



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

***STREPTOMYCES CLAVULİGERUS*'TA ADPA PLEİOTROPİK
REGÜLATÖRÜNÜN ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Çiğdem OTUR

Danışman
Doç. Dr. Ashhan KÜRT KIZILDOĞAN

SAMSUN
2024

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI



***STREPTOMYCES CLAVULİGERUS*'TA ADPA PLEİOTROPİK
REGÜLATÖRÜNÜN ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Çiğdem OTUR

Danışman

Doç.Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından 117Z808 ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.21.008 kodlu projeler ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Çiğdem OTUR tarafından, Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN danışmanlığında hazırlanan “*STREPTOMYCES CLAVULİGERUS*'TA ADPA PLEİOTROPİK REGÜLATÖRÜNÜN ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 08.07.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Şevki ARSLAN Pamukkale Üniversitesi Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Emek ASLAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet

Hayır

09 /06/ 2024
Çiğdem OTUR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : *STREPTOMYCES CLAVULİGERUS*'TA ADPA PLEİOTROPİK REGÜLATÖRÜNÜN ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 09/06/2024 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

09 /06/ 2024
Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

ÖZET

STREPTOMYCES CLAVULIGERUS'TA ADPA PLEİOTROPİK REGÜLATÖRÜNÜN ANTİBİYOTİK BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tez Yazarının Adı SOYADI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Doktora, Temmuz/2024
Danışman: Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Streptomyces clavuligerus (*S. clavuligerus*) tunikamisin, sefamisin C (CephC) ve klavulanik asit (CA) gibi çok sayıda önemli sekonder metabolitin üreticisidir. Çalışmamız kapsamında literatürde ilk defa, *S. clavuligerus*'ta AdpA pleiotropik regülatörünün, antibiyotik biyosentezi ve üretimi üzerindeki etkisi RNA-seq analiziyle araştırılmıştır. *Scel* meganükleaz yöntemiyle *adpA* geni silinen mutant suş (*S. clavuligerus* Δ adpA), yabancı suş (*S. clavuligerus* NRRL 3585), çok kopyalı *adpA* genine sahip rekombinant suş (*S. clavuligerus* pSPGadpA) ve bu suşun vektör kontrolü (*S. clavuligerus* pSPG) ne ait TYD kültürleriyle (T₄₈) yapılan RNA-seq analizinde gen ifadelerindeki farklılıkların global düzenleme mekanizmaları, metabolizma yolları, sekonder metabolit ve antibiyotik biyosentez yolları, membran taşıma ve sinyal iletim kategorilerinde yoğunlaştığı belirlenmiştir. Tunikamisin biyosentetik gen kümesinde *tunABCDEH* ve *tunF*, *tunG* ve *tunL* genlerinin ifadeleri mutantta yabancı suşa kıyasla daha yüksekken *S. clavuligerus* pSPGadpA'da genel olarak gen ifadeleri kontrollere kıyasla azalmıştır. Bu veriler qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Biyoassay ve LC-MS/MS analizleriyle *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla daha yüksek tunikamisin üretimi gerçekleştiği *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise tunikamisin titresinin azaldığı belirlenmiştir. CA biyosentetik gen kümesinde, *S. clavuligerus* Δ adpA'da kontrole kıyasla *argR*, *oat2*, *oppA1*, *orf14*, *orf16*, *gcaS*, *pbp2*, *orf20* ve *orf21*'nin ifadeleri azalırken *ceaS2*, *pah2* ve *pbpA*'nın ifadeleri artmıştır. Ayrıca, *S. clavuligerus* Δ adpA'da CA üretimi kontrole kıyasla daha azdır. CephC gen kümesinde ise mutantta yabancı suşa kıyasla *pbpA*, *cmcT*, *pcd*, *cefE*, *cefD*, *cefF*, *cmcI*, *cmcJ*, *ccaR* ve *cmcH* genlerinin ifadeleri artarken *orf10*, *lat*, *pcbAB*, *pcbC* ve *pbpR*'nin ifadeleri azalmıştır. Spesifik CephC üretimi *S. clavuligerus* Δ adpA'da özellikle T₉₆ olmak üzere tüm saatlerde en yüksek CephC titresindedir. rAdpA'nın *tunA* geninin yukarı akış dizisine bağlandığı EMSA ile tespit edilmiştir. Ayrıca, RT-PCR çalışmalarıyla *S. clavuligerus*'da tunikamisin gen kümesinin çoğunlukla polisistronik transkriptler halinde transkribe oldukları gösterilmiştir.

Çalışmamız *S. clavuligerus*'ta AdpA'nın antibiyotik biyosentezi ve global regülasyondaki rolünü detaylı bir şekilde sunmaktadır. Ayrıca, tunikamisin gen kümesinin transkripsiyonel organizasyonu ve de AdpA'nın bu gen kümesine doğrudan bağlanarak tunikamisin biyosentezi üzerindeki negatif regülasyon rolü ilk kez ortaya koyulmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Streptomyces clavuligerus*, AdpA, Tunikamisin, RNA-seq, LC-MS/MS, Biyoassay, EMSA, RT-PCR

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF ADPA PLEIOTROPIC REGULATOR ON ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*

Çiğdem OTUR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Master, July/2024

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ashıhan KURT KIZILDOGAN

Streptomyces clavuligerus (*S. clavuligerus*) is producer of numerous important secondary metabolites including tunicamycin, cephamycin C (CephC), and clavulanic acid (CA). In this study, using RNA-seq analysis, the effect of AdpA pleiotropic regulator on antibiotic biosynthesis and production in *S. clavuligerus* was investigated for the first time. RNA-seq analysis of TYD cultures (T₄₈) of *adpA* gene-deleted mutant (*S. clavuligerus* Δ *adpA*), wild-type (*S. clavuligerus* NRRL 3585), recombinant strain containing multiple copies of *adpA* gene (*S. clavuligerus* pSPGadpA), and vector control (*S. clavuligerus* pSPG) revealed that differences in gene expressions clustered on global regulatory mechanisms, metabolic pathways, secondary metabolite and antibiotic biosynthesis pathways, membrane transport, and signal transduction categories. In tunicamycin biosynthetic gene cluster, expressions of *tunABCDEH*, and *tunF*, *tunG*, and *tunL* genes were higher in the mutant compared to the wild-type, whereas overall gene expressions in *S. clavuligerus* pSPGadpA were lower compared to controls. These data were also confirmed by qRT-PCR. Additionally, higher tunicamycin production in *S. clavuligerus* Δ *adpA* compared to the wild-type, while tunicamycin titer decreased in *S. clavuligerus* pSPGadpA as shown by bioassay and LC-MS/MS analyses. In CA biosynthetic gene cluster, *argR*, *oat2*, *oppA1*, *orf14*, *orf16*, *gcaS*, *pbp2*, *orf20*, and *orf21* expressions were reduced, but expressions of *ceaS2*, *pah2*, and *pbpA* were increased in the mutant compared to the control. Correspondingly, CA production in *S. clavuligerus* Δ *adpA* was lower than in the control. In CephC gene cluster, *pbpA*, *cmcT*, *pcd*, *cefE*, *cefD*, *cefF*, *cmcI*, *cmcJ*, *ccaR*, and *cmcH* expressions increased, while expressions of *orf10*, *lat*, *pcbAB*, *pcbC*, and *pbpR* decreased in the mutant compared to wild-type. Specific CephC production was highest in *S. clavuligerus* Δ *adpA* particularly at T₉₆. EMSA revealed that rAdpA binds to the upstream sequence of *tunA* gene. Additionally, RT-PCR studies showed that tunicamycin gene cluster in *S. clavuligerus* are mostly transcribed as polycistronic transcripts.

Our study presents the role of AdpA in antibiotic biosynthesis and global regulation in *S. clavuligerus* in detail. Additionally, the transcriptional organization of the tunicamycin gene cluster and the role of AdpA in directly binding to this gene cluster to negatively regulate tunicamycin biosynthesis have been demonstrated for the first time.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*, AdpA, Tunicamycin, RNA-seq, LC-MS/MS, Bioassay, EMSA, RT-PCR

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı programında doktora tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

“*Streptomyces clavuligerus*'ta AdpA pleiotropik regülatörünün antibiyotik biyosentezi üzerine etkisinin belirlenmesi” konulu araştırmam üzerinde çalışma fırsatını veren; bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, doktora eğitimi sürecimin her aşamasında gösterdiği sabır, anlayış ve destek ile bana büyük bir ilham kaynağı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, bu uzun soluklu araştırma sürecinde birlikte geçirdiğimiz uzun çalışma saatlerinde yapmış olduğu sınırsız yardımlar ve gösterdiği sonsuz nezaket için çalışma arkadaşım ve dostum Zir. Yük. Müh. Büşra ABANOZ SEÇGİN'e teşekkür ederim.

Paylaştığımız fikir alışverişleri, tartışmalar ve çözüm önerileri ile tez çalışmama büyük katkılar sağlayan, desteği ve arkadaşlığı ile bu süreçte her zaman yanımda olan Zir. Yük. Müh. Zafer SEÇGİN, Zir. Yük. Müh. Emine TOPARSLAN AKÇAY ve Zir. Yük. Müh. Ayla FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım. Yine her zaman yanımda olan, ihtiyaç duyduğum her an destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Zir. Yük. Müh. Ömer KONUKSEVER olmak üzere diğer çalışma arkadaşlarıma da desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi desteğini hissettiğim, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunmaktayım.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından 117Z808 ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.21.008 proje numarası ile desteklenmiştir. Doktora eğitiminin YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmesine olanak sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın hazırlanma süresince sağladığı imkânlar için TÜBİTAK, YÖK ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi aracılığıyla devletimize ve milletimize şükranlarımı sunar, ülkemizin bilim ve teknoloji alanında ilerlemesine katkıda bulunmayı bir borç bilirim.

Çiğdem OTUR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. <i>Streptomyces</i> sp.....	4
2.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	8
2.3. Tunikamisinin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları	9
2.4. Tunikamisin Biyosentezi ve Gen Kümesi.....	14
2.5. β -Laktam Antibiyotikleri: CephC ve CA.....	17
2.5.1. β -Laktam Antibiyotiklerinin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları.....	17
2.5.2. CephC Biyosentezi ve Gen Kümesi	18
2.5.3. CA Biyosentezi ve Gen Kümesi	21
2.6. <i>Streptomyces</i> 'te Antibiyotik Üretiminin Moleküler Regülasyonu.....	24
2.7. Mevcut Çalışma	28
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Bakteri Suşları, Plazmidler ve Besiyerleri	30
3.2. Tamponlar ve Solüsyonlar	34
3.3. Kimyasal ve Enzimler	34
3.4. <i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 Suşundan Genomik DNA İzolasyonu.....	34
3.5. <i>E. coli</i> Suşlarından Plazmid DNA İzolasyonu	35
3.6. Kompetan <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu	36
3.7. Konjugasyon Reaksiyonu	37
3.8. Mutant <i>S. clavuligerus</i> Suşlarının Elde Edilmesi.....	37
3.9. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri.....	39
3.10. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	40
3.10.1. Native PAGE	40
3.10.2. SDS-PAGE.....	40
3.10.3. Southern Blot Deneyi İçin % 6'lık PAGE	41
3.11. Poliakrilamid Jellerin Boyanması	41
3.11.1. Native-Poliakrilamid Jellerin Boyanması	41
3.11.2. SDS-PAGE Jellerin Boyanması	41
3.12. Ligasyonlar	41
3.13. Primer Dizaynı.....	44
3.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	45
3.14.1. Standart PCR Reaksiyonları	45
3.14.2. Koloni PCR	47
3.15. Dizileme Reaksiyonu	48
3.16. Southern Blotlama	48
3.16.1. Prob Hazırlığı ve Prob Verimliliğinin Belirlenmesi.....	48
3.16.2. DNA'nın Membrana Transferi	49
3.16.3. Hibridizasyon ve Yıkamalar	50
3.16.4. Sinyal Tespiti.....	50

3.17. Fermantasyon Çalışması	50
3.18. DNA Kuantifikasyonu Yardımıyla Üremenin Belirlenmesi.....	51
3.19. Tunikamisin Ekstraksiyonu ve Üretiminin Biyoassay Deneyleri İle Belirlenmesi... 52	
3.20. CA Üretiminin Biyoassay Deneyleri ile Belirlenmesi	53
3.21. Suşların CephC Üretiminin Biyoassay Deneyleri İle Belirlenmesi	54
3.22. RNA Örneklerinin Hazırlanması	55
3.23. RNA Dizileme (RNA-Seq)	56
3.24. Kantitatif Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	57
3.25. qRT-PCR Verilerinin Rölatif Kuantifikasyonu	59
3.26. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi/Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) Analizi.....	59
3.27. AdpA Proteininin Saflaştırılması	61
3.28. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	62
3.29. Western Blot Analizi ile rAdpA Proteininin Doğrulanması	62
3.30. Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi (EMSA).....	62
3.31. Tunikamisin Gen Kümesindeki Genlerin Ortak Transkripsiyonel Profilinin Revers Transkripsiyon PCR (RT-PCR) İle Belirlenmesi.....	64
3.32. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	66
4.1. <i>S. clavuligerus</i> 'da <i>adpA</i> Geni Silinmiş Mutant Suşların Elde Edilmesi	66
4.1.1. <i>S. clavuligerus</i> Genomik DNA'sının Elde Edilmesi	66
4.1.2. $\Delta adpA$ -füzyon Fragmentini İçeren pIJ12738'in Eldesi	66
4.1.3. Rekombinant pIJ12738 $\Delta adpA$ Vektörünün <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması.....	71
4.1.4. Rekombinant <i>E. coli</i> pIJ12738 $\Delta adpA$ ve <i>S. clavuligerus</i> Arasında Konjugasyon Reaksiyonu	72
4.1.5. <i>E. coli</i> pIJ12742-Km5E ve <i>S. clavuligerus</i> pIJ12738 $\Delta adpA$ -1 Hücreleri Arasında Konjugasyon Reaksiyonu.....	73
4.1.5.1. pIJ12742 Vektörüne Kanamisin Direnç Geninin Aktarılması	73
4.1.5.2. Konjugasyon ve Kromozomdaki <i>I_SceI</i> Bölgesinde Çift Zincir Kırığının Oluşması	77
4.1.5.3. Ekskonjugantlarda Bulunan pIJ12742 Plazmidinin Hücreden Atılması.....	80
4.2. <i>S. clavuligerus</i> compAdpA Suşunun Elde Edilmesi	81
4.2.1. <i>adpA</i> Geninin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması	82
4.2.2. <i>adpA</i> Geninin pSET152ermE*'ye Klonlanması ve Konjugasyon Reaksiyonu... 84	
4.3. <i>S. clavuligerus</i> $\Delta adpA$ ve <i>S. clavuligerus</i> comp $\Delta adpA$ Suşlarının Southern Blot Deneyi İle Doğrulanması	89
4.4. <i>adpA</i> Geninin pSPG Çoklu İfade Vektörüne Klonlanması ve <i>S. clavuligerus</i> 'a Konjugasyonu	91
4.5. <i>S. clavuligerus</i> pSPG Suşunun Oluşturulması	95
4.6. Suşların Karşılaştırmalı RNA-seq Analizi	96
4.6.1. İzole Edilen RNA'lara Ait Kalite Değerleri.....	96
4.6.2. RNA-seq ve Biyoinformatik Analizler	100
4.6.3. Farklı İfade Olan Genlerin (DEG) Yolak ve Fonksiyonel Sınıflandırılma Analizi	100
4.6.4. Morfolojik Farklılaşma/Sporulasyon İle İlişkili DEG'lerin Analizi	118
4.6.5. Sekonder Metabolit Biyosentez Kümeleri ile İlişkili DEG'lerin Analizi	121
4.6.5.1. Tunikamisin Gen Kümesi	121
4.6.5.2. CA Biyosentetik Gen Kümesi.....	123
4.6.5.3. CephC Biyosentetik Gen Kümesi	124
4.6.6. Transporter ile İlişkili Genler	126
4.6.7. Siderofor ile İlişkili Genler	127
4.6.8. İki Bileşenli Sistem (TCS)'ler ile İlişkili Genler	128

4.6.9. Kemotaksis ile İlişkili Genler	129
4.7. Tunikamisin Gen Kümesine Ait RNA-seq Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Verileri ile Validasyonu	130
4.8. <i>S. clavuligerus</i> 'ta AdpA Regülatörünün Antibiyotik Üretimi Üzerindeki Etkisinin Biyoassay ile Belirlenmesi.....	132
4.9. Suşlarda Tunikamisin Üretimini LS-MS/MS ile Belirlenmesi	135
4.10. rAdpA Proteininin Saflaştırılması.....	136
4.10.1. <i>adpA</i> Geninin pET28-(a)+ Vektörüne Klonlanması	136
4.10.2. rAdpA Proteininin Saflaştırılması.....	139
4.11. Western Blot Deneyi ile Rekombinant Saf rAdpA Proteininin Varlığının Doğrulanması.....	143
4.12. Jel Retardasyon Deneyi-EMSA (Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi).....	143
4.12.1. AdpA Proteininin Bağlanma Bölgelerinin EMSA ile Belirlenmesi.....	143
4.13. <i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 Suşunda Tunikamisin Biyosentetik Yolağındaki Genlerin Ortak Transkripsiyonel Profili	146
5. SONUÇ	149
KAYNAKLAR	154
EKLER	166
ÖZ GEÇMİŞ.....	215

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTPs	: Dinükleotid Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Triasetik Asit
EMSA	: Elektroforetik Hareket Kayma Testi
EtBr	: Etidyum Bromür
kb	: Kilo Baz Çifti
kDa	: Kilodalton
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-İkili Kütle Spektrometrisi
M	: Molar
mM	: Mili-molar
ng	: Nanogram
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Hidrojen Potansiyeli
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
TAE	: Tris Asetat EDTA
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Tm	: Primer Bağlanma Sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Streptomyces</i> sp.'nin yaşam döngüsüne şematik genel bakış	4
Şekil 2.2. <i>S. clavuligerus</i> tarafından üretilen bazı sekonder metabolitler	8
Şekil 2.3. Tunikamisin genel yapısı	9
Şekil 2.4. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hücre duvarı	10
Şekil 2.5. Peptidoglikan biyosentetik yolağı	11
Şekil 2.6. MraY tarafından katalizlenen lipit I sentezinde tunikamisin inhibisyon etkisi	12
Şekil 2.7. GPT ile ilişkili olan substratlar dolikol fosfat ve tunikamisin şematize edilişi. .	13
Şekil 2.8. Tunikamisin biyosentez yolağı	15
Şekil 2.9. Tunikamisin biyosentetik gen kümesinin <i>S. chartreusis</i> NRRL 3882'de genetik organizasyonu ve <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 ile <i>A. mirum</i> DSM43827'deki homologları	16
Şekil 2.10. β -laktam antibiyotikleri ve β -laktamaz inhibitörleri	17
Şekil 2.11. β -laktam antibiyotiklerinin etki mekanizması Hücre duvarı sentezi ve β -laktam etki mekanizması	18
Şekil 2.12. CephC genel yapısı	19
Şekil 2.13. CephC biyosentez yolu	20
Şekil 2.14. CephC gen kümesi	21
Şekil 2.15. CA genel yapısı	22
Şekil 2.16. CA biyosentez yolu	23
Şekil 2.17. CA gen kümesi	24
Şekil 2.18. <i>S. griseus</i> 'da AdpA ekspresyonu ve düzenleyici basamakları	26
Şekil 3.1. <i>I-SceI</i> Meganükleaz yöntemi ile <i>S. clavuligerus</i> genomunda <i>adpA</i> geninin silinmesine dair şematik gösterim	39
Şekil 3.2. Prob verimliliğinin tespit edilmesi	49
Şekil 3.3. Blot transfer aparatına jel ve membranın yerleşimi	49
Şekil 3.4 Hibridizasyon sıcaklığının hesaplanması	50
Şekil 3.5. Herring Sperm DNA'ya ait kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 3.6. Tunikamisin standardına ait kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 3.7. CA standardına ait kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 3.8. Cefmatazole standardına ait kalibrasyon eğrisi	55
Şekil 3.9. RNA-seq analizi için iş akışı	56
Şekil 3.10. Rölatif ekspresyon oranı hesaplanırken kullanılan formül	59
Şekil 4.1. <i>S. clavuligerus</i> 'a ait genomik DNA	66
Şekil 4.2. <i>SCLAV_1956-SCLAV_1959</i> genlerine ait nükleotit dizileri ve tasarlanan primerlerin lokasyonları	67

Şekil 4.3. <i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR.	69
Şekil 4.4. <i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR.	69
Şekil 4.5. pIJ12738 plazmidinin KpnI enzimi ile kesimi.....	70
Şekil 4.6. Transformasyon sonucu oluşan hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler.....	70
Şekil 4.7. Rekombinant pIJ12738 plazmidinin KpnI bölgesinde 5406 bp'lik <i>adpA</i> aşağı ve yukarı bölgelerini içeren füzyon fragmentinin (Δ adpA-füzyon) PCR ile doğrulanması.	71
Şekil 4.8. Rekombinant <i>E. coli</i> pIJ12738 Δ adpAE'nin PCR ile doğrulanması.	72
Şekil 4.9. <i>S. clavuligerus</i> pIJ12738 Δ adpA-1 suşunda Δ adpA-füzyon fragmentinin PCR ile amplifikasyonu.	73
Şekil 4.10. pTC192-Km vektörünün EcoRI enzimi ile kesimi	74
Şekil 4.11. pIJ12742 vektörünün BlnI enzimi ile kesimi.....	74
Şekil 4.12. Rekombinant pIJ12742 vektöründe yer alan <i>aphII</i> geninin PCR amplifikasyonu.	75
Şekil 4.13. Kanamisin içeren rekombinant pIJ12742 plazmidinin HindIII ve XbaI enzimleri ile kesimi.	76
Şekil 4.14. pIJ12742-Km5 vektörünün <i>E.coli</i> ET1256/pUZ8002 içerisindeki varlığının <i>I_SceI</i> gen bölgesinin çoğaltıldığı PCR ile doğrulanması.	76
Şekil 4.15. pIJ12742-Km5 vektörünün <i>E.coli</i> ET1256/pUZ8002 içerisindeki varlığının <i>aphII</i> gen bölgesinin çoğaltıldığı PCR ile doğrulanması.....	77
Şekil 4.16. <i>adpA</i> nükleotid dizisi ve 5' yukarı ve 3' aşağı kısımlarındaki diziler	78
Şekil 4.17. AdpAD_F ve _R doğrulama primerleri kullanılarak yapılan PCR.....	79
Şekil 4.18. <i>adpA</i> primerleri kullanılarak yapılan PCR	79
Şekil 4.19. <i>I_SceI_check_F</i> ve _R primerleri kullanılarak yapılan PCR.....	80
Şekil 4.20. AdpAD_F ve _R doğrulama primerleri kullanılarak yapılan PCR.....	81
Şekil 4.21. <i>S. clavuligerus</i> Δ adpA1 ve Δ adpA2 mutant suşlarına ait kromozomda <i>adpA</i> geninin yok edildiği bölge.....	81
Şekil 4.22. <i>adpA</i> geninin PCR ile çoğaltılması.....	82
Şekil 4.23. Transformasyon sonucu oluşan hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler.....	83
Şekil 4.24. Rekombinant pGEMTadpA'nın PCR ile doğrulanması	83
Şekil 4.25. Rekombinant pGEMTadpA'nın enzim kesimi (NotI-NdeI ile kesim) ile doğrulanması.	84
Şekil 4.26. pGEMTadpA'nın EcoRI enzimi ile kesimi.	84
Şekil 4.27. pSET152Erme* plazmidinin EcoRI enzim ile kesimi.	85
Şekil 4.28. Transformasyon sonucu oluşan putatif rekombinant hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler.....	85

Şekil 4.29. pSETadpA4 ve pSETadpA5 rekombinant plazmidlerinde <i>adpA</i> genininin PCR amplifikasyonu	86
Şekil 4.30. <i>adpA</i> genini EcoRI kesim bölgesinde taşıyan rekombinant pSET152ErmE*'nin SpeI ve XbaI ile kesim sonuçları.....	87
Şekil 4.31. <i>adpA</i> genini taşıyan pSET152ErmE* vektörünün <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 hücrelerine traanformasyonunun PCR ile doğrulanması.....	88
Şekil 4.32. Komplementasyonun PCR ile doğrulanması.....	89
Şekil 4.33. <i>S. clavuligerus</i> Δ adpA1 ve Δ adpA2 mutantlarıyla AdpAD_F ve adpAD_R primerleri kullanılarak yapılan PCR.....	90
Şekil 4.34. Southern Blot sonucu.....	90
Şekil 4.35. pGEMTadpA'nın SpeI- NdeI enzimleri ile kesimi.....	91
Şekil 4.36. pSPG plazmidinin SpeI-NdeI enzimleri ile kesimi.....	91
Şekil 4.37. Transformasyon sonucu oluşan putatif rekombinant hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler.....	92
Şekil 4.38. <i>adpA</i> geninin PCR ile çoğaltılması.....	93
Şekil 4.39. <i>adpA</i> genini taşıyan rekombinant pSPG'nin KpnI ve EcoRI ile kesim sonucu ...	93
Şekil 4.40. <i>adpA</i> genini taşıyan pSPG plazmidinin <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 hücrelerine klonlanmasının PCR reaksiyonu ile doğrulanması.....	94
Şekil 4.41. Konjugasyonun Apr ^R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması.....	94
Şekil 4.42. Boş pSPG plazmidinin <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyonunun Apr ^R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu ile doğrulanması.....	95
Şekil 4.43. Konjugasyonun Apr ^R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması.....	96
Şekil 4.44. İzole edilen RNA örnekleri.....	97
Şekil 4.45. RNA dizilemede kullanılan RNA'lara ait RIN değerleri.....	98
Şekil 4.46. Karşılaştırmalarda önemli derecede ifadesi artan (up-regüle) ve ifadesi azalan (down-regüle) gen sayılarını gösteren bar	101
Şekil 4.47. Kontrol suşuna kıyasla önemli derecede ifadesi artan (up-regüle) ve ifadesi azalan (down-regüle) gen sayılarını gösteren volkan grafikleri	102
Şekil 4.48. Suşlarda ifade edilen genlere ait venn diyagramı	104
Şekil 4.49. Suşların karşılaştırılmasında farklı ifade olan genlerin KEGG yolak sınıflandırması	105
Şekil 4.50. Suşların karşılaştırılmasında yukarı ve aşağı yönde ifade olan (up-regüle/down regüle) DEG'lerin yolak fonksiyonel zenginleştirme sonuçları	108
Şekil 4.51. Suşların karşılaştırılmasında DEG'lere ait yolak fonksiyonel zenginleştirme istatistiği	111
Şekil 4.52. Suşların karşılaştırılmasında DEG'lere ait fonksiyonel GO sınıflandırılması... ..	114
Şekil 4.53. Suşların karşılaştırılmasında up-regüle/down regüle DEG'lerin GO zenginleştirme sonuçları	116
Şekil 4.54. ISP4 besiyerinde suşların sporlanma durumları	120

Şekil 4.55. <i>S. clavuligerus</i> Δ adpA suşunda kontrole kıyasla tunikamisin biyosentez yolağı ve tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki ifadesi artan genler (kırmızı).	122
Şekil 4.56. <i>S. clavuligerus</i> Δ adpA suşunda kontrole kıyasla CA biyosentez yolağı ve CA biyosentetik gen kümesindeki farklı ifade olan up-regüle (kırmızı) ve down-regüle (yeşil) genler	124
Şekil 4.57. <i>S. clavuligerus</i> Δ adpA suşunda kontrole kıyasla CephC biyosentez yolağı ve CephC biyosentetik gen kümesindeki farklı ifade olan up-regüle (kırmızı) ve down-regüle (yeşil) genler	125
Şekil 4.58. qRT-PCR ile tunikamisin gen kümesine ait genlerin 48. saatteki rölatif ifade değerleri	130
Şekil 4.59. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı üreme profilleri	133
Şekil 4.60. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik CephC üretimi	133
Şekil 4.61. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik CA üretimi	134
Şekil 4.62. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik tunikamisin üretimi	135
Şekil 4.63.(a) T ₉₆ 'da TYD kültürlerinde suşlar tarafından üretilen tunikamisin homologlarının kromatogramları, (b) Kümülatif LC-MS/MS sonuçları	135
Şekil 4.64. pGEMTadpA ve pET28-a(+) vektörlerinin NotI ve NdeI enzimleri ile kesim sonuçları	136
Şekil 4.65. Transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler	137
Şekil 4.66. <i>adpA</i> genini taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörlerinin PCR ile doğrulama sonuçları.	137
Şekil 4.67. <i>adpA</i> genini taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörlerinin NdeI-NotI enzim kesimi ile doğrulama sonuçları.....	138
Şekil 4.68.Transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler	138
Şekil 4.69. <i>E. coli</i> BL21 hücrelerine pET16 vektörlerinin transformasyonla aktarılmasının PCR ile doğrulanması.....	139
Şekil 4.70. <i>adpA</i> geninin pET28a(+) daki konumu	139
Şekil 4.71.IPTG ile indüklenmiş kültürlerde AdpA ifadesi.....	140
Şekil 4.72.Kültürlerde rAdpA ifadesi.	141
Şekil 4.73.Protino Ni-TED kolonları kullanılarak rAdpA proteininin saflaştırılması.	142
Şekil 4.74.Amicon® Ultra-15 30K santrifüj filtresi kullanılarak rAdpA'nın saf ve konsantre halde elde edilmesi.....	142
Şeki 4.75.Saf rekombinant rAdpA proteininin SDS-PAGE (a) ve Western blot (b) analizleri.	143
Şekil 4.76. <i>SCLAV_4288</i> ve <i>SCLAV_4287</i> arasındaki intergenik bölgenin nükleotid dizisi	145
Şekil 4.77.AdpA regülatörünün bağlanma bölgelerini belirlemek üzere EMSA'da kullanılan PCR amplikonu.	145
Şekil 4.78. <i>S. clavuligerus</i> 'ta rAdpA bağlanma bölgelerinin EMSA analizi.....	146
Şekil 4.79. <i>S. clavuligerus</i> 'ta tunikamisine ait gen kümesi.....	147

Şekil 4.80. *S. clavuligerus*'taki tunikamisin gen kümesinin ortak transkripsiyonel profili. . 148



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Streptomyces</i> sp. tarafından üretilen bazı antibiyotikler	6
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler	31
Tablo 3.2. Native poliakrilamid jellerin hazırlanışı	40
Tablo 3.3. SDS-poliakrilamid jellerin hazırlanışı	40
Tablo 3.4. %6'lık poliakrilamid jel kompozisyonu	41
Tablo 3.5. Insertlerin pIJ12738 plazmidine ligasyonu için uygulanan içerik	42
Tablo 3.6. <i>aphII</i> genine T4 DNA Polimeraz (Thermo Scientific™)) uygulanan reaksiyonun içeriği	42
Tablo 3.7. pIJ12742 plazmidine Alkalın fosfataz enzimi (Thermo Scientific™)) uygulanan reaksiyonun içeriği.....	43
Tablo 3.8. pIJ12742 plazmidine <i>aphII</i> geninin aktarılması için uygulanan ligasyon içeriği .	43
Tablo 3.9. pGEM®-T Easy plazmidine <i>adpA</i> 'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği.....	43
Tablo 3.10. pSET152ErmE* plazmidine <i>adpA</i> 'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği.....	44
Tablo 3.11. pET28-a(+) plazmidine <i>adpA</i> 'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği.....	44
Tablo 3.12. <i>adpA</i> geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerini çoğaltmada kullanılan PCR içerik ve koşulları	45
Tablo 3.13. <i>aphII</i> geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan reaksiyon içeriği ve koşulları	45
Tablo 3.14. SclI-check primerleri yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları	46
Tablo 3.15. <i>adpA</i> primerleri ile yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları	47
Tablo 3.16. <i>adpA</i> doğrulama primerleri ile yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları	47
Tablo 3.17. Prob oluşturma prosedürü.....	48
Tablo 3.18. cDNA sentez reaksiyonu ve koşulları.....	58
Tablo 3.19. qRT-PCR reaksiyon içerik ve koşulları.....	59
Tablo 3.20. LC-MS/MS analizinde zamana bağlı solvent kullanımı.....	60
Tablo 3.21. rAdpA proteininin <i>S. clavuligerus</i> 'un tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki putatif bağlanma bölgelerini belirlemek üzere yapılan EMSA deneylerinde uygulanan prosedür.....	63
Tablo 3.22. RT-PCR'ın içerik ve koşulları	64
Tablo 4.1. İzole edilen DNA örneğinin spektrofotometrik ölçümleri.....	66
Tablo 4.2. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri.....	96
Tablo 4.3. Okumalara ait istatistiksel değerler	100
Tablo 4.4. TYD kültürlerinde 48. saatte, tunikamisin gen kümesinde gen ifade farklılıkları.....	131

Tablo 4.5. <i>S. clavuligerus</i> 'a ait tunikamisin gen kümesinde AdpA proteininin bağlandığı konsensus dizisinin bulunduğu lokasyonlar ve nükleotid dizileri	144
Tablo 4.6. Genlerin ortak transkripsiyonel profilinin belirlenebilmesi için çoğaltılan bölgelerin uzunlukları.....	147



1. GİRİŞ

Sekonder metabolitler; benzersiz kimyasal yapıları ve önemli biyolojik etkileri sebebiyle yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde önemli bir yere sahip olan, özellikle de mikroorganizmalar tarafından fazlaca üretilen doğal biyoaktif bileşiklerdir (Newman ve Cragg, 2016). Mikroorganizmalar logaritmik üreme evrelerinde, gelişme ve çoğalmaları ile doğrudan ilişkili nükleotidler, vitaminler ve bazı amino asitler gibi primer metabolitlerin yanı sıra üremelerinin durgunluk fazında antibiyotikler, antitümöral, antiviral ilaçlar, biyolojik mücadele ajanları, bitki büyüme düzenleyicileri, pigmentler, toksinler, enzim inhibitörleri, immünomodülatörler, hormonal aktiviteye sahip bileşikler veya çevresel rekabet efektörleri gibi sekonder metabolitlerin üretimini gerçekleştirmektedir (Fouillaud ve Dufossé, 2022; Bech, 2022). Tüm mikrobiyal biyoaktif metabolitlerin yaklaşık %45'i aktinobakteriler tarafından ve bu grup içerisinde üretimin %80'i *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından yapılmaktadır (Baskaran vd., 2022). *Streptomyces* sp.; spor oluşturan, filamentli ve gram pozitif bakterilerdir ve geniş bir yelpazede biyoaktif bileşikler sentezlemektedirler (Khadayat vd., 2020). Bu biyoaktif bileşikler arasında gentamisin, neomisin, streptomisin, vankomisin vb. önemli antibiyotikler mevcuttur (Khan vd., 2023). *Streptomyces* sp. içerisinde *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) genomunda antitümör ajanı holomisin, çeşitli klavamlar, β -laktamaz inhibitörü klavulanik asit (CA), β -laktam antibiyotiği sefamisin C (CephC) ve bir nükleozid grubu antibiyotik olan tunikamisin dahil olmak üzere 58 farklı sekonder metabolite ait biyosentetik gen kümelerine sahip önemli bir türdür (Özcengiz ve Demain, 2013; Hwang vd., 2019).

Tunikamisinler; prokaryotlarda, antibiyotik direnci kazanmış patojen bakteriler üzerinde etki gösteren ve β -laktam grubu antibiyotiklere alternatif bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Tunikamisin, patojen bakterilerin hücre duvar sentezinin ilk aşamasında rol alan fosfo-N-asetilmuramil-pentapeptid transferaz (MraY) proteinini hedef alır ve bu şekilde peptidoglikan öncülü olan lipit I oluşumunu katalizleyen enzimi inhibe ederek etkisini gösterir (Brandish vd., 1996). Ökaryotlarda ise endoplazmik retikulumda (ER), N-glikopeptitlerin N-asetilglukozaminasyonundan sorumlu olan UDP-N-asetilglukozamin-dolikil fosfat N-asetilglukozamin-

fosfotransferaz (GPT) enzimini inhibe etmektedir. Ökaryotik hücreler üzerindeki bu etkisi sebebiyle kanser hücrelerinin büyümesini ve tümörlerin ilerlemesi inhibe eder. Ayrıca, meme, mide ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde anormal glikozilasyonun bir inhibitörü olduğu görülmüştür (Banerjee vd., 2022). Önemli biyolojik aktivitelere sahip bu ajanın oldukça karmaşık kimyasal yapısı; 11-karbonlu undekodialdoz iskeleti, lipid zinciri ve 1,1- β , α -trehaloz tipi glikozidik bağla bağlı bir GlcNAc parçasından oluşmaktadır (Yamamoto ve Ichikawa, 2019). Tunikamisin bileşimleri farklılık gösteren dört homolog antibiyotiğin, yani A-D homologlarının bir karışımıdır. Her homolog temel olarak bir urasil, bir N-asetil glikozamin veya tunikamin (11-karbonlu aminodialdoz) ve amino grubuna bağlı bir yağ asidi zinciri içerir (Gabani vd., 2019). *S. clavuligerus*'da tunikamisin sentezi için mevcut olan gen kümesi, *SCLAV_4274 (tunN)*'ten *SCLAV_4287 (tunA)*'ye kadar uzanmaktadır. Hwang vd. (2019), tunikamisin gen kümesinin *SCLAV_4290*, *_4289*, *_4288* ve *_4273* genlerini de içerdiğini öne süren *in silico* analizler gerçekleştirmişlerdir. Ancak, bu varsayımın doğrulanması için araştırmalar devam etmektedir. Diğer taraftan tunikamisin gen kümesinin düzenleyici bir gen içermediği bildirilmiştir (Chen vd., 2010; Wyszynski vd., 2010; Karki vd., 2011). Bu durum *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezinin global bir düzenleyicinin etkisi altında olduğunu düşündürmektedir.

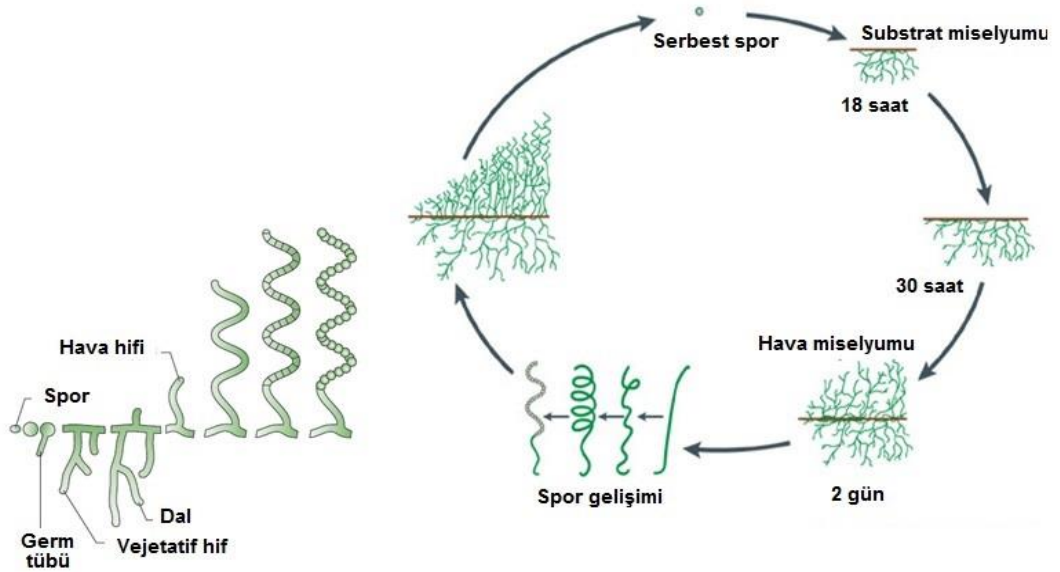
Streptomyces'te sekonder metabolizma ve morfolojik farklılaşmanın düzenlenmesi çeşitli fizyolojik ve çevresel durum değişikliklerine yanıt veren yolak özgü, pleiotropik ve global düzenleyicileri içeren bir ağ tarafından yönetilir (Yu vd., 2018). Bu düzenleyiciler içinde yer alan pleiotropik regülatörlerden biri de AdpA olup sekonder metabolizma için en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (Ohnishi vd., 2005; Yu vd., 2018). *Streptomyces*'te en çok çalışılan AraC ailesi pleiotropik transkripsiyonel düzenleyici olan AdpA'nın, çoğu *Streptomyces* türünde sekonder metabolizmanın ve morfolojik farklılaşmanın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı rapor edilmiştir. İlk kez *Streptomyces griseus*'ta streptomisin üretimini etkilediği gösterilmiştir (Ohnishi vd., 1999; Bu vd., 2019). *S. clavuligerus*'ta yapılan çalışmalarda AdpA'nın CA-CephC süperkümesi, CA gen kümesinin erken safhalarında rol oynayan enzimleri kodlayan genleri (*ceaS2/bls2* ve *cas2*) ve yolak özgü regülatör olan *ccaR* genlerinin ekspresyonunu etkilediği tespit edilmiştir

(López-García vd., 2010). Genel bir aktivatör olarak bilinmesine rağmen, Bu vd. (2019) AdpA'nın *Streptomyces xiamenensis*'te morfogenez ve sekonder metabolit biyosentezinde baskılayıcı bir rol oynadığını bildirmiştir. AdpA'nın etki mekanizması birçok sekonder metabolit için araştırılmış olmasına rağmen *S. clavuligerus*'ta tunikamisin gen kümesi üzerindeki etkisi aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamız kapsamında *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezinde AdpA'nın potansiyel düzenleyici mekanizmasını ortaya çıkarmak için ilk kez RNA dizilimi (RNA-seq) analizi gerçekleştirilmiş, AdpA'nın tunikamisin biyosentezi üzerindeki düzenleyici etkisinin baskılayıcı yönde olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca, AdpA'nın, *S. clavuligerus*'taki *tunA* promotor bölgesine bağlandığı EMSA ile gösterilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Streptomyces* sp.

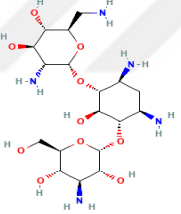
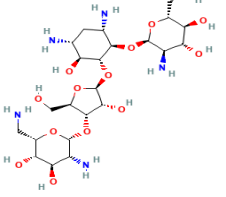
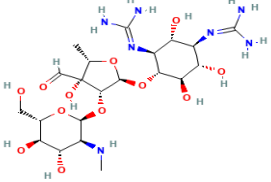
Aktinobakteri grubunun bir üyesi olan *Streptomyces* cinsi; spor oluşturan, filamentli, aerobik, hareketsiz ve gram pozitif bakterilerlerden oluşmaktadır (Kämpfer, 2006; Alam vd., 2022). *Streptomyces* cinsi ilk kez 1943'te yaygın bir antibiyotik kaynağı olarak keşfedilmiş ve günümüze kadar 1218 türü ve 73 alttürü tanımlanmıştır (Donald vd., 2022; <https://lpsn.dsmz.de/search?word=streptomyces> (25.05.2024); Parte vd., 2020). Karasal ve sucul ekosistemlerde dağılım gösteren *Streptomyces* sp. toprakta yaygın olarak bulunur ve toprak saprofitleri olarak da tanınmaktadır (Anderson ve Wellington, 2001; de Lima Procópio vd., 2012). *Streptomyces* sp. filamentli funguslarla benzerlik göstermektedir ve bu durumun sebebinin aynı çevresel alanlara karşı geliştirdikleri adaptasyonların sonucu olduğu düşünülmektedir (de Lima Procópio vd., 2012; Barbuto Ferraiuolo vd., 2021). Özellikle *Streptomyces* sp.'ye ait yaşam döngüsü incelendiğinde, sahip oldukları hiflerin uç uzaması ve dallanması yoluyla büyümenin sonucunda misel oluşumunun meydana gelmesi funguslar ile morfolojik benzerliğini öne çıkarmaktadır. *Streptomyces* yaşam döngüsü (i) serbest sporun çimlenmesi, (ii) vejetatif miselin üremesi, (iii), hava misellerinin gelişimi ve son olarak (iv) spor morfogenezi olmak üzere 4 adımdan oluşmaktadır (Barka vd., 2015) (Şekil 2.1).



