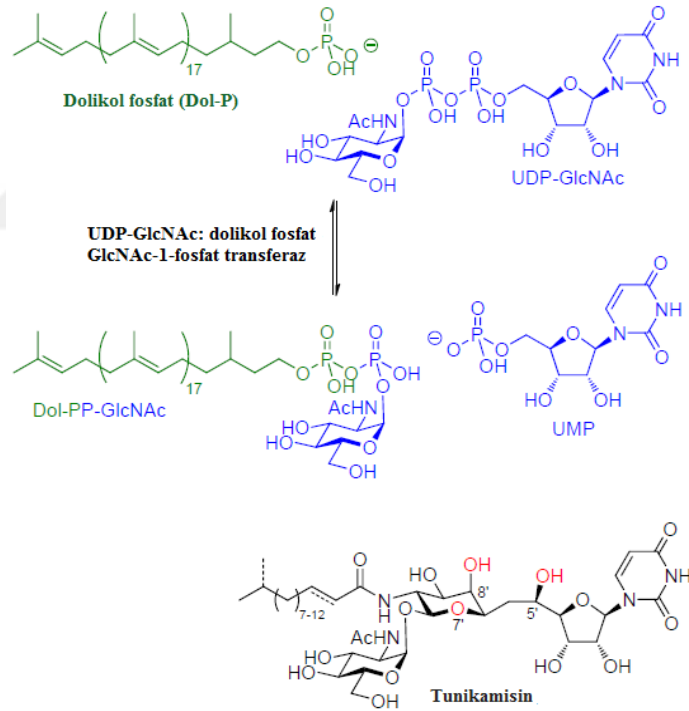
Peptidoglikan biyosentezine karşı aktivite gösteren vankomisin, teikoplanin, moenomisin ve β -laktamlar gibi doğal ürünlerin keşfi ve karakterizasyonu, tunikamisinlerin etki mekanizmalarının anlaşılması açısından katkı sağlamaktadır (Chen vd, 2010; Wyszynski vd, 2010).

1.3.3.3. Ökaryotlarda N-bağlı glikoprotein biyosentezini inhibisyonu

Proteinlerin N-bağlı glikozilasyonu, tüm ökaryotlarda ve birçok arkea'da en yaygın kovalent protein modifikasyonu iken, bakterilerde bu olay nadiren gözlenir. Dolayısı ile tunikamisin birçok farklı biyolojik sistemdeki glikoproteinlerin çalışılması için oldukça önemli bir araç haline gelmiştir. Ancak, protein N glikozilasyonun ilk aşamasında rol oynayan ökaryotik GPT'nin inhibisyonu ile ilişkili olarak memelilerde sitotoksositeye yol açmaları sebebiyle antibakteriyel ajan olarak kullanımları oldukça sınırlıdır (Kimura & Bugg, 2003; Winn vd, 2010).

Tunikamisinler ökaryotlarda tunikamisin N-bağlantılı protein glikolizasyonundaki ilk basamağı katalize eden, UDP-N-asetilglukozamin dolikol

fosfat GlcNAc-1-P-transferaz (GPT)'nin transisyon durum analogu (GlcNAc-1-P)'nu taklit ederler (Şekil 1.7). Böylelikle, N-bağlantılı protein glikolizasyonun dolikol yolağındaki ilk aşamayı, membran bağı N-asetil glukozamin pirofosforil dolikol (GlcNAc-PP-Dol) oluşumunu inhibe ederler. Bu inhibisyon, erken aşamada protein N-glikozilasyonunu sonlandırdığından önemli post-translasyonel modifikasyonların çalışılmasına olanak tanımaktadır. Aynı zamanda, tunikamisin, kullanılan memeli hücre hatlarında üretilen hedef proteinlerin homojenitesinden emin olmak için hücre kültürü uygulamalarında kullanılır (Elbein, 1987; Wyszynski, 2010). Ayrıca, tunikamisinlerin palmitoyltransferazı durdurarak açıl-proteinlerin N-palmoytilasyonunu bloke ettikleri gösterilmiştir (Patterson & Skene, 1994; Liang vd, 2002; Price & Tsvetanova, 2007). Palmitoyltransferaz, yağ asitlerinin proteinlerin sistein kısımlarına bağlanmalarını ve membrana bağı olan proteinlerin lipofiliterinin artırılmasını sağlayarak işlev görmektedir.



Şekil 1.7. Tunikamisinin GPT tarafından katalizlenen reaksiyon ile ilişkisi (Wyszynski, 2010)

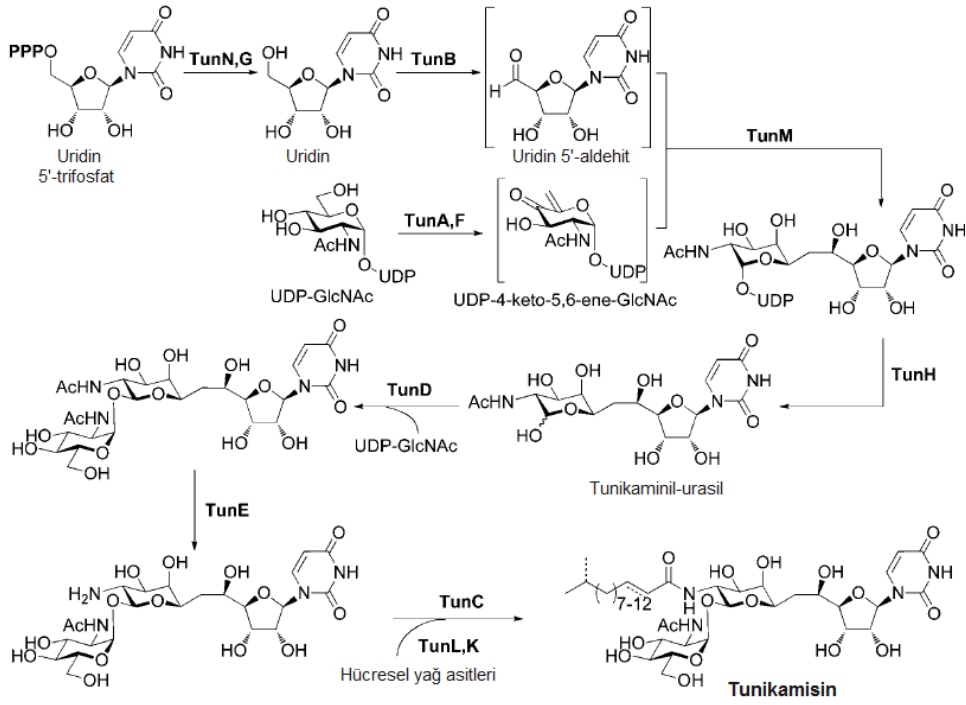
Tunikamisin 0.05-0.1 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değerine sahip GPT inhibitörüdür, inhibisyonunun geri-döndürülebilir olduğu ve her iki substrata göre yarışmalı olmadığı bildirilmiştir. Bunun aksine 44 $\mu\text{g/ml}$ 'de MraY'nin inhibisyonu 500 kat daha düşüktür ve nükleotit substrata göre yarışmalı, lipid fosfata göre yarışmasızdır (Brandish vd, 1996; Wyszynski, 2010). İki olayda da tunikamisin eş aksiyon modu ve iki enzimin

benzerliği düşünöldüğünde dikkat çekicidir. Bu farklılıklar tunikamisinin MraY tarafından kullanılan pentapeptit-içeren UDP-MurNAc'yi taklidinin GPT'nin UDP-GlcNAc substratı kadar iyi olmamasından kaynaklanması muhtemeldir (Wyszynski, 2010).

Tunikamisin birçok memeli tümör hücre kültürüne karşı sitotoksik bir etki göstermektedir. Tümörlerin beslenmesini ve üremesini sağlayan vaskülarizasyonu engelleyici anti-angiogenik etkisi sebebiyle meme kanseri tedavisinde kullanılmıştır (Banerjee vd, 2011). Ayrıca tunikamisinin antikanser ilaçları ile birlikte kullanımı çoklu ilaç direncine sahip yumurtalık cystadenocarcinoma hücrelerinin ilaca olan hassasiyetini artırmaktadır (Hiss vd, 2007). Tunikamisin, N-glikanların sentezini inhibe ettiği ve G1 fazında hücre döngüsünün duraklamasına neden olduğu için diyabet gibi otoimmün hastalıklarının tedavisinde de fayda sağlayabilmektedir (Shaabani vd, 2012).

1.4. Tunikamisin Biyosentezi

Tunikamisin yapısında yer alan sıradışı 11-karbonlu şeker, tunikamin ve α , β -1",11'-glikozidik bağının nasıl olduğunu açıklamak ve tunikamisin biyosentez yolağındaki moleküler mekanizmanın aydınlatılması yolunda yoğun araştırmalar yapılmıştır. İlk olarak 2007 yılında Price & Tsvetanova, uridin ve UDP-GlcNAc'den tunikamisin biyosentezi için beş enzimin yeterli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak, daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla tunikamisin biyosentez yolağında daha fazla sayıda enzimin görev aldığı tespit edilmiştir (Wyszynski vd, 2012) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Tunikamisin biyosentez yolağı (Wyszynski vd, 2010)

Tunikamisin biyosentez yolağındaki erken basamaklarında **Tun A**, **Tun B**, **Tun F** ve **Tun G** olarak adlandırılan dört enzim görev yapmaktadır. Bunlardan Tun A ve Tun F' nin bu antibiyotikğin biyosentezinin ilk basamağında yer aldığı ve tunikamisin tunikamin biriminin oluşturulmasında rol aldığı belirlenmiştir. **Tun A**, bir UDP-GlcNAc 5,6-dehidrataz “ekzo glikal sentaz” olup UDP-GlcNAc’yi ekzo-glikal UDP-4-keto-5,6-ene-GlcNAc’ye çevirir. UDP-GlcNAc üzerinde aktivite göstermez. **Tun F**, şeker-4-epimeraz olup (UDP-GlcNAc 4-epimeraz) alışılmadık bir substrat toleransına sahiptir ve bu özelliği yolak sıralamasını şekillendirmesine yardımcı olur (Wyszynsky vd, 2012). Tun F, geniş spektrumlu bir 4-epimeraz aktivitesi sergilemekte olup, UDP-GlcNAc ve UDP-6-deoksi-GlcNAc-5,6-ene’i galakto epimerlerine dönüştürmektedir. Kinetik analizler TunF enziminin bir ‘ekso glikal epimeraz’ olarak ekso-glikal substrat yönünde UDP-GlcNAc’den yedi kat daha aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara dayalı olarak, daha önceki çalışmalarda tunikamin çekirdeğinin biyosentezini açıklayan bilgiler revize edilerek tunikamisin biyosentez yolağı şu şekilde açıklanmıştır: Tun A önce UDP-GlcNAc üzerinde etki göstermektedir. Ardından, Tun F, meydana gelen ürünü C-4" pozisyonunda epimerize ederek UDP-6-deoksi-GlcNAc-5,6-ene’ nin oluşumunu sağlamaktadır. Bu aşama 11-karbonlu tunikamin oluşumundaki ardışık C-C bağının oluşması bakımından büyük önem taşımaktadır. Kararlı bir ekso-glikal enol eter olarak bu anahtar roldeki kuyruk- kuyruğa eşleşme

olayında monosakkarit-türevli çiftlerden birinin tespiti, üridin-türevi eşleşme partnerlerinin özellikleri ve eşleşme işlemine katıldıkları tahmin edilen **Tun B** ve **Tun M** enzimlerinin rollerini anlama konusunda fikir vermektedir. Tun B, birçok radikal reaksiyonları katalizleyen Fe₄S₄ redoks merkezine sahip S-adenozil metiyonin (SAM) enzimidir. *tunB* mutantlarında tunikamisin üretiminin durması bu gen tarafından kodlanan enzimin tunikamisin biyosentezi için hayati önemini ortaya koymaktadır (Wyszynski vd, 2012).

Tunikaminil urasil çekirdeğinin oluşumu, bir metil transferaz olan Tun M tarafından katalizlenen C-C bağıyla uridin ve galaktozamin türevlerinin kuyruk kuyruğa eşleşmesi ile oluşmaktadır. Gereken uridin sırasıyla **Tun N** (nükleotit pirofosfataz) ve **Tun G** (nükleotit monofosfat fosfataz)'nin ardışık aktivitesi sonucunda UTP'den elde edilir. **Tun H**, ardından Tun N ve Tun G tarafından işlenerek metabolik yolak boyunca serbest bırakılan UDP, uridinin kaynağı olarak hücresel UTP'nin yerine de görev alabilir. Nükleotit-şeker pirofosfatazı Tun H, UDP' nin psödodisakkarit tunikaminil urasil çekirdeğinden hidrolizini katalize eder ve GlcNAc' nin serbest anomerik pozisyona transferini sağlar. Bu basamak GT-1 ailesi glikoziltransferazı olan **Tun D** tarafından katalizlenmektedir. Ve bu olay sonucunda α,β-1,1 glikozidik bağdaki iki yeni stereoesterin eş zamanlı oluşumuyla tunikamisinlerin çekirdek psödotrisakkarit iskelet kısmı oluşur. Bu iskeletin son modifikasyonu, şimdiye kadar tanımlanmış olan 18 farklı tunikamisin homologunu oluşturmak üzere bir seri açıl zincirlerinin yapıya katılımı ile gerçekleşmektedir. Tanımlanan gen kümesinde henüz yağ asidi sentezi ile ilgili bir genin olmayışı tunikamisin biyosentezi için gereken açıl zincirinin, teikoplanin biyosentezinde olduğu gibi, hücrenin yağ asidi havuzundan karşılandığı düşünülmektedir (Wyszynski vd, 2010). Putatif bir tip 2 fosfatidik asit fosfataz (PAP₂) olan **Tun L**, üretici mikroorganizmada lipit sentezinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Hücre fosfatidik asidi seviyelerini düşürüp ve onun ayrılma ürünü olan diaçilgliserolin seviyesini artırarak fosfolipit biyosentezi baskılanır ve hücresel yağ asidi havuzunun β-oksidatif degradasyon yoluyla tunikamisin biyosentezinde kullanımına yönlendirilebilir (Carman & Han, 2009; Wyszynski vd, 2010). Tunikamisin üreten organizmalar yaşamsal öneme sahip hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemeden lipit metabolizmasını düzenleyen karmaşık regülasyon yollarına müdahale ederek tunikamisin biyosentezini artırmaktadırlar.

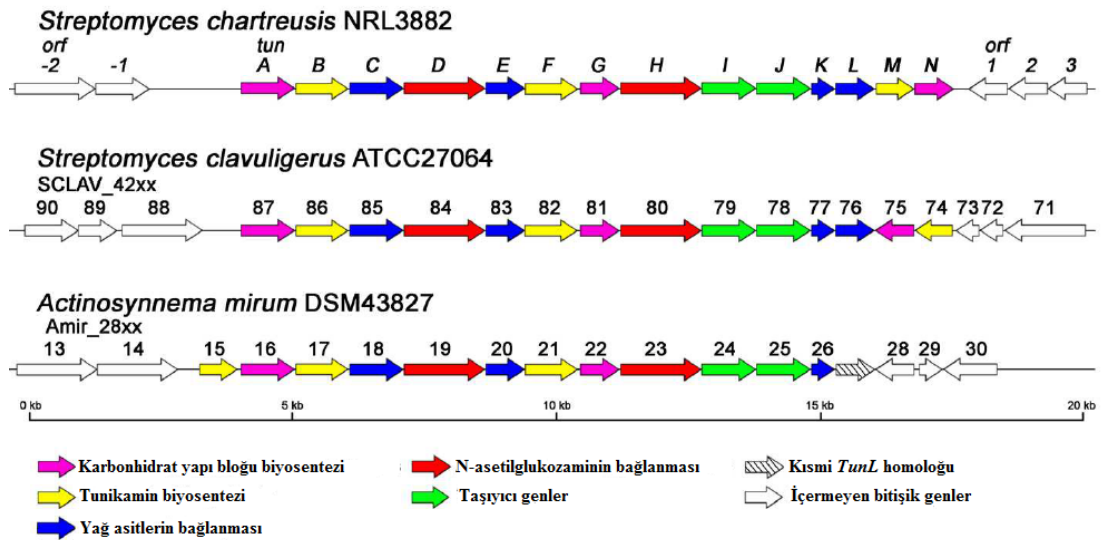
Daha sonra, bir açıl taşıyıcı protein olan **Tun K**, *tun* gen kümesinde ligaz olmadığından muhtemelen primer metabolizmadan bir yağ açıl-ACP ligaz aktivitesi yoluyla ardışık açillenmelerle müteakip yağ asitlerini aktive ederler. Tunikamisin çekirdek iskeleti, putatif bir GlcNac N-de asetilaz ailesinin bir üyesi olan **Tun E** ile N-deasetilasyona uğrar. Ardından, **Tun C**, N-asetil transferaz olarak görev yaparak sıralanmış ve aktive olmuş yağ asitlerini çekirdek yapıya taşır. Bu şekilde tüm tunikamisin homologlarının oluşmasını sağlar.

Tunikamisin gen kümesinde yer alan ve tunikamisin biyosentezine doğrudan katkı sağlamayan iki gen ürünü **Tun I** ve **Tun J** üretici organizmanın tunikamisine direncini ve taşınımını sağlamaktadır. İkisi de ABC transportörünü kodlamakta olup hızlı bir şekilde putatif ABC taşıma sistemi ile tunikamisinin hücre dışına salınımından sorumludur. TunI proteini ATPaz olarak görev yaparak fosforilasyon ile tunikamisini inaktive eder, fosforlanmış tunikamisin hücre dışına taşınır ve burada Tun J ve Tun L tarafından fosforu uzaklaştırılır (Chen vd, 2010; Wyszynsky vd, 2010).

1.5. Tunikamisin Gen Kümesi

Tunikamisin gen kümesi 12 kb büyüklüğünde olup geçmiş yıllarda beş genin bu sekonder metabolitin biyosentezi için yeterli olabileceğine dair fikirler son çalışmalarla yenilenmiş ve dokuz yeni genin daha bu gen kümesinde yer aldığı belirlenmiştir. Önce, Chen vd (2010), *S. clavuligerus* ATCC 27064 ve *Actinosynnema mirum* (*A. mirum*) DSM 43827'da tunikamisin gen kümelerini tespit etmişler ve bu bilgiyi *S. chartreusis*'deki tunikamisin gen kümesini bulmak için kullanmışlardır. İlgili gen kümesi daha sonra bu metaboliti üretmeyen *S. lividans*'a klonlanmış ve rekombinant bakteride tunikamisin biyosentezi gerçekleşmiştir. Grup doğrulama çalışmalarını, *tunA* genini susturup tunikamisin biyosentezini sonlandırarak tamamlamışlardır. Böylelikle, tunikamisin gen kümesinin *tunA-tunL* olmak üzere 12 genden oluştuğunu rapor etmişlerdir. Ardından Karki vd (2011), genom tarama çalışmaları ile *S. clavuligerus*'ta potansiyel tunikamisin-benzeri gen kümesini belirlemiş ve aynı şekilde bu genetik bilgiyi *S. chartreusis*'taki potansiyel tunikamisin gen kümesini izole etmek için kullanmıştır. *S. clavuligerus* genomunda tunikamisin gen kümesinin *tun1* (*SCLAV_4287*)-*tun12* (*SCLAV_4276*) olmak üzere toplam 12 genden meydana geldiği rapor edilmiştir. Her iki bakteride bu gen kümesine ait genlerin aminoasit homologileri %70-95 arasında bulunmuştur (Karki vd, 2011). Yine

benzer tarihli farklı bir çalışmada Wyszynski vd (2010), yukarıda adı geçen üç bakteriye ait tunikamisin gen kümesi ileri biyoinformatik yöntemlerle yeniden belirlenmiş ve bu gen kümesinin *S. coelicolor*'da heterolog ifadesiyle tunikamisin biyosentezi sağlanmıştır. Bu üç gen kümesi ufak farklılıklar göstermekte olup *S. chartreusis*'e ait tunikamisin gen kümesi tarafından kodlanan proteinlerin aminoasit dizi özdeşlikleri *S. clavuligerus*' takiler ile %50-90 aralığındadır. Bu benzerlik ve özdeşlikler, üç bakteri arasında yakın bir zamanda olmuş olması muhtemel bir evrimsel genetik taşınımı işaret etmektedir. Wyszynski vd (2010) tarafından rapor edilen bu çalışmada, *tunA-tunL* dışında *tunM* ve *tunN* adı verilen iki yeni genin tunikamisin gen kümesinde yer aldığı ve biyosentez yolağına katıldığı tespit edilmiştir (Şekil 1.9). Ayrıca, *tunI* ve *tunJ* gen ürünlerinin birlikte görev yaparak tunikamisin antibiyotiğinin hücre dışına salınımından sorumlu olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Tunikamisin biyosentetik gen kümesinin *S. chartreusis*'taki genetik organizasyonu ve *S. clavuligerus* ile *A. mirum*'daki homologları (Wyszynski vd, 2010)

Sonuç olarak, son bilgiler ışığında *SCLAV_4274-SCLAV4287* arasında yer alan proteinlerin kodlandığı genler *S. clavuligerus*'ta tunikamisin benzeri antibiyotik olan MM19290 biyosentezinden sorumlu genlerdir. Bu antibiyotiğin yapısı henüz rapor edilmemekle birlikte, yüksek aminoasit homolojisinin varlığı MM19290'nin streptovirüdin ve korinetoksin gibi, tunikamisin ile karbonhidrat iskeletlerinin benzer olduğunu göstermektedir (Wyszynski vd, 2010).

1.6. *S. clavuligerus*'ta Antibiyotik Biyosentezinin Düzenlenmesi

Sekonder metabolizmanın aktivasyonu için çok sayıda gen grubu görev aldığından genler arasında henüz keşfedilememiş genom çaplı etkileşimleri ortaya çıkarmak için ve ayrıca sekonder metabolit biyosentezinin düzenlenmesiyle alakalı spesifik düzenleyicilerin genetik hedef ve etkilerinin aydınlatılmasına yönelik olarak genom dizileme ve -omiks teknolojileri gibi ileri tekniklerin kullanılması oldukça önemlidir (Nah vd, 2012; Hwang vd, 2014). Yapılan çalışmalar, *Streptomyces* türlerinde sekonder metabolit üretiminin kontrolünde çevre uyaranlarınca indüklenen regülasyon ve sinyal iletiminin önemli rol oynadığını göstermektedir. Birçok sekonder metabolitin biyosentezi çoğunlukla dış çevredeki besin kısıtlanması (ör, glukoz, nitrojen, fosfor) durumunun neden olduğu stres koşullarını ya da γ -bütürolaktonlar gibi spesifik küçük sinyal moleküllerini hücre algıladığı zaman başlamaktadır (Liu vd, 2013). Bu metabolik geçiş sürecinde çeşitli global transkripsiyonel regülatörler görev alarak sekonder metabolitlerin biyosentezi ile ilgili genlere dış çevredeki sinyalleri ulaştırma rolü üstlenmektedirler. *Streptomyces*' de antibiyotik biyosentezini düzenleyen çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu karmaşık düzenlenme ağları üst seviyede global pleiotropik faktörler ya da alt seviyede antibiyotik biyosentetik gen kümeleri içerisinde lokalize olmuş yolak-özgü regülatörler veya yeni tanımlaması ile gen kümelerine konumlanmış "cluster-situated" regülatörlerdir (CSR'ler). CSR'ler kendilerinden uzakta bulunan antibiyotik gen kümelerinin ifadelerini de düzenleyebilmekte olup pleiotropik etki gösterebilmektedirler (Huang vd, 2005). Öte yandan, hemen hemen tüm global ve pleiotropik regülatörler çevreden veya hücre fizyolojisinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanan sinyalleri çoğu kez çok basamaklı bir sinyal iletim kaskadı ile CSR genlerine aktarırlar ve bu genlerin ifadelerini belirlerler (Liu vd, 2013; Niu vd, 2016).