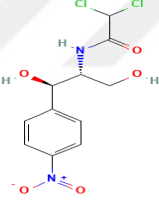
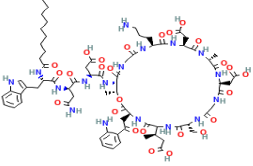
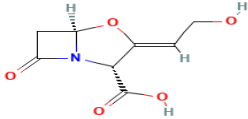
Şekil 2.1. *Streptomyces* sp.'nin yaşam döngüsüne şematik genel bakış (Barka vd., 2015)

Farmasötik olarak doğal antibiyotikler, biyoaktif bileşikler ve endüstriyel olarak yararlı enzimler gibi önemli sekonder metabolitlerin verimli üreticileri olmaları nedeniyle bu cinsin üyeleri birçok araştırmaya konu olmaktadır (Cuebas- Irizarry ve Grunden, 2024). Suşların genom özellikleri incelendiğinde, genellikle 8 Mbç'nin üzerinde ve yaklaşık %67-78 oranında yüksek bir G+C içeriğinde doğrusal kromozomlara sahip oldukları tespit edilmiştir (Law vd., 2019). *Streptomyces*'in ilk tüm genom dizisi *Streptomyces coelicolor* A3 (*S. coelicolor*)'a ait olup 8.667,507 bç boyutundadır ve ilgili genomun sekonder metabolitlerin biyosenteziyle ilgili 20'den fazla gen kümesi içerdiği bildirilmiştir (Bentley vd., 2002). Daha sonra, endüstriyel bir suş olan *Streptomyces avermitilis* (*S. avermitilis*)'in tüm genom dizisinin 9.025,608 bç'den oluştuğu ve genomunda çeşitli sekonder metabolitlerle ilişkili 30'dan fazla biyosentetik gen kümesinin varlığı rapor edilmiştir (Ikeda vd., 2003). *Streptomyces* sp.'de büyük genomlarının haricinde ayrıca sahip oldukları doğrusal plazmidler de sekonder metabolit biyosentezinden sorumlu gen kümeleri içermektedir (Kieser vd., 2000). *Streptomyces* cinsinin üyeleri, günümüzde insan ve veteriner ilaçlarında kullanılan ticari olarak değerli antibiyotiklerin %75'inden fazlasının üreticisi konumundadır (Law vd., 2019; Khan vd., 2023) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. *Streptomyces* sp. tarafından üretilen bazı antibiyotikler (Law vd., 2019; Khan vd., 2023)

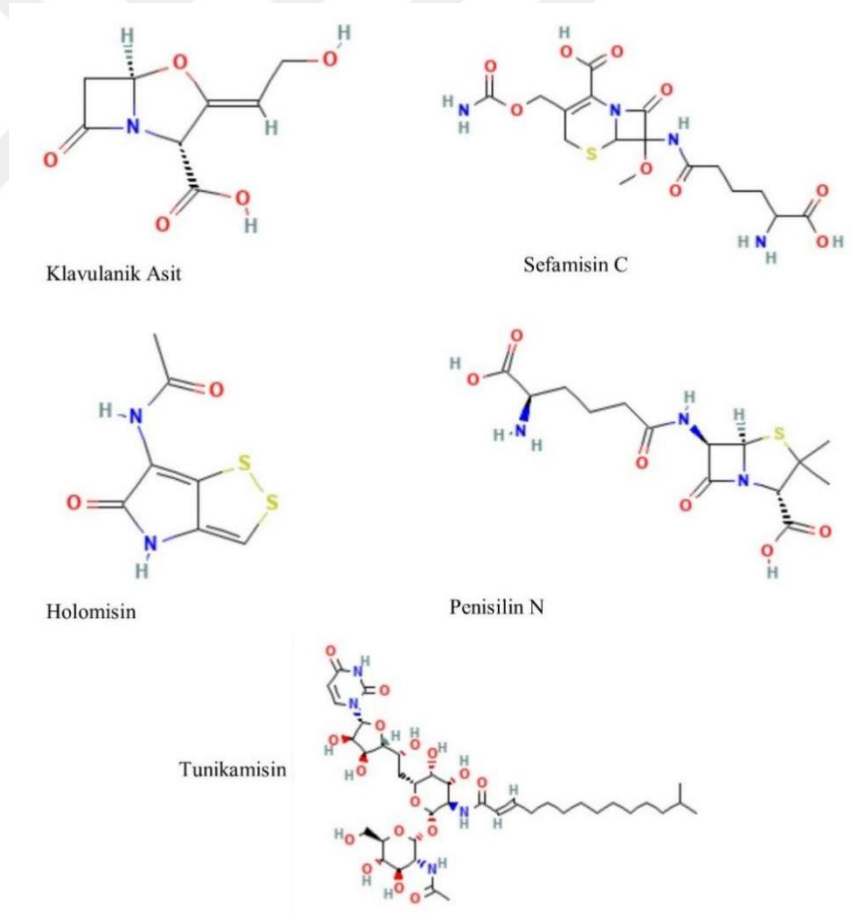
Kimyasal Sınıfı	Antibiyotik	Kimyasal yapısı	Üretici <i>Streptomyces</i> suşu	Etki mekanizması	Etki gösterdiği patojenler	Kaynak
Aminoglikozit	Bekanamisin		<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Protein sentezinin engellenmesine ve translasyon hatalarının artmasına neden olur.	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Yanai ve Murakami (2004)
Aminoglikozit	Neomisin		<i>Streptomyces fradiae</i>	30S ve bazı durumlarda 50S rRNA alt birimini bağlar ve yanlış kodlamaya neden olur. Protein sentezi sırasında başlama ve uzamayı engeller.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ma vd. (2010) Schneider vd. (2012)
Aminoglikozit	Streptomisin		<i>Streptomyces griseus</i>	Bakteriyel protein sentezini inhibe eder.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Dharmaraj (2010)

Tablo 2.1. *Streptomyces* sp. tarafından üretilen bazı antibiyotikler (devam) (Law vd., 2019; Khan vd., 2023)

Kimyasal Sınıfı	Antibiyotik	Kimyasal yapısı	Üretici	Etki mekanizması	Etki gösterdiği patojenler	Kaynak
Makrolid	Kloramfenikol		<i>Streptomyces venezuelae</i>	Peptidil transferaz adımında 50S rRNA alt birimindeki translayonu bozarak protein biyosentezini inhibe eder.	<i>Streptococci</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Staphylococci</i> <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria species</i>	Som vd. (2017)
Lipopeptid	Daptomisin		<i>Streptomyces roseosporus</i>	Sitoplazmaya nüfuz etmeden plazma membran fonksiyonunu bozarak bakterisidal aktivite gösterir.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Liu vd. (2018)
β -laktamaz inhibitörü	Klavulanik asit		<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Bakteriyel beta-laktamaz enzimlerinin inhibitörü olarak görev yapar.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Liras ve Martín (2005)

2.2. *Streptomyces clavuligerus*

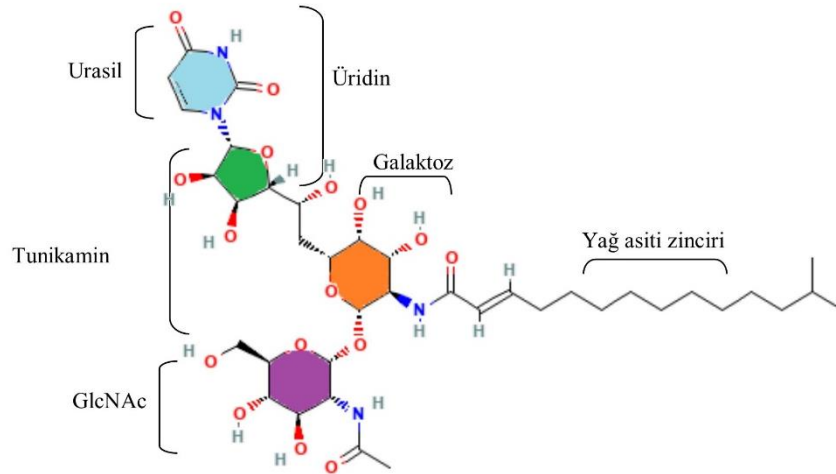
Streptomyces clavuligerus (*S. clavuligerus*), Higgins ve Kastner (1971) tarafından Güney Amerika toprak örneklerinden izole edilmiş ve bir β -laktam antibiyotik üreticisi olarak rapor edilmiştir. *S. clavuligerus* ATCC 27064 ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomlarının yaklaşık 6.7 Mb'lık doğrusal bir kromozoma ve pSCL1 (11.7 kb), pSCL2 (120 kb), pSCL3 (430 kb), ve pSCL4 (1.8 Mb, sadece *S. clavuligerus* ATCC27064'te bulunmaktadır) olarak isimlendirilmiş plazmidlere sahip oldukları tespit edilmiştir (Medema vd., 2010; Song vd., 2010; Martín ve Liras, 2021). Günümüze kadar bu bakteri genomunda 58 farklı sekonder metabolitin biyosentezinden sorumlu gen kümesi belirlenmiştir (Hwang vd., 2019). *S. clavuligerus* tarafından üretilen başlıca metabolitler; sefamisin C (CephC), klavulanik asit (CA), holomisin, deasetoksifalospirin C, penisilin N, ve tunikamisin'dir (Thai vd., 2001; Paradkar, 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *S. clavuligerus* tarafından üretilen bazı sekonder metabolitler (Thai vd., 2001; Paradkar, 2013)

2.3. Tunikamisinin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları

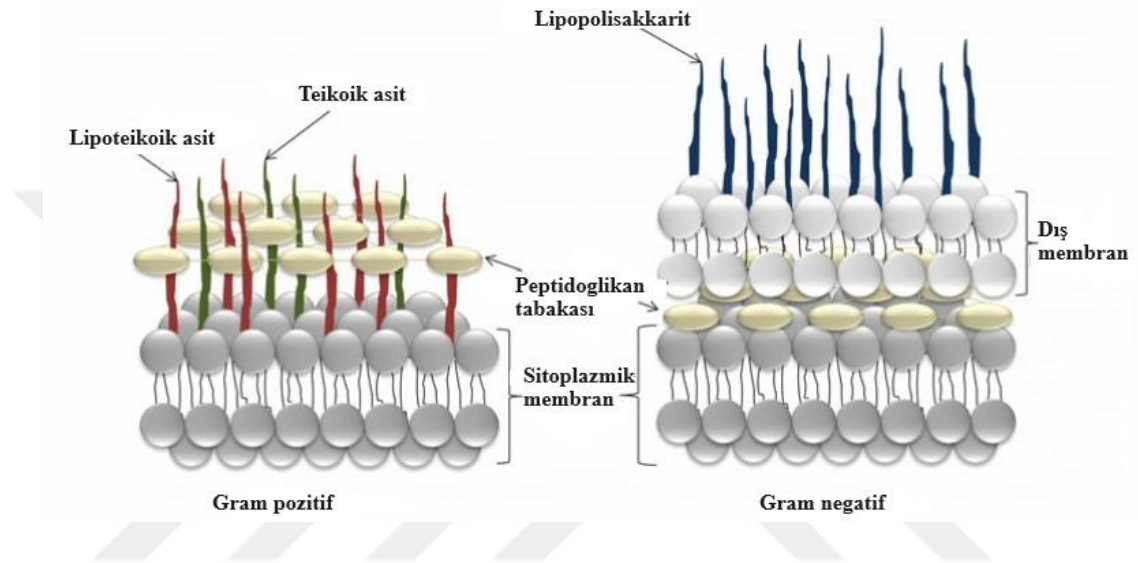
Tunikamisin; bakteriyel hücre duvarı biyosentezi ve ökaryotik proteinlerin N-glikozilasyonuna karşı güçlü inhibitör aktiviteye sahip nükleozid grubu bir antibiyotiktir (Tsvetanova ve Price 2001). İlk kez Takatsuki vd. (1971) tarafından *Streptomyces lysosuperificus*'dan ekstrakte edilmiştir. Daha sonra *Streptomyces chartreusis* (Hamill, 1980), *S. griseus* (Tejera vd., 1982), *S. clavuligerus* (Kenig ve Reading, 1979), *Bacillus cereus* (Kamogashira vd., 1988), *Clavibacter toksikus* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Tsvetanova vd., 2002) bakterilerinden izole edilerek tanımlanmıştır. Günümüzde 43'den fazla tunikamisin ve analogları keşfedilmiştir (Zhang vd., 2020). Tunikamisin nükleozid antibiyotikleri arasında eşsiz bir yapıya sahiptir. Urasil, N-asetilglukozamin (GlcNAc), tunikamin olarak bilinen 11 karbonlu 2-aminodialdoz şekeri ve değişik uzunluklu bir N-açıl yağ asidi zincirinden meydana gelmektedir. Tunikamin ile GlcNAc arasındaki α,β (1"-11') -glikozidik bağı tunikamisin bileşiğinin ailesine özgüdür (Şekil 2.3). Tunikamisin homologları, ortak tunikamisin iskelet yapısının azotuna bağlanmış N-açıl yağ asidi zincirindeki uzunluk, dallanma ve pozisyon bakımından farklılıklar nedeniyle meydana gelmektedir (Tsvetanova vd., 2002; Price ve Tsvetanova, 2007).



Şekil 2.3. Tunikamisinin genel yapısı (Price ve Tsvetanova, 2007)

Benzersiz yapısal özelliklere sahip tunikamisin ve türevlerinin; antimikrobiyal, antiviral ve antitümoral biyolojik aktiviteleri birçok araştırmacının dikkatini

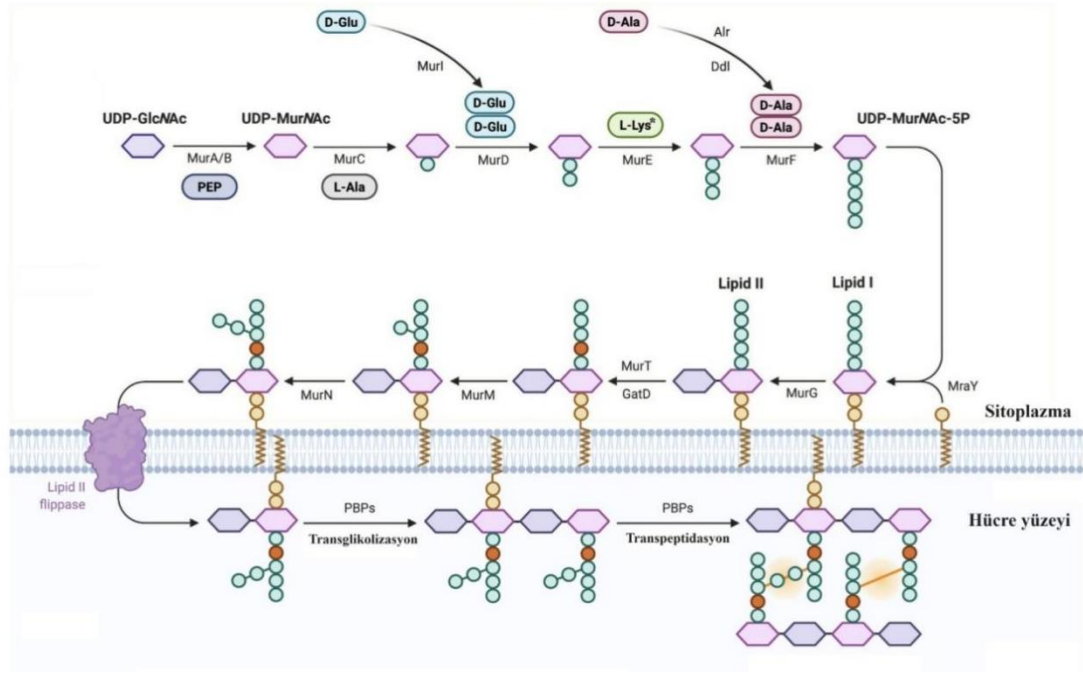
çekmiştir. Tunikamisin, antibakteriyel aktivitesi ile bakterinin hücre duvarı sentezini engelleyen güçlü bir inhibitör olarak görev yapmaktadır. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan tabakasından oluşur ve hücre duvarı kütlelerinin %5-90'ını meydana getirir (Seltmann ve Holst, 2002). Gram pozitif bakterilerde hücre duvarlarında çok daha fazla peptidoglikan içeriği bulunurken, gram negatif bakterilerde daha az peptidoglikan içeriği ve ekstra olarak bir dış zar bulunur (Şekil 2.4; Davies vd., 1983).



Şekil 2.4. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hücre duvarı (Espitia vd., 2012)

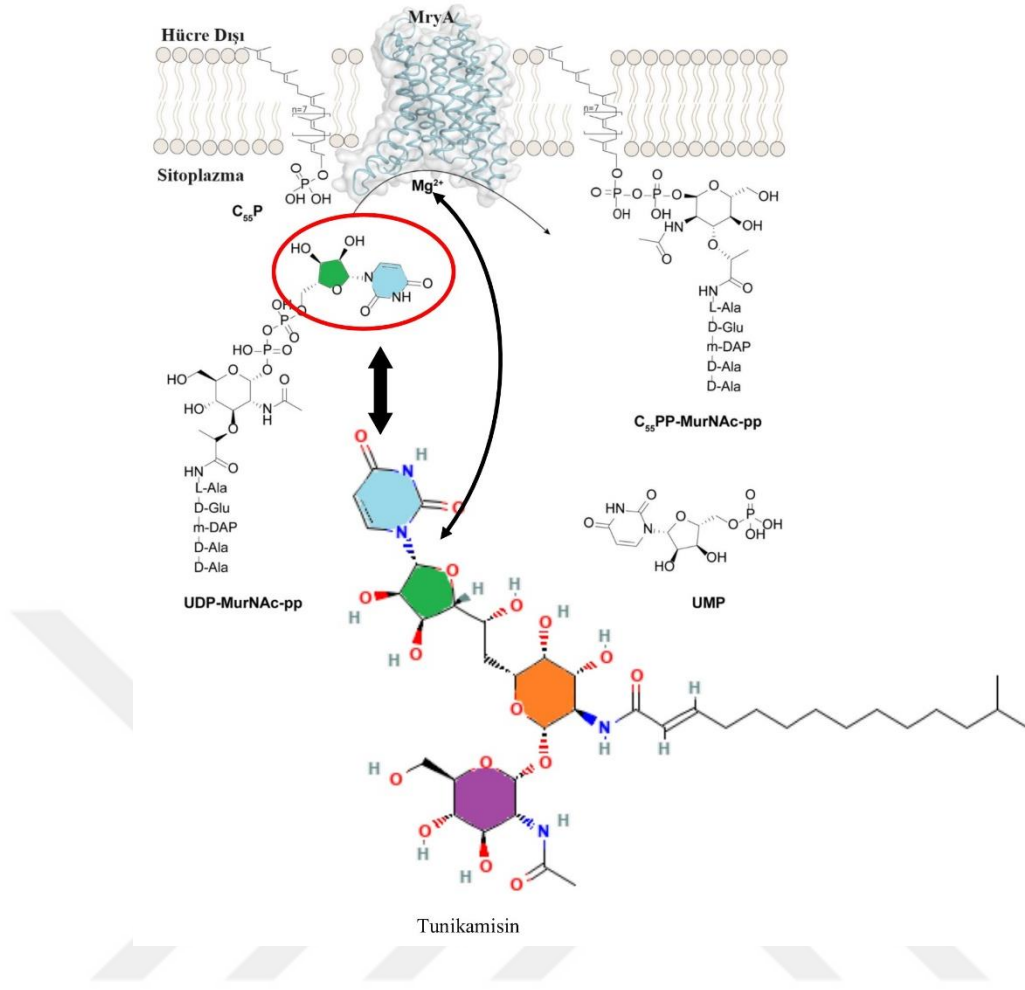
Peptidoglikan, sitoplazmik membranın etrafını sarar ve bakterileri ozmotik basınca karşı koruyarak mekanik stabiliteye yardımcı olur. Hücre şeklini koruyarak, hücrenin iç ve dış ortamı arasındaki büyük moleküllerin taşınmasında proteinler ve diğer makromoleküller için sabit bir platform sağlar. Ayrıca, membran sızıntısını önleyerek bir bariyer görevi görür (Wang, 2014). Peptidoglikan yapısı tekrarlayan β -1,4-glikozidik bağı ile bağlı N-asetil müramik asit (MurNAc) ve N-asetil glukozamin (GlcNAc) polisakkaritlerinden meydana gelmektedir. Biyosentezindeki ilk aşamada, UDP-MurNAc pentapeptidinin oluşturulması için sitoplazmada fosfoenolpiruvat (PEP) UDP-GlcNAc'ye parçalanır. Ardından, MurA ve MurB enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon ile UDP-GlcNAc'nin UDP-MurNAc'e dönüşümü gerçekleştirilir. MurC enzimi tarafından UDP-MurNAc'in laktil altyapısına L-alaninden başlayarak ardarda beş amino asit eklenir ve reaksiyon ürünü olarak UDP-Mur-Nac-L-Ala açığa çıkar. ATP-bağımlı ligazlar olan MurD, MurE ve MurF aracılığı ile UDP-Mur-Nac-L-Ala ürünü UDP-MurNAc-pentapeptide dönüştürülür.

Bakteri membran proteini translokaz I (MraY) aracılığıyla UDP-MurNAc-pentapeptit, membrana-bağlı lipit undekaprenil (Un) fosfata bağlanır ve lipit I'i meydana getirilir. Translokaz II (MurG) enzimi tarafından GlcNAc biriminin eklenmesi ile lipit I'den lipit II oluşturulur ve peptidoglikan biyosentezinin hücre içi kısmı tamamlanır. Hücre dışı kısımda ise peptidoglikan oluşumu transglikolizasyon ve transpeptidasyon reaksiyonlarıyla sağlanır (Zhou vd., 2022) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Peptidoglikan biyosentetik yolağı (Zhou vd., 2022)

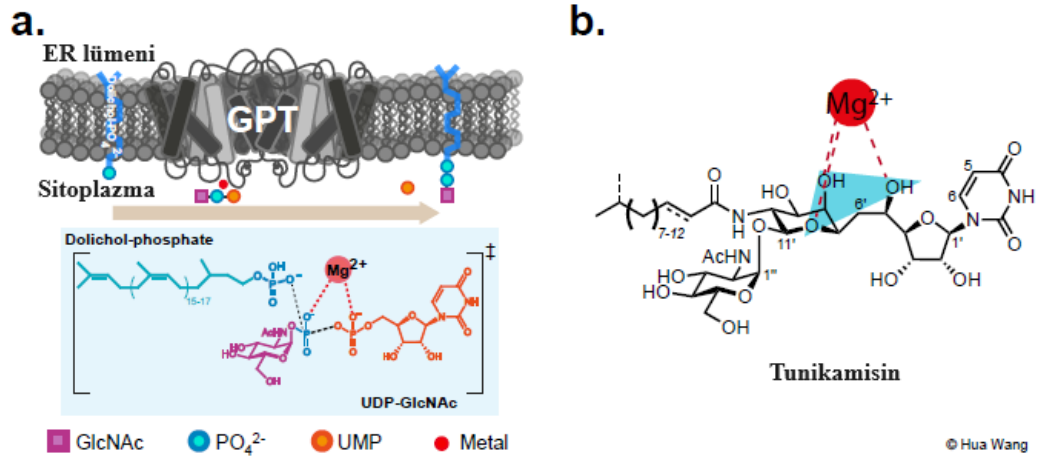
Tunikamisin etki mekanizmasını bakteri hücre duvarı sentezi sırasında lipit I'in oluşumunu katalize eden MraY'yi inhibe ederek göstermektedir. Tunikamisinin yapısında bulunan tunikaminin psödoribozil halkası ve urasil molekülü arasında β -1,4-glikozidik bağı oluşur ve üridin nükleozide oldukça benzer bir yapı ortaya çıkar. Bu yapısal benzerlik sonucunda tunikamisinin, membran proteini translokaz I (MraY) tarafından katalize edilen reaksiyonlarda, üridin monofosfat (UMP) adı verilen molekülü taklit ettiği varsayılmaktadır. Bu durum, translokazın normal işlevini etkileyerek bakterilerde UDP-MurNAc-pentapeptit pirofosfatın oluşumunun önüne geçerek lipit I'in sentezini engellemektedir (Şekil 2.6; Price vd., 2016).



Şekil 2.6. MraY tarafından katalizlenen lipid I sentezinde tunikamisin'in inhibisyon etkisi (Hering vd., 2020'den uyarlanmıştır)

Tunikamisin'in ayrıca, hücrelerde N-bağlı glikozilasyonu bloke ettiği ve glikoprotein sentezinin inhibisyonuna neden olan doğal bir toksin olduğu tespit edilmiştir. N-bağlı protein glikozilasyonu, tüm organizmalarda meydana gelen hücre yüzeyine veya hücre içi proteinlere karmaşık glikanlar veya oligosakkaritlerin eklenmesini sağlayarak proteinlerin fizyolojik rolünü etkileyen çok önemli bir biyolojik süreçtir (Wang, 2014). Bir proteinin en sık görülen translasyon sonrası modifikasyonundan biridir ve hücre zarı oluşumunda, protein katlanmasında, açılmasında ve stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Schoberer vd., 2018). Ökaryotik hücrelerde ER üzerindeki N-bağlı protein glikozilasyon yolundaki ilk membran adımı, *DPAGT1* geni tarafından kodlanan N-Asetilglukozamin-1-fosfat transferaz (GlcNAc-1-P transferaz veya GPT) proteini önemli bir rol oynar (Lehrman, 1991). GPT, UDP-GlcNAc molekülünün Glukozamin (GlcNAc) adlı bir bölümünü, dolikol fosfat (Dol-P) adlı bir lipid taşıyıcısına aktarır. Bu işlem sırasında,

UDP adlı bir başka molekül serbest bırakılır ve sonuç olarak GlcNAc-PP-Dol adlı ürün meydana gelerek proteinlerin glikozilasyon sürecinin ilk adımı gerçekleştirilmiş olur (Yamamoto ve Ichikawa, 2019). MraY ve GPT'nin benzerliğinden dolayı tunikamisinin GPT'nin enzimatik aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. GPT, MraY gibi bir transmembran proteindir (Spiro, 2002). Biyoinformatik analizler GPT'nin aktif bölgesinde tunikamisin ile kompleks oluşturmasını sağlayan korunmuş Mg^{2+} bağlama motifini içerdiğini göstermektedir. GPT proteininin hücre zarı içinde gömülü bulunması sebebiyle kristal yapısı mevcut değildir, bu nedenle GPT'nin tunikamisin ile nasıl etkileşime girdiğinin moleküler temeli konusundaki bilgiler sınırlıdır. Bu mekanizma ile ilgili önerilen model Şekil 2.7'de verilmiştir (Wang, 2014).



Şekil 2.7. GPT ile ilişkili olan substratlar dolikol fosfat ve tunikamisinin şematize edilmesi. a) Önerilen normal modelde, GBT ile UDP-GlcNAc molekülünün inteksiyonu sonucu UMP salınımı gerçekleşir ve dolikol fosfat (Dol-P) aracılığı ile GlcNAc-PP-Dol ürünü açığa çıkar. b) GPT ile etkileşimde substrat olarak tercih edilen tunikamisinin yapısının UDP-GlcNAc'nin difosfatını taklit eden bir konformasyonu (Wang, 2014)

Klinik bir ajan olarak kullanılmasına imkan sağlayan bu etkisi sebebiyle tunikamisinin kanser hücresi büyümesinin ve tümörlerin ilerlemesinin inhibisyonuna paralel olarak meme kanseri (Han vd., 2015), kolon kanseri (de Freitas Junior vd., 2011) ve pankreas kanseri (Jacenic vd., 2024) dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde anormal glikozilasyonun bir inhibitörü olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmış ve güçlü bir antitümör ajanı olarak sınıflandırılmıştır (Banerjee vd., 2024). Tunikamisinin antitümör ilaçları ile birlikte kullanımının çoklu ilaç direncine sahip yumurtalık kanseri hücrelerinin ilaca olan hassasiyetini artırdığı tespit

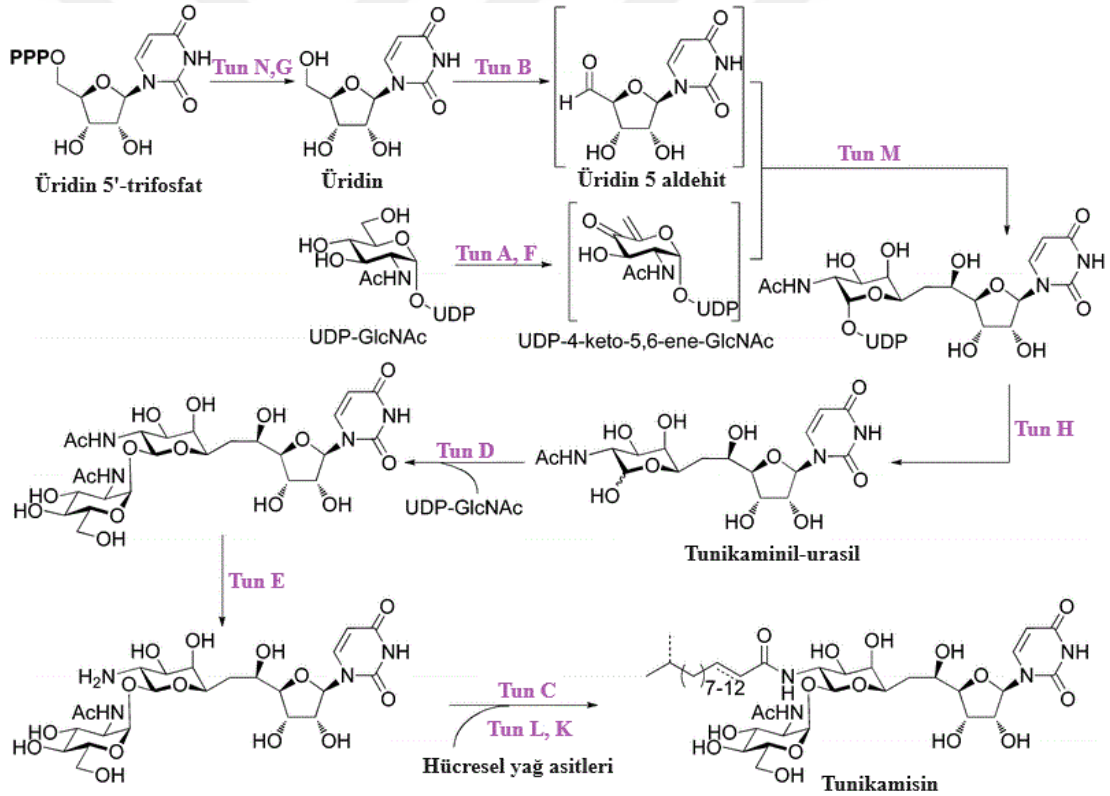
edilmiştir (Hiss vd., 2007). Tunikamisinin N-glikanların sentezini inhibe etmesine ve hücre döngüsünün G1 fazında duraklamasına neden olduğu için diyabet gibi otoimmün hastalıklarının tedavisinde de etkinlik gösterebileceği düşünülmektedir (Shaabani vd., 2012).

Tunikamisinin ilk karakterizasyon çalışmalarında, Newcastle Hastalık virüsü ve Herpes simplex virüsünün tavuk embriyo fibroblast hücrelerinde neden olduğu plak oluşumunu özel olarak engelleyip, düşük sitotoksosite gösteren bir antiviral etki gösterdiği tespit edilmiştir (Takatsuki ve Tamura, 1971; Katz vd., 1980). Tunikamisin antiviral etkisini, virüs nükleokapsidini çevreleyen viral membran (zarf) yapısında bulunan glikoproteinlerin glikozilasyonunu engelleyerek gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır (Dawood ve Alnori, 2020). Alfavirüslerde, bunyavirüslerde, herpesvirüslerde ve miksoviruslerde yapısal glikoproteinlerin glikozilasyonunun tunikamisin tarafından engellendiği gösterilmiştir (Dawood ve Alnori, 2020). Günümüzde çoğu koronavirüsün transmembran yapısal proteinleri (HE, 3a, 8ab, S, E, M, nsp3 ve nsp4) glikolizasyonla modifiye edilmektedir. Tunikamisinin koronavirüslerin E2, S ve M glikoproteinlerini inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır ve SARS-CoV-2 tedavisinde kullanılması önerilmiştir (Dawood ve Alnori, 2020).

2.4. Tunikamisin Biyosentezi ve Gen Kümesi

Tunikamisinler yapısı gereği sentezlenmesi zor olan biyoaktif moleküllerdir. 1971'de keşfedilmesine rağmen gen kümesi üzerine hala çalışmalar devam etmektedir. Biyosentetik yolak ile ilgili ilk rapor *S. chartreusis* NRRL 3882'de Tsvetanova vd. (2002) tarafından sunulmuştur. Chen vd. (2010), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Antibiyotik MM19290) ve *Actinosynnema mirum* DSM 43827'de tunikamisin benzeri antibiyotiklerin potansiyel biyosentezi için *tunA* (SCLAV_4287) ve *tunL* (SCLAV_4276) arasındaki toplam 12 geni içeren tunikamisin gen kümesini raporlamışlardır. Daha sonra, tunikamisin gen kümesini bu metaboliti üretmeyen *S. lividans* TK24'te heterolog olarak eksprese ederek rekombinant bakteride tunikamisin biyosentezini gerçekleştirmişlerdir. Diğer taraftan Wyszynski vd. (2010), *S. chartreusis* NRRL 3882 genomunda tunikamisin biyosentezinde görev aldığı düşünülen gen kümesini *S. coelicolor* M1152'ye klonlayarak tunikamisin biyosentetik yolunu tanımlamışlardır. Aynı zamanda, *A. mirum* DSM43827, *S.*

clavuligerus ATCC 27064 ve *S. chartreusis* NRRL 3882’de yer alan tunikamisin gen kümesinin benzerliklerini rapor etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri biyoinformatik analizlerde tunikamisin gen yolağının, aynı yönde ilerleyerek önceki gene translasyonel olarak bağlanan 14 geni (*SCLAV_4287- SCLAV_4274 / tunA-tunN*) içeren 12.0 kb’lik bir DNA parçasından oluştuğunu göstermişlerdir (Şekil 2.8). Üç bakteriye ait tunikamisin gen kümesi kıyaslamasında *tunA-tunL* dışında *tunM* ve *tunN* adı verilen iki yeni genin de tunikamisin gen kümesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Karki vd. (2011) ise *S. clavuligerus* ATCC 27064’deki tunikamisin biyosentetik gen kümesini, Wyszynski vd. (2010)’nin *S. chartreusis* NRRL 3882’de bildirdiği gibi on dört yerine (*SCLAV_4287- SCLAV_4274 / tunA-tunN*), on iki gen ürününü (*SCLAV_4287- SCLAV_4276 / tunA-tunL*) olarak listeleyerek biyosentetik yolak önerisinde bulunmuştur.

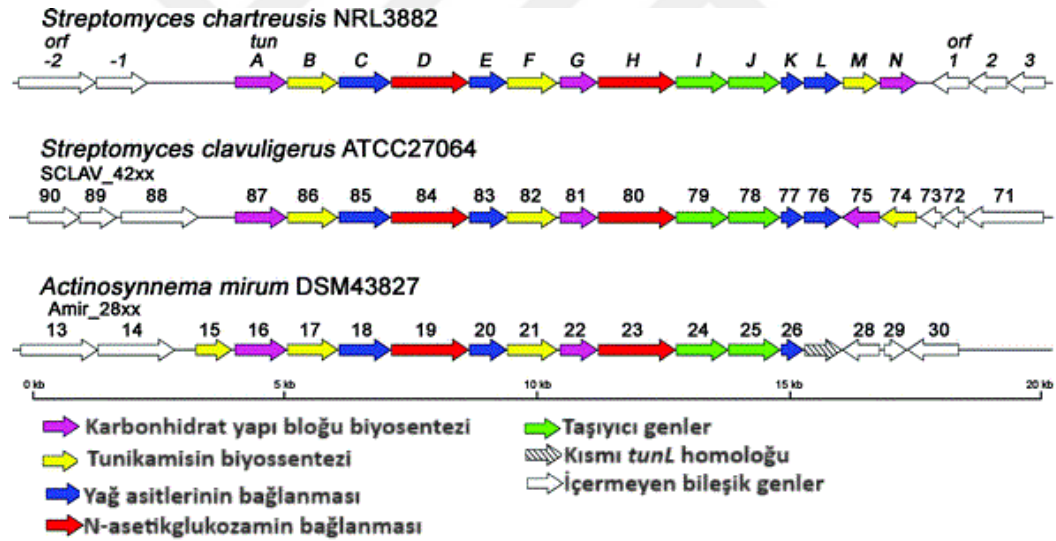


Şekil 2.8. Tunikamisin biyosentez yolağı (Wyszynski vd., 2010)

Tunikamisin biyosentez yolağındaki genlerin işlevleri incelendiğinde ilk basamaklarında tunikamin biriminin oluşturulması için TunA ve TunF’nin görev aldığı görülmektedir. TunA, UDP-GlcNAc üzerinde etki gösterir ve oluşan ürün TunF tarafından C-4" pozisyonunda epimerize edilerek UDP-6-deoksi-GalNAc-5,6-ene

molekölü elde edilir. TunB ve TunM, uridin ve UDP-4-keto-5,6-ene-GlcNAc substratlarını bir araya getirmektedirler. TunN ve TunG'nin ardışık aktivitesi sonucu UTP'den üridin elde edilir. TunH, psödodisakkarit tunikaminil urasil çekirdeğinden UDP'nin hidrolizini katalize eder ve GlcNAc'nin serbest anomerik pozisyona transferini gerçekleştirir. Bu transfer basamağı TunD tarafından katalizlenmektedir. TunL, lipid sentezinin düzenlenmesinde görev alır. Daha sonra, bir açıl taşıyıcı protein olan TunK, *tun* gen kümesinde ligaz olmadığından primer metabolizmadan bir yağ açıl-ACP ligaz aktivitesi yoluyla yağ asitlerini aktive eder. TunE tunikamin çekirdek iskeletini N-deasetilasyona uğrattır. TunC, aktive olmuş yağ asitlerini çekirdek yapıya taşır. Üretici organizmanın tunikamisine direncini ve taşınımını TunI ve TunJ üstlenir (Chen vd., 2010; Wyszynsky vd., 2010).

S. chartreusis NRRL 3882 genomunda 12.0 kb uzunluğundaki DNA dizisinde mevcut olan 14 genin yerleşimi ve yine bu dizinin *A. mirum* DSM43827 ve *S. clavuligerus* ATCC 27064'teki homologları Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



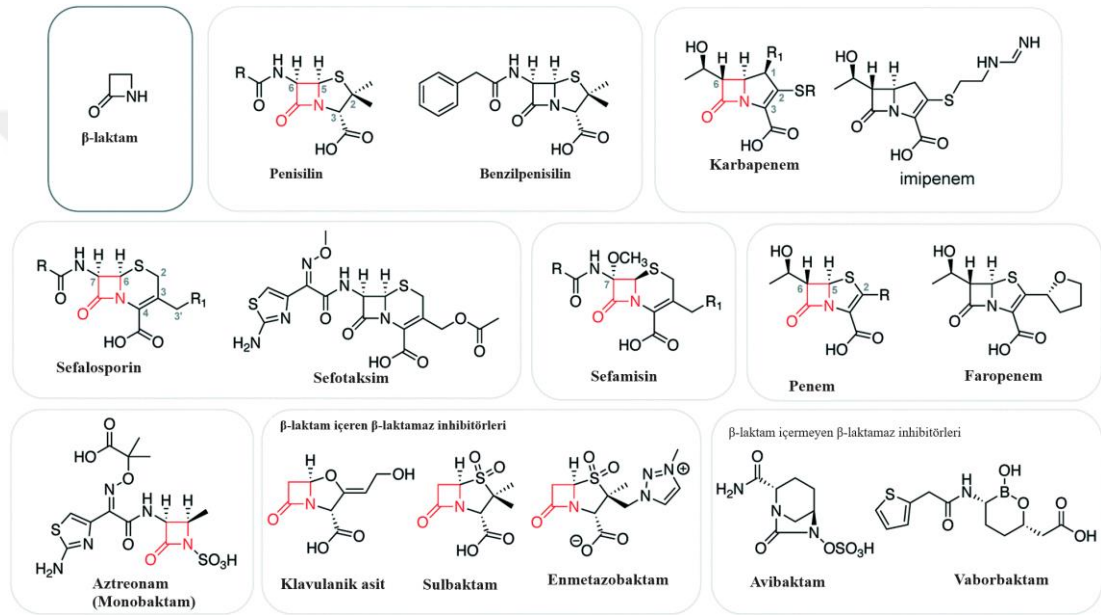
Şekil 2.9. Tunikamisin biyosentetik gen kümesinin *S. chartreusis* NRRL 3882'de genetik organizasyonu ve *S. clavuligerus* ATCC 27064 ile *A. mirum* DSM43827'deki homologları (Wyszynski vd., 2010)

Bu üç bakteriye ait tunikamisin gen kümesinde farklılıklar olmakla beraber, amino asit dizi özdeşliklerine bakıldığında *S. chartreusis* NRRL 3882 ve *S. clavuligerus* ATCC 27064'ye ait ilgili gen kümeleri arasında amino asit dizi özdeşliği oranının %50-90 aralığında olduğu görülmüştür.

2.5. β -Laktam Antibiyotikleri: CephC ve CA

2.5.1. β -Laktam Antibiyotiklerinin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları

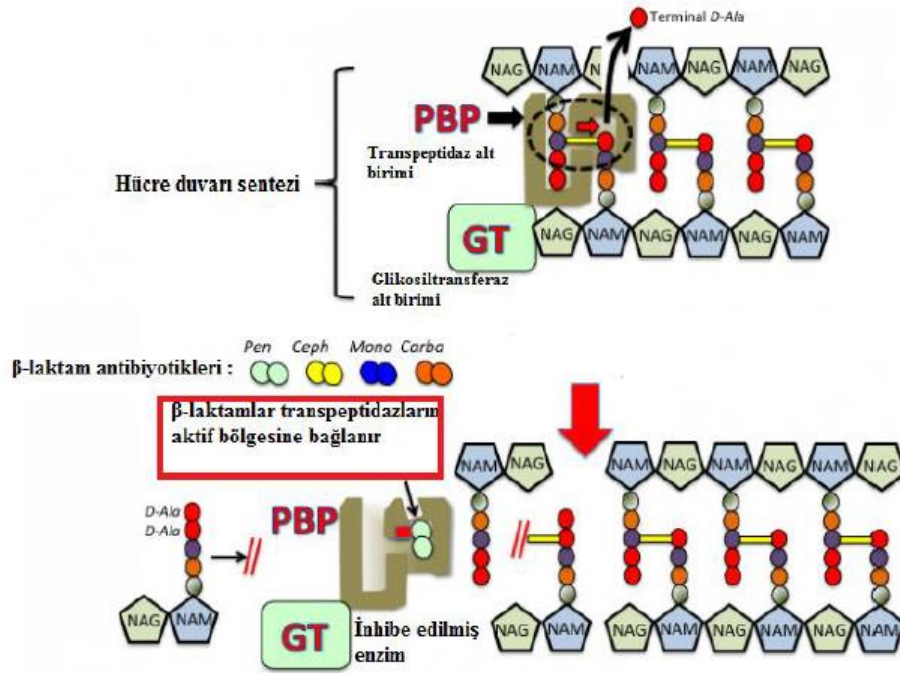
β -laktamlar, küresel olarak kullanılan antibakteriyel ajanların yarısından fazlasını oluşturan en önemli antibiyotik sınıfıdır. β -laktam antibiyotikleri, dört üyeli bir azetidion halkası içerirler. Ayrıca, penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler/penemler, monobaktamlar ve β -laktamaz inhibitörleri gibi farklı sınıflara ayrılırlar (Şekil 2.10; Mora-Ochomogo ve Lohans, 2021).



Şekil 2.10. β -laktam antibiyotikleri ve β -laktamaz inhibitörleri (Mora-Ochomogo ve Lohans, 2021)

β -laktam antibiyotiklerinin ana üreticisi konumunda aktinomisetler sınıfında *Nocardia lactamdurans*, *S. clavuligerus*, *S. chartreusis*, *Streptomyces panayaensis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces wadayamensis*, *Streptomyces jumonjinenesis*, ve *Streptomyces limanii* suşları bulunmaktadır (Thykaer ve Nielsen, 2003). β -laktam antibiyotikleri peptidoglikan sentezi sırasında hücre duvarı pentapeptidleri olan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asidi (NAM) çapraz bağlayan penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) transpeptidaz aktivitesini inhibe etmektedirler. β -laktam antibiyotikleri hücre duvarı sentezinde görev alan PBP'lerin aktif bölgelerinde yer alan ve enzimatik reaksiyonlarda önemli rol oynayan serin amino asidine bağlanır ve PBP'lerin hücre duvarı peptid zincirlerini çapraz

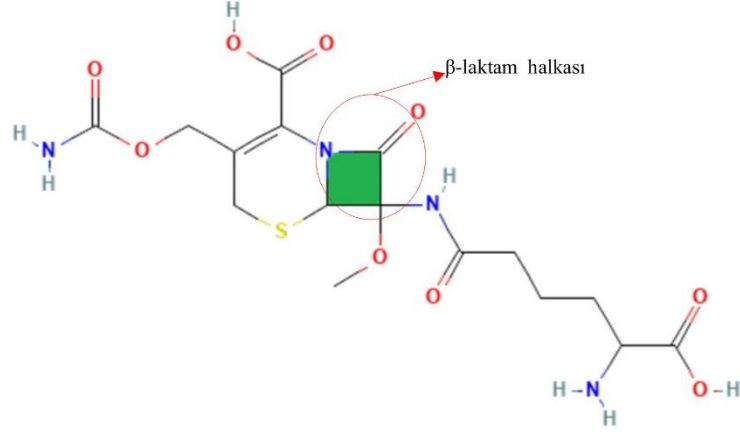
bağlama işlevini durdurmaktadırlar (Aliashkevich ve Cava 2022; Jacobs vd., 2024) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. β-laktam antibiyotiklerinin etki mekanizması Hücre duvarı sentezi ve β-laktam etki mekanizması (Deck ve Winston, 2012) https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm, Erişim: 25.05.2024)

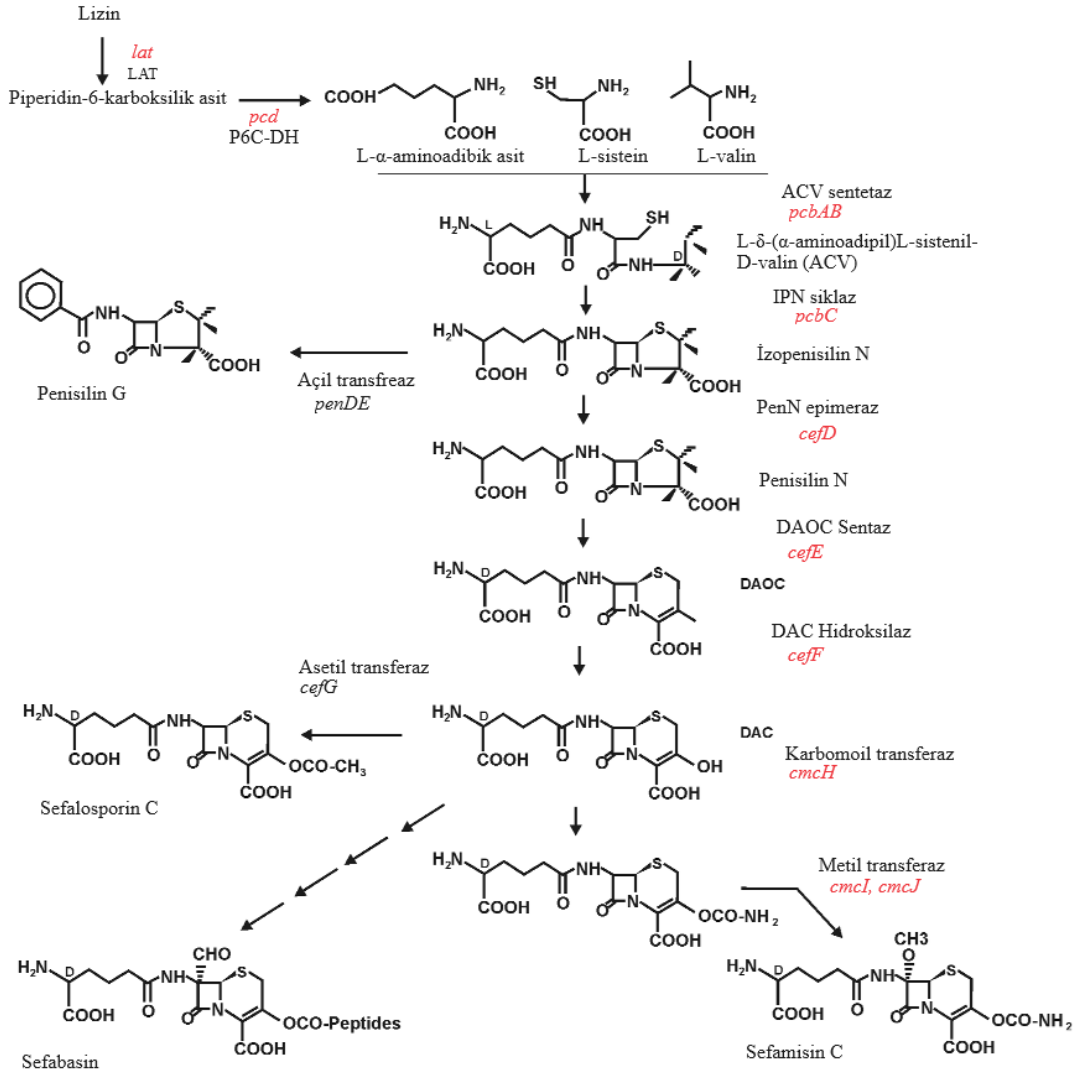
2.5.2. CephC Biyosentezi ve Gen Kümesi

CephC; *Streptomyces cattleya*, *S. clavuligerus* and *N. lactamdurans* gibi aktinomisetler tarafından doğal olarak üretilen ve tıpta en yaygın kullanılan β-laktam antibiyotiklerinden biridir (Thykaer ve Nielsen, 2003). Tüm β-laktam antibiyotiklerinde dört üyeli heterosiklik halkadan oluşan ortak bir kimyasal yapı olan β-laktam halkası mevcuttur (Şekil 2.12). CephC; β-laktam halkası ile birleşmiş altı üyeli bir sefam halkası, 7β pozisyonunda α-aminoadipoil, ve 7α pozisyonunda bir metoksi grubu içermektedir (Öster vd., 2006). Sahip oldukları bu metoksil grubu yoluyla tüm sefamisinler β-laktamazlara karşı dirençli olma özelliğini taşımaktadırlar (MacKenzie, 2007; Otur ve Kurt-Kızıldoğan, 2020). CephC nötr pH'ta oldukça stabildir ve sefoksitin, sefmetazol, temosilin ve sefotetan gibi yarı sentetik antibiyotiklerin sentezinde hammadde olarak kullanılır (Brites vd., 2013; Leite vd., 2013).



Şekil 2.12. CephC genel yapısı (Bussari vd., 2009)

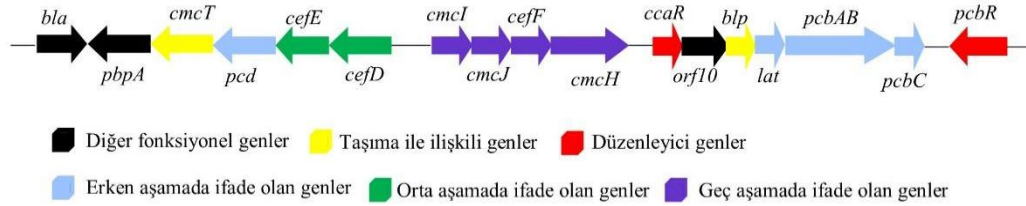
CephC biyosentezinin ilk basamağında, L-lizin, lizin-6 aminotransferaz (LAT) enzimi (*lat* geni tarafından kodlanır) aracılığı ile 1-piperidein-6-karboksilik aside (P6C) dönüştürülür. Ardından bu enzim kullanılarak *pcd* geninin kodladığı piperidein-6-karboksilat dehidrojenaz (PCD) enzimi tarafından L- α -aminoadipik asit (α -AAA) elde edilir. *pcbAB* tarafından kodlanan ACV sentetaz tarafından L- α -aminoadipik asit (α -AAA), L-sistein ve L-valin öncüllerinin kondenzasyonu ile δ -(L- α -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin (LLD-ACV) tripeptidi oluşturulur. Bu tripeptitten, *pcbC* geni tarafından kodlanan izpenisilin N (IPN) siklaz enziminin aracılığı ile β -laktam ve tiazolidin halkaları oluşturularak izopenisilin N (IPN) meydana getirilir. Daha sonra, izopenisilin N, *cefD* geninin kodladığı penisilin N (PenN) epimeraz enzimi ile D-izomeri olan penisilin N'e dönüştürülür. *cefE* geninin kodladığı deasetoksisefalosporin C (DAOC) sentaz ile penisilin N'nin yapısında değişiklik meydana getirilerek deasetoksisefalosporin C (DAOC)'nin oluşması sağlanır. DAOC'nin C-3' grubunun, *ceff* geni tarafından kodlanan DAOC hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenmesi sonucu deasetilsefalosporin C oluşur. Deasetilsefalosporin C'nin C-3 hidroksil grubuna *cmcH* geni tarafından kodlanan DAC karbamoil transferaz enziminin karbamoil grubunun eklenmesi sonucu ise O-karbamoil-deasetil-sefalosporin C (OCDAC) meydana gelir. *cmcI* geninin kodladığı sefalosporin-7- α -hidroksilaz enzimi OCDAC'ye metoksil grubunun eklenmesi için β -laktam halkasının C-7 pozisyonunu hidroksiller ve son olarak *cmcJ*'nin kodladığı sefalosporin C metiltransferaz aracılığı ile C-7'ye metil grubu transfer edilir ve CephC biyosentezi tamamlanmış olur (Şekil 2.13; Coque vd., 1995; Enguita vd., 1996; Alexander ve Jensen, 1998; Kurt, 2011).



Şekil 2.13. CephC biyosentez yolu (Liras ve Martín 2006)

S. clavuligerus genomunda, yaklaşık olarak 38 kb büyüklüğünde olan CephC gen kümesi, CA biyosentezinden sorumlu genler ile birlikte yan yana konumlanarak yaklaşık olarak 60 kb'lik bir üstküme oluşturur. CephC gen kümesi (*SCLAV_4198* ile *SCLAV_4217*), sefamisin öncüsü α-AAA'yı oluşturmak için gereken genleri (*lat*, *pcd*), deasetilsefalosporin C oluşumunda görev alan enzimleri kodlayan *pcbAB*, *pcbC*, *cefD*, *cefE*, ve *cefF* genlerini, deasetilsefalosporin C'nin modifikasyonu ile CephC'nin oluşturulmasında etkin genleri (*cmI*, *cmJ*, *cmH*), taşımada gerekli *cmcT* genini, antibiyotik direncinde geçici olarak yer alan bazı genleri (*bla*, *pcbR*, *pbp74*) ve ayrıca henüz fonksiyonu belli olmayan *orf10* geni ile SARP (*Streptomyces* Aktivatör Regülatör Proteini) düzenleyici proteini kodlayan *ccaR* geni olmak üzere 16 ayrı geni içermektedir (Hodgson vd., 1995; Song vd., 2010; Liras ve Martín; 2021). *cmH*'nin aşağısında yer

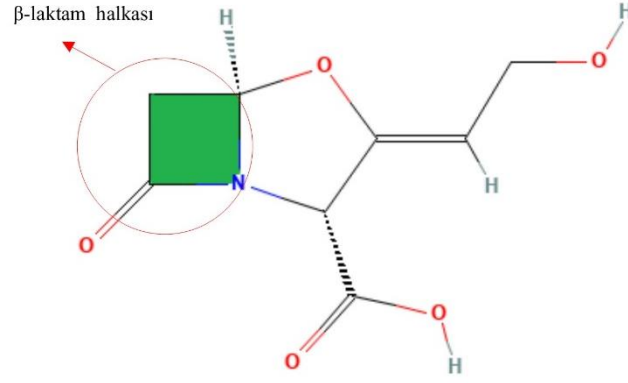
alan *ccaR* geni CephC ve CA biyosentez genlerinin ekspresyonunu kontrol etmektedir. CephC kümesindeki genlerin transkripsiyonel organizasyonunda biyosentezin erken (*lat*, *pcbAB*, *pcbC*), orta (*cefD*, *cefE*, *pcd*, *cmcT*, *pbpA*) ve geç (*cmcI*, *cmJ*, *cefF*, *cmcH*) aşamalarında görev alan enzimleri kodlayan genler polissitronik transkriptler olarak ifade edilirler. Bazı genler ise tek tek veya bisitronik halinde ifade edilmektedir (*pcbC*, *cefD-cefE*, *bla*, *pcbR*) (Şekil 2.14; Santamarta vd., 2011; Liras ve Martín, 2021).



Şekil 2.14. CephC gen kümesi (Fu vd., 2019)

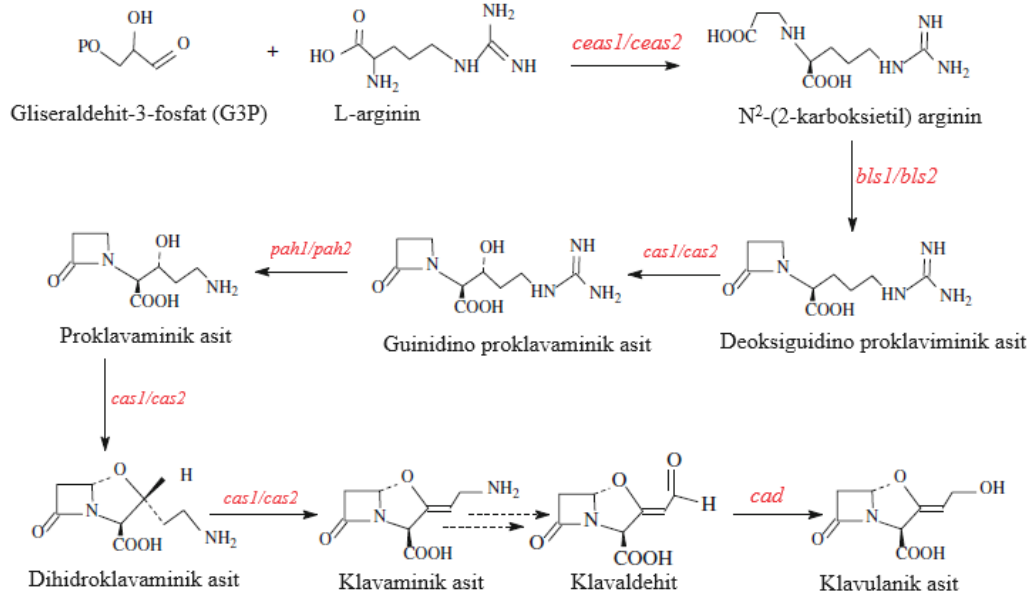
2.5.3. CA Biyosentezi ve Gen Kümesi

β -laktam antibiyotiklerin uzun süreli ve yaygın kullanımı nedeniyle birçok antibiyotiğe dirençli bakteri ortaya çıkmıştır. Bu suşların ana antibiyotik direnç mekanizması, β -laktam antibiyotiklerini parçalayan ve etkisiz hale getiren β -laktamaz üretimidir (Fu vd., 2023). CA penisilin veya sefalosporin türevleriyle kombinasyon halinde kullanılan geniş spektrumlu bir β -laktamaz inhibitörüdür (Saudagar vd., 2008). İlk olarak Higgins ve Kástner (1971) tarafından *S. clavuligerus*'da üretildiği tespit edilmiş, hemen ardından ekstraksiyonu ve β -laktam klavam grubunda sınıflandırılması yapılmıştır (Nagarajan vd., 1971) (Şekil 2.15). CA'nın moleküler çekirdeği klasik penisiline benzer; tek fark, penisilin tiyazolidin halkasındaki kükürt yerine okzazolidin halkasında oksijen olması ve C-6/C-2 gruplarındaki modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar, bileşiğin β -laktamazlar tarafından parçalanmasını önler ve çoğu class A ve D tipi β -laktamaz enzimlerinin geri dönülemez şekilde inhibe edilmesini sağlar (Baggaley vd., 1997; Özcengiz ve Demain, 2013).



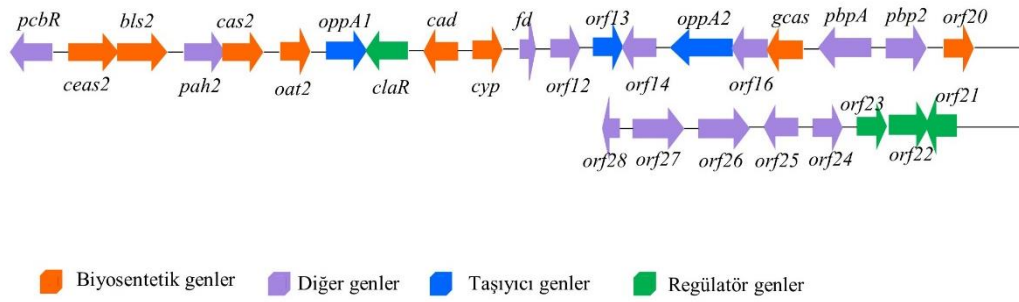
Şekil 2.15. CA genel yapısı (Saudagar vd., 2008)

S. clavuligerus dışında, CA ve aynı zamanda CephC de üreten *Streptomyces katsurahamanus* ve *S. jumonjinensis*'in genomları ve biyosentezlerine ilişkin bilgiler yakın zamanda yayınlanmıştır (AbuSara vd., 2019). CA biyosentezi, arjinin ve gliseraldehit-3-fosfat (G3P) öncüllerinin, *ceaS1/ceaS2* genleri tarafından kodlanan N²-(2 karboksietil) arjinin sentaz (CEAS) tarafından L-N²-(2-karboksi etil) arjinin ürününe dönüştürülmesi ile başlar (Li ve Townsend, 2006). Daha sonra *bls1/bls2* genlerinin bir ürünü olan β-laktam sentaz (BLS) enzimi tarafından deoksiguidino proklavaminik asit oluşturulur. Bu ara ürün; *cas1/cas2* tarafından kodlanan klavamin sentaz (CAS) enzimi aracılığı ile guinidino proklavaminik asite dönüştürülür. Guinidino proklavaminik asitteki arjinin türevi guanidino grubu, *pah1/pah2* geni tarafından kodlanan proklavaminat amidinohidroliz (PAH) enzimi ile katalize edilerek proklavaminik asit açığa çıkar. Proklavaminik asit oluşumundan sonra, CAS tarafından katalize edilen reaksiyon sonucunda klavaminik asit meydana gelir (Egan vd., 1997). Klavaminik asit, *gcas* geninin ürünü olan N-glisilklavaminikasit sentetaz (GCAS) aracılığı ile N-glisil-klavaminik asite dönüştürülür. CA yolağının geç adımları çok iyi aydınlatılmamış olmakla birlikte, CA kümesinde yer alan genlerin (*oppA1*, *oppA2*, *cyp*, *orf12*, *13*, *14*, *16*) ifadesi ile gerçekleşen reaksiyonlarla klavaldehit oluşturulur. Ve son adımda klavaldehitin, β-laktamaz inhibitör aktivitesi için gerekli olan (3S, 5S) stereokimyasının (3R, 5R) stereokimyasına dönüşümü için *cad* geni tarafından ifade edilen klavulanik asit dehidrojenaz (CAD) enzimi işlev gösterir ve CA stabil formuna dönüştürülmüş olur (Liras ve Martín, 2021) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. CA biyosentez yolu (Jnawali vd., 2011)

S. clavuligerus genomunda CA biyosentetik gen kümesi 11 gen ile CephC gen kümesine bitişik olarak konumlanmıştır (Jensen ve Paradkar, 1999). CA gen kümesi, hem CA hem de 5S klavam biyosentezi için gerekli erken aşamalarda yer alan enzimleri kodlayan genlerin yanı sıra, yalnızca CA biyosentezine özgü enzimleri kodlayan erken ve geç aşamalar olmak üzere iki gen grubuna ayrılır. Erken aşamadaki genler *ceaS*, *bls*, *pah*, *oat* ve *cas* olmak üzere CA ve 5S klavam biyosentetik yolunda ortak görev yapan genlerdir. Bu genlerin genomda *ceaS2*, *bls2*, *pah2* ve *oat2* olmak üzere homologları vardır. CephC-CA süperkümesi kromozomal DNA'da bulunurken klavam paralog gen kümesi *S. clavuligerus*'un pLSC4 megaplazmidinde bulunmaktadır (MacKenzie, 2007; Jensen, 2012). Geç aşamadaki genler (*claR*, *cad*, *cyp*, *fd*, *orf22-23*) yalnızca CA biyosentezi, taşınması ve düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. *orf21*, *orf22* ve *orf23* regülatör genler olup, aynı zamanda Orf22/23 iki bileşenli düzenleyici sistem (TCS) işlevi görmektedir (Liras vd., 1998; Jnawali vd., 2008; Vanlı, 2010) (Şekil 2.17).



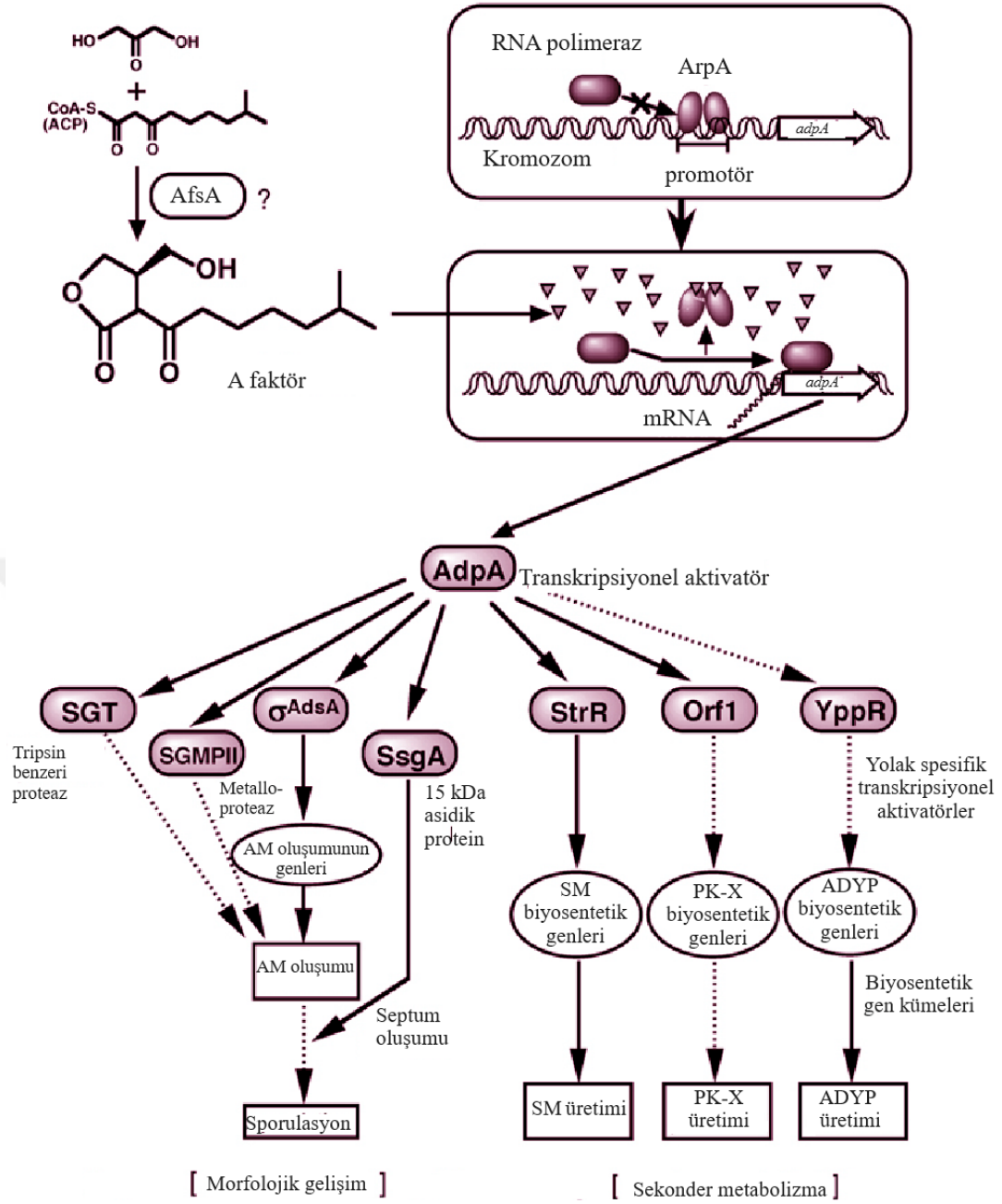
Şekil 2.17. CA gen kümesi (Fu vd, 2019)

2.6. *Streptomyces*'te Antibiyotik Üretiminin Moleküler Regülasyonu

Streptomyces'te spesifik olarak antibiyotik üretimi üzerinde etkin olan regülatör sistemler; dış çevre, besin kaynağı, biyosentetik verimlilik, gelişim aşamaları, popülasyon yoğunluğu gibi birçok faktörle yakından ilişkilidir. Regülatör genler sahip oldukları etki mekanizmaları ve konumlarına göre 3 farklı sınıfa ayrılmaktadır (Bu vd., 2019). Bunlardan birincisi, antibiyotik biyosentez kümeleri içerisinde yer alan yolak-özü regülatörlerdir (CSR'ler). CSR'ler yalnızca tek ve spesifik bir antibiyotiğin biyosentetik yolunu etkileyebilir ve o antibiyotiğin biyosentezi için anahtar görevi görerek dahil oldukları kümelerin antibiyotik biyosentez genlerini modüle edebilmektedirler (Liras ve Martín 2010; Rodríguez vd., 2013). CSR'ler spesifik bir antibiyotiğin biyosentez yolağına konumlanmış olsalar da bazı durumlarda kendilerinden uzakta bulunan antibiyotik gen kümelerini etkileyebilmekte ve dolayısıyla pleiotropik bir etki gösterebilmektedirler (Huang vd., 2005). *Streptomyces*'de CSR'lere örnek olarak *S. clavuligerus*'ta CA gen kümesinin düzenleyicisi ClaR, CephC-CA süperkümesinin düzenleyicisi CcaR ve holomisin gen kümesinin düzenleyicisi HlmJ-HlmM verilebilir (Pérez-Llarena vd., 1997; Tahlan vd., 2004; Li ve Walsh, 2010; Liras ve Martín, 2010). İkincisi; hem çoklu antibiyotik üretimi hem de morfolojik gelişim üzerinde global etki gösteren ve çoğunlukla biyosentetik gen kümelerinin dışında lokalize olmuş pleiotropik düzenleyicilerdir. *Streptomyces*'te en çok bulunan pleiotropik düzenleyiciler, bakterilerdeki baskın sinyal iletim sistemleri olan TCS'lerdir (Stock vd., 2000; Hakenbeck ve Stock, 1996). Bu sistemler, bir histidin kinaz (HK) ve bir yanıt regülatör proteini (RR) aracılığı ile gen ekspresyonunu çevresel değişikliklere uyum sağlamak için kontrol etmektedir. Bu TCS'ler bir sinyal algılandığında ve sinyal

işlendikten sonra hücrede belirli genlerin ifadesini değiştirerek antibiyotik üretimini düzenlerler (Romero-Rodríguez vd., 2015). Örneğin Fu vd. (2019); *S. clavuligerus* F613-1 suşunda, CA gen kümesine yakın konumlanmış bir TCS'yi kodlayan *cagS* ve *cagR* genlerini genomdan sildiklerinde mutant suşda CA üretiminin azaldığını bildirmişlerdir. Diğer pleiotropik düzenleyiciler, γ -butirolaktonlar (GBL'ler) adı verilen küçük moleküllerdir. En iyi karakterize edilen sinyal molekülü 1960'ların başında keşfedilmiş olan “A faktörü”dür (Kitani vd., 2011). Ve son olarak üçüncü düzenleyici sistem; pleiotropik düzenleyici genler, CSR genleri veya diğer regülatör genler üzerine etki gösteren global düzenleyicilerdir (Wei vd., 2018; Yin vd., 2019). Bu düzenleyicilere örnek olarak *Streptomyces virginiae*'da *barZ* (Pulsawat vd., 2007) ve *S. lividans*'da *ppk* (Ghorbel vd., 2006) regülatörleri verilebilir.

Genel olarak bu kompleks regülatör sistemlerin içerisinde pleiotropik düzenleyicilerden biri olan A-faktör bağımlı protein A (A-factor dependent protein A / AdpA) en iyi karakterize edilen sistemlerden biridir. AdpA; *Streptomyces* türlerinde bulunan, hücreler arası iletişimde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan, 2-izokapriloyl-3R-hidroksimetil- γ -butirolakton (A-faktör) adı verilen sinyal molekülü ile etkisini artıran ve AraC ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (Huang vd., 2022). AdpA morfolojik gelişim ve sekonder metabolizma için gerekli olan çeşitli işlevlere sahip bir dizi geni aktive ederek bir AdpA regülasyonunu oluşturur. *Streptomyces*'lerde bakterinin kompleks gelişim döngüsünde ve antibiyotik üretiminde kritik rol oynayan AdpA tarafından düzenlenen gen grubunun farklı *Streptomyces* türlerinde 100 ila 500 gen içerdiği bilinmektedir (Ohnishi vd., 2005; Higo vd., 2012; Guyet vd., 2014). Ohnishi vd. (1999) tarafından AdpA üzerinde yapılan çalışmalarda bu regülatörün *S. griseus*'ta streptomisin antibiyotiğinin üretimini etkilediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, moleküler düzeyde AdpA'nın biyosentezinin; gelişim ile doğru orantılı bir şekilde üretilen A faktörünün, *adpA* promotoruna bağlanan A faktör reseptör proteinine (ArpA) bağlanıp DNA'dan ayırması ve AdpA'nın transkripsiyonunu etkinleştirilmesi ile gerçekleştiği ve bu durumun morfolojik farklılaşma ile sekonder metabolit üretiminde rol alan genleri etkilediği tespit edilmiştir (Ohnishi vd., 2005; Horinouchi ve Beppu, 2007; Bu vd., 2019) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. *S. griseus*'da AdpA ekspresyonu ve düzenleyici basamakları (Horinouchi, 2002)

AdpA, *oriC*'ye yakın bir bölgeye bağlanarak kromozom replikasyonunu da düzenleyebilmektedir (Wolanski vd., 2012; Bu vd., 2019). Başka bir çalışmada AdpA'nın streptomisin üretiminde yolak özgü düzenleyici gen *strR*'nin transkripsiyonunu da aktive ettiği tespit edilmiştir (Hong vd., 2007). Ayrıca, *S. clavuligerus* (Lopez-García vd., 2010), *S. avermitilis* (Komatsu vd., 2010), *S. chattanoogensis* (Du vd., 2011) ve *Streptomyces roseosporus* (Mao vd., 2015) suşlarında AdpA'nın CSR'lerin kontrolü aracılığıyla antibiyotik biyosentezini pozitif

yönde regüle ettiği görülmüştür. AdpA'nın tek bir *Streptomyces* suşunda birden fazla sekonder metabolit üretimi üzerindeki farklı etkileri, *Streptomyces ansochromogenes*'de yapılan birbirinden bağımsız çalışmalarda tespit edilmiştir. Örneğin, AdpA-L (AdpA homoluğu), yolak özgü düzenleyici SnG aracılığıyla nikkomisin biosentezini aktive edebilirken (Pan vd., 2009), etkilediği CSR'ler OvmW ve OvmZ aracılığıyla oviedomisin biyosentezini baskılamaktadır (Xu vd., 2017). Yu vd. (2018)'e ait çalışmada *S. chattanoogensis* L10 suşunda AdpA ortoloğu olan AdpA_{ch} regülatörünün natamisin antibiyotiğinin biyosentezi üzerinde pleiotropik düzenleyici olduğu ifade edilerek hem aktivatör hem de baskılayıcı olarak iki yönlü bir düzenleme mekanizmasını yönettiği ortaya koyulmuştur. Bu vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *S. xiamenensis* tarafından üretilen anti inflamatuvar ve antifibrotik aktiviteye sahip bir prenil benzopiran bileşiği olan xiamenmisin ve polisiklik tetramat makrolaktamların (PTM'ler) üretiminde AdpA'nın ortoloğu olan AdpA_{Sx}'in pleiotropik etkisi araştırılmıştır. Xiamenmisin ve PTM'lerin biyosentez yolağında herhangi bir CSR bulunmamaktadır. AdpA_{Sx}'i kodlayan genin tahrip edilmesi ve aşırı ifade edilmesi şeklinde iki yönlü olarak yapılan araştırmada elde edilen verilerde, AdpA_{Sx}'in hücre gelişimini ve sporlanmayı negatif olarak etkilediği ve xiamenmisin ile PTM'lerin biyosentezini hem negatif hem de pozitif yönde olmak üzere çift yönlü olarak düzenlediği ilgili çalışmada gösterilmiştir (Bu vd., 2019).

AdpA'nın pleiotropik etkisi üzerine farklı *Streptomyces* suşlarında birçok çalışma yapıldığı görülmektedir. *S. clavuligerus* özelinde, özellikle CephC ve CA biyosentezleri olmak üzere antibiyotik üretiminin moleküler regülasyonu üzerinde CSR'ler, pleiotropik veya global düzenleyicilerin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının aydınlatılması yönünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Perez-Llarena vd., 1997; Trepanier vd., 2002; Song vd.; 2009; Fu vd., 2018; Fu vd., 2019). Örneğin, AdpA'nın CephC ve CA biyosentezi üzerindeki pozitif düzenleyici etkisine dair literatürde bir çalışma mevcuttur (López-García vd., 2010). Ancak, *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezinin moleküler düzenlenmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Grubumuza ait bir çalışmada (Baş vd., 2020), *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezi üzerinde BldG pleiotropik regülatörünün pozitif etkisi tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise Martínez-Burgo vd. (2019) *S.*

natalensis'e ait PimM regülatörünün *S. clavuligerus*'ta konstitutif heterolog ifadesinin tunikamisin kompleksinin üretiminde 5 kat artışa yol açtığını raporlamışlardır. *S. clavuligerus*'ta AdpA regülatörü ve tunikamisin biyosentezine ilişkin başka bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2.7. Mevcut Çalışma

AdpA regülatör proteini *Streptomyces* genomunda çoğu antibiyotiğin üretiminde düzenleyici bir rolü üstlenmektedir. AdpA'nın *Streptomyces* genomundan silinmesinin, CA ve CephC gen kümeleri üzerinde global bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir ancak diğer taraftan tunikamisin gen kümesinde regülatör bir genin var olmaması nedeniyle bu antibiyotiğin üretiminin regülasyonunda global bir kontrol mekanizmasının etkin olabileceği düşünülmektedir. Özellikle *Streptomyces* genomunda nadir bulunan lösün kodonunun, tunikamisin gen kümesinde yer alan *SCLAV_4287 (tunA)* ve *SCLAV_4275 (tunM)* genlerinde bulunması bu gen kümesinin translasyonel düzenlenmenin kontrolünde olabileceğini işaret etmektedir.

Bu bağlamda, mevcut çalışma ile *S. clavuligerus*'ta pleiotropik regülatör AdpA'nın özellikle tunikamisin biyosentezi başta olmak üzere CA ve CephC üretimi üzerindeki etkileri transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde tespit edilmiştir. Çalışmada öncelikle *S. clavuligerus* kromozomunda yer alan *adpA* regülatör geni, *SceI* Meganukleaz I stratejisi kullanılarak genomdan silinmiş ve mutant suş elde edilmiştir. Ardından pSET152ermE* plazmidi aracılığı ile mutant suşa tekrar *adpA* geni entegre edilerek komplement suş elde edilmiştir. Diğer taraftan *adpA* gliserol ile indüklenebilir güçlü bir promotörü içeren pSPG vektörüne klonlanarak *S. clavuligerus* genomuna aktarılmış ve çok kopyalı şekilde ifade ettirilmiştir. Yine çalışmada kullanılmak üzere bu suşun pozitif kontrolü olarak boş pSPG vektörünü içeren rekombinant *S. clavuligerus* suşu da elde edilmiştir. Yabancı suş, mutant ve diğer rekombinant suşlar kullanılarak TYD besiyerinde fermantasyon yapılmış ve 48. saatte elde edilen RNA'lar kullanılarak RNA transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir. RNA-seq çalışmasıyla CephC ve CA biyosentezinde regülatör olarak görev yapan AdpA'nın *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezi, taşıyıcı genler, diğer regülatörler üzerindeki ve genel anlamda global etkisi transkriptom verileri aracılığı ile ilk kez incelenerek global kontroldeki rolü aydınlatılmış ve biyoassay çalışmaları ile suşların CephC-CA biyosentezleri kıyaslanmıştır. RNA-seq verileri seçilen genler

kullanılarak yapılan qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Ayrıca, *adpA*'nın genomdan silinmesi ve çoklu ifadesinin tunikamisin üretimi üzerindeki etkisi biyoassay ve LC-MS/MS analizleri ile tespit edilmiştir. AdpA'nın tunikamisin gen kümesindeki bağlanma bölgelerinin analiz edildiği EMSA ile de AdpA'nın *tunA*'nın promotor dizisine bağlandığı belirlenmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bakteri Suşları, Plazmidler ve Besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmid vektörleri Tablo 3.1’de verilmiştir. *S. clavuligerus* NRRL 3585, *adpA* delesyonunun gerçekleştirildiği ana suştur. Klonlama çalışmalarında, *E. coli* DH5 α , *E. coli* ET12567/pUZ8002 ve *E. coli* BL21(DE3) suşları kullanılmıştır. Biyoassay çalışmalarında, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 ve *E. coli* ESS 22-35 suşları indikatör mikroorganizmalar olarak seçilmiştir. Genomunda *adpA* geni silinmiş mutant *S. clavuligerus* Δ *adpA* suşunun eldesinde kullanılan plazmidler pIJ12738 (Şekil EK1.1, EK1) ve pIJ12742 (Şekil EK1.2, EK1)’dir. *E. coli* ara klonlama vektörü olarak pGEM-T® Easy (Promega) (Şekil EK1.3, EK1), *S. clavuligerus* suşunun genetik manipülasyonu için güçlü bir gliserol promotorü taşıyan çok kopyalı pSPG (Şekil EK1.4, EK1) ve *E. coli*/*Streptomyces* mekik vektörü olarak pSET152ermE* (Combinature Biopharm AG) kullanılmıştır (Şekil EK1.5, EK1). AdpA proteininin saflaştırılması için His-Tag etiketi taşıyan bir ifade vektörü olan pET28-a(+) (Novogene) seçilmiştir (Şekil EK1.6, EK1). *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşunun gelişimi ve vejetatif çoğalma için Triptikaz Soya Broth (TSB; EK2), fermantasyon çalışmaları için ise TYD (EK2), sporlandırma için ISP4 (EK2) besiyerleri kullanılmış olup inkübasyon 28°C sıcaklıkta, sıvı kültürler için çentikli erlenler kullanılarak 220 rpm’lik bir çalkalama ile sağlanmıştır. Klonlamalarda kullanılan tüm *E. coli* suşları Luria broth (LB; EK2) besiyerinde 37°C’de 200 rpm’de üretilmiştir. İndikatör mikroorganizmaların gelişimleri TSB’de ve 200 rpm çalkalama koşullarında sağlanırken, inkübasyon sıcaklıkları olarak *B. subtilis* ATCC 6633 için 28°C, *K. pneumoniae* ATCC 29665 için 37°C ve *E. coli* ESS 22-35 suşu için 30°C tercih edilmiştir. Uzun süreli saklama için, *S. clavuligerus* NRRL 3585’e ait OD₆₀₀ değeri 5.0 olan kültürlerden 500 μ l alınıp, 500 μ l hacminde %87’lik gliserol ile karıştırılarak misel stokları elde edilmiştir. Diğer yandan, 16 saatlik *E. coli* kültürlerinden 2 ml alınıp santrifüj edilerek süpernatant atıldıktan sonra oluşan pellet 500 μ l LB’de çözülmüş ve 500 μ l %87’lik gliserol ile karıştırılmıştır. Tüm bakteri stokları -86°C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler

Mikroorganizma ve plazmidler	Tanımlama	Kaynak ve Referans
Mikroorganizmalar		
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585	Prototrof, CephC ve CA üreticisi	Prof. J. Piret, Northeastern Üniversitesi, ABD
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Tunikamisin indikatörü	Bignell vd. (2005)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 29665	CA indikatörü	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
<i>E. coli</i>		
ESS 22-35	β -laktama duyarlı suş	Prof. J. Piret, Northeastern Üniversitesi, ABD
DH5 α	<i>F'</i> / <i>dlacZD(lacZY A-argF)U169 supE44k-thi-1 gyrA recA1 relA1 endA1 hsdR17</i>	<i>E. coli</i> Genetik Stok Merkezi
ET12567/pUZ8002	<i>F dam 13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR lacYI / oriT</i> plazmid	<i>E. coli</i> Genetik Stok Merkezi
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B- m_B-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen, Merck (Almanya)
Plazmidler		
pGEM-T®-Easy	Amp ^R , <i>lacZ</i>	Promega (Madison Inc.)
pET28-a(+)	T7 Promotoru, His Tag, <i>lacI</i>	Novagen
pIJ12738	MCS ve pUC57-Simple_SceI'nin <i>I-SceI</i> bölgesini taşıyan pKC1132 (<i>Streptomyces</i> konjugatif vektör)	Fernández-Martínez ve Bibb (2014) JICStrepStrains
pIJ12742	<i>ermE</i> * <i>p-I-SceI</i> geni taşıyan pGM1190, <i>thi</i> ^R	Fernández-Martínez ve Bibb (2014) JICStrepStrains

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler (devam)

Plazmidler		
pSET152ermE*	<i>lacZ</i> , <i>reppuc</i> , <i>attΦC31</i> , <i>oriT</i> , <i>ermE</i> *	Combinature Biopharm AG
pSPG	<i>amp^R</i> , <i>ap^R</i> , P _{<i>glpF</i>}	Kurt vd. (2013)
pSETadpA4	<i>adpA</i> genini taşıyan pSET152ermE* plazmidi	Bu çalışma
pSETadpA5	<i>adpA</i> genini taşıyan pSET152ermE* plazmidi	Bu çalışma
pSPGadpA1	<i>adpA</i> genini taşıyan pSPG plazmidi	Bu çalışma
pSPGadpA2	<i>adpA</i> genini taşıyan pSPG plazmidi	Bu çalışma
pIJ12738ΔadpA	<i>adpA</i> genini taşıyan pIJ12738 plazmidi	Bu çalışma
pIJ12742-Km5	Kanamisin genini içeren pIJ12742 plazmidi	Bu çalışma
pGEMTadpA	<i>adpA</i> amplikonunu taşıyan rekombinant pGEM®-Teasy	Bu çalışma
pET15BL	<i>adpA</i> amplikonunu taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörü	Bu çalışma
pET16BL	<i>adpA</i> amplikonunu taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörü	Bu çalışma
Rekombinant suşlar		
<i>E. coli</i> pGEMTadpA	pGEMTadpA vektörünü taşıyan rekombinant hücre	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pET16BL	Rekombinant pET16BL vektörünü taşıyan <i>E. coli</i> DH5α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pET15BL	Rekombinant pET15BL vektörünü taşıyan <i>E. coli</i> DH5α	Bu çalışma

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler (devam)

Rekombinant suşlar		
<i>E. coli</i> pET16-BL	Rekombinant pET15BL vektörünü taşıyan <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pET15-BL	Rekombinant pET15BL vektörünü taşıyan <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSET4	Rekombinant pSETadpA4 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> DH5 α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSET5	Rekombinant pSETadpA5 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> DH5 α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSETadpA4E	Rekombinant pSETadpA4 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSETadpA5E	Rekombinant pSETadpA5 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSPG1	Rekombinant pSPG1 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> DH5 α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSPG2	Rekombinant pSPG2 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> DH5 α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSPG1E	Rekombinant pSPG1 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pSPG1E	Rekombinant pSPG1 plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pIJ12738 Δ adpA	pIJ12738 Δ adpA plazmidini taşıyan rekombinant <i>E. coli</i> DH5 α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pIJ12738 Δ adpAE	pIJ12738 Δ adpA plazmidini taşıyan rekombinant <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler (devam)

Rekombinant suşlar		
pIJ12742-Km5E	pIJ12742-Km5 plazmidini içeren <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Bu çalışma
<i>S. clavuligerus</i> comp Δ adpA1	<i>adpA</i> geni yeniden genomu entegre edilen komplement <i>S. clavuligerus</i> suşu	Bu çalışma
<i>S. clavuligerus</i> pSPGadpA1	<i>adpA</i> genini taşıyan pSPG plazmidini içeren rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
<i>S. clavuligerus</i> pIJ12738 Δ adpA-1	pIJ12738 Δ adpA plazmidini içeren rekombinant <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
<i>S. clavuligerus</i> Δ adpA1	<i>adpA</i> geni silinmiş <i>S. clavuligerus</i> mutant suşu	Bu çalışma
<i>S. clavuligerus</i> Δ adpA2	<i>adpA</i> geni silinmiş <i>S. clavuligerus</i> mutant suşu	Bu çalışma

3.2. Tamponlar ve Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan tampon ve solüsyonların kimyasal içerikleri ile hazırlanışları EK3’de listelenmiştir.