1.6.1. Yolak-özgü regülatörler (CSR'ler)

Antibiyotik biyosentezinden sorumlu birçok gen kümesi hücre yoğunluğu, besin ve kültür zamanı gibi parametrelere göre gen ifadelerini düzenleyen regülatörler içermektedirler (Martín & Liras, 2010). *Streptomyces*'te LysR-tip regülatörler ve büyük LuxR ailesi (LAL)-tipi ATP-bağlama regülatörleri gibi farklı düzenleyiciler çeşitli antibiyotik gen kümelerinde yer almaktadırlar (Pérez-Redondo vd, 1998; Tahlan

vd, 2007; Garg & Parry, 2010; He vd, 2010; Álvarez-Álvarez vd, 2014). Ancak, çoğu antibiyotik gen kümesinde, en yaygın olarak SARP (*Streptomyces* Antibiyotik Regülatör Proteinler) ailesine üye regülatörler yer almaktadır. Bu tip regülatörler spesifik nükleotit dizilerine bağlanarak antibiyotik biyosentez genlerinin ifadesini aktive ederler (Garg & Parry, 2010; He vd, 2010; Álvarez-Álvarez vd, 2014).

S. clavuligerus'ta yolak özgü regülatörlerden ClaR; klavulanik asit gen kümesinin, CcaR; sefamisin C-klavulanik asit süperkümesinin ve HlmJ-HlmM; holomisin gen kümesinin transkripsiyonel düzenleyicileridir (Pérez-Llarena vd, 1997; Tahlan vd, 2004; Li & Walsh, 2010). *S. clavuligerus*'ta klavulanik asit-klavam biyosentezi ise en az yedi regülatör gen; *ccaR*, *claR*, *cvm7P*, *orf21-23*, tarafından düzenlenmektedir (Yin vd, 2012). Bir SARP ailesi üyesi olan CcaR aktivatörü sefamisin C gen kümesinde yer alan *ccaR* geni tarafından kodlanmakta, her iki gen kümesinde farklı promotor bölgelerine bağlanarak hem sefamisin C biyosentezini hem de klavulanik asit biyosentezini olumlu yönde etkilemektedir (Santamarta vd, 2011). *ccaR* geninin tahrip edilmesi durumunda hem sefamisin C hem de klavulanik asit üretimi durmaktadır. Aynı zamanda, bu genin çok kopya halinde hücre içerisinde bulunması her iki metabolitin üretiminde artış sağlamaktadır (López-García vd, 2010; Kurt vd, 2013). *S. clavuligerus*'un *ccaR* ya da *claR* mutantlarında holomisin üretiminde ve holomisin gen kümesine ait genlerin ifadelerinde artış olduğu gösterilmiştir (De la Fuente vd, 2002; Robles-Reglero vd, 2013). Ayrıca, klavulanik asit gen kümesinde yer alan biyosentetik *oppA2* geninin delesyonu sonucunda holomisin genlerinde ve holomisin üretiminde çok ciddi bir artış meydana gelmiştir (Robles-Reglero vd, 2013). Yin vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, sefamisin C üretemeyen bir *S. clavuligerus* mutantında *argR* geninin blokasyonu sonucunda farklı biyosentez ve metabolik yolların (sefamisin C, klavulanik asit\ holomisin ve tunikamisin) farklı şekillerde etkilendikleri ve bunlar içerisinde, tunikamisin biyosentez yolağında yer alan Tun F'nin ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bu şekilde, arjinin-klavulanik asit, sefamisin C-klavulanik asit, klavulanik asit-holomisin yolları arasındaki çapraz düzenlenme farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Yin vd, 2012; Álvarez-Álvarez vd, 2014; Martínez-Burgo vd, 2015). Bu açıdan bakıldığında, yolak özgü regülatörlerin bakterinin ürettiği diğer antibiyotik biosentez yollarının ifadelerinde farklı şekillerde etkili olduğu görülmektedir. Yine bu çıkarımla bağlantılı olarak, 2016 yılında yüksek titre klavulanik asit üreticisi *S. clavuligerus* suşu ile

yabamı *S. clavuligerus*'un SA kültürleri kullanılarak yapılan proteom çalışması sonucunda holomisin biyosentezi ile alakalı HlmI proteininin ifadesinin arttığı, klavulanik asit gen kümesine ait biyosentetik genler tarafından kodlanan proteinlerin de ifadelerinde artış olduğu ve aromatik sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu iki enzimin ifadelerinin azaldığı ve ayrıca iki bileşenli regülatör sistem ve TetR ailesine ye iki global transkripsiyonel düzenleyicinin ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir (nsaldı vd, 2016).

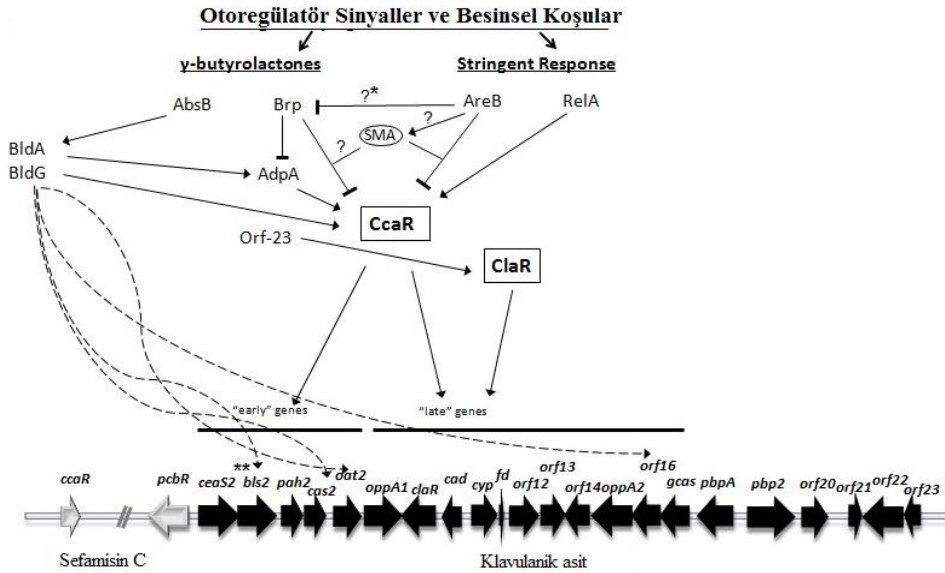
1.6.2. Global pleiotropik regülatörler

S. clavuligerus'un yaşam döngüsü süresince değişik morfolojik farklılaşma basamaklarında sekonder metabolitler üretilmektedir. *S. clavuligerus*'ta sekonder metabolizma ve/veya morfolojik gelişimi kontrol eden pleiotropik regülatörler *bldA* ve *bldG* olup sırasıyla bir tRNA ve bir anti-anti sigma faktörünü (AASF) kodlamaktadırlar. *bld* (bald=ıplak) gen ailesi yesi olan *bldA* ve *bldG* genleri *Streptomyces* spp.'de yaygın olarak bulunmaktadırlar. Bu genlerdeki mutasyonlar hava hiflerinin oluşumunu engellediğinden koloniler karakteristik görünümlerini kaybederek pürüzsüz koloniler meydana getirmeleri nedeni ile bu ismi almışlardır. *bld* genleri *S. coelicolor*'da çalışılan en karakteristik pleiotropik faktörlerden biridir. Bu bakteride BldG AASF' bir partner-değişim mekanizması ile farklı sigma faktörlerini regüle eden anti-sigma faktör (ASF) proteinleri ile etkileşime girmektedir. *S. clavuligerus*'da sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinin *bldG*'nin etkisi altında olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotiklerin pozitif regülasyonundan sorumlu olan *ccaR* geni *bldG*'ye bağımlı olarak ifade olmaktadır. *bldG* tarafından kodlanan AASF posttranslasyonel düzenlenmeden sorumludur. *bldG* geninin yokluğunda, morfolojik açıdan kusurlu ve antibiyotik retemeyen *S. clavuligerus* mutantları elde edilmiştir (Bignell vd, 2005). Bir diğer *bld* geni, bir TTA kodonu taşıyan *adpA*, *S. clavuligerus*'da antibiyotik üretiminin **AdpA** pozitif modlatrn kodlamaktadır. Bu genin blokasyonu sefamisin C ve klavulanik asit üretimini azaltırken çoklu ifadesi antibiyotik üretimini artırmaktadır (Lpez-García vd, 2010). Ayrıca, *bldA* geni DNA'sındaki yüksek GC içeriğinden dolayı *Streptomyces* genlerinde en nadir bulunan TTA kodonlarının translasyonu için gerekli olan lösin-tRNA'yı kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyon *S. coelicolor*, *S. lividans* ve *S. griseus* suşlarında hava hifi oluşumunu ve sekonder metabolit üretimini engellemekte iken *S. clavuligerus*'da *bldA*

mutasyonu gelişimsel açıdan kusurlu ancak yabancı tiple kıyaslandığında hala düşük miktarda da olsa klavulanik asit ve sefamisin üretebilen bir fenotipe neden olmaktadır. *ccaR* geni bir TTA kodonu içermesine rağmen *S. clavuligerus bldA* mutantı tarafından CcaR proteininin üretiliyor olması TTA kodonunun *ccaR*'da başka bir tRNA ile yanlış translasyona uğradığını düşündürmektedir. *S. clavuligerus bldG* ve *bldA* mutantları ve de kontrol suşu ile yapılan kantitatif proteom çalışması bu üç suşta global protein ifade profilleri elde edilmiş, sekonder metabolizma ve morfolojik farklılaşmada rol oynayan proteinleri ayırt etmek amaçlanmıştır. Ayrıca, *S. clavuligerus*'ta CcaR'in daha üst seviyesinde klavulanik asit üretimini kontrol eden elementleri belirlemek üzere regülasyona dahil olması muhtemel proteinlerin belirlenmesine odaklanılmıştır ve bu regülasyonda rol oynayan yeni proteinler rapor edilmiştir (Ferguson vd, 2016).

Aktinomisetlerde, γ -bütirolakton tip otheregülatörler antibiyotik üretiminin başlaması için mikrobiyal hormonlar olarak görev alırlar (Horinouchi, 2007). *S. griseus*'a ait A-faktör tipi bütirolakton *S. clavuligerus*'ta tespit edilmemekle beraber, *S. griseus* A faktörüne homolog Brp adlı bütirolakton proteinin *S. clavuligerus*'ta antibiyotik biyosentezinin negatif regülasyonunda rol oynadığı rapor edilmiştir. Dolayısı ile, *brp* geninin susturulması antibiyotik üretiminde artışa neden olmuştur (Santamarta vd, 2005). Bütirolakton reseptörlerinin bağlanması için spesifik olan sekansların ARE (Auto Regulatory Element) kutuları adında palindromik dizilerden meydana geldikleri birçok *Streptomyces* türünde tanımlanmakla birlikte literatürde reseptörlerin bu dizilere bağlandıkları gösteren çok az sayıda çalışma mevcuttur (Horinouchi, 2007). Brp etkisini kendi promotörü, *ccaR* ve *adpA* promotörlerindeki ARE kutularına bağlanarak gösterir. Δbrp mutantında *adpA* ekspresyonununun 2.5 kata kadar arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *ccaR* ekspresyonu direkt olarak Brp tarafından ya da dolaylı olarak Brp-bağımlı AdpA regülatörü yoluyla kontrol edilmektedir (López-García vd, 2010). "Stringent response" ile alakalı regülatör proteinlerden biri olan **AreB** (Molina-Henares vd, 2006)'yi kodlayan *areB* geni lösin biyosentez yolunda *leuCD* kümesine zıt yönde farklı bir promotör bölgesinden ifade olmaktadır. Hem kendi ekspresyonunda, hem de *leuCD* gen kümesinin transkripsiyonel düzenlenmesinde regülatör rolü üstlenir. Bununla birlikte, AreB, *S. clavuligerus*'ta lösin asimilasyonu, biyosentezi ve aynı zamanda yağ asidi asimilasyonunda karbon kaynağı olarak gereklidir (Liras vd, 2008). AreB *brp* ifadesini etkileyebilmekte olup Brp'deki azalma daha yüksek klavulanik asit üretimi ile

sonuçlanmıştır. *S. clavuligerus*'a ait $\Delta areB$ mutantında, $ARE_{(ccaR)}$ Brp kompleksi oluşturulmadığından bu sefamisin C ve klavulanik asit üretimleri ile *ccaR* geninin transkripsiyonunda küçük bir artış ve fakat *brp* ekspresyonunda net bir azalmaya yol açmıştır. Bu geri düzenleme, AreB'nin *brp* yoluyla dolaylı modülasyon rolüne sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. *S. clavuligerus* 'ta klavulanik biyosentezinin regülasyonu (Ünsaldı vd, 2016)

Aktinomisetlerdeki yaygın durumun aksine *Streptomyces* spp.'de belirlenen *tun* gen kümesinde regülatör bir gen bulunmamaktadır. *Streptomyces ghanaensis*'de bir peptidoglikan glikoziltransferaz biyosentezi inhibitörü olan moenomisin gen kümesinde de tunikamisin biyosentez kümesinde olduğu gibi herhangi bir CSR regülatör bulunmamaktadır. Tıpkı tunikamisinde olduğu gibi moenomisin üretiminin başlaması ve devam etmesini sağlayan regülatör sinyallerinin ne olduğu bu antibiyotik için de soru işareti oluşturmuştur. Makitrynsky vd (2013), *Streptomyces*'de morfogenez ve antibiyotik üretiminden sorumlu pleiotropik genler olan *bldA*, *adpA* ve *absB*'nin doğal ve heterolog üretici suşlarda moenomisin biyosentezinde çok katmanlı bir kontrol sergilediklerini belirlemişlerdir. Dikkat çekici bir diğer özellik de *bldA* tRNA^{lōsin}_{UAA} nın moenomisin biyosentez genlerinden ikisinde UUA kodonlarının translasyonu için gerekli olmasıdır (Makitrynsky vd, 2013). Tunikamisin üretiminin de üreme oranındaki azalmayla alakalı global bir kontrol altında olabileceği öne sürülmektedir. *tunA* ve *tunM* genlerinde nadir bulunan TTA lōsin kodonunun varlığı bu metabolitin biyosentezinde translasyonel düzenlemeyle alakalı bir elementin

sözkonusu olabilirliğini işaret etmektedir. Sözelimi, model organizma olan *S. coelicolor*'daki genlerin sadece %2'sinde TTA kodonu bulunmaktadır ve bu bakteride bu kodonu içeren mRNA ların translasyonu çoğunlukla üremenin ileri basamaklarına sınırlanmıştır (Wysznski vd, 2010).

1.7. Mevcut Çalışma

Tunikamisin klinik açıdan önemli nükleozit tipi bir antibiyotik ilaç olmasından dolayı, *S. clavuligerus* tarafından *tun* biyosentez yolağının regülasyonunun aydınlatılması önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Tunikamisin gen kümesi ile ilgili veriler son yıllara ait olup henüz bu antibiyotik biyosentezi üzerindeki gerek global gerekse de yolak-özgü regülasyon rapor edilmemiştir. Bu çalışmada, hem pleiotropik regülatör BldG'nin hem de CcaR aktivatörünün *S. clavuligerus*'ta *tun* gen kümesinin ifadesini ve de tunikamisin biyosentezini hangi yönde etkilediğini belirlemek amaçlanmıştır. *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentez kümesindeki gen ifade ve antibiyotik üretimindeki değişiklikler her iki genin antibiyotik direnç genleri ile yok edildiği/tahrip edildiği mutant suşlar (*S. clavuligerus* $\Delta bldG$ ve *S. clavuligerus* *ccaR::aph* mutantları). Her iki genin kromozoma ekstra kopyasının entegre olduğu (*S. clavuligerus* pSET-PC ve *S. clavuligerus* LB2). Bu genlerin (*bldG* ve *ccaR*) hücrede çok kopyalı olarak ifade edildiği rekombinant suşlarında (*S. clavuligerus* pAK23 ve *S. clavuligerus* LB1) *S. clavuligerus* ATCC 27064 ve vektör kontrollerine (*S. clavuligerus* pSET152 ve *S. clavuligerus* pSPG) kıyasla qRT-PCR, biyoassay ve HPLC analizleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezinin moleküler düzenlenmesinin ortaya çıkarılmasında ve bu antibiyotik üretici organizmada üretim miktarının artırılmasında önemli sonuçlar sağlamaktadır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bakteri Suşları, Plazmitler, Besiyerler Ve Kültür Koşulları

Kullanılan mikroorganizmalar ve plazmit vektörler Çizelge 2.1’de verilmektedir. *Escherichia coli* (*E. coli*) Luria-Bertani (LB) (Ek 4) veya LB agar plaklarda (Ek 4) 37 °C’de 200 rpm’de çalkalanarak üretilmiştir. Uzun süreli muhafaza için, 16 saatlik kültürden 3 ml alınıp santrifüj edilerek supernatant atılmış ve pellet 400 µl LB’de çözülmüştür. Ardından, %87’lik 400 µl hacimdeki gliserol ile karıştırılarak -86°C’de saklanmıştır. *S. clavuligerus* Triptikaz soya broth (TSB) (Ek 4) içerisinde 28 °C’de çentikli erlenlerde 220 rpm’lik bir çalkalama ile üretilmiştir. Triptikaz soya agar (TSA) (Ek 4) ise sıvı kültürlerdeki kontaminasyonu kontrol etmek için kullanılmıştır. *S. clavuligerus*’a ait misel stokları OD₆₀₀ değeri 5 ile 7 arasında olan kültürlerden 800 µl alınıp % 87’lik 800 µl hacimdeki gliserol ile karıştırılarak elde edilmiş ve -86 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan vektörler; ara klonlama vektörü olan pGEM-T® Easy (Promega), güçlü bir *ermE** promotorunu içeren pSET152*ermE** entegrasyon vektörü, ve de güçlü ve indüklenebilir bir gliserol promotoru taşıyan pSPG ekspresyon vektörüdür. pSET152*ermE** ve pSPG vektörleri hem *Streptomyces* sp. hem de *E.coli*’de ifade olabilen mekik vektörlerdir (Ek 2) ve *S. clavuligerus* suşunun genetik manipülasyonu için kullanılmışlardır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler

Mikroorganizma ve plazmitler	Tanımlama	Kaynak ve Referans
Mikroorganizmalar		
<i>S. clavuligerus</i> ATCC27064	Prototrof sefamisin C ve klavulanik asit üreticisi	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
<i>ccaR::aph</i>	<i>ccaR</i> geni kanamisin dirençlilik kasedi tahrir edilmiş <i>S. clavuligerus</i>	(Pérez-Llarena vd, 1997)
pAK23	Çok kopyalı vektör içerisinde (pAK23) ekstra <i>ccaR</i> geni içeren rekombinat <i>S. clavuligerus</i>	(Kurt vd, 2013)
pSET-PC	<i>ccaR</i> genini taşıyan pSET152 vektörünün kromozomuna entegre olduğu rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	(Kurt vd, 2013)
<i>ΔbldG</i>	<i>bldG</i> geni REDIRECT yöntemi ile <i>aac(3)IV-oriT</i> kaseti ile yer değiştirmiş mutant <i>S. clavuligerus</i>	(Bignell vd, 2005)
pSPG	pSPG vektörünü taşıyan rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	(Kurt vd, 2013)
pSET152	pSET152 vektörünün kromozomuna entegre olduğu rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	(Kurt vd, 2013)
LB1	<i>bldG</i> genini taşıyan rekombinant pSPG (pLB1) vektörünü taşıyan <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
LB2	<i>bldG</i> genini taşıyan rekombinant pSET152ermE* vektörünün kromozomuna entegre olduğu rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
<i>Bacillus subtilis</i>		
ATCC 6633	Tunikamisin indikatörü	(Bignell vd, 2005)
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F' /dlacZD(lacZY A-argF)U169 supE44k-thi-1 gyrA recA1 relA1 endA1 hsdR17</i>	ATCC
ET12567/pUZ8002	<i>F dam 13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdRlacYI / oriT</i> plazmit	<i>E. coli</i> Genetik Stok Merkezi
Plazmitler		
pSPG	<i>Amp^R, Ap^R, P_{glpF}</i>	(Kurt vd, 2013)
pGEM-T® Easy	<i>Amp^R, lacZ'</i>	Promega
pSET152ermE*	<i>lacZ, rep^{puC}, att^{ΦC31}, oriT, ermE*</i>	Combinature
pLB1	<i>bldG</i> genini taşıyan rekombinant pSPG	Bu çalışma
pLB2	<i>bldG</i> genini taşıyan rekombinant pSET152ermE*	Bu çalışma

2.2. Besiyerler

Kullanılan besiyerler ve içerikleri Ek 4'te verilmektedir.

2.3. Tamponlar ve Çözeltiler

Kullanılan tampon ve çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışları Ek 5'te verilmektedir.

2.4. Kimyasallar ve Enzimler

Kullanılan kimyasallar, enzimler ve ait oldukları markalar Ek 6'te verilmektedir.

2.5. *S. clavuligerus*'dan genomik DNA izolasyonu

S. clavuligerus'un genomik DNA'sı tuzla çöktürme metodu ile izole edilmiştir (Pospiech & Neumann, 1995). 50 µl miselyum stoğu 250 ml'lik çentikli erlen içerisindeki 50 ml TSB besiyerine ekilmiş, 28 °C'de ve 220 rpm'de 48-60 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu kültürün 30 ml'si 2000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve pellet 5 ml SET tamponunda (Ek 5) çözülmüştür. Bu karışıma 100 µl hacminde lizozim (50 mg/ml) (Ek 5) eklenmiş ve 1 saat süresince 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından, karışıma 140 µl proteinaz K (20 mg/ml) (Ek 5) ve 600 µl % 10'luk SDS (Ek 5) ilavesi yapılmıştır ve aşağı yukarı çevrilerek karıştırılmıştır. Sonrasında, 5 M NaCl'den (Ek 5) 2 ml karışıma eklenerek karıştırma sürdürülmüştür. Prosedürün devamında, karışıma 5 ml kloroform eklenip çözelti 20 °C'de 30 dk karıştırılarak inkübe edilmiştir. 6000 rpm'de ve oda sıcaklığında 15 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatant falkon tüpüne aktarılmış ve üzerine 0.6 x hacminde izopropanol eklenmiş, ters çevrilerek karıştırılmıştır. 3 dk sonunda, gözle görülür hale gelen DNA sıvıdan alınmış ve 5 ml % 70'lik etanolle yıkanmıştır. Etanolün uzaklaşması için kendiliğinden kurumaya bırakılan DNA'ya 1 ml TE tamponu (Ek 5) ilave edilmiş ve 55 °C'de çözünmesi sağlanmıştır (Kieser vd, 2000).

2.6. *E. coli*'den Manuel Yöntemle ve Kit Kullanarak Plazmit DNA İzolasyonu

Seçici antibiyotik içeren LA ortamında üreyen *E. coli* hücrelerinden steril pipet ucu ile 1 cm² alandan kazınarak alınan hücreler Eppendorf tüplere konulmuştur. Ardından lizozim (2 mg/ml) (Ek 5) içeren 100 µl STE tamponu (Ek 5) Eppendorf tüplerdeki

hücrelerin üzerine konularak vorteks yapılmıştır. Buzda 20 dk inkübe edildikten sonra 60 µl lizis solüsyonu (Ek 5) eklenmiş ve hemen vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 70 °C de 10 dk inkübasyon süresinden sonra hemen örnekler buza alınmıştır. Eşit oranda karıştırılarak hazırlanan fenol-kloroform solüsyonundan 160 µl eklenerek en yüksek hızda vorteks yapılmış ve Eppendorf tüpte bulunan örneklerin rengi süt beyazına dönüşmüştür. 13000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrasında Eppendorf tüpte oluşan en üst kısımdaki sıvıdan 25 µl alınıp jel elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

Plazmit izolasyonu için ayrıca GeneJET plazmit izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. İstenen vektörü taşıyan *E. coli* hücreleri LB besiyerinde 37 °C de 16 saat inkübe edilerek kültürden 3 ml sıvı alınıp 13000 rpm'de 1dk santrifüj yapılarak çöktürülmüş ve süpernatant kısmı atılarak pellet kısmından plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.7. *E. coli* Alıcı Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli alıcı (kompetan) hücrelerin hazırlanması için Hanahan (1983), tarafından tanımlanan RbCl₂ yöntemi kullanılmıştır (Hanahan, 1983). Taze LB agar kültüründen alınan bir *E. coli* DH5α veya *E. coli* ET12567/pUZ8002 kolonisi 3 ml LB içerisine ekilip 37 °C ve 200 rpm'de 16 saat inkübe edilmiştir (gerektiğinde antibiyotik eklenmiştir). Bu *E. coli* kültüründen 3 ml alınıp 200 ml LB besiyerine ekim yapılmış ve OD₆₀₀ değeri 0.4 ile 0.7'ye ulaşınca 37 °C'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Ardından, kültür 15 dk buz içerisinde bekletilip 3500 rpm'de, 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, pellet 20 ml hacmindeki soğuk Tampon 1'de (Ek 5) çözülmüş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet bu kez 8 ml hacmindeki soğuk Tampon 2'de (Ek 5) çözülmüş bu çözelti 100 µl'lik hacimlere bölünmüş ve 15 ile 30 dk buzda inkübe edilmişlerdir. Son olarak, tüpler sıvı nitrojende dondurularak -86 °C' de saklanmışlardır.