3.3. Kimyasal ve Enzimler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve enzimler EK4’de listelenmiştir.

3.4. *S. clavuligerus* NRRL 3585 Suşundan Genomik DNA İzolasyonu

S. clavuligerus NRRL 3585 suşunda genomik DNA izolasyonunda tuz çöktürme metodu kullanılmıştır (Pospiech ve Neumann, 1995). -86°C’de muhafaza edilen *S. clavuligerus* stoğundan 100 µl alınıp 50 ml TSB besiyerine ekilmiş ve ardından 28°C’de 220 rpm’de 48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen kültürden 30 ml alınarak +4°C’de 6.000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine 5 ml SET tamponu (EK3) eklenerek vorteks yapılmıştır. Ardından karışıma 100 µl lizozim enzimi (20 µg/ml, EK4) ilave edilmiş ve 1 saat boyunca hücre duvarının parçalanması için 37°C’de inkübasyon sağlanmıştır.

İnkübasyon sonrası karışıma 140 µl proteinaz K enzimi (20 µg/ml, EK4) ve 600 µl %10'luk SDS (EK4), 2 ml hacminde 5 M NaCl (EK4) ve 5 ml kloroform (EK4) eklenmesinin ardından çözelti karıştırılmıştır. 20°C'de ve 30 dk inkübasyon yapıldıktan sonra karışım 6.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant alınmış ve genomik DNA'nın çökmesi için üzerine 0.6X hacimde izopropanol (EK4) eklenmiştir. Hafif bir şekilde yapılan karıştırma işleminden sonra görülür hale gelen DNA sıvıdan alınmış ve falkon tüp içerisinde 5 ml hacmindeki %70'lik etanol (EK4) ile yıkanmıştır. 6.000 rpm'de yapılan 1 dk santrifüj sonrasında etanol atılmış ve DNA kurumaya bırakılmıştır. Ardından, genomik DNA üzerine 500 µl TE tamponu (EK3) eklenerek 55°C'de inkübasyon ile DNA'nın tampon içerisinde homojen şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen DNA +4°C'de saklanmıştır.

3.5. *E. coli* Suşlarından Plazmid DNA İzolasyonu

E. coli suşlarından manuel plazmid izolasyonunda Hopwood vd. (1985)'nin optimize ettiği prosedür uygulanırken kit ile izolasyonda Nucleospin (Macharey Nagel) plazmid izolasyon kiti (EK4) kullanılmıştır. Manuel izolasyon yönteminde katı kültürler kullanılmış ve steril pipet ucu ile 1 cm²'lik alandan alınan hücreler 2 mg/ml lizozim enzimi (EK4) içeren 100 µl STE tamponunda (EK3) vorteks yapılarak süspanse edilmiştir. Ardından hücre duvarının parçalanması için 37°C'de ve 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonlandıktan sonra hücreler buz içerisinde 20 dk soğutulmuştur. Örneklerin üzerine alkali bir çözelti olan liziz solüsyonundan (EK3) 60 µl eklenmiş ve vortekslenmiştir. Önce oda sıcaklığında 10 dk, sonra 70°C'de 10 dk inkübasyon yapılmıştır. Tüplerin üzerine 160 µl fenol-kloroform (1:1) (EK3) solüsyonu eklenerek vorteksleme sonrasında süt beyazı bir renkte bir karışım elde edilmiştir. Örneklerin +4°C'de 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrasında faz ayrımı sağlanarak üstteki tabakada bulunan sıvı kısımdan 20 µl alınıp %0.8'lik konsantrasyonda hazırlanmış agaroz jele yüklenmiştir ve elektroforez ile ayrımlanmıştır.

E. coli suşlarından Nucleospin plazmid izolasyon kiti (Macharey Nagel) kullanılarak yapılan plazmid DNA izolasyonunda, plazmide uygun seçici antibiyotigi içeren LB besiyerinde 37°C'de 16 saat inkübe edilen bakteri kültüründen 2 ml alınıp 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra

pelletten kit prosedüründe belirtilen şekilde plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilerek yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edilmiştir.

3.6. Kompetan *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu

Kompetan hücre hazırlığında Hanahan vd. (1983) tarafından tanımlanan RbCl₂ (EK4) yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle, -86°C'de muhafaza edilen *E. coli* DH5α, *E. coli* ET12567/pUZ8002 ve/veya *E. coli* BL21 stoklarından LB agar (EK2) besiyerine çizgi ekim yapılarak hücreler canlandırılmış ve elde edilen tek kolonilerden seçilerek, gerekli ise uygun konsantrasyonda antibiyotik eklenen 10 ml LB besiyeri içerisine ekilmiştir. 37°C ve 200 rpm'de 16 saat inkübasyon sonrası üreyen bakteri kültüründen 1 ml alınarak uygun antibiyotik içeren 100 ml LB besiyerine aşılanmıştır. 37°C ve 200 rpm'de inkübasyon sırasında bakteri OD₆₀₀ değeri 0.4 ile 0.7'ye ulaşmaya kadar düzenli aralıklarla bakteri yoğunluğu ölçülmüştür. İstenilen OD₆₀₀ değeri elde edildikten sonra öncelikli olarak kültür 15 dk buz içerisinde bekletilmiş ve ardından 3.500 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Örneğin süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 20 ml soğuk Tampon 1 (EK3) çözeltisi içerisinde süspansiyon edilmiş ve aynı şekilde santrifüj yapılarak tampon 1 pelletten uzaklaştırılmıştır. Ardından, pellet üzerine 8 ml soğuk tampon 2 (EK3) çözeltisinden eklenerek nazikçe karıştırılmıştır ve 100 µl'lik eşit hacimlere bölünerek 30 dk buz içerisinde bekletilmiştir. Ardından, tüpler sıvı nitrojende dondurulmuş ve -86°C'de muhafaza edilmiştir.

Taze hazırlanmış *E. coli* kompetan hücrelerinin transformasyonunda Sambrook vd. (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Öncelikle -86°C'de saklanan 100 µl'lik *E. coli* kompetan hücreleri buz içerisinde 10 dk bekletilerek çözülmesi sağlanmıştır. Ligasyon ürünü ya da 1-10 µl hacimde plazmid DNA (1-50 ng) buz içerisinde yavaşça eritilen kompetan hücrelerin üzerine eklenmiş ve hücrelere zarar vermeden yavaş hareketler ile pipetaj yapılmıştır. Tüpler 20 dk buzda inkübe edilmiş ve ardından 42°C'de 1 dk ısı şoku uygulanmıştır. Isı şoku uygulaması sonrasında tüpler hızlıca buz içerisine alınıp 5 dk bekletilmiştir. Hücre-DNA karışımının üzerine 900 µl SOC besiyeri (EK2) eklenmiş ve 37°C'de, 1 saat ve 150 rpm'de hücreler rejenerasyon için inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 100 µl SOC besiyerinde çözülmüştür. Hücre çözeltisi seçici antibiyotik içeren LA besiyerine yayma ekim

yöntemi ile yayılmış ve koloni oluşumunun gözlemlenmesi için 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.7. Konjugasyon Reaksiyonu

E. coli'den ve *S. clavuligerus*'a arasında konjugasyon reaksiyonu ile plazmid DNA aktarımı için Flett vd. (1997) tarafından optimize edilen metot, üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Donör olarak ilgili plazmidi içeren metilasyondan yoksun *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri kullanılmıştır. *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri pUZ8002 ve *dam*⁻ mutasyonunun devamı için kanamisin (Kan) (25 µg/ml) ve kloramfenikol (Cm) (25 µg/ml) (EK4), bunun yanı sıra aktarım yapılmak istenilen plazmide özgü seçici antibiyotiği içeren 10 ml'lik LB besiyerine ekilmiş ve 37°C ve 200 rpm'de 16 saatlik inkübasyon yapılmıştır. Elde edilen gece kültürünün 1 ml'si 100 ml LB besiyerine (antibiyotik içeren) ekilerek OD₆₀₀ değeri 0.4-0.6 aralığına ulaşmaya kadar inkübe edilmiştir. Ardından bakteri kültürü 3.500 rpm'de, 4°C'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır ve iki kere eşit hacimde antibiyotik içermeyen taze LB besiyeri ile aynı koşullarda yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından, pelletler 1/10 hacmindeki LB'de çözülmüştür. Triptikaz Soya Agar (TSA; EK2) besiyerinde üreyen 48 saatlik *S. clavuligerus* NRRL 3585 kültüre %20 konsantrasyonunda ve 5 ml hacminde gliserol eklenerek miseller besiyerinin yüzeyinden toplanmış ve homojenize edilmiştir. Bu karışımın 500 µl'si 500 µl *E. coli* hücreleri ile karıştırılmış ve bu karışım 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen *E. coli*-*S. clavuligerus* çökeltisi 200 µl LB'de çözülmüş ve 10 mM CaCl₂ (EK4) içeren Mannitol-Soya Unu-Agar (MSA; EK2) üzerine yayılmıştır. 28°C'de 16 saatlik inkübasyon sonrasında MSA besiyerleri üzerine *E. coli* üremesinin baskılanması için 0.5 mg/ml nalidiksik asit ve ekskonjugantların seçimi için 1 mg/ml seçici antibiyotik içeren 1 ml çözelti yayılmıştır. İnkübasyon 30°C'de 3-7 gün boyunca devam etmiştir.

3.8. Mutant *S. clavuligerus* Suşlarının Elde Edilmesi

SCLAV_1957 (*adpA*) geninin delesyonu için Fernández-Martínez ve Bibb (2014) tarafından geliştirilen *I-SceI* meganükleaz yöntemi uygulanmıştır. *I-SceI* meganükleaz; *Saccharomyces cerevisiae* mitokondri DNA'sında kodlanan, çift zincirli DNA'yı 18 bp uzunluğundaki bir tanıma dizisinden (TAGGGATAACAGGGTAAT) kesebilen monomerik ve 235 amino asitlik bir

endonükleazdır. 18 bç'lik bu tanıma dizisi şu ana kadar tanımlanmış hiçbir aktinomiset genom dizisinde bulunmadığı için *Streptomyces* sp. suşlarındaki gen delesyonu çalışmalarında güvenle kullanım avantajı sağlamaktadır. *I-SceI* meganükleaz, 18 bç'lik tanıma dizisinde çift zincir kırılmasına neden olarak, hücrenin hayatta kalabilmek için kromozom onarımının devreye girmesini ve bu amaçla homolog rekombinasyon olayının gerçekleşmesini mümkün kılar (Fernández-Martínez ve Bibb, 2014). Yöntemin uygulama aşamasında; *I-SceI* hedef sekansını içeren pIJ12738 (EK1) ve kodon optimize *I-SceI* meganükleazı içeren pIJ12742 (EK1) plazmidleri kullanılmıştır.

Prosedürün aşamaları aşağıda verilmiştir:

(i) *adpA* geninin *SCLAV_1956* ve *SCLAV_1957* arasındaki intergenik bölgesini kapsayan 2419 bç'lik 5' yukarı ve *ornA* genini de kapsayan *adpA-SCLAV_1959* genleri arasında kalan 2987 bç'lik 3' aşağı bitişik (flanking) bölgeleri CloneAmp™ HiFi PCR Premix (EK4; TAKARA) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır.

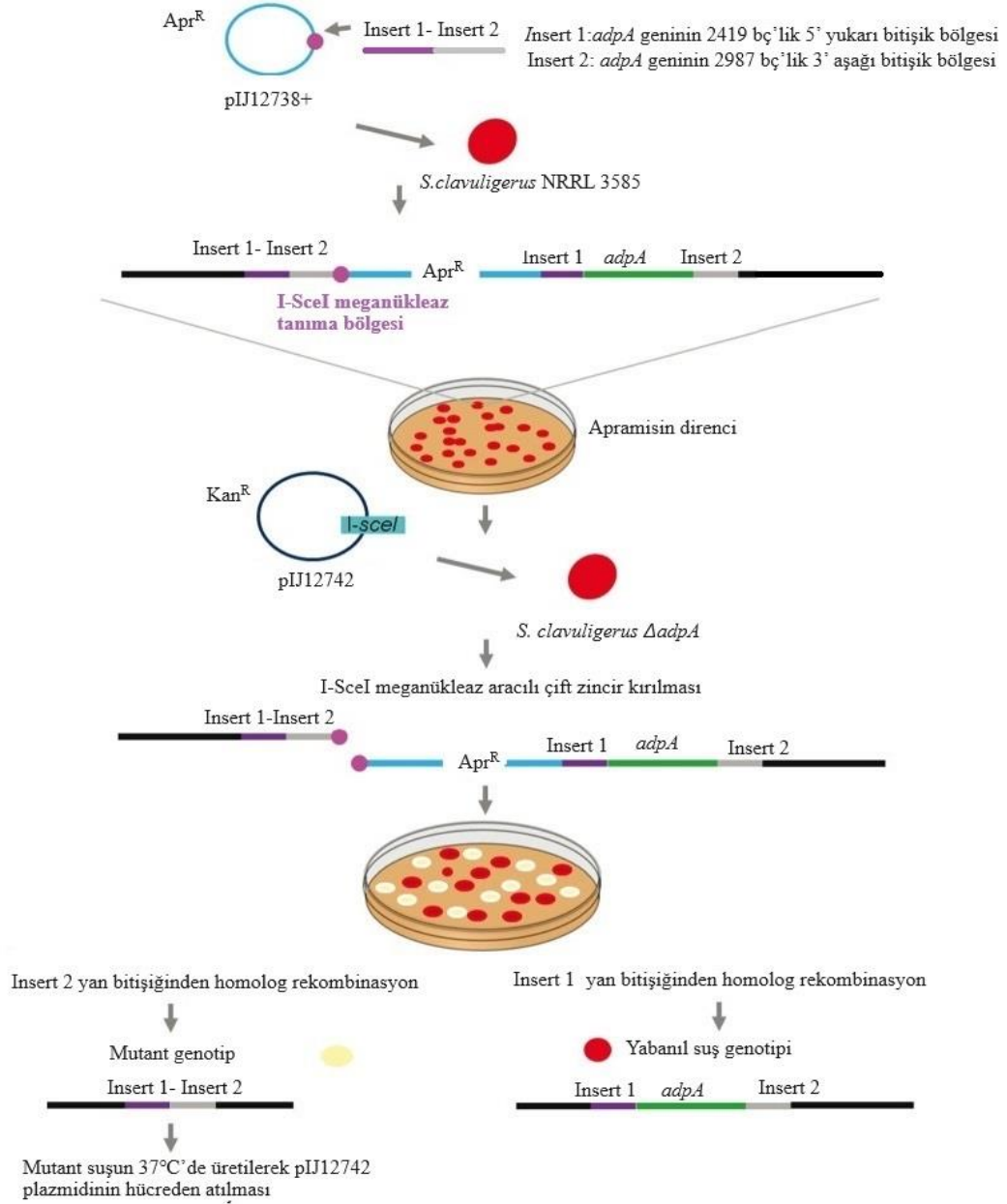
(ii) In-Fusion® HD Cloning Kit (EK4; TAKARA) ile iki amplikon birbiri ardına bitişik füzyon halinde pIJ12738 plazmidine klonlanıp *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiştir.

(iii) Konjugasyon reaksiyonu için rekombinant pIJ12738 vektörü *E. coli* DH5α'dan *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyon ile aktarılmıştır.

(iv) Konjugasyon reaksiyonu ile rekombinant *E. coli* ET12567/pUZ8002'den *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşunun kromozomuna rekombinant pIJ12738'in entegrasyonu sağlanmıştır (tek kross over).

(v) pIJ12742Km5 vektörünün rekombinant *S. clavuligerus* NRRL 3585 hücrelerine konjugasyonunu yapılmış ve kromozomdaki *I-SceI* tanıma bölgesinde çift zincir kırığı oluşturulmuştur.

(vi) Elde edilen ekskonjugantlarda yer alan pIJ12742Km5 plazmidinin hücreden atılması için hücreler sporlandırılıp 37°C'de üretilmiş ve *kan^S/apr^S* genotipli koloniler seçilmiştir. *S. clavuligerus*'da *adpA* geninin delesyonu PCR ve Southern Blot yöntemleri ile doğrulanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *I-SceI* Meganükleaz yöntemi ile *S. clavuligerus* genomunda *adpA* geninin silinmesine dair şematik gösterim (Fernández-Martínez ve Bibb, 2014'den uyarlanmıştır)

3.9. Restriksiyon Endonükleaz Kesimleri

DNA'nın manipülasyonu işlemlerinde, klonlama ve doğrulama çalışmalarında çeşitli restriksiyon endonükleazlar (EK4) kullanılmıştır. Enzim kesim reaksiyonları üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.10. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Protein örneklerinin moleküler büyüklüğüne göre ayrımlanabilmesi için poliakrilamid jel elektrofrez (PAGE) kullanılmıştır.

3.10.1. Native PAGE

Elektroforetik hareket değişim deneyinde (EMSA'da) rekombinant proteinler %12'lik native (denatüre olmayan) poliakrilamid jellerde ve Tris Borat EDTA (TBE) tamponunda (EK3) yürütülmüştür (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Native poliakrilamid jellerin hazırlanışı

Jel içeriği	Miktar
Monomer konsantrasyonu	%12
Akrilamid/bis (30:1)	1.670 ml
dH ₂ O	7.13 ml
0.5X TBE	0.5 ml
% 43 Gliserol	600 µl
% 10 Amonyum persülfat (APS)	90 µl
TEMED	5 µl
Total Hacim	10 ml

3.10.2. SDS-PAGE

Rekombinant proteinlerin analizi için poliakrilamid jel Tablo 3.3'de verilen kompozisyonda hazırlanıp 16 mA' de Mini-Protean jel aparatı (Biorad) kullanılarak SDS-PAGE ile yürütülmüştür (Laemmli, 1970).

Tablo 3.3. SDS-poliakrilamid jellerin hazırlanışı

	İstifleme jeli	Ayırma jeli
Monomer konsantrasyonu	%4.5	%12
Akrilamid/bis	1.3 ml	4 ml
dH ₂ O	6.1 ml	3.35 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml	-
% 10 (w/v) SDS	100 µl	100 µl
% 10 APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
Total hacim	10 ml	10 ml

3.10.3. Southern Blot Deneyi İçin % 6'luk PAGE

Southern blot deneylerinde PCR ürünleri %6'luk native poliakrilamid jellerde yürütülmüştür (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. %6'luk poliakrilamid jel kompozisyonu

Kimyasal	Hacim (ml)
29:1 Akrlamid	2.4 ml
Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu (1X)	12 ml
APS (%10)	200 µl
TEMED	10 µl

3.11. Poliakrilamid Jellerin Boyanması

3.11.1. Native-Poliakrilamid Jellerin Boyanması

EMSA deneyinde kullanılan DNA-protein kompleksleri, 1/100.000 oranında seyreltilmiş SYBR Green I nükleik asit jel boyası (EK4) içeren 0.5X TBE tamponu içinde hafifçe çalkalanarak (80 rpm) boyanmıştır.

3.11.2. SDS-PAGE Jellerin Boyanması

SDS-PAGE jellerinde yürütülen protein bantlarının gözlenmesi için jeller taze hazırlanmış 50 ml Coomassie Blue R-250 (EK3)'de 1 saat hafif çalkalama ile inkübe edilmiş ve daha sonra 2-3 saat boyunca boya temizleme çözeltisinde (EK3) bekletilerek durulanmıştır.

3.12. Ligasyonlar

Elektroforez işlemi sonrası ayrımlanan DNA bantları jelden kesilerek Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen DNA bantları, NucleoSpin Jel ve PCR Clean-up (EK4; Macharey Nagel) kiti kullanılarak jelden arındırılmış ve elde edilen DNA konsantrasyonu NanoDrop® ND-2000 (Thermo Scientific™) cihazıyla ölçülmüştür. PCR ürünlerinin doğrusal pIJ12738 vektörüne ligasyonunda In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA) (EK4) kullanılmış ve Tablo 3.5'de verilen prosedür uygulanmıştır.

Tablo 3.5. İnsertlerin pIJ12738 plazmidine ligasyonu için uygulanan içerik

İçerik	Hacim (µl)
Insert 1 (21.3 ng/µl)	3
Insert 2 (61.7 ng/µl)	1
Doğrusal pIJ12738 plazmidi (23.3 ng/µl)	3
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2
dH ₂ O	1
Toplam Hacim	10

S. clavuligerus ΔadpA hücrelerin elde edilmesinde antibiyotik seçiliminin çok daha kolay olarak yapılabilmesi için *I_SceI* genini içeren pIJ12742 vektörüne, pTC192-Km plazmidinden (Lopez-García vd., 2010) EcoRI (Thermo Scientific™) (EK4) enzimi ile kesilerek elde edilmiş olan kanamisin direnç geni (*aphII*) ligasyon reaksiyonu ile transfer edilmiştir. Ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmeden önce yapışkan uç oluşturan EcoRI (enzimi ile kesilen *aphII* geninin, küt uç oluşturan BlnI (Thermo Scientific™) (EK4) enzimi ile doğrusal hale getirilen pIJ12742 vektörüne bağlanabilmesi için fragment uyumsuzluğunun giderilmesi gerekmektedir. Bu sebeple *aphII* geninde mevcut olan yapışkan uçların enzim muamelesi ile küt uç haline getirilmesinde T4 DNA Polimeraz (Thermo Scientific™) (EK4) enzimi kullanılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. *aphII* genine T4 DNA Polimeraz (Thermo Scientific™) uygulanan reaksiyonun içeriği

İçerik	Hacim (µl)
<i>aphII</i> geni (9.6 ng/µl)	13.8
5X reaksiyon tamponu	5
dNTP (10 mM)	1
T4 DNA Polimeraz (1U/ µl)	0.2
Toplam Hacim	20

Reaksiyon; 11°C'de 20 dk ve ardından 75°C'de 10 dk inkübe edilir.

Doğrusal pIJ12742 plazmidi, self ligasyonu engellemek amacıyla Alkalın fosfataz (Thermo Scientific™) enzimi (EK4) ile muamele edilmiş ve uçlarındaki fosfat grupları uzaklaştırılmıştır (Tablo 3.7). Ardından ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.8).

Tablo 3.7. pIJ12742 plazmidine Alkalın fosfataz enzimi (Thermo Scientific™) uygulanan reaksiyonun içeriği

İçerik	Hacim (µl)
Doğrusal pIJ12742 plazmidi (49.8 ng/µl)	16
10X Alkalın Fosfataz tamponu	2
FastAP™ Termosensitif Alkalın Fosfataz (1U/ µl)	1
dH ₂ O	1
Toplam Hacim	10.7

Reaksiyon; 37°C'de 10 dk ve ardından 75°C'de 5 dk inkübe edilir.

Tablo 3.8. pIJ12742 plazmidine *aphII* geninin aktarılması için uygulanan ligasyon içeriği

İçerik	Hacim (µl)
<i>aphII</i> fragmenti (9.6 ng/µl)	6.7
10X ligasyon tamponu	2
Alkalın Fosfataz uygulanmış doğrusal pIJ12742 plazmidi (49.8 ng/µl)	1
T4 DNA ligaz (5 U/µl)	1
dH ₂ O	-
Toplam Hacim	10.7

Çalışmada kullanılan pGEM®-T easy ve pSET152ErmE* plazmidlerine DNA fragmentlerinin yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon reaksiyonları sırasıyla Tablo 3.9 ve Tablo 3.10'da, pET28-a(+) vektörüne gen aktarımında uygulanan ligasyon reaksiyonu ise Tablo 3.11'de detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 3.9. pGEM®-T Easy plazmidine *adpA*'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği

İçerik	Hacim (µl)
<i>adpA</i> ampikonu (50.7 ng/µl)	4.65
T4 DNA ligaz (5 U/µl)	1
pGEM®-T Easy vektör (50 ng/µl)	1
T4 DNA ligaz tamponu (2X)	5
dH ₂ O	-
Toplam Hacim	10

Tablo 3.10. pSET152ErmE* plazmidine *adpA*'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği

İçerik	Hacim (µl)
<i>adpA</i> amplikonu (23.3 ng/µl)	1.9
T4 DNA ligaz (5 Weiss U/µl)	1
pSET152ErmE* vektörü (43.4 ng/µl)	1
T4 DNA tamponu (10X)	2
dH ₂ O	4.1
Toplam Hacim	10

Tablo 3.11. pET28-a(+) plazmidine *adpA*'nın yerleştirilmesi için uygulanan ligasyon içeriği

İçerik	Hacim (µl)
pGEMT-1'den kesilen <i>adpA</i> amplikonu	1
T4 DNA ligaz (5 Weiss U/µl)	1
pET28-a(+) vektörü (50 ng/µl)	4
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	2
dH ₂ O	2
Toplam Hacim	10

3.13. Primer Dizaynı

National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanında kayıtlı GenBank erişim numaralarından ulaşılan dizilere göre ve Primer3 plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) programı kullanılarak primerler tasarlanmıştır. *S. clavuligerus* Δ*adpA* mutantının elde edilmesi için yapılan klonlama çalışmasında, elde edilen PCR ürünleri ile doğrusal hale getirilmiş vektörün uçlarındaki 15 bç'lik örtüşmenin gerçekleşmesi için gerekli primerler TAKARA In-fusion cloning programı (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-tools>) kullanılarak dizayn edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm primerler Sentebiolab (Ankara) firmasına sentezlettirilmiştir. İlgili primer dizileri ve özellikleri EK5'de verilmiştir.

3.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.14.1. Standart PCR Reaksiyonları

S. clavuligerus $\Delta adpA$ mutantının elde edilmesinde, *adpA* geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerinin (sırasıyla Insert 1 ve Insert 2) çoğaltılması ve rekombinasyonun doğrulanması için füzyon fragmentin ($\Delta adpA$ -füzyon) putatif rekombinant plazmidlerde çoğaltılmasında Tablo 3.12'de verilen içerik ve koşullar altında CloneAmp™ HiFi PCR Premix (TAKARA) kullanılarak PCR yapılmıştır.

Tablo 3.12. *adpA* geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerini çoğaltmada kullanılan PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon içeriği	Miktar (μ l)	PCR Koşulları
CloneAmp™ HiFi PCR Premix Mastermix	12.5	
Kalıp DNA (100 ng)	1	98°C 10 sn
İleri primer (10 μ M)	1.25	68°C 1dk 20 sn } #30
Geri primer (10 μ M)	1.25	
DMSO	1	
dH ₂ O	8	

pIJ12742 vektörüne *aphII* geninin yerleştirilmesi sonucu elde edilen rekombinant plazmidlerin doğrulanmasında ise Tablo 3.13'de verilen PCR içerik ve koşulları kullanılmıştır.

Tablo 3.13. *aphII* geninin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan reaksiyon içeriği ve koşulları

PCR içeriği	Hacim (μ l)	PCR koşulları
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5U/ μ l)	0.5	95°C 10 dk
10X standart <i>Taq</i> reaksiyon tamponu	2.5	95°C 30 sn
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	52°C 30 sn
aphII_F (10 μ M)	1.25	72°C 55 sn
aphII_R (10 μ M)	1.25	68°C 5 dk
Kalıp DNA (100 ng)	1	+4°C ∞
dNTP (10 mM)	0.5	
DMSO	1	
dH ₂ O	15.5	

I-SceI genini içeren ve seçim markörü olarak kanamisin geninin yer aldığı pIJ12742Km5 vektörünün *S. clavuligerus*'a konjugasyonla aktarılması için öncelikle sıkı restriksiyon bariyer sisteminin aşılması gerekmektedir. Bu amaçla metilasyondan yoksun *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine ilgili vektörün transformasyon ile aktarılması sonucu elde edilen kolonilerin doğrulanmasında hem Tablo 3.13'de verilen *aphII* geninin PCR reaksiyonu hem de Tablo 3.14'de verilen SceI-check primerlerinin (EK5) kullanıldığı PCR reaksiyonu uygulanmıştır.

Tablo 3.14. SceI-check primerleri yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları

PCR içeriği	Hacim (µl)	PCR koşulları	
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5	95°C	5 dk
10X Standart <i>Taq</i> reaksiyon tamponu	2.5	95°C	15 sn
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	55°C	30 sn
SceI_check_F (10 µM)	1.25	72°C	42 sn
SceI_check_R (10 µM)	1.25	68°C	5 dk
Kalıp DNA (100 ng)	1	+4°C	∞
dNTP (10 mM)	0.5		
DMSO	1		
dH ₂ O	15.5		

adpA geni silinmiş *S. clavuligerus* Δ*adpA* suşların belirlenmesi için elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak, hem *adpA* geninin primerleri ile hem de genin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerinden tasarlanan *adpA* doğrulama primerleri (EK5) ile Tablo 3.15 ve Tablo 3.16'da verilen PCR içerik ve koşulları altında iki ayrı PCR gerçekleştirilmiştir. Southern blot analizinde prob hazırlığında da *adpAD_F* ve *adpAD_R* primerleri (EK5) ile PCR yapılmıştır.

Tablo 3.15. *adpA* primerleri ile yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları

PCR içeriği	Hacim (µl)	PCR koşulları	
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U/ µl)	0.5	95°C	5 dk
10X standart <i>Taq</i> reaksiyon tamponu	2.5	95°C	15 sn
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	68°C	30 sn
adpA_F (10 µM)	1.25	72°C	1.12 sn
adpA_R (10 µM)	1.25	68°C	5 dk
Kalıp DNA (100 ng)	1	+4°C	∞
dNTP (10 mM)	0.5		
DMSO	1		
dH ₂ O	15.5		

Tablo 3.16. *adpA* doğrulama primerleri ile yapılan PCR reaksiyonunun içerik ve koşulları

PCR içeriği	Hacim (µl)	PCR koşulları	
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5	95°C	5 dk
10X standart <i>Taq</i> reaksiyon tamponu	2.5	95°C	15 sn
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	55°C	30 sn
adpAD_F (10 µM)	1.25	72°C	1.31 sn
adpAD_R (10 µM)	1.25	68°C	5 dk
Kalıp DNA (100 ng)	1	+4°C	∞
dNTP (10 mM)	0.5		
DMSO	1		
dH ₂ O	15.5		

3.14.2. Koloni PCR

Transformasyon sonrası doğrulama çalışmalarında tek bir koloniye ait küçük bir parça 1 µl Triton X-100 (EK4) içeren 50 µl dH₂O içinde çözülmüş ve 94°C'de 45 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapılan çözeltilerin süpernatant kısmından 2-3 µl alınarak standart PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

3.15. Dizileme Reaksiyonu

DNA dizileme hizmeti Genoks Şirketi (Ankara)'nden sağlanmıştır.

3.16. Southern Blotlama

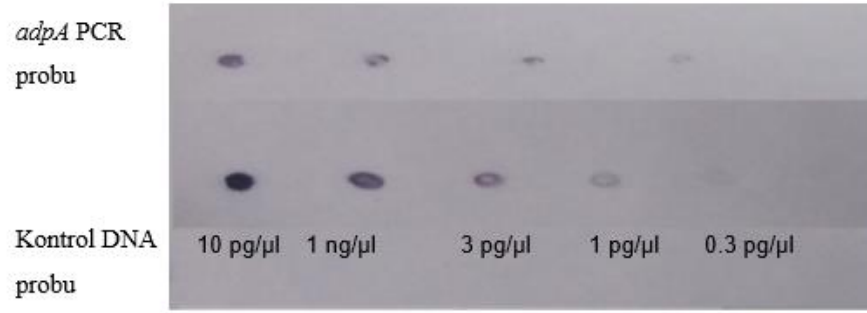
3.16.1. Prob Hazırlığı ve Prob Verimliliğinin Belirlenmesi

Digoksinin (DIG) etiketli DNA problemleri, *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomunda *adpA* geni ve 5'-3' dizilerine ait toplam 1514 bç'lik bölgeden rastgele etiketleme yöntemine göre elde edilmiştir (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche, UK). Üretici firmanın prosedürüne uygun olarak elde edilen PCR ürünü PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmış ve konsantrasyonu 60.7 ng/μl olarak elde edilmiştir. 15 μl'lik PCR ürünün denatürasyonu için DNA 99°C'de 10 dk inkübe edilerek Tablo 3.17'de verilen içerik ve koşullarda prob hazırlanmıştır.

Tablo 3.17. Prob oluşturma prosedürü

İçerik ve koşullar	Hacim (μl)
PCR ürünü (60.7 ng/μl)	15
99 °C'de 10 dk inkübasyon	
Hekzanükleotit karışımı (10x)	2
dNTP işaretleme karışımı	2
Klenow işaretleme enzimi (5 U/μl)	1
37°C'de 20 saat inkübasyon	

Prob verimliliğinin belirlenmesi için yapılan analizde kontrol olarak kit içeriğinde bulunan etiketli kontrol plazmidi DNA pBR328 (BamHI ile doğrusallaştırılmış) kullanılmıştır. Öncelikle pBR328 (5 ng/μl) ve etiketli prob (60 ng/μl), kitte yer alan seyreltme solüsyonu (Vial 3) ile 1 ng/μl'ye seyreltilmiştir. Bu seyreltme, 10 pg/μl, 3 pg/μl, 1 pg/μl, 0.3 pg/μl, 0.1 pg/μl, 0.03 pg/μl ve 0.01 pg/μl olacak şekilde yapılmıştır. Seyreltmeler tamamlandıktan sonra numuneler, pozitif yüklü bir naylon membran (Thermo Scientific™), EK4) üzerine Şekil 3.2'de gösterilen sırayla 1 μl hacminde damlatılmıştır. Numunenin membran üzerine sabitlenmesi 8 dk UV ışığına (312 nm) maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından kit içeriğinde verilen adımlar uygulanarak probun verimliliği tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Prob verimliliğinin tespit edilmesi

3.16.2. DNA'nın Membrana Transferi

Mutant hücrelerin doğrulanmasında kullanılan adpAD_F ve adpAD_R primerleri (EK5) ile PCR yapılmıştır ve PCR ürünleri %6'lık native poliakrilamid jelde (Tablo 3.6) yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel 30 dk oda sıcaklığında nazik bir çalkalama ile denatürasyon çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından 30 dk oda sıcaklığında nötralizasyon çözeltisinde hafif bir çalkalama ile inkübasyon yapılmıştır. Transfer öncesinde jel 0.5X TBE tamponunda 10 dk boyunca dengelenmiştir. Blotlama için Tetra Blotting Module (BIORAD) kullanılmıştır. Aparatın içine yerleştirilmeden önce süngerler ve 2 adet Whatman kağıdı (EK4) 0.5X TBE'de ıslatılmıştır. Whatman kağıtlarının üzerine jel ve jelin üzerine de hava kabarcığı olmayacak şekilde membran yerleştirilmiştir. Membranın üzerine tekrar 2 adet 0.5X TBE ile ıslatılmış Whatman kağıtları ve süngerler yerleştirilmiştir. Transfer için hazır olan sistem Şekil 3.3'de gösterilen şekilde blot transfer aparatına yerleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Blot transfer aparatına jel ve membranın yerleşimi

Transfer işlemi için 1 saat boyunca 80 V akım uygulanmıştır. Transfer tamamlandıktan sonra membran 0.4 M NaOH solüsyonu (EK3) ile 10 dk muamele

edilerek denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra membran 1X SSC (EK3) ile 2 kez yıkanmış ve 8 dk UV ışığına (312 nm) maruz bırakılarak DNA'nın membran üzerinde kross link işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.16.3. Hibridizasyon ve Yıkamalar

Kit prosedüründe yer alan ve Şekil 3.4'de verilen formül kullanılarak hibridizasyon sıcaklığı 55 °C olarak hesaplanmıştır.

$$T_m = 49.82 + 0.41(\% G+C) - (600/l)$$

$$T_{opt} = T_m - 20-25^{\circ}C$$

Şekil 3.4. Hibridizasyon sıcaklığının hesaplanması. l: PCR fragmentinin bç olarak büyüklüğü

Hibridizasyon öncesi membran 55°C'de DIG Easy Hyb tamponunda 30 dk bekletilmiştir. Etiketli probalar hibridizasyon tamponuna eklenmeden önce 99°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Ardından hibridizasyon tamponuna eklenerek 50 rpm'de 55°C'de 18 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası membran yıkama solüsyonu 1 (EK3) ile 2 kez 25°C ve 30 rpm'de 15 dk yıkanmıştır. Ardından yıkama solüsyonu 2 (EK3) ile 68°C'de düzenli aralıklar ile nazikçe çalkalanarak 15 dk iki kez yıkanmıştır.

3.16.4. Sinyal Tespiti

Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra kit prosedüründe verilen içerik ve koşullarda uygulanan tespit aşamasında probun hibridize olduğu DNA'larda renk oluşumu gözlemlenmiştir.

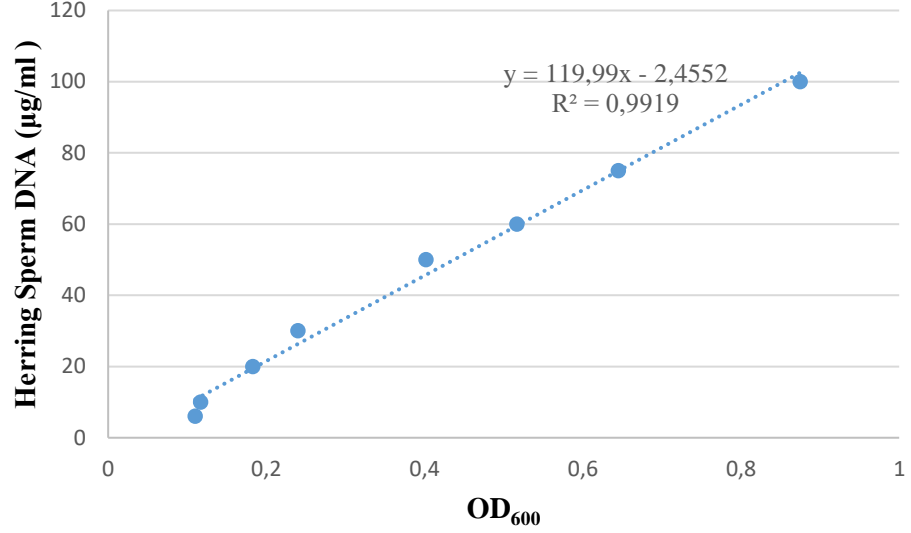
3.17. Fermantasyon Çalışması

Fermantasyon çalışmasında *S. clavuligerus* NRRL 3585, *adpA* geni yok edilmiş *S. clavuligerus* $\Delta adpA$, komplement *S. clavuligerus* *compadpA*, *adpA* geninin çoklu ifadesini sağlayan *S. clavuligerus* pSPGadpA ve vektör kontrolü olarak *S. clavuligerus* pSPG suşları kullanılmıştır. Fermantasyon öncesinde oluşturulacak ön kültürler için 100 ml'lik TSB besiyerine, suşların gliserol stoklarından 500 μ l ekim yapılmış ve 28°C'de 220 rpm'de OD₆₀₀ değeri 5-7 aralığında oluncaya kadar inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 500 ml'lik çentikli erlenlere 100 ml TYD (EK2) besiyeri eklenmiş ve ayrıca *adpA* geninin çoklu ifadesinin sağlanırken pSPG

vektörünün gliserolle indüklenen bir promotora sahip olması sebebiyle %1.5 oranında gliserol besiyerine ilave edilmiştir. OD₆₀₀ değerleri eşitlenen suşların ön kültürlerinden, her bakteriden üç biyolojik replika olacak şekilde %5 hacimde besiyerine ekilmiş ve 120 saat 220 rpm'de ve 28°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince 24 saat aralıklarla DNA kuantifikasyonu, RNA izolasyonu ve biyoassay deneyleri için örnekler alınmıştır. Süpernatantlar ve RNA izolasyonunda kullanılacak olan pelletler -86°C'de muhafaza edilirken DNA kuantifikasyonu yardımıyla üreme eğrilerinin çıkarılması için kullanılacak olan pelletler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.18. DNA Kuantifikasyonu Yardımıyla Üremenin Belirlenmesi

DNA kuantifikasyonu ile üremenin belirlenebilmesi için Burton (1968) tarafından optimize edilen protokol kullanılmıştır. Fermantasyon çalışmasında her 24 saatte bir alınan kültürlerden elde edilen pelletler 2 ml hacimli %0.85'lik NaCl çözeltisinde vortekslenerek çözülmüştür. Çalışmada standart olarak 0.3 mg/ml stok konsantrasyonunda Herring Sperm DNA (Sigma) (EK4)'sı 5 mM NaOH (EK4) içinde çözülmüş ve 6, 10, 20, 30, 50, 60, 75 ve 100 µg/ml olmak üzere farklı konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Blank (kör) örneği (5 mM NaOH), hazırlanan standartlar ve %0.85'lik NaCl ile seyreltilmiş örneklerden 400 µl hacimde alınmıştır ve üzerlerine 1 N HClO₄'den (EK3) 400 µl (v/v) ilave edilmiştir. Tüpler ters çevrilip karıştırılarak 70°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 800 µl difenilamin belirteci (EK3) eklenmiş ve 8-10 kez ters çevrilerek karıştırılmıştır. Örnekler 30°C'de ve 15 -17 saat inkübe edilmiş ve spektrofotometrik ölçüm öncesinde vortekslenerek 13.200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar OD₆₀₀ değerinde ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standartların ölçüm sonuçlarından standart eğri ve denklem elde edilmiştir. Grafik üzerinde verilen eşitlik kullanılarak her bir örnekteki DNA konsantrasyonu (µg/ml) hesaplanmıştır (Şekil 3.5).



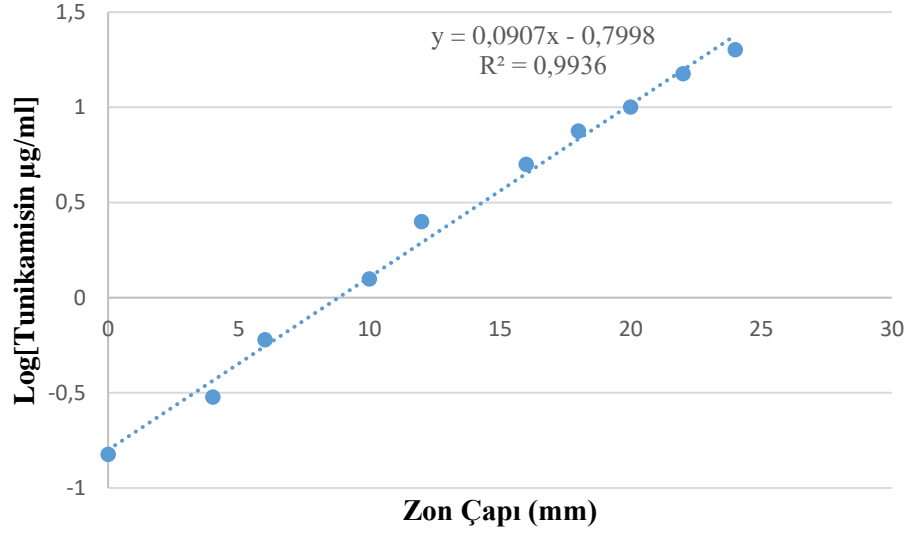
Şekil 3.5. Herring Sperm DNA'ya ait kalibrasyon eğrisi

3.19. Tunikamisin Ekstraksiyonu ve Üretiminin Biyoassay Deneyleri İle Belirlenmesi

Tunikamisin ekstraksiyonu için fermantasyon kültürlerinden 24 saat aralıklarla alınan 10 ml hacmindeki kültürlerin üzerine son konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde %37'lik HCl (EK4) eklenmiştir. Karışım vortekslenmiş ve 4.000×g'de 10 dk ve +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet %1'lik HCl ile yıkanıp santrifüj yapılmıştır. Yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Pellet üzerine 1 ml metanol eklenmiş ve 10 dk boyunca vortekslenmiştir. Tunikamisin çözüldükten sonra 4.000×g'de, 10 dk ve +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Son olarak, 1.5 ml'lik Eppendorflara 1 ml'lik süpernatant eklenmiş ve metanol 40°C'de evaporatör cihazında (Christ RVC 2-18) uçurulmuştur. Numuneler -20°C'de muhafaza edilmiştir. Biyoassay deneyinden önce her bir numune 150 µl metanol içerisinde çözülerek konsantrasyonunu belirlemek için tunikamisin çözeltisi elde edilmiştir (Baş vd., 2020).

Biyoassay çalışmasında indikatör mikroorganizma olarak *B. subtilis* 6633 hücreleri kullanılmıştır. İndikatör suş, TSB besiyerinde OD₆₀₀ değeri 1.0'e ulaşıncaya dek üretilmiş ve 45°C'ye kadar soğutulmuş TSA besiyerine 100 ml'de 0.0033 yoğunluğunda bakteri olacak şekilde eklenmiştir. TSA-kültür karışımı petrilere dökülmüş ve katılaştığında üzerinde 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklar içerisine 50 µl örnek süpernatantı ve standartlar gerekli seyreltmeler yapılarak [Tunikamisin standardı (1 mg/ml) DMSO (EK4)'da hazırlanmış ve

ardından metanol (EK4) ile 1.0-0.75-0.5-0.25-0.125-0.0625-0.003125 µg/ml konsantrasyonlarda seyreltilmiştir] kuyucuklara yüklenmiştir. Petriler önce 4°C’de 2 saat, ardından 28°C’de 12-15 saat inkübe edilmiştir. Tunikamisine ait standart eğriden elde edilen lineer regresyon baz alınarak kültürlerdeki tunikamisin üretimleri (µg/ml) belirlenmiştir (Şekil 3.6).

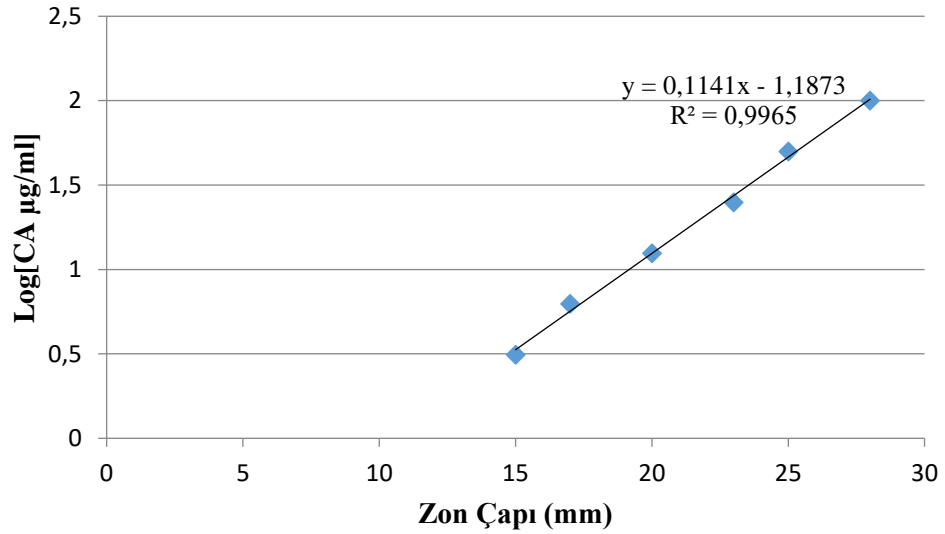


Şekil 3.6. Tunikamisin standardına ait kalibrasyon eğrisi

3.20. CA Üretimini Biyoassay Deneyle Belirlenmesi

Suşların CA üretimlerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan biyoassay deneyinde indikatör mikroorganizma olarak bir β-laktamaz üreticisi olan *K. pneumoniae* ATCC 29665 suşu kullanılmıştır (Romero vd., 1984). Fermantasyon sürecinde 24 saat aralıklarla alınan örneklerden elde edilen süpernatantlar kullanılarak gerçekleştirilen biyoassay deneyinde standart olarak potasyum klavulanat (Sigma, USA) (EK4) kullanılmıştır. *K. pneumoniae* ATCC 29665 hücreleri, penisilin G (10 µg/ml) (EK4) içeren TSB besiyerinde OD₆₀₀ değeri 1.0'e ulaşmaya dek üretilmiştir. Ardından TSA besiyeri hazırlanmış ve 45-47°C'lik sıcaklık aralığına kadar soğutulmuş penisilin G (10 µg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. 100 ml TSA besiyeri içerisinde 0.0033 yoğunlukta bakteri olacak şekilde *K. pneumoniae* ATCC 29665 kültüründen eklenmiş ve TSA-kültür karışımı petri kabına dökülmüştür. Katılaştıran TSA-kültür karışımı üzerinde 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır ve içerisine 50 µl örnek süpernatantı ve farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiş standartlar [Potasyum klavulanat; sodyum asetat (EK4; pH: 6.0) ile 10,

7.5, 5.0, 3.5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, ve 0.156 µg/ml'ye seyreltilmiştir.] kuyucuklara eklenmiştir. Petriler önce 4°C'de 2 saat, ardından 30°C'de 12-15 saat inkübe edilmiştir. Potasyum klavulanata ait standart eğriden elde edilen lineer regresyon baz alınarak kültürlerdeki CA üretimleri belirlenmiştir (Şekil 3.7). Burada, CA *K. pneumoniae* tarafından üretilen β-laktamazı inhibe ederken, penisilin G bakteriyel gelişimini engelleyerek kuyucuk etrafında inhibisyon zonu oluşmasını sağlar (Romero vd., 1984).

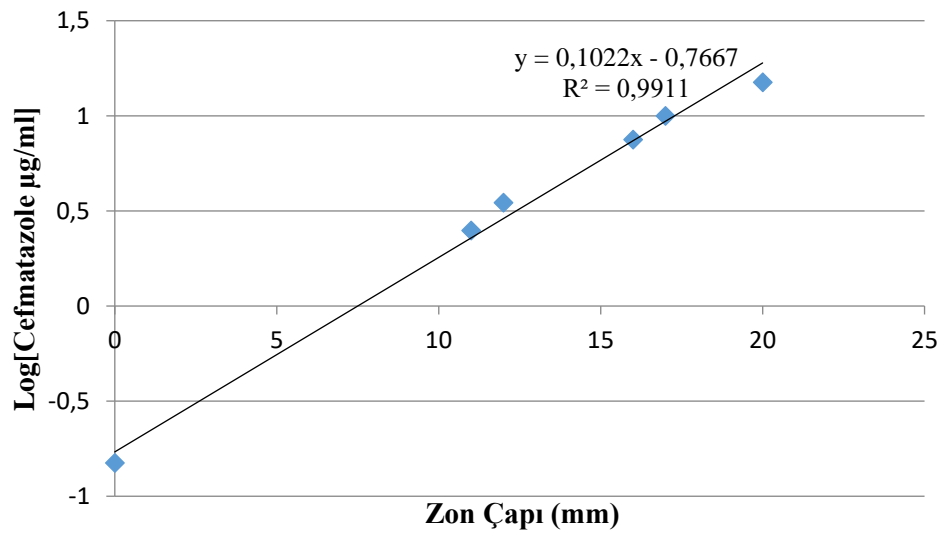


Şekil 3.7. CA standardına ait kalibrasyon eğrisi

3.21. Suşların CephC Üretimini Biyoassay Deneyleri İle Belirlenmesi

Manipüle suşların kontrole kıyasla CephC üretimlerini karşılaştırmak için yapılan biyoassay çalışmasında indikatör mikroorganizma olarak β-laktam antibiyotiklerine karşı aşırı duyarlı olan *E. coli* ESS 22-35 suşu kullanılmıştır (Aharonowitz ve Demain, 1978). Fermantasyon çalışması sürecinde 24 saat aralıklar ile alınarak -86 °C'de muhafaza edilen süpernatantlar CephC üretiminin tespitinde kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan 1 mg/ml Cefmatazole (Gold Bio, USA) (EK4) 1 M MOPS tamponunda (EK4; pH: 6.0) çözülmüş ve 10, 7.5, 5.0, 3.5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, ve 0.009 µg/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. *E. coli* ESS 22-35 hücreleri bir gece önce 10 ml TSB besiyerine ekilerek 30°C ve 200 rpm'de inkübe edilip gece kültürü oluşturulmuştur. Üreyen kültürden 1 ml alınıp 100 ml TSB besiyerine ekilmiş ve OD₆₀₀ değeri 1.0'e ulaşıncaya dek üretilmiştir. Taze hazırlanmış steril TSA besiyeri 42°C'lik sıcaklığa

kadar soğutulmuştur. 100 ml TSA içerisinde 0.0033 yoğunluğunda olacak şekilde OD₆₀₀ değeri 1 olan *E. coli* ESS 22-35 kültüründen eklenmiş ve TSA-kültür karışımı petrilere dökülmüştür. Katılaştan TSA-kültür karışımı üzerinde 5 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. İçerisine 50 µl örnek süpernatantı ve seyreltilmiş standartlar eklenmiştir. Kuyucukların içerisine eklenen numunelerin agar besiyeri tarafından absorbe edilebilmesi için petriler önce 4°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından 30°C’de 12-15 saat boyunca yapılan inkübasyon sonrası kuyucuklar etrafında oluşan zonlar mm cinsinden ölçülmüştür. Cefmatazole’e ait standart eğriden (Şekil 3.8) elde edilen eşitlik aracılığı ile kültürlerin CephC üretimleri belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Cefmatazole standardına ait kalibrasyon eğrisi

3.22. RNA Örneklerinin Hazırlanması

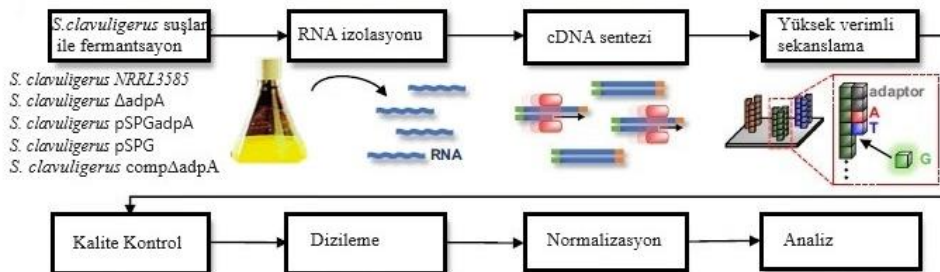
RNA izolasyonları için DNA kuantifikasyonu sonuçları değerlendirilerek fermantasyonun 48. saatinde alınan örneklerin kullanılmasına karar verilmiştir. NucleoSpin RNA izolasyon kiti (EK4; Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak 2 ml kültür pelletinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kitin prosedürüne ek olarak hücre duvarını parçalamak amacıyla sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Protein ve hücre kalıntılarının ayrıştırılması için fenol/kloroform muamelesi ile "Phase lock gel heavy" (5-Prime) kolonları (EK4) kullanılmıştır. DNA kontaminasyonunu önlemek için kit içerisinde yer alan DNaz muamelesine ek olarak izolasyon sonunda 50 µl hacmindeki RNA örneklerine iki kez DNaz (Invitrogen, USA) (EK4) işlemi uygulanmıştır (Kurt vd., 2013). Elde edilen RNA'lar %1.5 konsantrasyonundaki

agaroz jelde yürütülmüş ve RNA miktarı, kalitesi ($A_{260}/A_{230}>1.8-2.2$) ve temizliği ($A_{260}/A_{280}>2.0$) spektrofotometrik ölçümlerle belirlenerek $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de küçük hacimlerde muhafaza edilmiştir.

3.23. RNA Dizileme (RNA-Seq)

RNA dizileme (RNA-seq), belirli bir zaman diliminde biyolojik bir dokuda ifade olan RNA'nın varlığını, miktarını ve dolayısıyla hücredeki gen ifadesini anlamak için yüksek verimli dizileme yöntemlerinin avantajlarını kullanarak hızlı ve güvenilir çıktılar sunan dizileme prensibine dayalı bir transkriptom aracıdır (Nagalakshmi vd., 2008, Kukurba ve Montgomery, 2015). İlk transkriptomik çalışmaları, nispeten düşük maliyetle yüksek verim seçeneği sunan hibridizasyon temelli mikrodizi teknolojileri kullanılarak gerçekleştirilmiş ancak analiz için önceden dizi bilgisine ihtiyaç duyulması, ifadesi az ve çok yüksek olan genlerin verimli bir şekilde tespit edilememesi ve benzer dizilerin analizi sırasında sorunlu hibridizasyon problemleri gibi çeşitli olumsuz durumlar kullanımını sınırlandırmıştır (Schena vd., 1995; Casneuf vd., 2007; Shendure 2008; Kukurba ve Montgomery, 2015). Mevcut sorunlar günümüzde yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanımı ile RNA analizinde komplementer DNA'nın (cDNA) yüksek verimli dizilenmesi sonucunda çözüme kavuşmuştur (Wang vd., 2009).

RNA-seq analizi özellikle prokaryotlarda çoğunlukla diferansiyel gen ekspresyonunu (DEG) analiz etmek için kullanılır. Standart bir RNA-seq deneyi, RNA'nın izole edilmesi, cDNA'ya dönüştürülmesi, sekanslama kütüphanesinin hazırlanması, NGS platformunda sekanslanması ve biyoinformatik analizlerin yapılması adımlarından oluşur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. RNA-seq analizi için iş akışı (Gong vd., 2023)

Çalışmamızda her bir örneğe ait üç biyolojik replika/numune [RNA bütünlük numarası (RIN) değerleri ≥ 9.0] birleştirilerek bir havuz yapılmış ve RNA-seq için mRNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılmıştır (Abanoz-Seçgin vd., 2023). Suşlarının RNA-seq analizi DNBSseq/Illumina platformunda (BGI Genomics, Hong Kong) gerçekleştirilmiş ve PE100 kütüphaneleri elde edilmiştir. Ham RNA-seq verileri, PRJNA707406 proje numarası altında NCBI Sekans Okuma Arşivi'nde (Sequence Read Archive, SRA) saklanmıştır. Filtrelemeden sonra adaptör diziler, düşük kaliteli okumalar ve fazlalık rRNA dizileri ham verilerden çıkarılmıştır. Temiz okumalar HISAT (Kim vd., 2015) ve IGV (Thorvaldsdóttir vd., 2013) yardımıyla *S. clavuligerus* referans genom dizisine (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000148465.1) hizalanmıştır. Ayrıca, temiz okumaları referans genomuna eşleştirmek için Bowtie2 (Langmead ve Salzberg, 2012) kullanılmıştır. Her numunenin gen ekspresyon düzeyi RSEM kullanılarak hesaplanmıştır (Li and Dewey, 2011) ve genlerin ekspresyon seviyesi, milyon haritalanmış fragman başına gen başına fragman sayısı (Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments, FPKM) ile normalleştirilmiştir. Diferansiyel olarak eksprese edilen genleri (DEG'ler) belirleme eşliğinde $\log_2(\text{FoldChange, FC}) \geq 1$, ≤ -1 ve yanlış tespit oranı (FDR) ≤ 0.005 olarak kullanılmıştır. DEG'lerin fonksiyonel sınıflandırması Gen Ontoloji (GO) analizi ile yapılırken, DEG'lerin yol zenginleştirme analizi Gen ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG) (Okuda vd., 2008) veri tabanı kullanılarak sağlanmıştır.

3.24. Kantitatif Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Tunikamisin biyosentetik yolağında bulunan gen ifade değişikliklerinin tespit edilmesi ve aynı zamanda RNA-seq verilerinin biyoinformatik analizi sonucu elde edilen diferansiyel gen ekspresyonu (DEG) verilerinin doğrulanması için qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. TYD besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyon sürecinde 48. saatte alınan örneklerden elde edilen RNA'lar hem RNA-seq hem de qRT-PCR analizinde kullanılmıştır. 2 μg RNA örneği ile High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (EK4; Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.18). qRT-PCR analizinde kullanılan primerlerin dizileri ve özellikleri EK5'de verilmiştir.

Tablo 3.18. cDNA sentez reaksiyonu ve koşulları

İçerik	Hacim (µl)	Sıcaklık	Süre
10x RT tamponu	2	25°C	10 dk
dNTP mix (10 mM)	0.8	37°C	120 dk
MultiScribeReverse transkriptaz (50 U/µl)	1	85°C	5 dk
10X RT random primer	2	4°C	-
RNaz inhibitör	1		
RNA (200 ng/µl)	10		
dH ₂ O	3.2		

qRT-PCR çalışmasında BRYT Green® boyası içeren GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) ajanı kullanılmıştır. Bu master mix, kantitatif PCR (qPCR) için 2X master mix olup, içerisinde oda sıcaklığında polimeraz aktivitesini engelleyen patentli bir antikora bağlı tam uzunlukta *Taq* DNA polimeraz olan GoTaq® Hot Start polimeraz dNTP'ler ve MgCl₂ bulunmaktadır. Ayrıca, amplifikasyon reaksiyonunda daha az inhibitör özelliğine sahip, SYBR® Green I'den daha yüksek bir konsantrasyonda kullanılabilen yeni, ve patentli bir dsDNA bağlayıcı boya içerir. Master mix içindeki boya konsantrasyonu, SYBR® Green I içeren master mixlerden çok daha parlak floresans üretmek üzere optimize edilmiştir. Boyanın uyarılma ve emisyon özellikleri SYBR® Green I'e benzer, bu nedenle yaygın olarak bulunan gerçek zamanlı PCR cihazlarıyla uyumludur (<https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/introducing-gotaq-qpcr-master-mix-the-bright-choice-for-dye-based-qpcr/>; 19.07.2024). Deney aşamasında verileri normalize etmek ve güvenilir bir karşılaştırma yapabilmek için referans gen olarak RNA polimeraz sigma faktörünü kodlayan *hrdB* geni seçilmiştir (Kurt vd., 2013). Çalışmada kullanılan qRT-PCR reaksiyon içeriği ve koşulları Tablo 3.19'da verilmiştir. qRT-PCR analizi, CFX96 Real Time PCR (BioRad) cihazında gerçekleştirilmiştir. Deney sırasında her bir örnek için iki biyolojik ve iki teknik replika kullanılmıştır. Bunun yanı sıra her reaksiyona özgü, cDNA yerine dH₂O'nun kullanıldığı negatif kontrol (NTC) seti deneye eklenmiştir.

Tablo 3.19. qRT-PCR reaksiyon içerik ve koşulları

İçerik	Hacim (µl)	Final Konsantrasyon	Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
GoTaq®qPCR Master mix (2X)	10	1x	Hot Start aktivasyonu	95°C	2 dk	1
cDNA	1		Denatürasyon	95°C	15 sn	40
İleri Primer (10 µM)	0.8	0.4 µM	Yapışma/uzama	60°C	1 dk	
Geri primer (10 µM)	0.8	0.4 µM	Dissosiasyon (ergime eğrisi)	60-95°C	0.5°C lik artışlarla	1
dH ₂ O	7.4					

3.25. qRT-PCR Verilerinin Rölatif Kuantifikasyonu

Rölatif kuantifikasyon, hedef genin ifade düzeyini belirli bir referans genin ifade düzeyine göre göreceli olarak ölçme işlemidir (Pfaffl, 2007). qRT-PCR sonucu elde edilen verilerde gen ifade farklılıklarının analizi için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi uygulanmış ve rölatif ekspresyon oranı hesaplanırken kullanılan formül Şekil 3.10'da verilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

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

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

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

Şekil 3.10. Rölatif ekspresyon oranı hesaplanırken kullanılan formül

3.26. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi/Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) Analizi

LC-MS/MS; sıvı kromatografisi (LC) ile kütle spektrometrisi (MS) yönteminin birleşiminden oluşan, karmaşık biyolojik moleküllerin, organik ve inorganik maddelerin analiz edilmesinde kullanılan hassas ve seçicilik oranı yüksek bir analiz yöntemidir (Skoog vd., 2019). LC-MS/MS analizinde ilk aşama olan LC, bileşiğin analiz edileceği karışımı ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Numune içeriği, bileşenleri belirli özelliklerine (polarite, boyut, kimyasal etkileşimler vb.)

göre ayırıştırılan bir kolon içerisinde sıvı bir taşıyıcı aracılığı ile taşınarak kategorize edilir. Ardından ayrılmış bileşenler, kütle spektrometrisi (MS) analizinde kullanılır. MS, moleküler kütleyi ölçer ve bileşiğin tanımının yapılmasını sağlar. İyonizasyon adı verilen bir süreçte, bileşiğin molekülleri iyonlara dönüştürülerek kütle analiz cihazı içinde hareket ettirilir ve kütle-yük oranları (m/z) ölçülür. Bu sayede her bir iyonun kütle spektrumu oluşturularak bileşik tanımlanır ve miktarı tayin edilir (Pitt, 2009).

Çalışmamızda, TYD kültürlerinde manipüle ve kontrol suşları tarafından üretilen tunikamisin antibiyotiğinin miktarı biyoassay deneyine ek olarak LC-MS/MS analizi ile de belirlenmiştir. Biyoassay sonuçlarından elde edilen verilerden yola çıkılarak TYD besiyerinde gerçekleştirilen fermantasyonun 96. saatine ait tunikamisin ekstraktlarının LC-MS/MS analizi DAYTAM (<https://daytam.atauni.edu.tr/>) merkezinde bulunan Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kolon Poroshell 120 SB-C₁₈, 3x100 mm, 2.7 mikron özelliklerindedir. Analiz metodolojisi olarak Gabani vd. (2019) referans alınmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µl olup akış hızı 0.6 ml/dk'dır. Tablo 3.20'de uygulanan akış süreci ve solvent kompozisyonu verilmiştir.

Tablo 3.20. LC-MS/MS analizinde zamana bağlı solvent kullanımı

Zaman (dk)	Solvent kompozisyonu	Mobil fazlar
0.01	A: %30.00 B: %70.00	A %100 asetonitril
1.50	A: %80.00 B: %20.00	B 5 mM amonyum format
3.50	A: %80.00 B: %20.00	
6.00	A: %30.00 B: %70.00	

LC-MS/MS pozitif iyon modunda elektrosprey iyonizasyon tekniği kullanılarak çoklu reaksiyon izleme modunda çalıştırılmıştır. Tunikamisin A-D homologlarını ölçmek için m/z 817.18 → 596.10, 831.43 → 609.9, 845.29 → 624.0 ve 859.2 → 638.0 geçişleri kullanılmıştır. Standart olarak tunikamisin (EK4; Sigma T7765-10 mg) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisine göre her bir örnekteki tunikamisin miktarı (µg/ml) belirlenmiştir.

3.27. AdpA Proteininin Saflaştırılması

Klonlama çalışması sonucu elde edilen rekombinant *E. coli* pET16BL vektörü protein ifadesinin sağlanabilmesi için transformasyon yöntemiyle *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmış ve elde edilen koloni *E. coli* pET16-BL olarak isimlendirilmiştir. Protein indüklemeye deneyi için *E. coli* pET16-BL kültürü, 30 µg/ml kanamisin içeren 10 ml LB besiyerine ekilmiş ve 16 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Üreyen kültürün 1 ml'si dört farklı erlen içerisinde bulunan 100 ml'lik LB (30 µg/ml kanamisin içeren) besiyerlerine ekilmiştir. İki erlen 30°C, diğer iki erlen ise 37°C sıcaklıkta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.5'e ulaştığında, iki farklı sıcaklıktaki erlenlerden birine 1 mM IPTG (EK4) eklenmiş ve ikinci erlenlerdeki kültüre IPTG eklenmeyerek kontrol kültürü olarak kullanılmıştır. IPTG eklemesi yapıldıktan sonraki 5 saat boyunca tüm kültürler 37°C sıcaklıkta 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürler 4°C'de ve 6.000xg'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra elde edilen pelletler -86°C'de 30 dk boyunca bekletilmiş ve ardından oda sıcaklığında çözülmüştür. Protein ekstraksiyonu için ilk olarak pelletler üzerine 5 ml hacimdeki LEW tamponu (EK3) ve 10 µl beta-merkaptotanol (β-ME) (EK4) eklenerek vortekslenmiştir. Hücre duvarının parçalanması için LEW tamponu içerisinde homojen hale getirilen kültür 5 sn aralıklarla toplamda 60 sn (6 x 10 sn) süreyle ve %50'lik bir güç seviyesi (amplitud) kullanılarak sonike edilmiştir (Sonics, VCX 130 PB). Sonikasyon sonrası örnekler 4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar -86°C'de saklanmak üzere muhafaza edilmiştir. Süpernatantlar %12'lik poliakrilamid jelde yürütülmüş ve indüklemeye kontrol edilmiştir. SDS_PAGE sonrası IPTG ile indüklenen proteinler, Protino® Ni-TED 2000 His Tag kolonu (EK4) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma aşamasında öncelikle kolon 4 ml hacmindeki LEW tamponu (ek olarak 10 mM imidazol içerir, pH: 8.0) ile dengelendikten sonra, süpernatant kademeli olarak kolondan geçirilmiştir ve kolondan geçen numuneler -86°C'de muhafaza edilmiştir. Süpernatant kolondan geçirildikten sonra His-Tag etiketi olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacı ile kolon, üç kez 20 mM imidazol içeren LEW tamponu ile yıkanmış ve kolondan geçirilen 3 yıkama ürünü de -86°C'de saklanmıştır. Son olarak His-Tag etiketli IPTG ile indüklenmiş proteinin kolondan indirilebilmesi için 3 ml'lik elüsyon tamponu

(200 mM imidazol içerir, pH: 8.0) kullanılmıştır. Elde edilen tüm örnekler %12'lik poliakrilamid jeldede yürütülerek rekombinant AdpA proteininin (rAdpA) saflaştırılıp saflaştırılmadığı kontrol edilmiştir (Şafak vd., 2020). Saf rAdpA'yı renatüre ve konsantrasyonunu artırmak amacıyla, cutoff değeri 30 kDa olan Amicon® Ultra-15 30K santrifüj filtresi (EK4) kullanılmıştır.

3.28. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları belirlenirken Bradford kuantifikasyon metodu kullanılmıştır. Standart olarak Bovine serum albümini (BSA) (EK4) kullanılarak kalibrasyon eğrisi ve denklemi elde edilmiş ve protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.29. Western Blot Analizi ile rAdpA Proteininin Doğrulanması

rAdpA proteininin rekombinant *E. coli* pET16BL hücrelerinde ifadesinin doğrulanması için Western Blot deneyi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle protein örnekleri her biri %12 konsantrasyonunda hazırlanmış iki ayrı SDS- poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Bu jellerden biri Coomassie Blue R-250 ile boyanmıştır. Diğer jeldeki proteinler Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, CA, USA) kullanılarak 0.2 µm nitroselüloz membrana (EK4) transfer edilmiştir. Primer antibodi olarak His-Tag (Sino Biological) antibadisi (1/7000 dilüsyon oranıyla) (EK4) kullanılmış ve AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, CA, USA) (EK4) ile çalışılmıştır (Okay vd., 2018).

3.30. Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi (EMSA)

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), bir DNA parçasının hedeflenen bir protein ile etkileşimini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Analizin ilk aşamasında hedef protein ve nükleik asit çözeltisi uygun bir protokol altında bir araya getirilir ve elde edilen protein-nükleik asit karışımı poliakrilamid jel elektroforezi aracılığı ile yürütülür. Bu işlem sırasında oluşan DNA-protein kompleksi diğer DNA parçalarından daha yavaş hareket etmektedir. Eğer hedef proteinle DNA arasında etkileşim gerçekleşip kompleks oluşursa, DNA bandı bir "shift" yaparak orijinal konumundan farklı bir konumda gözlemlenir (Hellman ve Fried, 2007).

Çalışmamızda, FIMO sürüm 5.1.1.-motif araştırma aracı (meme-suite.org) kullanılarak *Streptomyces sp.*'de promotor bölgelerinde rAdpA proteininin bağlandığı konsensus dizi (TGGCSNGWWY, S: G veya C; W: A veya T; Y: T veya C; N: herhangi bir nükleotid) (Ohnishi vd., 2005) *S. clavuligerus*'un tunikamisin gen kümesinin nükleotid dizilerinde taranmıştır. Tespit edilen DNA dizisinin çoğaltılması için primer tasarlanmış (EK5) ve ilgili dizi ile rAdpA proteinin olası etkileşimini değerlendirmek için Tablo 3.21'de verilen EMSA prosedürü uygulanmıştır. DNA-rAdpA etkileşiminin inceleneceği EMSA reaksiyonunda Makitrynsky vd. (2013)'te rapor edilen reaksiyon içeriği kullanılmıştır. rAdpA farklı reaksiyonlara 0, 1 µM (0.042 µg/ml), 2 µM (0.085 µg/ml), 4 µM (0.171 µg/ml), 6 µM (0.258 µg/ml), 8 µM (0.344 µg/ml), 10 µM (0.430 µg/ml), 12 µM (0.516 µg/ml), 14 µM (0.602 µg/ml) konsantrasyonlarda eklenmiştir.

Tablo 3.21. rAdpA proteininin *S. clavuligerus*'un tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki putatif bağlanma bölgelerini belirlemek üzere yapılan EMSA deneylerinde uygulanan prosedür

İçerik	Makitrynsky vd. (2013)
Tris-HCl pH:7.5	20 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	100 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Gliserol	% 10
Prob	50 ng
Protein	0-14 µM
Poly[d(I-C)]	0.5 mM
Son hacim	15 µl
Koşullar	25°C; 20 dk

İnkübasyon sonrasında örnekler, daha önce 4°C'de soğutulmuş olan ve 30 dk boyunca 80 V akım uygulanan %6'lık native poliakrilamid jele yüklenmiş ve ardından jel komplekslerin ayrışması için 0.5X TBE tamponunda (90 mM Tris borat, 2 mM EDTA, pH 8.3) 4°C'de ve 90 V akım ile 1 saat boyunca elektroforez yapılmıştır. Bu işlem için Bio-Rad'e ait Mini-PROTEAN® 3 Hücre sistemi kullanılmıştır. PAGE işleminden sonra, EMSA jelleri, rAdpA ile kompleks yapan ve herhangi bir reaksiyona girmeyen DNA fragmentlerini görebilmek için SYBR Green I Nükleik Asit Jel Boyası (EK4; Invitrogen) (1/10000, v/v oranında) içeren bir çözelti

içerisinde oda sıcaklığında ve 30 dk düşük çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Son olarak, EMSA sonuçlarına ait bantlar UV-transilluminatörde görüntülenmiştir.

3.31. Tunikamisin Gen Kümesindeki Genlerin Ortak Transkripsiyonel Profiline Revers Transkripsiyon PCR (RT-PCR) İle Belirlenmesi

Tunikamisin biyosentetik yolağındaki genlerin transkripsiyonel profili, *S. clavuligerus* NRRL 3585 RNA örneği ve kontrol olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kullanılarak RT-PCR deneyleri aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. RT-PCR için Superscript™ One-Step RT-PCR kiti (EK4; Invitrogen) kullanılmıştır. Kit içeriği 2X Reaksiyon karışımı tamponunu ve RT/platinum® *Taq* DNA polimerazı (EK4) barındırmaktadır. RNA örneklerinde olası DNA kontaminasyonunu tespit etmek üzere RT-PCR'da negatif kontrol reaksiyonu için RT/platinum® *Taq* yerine Platinum® *Taq* DNA polimeraz (EK4) kullanılmıştır. Reaksiyon içerik ve koşulları Tablo 3.22'de verilmiştir.

Tablo 3.22. RT-PCR'in içerik ve koşulları

İçerik	Hacim (µl)	Final Konsantrasyonu		
2X reaksiyon karışımı	10	1X		
Total RNA (100 ng/µl)	2	10 ng		
Forward primer (10 µM)	0.5	250 nM		
Reverse primer (10 µM)	0.5	250 nM		
DMSO	1	%5		
dH ₂ O	Hacim 20 µl'ye tamamlanır.		-	
RT/Platinum ^R <i>Taq</i> mix (RT+)	0.3	0.04 U/µl		
Platinum ^R <i>Taq</i> (RT-) (5 U/µl)	0.16	0.04 U/µl		
RT-PCR Koşulları				
cDNA sentezi	50°C	30 dk	1 döngü	
İlk denatürasyon	94°C	2 dk	1 döngü	
PCR amplifikasyonu	Denatürasyon	94°C	30 sn	15-30 döngü
	Bağlanma	Tm-10°C	30 sn	
	Uzama	72°C	1 dk/kb	
Final uzama	72°C	10 dk	1 döngü	

3.32. İstatistiksel Analiz

DNA kuantifikasyonu, biyoassay ve qRT-PCR verilerinin istatistiksel analizi, Graphpad Prism Software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) yazılımında Bonferroni *post hoc* test ile iki yönlü ANOVA kullanılarak yapılmıştır. Hata

ubukları %95 güven aralıklarını temsil etmektedir ve anlamlılık p değeri olarak ifade edilmiştir (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ve ****: $p < 0.0001$).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *S. clavuligerus*'da *adpA* Geni Silinmiş Mutant Suşların Elde Edilmesi

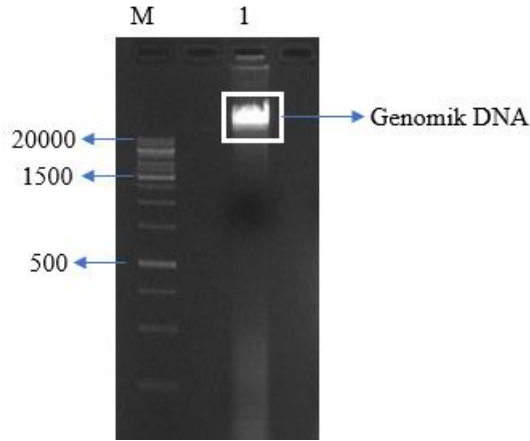
4.1.1. *S. clavuligerus* Genomik DNA'sının Elde Edilmesi

S. clavuligerus NRRL 3585 suşu 50 ml TSB besiyerinde 28°C'de 200 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen kültürün 30 ml'si ile Pospiech ve Neumann (1995) tarafından tanımlanmış tuz çöktürme metoduna göre genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA kalitesi ve konsantrasyonu NanoDrop® ND-2000 (Thermo Scientific™) cihazıyla ölçülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İzole edilen DNA örneğinin spektrofotometrik ölçümleri

Örnek adı	A _{260/280}	A _{260/230}	Konsantrasyon (ng/μl)
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585	2.00	1.83	471

İzole edilen genomik DNA %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek kalitesi ve konsantrasyonu kontrol edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *S. clavuligerus*'a ait genomik DNA. M: GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific™) (EK1) 1: *S. clavuligerus* genomik DNA'sı

4.1.2. $\Delta adpA$ -füzyon Fragmentini İçeren pIJ12738'in Eldesi

In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA) kullanılarak gerçekleştirilen bu işlemde PCR ampliconları ve doğrusal hale getirilmiş vektörün uçlarında 15 bp'lik örtüşme olması gerekmektedir. *adpA* geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerinin tek aşamada pIJ12738'ye yerleştirilebilmesi için primer dizaynında kullanılan DNA

dizisi ve primerlerin bağlanma bölgeleri Şekil 4.2’de verilmiştir.

Oligo 1 primerinin son 19 bç nükleotid dizisi

accggacggggcccgcctcgactccccccatccgtgccccgggggggagttgaccggggtcagtcggg
gccccggggcgacaggagcggggccgaacgggcttccgggagagccgggtcaacgggcggaacgg
gccccgggggtgaacggactcagaggggtgaacgggctcaggggatgacgacgacggggcgctgggcgcg
ccgggagagccgtcccgcgaccgagccgaagatccggcccacgatgccatgggtggagccgaccacga
tcgcgctcggcggagtagtactcccggcgcacttccctccagttcatggcagatgtccccgcgcgctccacc
aggatccacgggacctcggcgagatagtcggcgcaggccagctccagccccagcacctcgggtgcggtg
gtcggggacatcgacgaagacgggcggtcgcacccccgccagaccgtgggtgggacggcgggtggcga
catgaacgatgatcagaccggaaccggaacgcgggcccattgccaatggcgtaggccaatgcgcgctcg
ctggaggtcgaaccgtcgaatccgaccacgacgcccgtgccggaaggcggggtcgcaaggatggcgtga
ctcttccgcccgcgagttccgcgctgggatcggcgatctgcttgcgggtccgcgggttcggggatct
cgtgacctgccatcgggtgtctcggcgaagaaagtccctcgggtgagggatcgacatggcgacagactgt
tgtgtccgggaatcatcttccctgtcccttaccgtaagggtacggcgacactcctctcctgcccagg
gccccgtcggcccaatcgcgctcccaggagcatgcctgaggtcgtgccgtatggcaatgccgatgg
cgtctacagccgcccgcacggcgtcgacggcgtccggcgcgacccccggtgccactccgggtgcggc
ccccggcccgactccggcggcgcgacccgcgtttcaccacgacacaccggacatccaggatctcctgg
ccatcaccggggcgacccgggacagtgccgcgacggcgcccggacgggggtgcgcccgcggggccgggtg
gcggccggggcccggggcgggcgagcggccaccgcccggggccggggcgcgccgctcgagggcatgg
agtccttgacccccgggtccggaaacgacacgcgacccccggccaggacggacaccgtacggacacgaacg
cacacacagcgacacggcggggcgcgccggattccacggcggagcggccgggaaggggacggggaaa
ggacgcggcggtggaagcggggcggaacgggagacgtccgcatccggccgggagaaaggatcacgggtggc
aaagccgcacacaccgggagggcggtccgcaccccctcccgcgggtccgggcccgggtggacggcgcggc
ctgcgcggggcggtcacgggtccggcgtattcgggtccccccgacggccctcgcgcggcacccccgtgc
cgcagtgaccggaaggctccattcctcgttggcacctcgggtcacccccgagggcccaggagcccgtgt
gcccgaaccagcgtcccaccgccccggggcggggcccgcgggtgcccgccccgccccgcgcgcccgg
ccggggacgctccgcccgggcccctccgcccaccgcccgccccggccgcgcccggccccggcgacccc
gtgggggaactgggtgcgctggggcgccctccggctgtctgctcgtccccgtcgcccttgtcggatcgg
atacccgggggcgacgcatgacggcggcactcgggctcgcgcccctgaccaccgctcggggcg
cgctgcggtagcgggagcgcgggcccggacggggcgcccacgcggccccgggcccggcgccgtccccg
ccggacccccggccgaacgggacggacccggacggcgacccgggcccgggtggccaccaccgcaggacacg
tgacacccccggcagggcgccgcacaggccgcacggagggcgccacccccgcgactgaccattc
gcacgctcgcacccgtataatctcagccaacttcgcgcccgtacccatcccttggggaaatgaccgga
ctacccccctgtcacctggaagggaaggggcaaaggcgtccccgcacccctatggggacgggcatgc
gcgggagggcgacttccctgcggggcccgcgagtggaacgcttcgtgatcgaatgcttcgcgccaagt
tctcatggagacatagcggggcatgccgaacttgtcacggcggcgtcacgggacacagtagattcgat
cttgggtatcgaaggctcgttaactcgtgcaaaaccgaggggaaacgtgcaggagcgaaggcccgaaa
cgaacggggagacgcg**aataaccgaggggggcttagcgtc** (Oligo 2 primerinin 1-23 bç arası),
(Altı çizili alan Oligo 3 primerine ait 1-10 bç’lik nükleotid dizisi)

adpA geninin lokasyonu

(Oligo 3 primerinin 11-29 b’lik dizisi, (Altı çizili alan Oligo 2 primerine ait 24-33. bç bölgesi) arası)

aaggtagtcgcatgaacgaccgcatgggtggtgactgcgagatgaccgggctctcgtgacggac
gacgcactcatcgaggtggccgcgctgggtcaccgactcggaaactgaatgtgctcggcgaagggtgga
catcgtgatccgcccccgacgcggcccctcgcgacctgcccggaggtgggtgcggcagatgcacaccg

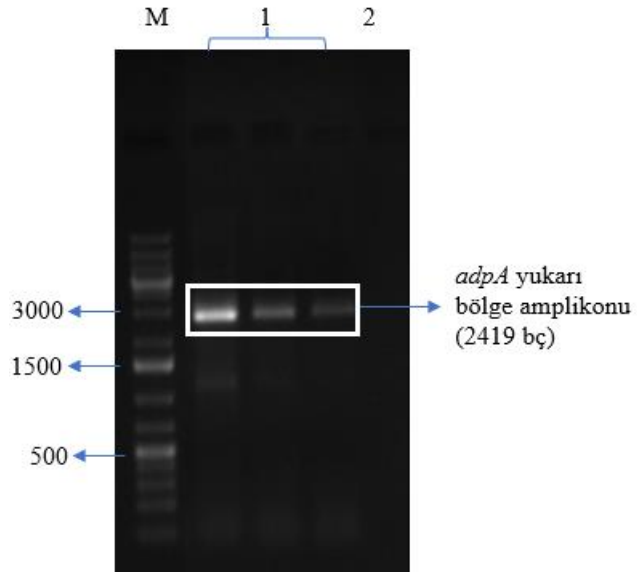
Şekil 4.2. *SCLAV_1956-SCLAV_1959* genlerine ait nükleotit dizileri ve tasarlanan primerlerin lokasyonları (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CM000913.1>)

cctcgggctgctcgacgagctggcggggcggcaccacgctcgccgacgcccaggagcgggtgctcgcc
tacatccgggagcatgtgagggaaaccggggaaaggctccgctgtgcgggaactcgtgggacggaccg
cggcttcctgctcgcgggacatgcccgcctgggagagctggctccactaccggatcgtggacgtctcct
cggtgaggagctggcccgcgctgggtaccggagggcctacttcaacagtccggagaaagtccggcaac
caccgggctgctcgcggaacatcccgagctcgatcgccgagctgcggtactaccgggagggcgtctctcgt
actgcagcccggaccggactcggagacggcgaggacgatcgcggcgaagcagctgctccccgcgaggt
gacgctcgtcggggacgggagggggcggccgcggggccaccggaaaagagtggcgcgagcaccctccc
ggaccctgtagacttcttctcggccgggtcgggaaaacgaccggacatggtgggtgtagctcagctggt
agagcacctgggtggtccaggatgcccggggttcgagtcocgctcactcaccctgatggaccaaggg
ccccggtcggaaagaccgggccccttggcatggttacggggtcgcgggtcaccggtcaccgggttcacc
gcccgtgatccggcacgggagacggaaacagcgcgtcccgggtcggattggggccgaccgggacgccc
gggtgggggggtggggatctcgtcgggtccaccggggggggcgggtactgaccctgcgaggggatacg
ccagcaccataccacgggcatcccggcgaaagagacataggctcactcgccccggcggtttagggtg
cgcttaagccgctcctgcgcggggttaagcagaacccccggcgacagccccgtacgcgagccgacgcc
cctccgccccggaaacggcgcgccggccggggcgggttcccccgcgcgagtgggccatggggcgcggtg
accgcccgggagcgggagagcgggcccctgtctcctgggcccggcggttgcctcgaccctgcggcggggtg
agccgaaggggtgcccggggtgcccgaagcgaagagcgcgcccctggctcttgggcccggcggttggc
ttcgcccccgcgcgagtgggccgaagcgggtgcccggggtgcccgggagcggagagcgggcccctgtctc
ctggggcccggcgatggcccccgccccggcgagtgagccaaaggggtgcccggggtgcccgaagtggtg
agagcgcgagggttccgaggaacgaggaaccgagcagcggtcgaccgctcggcgccagcgttcagcgcc
ccggaggcgaaccgagccacaaaaagcggcgccccctcagttcaggaccgggtgcggtggccgcgggc
ggcggtcgggggtggtgctggtgctgggaggtccaggcccagccagacgcggacttccgtgcccggcagg
accgagcgcctatgcccgacgtctccgcccgtggactccgcgaccccggcgagcagatgtccaggccgag
cccgggtggagccgtcccggccggttgcctcaggcccgggccatcgccgcctcggggtcggcgatccccct
gccccgctcgggagaccaggatgatcaccgatcgtcgcgcttgtggacgtcgaccgagaaggcgggtg
ccctcgggggtggtgcccgaacacattgcccgaggagcgcgtcgagcgcggcgaccagttcggggcggggc
caccggatgcccggacggggcggtcgacgcccgccaccggaccttgcggccctcgtcctcccgagcgcg
cggaccagaagtcctgctcgggaccaccctcggagacatcgaccccgccccggggcggccgccc
gtggtctcgggcttggcctcggggcggtgcccgatgatgctcgaccctcgcgctccagtgttctgac
ggccgcccgggtctgttcggccgcccgggtctcgcgccaggggacgcggcggttcagccgcagcaggtca
gcccgggtgcccgagcgggtgggagaggtcggcgggccagttcccgttcggtggcgaggagttggaccacc
tgggtcggccatggcggttgaaggcgatcgcgccgagcgcagctccggcggtccctcctcggggaccgg
tgccccgagctcgcctcgcaccagttcgtgcccggcgcccgcgagccgctggggcgggctggaccatcc
gtatcccgagccgggtcggcgacggccaccgagcccacgatcagggcgacgcccgcgagcacc
agccaggcgggtggtgacgcccgggagaccctcgtcgtcggggatgaacacctcgacgagcgcgatctg
cccgggtgctgatgcccgggtgggctggaccagtgcccagccgtcctccacctccagggtggcgccctcgg
aggagtgccctggacgcccggccaggctcggcgctccgagaccgggggggagccgatctcgatggggacg
ccgtcccgggacgacggaagggtggtgacccgcgagccgtccgtgaccccacgcccggggcgactcac
ggccagttccagcttggcccggctcgtcgggtgatggacagggcgggggccgatgggtggcggtggcgtt
ccgcttgggtgaaggcgggtcccgggcatctccttgatgaccagccccaggggtaaggcgaacgccc
accacgaccatcgcggtgacggccaggcagacct**tgaccaggggcccatctcat**

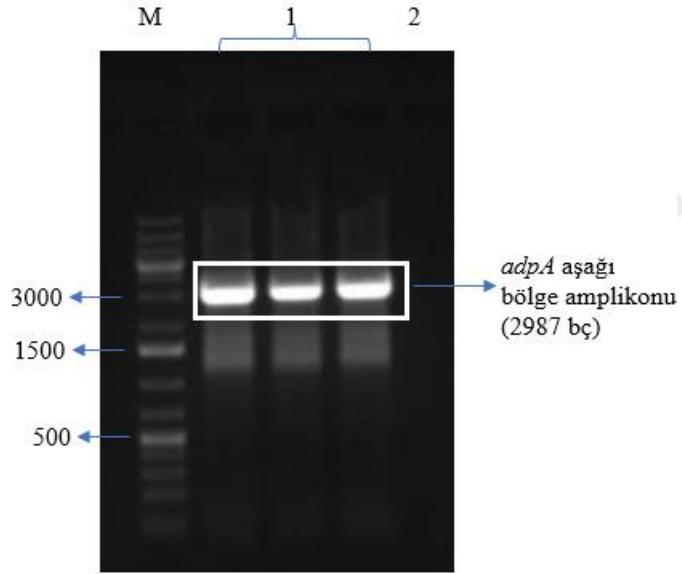
Oligo 4 primerinin 21-39. bç arasındaki nükleotid dizisi

Şekil 4.2. *SCLAV_1956-SCLAV_1959* genlerine ait nükleotid dizileri ve tasarlanan primerlerin lokasyonları (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM000913.1>) (Devam)

adpA geninin yukarı ve aşağı bitişik bölgeleri tasarlanan primerler ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sının yer aldığı CloneAmp™ HiFi PCR Premix (TAKARA) karışımı kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.3-4.4).