2.8. *E. coli* Alıcı Hücrelerinin Transformasyonu

E. coli alıcı hücrelerinin transformasyonu için Sambrook & Russell (1989), tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır (Sambrook & Russell, 2012). -86 °C'de muhafaza edilen 100 µl'lik *E. coli* alıcı hücreleri buz içerisinde çözülmüş ve içine 1-10 µl

hacimde plazmit DNA (1- 50 ng) ya da ligasyon ürünü ilave edilip nazikçe pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. Tüpler 20 dk buzda inkübe edilmiş, hücre-DNA karışımı 42 °C'de 45-60 sn su banyosunda ısı şokuna maruz bırakılmışlardır. Ardından, tüpler hemen buza koyulmuş ve 5 dk inkübe edilmiştir. Üzerine antibiyotik içermeyen 0.9 ml SOC (Ek 4) besiyeri eklenen karışım 37 °C'de 1 saat 100-150 rpm'de inkübe edilmiştir. 3000 rpm'de 10 dk santrifüj sonrasında pellet 100 µl LB'de çözülmüş ve hücre çözeltisi seçici antibiyotik içeren LB agar'a yayılmış, 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen tek koloniler seçilmiş ve sonraki analizler için plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.9. Konjugasyon Metodu ile *E. coli*'den *S. clavuligerus*'a Plazmit DNA Transferi

Streptomyces ve *E. coli* arasındaki konjugasyon olayı Flett vd (1997), tarafından tanımlanan prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Flett vd, 1997). *E. coli* ET12567/pUZ8002'e ait alıcı hücreler pUZ8002 ve *dam*⁻ mutasyonunu seçmek için kanamisin (Km) (25 µg/ml) ve kloramfenikol (Cm) (25 µg/ml) içeren besiyerinde üretilmiştir. *bldG* geninin klonlandığı rekombinant vektörler *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılmış ve uygun antibiyotiklerle seçim yapılmıştır. İstenilen vektörü taşıyan rekombinant *E. coli* ET12567/pUZ8002 10 ml'lik apramisin (50 µg/ml) içeren LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C ve 200 rpm'de 16 saatlik inkübasyon sonrasında 1 ml'si 100 ml LB antibiyotik içeren besiyerine eklenmiştir. Aynı koşullarda, 0.4-0.6 aralığında OD₆₀₀ değerine ulaşan kültür iki kere eşit hacimde antibiyotik içermeyen taze LB besiyerinde +4 °C'de 3500 rpm 10 dk santrifüj edilerek antibiyotiğinden arındırılmıştır. Oluşan pellet 0.1 hacim LB'de çözülmüştür. TSA besiyerinde üreyen 24 saatlik *S. clavuligerus* kültürü 5 ml'lik % 20 gliserolde çözülmüş ve homojen bir karışım elde edilmiştir. Bu karışımın 0.5 ml' si 500 µl *E. coli* hücreleri ile karıştırılmış ve bu karışım 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra pellet 200 µl LB'de çözülmüş ve son olarak 10 mM MgCl₂ veya CaCl₂ içeren Mannitol-Soya unu (MS) (Hobbs vd, 1989) (Ek 4) agar üzerine yayılmıştır. 30 °C'de 16-20 saatlik inkübasyon sonrasında MS agar plaklar üzerine 0.5 mg/ml nalidiksik asit ve 1 mg/ml apramisin içeren 1 ml distile su yayılmıştır. İnkübasyon 30 °C'de 4 gün boyunca devam ettirilmiştir.

2.10. DNA'nın Manipülasyonu

2.10.1. Restriksiyon endonükleaz kesimleri

Restriksiyon endonükleazlar (Thermo Fisher Scientific) klonlama çalışmalarında kullanılmışlardır. Restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim reaksiyonları üretici firmaların önerdiği koşullarda gerçekleştirilmiştir.

2.10.2. Agaroz jel elektroforezi

DNA ve RNA örnekleri 45 dk süresince 80 V akım uygulanarak % 0.8-1 konsantrasyonlarında hazırlanmış agaroz jelde yürütülmüşlerdir. Elektroforez tamponu 1X TAE (Ek 5)'dir. Jel görüntüleri Genesys Jel Görüntüleme Sistemi yardımıyla fotoğraflanmıştır. Jel yürütürken O'GeneRuler 1kb plus DNA ladder markörü (Ek 2) kullanılmıştır.

2.10.3. DNA parçalarının agaroz jelden saflaştırılması

Elektroforez sonrasında, gerekli jeldeki DNA bantları UV transilluminatörde (UVP) mavi ışık altında jelden kesilerek Eppendorf tüplere konulmuştur. Jeldeki DNA bantları Genejet jel ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Saflaştırılan DNA/RNA konsantrasyonları NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) cihazıyla ölçülmüştür.

2.10.4. Ligasyon reaksiyonları

PCR ürünlerinin pGEM-T® Easy vektörüne ligasyonu için 3 hedef gen: 1 vektör molar oranı tercih edilmiştir. 1 µl T4 DNA ligaz (Promega), 5 µl 2× ligasyon tamponu, 1 µl (55 ng) pGEM-T® Easy vektörü, 3 µl PCR ürünü (27.5 ng) karıştırılarak hacim dH₂O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 4 °C'de 16 saat inkübasyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. pSET152ermE* ve pSPG vektörlerine yapışkan uç ligasyonları için de genel olarak 3 hedef gen: 1 vektör molar oranı kullanılmıştır. 1 µl T4 DNA ligaz ve 1 µl hacimde 10× ligasyon tamponu ilave edilen reaksiyon hacmi distile su ile 10 µl'a tamamlanmış ve karışım 4 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

2.11. Primer Dizaynı

S. clavuligerus'a ait *bldG* genine ait nükleotit dizisine GenBank:AY821553.1'den ulaşılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY821553.1>). *bldG* geni ile birlikte *tun* gen kümesi ve *hrdB* genlerine ait primerler NCBI'nin internet sayfasında kayıtlı GenBank erişim numaralarından ulaşılan dizilerine göre tasarlanmışlardır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gerek klonlama gerekse de qRT-PCR deneyleri için primer dizaynı, DNASTar yazılımındaki PrimerSelect ve Primer3 plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizayn edilen tüm primerler Genoks firması aracılığı ile Microsynth (İsviçre)'a sentezletirilmiştir. Tasarlanan primer dizileri Ek 3'de verilmektedir.

2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.12.1. Standart PCR

Klonlama, doğrulama ve tarama çalışmaları için *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun içeriği ve optimize edilen PCR koşulları Çizelge 2.2'de verilmektedir.

Çizelge 2.2. Standart bir PCR reaksiyonu ve uygulanan koşullar

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)	PCR koşulları	Sıcaklık/Zaman °C/dk ya da sn
Tamponu (10×)	1X	2,5	Başlangıç	95 °C 10 dk
dNTP karışımı (10 mM)	200 nM	1	denatürasyonu	
İleri primer (10 µM)	0.2 µM	1.25	Denatürasyon	94 °C 30 sn
Geri primer (10 µM)	0.2 µM	1.25	Yapışma	59 °C 20 sn
Kalıp DNA	50 ng	2	Uzama	72 °C 20 sn
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2	Devir #	35
DMSO 100%	5 %	1.25	Son uzama	72 °C 10 dk
Taq DNA Pol (5 u/µl)	2.5 u	0.25		
dH ₂ O		11		

2.12.2. Koloni PCR

Konjugasyon sonrası doğrulama için katı kültürlerden az miktarda koloni alınıp 50 µl dH₂O içerisinde çözdürülmüş ve devamında 94 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. Bu DNA karışımının 2-3 µl’si alınarak PCR’da kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

2.13. Dizileme Reaksiyonu

DNA dizileme hizmeti, Applied Biosystem’e ait BigDye Cycle Sekanslama Kit V3.1 (Applied Biosystems)’i ile zincir sonlandırma metodunu kullanan Genoks şirketi tarafından verilmiştir.

2.14. Fermentasyon Çalışmaları: Bioassay ve HPLC Analizleri

2.14.1. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi

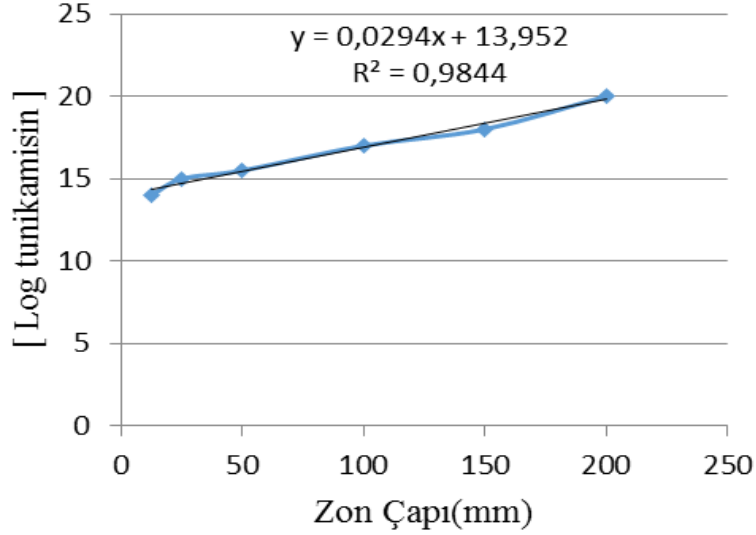
DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi Burton (1968) tarafından tanımlanan metodla gerçekleştirilmiştir (Burton, 1968). Hücre çökeltileri -20°C den alınarak 2 ml hacimli % 0.85’lik NaCl çözeltisinde (Ek 5) çözülüp vorteksenerek homojen hale getirilmiştir. Herring sperm DNA (Sigma) ya ait 0.3 mg/ml stok çözeltisi (5 mM NaOH’da çözülmüş) standart hazırlığında kullanılmıştır. Kullanılan standard DNA konsantrasyonları şu şekildedir: 6, 10, 20, 30, 50, 60, 75 ve 100 µg/ml. 5 mM NaOH (blank örneği), standartların herbiri ve de çözülen pellet karışımlarından 400’er µl alınıp üzerlerine 1 N HClO₄’den (Ek 5) 400 µl ilave edilmiştir. Ters çevrilerek karıştırılan tüpler 70 °C’de ve 20 dk inkübe edilmişlerdir. Her bir tüpteki karışıma bu kez de 800 µl difenilamin belirteci (Ek 5) eklenmiş, ters çevrilerek karıştırılan solüsyonlar 30 °C’de ve 15-17 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında tüplerdeki örnekler yeniden karıştırılmış ve miseller santrifüjle (13200 rpm ve 10 dk) çöktürülmüştür. Süpernatanın absorbansı 600 nm’de ölçülmüştür.

2.14.2. Kültürlerdeki tunikamisin üretiminin biyoassay deneyleri ile belirlenmesi

S. clavuligerus’ta tunikamisin üretimlerini karşılaştırmak için kontrol olarak *S. clavuligerus* ATCC27064 ve manipüle edilen suşlar *S. clavuligerus* LB1, *S. clavuligerus* pSPG, *S. clavuligerus* LB2, *S. clavuligerus* pSET152, *S. clavuligerus ccaR::aph*, *S. clavuligerus ΔbldG*, *S. clavuligerus* pAK23 ve *S. clavuligerus* pSET-PC

TSBYG sıvı besiyerinde 4 gün boyunca 28 °C’de inkübe edilmiştir (Chen vd, 2010). *B. subtilis* 6633 suşu tunikamisin biyoassayinde indikatör organizma olarak kullanılmıştır. Sıvı kültürler %37 lik HCl ile son konsantrasyonu %1 (v/v) olacak şekilde asidifiye edilmişler, asitte çözülmeyen tunikamisin kompleksi 4000×g de 10 dk +4 °C de santrifüjle çöktürülmüş, pellet, 0.2 M’lık HCl ile iki kez yıkanıp tekrar santrifüj edilmiştir. Ardından, pelletlere 5 ml metanol eklenerek ve 10 dk boyunca buzda vortekslenerek tunikamisin çözdükten sonra 4000×g 10 dk +4 °C’de santrifüj yapılmıştır. Son olarak, 1.5 ml’lik Eppendorflara 500 µl süpernatant konularak metanol 40 °C’de uçurulmuş, daha sonra örnekler -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Test ve analizlerde kullanılmadan önce Eppendorflara 40 µl metanol eklenerek konsantre tunikamisin çözeltisi elde edilmiştir.

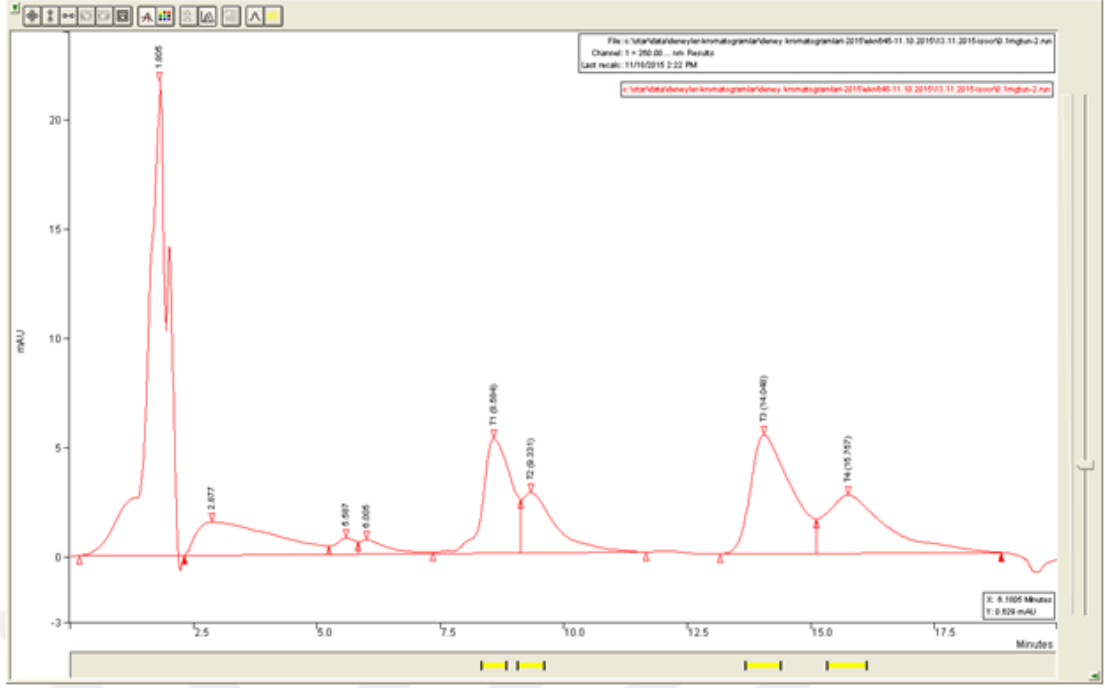
TSA besiyerinde üretilen *B. subtilis* 6633 hücreleri 10 ml TSB besiyerine ekilmiş ve 28 °C’de 200 rpm’de 16 saat inkübe edilmişlerdir. Bu kültürden 300 µl alınıp 100 ml TSB besiyerine ekim yapılmış ve kültürün OD₆₀₀ değeri 1’e ulaşıncaya dek inkübe edilmiştir. % 1.5 agar içeren 100 ml TYD agar (Ek 4) 45-47 °C’lik sıcaklık aralığına soğutulmuş ve ardından *B. subtilis* 6633’nin OD₆₀₀ değeri 0.033 olacak şekilde agarlı besiyerine eklenmiştir. Petri kaplarına 25 ml hacimde TYD-kültür karışım konulup donması sağlandıktan sonra agar üzerinde 5 mm çapında delikler açılmış ve içerisine 40 µl ekstrakt örneği konulmuştur Ayrıca, tunikamisin standardı (5 mg/ml) DMSO’da hazırlanmış ve ardından metanol kullanılarak standart serisi elde edilmiştir (1-0.75-0.5-0.25-0.125-0.0625-0.003125 mg/ml konsantrasyonlarında dilüsyonlar). Petri kapları önce 4 °C’de 2 saat, ardından 30 °C’ de 12-15 saat inkübe edilmiştir. Tunikamisine ait standart eğrilerinden elde edilen lineer regresyona göre örneklerdeki tunikamisin konsantrasyonları hesaplanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Biyoassay deneylerinde kullanılmak üzere TSBYG besiyerlerinde üreyen kültürlerden elde edilen tunikamisin kalibrasyon eğrisi

2.14.3. HPLC ile tunikamisin miktarının belirlenmesi

TSBYG (Ek 4) kültürlerinden metanol ekstraksiyonu ile elde edilen numunelerdeki tunikamisin miktarını belirlemek üzere HPLC analizleri yapılmıştır. HPLC; Varian Prostar Separations Modülü ve Pursuit C18 (A3000150x046, Serial No: 318437) reverse kolonu ile 1.0 ml/dk'lık akış oranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler %45:%55 asetonitril: sulu asetik asit (%1 v/v) oranında karışımla elute edilmişlerdir (Chen vd, 2010). Kolondaki örnekler, Varian PDA Detector Model 330 ile 260 nm' de görüntülenmiştir. Her bir enjeksiyon için akış süresi 20 dk olarak belirlenmiştir. Tüm enjeksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Standart olarak 0.1 mg/ml tunikamisin örneği kullanılmıştır (Şekil 2.2). Kromatogramda toplam tunikamisine ait 4 adet peak elde edilmiştir. Numunelerdeki tunikamisin miktarı standarda göre hesaplanmıştır.



Şekil 2.2. Tunikamisin standardının HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramı

2.15. RNA Örneklerinin Hazırlanması

RNA izolasyonu için fermentasyonun 4. gününde kültürden 2 ml alınmıştır. 12000×g de 2 dk soğutmalı santrifüjde çöktürülen örneklerin çöken kısmı (pellet) RNA izolasyonu için kullanılmıştır. RNA izolasyonu GeneJET RNA izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kite ait standart prosedüre lizozimde (TE tamponunda çözülmüş final konsantrasyonu 30 mg/ml) 37 °C'de inkübasyon ve fenol muamele basamakları eklenerek modifikasyon yapılmıştır. Fenol ekstraksiyonu sırasında örnek kaybını azaltmak amacı ile “Phase lock gel heavy” (5 PRIME) kolonları kullanılmıştır. Pelletin üzerine 100 µl taze hazırlanmış lizozim içeren TE tamponu eklenerek vorteks veya pipetaj ardından 37 °C de 30 dk inkübasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. β-merkaptoethanollü lizis tamponundan 300 µl eklenen karışım homojenizasyon için 15 sn vortekslenmiştir. 13200 rpm'de 30 sn santrifüj edilen boş fenol-kloroform-izoamilalkol (İAA) kolonlarına 400 µl karışım ilave edilmiştir. Karışım üzerine 200 µl aquafenol ve 200 µl kloroform izoamilalkol (24:1) konulmuştur. 13000rpm de 5 dk santrifüj sonrasında üst kısmındaki sıvı alınarak temiz Eppendorf tüplere aktarılmış ve kitle yer alan protokole uygun olarak RNA izolasyon işlemine devam edilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen saf suda çözünen RNA, üzerine (Ambion) 5 µl DNaz tamponu ve 2 µl DNaz eklenerek 37 °C de 30 dk inkübe

edilmiştir. Ardından, 12 µl DNaz inaktivasyon agent eklenen RNA örnekleri 13200 rpm de 2 dk santrifüj edilerek üstteki sıvı yeni 1.5 ml hacimli Eppendorf tüplerine alınmıştır. Her bir RNA örneğinden 1 µl alınıp saflığı, kalitesi ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) cihazıyla ölçülmüştür. 2 µl RNA örneği ise agaroz jelde yürütmek için kullanılmış geri kalan örnekler küçük hacimlerde -86 °C’de saklanmıştır.

2.16. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR)

Kalıp cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Çizelge 2.3’de qRT-PCR sentezi için kullanılan reaksiyon koşulları verilmektedir.

qRT-PCR deneyde SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) kullanılmıştır. Standart bir kinetik PCR reaksiyonu Biorad CFX96 robotiği kullanılarak şu şekilde gerçekleştirilmiştir: SYBR Supermix, 5 µl; ileri primer (10 µM), 0.25 µl; geri primer (10 µM), 0.25 µl; cDNA, 0.5 µl; dH₂O, 4 µl.

Çizelge 2.3. Biorad CFX96 cihazında Real time PCR koşulları

Evreler	Sıcaklık(°C)	Süre(sn)
Denatürasyon-Bekleme evresi	95 °C	30 sn
Amplifikasyon-Devir evresi	95 °C	5 sn
	60 °C	20 sn
Devir #	40	
Ergime eğrisi evresi	60 °C	5 sn/adım
	95 °C	

Her bir örnek için iki biyolojik kopya ve iki deneysel kopya içeren birbirinden bağımsız iki ayrı qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kalıp olarak cDNA yerine dH₂O’nun kullanıldığı “no template control (NTC)” ve RNA’nın kullanıldığı RT (-) kontrolleri ilave edilmiştir. SYBR temelli amplikon tespitinde ergime eğri analizi (çözünme eğri analizi) oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu sayede amplifikasyonun primer dimerleri, kontamine DNA, yanlış eşleşmiş primerlerden kaynaklanan PCR ürünleri gibi tüm çift-zincirli DNA’dan kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirlenebilmektedir (Pfaffl, 2004).

2.17. qRT-PCR Verilerinin Rölatif Kuantifikasyonu

Belirli bir koşulda gen ekspresyon seviyesinde normal durumdakine kıyasla meydana gelen fizyolojik değişimleri analiz etmede en çok kullanılan yöntem rölatif kuantifikasyondur. Hedef genin rölatif ekspresyonu en azından bir referans genin ekspresyonuyla normalize edilir (Bustin, 2000). Hedef ve kontrol örneklerin verimliliklerinin eşit olduğu varsayılarak oluşturulan aşağıdaki formül rölatif ekspresyon oranını hesaplamada kullanılmıştır (Pfaffl, 2004):

R (Rölatif ekspresyon oranı) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Burada;

$(\Delta\Delta Ct) = (\Delta Ct \text{ hedef gen} - \Delta Ct \text{ referans gen})_{\text{manipüle bakteri}} - (\Delta Ct \text{ hedef gen} - \Delta Ct \text{ referans})_{\text{kontrol bakteri (yabancıl suş)}}$

$\Delta Ct = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$ 'dir.

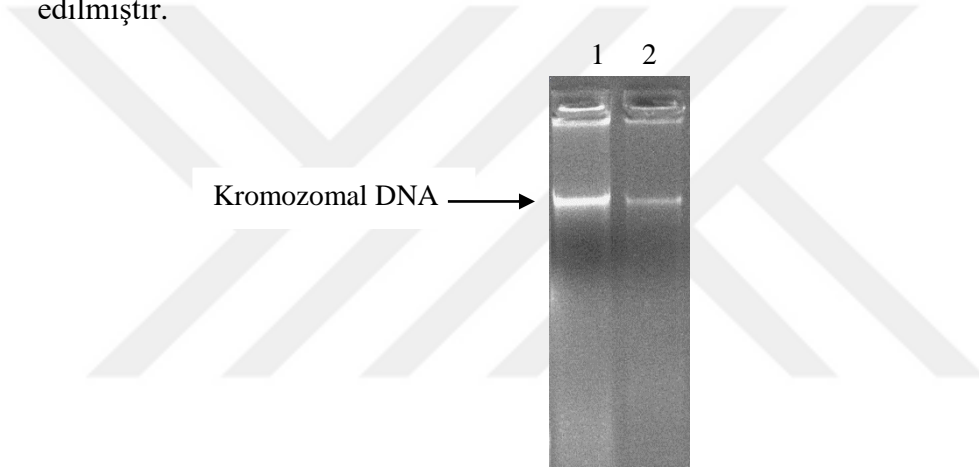


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *bldG* Geninin PCR ile Çoğaltılması ve pGEM-T® Easy Ara Vektörüne Klonlanması

3.1.1. *S. clavuligerus*'dan genomik DNA izolasyon

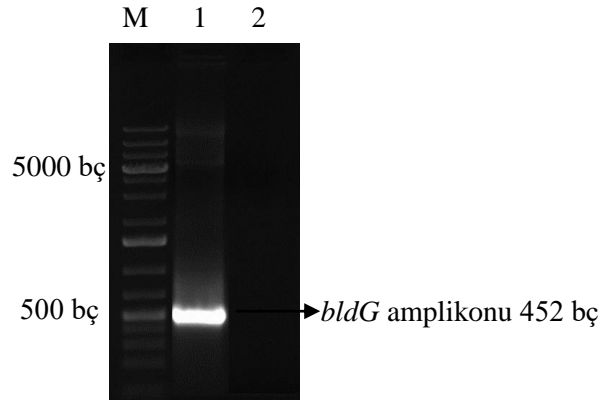
28 °C'de 48 saat inkübe edilen 30 ml lik *S. clavuligerus* kültürü çöktürülmüş ve genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA %0.8 lik agaroz jelde yürütülmüş (Şekil 3.1), konsantrasyonu ve saflığı/kalitesi kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. *S. clavuligerus*'tan izole edilen kromozomal DNA (1,2)

3.1.2. *bldG* geninin PCR ile çoğaltılması

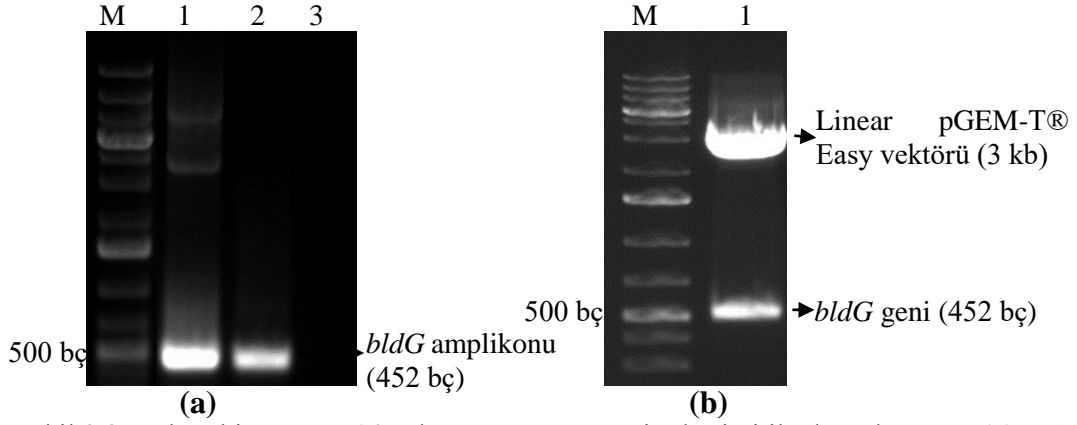
Klonlama için dizayn edilen primer çifti (*bldgF1*: 5'catatggtggacctgtccctgtcgactc 3', *bldgR1*: 5'actagtaagagccgtgcccgccac 3') ve izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak *bldG* geni çoğaltılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *S. clavuligerus*'a ait kromozomal DNA kalıp olarak kullanılarak *bldG* geninin PCR ile çoğaltılması. 1: *bldG* amplikonu, 2 Kalıp DNA yerine dH₂O kullanılarak gerçekleştirilen negatif kontrol PCR, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

3.1.3. *bldG* genin pGEM-T® Easy vektörüne klonlanması

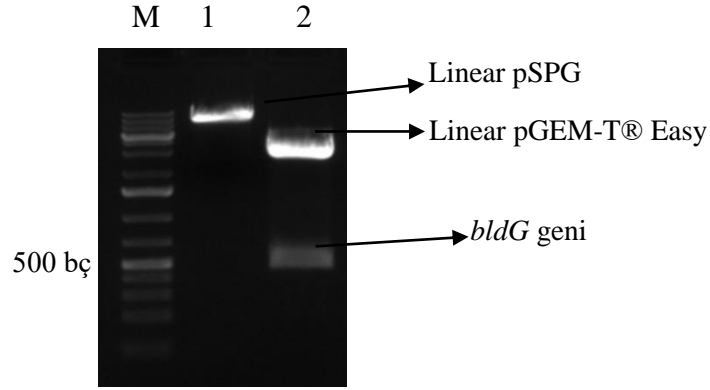
Taq DNA polimeraz ile çoğaltılan *bldG* genine ait bant jelden kesilmiş, GeneJet jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden ekstrakte edilmiş ve pGEM-T® Easy ara klonlama vektörüne ligasyon ile yapıştırılmış ve ardından transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında ampisilin (100 μ g/ml), X-Gal (Ek 5) ve IPTG (Ek 5) içeren LB agar ortamında 37 °C'de 16 saat inkübasyon sonrasında üreyen beyaz renkli koloniler yeniden çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmişlerdir. Elde edilen kolonilerden seçim yapılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Rekombinasyonun doğruluğu PCR, restriksiyon enzim kesimi (Şekil 3.3) ve ayrıca DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Rekombinant vektör; pLB14, rekombinant *E. coli* DH5 α hücreleri ise *E. coli* pLB14 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.3. Rekombinant pLB14 vektörün PCR ve enzim kesimi ile doğrulanması. (a);1: *bldG* genini çoğaltmak amacı ile kalıp DNA olarak pLB14 vektörünün kullanıldığı PCR reaksiyonu, 2: Kalıp DNA olarak *S. clavuligerus* genomik DNA'sının kullanıldığı PCR sonucu, 3: Kalıp DNA yerine dH₂O kullanılarak gerçekleştirilen negatif kontrol PCR. (b);1: *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pLB14. M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

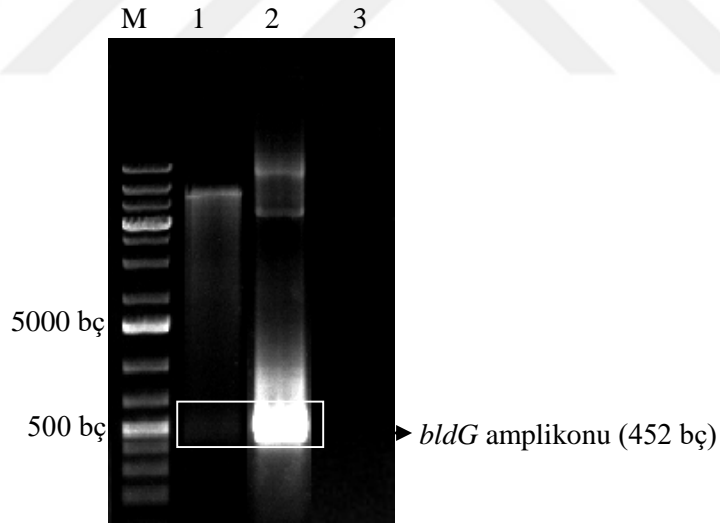
3.2. *bldG* Geninin pSPG Çoklu Klonlama Vektörüne Klonlanması

pSPG plazmiti hücrede 40-300 arasında kopya sayısına sahip bağımsız replike olabilen ve pIJ699 kökenli bir *E. coli/Streptomyces* mekik vektörüdür (Kieser & Melton, 1988). pSPG vektöründe yer alan *P_{glpF}* promotoru, *S. clavuligerus*'ta gliserol kullanım yolağında bulunan ve GlyR represörü tarafından kontrol edilen, gliserol ile uyarılabilir bir promotordur (Baños vd, 2009). pLB14 rekombinant vektörünü ve de pSPG'yi içeren *E. coli* DH5a hücrelerinden izole edilen plazmitler *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir (Şekil 3.4). pLB14'ten ayrılan *bldG* genine ve linear pSPG vektörüne ait bantlar agaroz jelden kesilerek ekstrakte edilmişler ve saflaştırılan (*bldG* geni ve linear pSPG) DNA'lar ligasyon reaksiyonunda kullanılmışlardır. Ardından, ligasyon ürünü transformasyonla *E. coli* DH5a alıcı hücrelere aktarılmıştır.



Şekil 3.4. pSPG ve pLB14 vektörlerinin *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile kesimi, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *NdeI* ve *SpeI* enzimleri ile kesilerek lineer hale gelmiş pSPG vektörü (8 kb), 2: *NdeI* ve *SpeI* enzimleri ile kesilerek ayrılan lineer pGEM-T® Easy vektörü ve *bldG* geni

Transformasyon sonrası apramisin içeren seçici besiyerinde üreyen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bu plazmitlerden PCR ve *NdeI-SpeI* ikili enzim kesimi yapılarak rekombinasyon doğrulanmıştır (Şekil 3.5). Rekombinant vektör pLB1, bu vektörü taşıyan *E. coli* DH5α hücreleri ise *E. coli* pLB1 olarak isimlendirilmiştir.

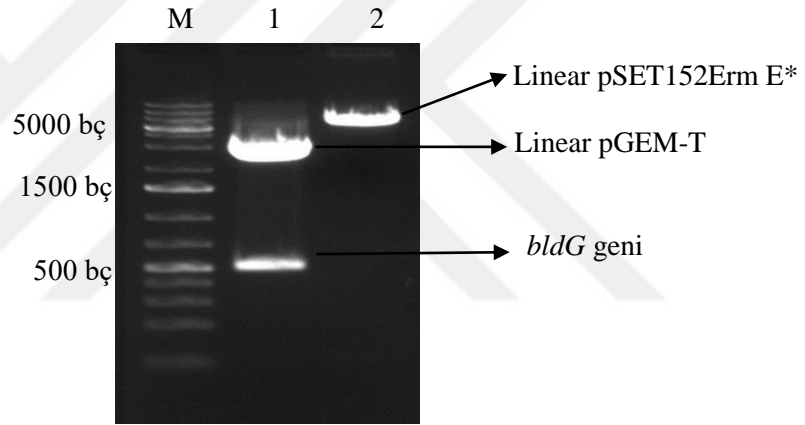


Şekil 3.5. Rekombinant pLB1 vektörünün PCR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması. 1: *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pLB1, 2: pLB1'in kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu, 3: Kalıp DNA yerine dH₂O kullanılarak gerçekleştirilen PCR. M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

3.3. *bldG* Geninin pSET152ErmE*Entegrasyon Vektörüne Klonlanması

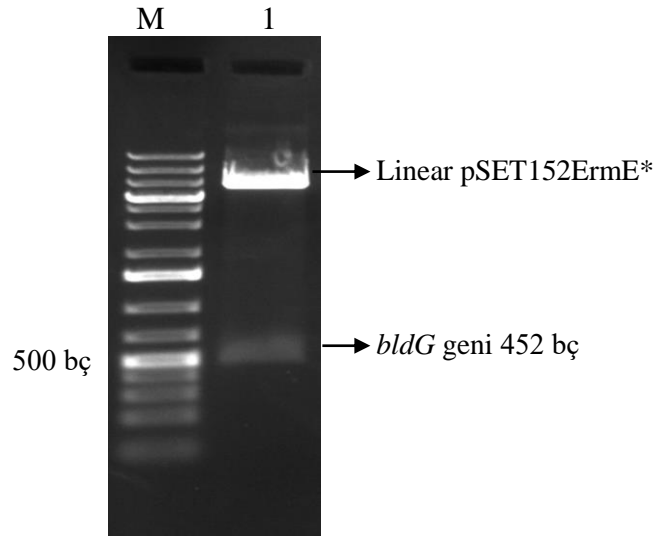
pSET152 plazmiti *Streptomyces*'de çoğalamayan fakat sahip olduğu nükleotit dizisindeki ϕ C31 (ϕ C31) *attP-int* lokusu sayesinde *Streptomyces* kromozomundaki

phiC31 bağlanma bölgesi (*attP*)'ne tek kopya olarak kendini sokan bir entegrasyon vektörü aynı zamanda *E. coli*/*Streptomyces* mekik vektörüdür (Medema vd, 2011). *P_{ermE}** *Streptomyces*'de homolog ve heterolog gen ekspresyonu için kullanılan ve eritromisin genine ait mutasyona uğramış güçlü bir konstitutif promotordur (Wilkinson vd, 2002). *bldG* geninin ekstra kopyasınının *S. clavuligerus* genomuna entegrasyonunun tunikamisin biyosentezi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla pLB14 rekombinant vektöründen kesilen *bldG* geni pSET152ErmE* entegrasyon vektörüne klonlanmıştır. Öncelikle, her iki vektör *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir (Şekil 3.6). pLB14'ten ayrılan *bldG* geni ve linear pSET152ErmE* bantları jelden kesilerek ekstrakte edilmiş ve ardından ligasyon deneyinde kullanılmıştır. Ligasyon ürünü transformasyon reaksiyonu ile *E. coli* DH5α alıcı hücrelerine aktarılmıştır.



Şekil 3.6. pLB14 ve pSET152ErmE* vektörlerinin *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimi, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *EcoRI* ile kesilmiş pLB4, 2: *EcoRI* ile kesilerek linear hale gelen pSET152ErmE*

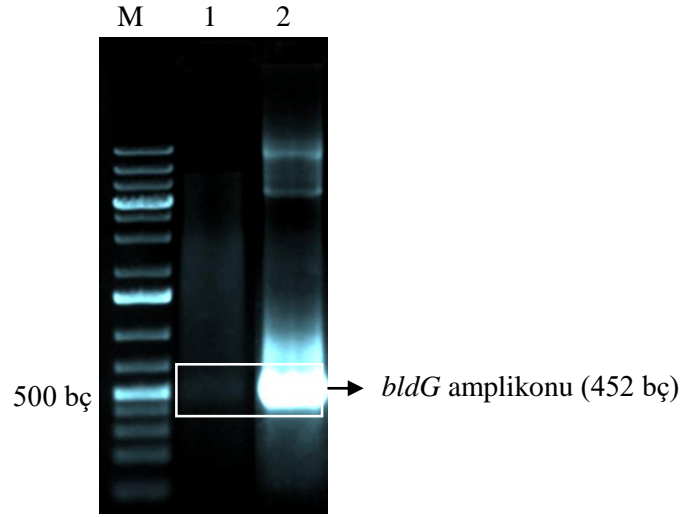
Transformasyon sonrasında apramisin içeren seçici LB agar ortamında üreyen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmış ve rekombinant plazmitler *NdeI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile ikili kesim yapılarak doğrulanmıştır (Şekil 3.7). Rekombinant vektör pLB2, bu vektörü taşıyan *E. coli* DH5α hücreleri ise *E. coli* pLB2 olarak adlandırılmışlardır.



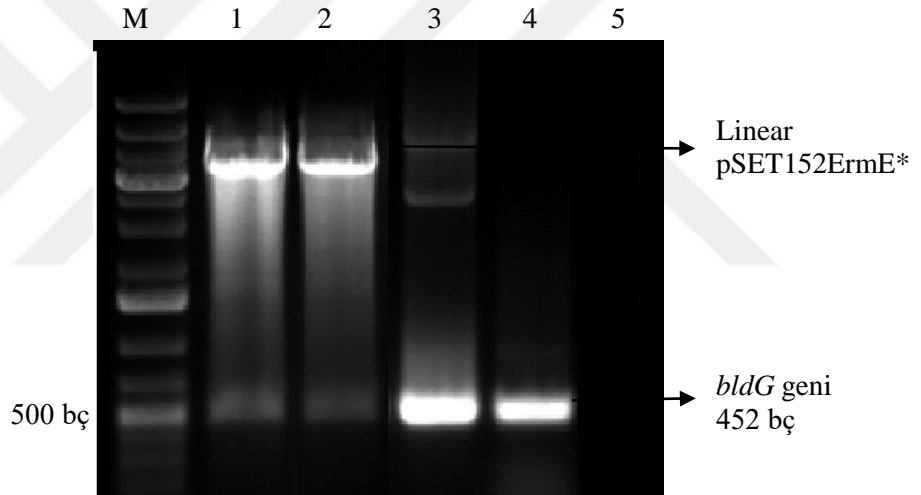
Şekil 3.7. Rekombinant pLB2 vektörünün *NdeI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesimi. M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *NdeI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesim sonrasında elde edilen linear pSET152ErmE* vektörü ve *bldG* geni

3.4. Rekombinant *E. coli* Suşları ve *S. clavuligerus* Arasında Konjugasyon

Rekombinant pLB1 ve pLB2 vektörlerinin *S. clavuligerus* hücrelerine aktarılmaları için konjugasyon yöntemi tercih edilmiştir. Ancak, konjugasyon öncesinde *S. clavuligerus*'a ait sıkı restriksiyon bariyer sisteminin önüne geçilmesi amacıyla vektörler öncelikle metilasyondan yoksun *E.coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyon yöntemi ile aktarılmışlardır. Transformasyon sonrasında kanamisin (25 µg/ml), kloramfenikol (25 µg/ml) ve apramisin (50 µg/ml) antibiyotiklerini içeren seçici LB agar ortamından üreyen kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyonun doğruluğu PCR ve restriksiyon enzim kesimleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). pLB1 ve pLB2 vektörlerini taşıyan rekombinant *E. coli* ET12567/pUZ8002 suşları sırası ile *E. coli* pLB1ET ve *E. coli* pLB2ET olarak isimlendirilmişlerdir.

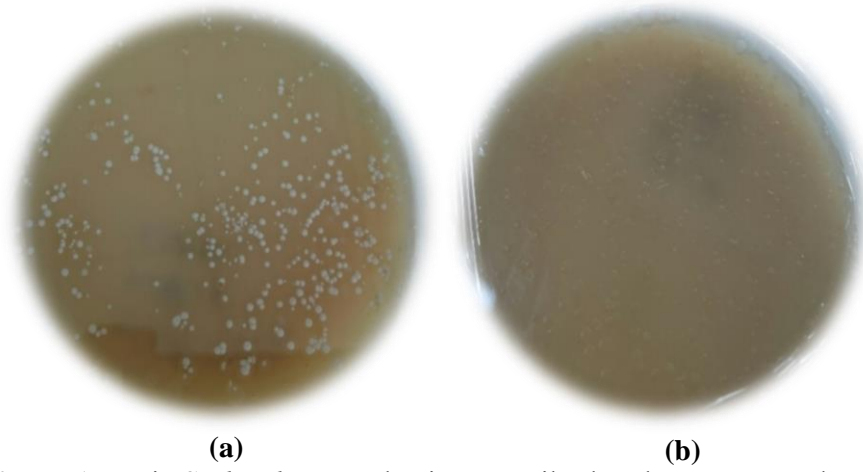


Şekil 3.8. Rekombinant pLB1ET vektörünün ikili restriksiyon enzim kesimi ve PCR ile doğrulanması, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pLB1ET, 2: pLB1ET'nin kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR ile *bldG* geninin amplifikasyonu



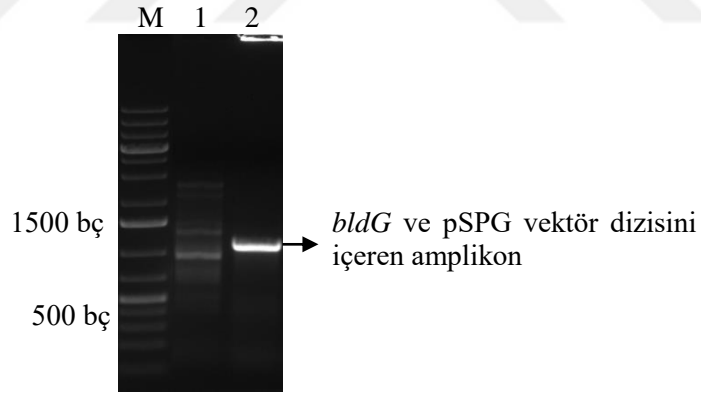
Şekil 3.9. Rekombinant pLB2ET vektörünün ikili restriksiyon enzim kesimi ve PCR ile doğrulanması, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *NdeI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pLB2ET, 2: 1: *NdeI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pLB2, 3: pLB1ET'nin kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR ile *bldG* geninin amplifikasyonu, 4: *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR, 5: Kalıp DNA yerine dH₂O kullanılarak gerçekleştirilen PCR

Çalışmanın devamında, *E. coli* pLB1ET ve *E. coli* pLB2ET suşları ile *S. clavuligerus* arasında konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan Mannitol Soy agara (MS agar/MSA) (Ek 4) hazırlık aşamasında 10 mM CaCl₂ veya 10 mM MgCl₂ eklenmiştir. *E. coli* pLB1ET ve pLB2ET ile *S. clavuligerus* arasındaki konjugasyon sonrasında CaCl₂ içeren MS agarda üreyen ekskonjugantlarda sporlanmanın indüklendiği tespit edilmiştir (Şekil 3.10).



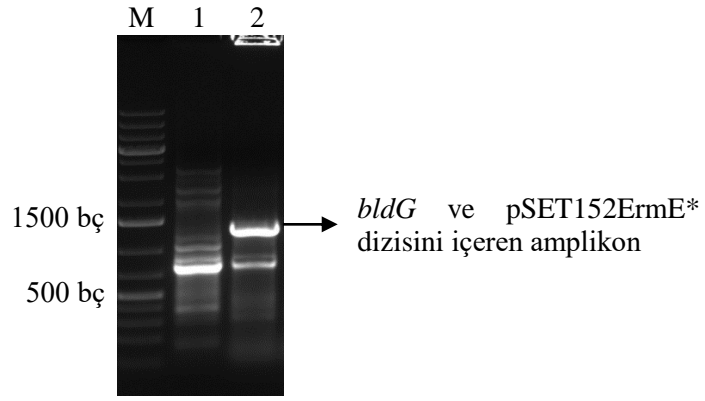
Şekil 3.10. pLB1ET'nin *S. clavuligerus*'a konjugasyon ile aktarılması sonrasında CaCl_2 (a) ve MgCl_2 (b) içeren MS agarlarda üreyen ekskonjugantların görünümü

MS agarda üreyen ekskonjugantlar apramisin içeren TSA besiyerlerine transfer edilmiştir. Burada üreyen ekskonjugantlardan koloni PCR yapılarak doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR'da primer olarak *bldG* geninin amplifikasyonunda kullanılan geri primer ile apramisin sekansından dizayn edilen ileri primer kullanılmıştır (Ek 1) ve Bu PCR reaksiyonu sonrasında beklenen ampikon büyüklüğü 999 bç'dir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).



Şekil 3.11. pLB1ET vektörünü taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* suşunun PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu, 2: Kalıp DNA olarak pLB1ET içeren *S. clavuligerus* ekskonjugantına ait DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR [*bldG* (452 bç) ve pSPG (547 bç) sekansı içeren ampikon]

pLB1ET vektörünü içeren rekombinant *S. clavuligerus* hücreleri *S. clavuligerus* LB1 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.12. pLB2ET vektörünün kromozoma entegre olduğu rekombinant *S. clavuligerus* suşunun PCR ile doğrulanması, M: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1: *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu, 2: Kalıp DNA olarak pLB2ET'nin genomuna entegre olduğu *S. clavuligerus* ekskonjugantına ait DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR [*bldG* (452 bç)ve pSET152ErmE* (765 bç) sekansı içeren amplicon]

pLB2ET vektörü kromozomuna entegre olan rekombinant *S. clavuligerus* hücresi *S. clavuligerus* LB2 olarak isimlendirilmiştir.