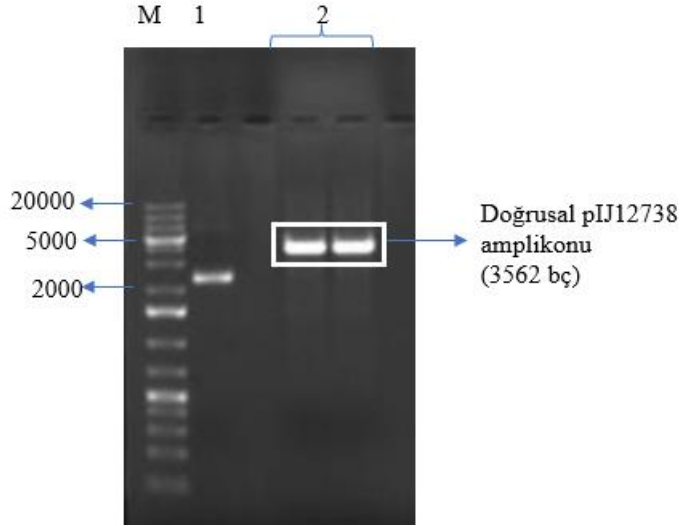


Şekil 4.3. *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: *adpA* yukarı bölge ampliconu, 2: Negatif kontrol PCR



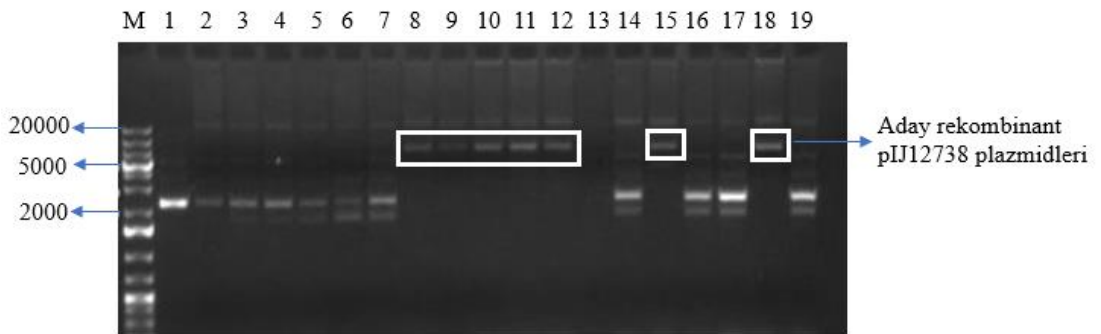
Şekil 4.4. *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: *adpA* aşağı bölge ampliconu, 2: Negatif kontrol PCR

pIJ12738 plazmidi klonlamada kullanılmak üzere KpnI (Fermantas) enzimi kullanılarak doğrusal forma dönüştürülmüştür (Şekil 4.5).



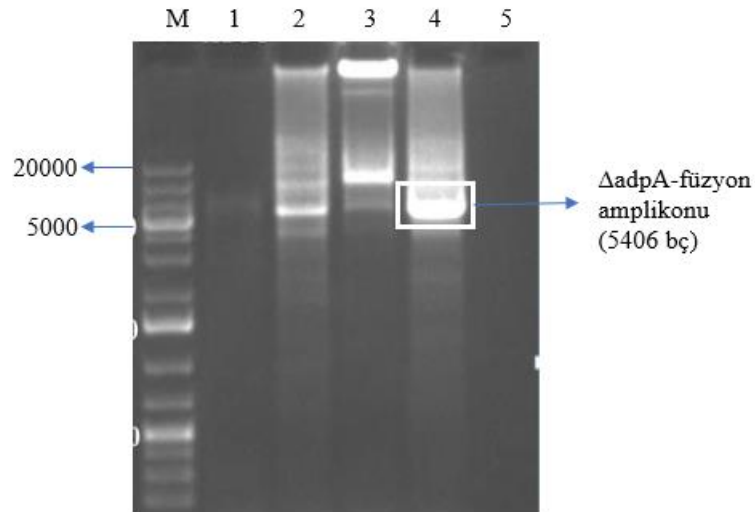
Şekil 4.5. pIJ12738 plazmidinin KpnI enzimi ile kesimi. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pIJ12738 plazmidi, 2: KpnI enzimi ile kesilmiş doğrusal pIJ12738 plazmidi

PCR ve enzim kesim reaksiyonu sonucu elde edilen bantlar jelden kesilerek NucleoSpin® Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda elde edilen fragmentler kullanılarak ligasyon reaksiyonu yapılmıştır. Ardından ligasyon ürünleri *E. coli* DH5 α hücrelerine ısı şoku yöntemi kullanılarak aktarılmıştır. Transformasyon ürünleri seçici besiyeri olarak apramisin (50 μ g/ml) içeren LB agar besiyerine yayma ekim tekniği kullanılarak ekilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonucu elde edilen kolonilerden öncelikle manuel yöntemle plazmid izolasyonu yapılarak aday rekombinant hücreler belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Transformasyon sonucu oluşan hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kontrol için jele yüklenen boş halkasal pIJ12738 plazmidi, 2-19: Transformasyon sonucu elde edilen rekombinant pIJ12738 plazmidleri (KpnI bölgesinde 5406 bç'lik *adpA* aşağı ve yukarı bölgelerini içeren füzyon fragmenti taşıyan pIJ12738 plazmidleri)

Manuel yöntem ile izole edilen 8, 15 ve 18 numaralı koloniler kontrol plazmidine göre daha yukarıda bant verdikleri için Nucleospin plazmid izolasyon kiti (Macharey Nagel) (EK4) aracılığı ile izolasyon yapılmak üzere seçilmişlerdir. İzole edilen plazmidlerde rekombinasyonun doğrulanması için Oligo 1 ve Oligo 4 primerleri (EK5) kullanılarak füzyon fragment ($\Delta adpA$ -füzyon) PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda 5406 bp büyüklüğündeki $\Delta adpA$ -füzyon ampliconu 18 numaralı plazmidten elde edilmiştir (Şekil 4.7). 18 numaralı plazmid PCR reaksiyonu ile doğrulandıktan sonra füzyon fragmentin tüm nükleotid dizisinde herhangi bir mutasyon olup olmadığının kontrol edilebilmesi için dizi içerisinden de primerler tasarlanarak beş farklı bölge (EK5) Sanger dizileme ile dizilenmiştir. Dizileme sonucu herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. 18 numaralı rekombinant pIJ12738 plazmidi pIJ12738 $\Delta adpA$, bu vektörü taşıyan *E. coli* DH5 α hücreleri ise *E. coli* pIJ12738 $\Delta adpA$ olarak isimlendirilmiştir.

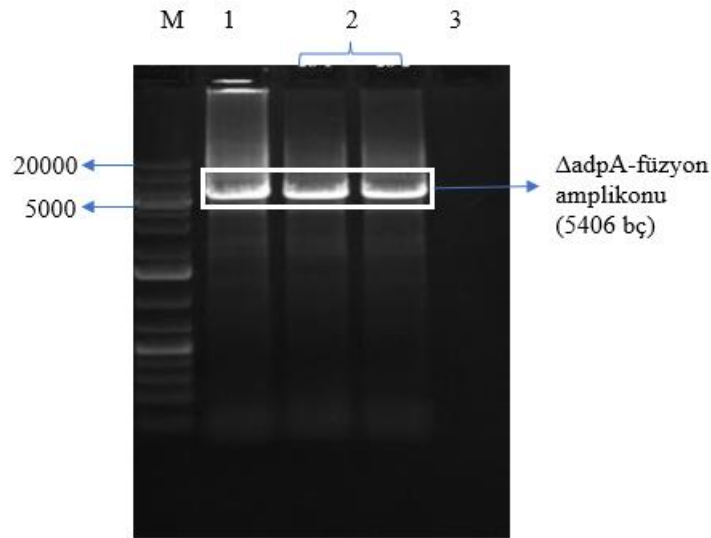


Şekil 4.7. Rekombinant pIJ12738 plazmidinin KpnI bölgesinde 5406 bp'lik *adpA* aşağı ve yukarı bölgelerini içeren füzyon fragmentinin ($\Delta adpA$ -füzyon) PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sının kullanıldığı kontrol PCR (6806 bp), 2-4: Kalıp DNA olarak sırasıyla 8, 15 ve 18 numaralı rekombinant plazmidlerin kullanıldığı PCR, 5: Negatif kontrol PCR (kalıp DNA yerine distile su kullanılmıştır)

4.1.3. Rekombinant pIJ12738 $\Delta adpA$ Vektörünün *E. coli* ET12567/pUZ8002 Hücrelerine Aktarılması

E. coli pIJ12738 $\Delta adpA$ hücrelerinde bulunan rekombinant pIJ12738 $\Delta adpA$ plazmidinin *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşuna konjugasyonla aktarılabilmesi için

sıkı restriksiyon bariyer sistemini elemine etmesi gerekmektedir. Konjugasyon işleminde *E.coli* ET12567/pUZ8002 suşunun içerdiği cis-etkili bir fonksiyona sahip olmayan pUZ8002 plazmidi yardımıyla, *oriT* bölgesini içeren vektörler trans halinde diğer suşa hareket edebilmektedirler (Gust vd., 2002). Bunun için rekombinant pIJ12738 Δ adpA plazmidi metilasyondan yoksun *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine ısı şoku aracılığıyla transformasyonu yöntemi kullanılarak aktarılmıştır. Yapılan transformasyon işleminde bakteriler kanamisin (25 μ g/ml), kloramfenikol (25 μ g/ml) ve apramisin (50 μ g/ml) içeren seçici LA besiyerine ekilmiştir. 37°C’de 16 saat inkübe edildikten sonra besiyerinde oluşan rekombinant kolonilerin doğruluğu PCR reaksiyonu ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.8). Rekombinasyonun doğrulanmasının ardından pIJ12738 Δ adpA’yı içeren *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri *E. coli* pIJ12738 Δ adpAE olarak isimlendirilmiştir.

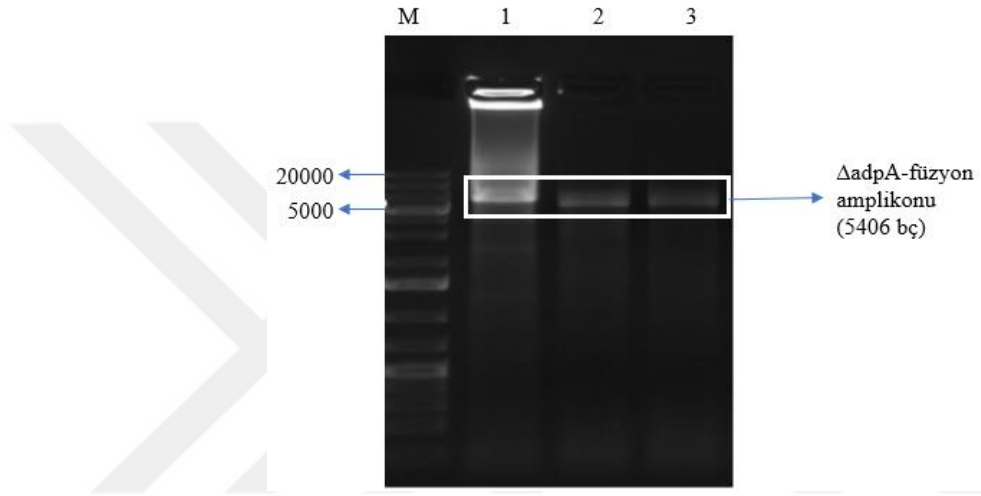


Şekil 4.8. Rekombinant *E. coli* pIJ12738 Δ adpAE’nin PCR ile doğrulanması. M: O’Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak pIJ12738 Δ adpA’nın kullanıldığı kontrol PCR, 2: pIJ12738 Δ adpAE’nin kalıp olarak kullanılması ile elde edilen Δ adpA-füzyon amplikonu, 3: Kalıp olarak DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR

4.1.4. Rekombinant *E. coli* pIJ12738 Δ adpAE ve *S. clavuligerus* Arasında Konjugasyon Reaksiyonu

Rekombinant *E. coli* pIJ12738 Δ adpAE ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşu arasında konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon ürünleri 28°C’de 16-20 saat inkübe edilmiş ve MSA yüzeyine 1 ml hacminde 0.5 mg/ml nalidiksik asit ve 1 mg/ml apramisin içeren karışım yayılarak 28°C’de inkübasyona devam

edilmiştir. 4-5 gün sonra MSA'da oluşan koloniler apramisin (50 µg/ml) içeren TSA besiyerine transfer edilerek 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. TSA besiyerinde üreyen koloniler apramisin (50 µg/ml) içeren TSB besiyerine aktarılmış ve 28°C'de 200 rpm'de 48 saat üretilmiştir. Sıvı kültürde üretilen kolonilerden kit ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant pIJ12738ΔadpA vektörünü taşıyıp taşımadıkları Oligo1 ve Oligo4 (EK5) primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonu ile belirlenmiştir (Şekil 4.9). Rekombinant pIJ12738ΔadpAE'yi içeren suş rekombinant *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.9. *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 suşunda ΔadpA-füzyon fragmnetinin PCR ile amplifikasyonu. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak pIJ12738ΔadpA plazmidinin kullanıldığı kontrol PCR, 2,3: Kalıp olarak rekombinant *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 genomik DNA'larının kullanıldığı PCR sonucu

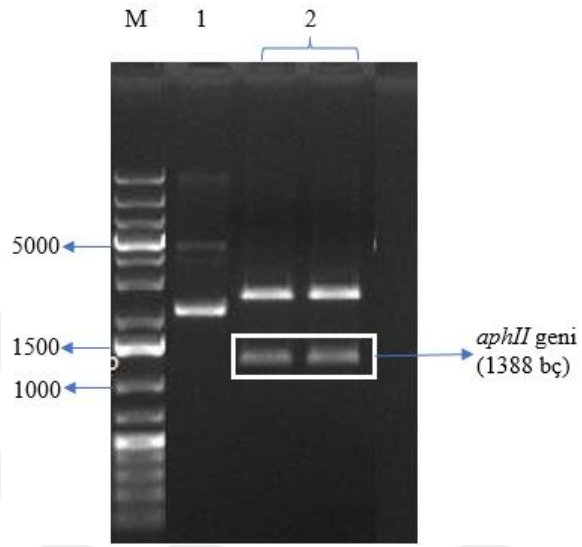
4.1.5. *E. coli* pIJ12742-Km5E ve *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 Hücreleri Arasında Konjugasyon Reaksiyonu

4.1.5.1. pIJ12742 Vektörüne Kanamisin Direnç Geninin Aktarılması

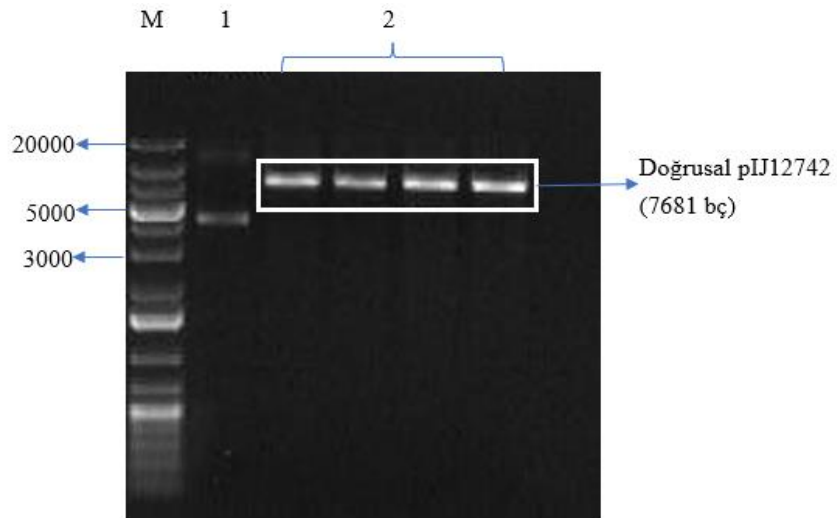
I_SceI genini içeren pIJ12742 plazmidi üzerinde seçilim markörü olarak thiostrepton ve apramisin genleri bulunmaktadır. Mutant hücrenin oluşturulabilmesi için ilk aşamada kullanılan *I_SceI* meganükleaz enziminin tanıma bölgesini içeren pIJ12738 plazmidi de apramisin genini taşımaktadır. Dolayısıyla, kromozomdaki *I_SceI* bölgesinde çift zincir kırığının oluşması için yapılan konjugasyon reaksiyonu sonucu pIJ12742 vektörünü taşıyan hücrelerin seçilimde thiostrepton direnç genine (*tsr*) ihtiyaç vardır. Mevcut çalışma kapsamında MSA'da pIJ12742 plazmidini taşıyan *S. clavuligerus* suşlarının seçilimi için thiostreptonun farklı konsantrasyonları

(1-10 µg/ml) kullanılmış, ancak herhangi bir koloni elde edilememiştir. Bu sebeple seçilimin kolaylaşabilmesi için kanamisin direnç geni (*aphII*) pIJ12742 vektörüne aktarılmıştır.

aphII geninin eldesi için pTC192-Km plazmidi (López- García vd., 2010) kullanılmıştır. EcoRI (Thermo Scientific™)) enzimi ile *aphII* geni vektörden çıkarılmıştır (Şekil 4.10). BspI (Thermo Scientific™)) enzimi kullanılarak doğrusal pIJ12742 vektörü elde edilmiştir (Şekil 4.11).

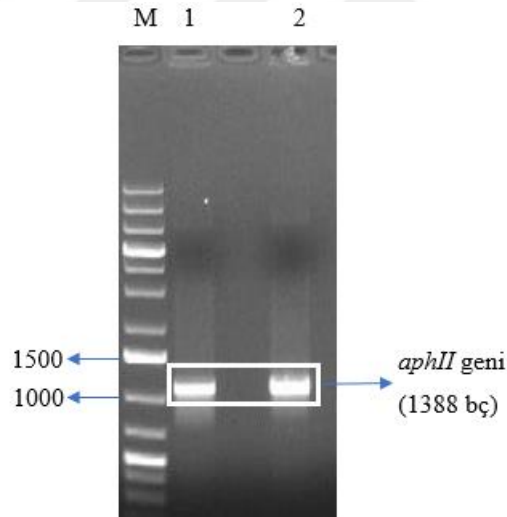


Şekil 4.10. pTC192-Km vektörünün EcoRI enzimi ile kesimi. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pTC192-Km, 2: EcoRI enzimi ile kesilmiş doğrusal pTC192-Km vektörü (2665 bç) ve 1388 bç'lik *aphII* geni

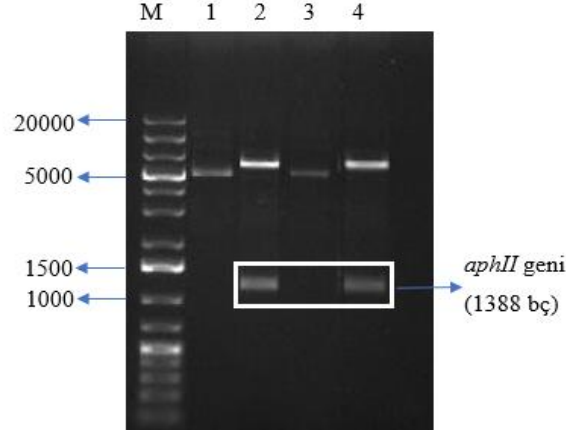


Şekil 4.11. pIJ12742 vektörünün BspI enzimi ile kesimi. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pIJ12742 vektörü, 2: BspI enzimi ile kesilmiş doğrusal pIJ12742 vektörü

Enzim kesim reaksiyonları sonucu elde edilen fragmentler jelden kesilerek saflaştırılmıştır. *aphII* genine T4 DNA Polimeraz ile küt uç oluşturma ardından doğrusal pIJ12742 vektörüne alkalın fosfataz işlemi uygulanmış ve ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon ürünleri transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarıldıktan sonra kanamisin (50 μ g/ml) içeren seçici LA besiyerine ekilmişlerdir. 30°C’de 16 saat inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidlerden Aph_II (EK5) olarak isimlendirilen kanamisinini çoğaltılması için tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapılmıştır (Şekil 4.12). PCR reaksiyonunun ardından HindIII (Thermo Scientific™) ve XbaI (Thermo Scientific™) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen kesim reaksiyonları ile de bu plazmidlerde kanamisin geninin (*aphII*) varlığı ispatlanmıştır (Şekil 4.13).

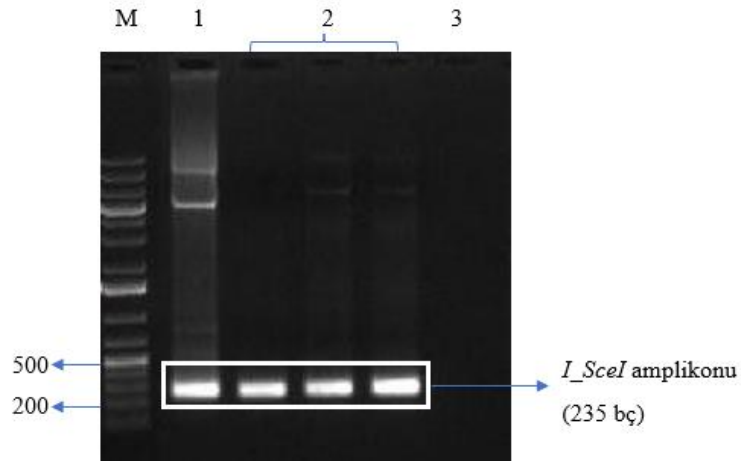


Şekil 4.12. Rekombinant pIJ12742 vektöründe yer alan *aphII* geninin PCR amplifikasyonu. M: O’GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak 4 numaralı koloniden izole edilen rekombinant pIJ12742’nin kullanıldığı PCR sonucunda elde edilen *aphII* amplikonu, 2: Kalıp olarak 5 numaralı koloniden izole edilen rekombinant pIJ12742’nin kullanıldığı PCR sonucunda elde edilen *aphII* amplikonu

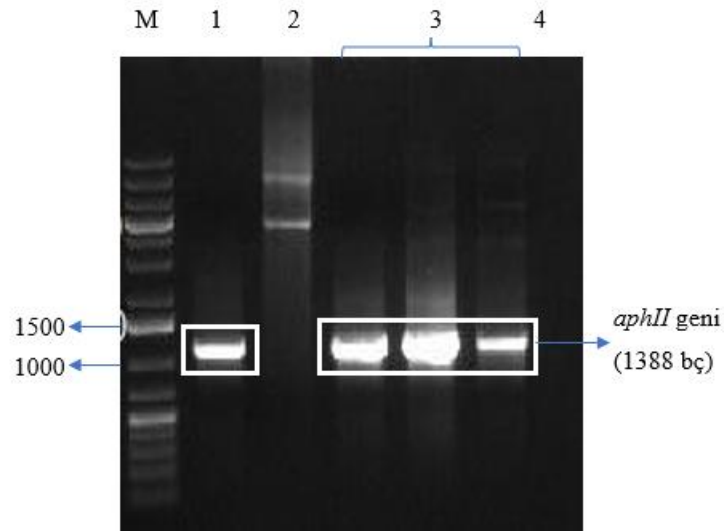


Şekil 4.13. Kanamisin içeren rekombinant pIJ12742 plazmidinin HindIII ve XbaI enzimleri ile kesimi. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: 4 numaralı rekombinant halkasal pIJ12742 plazmidi, 4: HindIII-XbaI enzimi ile kesilmiş 4 numaralı rekombinant pIJ12742 plazmidi, 3: 5 numaralı rekombinant halkasal pIJ12742 plazmidi, 5: HindIII-XbaI enzimi ile kesilmiş 4 numaralı rekombinant pIJ12742

PCR ve enzim kesim reaksiyonu ile kanamisin geninin varlığı doğrulanan plazmidlerden 5 numaralı olan (pIJ12742-Km5) konjugasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere *E. coli* ET1256/pUZ8002 hücrelerine transformasyonla aktarılmıştır. Elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmış, kanamisin ve I_SceI_check primerleri (EK5) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu ile pIJ12742-Km5 plazmidinin *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerindeki varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.14 ve 4.15). pIJ12742-Km5 plazmidini içeren *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri *E. coli* pIJ12742-Km5E olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.14. pIJ12742-Km5 vektörünün *E.coli* ET1256/pUZ8002 içerisindeki varlığının *I_SceI* gen bölgesinin çoğaltıldığı PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak pIJ12742 vektörünün kullanıldığı PCR, 2: Kalıp olarak pIJ12742-Km5E vektörünün kullanıldığı PCR, 3: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR



Şekil 4.15. pIJ12742-Km5 vektörünün *E.coli* ET1256/pUZ8002 içerisindeki varlığının *aphII* gen bölgesinin çoğaltıldığı PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak pTC192-Km vektörünün kullanıldığı PCR, 2: pIJ12742 vektörünün kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR, 3: Kalıp olarak kanamisin genini içeren pIJ12742-Km5E vektörünün kullanıldığı PCR, 4: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR

4.1.5.2. Konjugasyon ve Kromozomdaki *I_SceI* Bölgesinde Çift Zincir Kırığının Oluşması

aphII genini içeren *E. coli* pIJ12742-Km5E suşu ile *S. clavuligerus* pIJ12738 Δ adpA-1 suşu arasında konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon ürünleri MSA üzerine yayma ekim tekniği ile yayıldıktan sonra 28°C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası MSA'ların yüzeyine 1 ml hacminde 0.5 mg/ml nalidiksik asit, 0.5 mg/ml apramisin ve 0.5 mg/ml kanamisin içeren karışım eklenmiş, yayıcı ile agar yüzeyine emdirildikten sonra 28°C'de inkübasyona devam edilmiştir. 4-5 gün sonra oluşan koloniler, kanamisin (25 μ g/ml) ve apramisin (25 μ g/ml) içeren seçici TSA besiyerine transfer edilmiş ve üreyen kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Konjugasyon işleminin sonucunda elde edilen kolonilerde pIJ12742-Km5E vektörüne ait *I_SceI* enziminin, rekombinant *S. clavuligerus* pIJ12738 Δ adpA-1 suşunda *I_SceI* enzim tanıma bölgesinde yer alan dizide çift zincir kırığı oluşturması ve kromozomda meydana gelen bu kırığın onarımının homolog rekombinasyon ile yapılması beklenmektedir. Bu onarımın gerçekleşmesi sonucunda orjinal genotipi ve mutant genotipi içeren bir koloni karışımı oluşmaktadır. Mutant genotipe sahip kolonilerin tespiti için izole edilen genomik DNA'lardan hem *adpA* genini çoğaltan primerler (EK5) hem de

genin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerinden tasarlanan doğrulama primerleri (EK5) (Şekil 4.16) kullanılarak iki farklı PCR gerçekleştirilmiştir.

(adpAD_F Doğrulama İleri Primer Dizisi)

gcttcgcgcccaagttctcatggagacatagcggggcatgccgaacttgtcacggcgccgtcacgggac
acagtagattcgatcttgggtatcgaaggctcgtaactcgtgcaaaaccgaggggaaacgtgcaggag
cgaaagggcccgaacgaacggggagacgcgaataaccgaggggggcttagcgtc

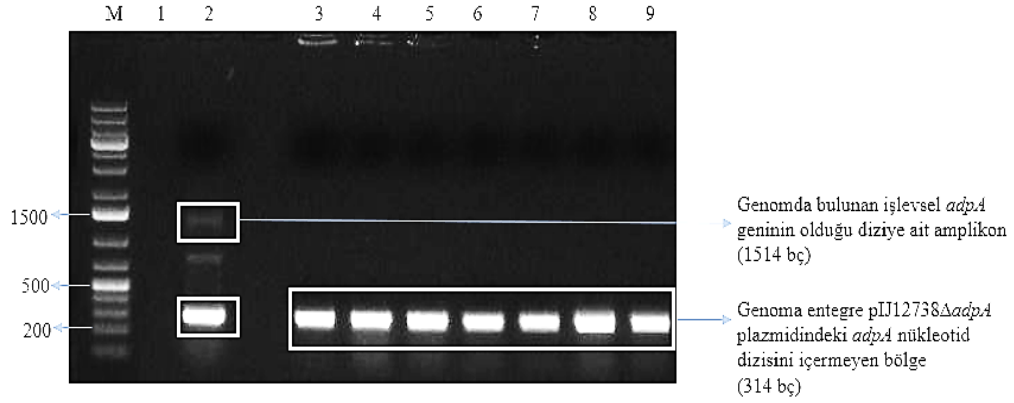
(adpA_F Primer Dizisi)

atgagtcaggactccgcgcaccggaggcggcaccggaagctctcggggcgccggcgccgggaagtgcg
cgccgtgctgctcttcagtgggcgccccatttttgagagttccatcccgtctcgggtgttcggaatcg
accgtcaggacgcggagttcctcgtaccgactgctcgtgctgcgcggcgagggaagggccgctgccc
accaccggcggtctcgaactgaccgcaccgtaacggcctggaggccatcggcagagcgggcacggtcgt
cgtaccggcatggcggtccatcacatcgccgccaccgcccgaagcgtcgcagcgcctgctgcgcgc
acgaggaaggagcgcggatagtcggactgtgcacggggcgcttcgtcctcgccgcggcggactgctg
gacggcagggcccgcgacgcgcaactggatgtacgcgcggcagcgtggccaagcggatccgtccgtcca
tgtcgatccgcgggagctggtcgtcgcagcggcgatgtgctcacctcggccggcagcggcgccgggca
tcgacctctgtctgcacatcgtgcgcaccgaccacggcaccgagggccggggcgctcgcccgcagg
ctggctgtaaccgccccggcgcagcggcggtcaggagcgtacacctggacaggtctttaccagaggaat
cgggtcggaccgcgtggccgaggtcgtctcctggggcgctggaacatcttcacgagcagttcgacgtgg
agacgctggcgccagggcgtacatgagccgacggacgttcgaccggcgattccgctcactcaccggc
agtgcctccgctccagtggtgatcactcagcgggtgctccaggcgcagcggctcctggagacgtcggg
ctactccgtggacgaggtcgcggggcgctgcccgttcggcttcgcccgtggcgctgcccggacacttcc
gcaggcagctcggctcgtccccggcggcctaccggggcgccctaccgggtgcccagggccccagggcgac
tccgccccggcgtcactggtggactcgggtggtaccggccaggcagacgtacggcggcagcccgggc
aggtccggggcgggccctcgtccgtccctcctgagctggggaaagcctccgctccggcgcctatgcccgg
gccacgggcgtcccagcctgcccggggcagcggagcgcgccataa (adpA_R Primer Dizisi)

ggtagtcgatgaacgaccgatggtgtggatcgactgagagatgaccgggctctcgtcgcaggacga
cgcactcatcgaggtggccgcgctgggtcaccgactcggaactgaatgtgctcgggca (adpAD_R
Doğrulama Geri Primer Dizisi)

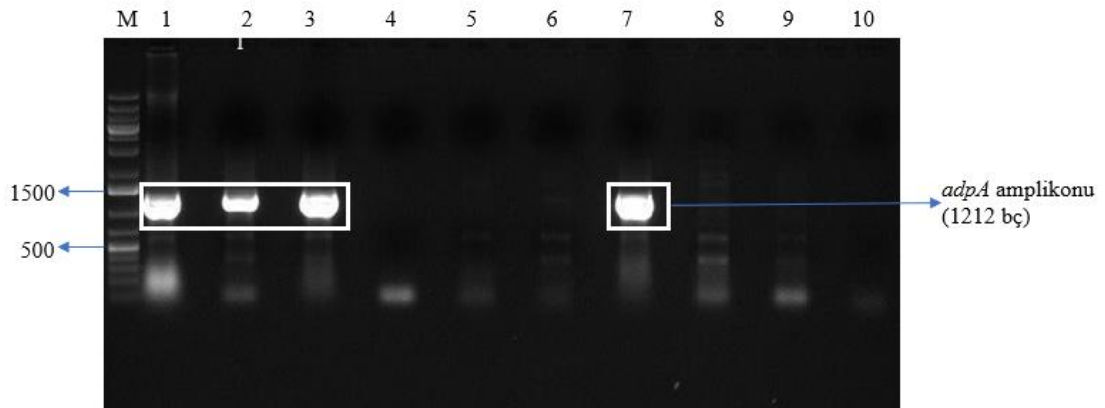
Şekil 4.16. *adpA* nükleotid dizisi ve 5' yukarı ve 3' aşağı kısımlarındaki diziler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CM000913.1>).

AdpA doğrulama primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonunda *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 suşunun genomik DNA'sı kullanıldığında, kromozomda *adpA* geninin olduğu 1514 bp'lik bölge ve pIJ12738ΔadpA-1 plazmidi aracılığı ile kromozoma entegre edilen 314 bp'lik amplikonun oluşması, mutant suşda ise *adpA* geninin homolog rekombinasyon ile silinmesi sonucu sadece 314 bp'lik bölgenin çoğalması beklenmektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. AdpAD_F ve _R doğrulama primerleri kullanılarak yapılan PCR. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR. 2: Kalıp olarak *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 3-9: Putatif mutant *S. clavuligerus* ΔadpA kolonilerine ait genomik DNA'lar kullanılarak elde edilen PCR ampliconları, sırasıyla # 4, 5, 6, 7, 8, 9

adpAF ve adpAR primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonunda *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 suşunda 1212 bç'lik *adpA* geni çoğalırken, mutant suşda ise *adpA* geni genomdan silindiği için herhangi bir amplicon oluşumu gerçekleşmemelidir (Şekil 4.18).

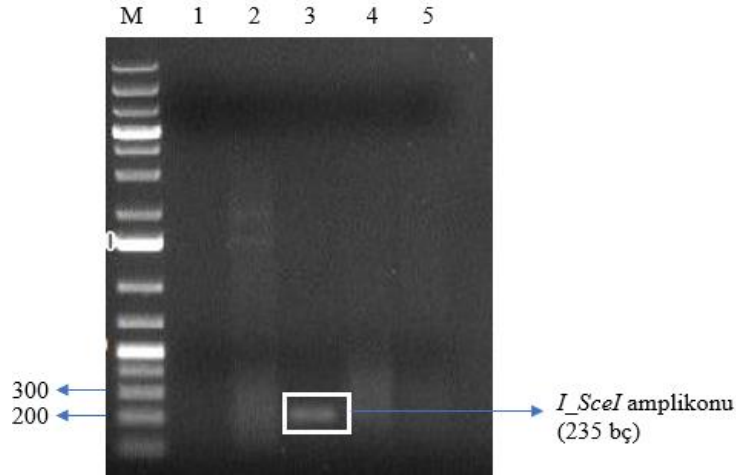


Şekil 4.18. adpA primerleri kullanılarak yapılan PCR. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: *S. clavuligerus* NRRL 3585'in genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu elde edilen adpA ampliconu, 2: Kalıp olarak *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 3-9: Putatif mutant *S. clavuligerus* ΔadpA kolonilerine ait genomik DNA'lar kullanılarak elde edilen PCR ampliconları, sırasıyla # 3,4, 5, 6, 7, 8, 9. 10: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR

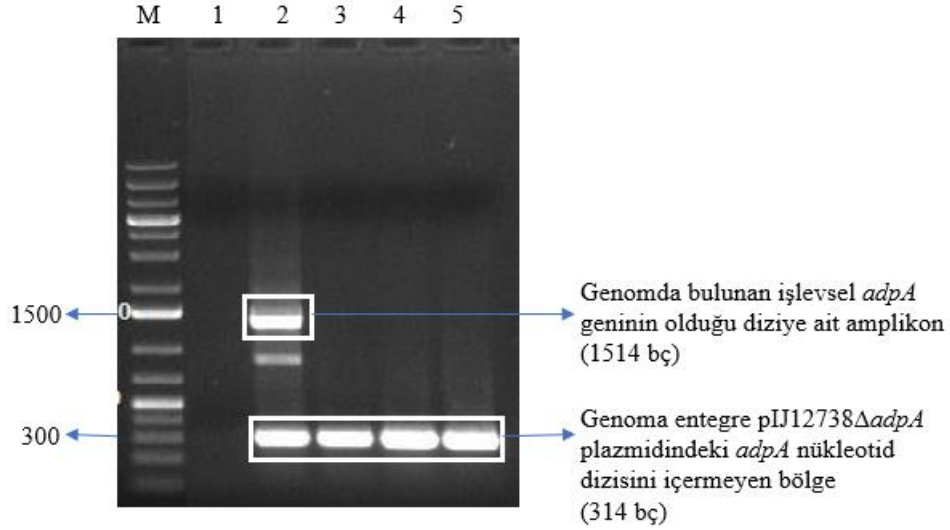
Sonuçlar incelendiğinde, aday mutant suşlardan 4, 5, 6, 8 ve 9 numaraların bu koşulu sağladıkları görülmektedir.

4.1.5.3. Ekskonjugantlarda Bulunan pIJ12742 Plazmidinin Hücreden Atılması

pIJ12742 plazmidi ısıya duyarlı, 30°C üstündeki sıcaklıklarda stabilitesi kaybolan bir vektördür (Fernández-Martínez ve Bibb, 2014). Yapılan doğrulama çalışmaları sonucunda elde edilen mutant suşlardan pIJ12742 plazmidinin uzaklaştırılması için bu suşlar 37°C'de 220 rpm'de 50 ml TSB besiyerinde 8 gün boyunca üretilmiştir. Üretilen suşlar daha sonra TSA besiyerine tekrar ekilmiş ve 37°C'de ve 7-10 gün süresince inkübe edilerek koloni oluşumu takip edilmiştir. İnkübasyon sonunda, *S. clavuligerus* Δ adpA-5 suşunda koloni oluşumu elde edilmiş ve oluşan kolonilerden TSA besiyerine çizgi ekimi yapılarak 28°C'de 2-3 gün inkübasyon yapılarak kolonilerin gelişimi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası seçilen kolonilerden kanamisin (25 µg/ml) içeren TSA'ya baskı (replika plate) yapılmıştır. 28°C'de ve 2-3 gün inkübasyon sonrasında kanamisinli (25 µg/ml) TSA petrilerinde koloni oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Replika plate yapıldıktan sonra kanamisin seçiciliğinde üremeyen koloniler seçilerek sıvı kültürleri elde edilmiş ve bu suşlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'lar I_SceI_check primerleri ve AdpA doğrulama primerleri (EK5) kullanılarak PCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 4.19-4.20).



Şekil 4.19. I_SceI_check_F ve _R primerleri kullanılarak yapılan PCR. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR. 2: Kalıp olarak *S. clavuligerus* pIJ12738 Δ adpA-1 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 3: *S. clavuligerus* Δ adpA-5 genomik DNA'sı kullanılarak elde edilen PCR ampliconu, 4-5: Sıcaklık muamelesi sonucu pIJ12742 plazmidini hücreden atan kolonilere ait genomik DNA kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları



Şekil 4.20. AdpAD_F ve _R doğrulama primerleri kullanılarak yapılan PCR. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR. 2: Kalıp olarak *S. clavuligerus* pIJ12738ΔadpA-1 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 3: *S. clavuligerus* ΔadpA-5 genomik DNA'sı kullanılarak elde edilen PCR ampliconu, 4-5: Sıcaklık muamelesi sonucu pIJ12742 plazmidini hücreden atan kolonilere ait genomik DNA kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları

Doğrulama çalışmaları sonucu elde edilen 4 ve 5 numaralı iki mutant suş *S. clavuligerus* ΔadpA1 ve *S. clavuligerus* ΔadpA2 olarak isimlendirilmişlerdir. Kromozom üzerinde *adpA* delesyonu şekildeki gibidir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *S. clavuligerus* ΔadpA1 ve ΔadpA2 mutant suşlarına ait kromozomda *adpA* geninin yok edildiği bölge

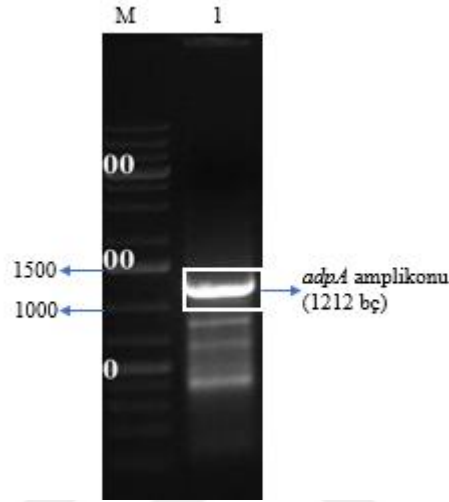
4.2. *S. clavuligerus* compAdpA Suşunun Elde Edilmesi

Kromozomdan silinmiş *adpA* geninin tekrar genoma geri kazandırılması amacıyla gerçekleştirilen komplementasyon çalışmasında, *S. clavuligerus* ΔadpA1 mutant suşunun genomuna *adpA* geni bir entegrasyon vektörü aracılığı ile geri

aktarılmıştır. Bu amaçla, *adpA* geni önce ara klonlama vektörü olan pGEM®-T Easy vektörüne ardından ise pSET152ErME* entegrasyon vektörüne klonlanmıştır.

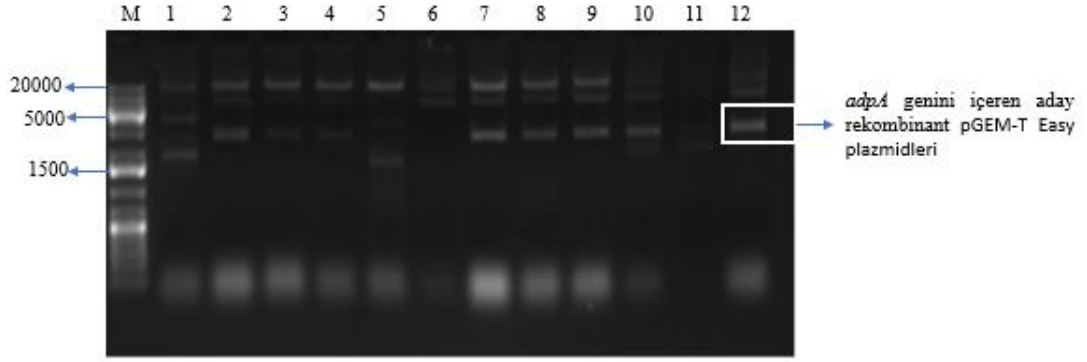
4.2.1. *adpA* Geninin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması

1212 bp'lik *adpA* geni, AdpA_F ve adpA_R primerleri ile *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.22).



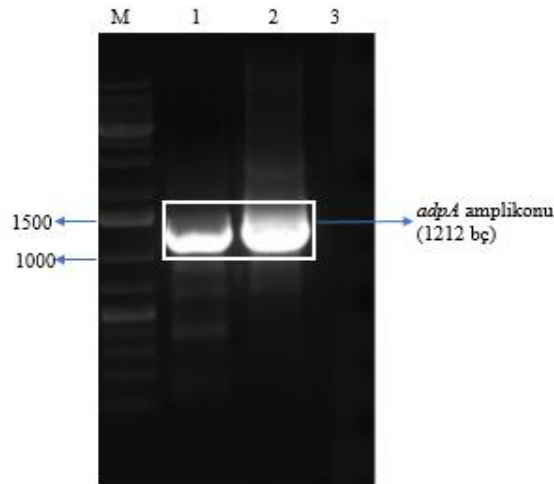
Şekil 4.22. *adpA* geninin PCR ile çoğaltılması. M: O'Gene ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen fragment NucleoSpin® Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Elde edilen jel ekstraksiyon ürünü pGEM®-T Easy ara klonlama vektörüne ligasyon ile yerleştirilmiş ve ardından transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon ürünü ampisilin (100 μ g/ml) içeren ve mavi-beyaz koloni seçilimini sağlayan 40 μ l X-gal (20 mg/ml) ile 4 μ l IPTG (100 mg/ml) yayılmış LA besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmişlerdir. Mavi-beyaz koloni seçilimine göre beyaz koloniler tekrar ampisilin (100 μ g/ml) içeren besiyerine aktarılmış ve manuel yöntem ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23).