3.5. Manipüle Suşlarda Tunikamisin Üretiminin Biyoassay ve HPLC Analizi ile Karşılaştırılması

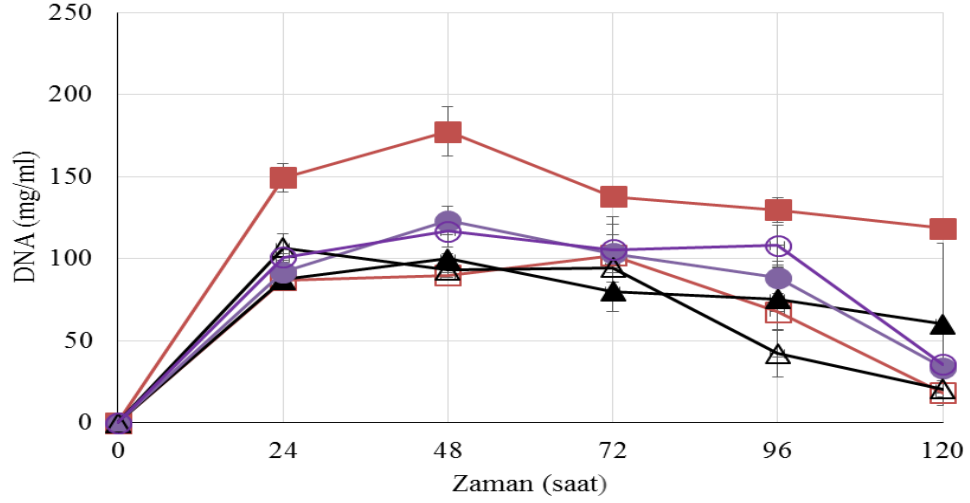
Ön çalışma olarak *S. clavuligerus* ATCC27064'in tunikamisin üretiminin en iyi olduğu besiyerini belirlemek için optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Literatürde TYD ve TSBY besiyerlerinin bu amaçla kullanıldığı rapor edilmiştir (Tsvetanova & Price, 2001; Chen vd, 2010). Yabanıl suşun her iki besiyerine ait katı ve sıvı kültürleri elde edilmiş, biyoassay yöntemi ile tunikamisin üretimleri incelendiğinde çok büyük farklılıklar olmamakla birlikte sıvı TSBY besiyerinin tunikamisin üretimini daha olumlu etkilediği belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmanın devamında TSBY sıvı besiyeri ile çalışılmıştır. Ancak, P_{glpF} promotörü ancak gliserol varlığında indüklenebildiğinden deney öncesinde TSBY besiyerine % 0.5 oranında gliserol eklenmiş (Kurt vd, 2013) ve besiyeri TSBYG olarak adlandırılmıştır.

BldG pleiotropik regülatörü ile CcaR cluster (yolak)-özü regülatörlerinin *S. clavuligerus*'un tunikamisin biyosentezi üzerindeki muhtemel düzenleyici etkilerini incelemek amacıyla fermentasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan suşlar şunlardır: Her iki genin antibiyotik direnç genleri ile yok edildiği/tahrip edildiği mutant suşlar (*bldG* geninin yok edildiği *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ ve *ccaR* geni bozulmuş *S. clavuligerus* *ccaR::aph* mutantları), her iki genin bağımsız olarak, gliserol ile

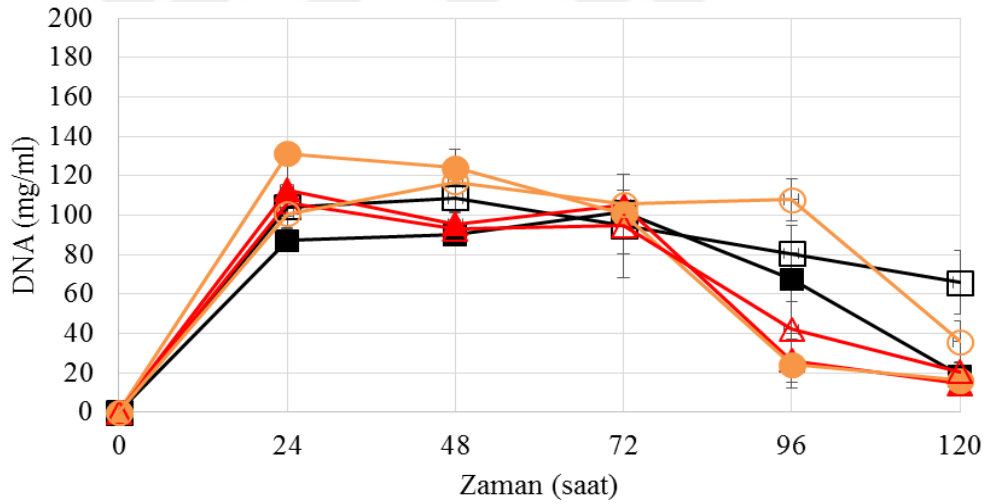
indüklenen P_{glpF} promotorunu taşıyan pSPG vektörüne klonlanması ve bu rekombinant vektörlerin *S. clavuligerus* hücrelerine aktarılması ile elde edilen rekombinant suşlar (çok kopyalı *ccaR* genini içeren *S. clavuligerus* pAK23 ve *bldG* geninin çoklu kopyasını taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* LB1), *ccaR* geninin ekstra kopyasının kendi promotoru altında pSET152 vektörüyle birlikte kromozoma entegre olduğu rekombinant *S. clavuligerus* pSET-PC ve P_{ermE^*} promotoru altında ekstra *bldG* genine ait kopyanın kromozomuna entegre olduğu rekombinant *S. clavuligerus* LB2), genleri içermeyen vektöre sahip kontrol suşları (*S. clavuligerus* pSPG ve *S. clavuligerus* pSET152 ile son olarak yabanıl *S. clavuligerus* ATCC27064 suşu. Tüm suşlar 500 ml hacimli çentikli erlenlerde 50 ml hacmindeki TSBYG besiyerinde 28 °C’de 5 gün boyunca 220 rpm çalkalama ile inkübe edilmişlerdir. Her bir suşa ait üç biyolojik replika ile çalışılmış ve 24 saat aralıklarla DNA kuantifikasyonu için örnekler alınmıştır. Fermentasyonun 4. gününde RNA izolasyonu, biyoassay ve de HPLC çalışmaları için örnekler alınmıştır. Biyoassay ve HPLC çalışmaları için tunikamisin standardı (Sigma) kullanılmıştır.

3.5.1. Kontrol ve manipüle suşlarda DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi

Suşların üreme eğrileri karşılaştırıldığında 24 ila 48. saatler arasında hepsinin durgunluk fazına girdikleri görülmektedir (Şekil 3.13 ve 3.14). En iyi üreme profili mutant *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ suşunda kaydedilmiştir. *bldG* geninin ekstra kopyasının kromozoma entegrasyonu, vektör kontrolü (*S. clavuligerus* pSET152) ile benzer üreme profile sergilemektedir. *bldG* geninin çoklu kopyasının hücrede ifadesinin gerçekleştiği *S. clavuligerus* LB1 suşu kontrolleri ile T_{96} ya kadar benzer üreme eğrisine sahip olup bu saatten sonra üremesinde daha yavaş bir düşüş gerçekleşmiştir (Şekil 3.13). *ccaR* manipülasyonu olan suşlar kontrolle kıyaslandığında, T_{24} - T_{48} aralığında en yüksek üreme değeri *S. clavuligerus* pSET-PC’de elde edilmiştir. Bu bakterinin kontrol suşunda da üreme profili benzerdir. *S. clavuligerus* *ccaR::aph* mutantında ise *S. clavuligerus* ATCC27064 suşuna göre T_{72} ’ye kadar nispeten daha yüksek bir üreme değeri söz konusudur (Şekil 3.14). *S. clavuligerus* pAK23 ve kontrol suşu *S. clavuligerus* pSPG fermentasyon süresince hemen hemen aynı üreme profilini sergilemişlerdir.



Şekil 3.13. *S. clavuligerus* ATCC27064(□), *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ (■) ve rekombinant suşların, LB1 (▲), LB2(●), pSPG (Δ), pSET152 (○) TSBYG besiyerinde zamana bağlı üreme profilleri

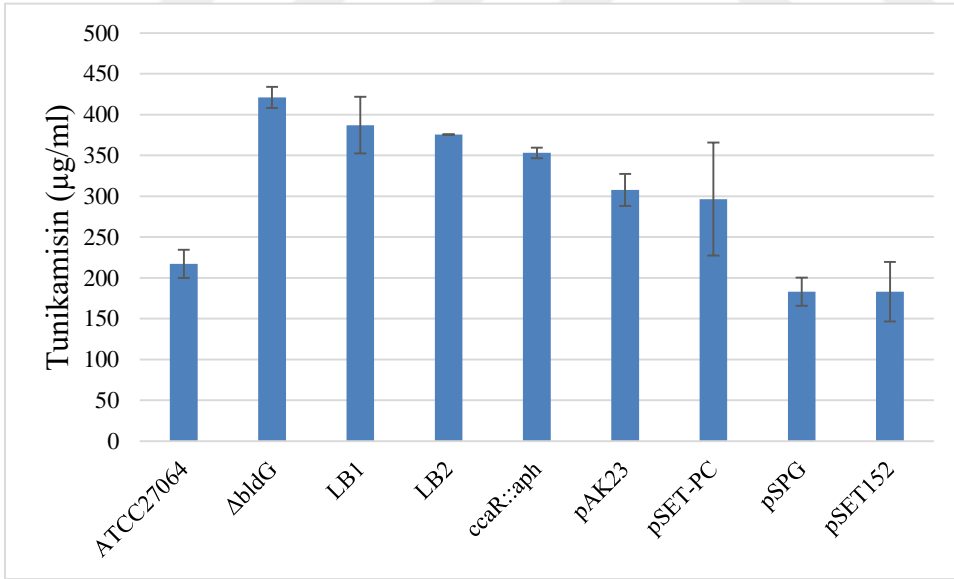


Şekil 3.14. *S. clavuligerus* ATCC27064(■), *S. clavuligerus* *ccaR::aph*(□) ve rekombinant suşların pSET-PC(●), AK23(▲), pSPG(Δ), pSET152(○), TSBYG besiyerinde zamana bağlı üreme profilleri

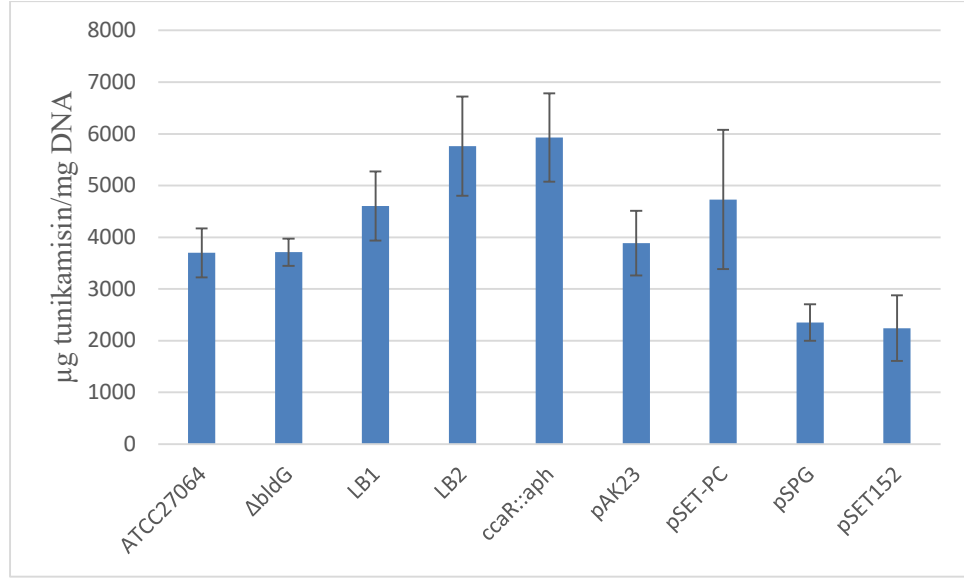
3.5.2. Kontrol ve manipüle suşlarda tunikamisin üretiminin biyoassay ile belirlenmesi

Biyoassay sonuçları incelendiğinde, en yüksek volumetrik tunikamisin üretiminin 421.1 $\mu\text{g/ml}$ ile *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ mutantına ait olduğu tespit edilmiştir. *S. clavuligerus* ATCC27064 suşu ise 217.05 $\mu\text{g/ml}$ değerinde tunikamisin üretimi gerçekleştirmiş olup $\Delta bldG$ mutantındaki artış yabancı suşa kıyasla 1.94 mislidir.

İlginç bir şekilde, *bldG* geninin hücrede yok edilmesinin yanı sıra, çoklu ifadesinin (*S. clavuligerus* LB1) ve ekstra kopyasının kromozoma entegrasyonunun (*S. clavuligerus* LB2) da tunikamisin üretiminde kontrollere kıyasla dikkate değer ölçüde artışa yol açtığı görülmektedir. *S. clavuligerus* LB1 (387.12 µg/ml)'de *S. clavuligerus* pSPG (183.03 µg/ml) ve *S. clavuligerus* ATCC27064'e göre sırası 2.11 ve 1.78 kat daha yüksek tunikamisin üretimi sağlanırken, *S. clavuligerus* LB2 (375.78 µg/ml)'de bu fark *S. clavuligerus* pSET152 (183.03 µg/ml) ve yabancı suşa göre sırası ile 2.05 ve 1.73 kattır (Şekil 3.15). Hücrelerin tunikamisin üretim kapasiteleri her bir suş için mg DNA başına üretilen µg tunikamisin değerleri tespit edilerek de karşılaştırılabilmektedir. Buna göre, *AbldG* mutantının üremesi kontrole kıyasla daha yüksek olduğundan bu durum spesifik üretimini etkilemiştir. Dolayısı ile *AbldG* mutantının spesifik tunikamisin üretimi yabancı suş ile aynıdır. *S. clavuligerus* LB1'de spesifik tunikamisin üretimi *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *S. clavuligerus* pSPG'ye göre sırası ile 1.24 ve 1.96 kat daha yüksek iken *S. clavuligerus* LB2'de bu fark kontrollerine kıyasla 1.56 (*S. clavuligerus* ATCC27064) ve 2.57 (*S. clavuligerus* pSET152) kattır (Şekil 3.16).



Şekil 3.15. *S. clavuligerus* ATCC27064 suşu ile *bldG* ve *ccaR* genleri manipüle suşlarda ve bunların vektör kontrollerinde volumetrik tunikamisin üretimlerinin karşılaştırılması

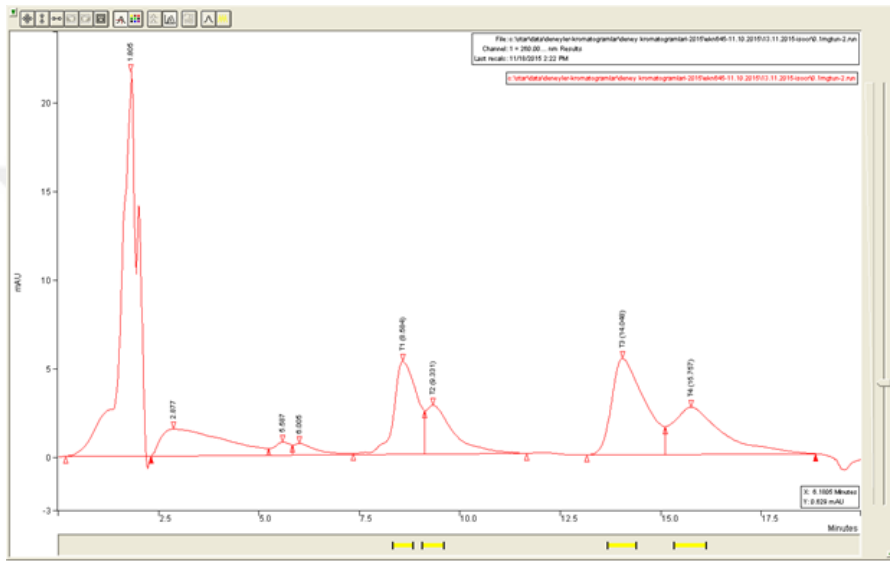


Şekil 3.16. *S. clavuligerus* ATCC27064 suşu ile *bldG* ve *ccaR* genleri manipüle suşlarda ve bunların vektör kontrollerinde spesifik tunikamisin üretimlerinin karşılaştırılması

ccaR geninin tunikamisin üretimi üzerindeki etkisini incelemek üzere kontrol ve manipüle suşların TSBYG kültürlerinden elde edilen biyoassay sonuçlarına bakıldığında, *bldG* geninin manipüle edildiği suşlarda olduğu gibi *ccaR* manipülasyonu olan tüm suşlarda tunikamisin üretiminin kontrollere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *S. clavuligerus ccaR::aph* mutantında volumetrik tunikamisin üretimi 353.1 µg/ml ile *S. clavuligerus* ATCC27064'e göre 1.63 kat daha yüksek bulunmuştur. *ccaR* geninin hücrede çoklu ifadesinin (*S. clavuligerus* pAK23) ve ekstra kopyasının kromozoma entegrasyonunun (*S. clavuligerus* pSET-PC) tunikamisin üretiminde kontrollere kıyasla dikkate değer ölçüde artışa yol açtığı görülmektedir. *S. clavuligerus* pAK23 (307.75 µg/ml)'de *S. clavuligerus* pSPG ve *S. clavuligerus* ATCC27064'e göre sırası 1.68 ve 1.41kat daha yüksek tunikamisin üretimi sağlanırken, *S. clavuligerus* pSET-PC (296.41 µg/ml)'de bu fark *S. clavuligerus* pSET152 ve yabancı suşa göre sırası ile 1.62 ve 1.36 kattır (Şekil 3.15). *S. clavuligerus* pAK23'de spesifik tunikamisin üretimi *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *S. clavuligerus* pSPG'ye göre sırası ile 1.05 ve 1.65 kat daha yüksek iken *S. clavuligerus* pSET-PC'de bu fark kontrollerine kıyasla 1.28 (*S. clavuligerus* ATCC27064) ve 2.11 (*S. clavuligerus* pSET152) kattır. *S. clavuligerus ccaR::aph* mutanti ise yabancı suşla karşılaştırıldığında 1.6 kat daha fazla spesifik tunikamisin üretmiştir (Şekil 3.16).

3.5.3. Kontrol ve manipüle suşlarda tunikamisin üretiminin HPLC analizi ile karşılaştırılması

S. clavuligerus ATCC27064 suşu ve tüm manipüle suşların kültür süpernatantlarından ekstrakte edilen tunikamisin miktarlarını belirlemek üzere HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. 7.5 ve 17.5 retensiyon dakikaları arasında tunikamisin standardına ait tespit edilen dört adet majör pik (T1, T2, T3, T4) literatürde rapor edilen tunikamisin pikleri ile uyumludur (Chen vd, 2010) (Şekil 3.17).



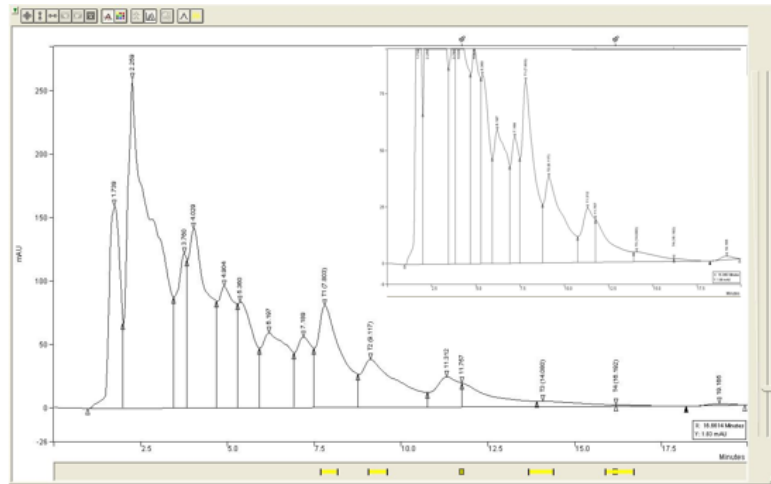
Şekil 3.17. HPLC analizi sonucunda elde edilen tunikamisin standardı (0.1 mg/ml)'na ait kromatogram

Çizelge 3.1'de her bir suşa ait HPLC analizi sonucunda elde edilen tunikamisin üretimleri verilmektedir. Kromatogramlar ise Şekil 3.18'de yer almaktadırlar.

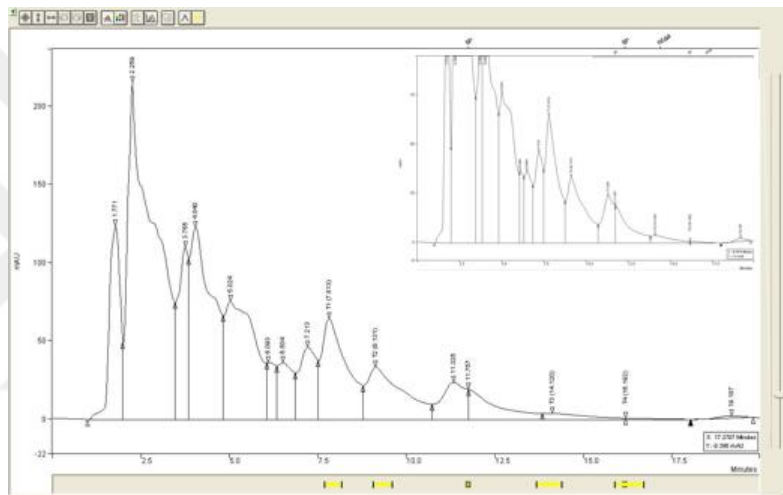
Çizelge 3.1. HPLC ile belirlenen her bir suşa ait tunikamisin üretimleri

Suşlar	Tunikamisin ($\mu\text{g/ml}$)				Toplam
	T1	T2	T3	T4	
<i>S. clavuligerus</i> ATCC27064	79,2 \pm 1,4	69 \pm 10,2	16 \pm 1,1	4,6 \pm 0,9	168,8
<i>S. clavuligerus</i> <i>AbldG</i>	1562,7 \pm 23,3	1631,2 \pm 34,9	98,9 \pm 8,6	20,8 \pm 1,1	3313,6
<i>S. clavuligerus</i> <i>ccaR::aph</i>	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	
<i>S. clavuligerus</i> LB1	50,9	45,8	11	6,2	113,9
<i>S. clavuligerus</i> LB2	215,2 \pm 4,5	244,4 \pm 4,9	41,3 \pm 0,6	18 \pm 0,7	518,8
<i>S. clavuligerus</i> pAK23	1297,3 \pm 30,8	1446,4 \pm 48,1	86,4 \pm 0,2	13 \pm 0,2	2843,1
<i>S. clavuligerus</i> pSET-PC	1487,4 \pm 20,7	1584,7 \pm 32,4	123 \pm 4,8	25,9 \pm 0,4	3221
<i>S. clavuligerus</i> pSPG	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	
<i>S. clavuligerus</i> pSET152	t.e.	t.e.	t.e.	t.e.	

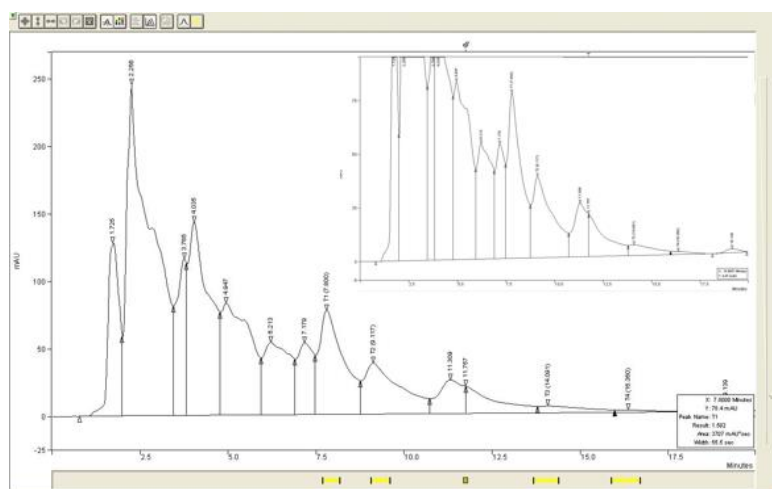
t.e. tespit edilemedi



e) *S. clavuligerus* $\Delta bldG$

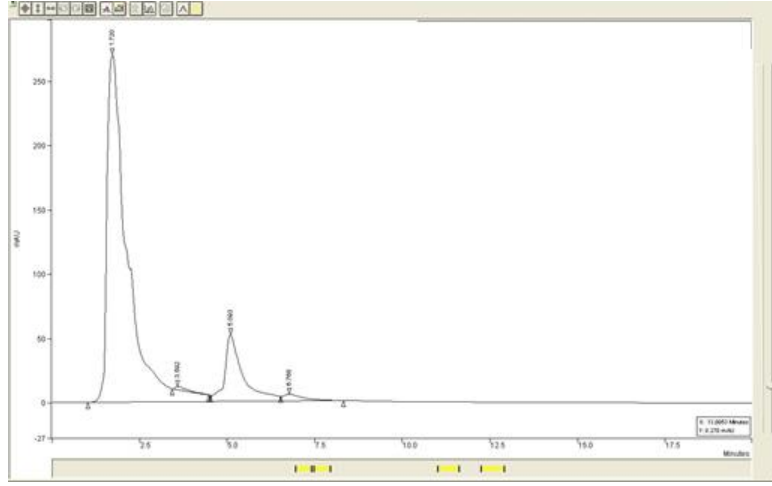


f) *S. clavuligerus* pAK23

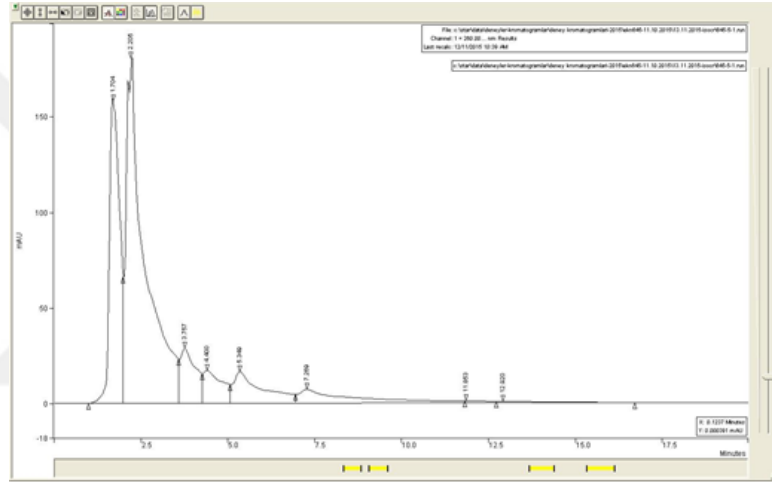


g) *S. clavuligerus* pSET-PC

Şekil 3.18. devamı



h) *S. clavuligerus* pSPG

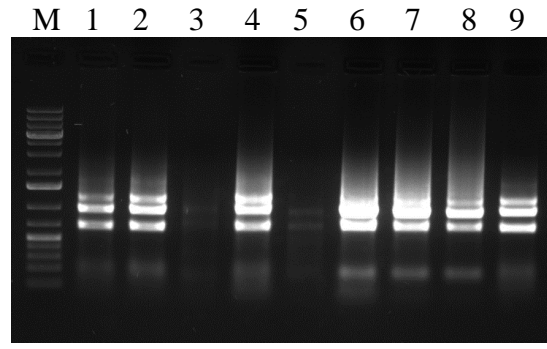


i) *S. clavuligerus* pSET152

Şekil 3.18. devamı

3.6. *bldG* ve *ccaR* Regülatör Geni Manipüle Suşlarda Tunikamisin Gen Kümesinin Ekspresyonu

İnkübasyonun 96. saatinde TSBYG kültürlerinden alınan örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.19). Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve kaliteleri belirlenmiştir (Çizelge 3.2).



Şekil 3.19. Tüm bakterilerden elde edilen RNA örnekleri. 1: *S. clavuligerus* LB1, 2: *S. clavuligerus* LB2, 3: *S. clavuligerus* pAK23, 4: *S. clavuligerus* $\Delta bldG$, 5: *S. clavuligerus* *ccaR::aph*, 6: *S. clavuligerus* pSPG, 7: *S. clavuligerus* pSET152, 8: *S. clavuligerus* pSET-PC, 9: *S. clavuligerus* ATCC27064

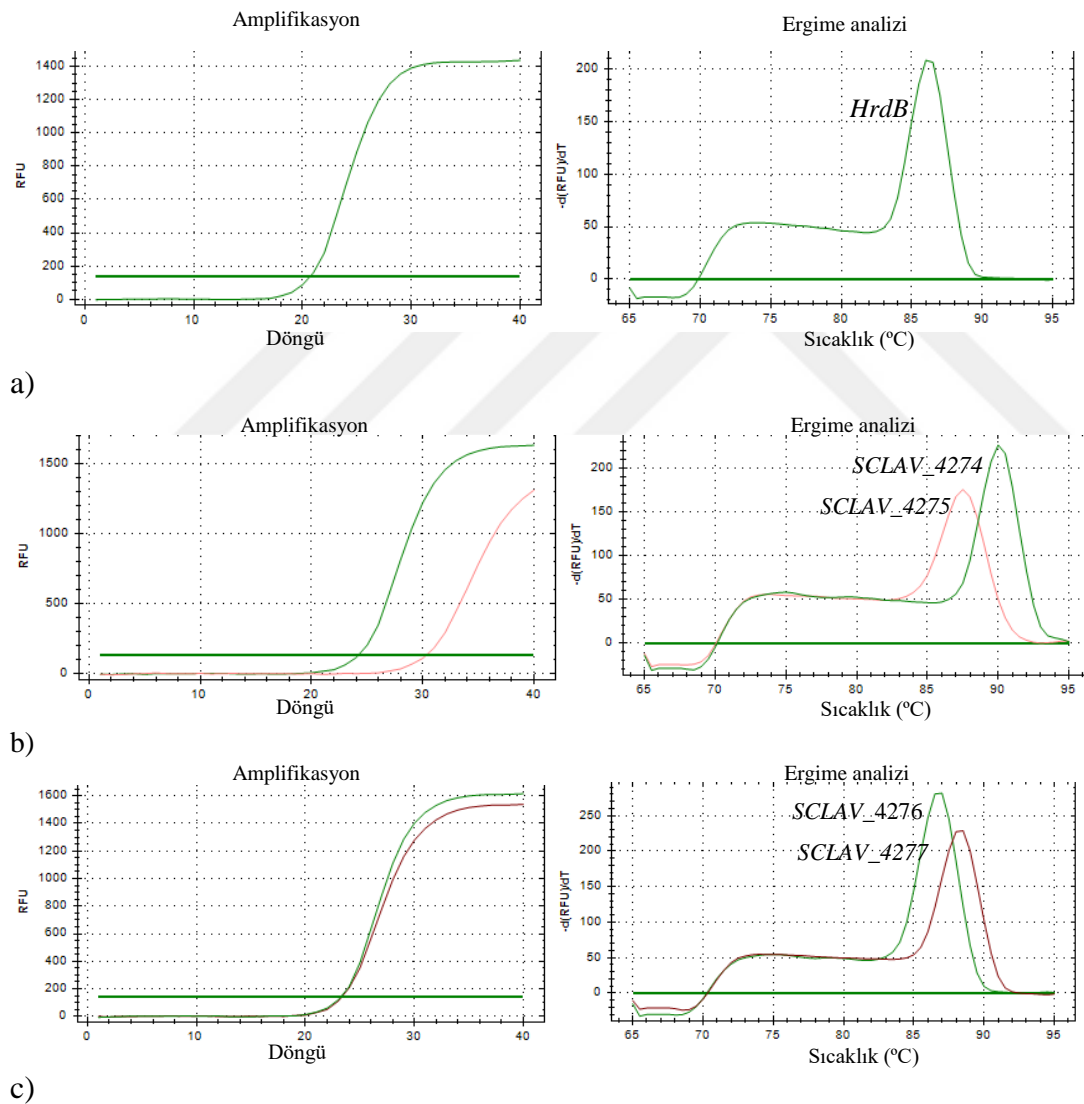
Çizelge 3.2. İzole edilen RNA örneklerinin nanodrop analiz sonuçları

No	Örnek adı	A _{260/280}	A _{260/230}	Konsantrasyon(ng/μl)
1	<i>S. clavuligerus</i> LB1	2.06	2.13	1075
2	<i>S. clavuligerus</i> LB2	2.00	2.06	844
3	<i>S. clavuligerus</i> pAK23	1.89	1.62	164
4	<i>S. clavuligerus</i> $\Delta bldG$	2.07	2.17	1572
5	<i>S. clavuligerus</i> <i>ccaR::aph</i>	2.01	2.02	201
6	<i>S. clavuligerus</i> pSPG	2.05	2.15	1129
7	<i>S. clavuligerus</i> pSET152	2,08	2,14	2378
8	<i>S. clavuligerus</i> pSET-PC	2.06	2.18	1552
9	<i>S. clavuligerus</i> ATCC27064	2.09	2.21	1884

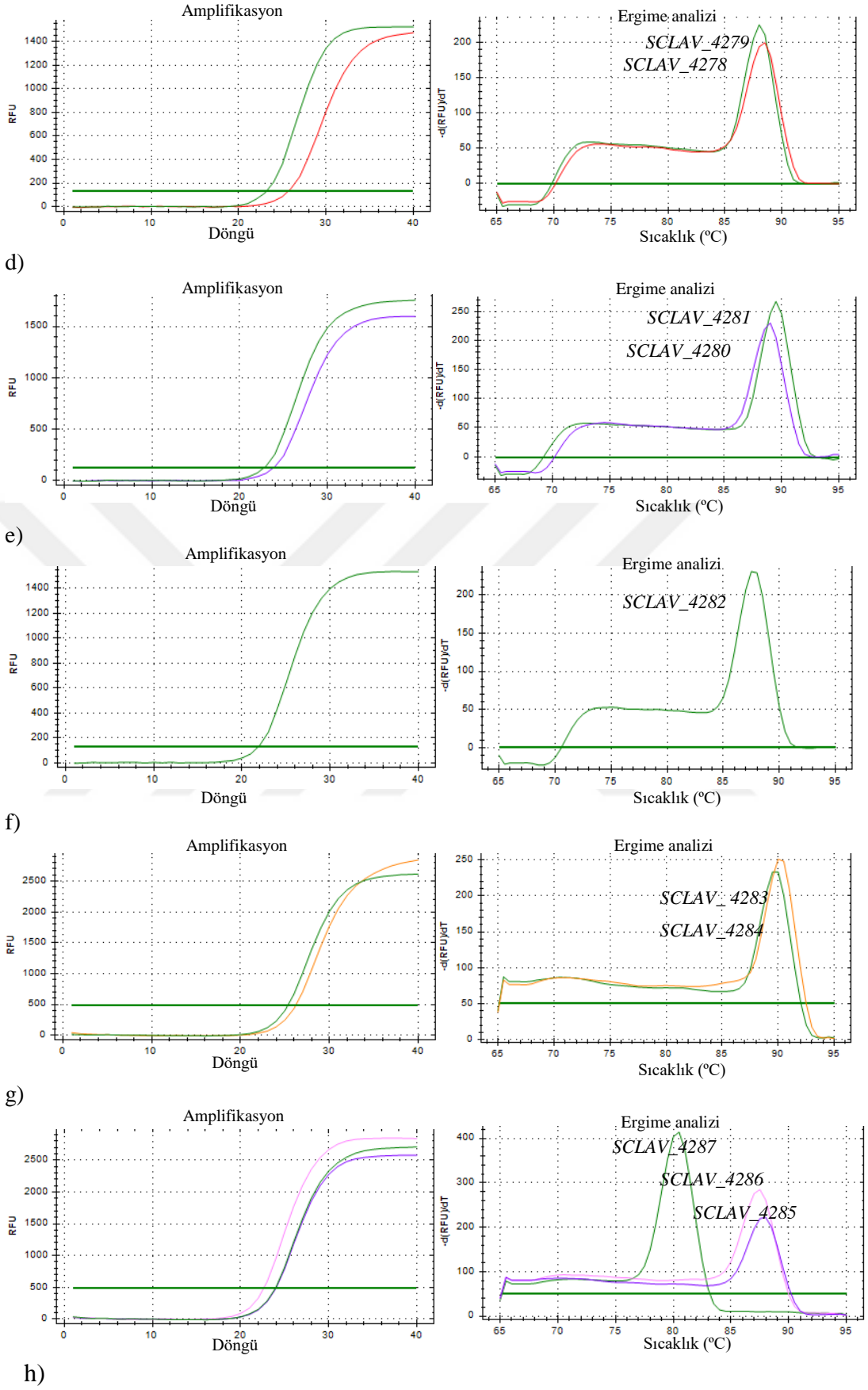
3.6.1. *S. clavuligerus* ATCC27064 suşunda tunikamisin gen kümesinin amplifikasyon ve ergime eğrileri

qPCR koşullarının optimizasyonu; güvenilir, tekrarlanabilir ve hassas sonuçların elde edilebilmesi için oldukça önemlidir. Primer konsantrasyonları, döngü koşulları, kullanılan tampon içeriği ve MgCl₂ konsantrasyonu optimizasyon sürecinde dikkate alınması gereken önemli parametreler arasındadır. Aynı zamanda kullanılan RNA kalitesi de qPCR ile güvenilir sonuçlar alınmasında oldukça önemlidir. Çalışma öncesinde bu tip öncül optimizasyon basamakları varyasyonları elimine etmeye yardımcı olmaktadır (Logan vd, 2009). Çalışmada, GeneJET RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapılmış, fenol-kloroform ve DNaz muameleleri elde edilen RNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu artırılmıştır. İki basamaklı qRT-PCR metodu ile ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için 250 ng primer (Oligo(dT))₁₈

ve 1 µg total RNA kullanılmıştır. SsoAdvanced Universal SYBR Green supermix (Biorad) a ait karışımda Mg⁺⁺ konsantrasyonu sabit olduğundan sadece primerlerin farklı konsantrasyonları (250, 350, 500 nM) denenmiş ve 250 nM primer konsantrasyonunun çalışmamız için uygun olduğu belirlenmiştir. Optimize koşullarda qRT-PCR analizleri ile *tun* gen kümesinin *S. clavuligerus* ATCC27064'e kıyasla manipüle suşlarda ifade değişimleri incelenmiştir. SYBR temelli deneyler sonucunda her bir gene ait farklı ekspresyon profilleri elde edilmiştir. *S. clavuligerus* ATCC27064'de her bir gene ait amplifikasyon ve ergime eğrilerine ait grafikler ile Ct ve Tm değerleri sırası ile Şekil 3.20 ve Çizelge 3.3'de verilmektedir.



Şekil 3.20. Optimize edilmiş koşullarda *S. clavuligerus* ATCC27064'de *hrdB* referans geni ve *tun* gen kümesine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon (ergime) eğrileri



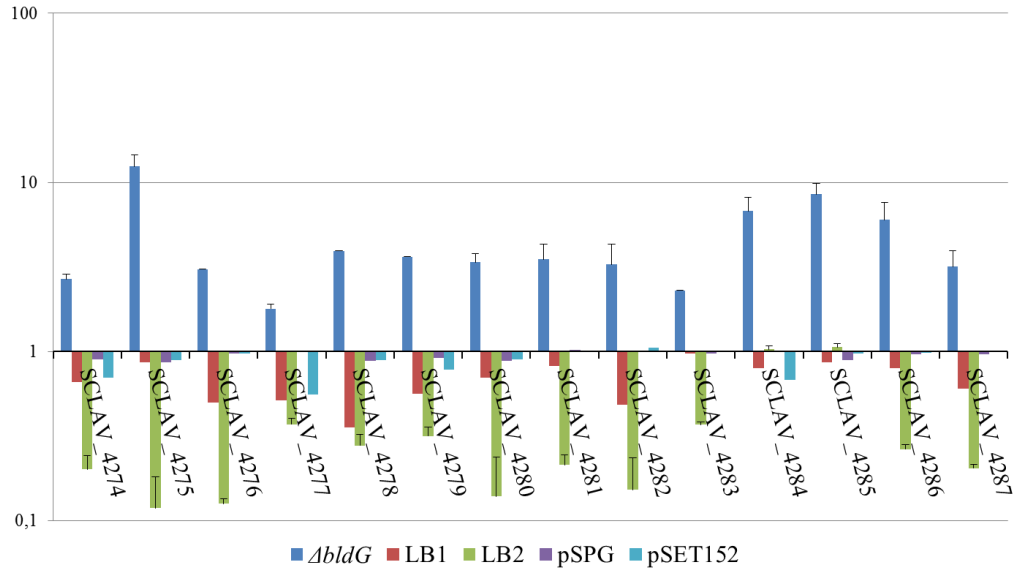
Şekil 3.20. Devamı

Çizelge 3.3. *S. clavuligerus* ATCC27064'te *tun* gen kümesine ait genlerin amplifikasyon eğrileri ve ergime analizlerine ait Ct ve Tm değerleri

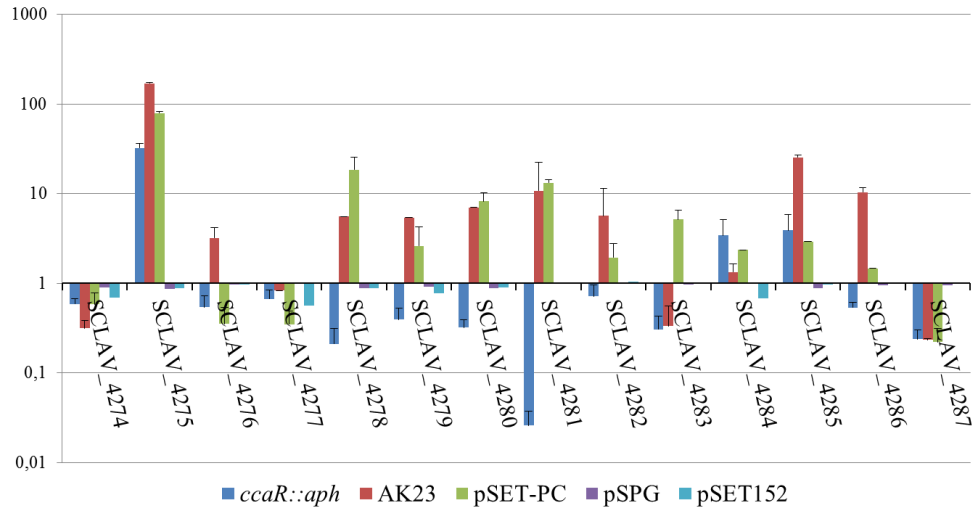
Genler	Ct _{ATCC}	Tm(°C)
<i>SCLAV_4274/14/N</i>	24.24	90.0
<i>SCLAV_4275/13/M</i>	30.36	87.5
<i>SCLAV_4276/12/L</i>	23.29	88.5
<i>SCLAV_4277/11/K</i>	23.19	87.0
<i>SCLAV_4278/10/J</i>	25.62	88.5
<i>SCLAV_4279/9/I</i>	23.14	88.0
<i>SCLAV_4280/8/H</i>	23.88	89.0
<i>SCLAV_4281/7/G</i>	22.79	89.5
<i>SCLAV_4282/6/F</i>	21.86	87.5
<i>SCLAV_4283/5/E</i>	26.20	90.0
<i>SCLAV_4284/4/D</i>	25.31	90.0
<i>SCLAV_4285/3/C</i>	23.63	88.0
<i>SCLAV_4286/2/B</i>	22.60	87.5
<i>SCLAV_4287/1/A</i>	23.94	80.5
<i>hrdB</i>	20.69	86.0

Amplifikasyon eğrileri ve ergime analizi sonuçları değerlendirildiğinde her bir gene ait nükleotit dizisinin amplifikasyonu için tasarlanan primerlerin yüksek özgüllükte olduğu ve optimize koşullarda güzel sonuçlar verdiği, dimer oluşumu ve spesifik olmayan amplifikasyonların meydana gelmediği görülmektedir.

Tunikamisin gen kümesinin yabancı *S. clavuligerus* ATCC27064 suşuna kıyasla manipüle suşlardaki qRT-PCR ile elde edilen ifade değerleri Şekil 3.21 ve 3.22'te verilmektedir. Bazı ekspresyon değerleri doğrusal skalada göstermek için oldukça düşük olduğundan grafiklerde genlerin rölatif ekspresyonlarının ifadesi için logaritmik transformasyon tercih edilmiştir (Derveaux vd, 2010). Kontrol *S. clavuligerus* ATCC27064 suşunun ifade değeri 1 olarak kabul edilmiştir. Çizelge 3.4'te tüm suşlara ait sayısal rölatif ifade değerleri yer almaktadır.



Şekil 3.21. qRT-PCR ile *S. clavuligerus* ATCC27064 kontrol suşuna kıyasla *S. clavuligerus* $\Delta bldG$, *S. clavuligerus* LB1, *S. clavuligerus* LB2 ve vektör kontrolleri *S. clavuligerus* pSPG ve *S. clavuligerus* pSET152’de tunikamisin gen kümesindeki genlerin rölatif ifade değerleri



Şekil 3.22. qRT-PCR ile *S. clavuligerus* ATCC27064 kontrol suşuna kıyasla *S. clavuligerus* *ccaR::aph*, *S. clavuligerus* pAK23, *S. clavuligerus* pSET-PC ve vektör kontrolleri *S. clavuligerus* pSPG ve *S. clavuligerus* pSET152’de tunikamisin gen kümesindeki genlerin rölatif ifade değerleri

Çizelge 3.4. qRT-PCR sonuçlarına göre elde edilen rölatif ifade değerleri

<i>S.clavuligerus</i>	<i>ΔbldG</i>	LB1	LB2	<i>ccaR::aph</i>	pSET-PC	pAK23	pSPG	pSET152
<i>SCLAV_4274</i> <i>tun14(tun N)</i>	2,68	0,65	0,2	0,58	0,58	0,31	0,9	0,7
<i>SCLAV_4275</i> <i>tun13(tun M)</i>	12,41	0,86	0,11	32,23	79,29	169,32	0,86	0,89
<i>SCLAV_4276</i> <i>tun12 (tunL)</i>	3,06	0,5	0,12	0,54	0,35	3,21	0,97	0,97
<i>SCLAV_4277</i> <i>tun11(tunK)</i>	1,79	0,51	0,37	0,67	0,34	0,82	0,99	0,56
<i>SCLAV_4278</i> <i>tun10(tunJ)</i>	3,93	0,35	0,27	0,21	18,5	5,55	0,88	0,89
<i>SCLAV_4279</i> <i>tun9(tunI)</i>	3,64	0,56	0,31	0,39	2,62	5,42	0,92	0,78
<i>SCLAV_4280</i> <i>tun8(tunH)</i>	3,38	0,7	0,13	0,32	8,21	7,03	0,88	0,9
<i>SCLAV_4281</i> <i>tun7 (tunG)</i>	3,51	0,82	0,21	0,026	13,2	10,76	1,02	1
<i>SCLAV_4282</i> <i>tun6 (tunF)</i>	3,27	0,48	0,15	0,71	1,94	5,68	1	1,05
<i>SCLAV_4283</i> <i>tun5 (tunE)</i>	2,3	0,97	0,36	0,3	5,16	0,33	0,97	0,99
<i>SCLAV_4284</i> <i>tun4 (tunD)</i>	6,76	0,79	1,02	1,33	2,36	1,33	0,99	0,68
<i>SCLAV_4285</i> <i>tun3 (tunC)</i>	8,52	0,86	1,06	25,34	2,92	25,34	0,89	0,97
<i>SCLAV_4286</i> <i>tun2 (tunB)</i>	6,01	0,79	0,26	10,35	1,46	10,35	0,96	0,98
<i>SCLAV_4287</i> <i>tun1 (tunA)</i>	3,18	0,6	0,2	0,23	0,22	0,23	0,96	1

S. clavuligerus ATCC27064’de *bldG* geninin yok edilmesi *tun* gen kümesindeki tüm genlerin ifadelerinde 1.8 ila 12.4 katlık artışa neden olmuştur. En yüksek rölatif ifade değeri 12,41 ile *SCLAV_4275* genine aittir. Bu gen metiltransferaz enzimine homolog bir enzim kodlamakta olup Tun B ile birlikte tunikaminil urasil iskeletinin oluşumunda görev alır. Putatif ABC transportör proteinlerinin kodlanmasından sorumlu olan, dolayısı ile tunikamisin direnç ve dışarı salınımdan sorumlu enzimleri kodlayan genlerden olan *SCLAV_4279 (tunI)* ve *SCLAV_4278 (tunJ)* ifadelerinin *ΔbldG* mutantında kontrole göre sırası ile 3.6 ve 3.9 katlık artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.21). Bununla birlikte *bldG* geninin *S. clavuligerus* LB1’de çoklu ifadesi ve *S. clavuligerus* LB2’de kromozoma entegrasyonu tunikamisin gen kümesine ait genlerin ifadelerinde kontrol *S. clavuligerus* ATCC27064 ve vektör kontrolleri ile karşılaştırıldığında düşüşe sebep olmuştur. *bldG* geni ile ilgili olarak elde etmiş

olduğumuz rölatif ifade değerleri bize genin yok edilmesinin tunikamisin biyosentezi ile alakalı genlerin ifadelerinde artışa yol açtığını, *bldG* geninin ekstra kopyasının kromozoma entegrasyonunun veya çoklu kopyasının hücrede ifadesinin ise ilgili genlerin rölatif ifadelerinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir.