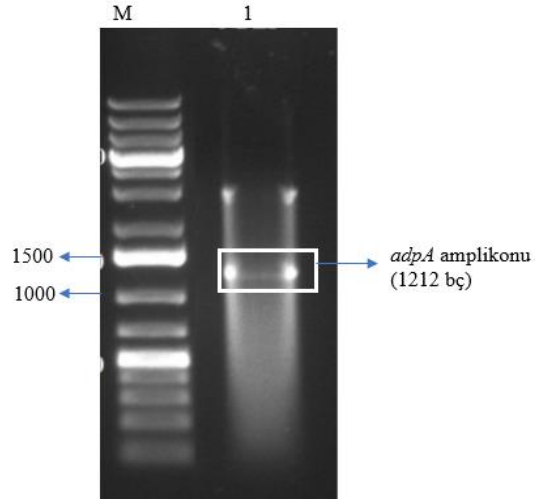


Şekil 4.23. Transformasyon sonucu oluşan hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Mavi koloniden elde edilen halkasal pGEM-T® Easy, 2-12: Putatif *adpA* geni taşıyan pGEM®-T Easy plazmidleri

Manuel plazmid izolasyonu sonucu 2 numaralı koloniden elde edilen plazmid kontrolden daha yukarıda fragment verdiği için bu koloniden ekim yapılarak kit ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmid kullanılarak gerçekleştirilen PCR ve kesim reaksiyonu (NotI-NdeI [Thermo Scientific™] (EK4) enzimleri kullanılarak yapılmıştır) ile *adpA* geninin varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.24- 4.25). Klonlama sonucunda elde edilen rekombinant vektöre pGEMTadpA, bu vektörü içeren rekombinant *E. coli* DH5α hücrelerine *E. coli* pGEMTadpA adı verilmiştir. Ayrıca, Sanger dizileme ile klonlanan amplicona ait nükleotid dizisinin doğruluğu teyit edilmiştir.



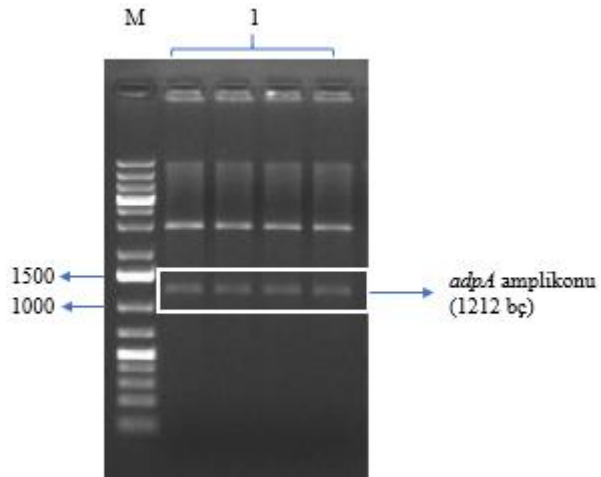
Şekil 4.24. Rekombinant pGEMTadpA'nın PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu, 2: pGEMTadpA DNA'sı ile yapılan PCR ile elde edilen *adpA* ampliconu, 3: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR'ı



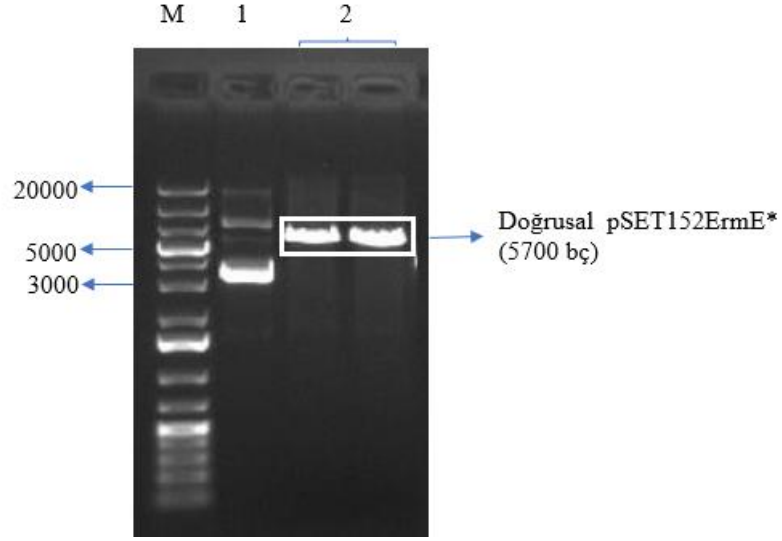
Şekil 4.25. Rekombinant pGEMTadpA'nın enzim kesimi (NotI-NdeI ile kesim) ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: pGEMTadpA'nın NotI-NdeI ile kesimi sonrasında elde edilen *adpA* geni

4.2.2. *adpA* Geninin pSET152ermE*'ye Klonlanması ve Konjugasyon Reaksiyonu

adpA geninin pSET152ermE* entegrasyon vektörüne klonlanması işleminde öncelikle pGEMTadpA vektörü (70.6 ng/µl) ve pSET152ermE* (337.8 ng/µl) EcoRI enzimi ile farklı reaksiyonlarda 2 saat boyunca 37°C'de kesilmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27).

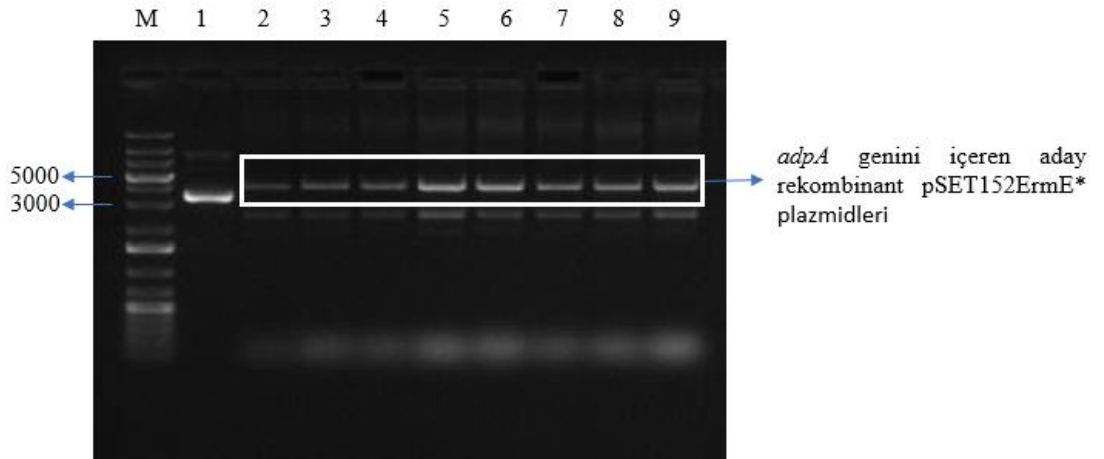


Şekil 4.26. pGEMTadpA'nın EcoRI enzimi ile kesimi. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1-4: pGEMTadpA'nın EcoRI enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen *adpA*



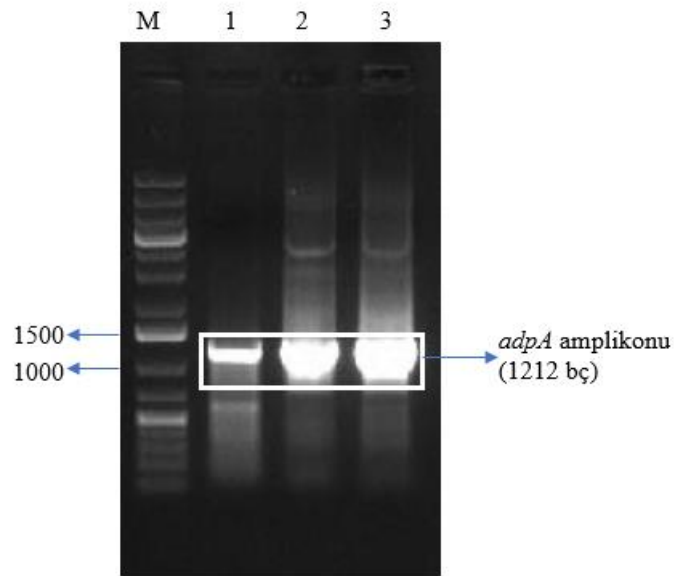
Şekil 4.27. pSET152ErmE* plazmidinin EcoRI enzim ile kesimi. M: O'Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pSET152ErmE* plazmidi, 2,3: EcoRI enzimi ile kesilmiş doğrusal pSET152ErmE*

PCR ve enzim kesim reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jelden kesilerek NucleoSpin® Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel) ile saflaştırılmıştır. Alkalın fosfataz işlemi uygulanan doğrusal pSET152ErmE* plazmidine *adpA* geni ligasyon ile yerleştirildikten sonra oluşan ligasyon ürünü de *E. coli* DH5 α hücrelerine ısı şoku yöntemi ile aktarılmıştır. Transformasyon ürünü apramisin (50 μ g/ml) içeren LA besiyerinde 37°C'de 16 saat inkübe edilmiş ve elde edilen kolonilerden manuel plazmid izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.28).

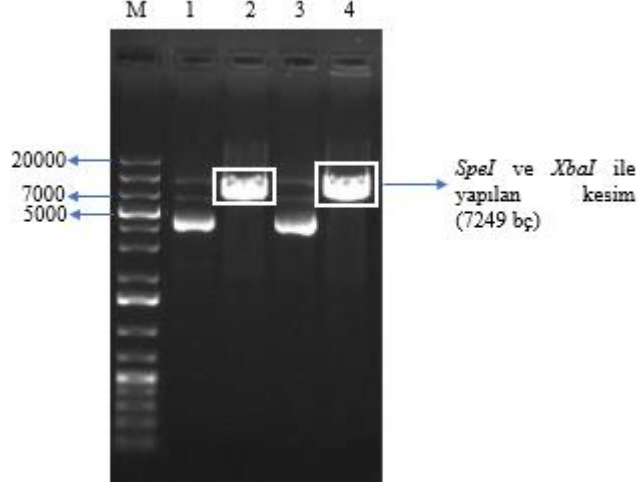


Şekil 4.28. Transformasyon sonucu oluşan putatif rekombinant hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pSET152ErmE* plazmidi (5.7 kb), 2-9: *adpA* genini taşıdıkları varsayılan rekombinant plazmidler

Manuel plazmid izolasyonu sonucu 5 ve 6 numaralı koloniler kontrolden daha yukarıda bant verdiği için seçilmiş ve kit ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrasında PCR, ve SpeI-XbaI (Thermo Scientific™) (EK4) enzimleri kullanılarak yapılan kesim reaksiyonu ile rekombinasyon doğrulanmıştır (Şekil 4.29-Şekil 4.30). SpeI-XbaI kesimi sonucunda *adpA* geninin pSET152ErmE* plazmidinde promotor yönünde girip girmediği belirlenmiştir. pGEMTadpA vektöründen *adpA* geninin *EcoRI* enzimi ile kesilerek çıkarılması sırasında SpeI enzimi, genin 3' ucunda kalmaktadır. Dolayısıyla ile, genin entegrasyon plazmidine promotorun devamında doğru yönde girmesi durumunda SpeI-XbaI kesimi sonucunda *adpA* geninin vektör içinde kaldığı doğrusal ve 7249 bp büyüklüğünde bir rekombinant pSET152ErmE* plazmidi elde etmek gerekmektedir. Bu koşulu sağlayan rekombinant pSET152ErmE* plazmidleri pSETadpA4 ve pSETadpA5 olarak isimlendirilmiştir.

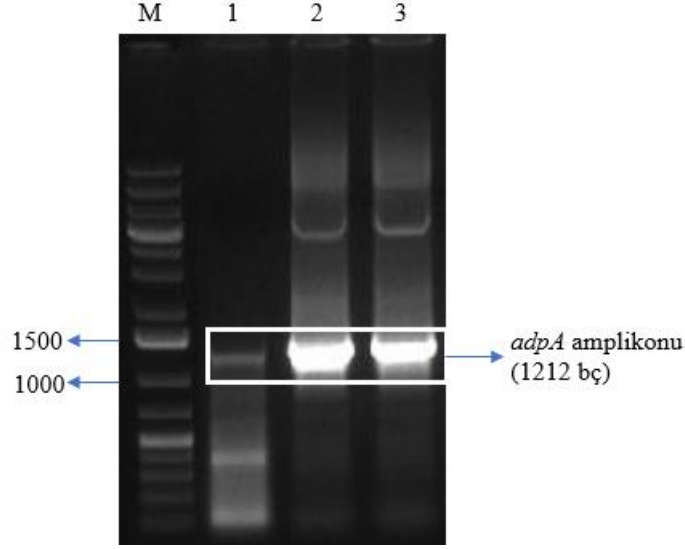


Şekil 4.29. pSETadpA4 ve pSETadpA5 rekombinant plazmidlerinde *adpA* genininin PCR amplifikasyonu. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S. clavuligerus* genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 2: Kalıp olarak pSETadpA4 plazmidinin kullanıldığı PCR, 3: Kalıp olarak pSETadpA5 plazmidinin kullanıldığı PCR



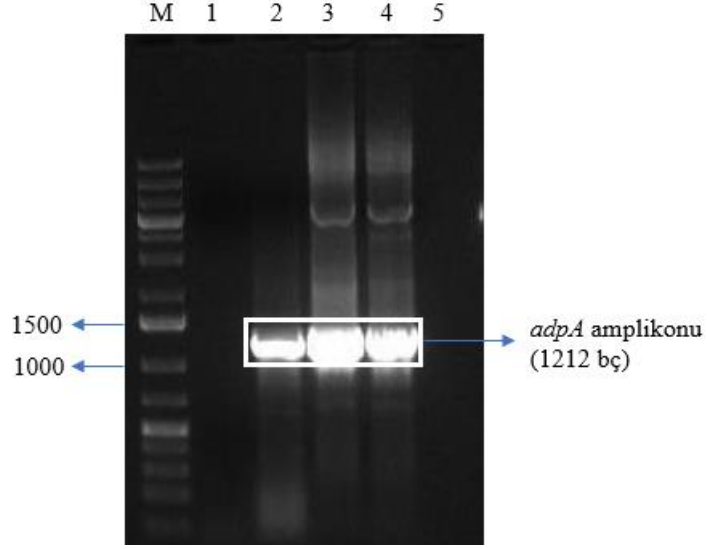
Şekil 4.30. *adpA* genini *EcoRI* kesim bölgesinde taşıyan rekombinant pSET152Erme*'nin *SpeI* ve *XbaI* ile kesim sonuçları. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: pSETadpA4 halkasal plazmid, 2: pSETadpA4 *SpeI* ve *XbaI* ile kesilmiş doğrusal plazmid 3: pSETadpA5 halkasal plazmid, 4: pSETadpA5 *SpeI* ve *XbaI* ile kesilmiş doğrusal plazmid

PCR reaksiyonu ve enzim kesim reaksiyonu ile doğrulanan, pSETadpA4 ve pSETadpA5 vektörlerini taşıyan rekombinant *E. coli* DH5 α hücreleri *E. coli* pSET4 ve *E. coli* pSET5 olarak isimlendirilmiştir. Konjugasyon öncesinde *E. coli* DH5 α hücrelerindeki pSETadpA4 ve pSETadpA5 vektörleri transformasyonla *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılmıştır. Elde edilen kolonilerden birer tanesi seçilip kit ile plazmid izole edilmiştir. İzole edilen plazmidler PCR reaksiyonu ile doğrulanmıştır (Şekil 4.31). *E. coli* ET2567/pUZ8002 hücrelerindeki pSETadpA4 ve pSETadpA5 vektörleri pSETadpA4E ve pSETadpA5E, bu rekombinant plazmidleri taşıyan metilasyondan yoksun *E. coli* suşları ise *E. coli* pSETadpA4 ve *E. coli* pSETadpA5 olarak isimlendirilmişlerdir.



Şekil 4.31. *adpA* genini taşıyan pSET152Erme* vektörünün *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine traanformasyonunun PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S.clavuligerus* genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 2-3: Kalıp olarak pSETadpA4E plazmidinin kullanıldığı PCR, 4-5: Kalıp olarak pSETadpA5E plazmidinin kullanıldığı PCR, 6: Kalıp olarak DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR.

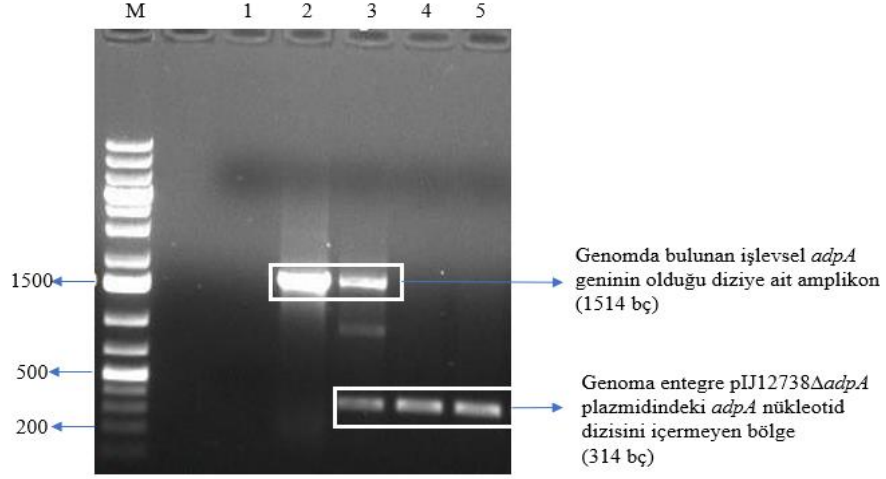
Transformasyon sonucu elde edilen rekombinant *E. coli* pSETadpA4 ve *E. coli* pSETadpA5 ile mutant *S. clavuligerus* Δ adpA1 ve *S. clavuligerus* Δ adpA2 suşları arasında konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon sonrası apramisin seçiciliğinde üreyen kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA ile yapılan PCR sonucunda mutant *S. clavuligerus* Δ adpA'ların genomuna *adpA* geninin entegrasyonunun sağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Elde edilen kolonilerden adpA_F ve adpA_R primerleri kullanılarak PCR yapılmış ve istenen entegrasyonun sağlandığı doğrulanmıştır. PCR reaksiyonu ile doğrulanan suşlardan bir tanesi seçilerek *S. clavuligerus* comp Δ adpA olarak adlandırılmış, stokları yapılarak -86 °C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 4.32. Komplementasyonun PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: *S. clavuligerus* Δ adpA1 genomik DNA'sı kullanılarak adpA_F ve R primerleri ile yapılan PCR, 2: Kalıp olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 3-4: Kalıp olarak komplementasyon sonucunda elde edilen suş DNA'larının kullanıldığı PCR

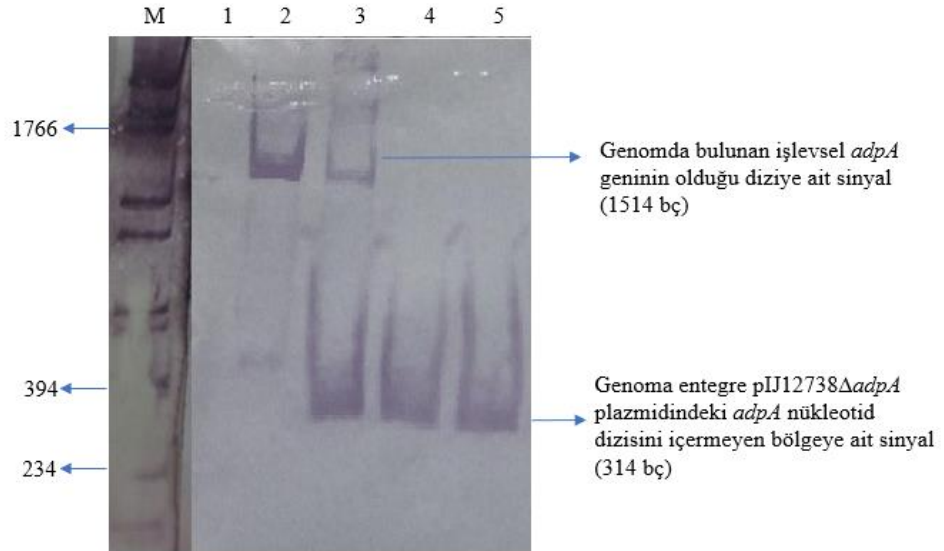
4.3. *S. clavuligerus* Δ adpA ve *S. clavuligerus* comp Δ adpA Suşlarının Southern Blot Deneyi İle Doğrulanması

Mutant *S. clavuligerus* Δ adpA1, *S. clavuligerus* Δ adpA2 ve *S. clavuligerus* comp Δ adpA1 suşlarının Southern Blot deneyi aracılığı ile doğrulanması yapılmıştır. Southern Blot deneyinde DIG DNA Labeling and Detection Kit-(Roche-11093657910) ve naylon membran (Biobond Plus) kullanılmıştır. Doğrulama çalışmasında AdpAD_F ve AdpAD_R primerleri ile PCR yapılmış ve kontrol için 5 μ l agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. *S. clavuligerus* Δ*adpA1* ve Δ*adpA2* mutantlarıyla AdpAD_F ve adpAD_R primerleri kullanılarak yapılan PCR. M: O'Generuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine dH₂O'nun kullanıldığı kontrol PCR, 2: *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR, 3: Kalıp olarak *S. clavuligerus* compΔ*adpA1* genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 4: Kalıp olarak *S. clavuligerus* Δ*adpA1* genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR sonucu, 5: *S. clavuligerus* Δ*adpA2* suşlarına ait ait genomik DNA'sı kullanılarak elde edilen PCR ampliconları

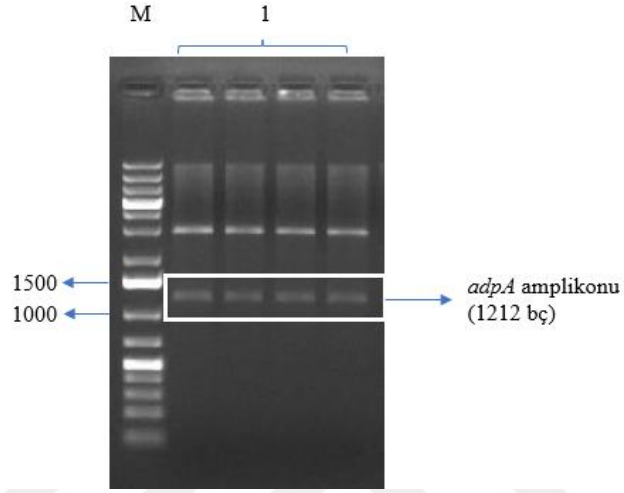
Şekil 4.33'de verilen PCR ampliconlarının, *adpA* geni ve 5'-3' dizilerine ait toplam 1514 bç'lik bölgeden elde edilen probu ile hibridize oldukları ve sinyal verdikleri Southern Blot deneyi ile de doğrulanmıştır (Şekil 4.34).



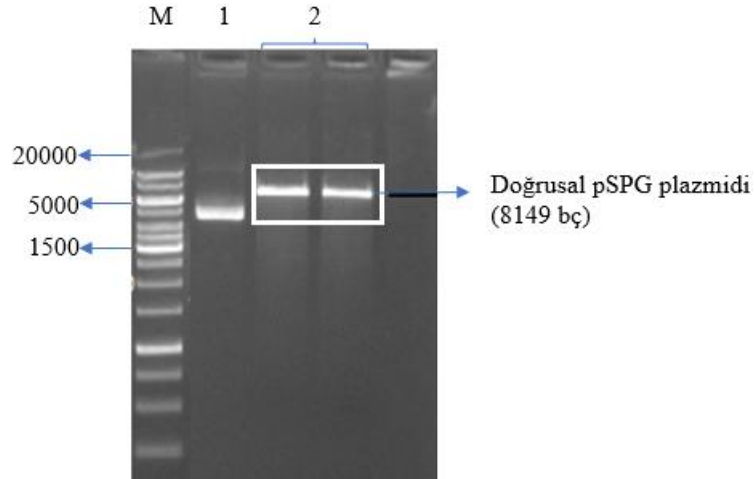
Şekil 4.34. Southern Blot sonucu. M: BamHI, BglI ve Hinfl ile kesilmiş doğrusal pBR328, 1: DNA içermeyen kontrol örneği, 2: *S. clavuligerus* NRRL 3585, 3: *S. clavuligerus* compΔ*adpA1*, 4: *S. clavuligerus* Δ*adpA1*, 5: *S. clavuligerus* Δ*adpA2*

4.4. *adpA* Geninin pSPG Çoklu İfade Vektörüne Klonlanması ve *S. clavuligerus*'a Konjugasyonu

pGEMTadpA vektöründe (23.3 ng/μl) yer alan *adpA* geninin pSPG vektörüne klonlanması amacıyla rekombinant vektör SpeI-NdeI enzimleri kesilmiştir. Halkasal formda bulunan pSPG (337.8 ng/μl) plazmidini de SpeI ve NdeI enzimleri ile 2 saat süresince 37°C'de kesilerek doğrusal hale getirilmiştir (Şekil 4.35 ve 4.36).



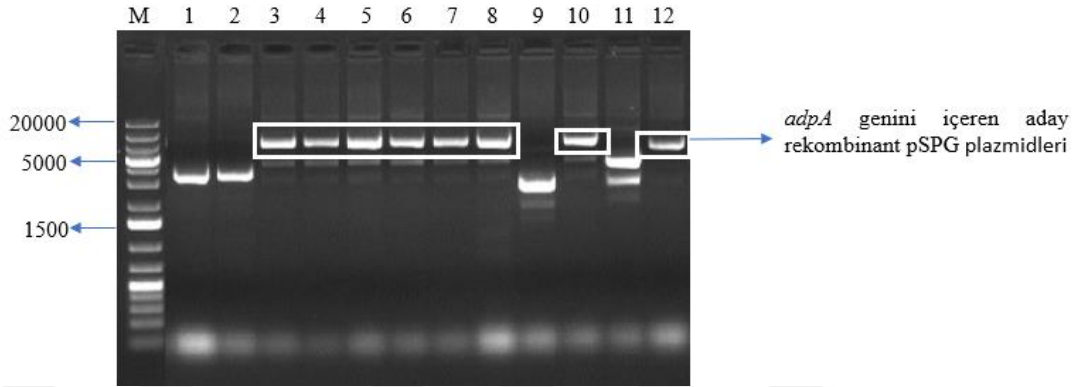
Şekil 4.35. pGEMTadpA'nın SpeI- NdeI enzimleri ile kesimi. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: pGEMTadpA' nın SpeI- NdeI enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen serbest *adpA*



Şekil 4.36. pSPG plazmidinin SpeI-NdeI enzimleri ile kesimi M: NEB 1 kb Plus DNA Ladder, 1: Halkasal pSPG plazmidini 2: SpeI-NdeI enzimi ile kesilmiş doğrusal pSPG plazmidini

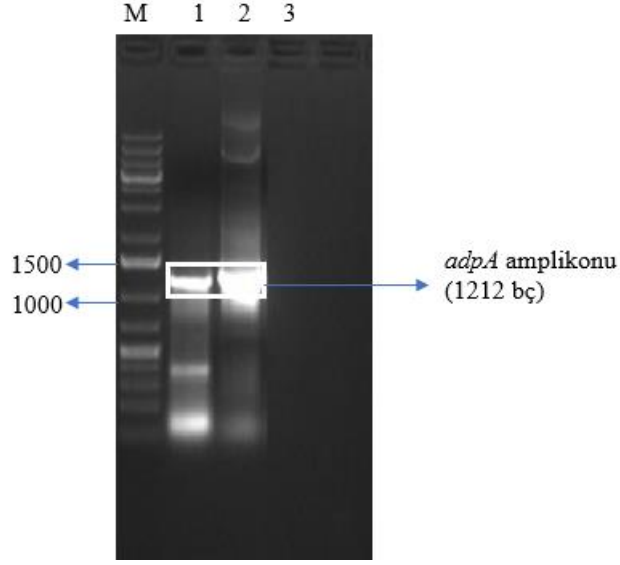
Enzim kesim reaksiyonları sonucu elde edilen fragmentler jelden kesilip NucleoSpin® Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak saflaştırılmış ve ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 10 μl hacmindeki ligasyon ürünü

transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon ürünleri 50 μ g/ml final konsantrasyonunda apramisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim tekniği ile ekilerek 37°C’de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen kolonilerden manuel yöntemle plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.37).

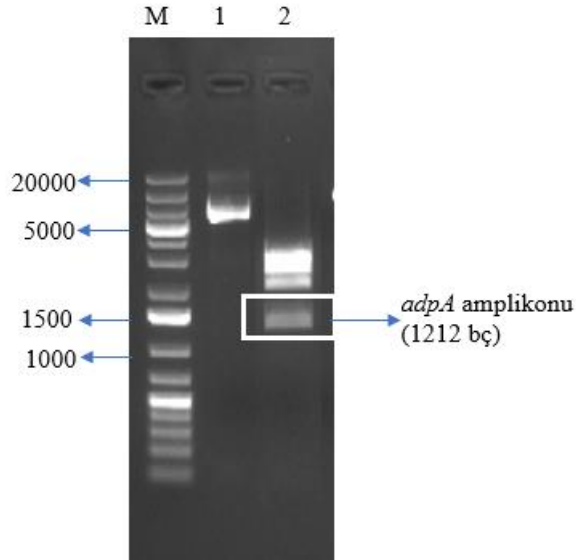


Şekil 4.37. Transformasyon sonucu oluşan putatif rekombinant hücrelerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler. M; O’Gene Ruler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pSPG plazmidini 1-12: *adpA* genini taşıdıkları varsayılan rekombinant plazmidler

Manuel plazmid izolasyonu sonucu 3 numaralı koloniden elde edilen plazmid kontrolden daha yüksek fragment vermesi sebebiyle bu koloniden kit yardımı ile yeniden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinasyonun doğruluğu PCR reaksiyonunu ve EcoRI–KpnI enzimleri ile kesim yapılarak ispatlanmıştır (Şekil 4.38-Şekil 4.39). EcoRI–KpnI enzimleri ile yapılan kesim reaksiyonu sonucunda *adpA* geninin pSPG plazmidine doğru yönde girip girmediği belirlenmiştir. KpnI enzimi *adpA* geninin 3’ ucunda kalmaktadır. EcoRI enzimi pSPG plazmidinin üzerinde promotor yönünde bulunmaktadır. Dolayısıyla genin pSPG plazmidine promotorun devamında ve doğru yönde girmesi durumunda EcoRI–KpnI kesimi sonucunda *adpA* geninin vektör içinden ayrılması beklenmektedir. Bu koşulu sağlayan rekombinant pSPG plazmidini pSPGadpA3 ve *E. coli* DH5 α hücreleri, *E. coli* pSPGadpA3 olarak isimlendirilmiştir.



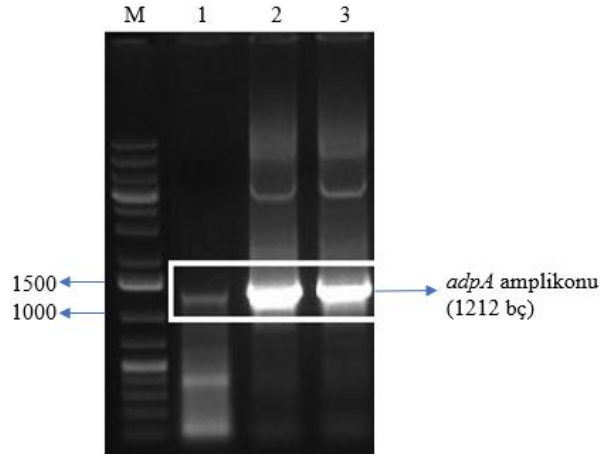
Şekil 4.38. *adpA* geninin PCR ile çoğaltılması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S.clavuligerus* NRRL3585 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 2: Putatif rekombinant pSPG plazmidi kullanılarak yapılan PCR, 3: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR'ı



Şekil 4.39. *adpA* genini taşıyan rekombinant pSPG'nin KpnI ve EcoRI ile kesim sonucu M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder 1: Halkasal pSPG plazmidi, 2: KpnI ve EcoRI ile kesilmiş putatif rekombinant plazmid

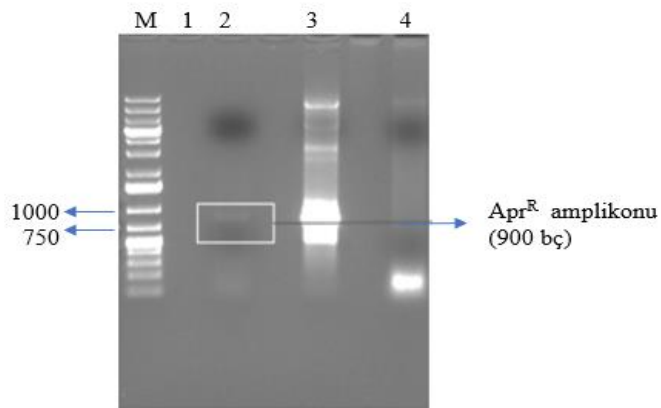
Konjugasyon öncesinde pSPGadpA3 vektörü, transformasyon yöntemi ile *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine aktarılmıştır. Üreyen koloniden izole edilen plazmidde PCR ile *adpA* amplifikasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.40). *E. coli* ET2567/pUZ8002 hücrelerindeki rekombinant vektör pSPGadpAE olarak

adlandırılmış, bu rekombinant plazmidleri taşıyan metilasyondan yoksun *E. coli* suşu ise *E. coli* pSPGadpA3E olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.40. *adpA* genini taşıyan pSPG plazmidinin *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine klonlanmasının PCR reaksiyonu ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S.clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 2-3: Kalıp olarak pSPGadpA3E plazmidinin kullanıldığı PCR

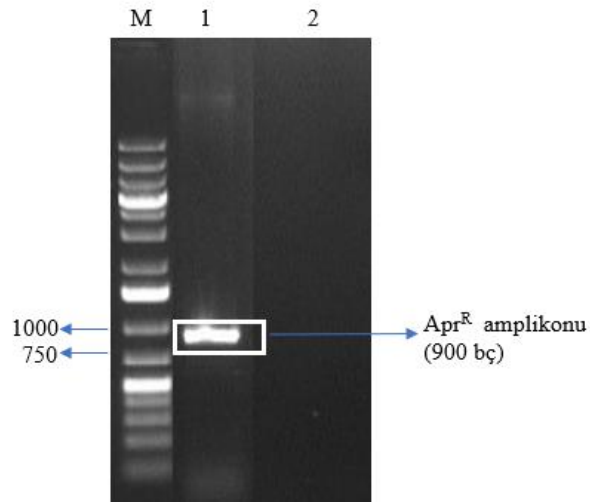
Elde edilen rekombinant *E. coli* pSPGadpA3E ile *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşları arasında konjugasyon gerçekleştirilmiştir. Konjugasyonun ardından apramisin seçiciliğinde üreyen kolonilerden genomik DNA izole edilmiştir. Elde edilen DNA'lar kullanılarak apramisin (EK5) primerleri ile doğrulama PCR'ı yapılmış ve *S. clavuligerus* NRRL 3585'in rekombinant pSPGadpA3 vektörünü taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. Konjugasyonun Apr^R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR'ı, 2: *S. clavuligerus* pSPGadpA genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 3: Kalıp olarak pSPGadpA3 plazmidinin genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 4: Kalıp olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR

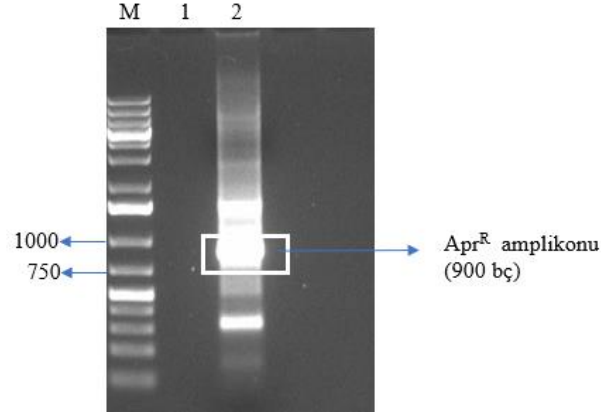
4.5. *S. clavuligerus* pSPG Suşunun Oluşturulması

adpA geninin pSPG çoklu ifade vektörüne klonlanması ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşuna konjugasyonu sonrası elde edilen *S. clavuligerus* pSPGadpA rekombinant suşundan elde edilecek verilerin standardize edilebilmesi ve RNA-seq ve diğer analizlerde kontrol olarak kullanılabilmesi için *adpA* geni içermeyen boş halkasal pSPG vektörü *S. clavuligerus* NRRL 3585 hücrelerine konjugasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Bu bağlamda, boş vektör kontrolü kullanılarak vektörün kendisinin hedef hücreler üzerindeki etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Konjugasyon öncesi boş pSPG vektörü *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyon ile aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında oluşan kolonilerden Apr^R primerleri (EK5) kullanılarak koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.42). Doğrulanmış *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücreleri *E. coli* pSPGE olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.42. Boş pSPG plazmidinin *E. coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerine transformasyonunun Apr^R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: *E. coli* pSPGE kolonisi kullanılarak yapılan PCR, 2: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR'ı

Koloni PCR ile doğrulanmış *E. coli* pSPGE ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşları arasındaki konjugasyon reaksiyonu ile pSPG vektörü *S. clavuligerus* NRRL 3585 hücrelerine aktarılmıştır. Konjugasyonun sonucunda apramisin seçiciliğinde üreyen kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve Apr^R primerleri ile doğrulama PCR yapılarak *S. clavuligerus* NRRL 3585'in boş pSPG vektörünü taşıdığı doğrulanmıştır (Şekil 4.43). Doğrulanmış koloni *S. clavuligerus* pSPG olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.43. Konjugasyonun Apr^R primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: DNA yerine distile suyun kullanıldığı negatif kontrol PCR'ı, 2: *S. clavuligerus* pSPG genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR

4.6. Suşların Karşılaştırmalı RNA-seq Analizi

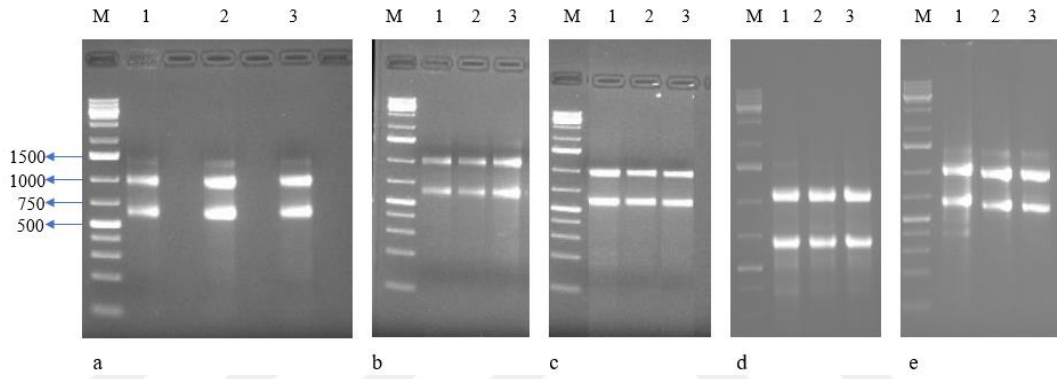
4.6.1. İzole Edilen RNA'lara Ait Kalite Değerleri

TYD fermantasyonunda 48. saatte RNA izolasyonu için 2 ml hacminde numuneler alınmış ve NucleoSpin RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinin miktarı, kalitesi ($A_{260}/A_{230} > 1.8-2.2$) ve temizliği ($A_{260}/A_{280} > 2.0$) spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (Tablo 4.2). Ayrıca RNA'lar %1.5 konsantrasyonundaki agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.44).

Tablo 4.2. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Örnek adı	$A_{260}/280$	$A_{260}/230$	Konsantrasyon (ng/µl)
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 -1	2.00	1.81	271
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 -2	2.08	2.14	494.6
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585 -3	2.00	2.01	456.3
<i>S. clavuligerus</i> Δ adpA-1	1.99	1.35	84
<i>S. clavuligerus</i> Δ adpA-2	1.97	1.44	75.7
<i>S. clavuligerus</i> Δ adpA-3	2.01	1.55	177.9
<i>S. clavuligerus</i> compadpA-1	1.92	1.52	305.8
<i>S. clavuligerus</i> compadpA-2	1.99	1.60	174.9

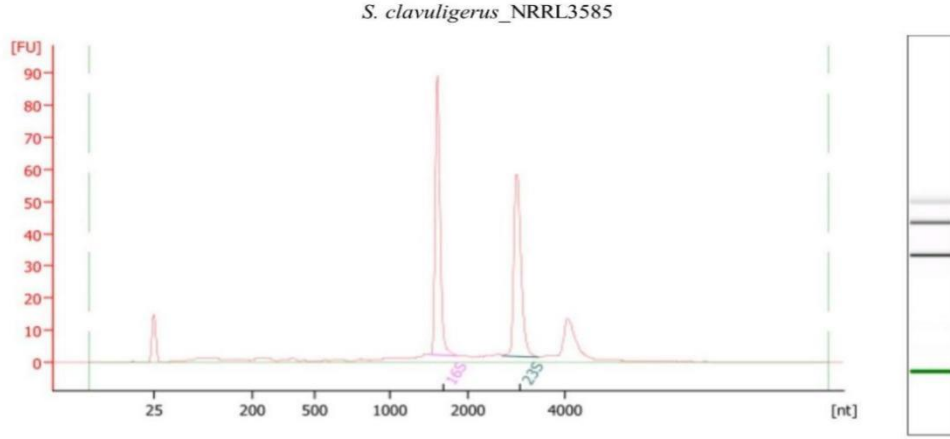
<i>S. clavuligerus</i> compadpA-3	1.95	1.67	250.6
<i>S. clavuligerus</i> pSPGadpA-1	2.06	2.11	1171.6
<i>S. clavuligerus</i> pSPGadpA-2	2.04	2.14	918
<i>S. clavuligerus</i> pSPGadpA-3	2.02	1.93	1194.9
<i>S. clavuligerus</i> pSPG-1	2.05	2.13	1052.4
<i>S. clavuligerus</i> pSPG-2	2.03	2.11	924.4
<i>S. clavuligerus</i> pSPG-3	2.05	2.10	1077.1



Şekil 4.44. İzole edilen RNA örnekleri. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1, 2, 3: RNA kopyaları (replikaları), a) *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* Δ adpA, c) *S. clavuligerus* compadpA, d) *S. clavuligerus* pSPGadpA, e) *S. clavuligerus* pSPG

Yüksek kalitede elde edilen RNA örneklerinden, *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. clavuligerus* Δ adpA, *S. clavuligerus* pSPGadpA ve *S. clavuligerus* pSPG suşlarına ait biyolojik replikalar birleştirilmiştir (20-40 μ g). RNA örnekleri Labconco Freezone 12plus liyofilizatöründe -85°C'de 8 saat süresince dondurularak liyofilize edilmiş ve ardından RNASTable (Biomatrix) adlı koruyucu madde içeren Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Liyofilize edilen RNA örnekleri, RNA transkriptom dizilemesi hizmetini sağlayan BGI (www.genomics.cn/BGI, HongKong) firmasına gönderilmiştir. RNA-seq çalışmalarında RNA bütünlük değerleri (RIN) (RNA integrity number) önemli bir ölçüttür. RNA'nın bütünlüğünü ifade eder ve genellikle 1 ile 10 arasında bir değer alır. RNA-seq öncesinde, kalite analizi için liyofilize edilen RNA örnekleri çözündürülmüş ve Agilent 2100 Bioanalyzer/Fragment Analyzer ile RIN değerleri ölçülmüştür (Şekil 4.45). Buna göre, *S. clavuligerus* NRRL 3585 için 9.3, *S. clavuligerus* Δ adpA için 9.7, *S. clavuligerus* pSPGadpA için

9.0 ve *S. clavuligerus* pSPG için 9.1 RIN değerleri elde edilmiştir. Yüksek RIN değerleri elde edilen RNA'ların dizilemede kullanılabilir kaliteye sahip olduğunu göstermiştir.