Sefamisin C gen kümesinde konumlanmış olan *ccaR* geninin *aph* geni ile tahrip edilmesi tunikamisin gen kümesindeki gen ifadelerinde farklı etkilere neden olmuştur (Şekil 3.22). *SCLAV_4275 (tunM)*, *4284 (tunD)*, *4285 (tunC)* ve *4286 (tunB)* genlerinin rölatif ifade değerleri sırası ile 32.2, 1.33, 25.34 ve 10.35'tir. Bu genlerden her biri tunikamisin biyosentezinden sorumludurlar. Bununla birlikte, diğer tüm genlerin ifadelerinde kontrol suşa kıyasla düşüş tespit edilmiştir. *S. clavuligerus ccaR::aph*'ta kontrole göre en düşük rölatif ifade değeri 0.026 ile *SCLAV_4281(tunG)*'ye aittir. *tunG* nükleotit monofosfat fosfataz enzimini kodlayan gen olup tunikamil urasil çekirdeğinin oluşumunda rol oynayan UDP'nin uridin kaynağı olarak kullanılmasında görev alır. Dolayısı ile tunikamisin iskeletinin oluşumunda temel biyosentetik genlerdendir. *ccaR* geninin hücrede çoklu ifadesi *SCLAV_4274*, *4283* ve *4287* genlerinin ifadelerinde azalmaya buna karşılık tunikamisin ile ilgili diğer genlerin rölatif ifade değerlerinde dikkat çekici artışlara neden olmuştur. En yüksek ifade artışı ise *SCLAV_4275* genine ait olup rölatif ifade değeri kontrole kıyasla 169.3'tür. Dikkat çekici bir şekilde, *S. clavuligerus* pSET-PC suşunda da aynı genin rölatif ifadesinde 79.3 katlık bir artış söz konusudur. *SCLAV_4275* gen ifadesinin *ccaR* geninin yokluğunda da arttığı kaydedilmiş olmakla birlikte bu artış genin çoklu ifadesi ya da kromozoma entegrasyonu durumunda çok daha yüksektir. Öte yandan, bir diğer ilginç sonuç *SCLAV_4274* ve *4287* genlerinin rölatif ifadelerinin hem mutant *ccaR* suşunda hem de rekombinant olanlarda düşük düzeyde olmasıdır. Bununla birlikte, *S. clavuligerus ccaR::aph*'te rölatif ifade değeri en düşük gen olan *SCLAV_4281*, *S. clavuligerus* pSET-PC ve PAK23'te sırasıyla 13.2 ve 10.76 rölatif ekspresyon değeri vermiştir. Fonksiyonel bir *ccaR* geninin hücrede bulunmadığı durumlarda bazı genlerin ifadelerinde azalmanın görüldüğü, *ccaR* geninin hücrede ekstra kopyasının veya çok kopyasının varlığının genel olarak *tun* gen kümesindeki genlerin ekspresyonlarında artış sağladığı görülmektedir.

qRT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, pleiotropik *bldG* ve sefamisin C yolağında bulunan *ccaR* regülatörlerinin tunikamisin biyosentetik gen kümesini oluşturan genlerin ifadelerinde bir takım değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir.

Genel anlamda *bldG* regülatör geni tunikamisin gen ifadeleri üzerinde negatif bir düzenlenmeyle alakalı bir rol üstleniyor olabilir iken *ccaR* regülatör geninin ise tunikamisin gen ifadesini pozitif yönde etkilediğine dair bir çıkarım yapılabilir.



4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *S. clavuligerus*'ta kendine ait regülatör bir geni olmayan tunikamisin gen kümesinin moleküler düzenlenmesi ile ilgili daha fazla bilgi elde edebilmek için bu bakteride antibiyotik regülasyonunda farklı seviyelerde rol oynayan regülatör proteinlerin muhtemel etkileri araştırılmıştır. Pleiotropik BldG regülatör proteini kodlayan *bldG* regülatör geninin ve aynı zamanda sefamisin C yolağına konumlanan CcaR transkripsiyonel aktivatörünü kodlayan *ccaR* geninin tunikamisin biyosentezi ve *tun* gen kümesindeki genlerin ifadelerindeki etkileri biyoassay/HPLC ve qRT-PCR ile belirlenmiştir. BldG; morfolojik farklılaşma ve antibiyotik biyosentezini düzenlemeden sorumlu olan ve CcaR'de dahil birçok regülatörü etkileyerek *S. clavuligerus*'ta daha üst bir regülasyon basamağında yer alan bir pleiotropik regülatördür. CcaR ise sefamisin C dışında klavulanik asit ve holomisin antibiyotikleri üzerinde de regülatör etki gösteren önemli bir SARP-tipi CSR'dir. Çalışmada, *S. clavuligerus* ATCC27064'te bulunan *bldG* geninin ekstra kopyası entegrasyon vektörü pSET152ErmE* ye klonlanarak kromozoma entegre edilmiş (*S. clavuligerus* LB1) ve de gliserol promotörü altında pSPG vektörü içerisinde hücrede çok kopyalı ifadesi (*S. clavuligerus* LB2) sağlanmıştır. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda elde edilen *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ (Bignell vd, 2005) ve *S. clavuligerus* *ccaR::aph* (Perez-Llarena vd, 1997) mutantları ile *ccaR*'in ekstra kopyasını (*S. clavuligerus* pSET-PC) ve de çoklu kopyalarını taşıyan (*S. clavuligerus* pAK23) rekombinantlar (Kurt vd, 2013) çalışmaya dahil edilmiştir.

Mutant suşlar, rekombinantlar ve bunlara ait vektör kontrolleri yabancı suş *S. clavuligerus* ATCC27064 ile birlikte TSBYG (Chen vd, 2010) besiyerlerinde üretilmiştir. Tunikamisin ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalar dikkate alınarak örneklem zamanı olarak 96. saat seçilmiş (Tsvetanova vd, 2002; Chen vd, 2010), ve bu saat sonunda alınan örneklerden biyoassay, HPLC ve qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tunikamisin üretimi biyoassay ve HPLC analizleri ile incelendiğinde biyoassay verilerine göre; en yüksek volumetrik tunikamisin üretiminin *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ suşunda görülmüş ancak spesifik üretim incelendiğinde bakterinin üremesi fazla olduğundan hücre başına tunikamisin üretiminin kontrol suşu ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, HPLC verilerine bakıldığında bu

mutasyonun tunikamisin üretiminde kontrole kıyasla büyük farka yol açtığı görülmektedir. *S. clavuligerus* LB1 ve LB2 rekombinantlarında ise hem biyoassay hem de HPLC sonuçları değerlendirildiğinde en iyi tunikamisin üretimi *bltG*'nin ekstra kopyasının kromozoma entegre olduğu LB2 tarafından gerçekleştirilmektedir.

S. clavuligerus ccaR::aph suşunda biyoassay sonuçlarına göre kontrole göre daha iyi bir tunikamisin üretimi elde edilirken HPLC'de tunikamisine ait herhangi bir peak oluşumu tespit edilememiştir. Ancak, *ccaR* manipülasyonları içerisinde rekombinantlara ait biyoassay ve HPLC sonuçları benzer veriler sağlamıştır. Yine de *S. clavuligerus* pSET-PC suşunda HPLC yöntemi ile analiz sonucunda en iyi tunikamisin üretiminin elde edildiği görülmektedir. qRT-PCR datası incelendiğinde *ccaR::aph* mutantında belirgin genlerin rölatif ifadelerinde artma/azalmalar söz konusu iken pAK23 ve pSET-PC suşlarında genel olarak *tun* gen kümesindeki rölatif gen ifadeleri kontrollere göre artmıştır. HPLC ile *ccaR::aph* mutantında tunikamisine ait peaklerin elde edilememesi sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak, gen ifade analizleri ışığında, *ccaR* nin yokluğunda tunikamisin gen kümesinin ifadesinde azalma olduğu, bu genin ekstra kopyasının kromozoma entegrasyonu veya çoklu ifadesinin gen kümesinin rölatif ifade değerlerini artırdığı sonucuna varılmaktadır. Bu durum bize CcaR regülatörünün tunikamisin biyosentezi üzerinde pozitif etki gösterebileceğine dair ipuçları vermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda CSR regülatörlerinin sadece buldukları gen kümesinin biyosentezinden sorumlu olduğu antibiyotik üzerinde değil, aynı zamanda suş tarafından üretilen diğer antibiyotik gen kümeleri üzerinde de düzenleyici etki gösterebilecekleri rapor edilmiştir (Ünsaldı vd, 2016). Son yapılan proteom çalışmasında, homoserin dehidrogenaz geni bloke edilmiş mutant *S. clavuligerus hom::aph* suşunda kontrole kıyasla TunF proteininin ifadesinde azalma tespit edilmiştir (Ünsaldı, 2016). Bu mutant sefamisin C üretimi artırılmış bir suş olup aşırı sefamisin C üreten bu şusta tunikamisin biyosentezinde anahtar rollerden birine sahip TunF nin down regüle olması bu iki antibiyotik biyosentez regülasyonunun birbirleri ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Aynı *S. clavuligerus*'un *argR* holomisin biyosentezinin artması, klavulanik asit biyosentezinden sorumlu birçok enzimin ifadesinin arttığı ve tunikamisin biyosentezi ile ilgili olarak TunF'nin ifadesinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir.

S. clavuligerus $\Delta bldG$ mutantında klavulanik asit ve sefamisin C üretimlerinin olmaması *ccaR*'nin ifadesinin bloke olmasından dolayıdır (Bignell vd, 2005). *bldG* mutantı ile yapılan en son çalışmada BldN/AdsA adlı sigma faktörün *ccaR* transkripsiyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Bundan dolayı, BldN/AdsA'nın BldG ve *ccaR* ifadeleri arasındaki bağlantıyı açıklamak üzere tanımlanan ilk protein olabileceği ilgili proteom çalışmasında rapor edilmektedir (Ferguson vd, 2016). Yine aynı çalışmada, *bldG* mutantında BldH/AdpA'nın da ifadesinin azaldığı tespit edilmiş bu durum BldG regülatörünün *S. clavuligerus*'ta henüz bilinmeyen bir şekilde ve fakat BldH/AdpA'dan bağımsız olarak BldN/AdsA ifadesini düzenlediğine işaret etmektedir. qRT-PCR verilerine göre *S. clavuligerus* $\Delta bldG$ suşunda hemen hemen tüm tunikamisin gen kümesinde kontrole kıyasla önemli bir artış sağlanmış olması, buna karşın LB1 ve LB2 rekombinantlarında gen ifadelerinin belirgin bir düşüş göstermesi BldG proteininin tunikamisin üretimi üzerinde etki gösteren bir repressör proteini aktive ettiği, bu pleiotropik regülatörün ifade edilmediği durumlarda repressörün inaktif hale geçerek tunikamisin biyosentezi ve gen ifadesi üzerinde etki gösteremediği şeklinde açıklanabilecek bir durum söz konusu olabilir. Aynı zamanda, LB1 ve LB2 rekombinant suşlarında hala tunikamisin üretilabiliyor olması BldG'nin CcaR üzerinden de tunikamisin regülasyonu rolüne sahip olma durumu ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, bu tez *S. clavuligerus*'da tunikamisin antibiyotik biyosentezinin BldG ve CcaR tarafından regülasyonu konusunda yapılan ilk çalışmadır. Çalışmanın devamında, BldG/CcaR regülatörlerinin tunikamisin gen kümesinde yer alan promotor bölgelerine bağlanma potansiyelleri EMSA deneyleri ile belirlenecektir. Bu çalışmalar ışığında elde edilecek bulgularla regülasyon ağının deşifre edilmesine yönelik önem arzeden bir adım atılabilecektir. Ayrıca, farklı besiyerlerinin kullanılması, tunikamisin biyosentez ve üretiminin incelenmesi için zamana bağlı olarak kültürlerden alınan örneklerle analizlerin yapılması, tunikamisin üretiminin belirlenmesi için HPLC'ye göre daha hassas olan LC-MS analizinin uygulanması yönünde çalışmaların devam ettirilmesi planlanmaktadır.



EKLER



EK 1- *bldG* Genine Ait Sekans

NdeI

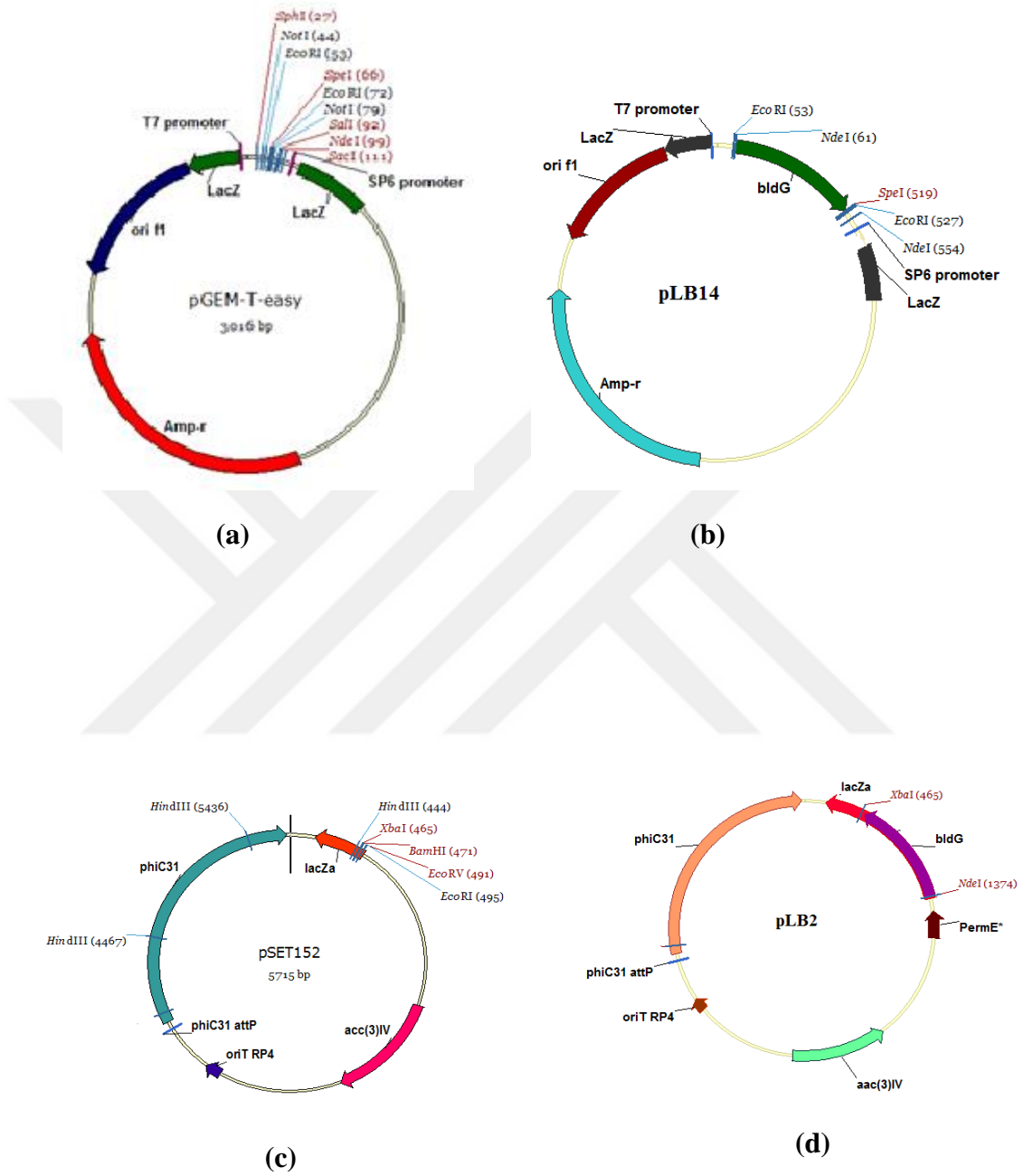
```
catatg|GTGGACCTGTCCCTGTCGACTC|GCAATGTGACCGGCCCCGCCGGCGACCGTACGGTCGTCGA  
GGTCGGTGGCGAGATTGATGTGTATACCGCGCCCAAGCTGCGCGAGCAGTTGGTTCGAGCTGGTGAATG  
ACGGCAGCTACCACCTGGTTGTCGACATGGAGGGCGTGGACTTCCTCGACTCCACCGGGCTCGGTGTG  
CTCGTGGGCGGCCTGAAGCGGGTACGTGCCCATGAGGGCTCGCTGCGTCTGGTCTGCAACCAGGAGCG  
CATTCTGAAGATTTCCGGATCACGGGACTCACCAAGGTGTTCCCGATCCACACCACGGTCGACGAAG  
CGGTCGCTGCCGCCGACT|G|AGTCCGTCCGGACGGGGACGGCCGCCCGCCCGGGCGCCGGGGTGCA  
GGCCGCTCGTCGGCCGGGCCCGGTCCGGTCCG|GTGGCGGGCACGGCTCT|actagt|
```

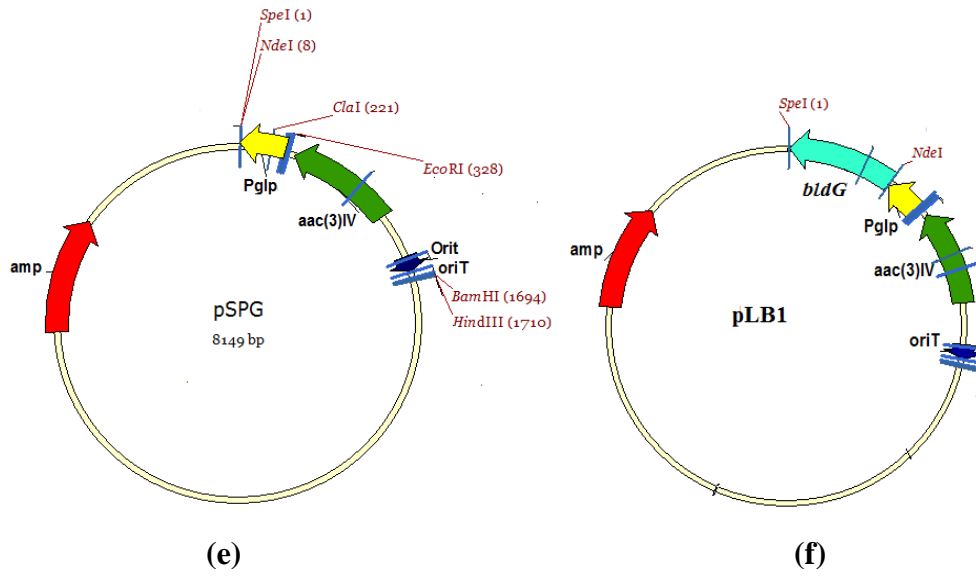
SpeI

Kırmızı bazlar başlangıç ve sonlanma kodonlarını ifade etmektedir. Sarı ile işaretli baz dizileri ise ileri ve geri primerleri göstermektedir. Dizinin 5' ve 3' uçlarındaki hekzanükleotitleri ise sırasıyla *NdeI* ve *SpeI* restriksiyon enzim kesim bölgeleridir.

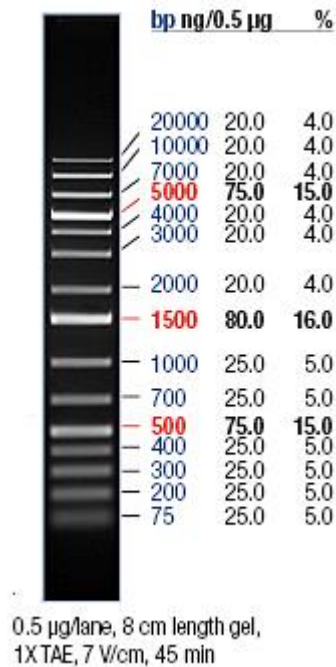
EK 2 - Kullanılan plazmitler ve DNA Markör

Plazmit vektörleri





Vektör plazmitlerin yapısı (a) pGEM-T® Easy: *E. coli* klonlama vektör, (b) pLB14: *bldG* içeren pGEM-T® Easy vektör, (c) pSET152Erme*: *E. coli*/*Streptomyces* entegrasyon vektör, (d) pLB2: *bldG* içeren pSET152. (e) pSPG: *Streptomyces* ekspresyon vektör, (e) pLB1: *bldG* içeren pSPG



O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder

EK 3 -Kullanılan primer dizileri

Primer isimleri	Primer dizileri (5'-3')	Uzunluk (bç)
bldGF1 bldGR1	CATATGGTGGACCTGTCCCTGTGCGACTC ACTAGTAAGAGCCGTGCCCGCCAC	452bç
pSETDPF bldGR1	TAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCAC ACTAGTAAGAGCCGTGCCCGCCAC	1217 bç
pSPGDPF bldGR1	TGCCTTTGCTCGGTTGATCC ACTAGTAAGAGCCGTGCCCGCCAC	999 bç
QhrdBF QhrdBR	CGCGGCATGCTCTTCCT AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	109 bç
4274F 4274R	TGTGCTGGTATCCTTGGCTGCTA GGGCGGCTGATGTCCCTGCTTCC	144bç
4275F 4275R	GTGAGGAGGAAGGGAACGGC ATTGAAGGCGACACAGGTCG	81 bç
4276F 4276R	TCGGACTCGCCAGGACA ATTGCCCCAGGAGGTGATGAA	101bç
4277F 4277R	CTTTCGGCGATCTGGATGTGGAC GCTGACGCCGGCGATGTATTC	146bç
4278F 4278R	GCGCAGCACCAGGAGCCTTTGAGTA GCGGGCAGCGAGAGCAGTGAGAA	102bç
4279F 4279R	CCGCATCGAGGAGGGGAGTT GTACCGGGAGTGGGCGAAGACAT	148bç
4280F 4280R	CCGCATCGAGGAGGGGAGTT GTACCGGGAGTGGGCGAAGACAT	145bç
4281F 4281R	GGCGGAGTCTGGCACGATTTTCAT CTCCCGCCACCGTTTCAGCAGTTCT	147bç
4282F 4282R	CCTGCGCCGGGTCTTTC CCCGGTAGTACGTGGTGATGTC	104bç
4283F 4283R	CGGGAGAAGTGGGTGCGAAGGAGA CCGGGTGGTGGGTGAGGACGAGT	150bç
4284F 4284R	GGCCTTGTGCGCACGGTCACTC TCGGCGAAAGGCGGCACACTCAC	114bç
4285F 4285R	ATCTCCTCGGTCATCGTCGTG GAGCCGTGCGGTGTGCGTA	90 bç
4286F 4286R	CCGTCCGCAAGGGGTTCTGG TGGTTGGCCGCGTTGGTGATG	88 bç
4287F 4287R	CCGGAGGGGACAGGTAAAT TTGTGCGAGGCTAGATGGTAAA	98 bç

EK 4 - Besiyerlerin Hazırlanması ve İçerikleri

Sıvı Besiyerleri

Lurient-Bertani (LB) **g/l**

Tripton	10
Yeast Ekstrakt	5
NaCl	5

pH: 7.0 olarak ayarlanır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

Triptikaz Soya Broth (TSB) **g/l**

Triptikz Soya Broth	30
---------------------	----

121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

TSBYG

Triptik Soya Broth	30
Sükroz	103
Yeast ekstrakt	10
Gliserol	% 0.5

pH:7.0 olarak ayarlanır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

Katı Besiyeri

LB Agar **g/l**

Tripton	10
Yeast Ekstrakt	5
NaCl	5

pH:7.0 olarak ayarlanır

Agar	15
------	----

121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

TSA **g/l**

Triptik Soya Broth	30
Agar	20

121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

TYD **g/l**

Tripton	2
Yeast ekstrakt	2
Glukoz	6

MgCl₂.6H₂O 0.3

pH:7.2'ye ayarlanır

Agar 15

121 °C'de 15 dk otoklavlanır.

Mannitol Soya flour (MS) Agar (Hobbs vd, 1989) **g/l**

Soya unu 20

Agar 20

Mannitol 20

121 °C'de 15 dk (İki kere otoklavlanır)

Otoklav sonrasında CaCl₂ veya MgCl₂ eklenir.

CaCl₂.2H₂O 10 mM

MgCl₂.6H₂O 10 mM

EK 5 - Tamponlar ve Solüsyonlar

Plazmit ve kromozomal DNA İzolasyonu

SET Tamponu

NaCl	75 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM
Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM

TE Tamponu

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1mM

STE Tamponu

Sükroz	0.3 M
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM

Lizis Solüsyonu

NaOH	0.3 M
SDS	2%

Fenol-kloroform çözeltisi (su ile doyurulmuş) (Hintermann, 1981)

Fenol	500 g
Kloroform	500 ml
Distile su	400 ml

Çözelti oda sıcaklığında saklanır ve ışıktan korunur.

Agaroz Jel Elektroforezi

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

Tris Bazı	242 g
Glasiyal Asetik asit	57.1 ml

EDTA (0.4 M, pH 8.0) 125 ml

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır.

Alıcı *E.coli* hücreleri için kullanılan tamponlar

Tampon 1

Potassium asetate 30 mM

RuCl₂ 100 mM

CaCl₂ 10 mM

Gliserol (87 %) 8.6 ml

Son hacim dH₂O ile 50 ml tamamlanır ve filtre sterilizasyonu yapılır

Tampon 2

MOPS 10 mM

RuCl₂ 10 mM

CaCl₂ 75 mM

Gliserol (87 %) 8.6 ml

0.2 M KOH ile pH 6.5 e ayarlanır. Hacim dH₂O ile 50ml tamamlanır

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosit)

X-Gal 20 mg

Dimethylformamit 1 ml

-20 °C de saklanır ve ışıktan korunur.

Ethidium Bromür Solüsyon

Etidyum Bromür (10 mg/ml) 100 μ l/l

TAE Buffer (1X) 1 l

DNA kuantifikasyonu için üremenin belirlenmesi

Difenilamin Ayracı

Difenilamin	1.5 g
Glasiyal asetik asit	100 ml

Etrafı aliminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunur

Yalnızca kullanılacağı zaman eklenmesi gerekenler,

Konsantre H ₂ SO ₄	1.5 ml/100 ml
Asetaldehit (1.6 %)	0.1 ml/20 ml

Sulu Asetaldehit (1.6 %)

Asetaldehit	1 ml
dH ₂ O	49 ml

1 N HClO₄

HClO ₄ (80 %)	10.87 ml/100 ml
HClO ₄ (60 %)	16.74 ml/100 ml

Antibiyotik Stokların Hazırlanışı

	<u>Stok Konsantrasyon</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
Ampisilin	100 mg/ml dH ₂ O	100 µg/ml
Kanamisin	50 mg/ml dH ₂ O	25 veya 50 µg/ml
Kloramfenikol	25 mg/ml ethanol	25 µg/ml
Apramisin	50 mg/ml dH ₂ O	50 µg/ml

EK 6 - Kimyasallar ve Enzimler

Kimyasallar

Asetaldehit	Sigma
Agar	Merck
Agaroz	Thermo Fisher Scientific
Amonyum persülfat	Sigma
Ampisilin	Sigma
Apramisin	Sigma
β -merkaptoetanol	Sigma
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma
Kloroform	AppliChem
Kloramfenikol	Sigma
Difenilamin	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Etanol	Merck
Etidyum bromür	Sigma
Glasiyal Asetik Asit	Merck
Gliserol	Sigma
Herring sperm DNA	Sigma
HCl	Sigma
HClO_4	Merck
H_2SO_4	Merck
IPTG	Sigma
İzoamilalkol	Sigma

İzopropanol	Merck
Potasyum -asetat	Merck
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
Luria Broth	Sigma
Mannitol	Merck
Metanol (HPLC grade)	Sigma
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
MOPS	Sigma
Sodyum-asetat	Merck
NaCl	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Merck
Nalidiksik asit	Sigma
NaOH	Merck
Fenol	Amresco
Fenol-kloroform	Amresco
RuCl ₂	Merck
SDS	Merck
Soya unu	Sigma
Sükroz	Merck
Tris-HCl	Merck
Tryptik Soy Broth	Oxoid
Tripton	Merck
X-Gal	Fermentas
Enzimler	

Lizozim	Sigma
Proteinaz K	Sigma
T4 DNA Ligaz	Thermo Fisher Scientific
FastAP	Thermo Fisher Scientific
<i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>XbaI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>SacI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>NdeI</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>SpeI</i>	Thermo Fisher Scientific
Taq DNA polimeraz	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA ligaz	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA ligaz (pGEM-T® Easy için)	Promega
Markörler	
O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific
Kitler	
GeneJet mini Plazmit İzolasyon Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJet Jel Ekstraksiyon Kiti	Thermo Fisher Scientific
GeneJET RNA Purifikasyon kit	Thermo Fisher Scientific
RNA protect solution	Qiagen
RNAase Free DNAase set	Qiagen
DNA-free™ kit	Ambion
SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix	Bio Rad



KAYNAKLAR

- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Prieto-Domínguez A, Martínez-Burgo Y & Liras P (2014). Transcriptomic Analysis of *Streptomyces clavuligerus* Δ ccar::Tsr: Effects of the Cephamicin C-Clavulanic Acid Cluster Regulator Ccar on Global Regulation. *Microbial Biotechnology*, 7(3): 221-231
- Anonymous (2007). Streptomyces: they're twisted <http://twistedbacteria.blogspot.com/2007/08/streptomyces-twisted.html> (Erişim tarihi: 27.04.2015)
- Anonymous (2005). National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY821553.1> (Erişim tarihi:27.04.2015)
- Anonymous (2006). Primer3Plus. www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi (Erişim tarihi: 27.04.2015)
- Baltz R H (2008). Renaissance in Antibacterial Discovery from Actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(5): 557-563
- Banerjee A, Lang J-Y, Hung M-C, Sengupta K, Banerjee S K, Baksi K & Banerjee D K (2011). Unfolded Protein Response Is Required in Nu/Nu Mice Microvasculature for Treating Breast Tumor with Tunicamycin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33): 29127-29138
- Baños S, Pérez-Redondo R, Koekman B & Liras P (2009). Glycerol Utilization Gene Cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9): 2991-2995
- Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A-M, Challis G L, Thomson N, James K D, Harris D E, Quail M A, Kieser H & Harper D (2002). Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885): 141-147
- Bignell D R, Tahlan K, Colvin K R, Jensen S E & Leskiw B K (2005). Expression of Ccar, Encoding the Positive Activator of Cephamicin C and Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*, Is Dependent on Bldg. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4): 1529-1541
- Brandish P E, Kimura K-i, Inukai M, Southgate R, Lonsdale J T & Bugg T (1996). Modes of Action of Tunicamycin, Liposidomycin B, and Mureidomycin A: Inhibition of Phospho-N-Acetylmuramyl-Pentapeptide Translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(7): 1640-1644
- Burton K (1968). Determination of DNA Concentration with Diphenylamine. *Methods in Enzymology*, 12: 163-166
- Bustin S A (2000). Absolute Quantification of Mrna Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2): 169-193
- Carman G M & Han G-S (2009). Phosphatidic Acid Phosphatase, a Key Enzyme in the Regulation of Lipid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5): 2593-2597

- Challis G L & Hopwood D A (2003). Synergy and Contingency as Driving Forces for the Evolution of Multiple Secondary Metabolite Production by *Streptomyces* Species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 14555-14561
- Chang P-C & Cohen S N (1994). Bidirectional Replication from an Internal Origin in a Linear *Streptomyces* Plasmid. *Science*: 952-952
- Chater K F (2006). *Streptomyces* inside-Out: A New Perspective on the Bacteria That Provide Us with Antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1469): 761-768
- Chater K F, Biró S, Lee K J, Palmer T & Schrempf H (2010). The Complex Extracellular Biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2): 171-198
- Chen W, Qu D, Zhai L, Tao M, Wang Y, Lin S, Price N P & Deng Z (2010). Characterization of the Tunicamycin Gene Cluster Unveiling Unique Steps Involved in Its Biosynthesis. *Protein & Cell*, 1(12): 1093-1105
- De la Fuente A, Lorenzana L M, Martín J F & Liras P (2002). Mutants of *Streptomyces Clavuligerus* with Disruptions in Different Genes for Clavulanic Acid Biosynthesis Produce Large Amounts of Holomycin: Possible Cross-Regulation of Two Unrelated Secondary Metabolic Pathways. *Journal of Bacteriology*, 184(23): 6559-6565
- Derveaux S, Vandesompele J & Hellemans J (2010). How to Do Successful Gene Expression Analysis Using Real-Time Pcr. *Methods*, 50(4): 227-230
- Eckardt K, (1983). Tunicamycins, Streptovirudins, and Corynetoxins, a Special Subclass of Nucleoside Antibiotics. *Journal of Natural Products*, 46(4): 544-550. doi:10.1021/np50028a020
- Elbein A D (1987). Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1): 497-534
- Ferguson N L, Peña-Castillo L, Moore M A, Bignell D R & Tahlan K (2016). Proteomics Analysis of Global Regulatory Cascades Involved in Clavulanic Acid Production and Morphological Development in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(4): 537-555
- Flärdh K (2003). Growth Polarity and Cell Division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6): 564-571
- Flärdh K & Buttner M J (2009). *Streptomyces* Morphogenetics: Dissecting Differentiation in a Filamentous Bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1): 36-49
- Flett F, Mersinias V & Smith C P (1997). High Efficiency Intergeneric Conjugal Transfer of Plasmid DNA from *Escherichia Coli* to Methyl DNA-Restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 155(2): 223-229
- Garg R P & Parry R J (2010). Regulation of Valanimycin Biosynthesis in *Streptomyces Viridifaciens*: Characterization of Vlmi as a *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein (Sarp). *Microbiology*, 156(2): 472-483
- Garrity G M, Bell J A & Lilburn T G (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, USA.
- Goriely A & Tabor M (2003). Biomechanical Models of Hyphal Growth in Actinomycetes. *Journal of Theoretical Biology*, 222(2): 211-218
- Hanahan D (1983). Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4): 557-580

- He X, Li R, Pan Y, Liu G & Tan H (2010). Sang, a Transcriptional Activator, Controls Nikkomycin Biosynthesis through Binding to the Sann–Sano Intergenic Region in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbiology*, 156(3): 828-837
- Higgins C & Kastner R (1971). *Streptomyces clavuligerus* Sp. Nov., a B-Lactam Antibiotic Producer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21(4): 326-331
- Hiss D C, Gabriels G A & Folb P I (2007). Combination of Tunicamycin with Anticancer Drugs Synergistically Enhances Their Toxicity in Multidrug-Resistant Human Ovarian Cystadenocarcinoma Cells. *Cancer Cell International*, 7(1): 1
- Hobbs G, Frazer C M, Gardner D C, Cullum J A & Oliver S G (1989). Dispersed Growth of *Streptomyces* in Liquid Culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3): 272-277
- Hoch J A L, Sonenshein R & Abraham L (1993). *Bacillus Subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*,
- Hopwood D A (2006). Soil to Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual Review of Genetics*, 40: 1-23
- Hopwood D A (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, , John Innes Center, and Emeritus Professor of Genetics, University of East Anglia, Norwich, UK.
- Horinouchi S (2007). Mining and Polishing of the Treasure Trove in the Bacterial Genus *Streptomyces*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(2): 283-299
- Huang C H, Lin Y S, Yang Y L, Huang S w & Chen C W (1998). The Telomeres of *Streptomyces* Chromosomes Contain Conserved Palindromic Sequences with Potential to Form Complex Secondary Structures. *Molecular Microbiology*, 28(5): 905-916
- Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb M J, Karoonuthaisiri N, Lih C J, Kao C M & Buttner M J (2005). Cross-Regulation among Disparate Antibiotic Biosynthetic Pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58(5): 1276-1287
- Hwang K-S, Kim H U, Charusanti P, Palsson B Ø & Lee S Y (2014). Systems Biology and Biotechnology of *Streptomyces* Species for the Production of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 32(2): 255-268
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M & Ōmura S (2003). Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 21(5): 526-531
- Karki S, Kwon S-Y & Kwon H-J (2011). Cloning of Tunicamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces chartreusis* Nrrl 3882. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(1): 136-140
- Kieser T (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation,
- Kieser T & Melton R E (1988). Plasmid Pij699, a Multi-Copy Positive-Selection Vector for *Streptomyces*. *Gene*, 65(1): 83-91
- Kieser T B, Buttner M J & Chater M J (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Centre Foundation, 249-250, Norwich, England.

- Kimura K-i & Bugg T D (2003). Recent Advances in Antimicrobial Nucleoside Antibiotics Targeting Cell Wall Biosynthesis. *Natural Product Reports*, 20(2): 252-273
- Kurt A (2011). The Regulatory Effect of Ccar Activator on the Cephamicin C Gene Cluster of *Streptomyces clavuligerus*. Doctoral Dissertation, Middle East Technical University The graduate school of natural and applied sciences, department of biological sciences, 162, Ankara.
- Kurt A, Álvarez-Álvarez R, Liras P & Özcengiz G (2013). Role of the Cmch–Ccar Intergenic Region and Ccar Overexpression in Cephamicin C Biosynthesis in *Streptomyces Clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13): 5869-5880
- Li B & Walsh C T (2010). Identification of the Gene Cluster for the Dithiolopyrrolone Antibiotic Holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46): 19731-19735
- Liang X, Lu Y, Neubert T A & Resh M D (2002). Mass Spectrometric Analysis of Gap-43/Neuromodulin Reveals the Presence of a Variety of Fatty Acylated Species. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36): 33032-33040
- Liras P, Gomez-Escribano J P & Santamarta I (2008). Regulatory Mechanisms Controlling Antibiotic Production in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(7): 667-676
- Liu G, Chater K F, Chandra G, Niu G & Tan H (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1): 112-143
- Logan J, Edwards K J & Saunders N A (2009). *Real-Time Pcr: Current Technology and Applications*. Horizon Scientific Press,
- López-García M T, Santamarta I & Liras P (2010). Morphological Differentiation and Clavulanic Acid Formation Are Affected in a *Streptomyces clavuligerus* Adpa-Deleted Mutant. *Microbiology*, 156(8): 2354-2365
- Makitrynskyy R, Ostash B, Tsypik O, Rebets Y, Doud E, Meredith T, Luzhetskyy A, Bechthold A, Walker S & Fedorenko V (2013). Pleiotropic Regulatory Genes Blda, Adpa and Absb Are Implicated in Production of Phosphoglycolipid Antibiotic Moenomycin. *Open Biology*, 3(10): 130121
- Martín J-F & Liras P (2010). Engineering of Regulatory Cascades and Networks Controlling Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3): 263-273
- Martínez-Burgo Y, Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A & Liras P (2015). The Pathway-Specific Regulator Clar of *Streptomyces Clavuligerus* Has a Global Effect on the Expression of Genes for Secondary Metabolism and Differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19): 6637-6648
- Matsushima P, Cox K L & Baltz R H (1987). Highly Transformable Mutants of *Streptomyces Fradiae* Defective in Several Restriction Systems. *Molecular and General Genetics MGG*, 206(3): 393-400
- Medema M H, Breitling R & Takano E (2011). *Methods in Enzymology*, 485-502.
- Medema M H, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam M T, Ronning C M & Nierman W C (2010). The Sequence of a 1.8-Mb Bacterial Linear Plasmid Reveals a Rich Evolutionary Reservoir of Secondary Metabolic Pathways. *Genome Biology and Evolution*, 2: 212-224

- Molina-Henares A J, Krell T, Guazzaroni M E, Segura A & Ramos J L (2006). Members of the Iclr Family of Bacterial Transcriptional Regulators Function as Activators and/or Repressors. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2): 157-186
- Nah J-H, Park S-H, Yoon H-M, Choi S-S, Lee C-H & Kim E-S (2012). Identification and Characterization of Wbla-Dependent Tmct Regulation During Tautomycetin Biosynthesis in *Streptomyces* Sp. Ck4412. *Biotechnology Advances*, 30(1): 202-209
- Niu G, Chater K F, Tian Y, Zhang J & Tan H (2016). Specialised Metabolites Regulating Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces* Spp. *FEMS Microbiology Reviews*:012
- Oskay M (2009). *Streptomyces* Kökeni Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü Ve Yarini. *Ecological Life Sciences*, 4(2): 48-60
- Patterson S I & Skene J (1994). Novel Inhibitory Action of Tunicamycin Homologues Suggests a Role for Dynamic Protein Fatty Acylation in Growth Cone-Mediated Neurite Extension. *The Journal of Cell Biology*, 124(4): 521-536
- Pérez-Llarena F J, Liras P, Rodriguez-Garcia A & Martin J F (1997). A Regulatory Gene (Ccar) Required for Cephamycin and Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: Amplification Results in Overproduction of Both Beta-Lactam Compounds. *Journal of Bacteriology*, 179(6): 2053-2059
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín J F & Liras P (1998). The Clar Gene of *Streptomyces Clavuligerus*, Encoding a Lysr-Type Regulatory Protein Controlling Clavulanic Acid Biosynthesis, Is Linked to the Clavulanate-9-Aldehyde Reductase (Car) Gene. *Gene*, 211(2): 311-321
- Pfaffl M W (2004). *Az of Quantitative Pcr*, 89-113, International University Line (IUL)La Jolla, CA, USA
- Pospiech A & Neumann B (1995). A Versatile Quick-Prep of Genomic DNA from Gram-Positive Bacteria. *Trends Genetics*, 11(6): 217-218
- Price N P & Tsvetanova B (2007). Biosynthesis of the Tunicamycins: A Review. *Journal of Antibiotics*, 60(8): 485-491
- Robles-Reglero V, Santamarta I, Álvarez-Álvarez R, Martín J & Liras P (2013). Transcriptional Analysis and Proteomics of the Holomycin Gene Cluster in Overproducer Mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Biotechnology*, 163(1): 69-76
- Sambrook J & Russell M (2012). *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York,USA.
- Santamarta I, Lopez-Garcia M T, Kurt A, Nardiz N, Alvarez-Alvarez R, Perez-Redondo R, Martin J F & Liras P (2011). Characterization of DNA-Binding Sequences for Ccar in the Cephamycin-Clavulanic Acid Supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular Microbiology*, 81(4): 968-981. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07743
- Santamarta I, Pérez-Redondo R, Lorenzana L M, Martín J F & Liras P (2005). Different Proteins Bind to the Butyrolactone Receptor Protein Are Sequence Located Upstream of the Regulatory Ccar Gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular Microbiology*, 56(3): 824-835
- Shaabani N, Honke N, Lang P A, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D & Lang K S (2012). Tunicamycin Inhibits Diabetes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29(3-4): 595-602

- Song J Y, Jeong H, Yu D S, Fischbach M A, Park H-S, Kim J J, Seo J-S, Jensen S E, Oh T K & Lee K J (2010). Draft Genome Sequence of *Streptomyces Clavuligerus* Nrrl 3585, a Producer of Diverse Secondary Metabolites. *Journal of Bacteriology*, 192(23): 6317-6318
- Tahlan K, Ahn S K, Sing A, Bodnaruk T D, Willems A R, Davidson A R & Nodwell J R (2007). Initiation of Actinorhodin Export in *Streptomyces Coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 63(4): 951-961
- Tahlan K, Park H U & Jensen S E (2004). Three Unlinked Gene Clusters Are Involved in Clavam Metabolite Biosynthesis in *Streptomyces Clavuligerus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(10): 803-810
- Takatsuki A, Arima K & Tamura G (1971). Tunicamycin, a New Antibiotic. I. Isolation and Characterization of Tunicamycin. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 24(4): 215-223
- Thai W, Paradkar A S & Jensen S E (2001). Construction and Analysis of Ss-Lactamase-Inhibitory Protein (Blip) Non-Producer Mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, 147(Pt 2): 325-335. doi:10.1099/00221287-147-2-325
- Tkacz J S & Lampen J O (1975). Tunicamycin Inhibition of Polyisoprenyl N-Acetylglucosaminyl Pyrophosphate Formation in Calf-Liver Microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 65(1): 248-257
- Tsvetanova B C, Kiemle D J & Price N P (2002). Biosynthesis of Tunicamycin and Metabolic Origin of the 11-Carbon Dialdose Sugar, Tunicamine. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38): 35289-35296
- Tsvetanova B C & Price N P (2001). Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry of Tunicamycin-Type Antibiotics. *Analytical Biochemistry*, 289(2): 147-156. doi:10.1006/abio.2000.4952
- Ünsaldı E, Kurt-Kızıldoğan A, Voigt B, Becher D & Özcengiz G (2016). Proteome-Wide Alterations in an Industrial Clavulanic Acid Producing Strain of *Streptomyces Clavuligerus*. *Synthetic and Systems Biotechnology*
- Volff J N & Altenbuchner J (1998). Genetic Instability of the *Streptomyces* Chromosome. *Molecular Microbiology*, 27(2): 239-246
- Wilkinson C J, Hughes-Thomas Z A, Martin C J, Bohm I, Mironenko T, Deacon M, Wheatcroft M, Wirtz G, Staunton J & Leadlay P F (2002). Increasing the Efficiency of Heterologous Promoters in Actinomycetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(4): 417-426
- Winn M, Goss R J, Kimura K-i & Bugg T D (2010). Antimicrobial Nucleoside Antibiotics Targeting Cell Wall Assembly: Recent Advances in Structure–Function Studies and Nucleoside Biosynthesis. *Natural Product Reports*, 27(2): 279-304
- Wyszynski F J (2010). Dissecting Tunicamycin Biosynthesis: A Potent Carbohydrate Processing Enzyme Inhibitor. Doctoral Dissertation, University of Oxford Jesus College, 301, Oxford.
- Wyszynski F J, Hesketh A R, Bibb M J & Davis B G (2010). Dissecting Tunicamycin Biosynthesis by Genome Mining: Cloning and Heterologous Expression of a Minimal Gene Cluster. *Chemical Science*, 1(5): 581-589
- Wyszynski F J, Lee S S, Yabe T, Wang H, Gomez-Escribano J P, Bibb M J, Lee S J, Davies G J & Davis B G (2012). Biosynthesis of the Tunicamycin Antibiotics

Proceeds Via Unique Exo-Glycal Intermediates. *Nature Chemistry*, 4(7): 539-546

Xu L, Appell M, Kennedy S, Momany F A & Price N P (2004). Conformational Analysis of Chirally Deuterated Tunicamycin as an Active Site Probe of Udp-N-Acetylhexosamine: Polyprenol-P N-Acetylhexosamine-1-P Translocases. *Biochemistry*, 43(42): 13248-13255

Yin H, Xiang S, Zheng J, Fan K, Yu T, Yang X, Peng Y, Wang H, Feng D & Luo Y (2012). Induction of Holomycin Production and Complex Metabolic Changes by the Argr Mutation in *Streptomyces Clavuligerus* Np1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9): 3431-3441





ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Lokman BAŞ
Doğum Yeri : Bismil
Doğum Tarihi : 27.08.1988
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Adana Beş Ocak Lisesi (2009)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2013)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD (Şubat 2014 – Aralık 2016)

Konferans Bildirisi:

Lokman BAŞ, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN, *Streptomyces clavuligerus*'ta *bldG* Regülatör Geninin Tunikamisin Biyosentezi Üzerine Etkisi, 12/2015 Konya [Ulusal].

Konferans Sunumu:

Kurt Kızıldoğan, A., Baş, L. (2016). *Streptomyces clavuligerus*'ta Tunikamisin Üretiminin Arttırılması. I. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi (1-3 Haziran 2016 Samsun). Bildiri Özetleri Kitabı sayfa 1.

Projeler:

Temmuz 2014 – Temmuz 2015: TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı Desteği.

Ağustos 2015 - Aralık 2016: Tübitak 114Z948 numaralı '*Streptomyces clavuligerus*'ta demir regülasyonu ve antibiyotik biyosentezi arasındaki ilişkinin belirlenmesi' başlıklı projede bursiyer.