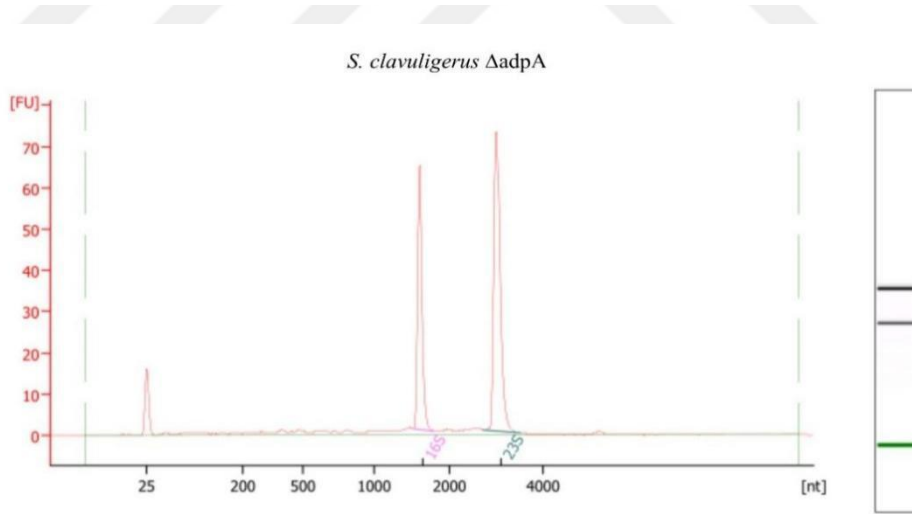
***S. clavuligerus* NRRL3585 RNA Genel Sonuçlar:**

RNA Alanı: 257.9 RNA Bütünlük Sayısı (RIN): 9.3(B.02.07)
 RNA konsantrasyonu: 137 ng/μl
 RNA Oranı (23S/16S): 0.8

***S. clavuligerus* NRRL3585 RNA Fragment Tablosu:**

Fragment adı	Başlangıç Boyutu (baz)	Bitiş Boyutu (baz)	Alan	Toplam alanın yüzdesi
16S	1.498	1.872	79.6	30.9
23S	2.716	3.454	62.2	24.1

a



***S. clavuligerus* ΔadpA RNA Genel Sonuçlar:**

RNA Alanı: 185.7 RNA Bütünlük Sayısı (RIN): 9.7 (B.02.07)
 RNA konsantrasyonu: 98 ng/μl
 RNA Oranı (23S/16S): 1.4

***S. clavuligerus* ΔadpA RNA Fragment Tablosu:**

Fragment adı	Başlangıç Boyutu (baz)	Bitiş Boyutu (baz)	Alan	Toplam alanın yüzdesi
16S	1.505	1.793	55.4	29.8
23S	2.701	3.517	75.5	40.8

b

Şekil 4.45. RNA dizilemede kullanılan RNA'lara ait RIN değerleri. a) *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* ΔadpA

4.6.2. RNA-seq ve Biyoinformatik Analizler

Toplam dört RNA örneği, DNBseq/Illumina platformunda dizilenmiş ve 1.5 Gb veri elde edilmiştir. Referans genom (GCF_000148465) ile yapılan ortalama eşleştirme oranı %85.86'dır ve analiz sonucu 1601 yeni transkript tanımlanmıştır. Bu transkriptlerin 55 tanesi yeni kodlayıcı transkript ve 1546'sı ise uzun kodlama yapmayan transkriplerden oluşmaktadır. Dizileme sonrası yapılan biyoinformatik analizin ilk aşamasında, düşük kaliteli okumalar, adaptör okumaları ve bilinmeyen bazlara sahip okumaların filtrelenmesiyle temiz okumalar elde edilmiştir. Okumaların kalite kontrolü yapılırken Fred skoru (Q) olarak bilinen Q20 ve Q30 puanları kullanılmıştır (Guan vd., 2019). Genel olarak tüm suşlarda; Q20 ve Q30 değerleri sırası ile %98 ve %96'nın üzerindedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Okumalara ait istatistiksel değerler

Örnek	Toplam Ham okuma (Mb)	Toplam Temiz okuma (Mb)	Toplam Temiz baz (Gb)	Temiz Okuma Q20 ^a (%)	Temiz Okuma Q30 ^b (%)	N ^c Okuma (%)	Düşük kalite okuma (%)	Adaptör okuma (%)
<i>S. clavuligerus</i> ΔadpA	5.73	2.62	0.39	98.82	96.42	0.02	0.39	53.75
<i>S. clavuligerus</i> _NRRL	4.0	1.79	0.27	98.84	96.55	0.03	0.36	55.99
<i>S. clavuligerus</i> _pSPGadpA	6.29	2.73	0.41	98.91	96.62	0.02	0.29	56.25
<i>S. clavuligerus</i> _pSPG	7.24	3.52	0.53	98.88	96.58	0.02	0.39	50.99

a. Q20; %1 hata şansına ve %99 güvene işaret eder.

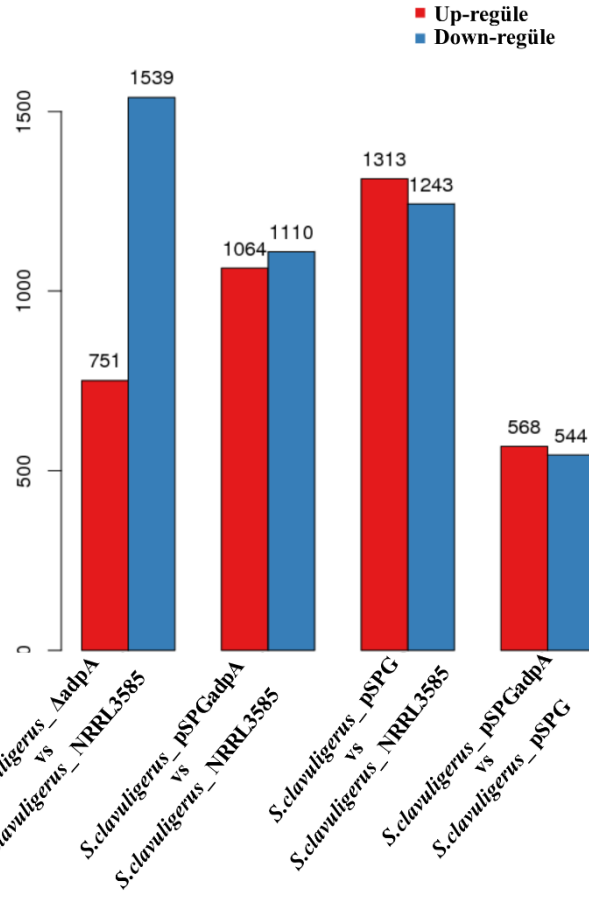
b. Q30; %0.1 hata şansına ve %99.9 güvene işaret eder.

c. %N, okunmamış bazların toplam baz sayısı içindeki oranını gösterir.

4.6.3. Farklı İfade Olan Genlerin (DEG) Yolak ve Fonksiyonel Sınıflandırılma Analizi

Mevcut çalışmada tek örneklemede farklı ifade olan genlerin tespit edilebilmesi için poissonDis algoritması kullanılmış ve suşlar arasında farklı ifade olan genlerin sayısının kıyaslanabilmesi için Şekil 4.46'da verilen grafik oluşturulmuştur.

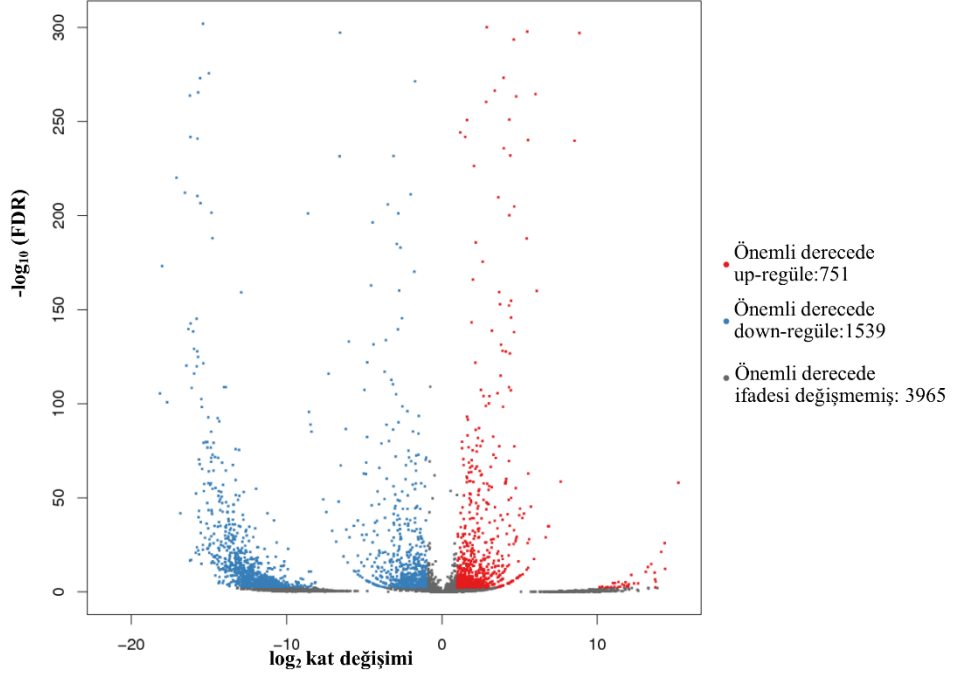
Farklı İfade Olan Genlere (DEG) Ait İstatiksel Veriler (PoissonDis Metodu)



Şekil 4.46. Karşılaştırmalarda önemli derecede ifadesi artan (up-regüle) ve ifadesi azalan (down-regüle) gen sayılarını gösteren bar

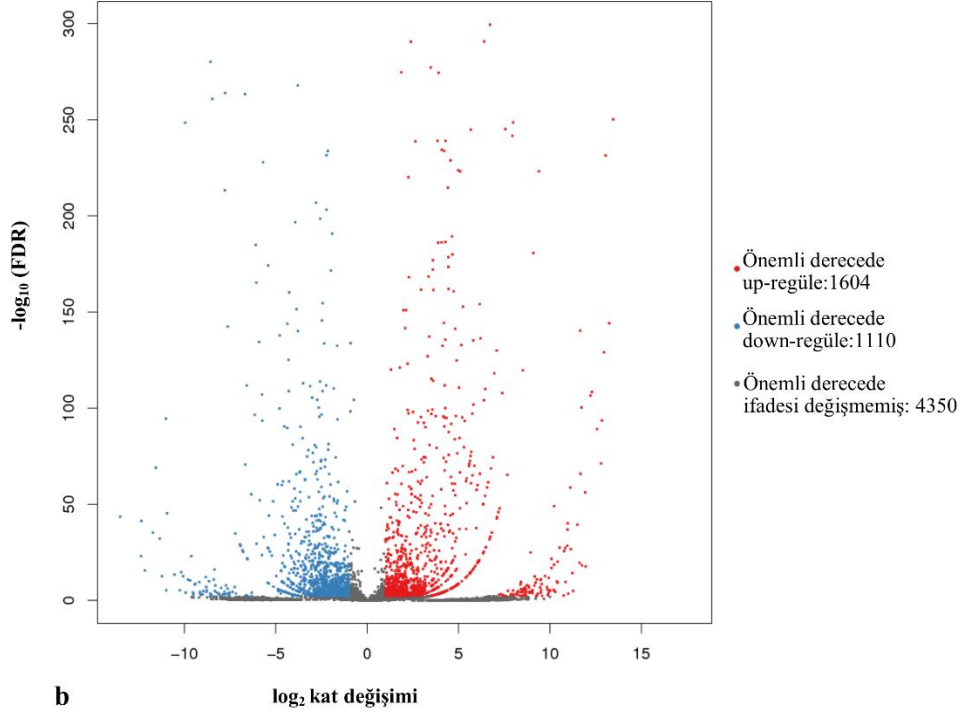
DEG'lere ait sonuçlara göre tüm karşılaştırmalar için volkan grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.47). Kırmızı noktalar up-regüle DEG'ler, mavi noktalar down-regüle DEG'ler ve gri noktalar farklı ifade olmayan genleri ifade etmektedir.

S. clavuligerus Δ adpA vs *S. clavuligerus*_NRRL3585



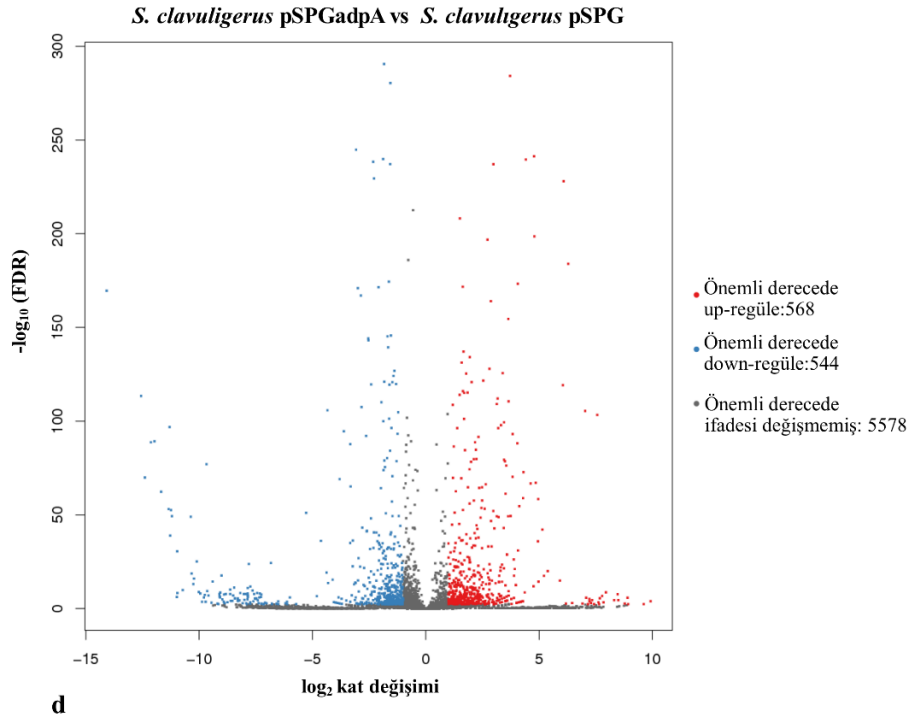
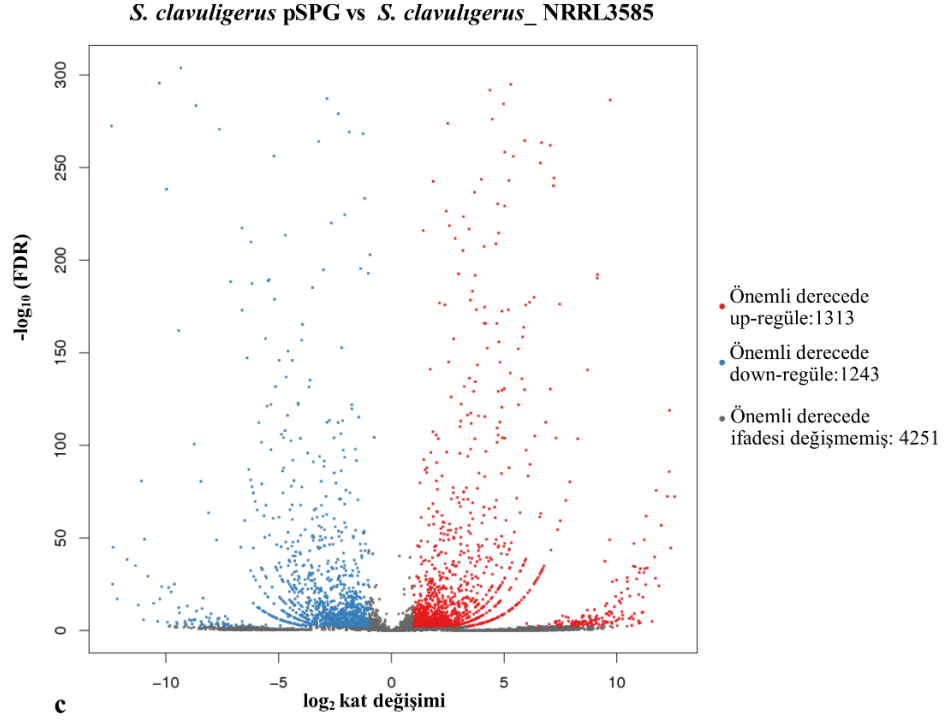
a

S. clavuligerus pSPGadpA vs *S. clavuligerus*_NRRL3585



b

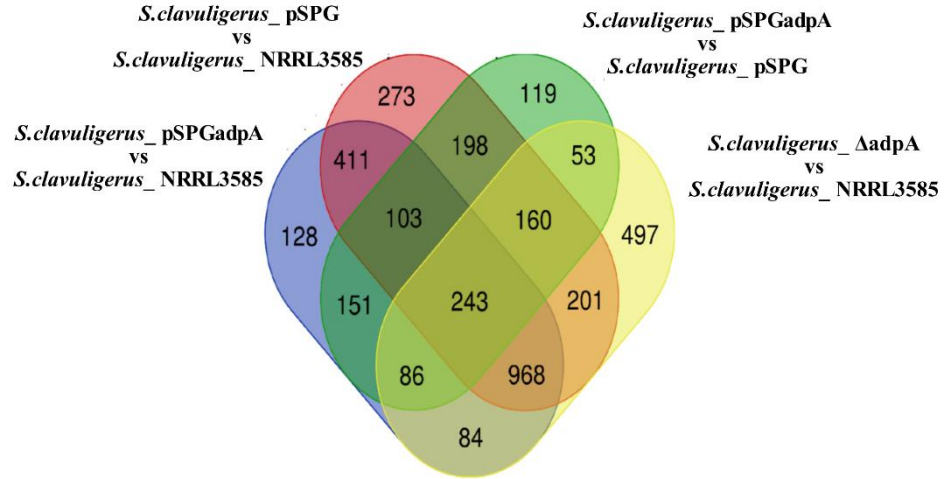
Şekil 4.47. Kontrol suşuna kıyasla önemli derecede ifadesi artan (up-regüle) ve ifadesi azalan (down-regüle) gen sayılarını gösteren volkan grafikleri. a) *S. clavuligerus* Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585



şekil 4.47. Kontrol suşuna kıyasla önemli derecede ifadesi artan (up-regüle) ve ifadesi azalan (down-regüle) gen sayılarını gösteren volkan grafikleri. c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585 d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

Suşlar arasındaki karşılaştırmalarda elde edilen DEG'ler ayrıca Venn diyagramı ile de gösterilmiştir. Her küme bir karşılaştırma grubunu temsil etmekte

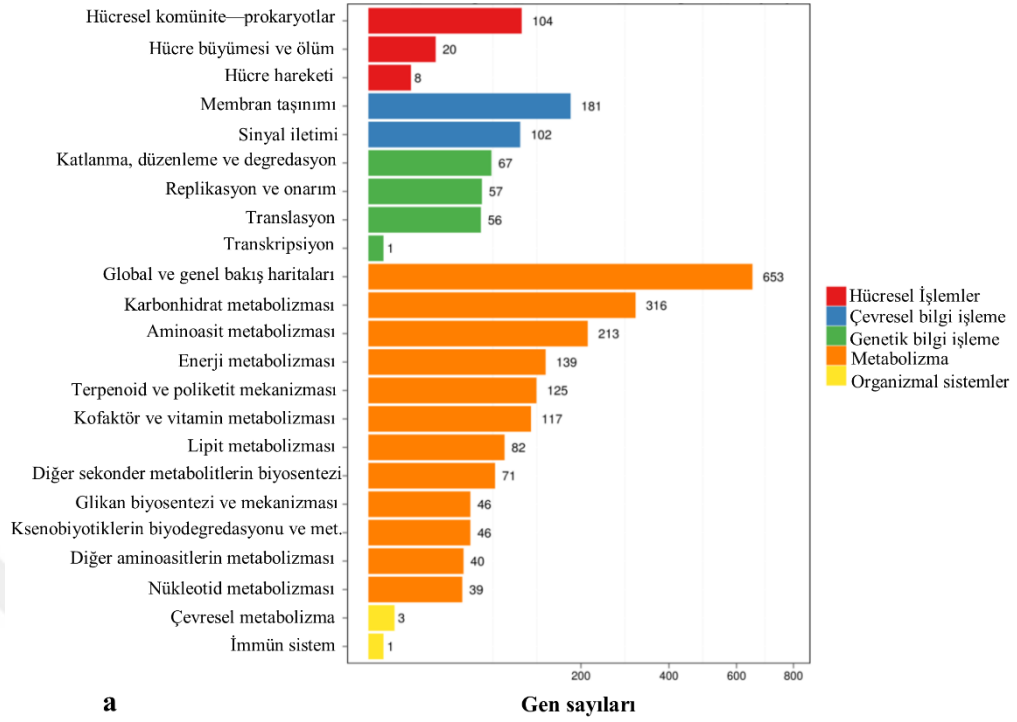
olup farklı renklerle işaretlenmiştir. Kesişim kısımlarında gruplar arasında ortak ifade olan genlerin sayısı yer almaktadır. Tüm gruplarda 243 genin ortak DEG olarak ifade edildiği görülmektedir (Şekil 4.48).



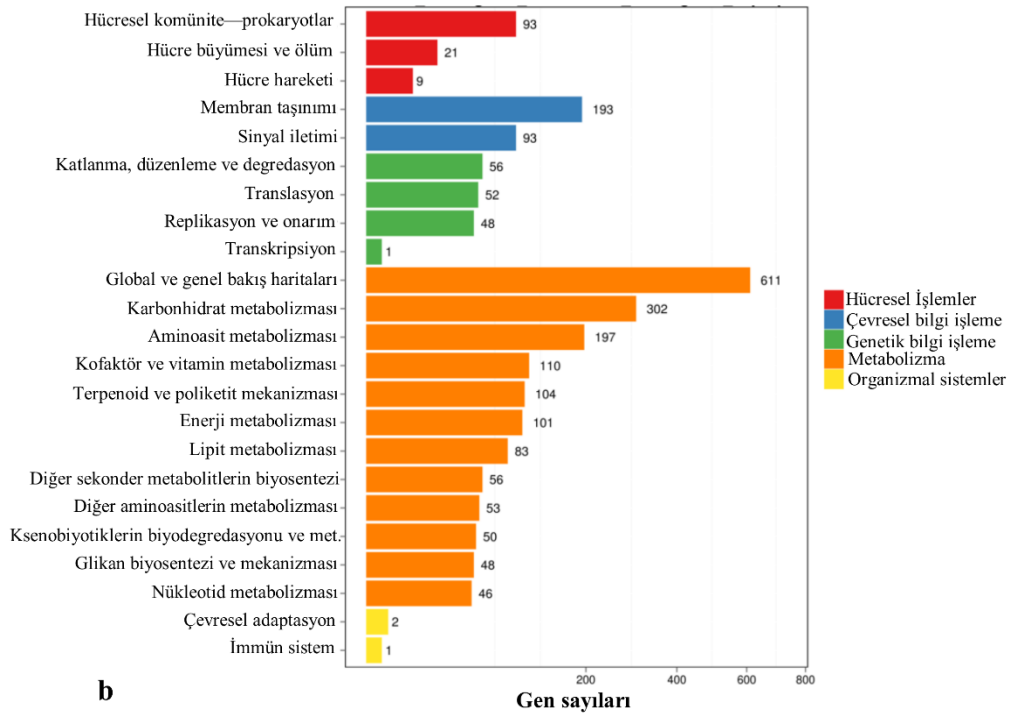
Şekil 4.48. Suşlarda ifade edilen genlere ait venn diyagramı

DEG'lerin biyolojik işlevlerinin ve diğer yollarla etkileşimlerinin sınıflandırılması için yolağa dayalı KEGG analizleri yapılmıştır. KEGG analizi, tüm genom ile karşılaştırılarak farklı ifade olan genlerin hücresel fonksiyonlarının ve biyolojik süreçlerin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Dizileme sonucu tespit edilen DEG'lerin yolak sınıflandırma sonuçları Şekil 4.49'daki grafiklerde verilmiştir.

***S. clavuligerus* ΔadpA vs *S. clavuligerus* _NRRL3585**

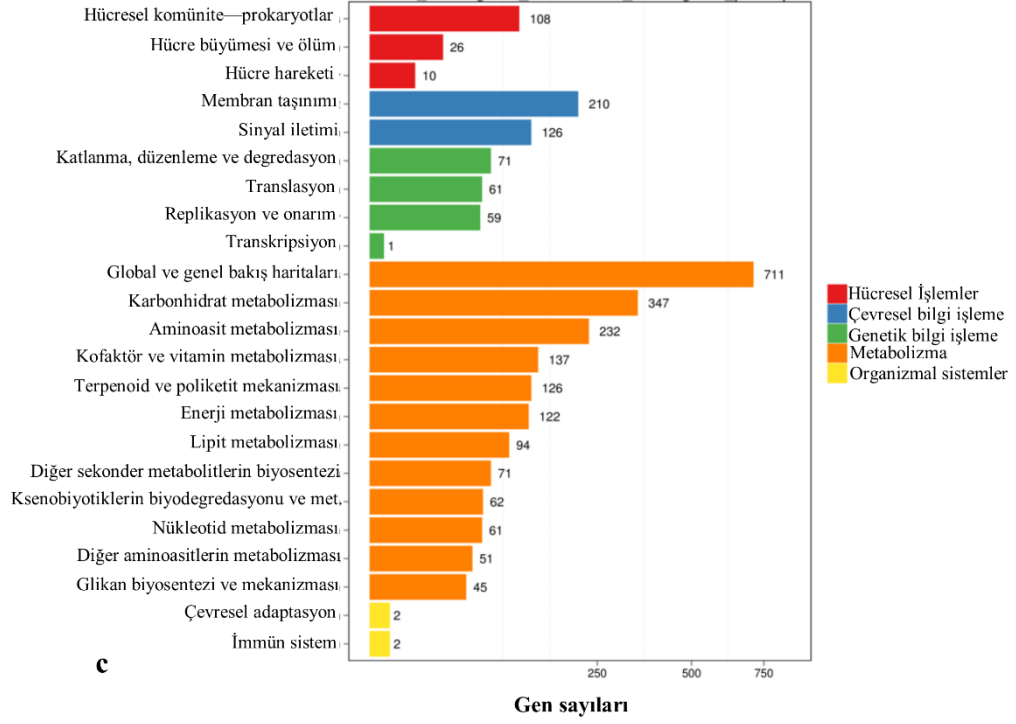


***S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* _NRRL3585**

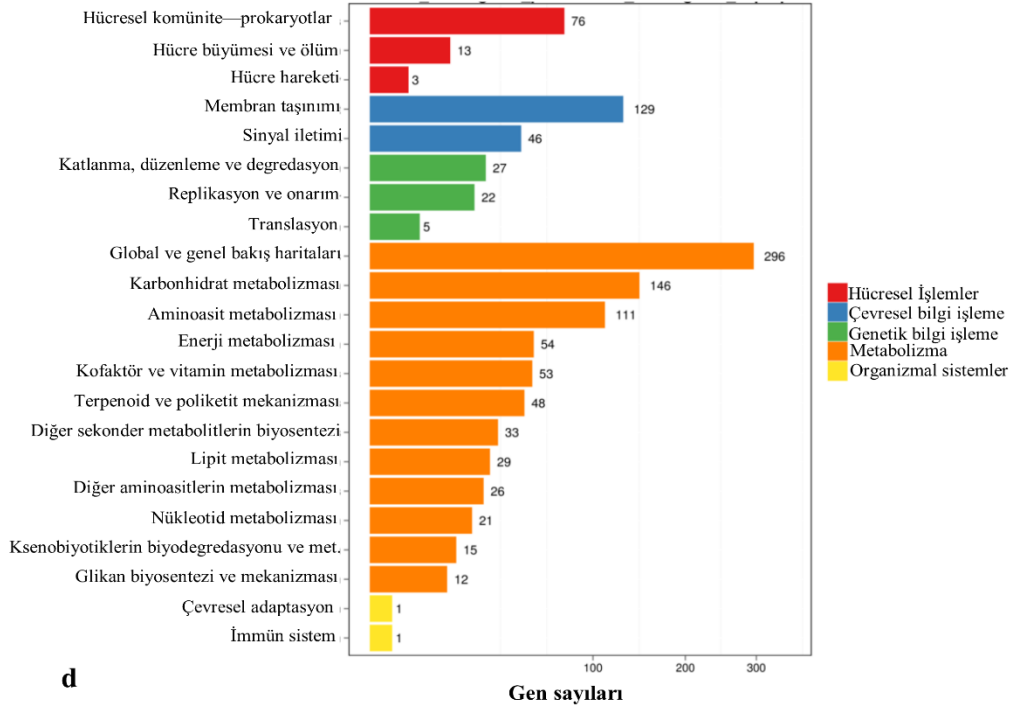


Şekil 4.49. Suşların karşılaştırılmasında farklı ifade olan genlerin KEGG yolak sınıflandırması. a) *S. clavuligerus* ΔadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585

S. clavuligerus pSPG vs *S. clavuligerus*_ NRRL3585



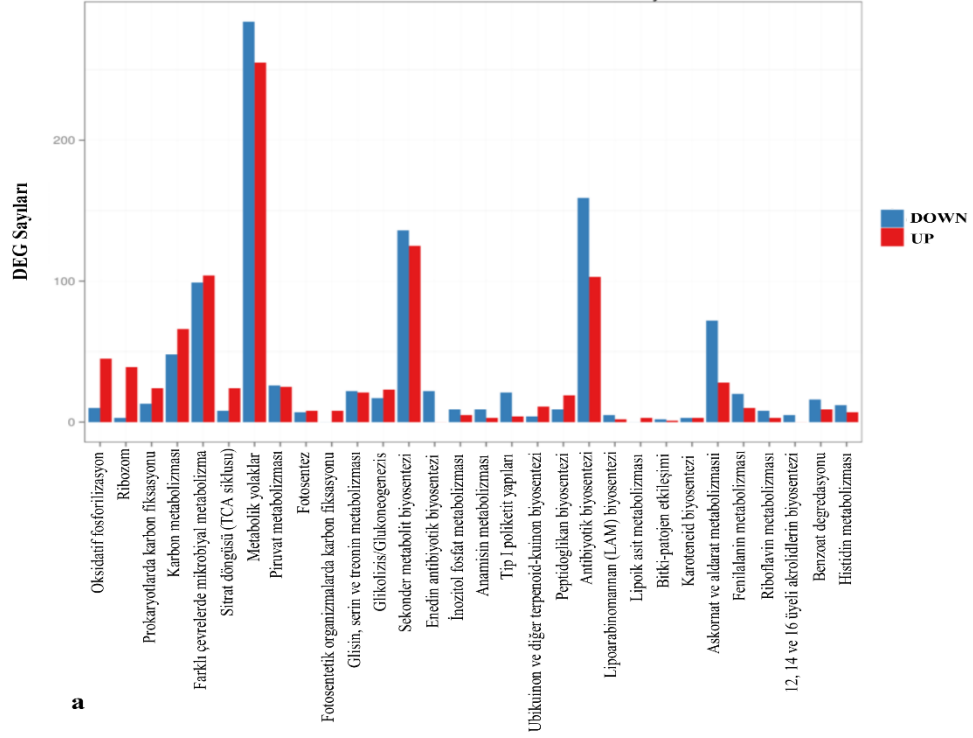
S. clavuligerus pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG



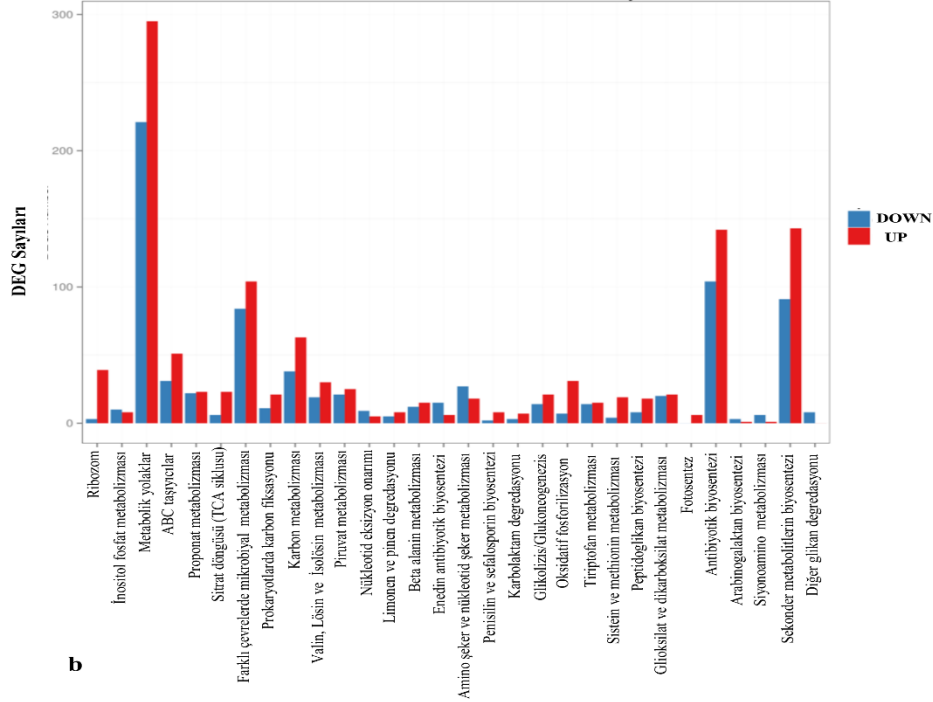
Şekil 4.49. Suşların karşılaştırılmasında farklı ifade olan genlerin KEGG yolak sınıflandırması. c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

KEGG yolak sınıflandırması analizlerinin sonucunda tüm suşlarda DEG'lerin çoğunlukla metabolizma ve hemen ardından ise çevresel bilgi işleme ile ilgili genlerde yoğunlaştığı görülmektedir. Suşların genelinde, özellikle global ve genel bakış haritaları başta olmak üzere, metabolizma kategorisinde; karbonhidrat, amino asit, enerji ve poliketid metabolizmalarında DEG'lerin kategorize olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra spesifik olarak membran taşınımı ve sinyal iletimi ile ilgili genlerin çevresel bilgi işleme kategorisinde DEG'lerin yoğunlaştığı görülmektedir. *S. clavuligerus* Δ adpA suşu daha detaylı incelendiğinde kontrole kıyasla global ve genel bakış haritaları, karbonhidrat metabolizması, sekonder metabolit biyosentezi, antibiyotik biyosentezi gibi farklı metabolizmalara ait yolaklarında çok fazla sayıda DEG'lerin gruplandığı görülmektedir. *adpA* geninin çok kopyasını içeren *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda da *S. clavuligerus* Δ adpA ile aynı doğrultuda DEG'lerin sınıflandığı ancak sayısının mutant suşa göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, suşların karşılaştırmasında yukarı ve aşağı yönde farklı ifade olan genlerin yolak fonksiyonel zenginleştirme sonuçları ise Şekil 4.50'de verilmiştir.

S.clavuligerus Δ adpA vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında en zenginleştirilmiş yollarda DEG'lerin sayısı

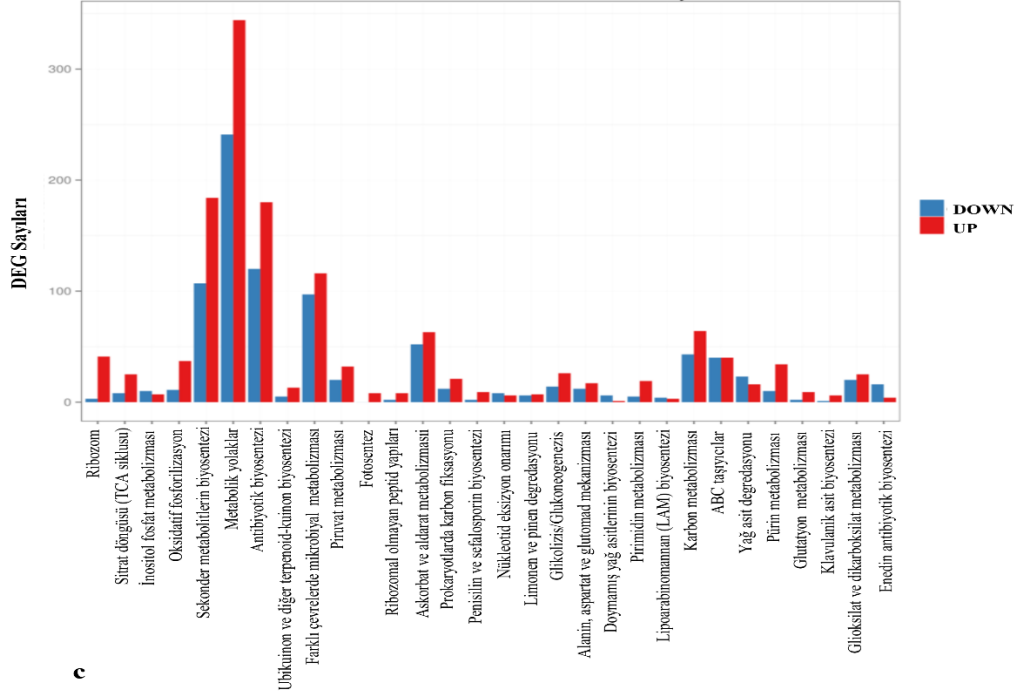


S.clavuligerus pSPGadpA vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında en zenginleştirilmiş yollarda DEG'lerin sayısı



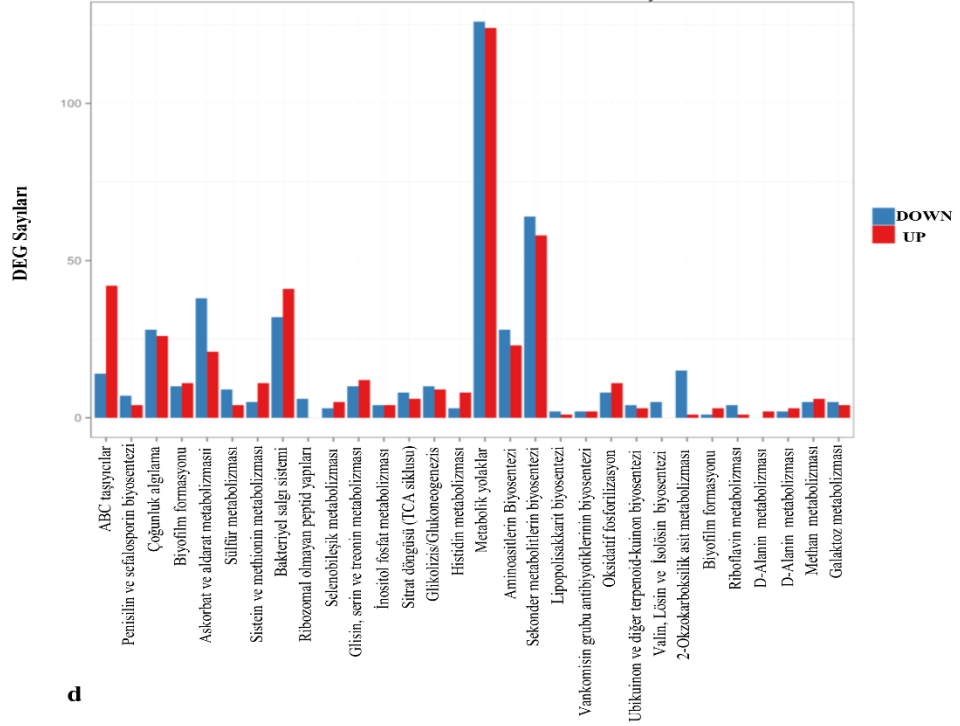
Şekil 4.50. Suşların karşılaştırılmasında yukarı ve aşağı yönde ifade olan (up-regüle/down regüle) DEG'lerin yolak fonksiyonel zenginleştirme sonuçları a) *S. clavuligerus* Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585

***S.clavuligerus* pSPG vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında en zenginleştirilmiş yollarda DEG'lerin sayısı**



c

***S.clavuligerus* pSPGadpA vs *S.clavuligerus* pSPG karşılaştırmasında en zenginleştirilmiş yollarda DEG'lerin sayısı**



d

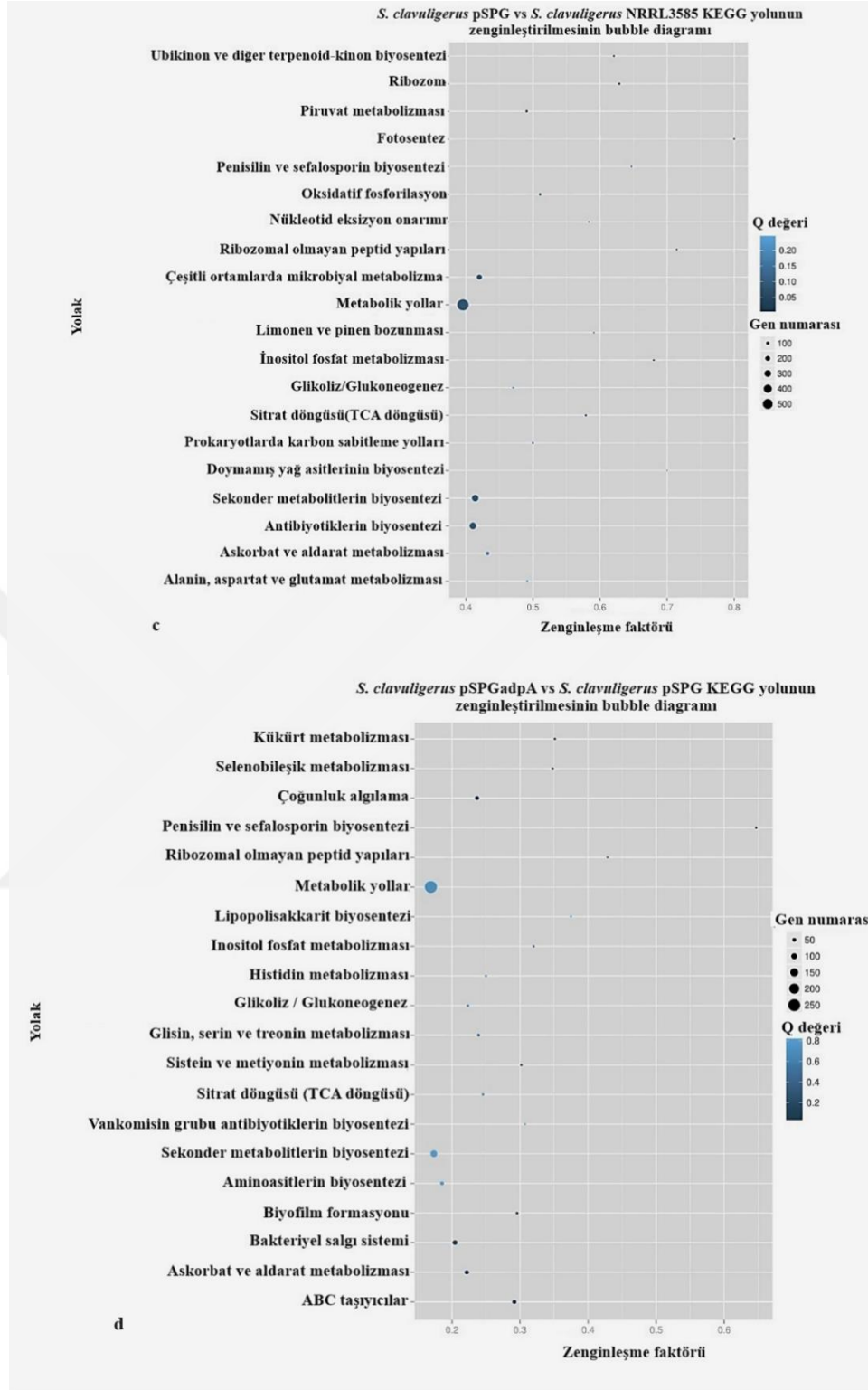
Şekil 4.50. Suşların karşılaştırmasında yukarı ve aşağı yönde ifade olan (up-regüle/down regüle) DEG'lerin yolak fonksiyonel zenginleştirme sonuçları. c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

Şekil 4.50’de tüm suşlarda ifade farklılığı olan genlerin çoğunluğunun metabolik yollarda yoğunlaştığı görülmektedir. *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda metabolik yollarda konumlanan down-regüle DEG’lerin sayısında up-regüle genlere göre artış gözlemlenmiştir. Ayrıca sekonder metabolit biyosentezi ve antibiyotik biyosentezinde de down-regüle DEG’lerin sayısı up-regüle genlere göre daha fazladır. Buna karşın, *adpA* geninin çok kopyasını içeren *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda kontrol suşuna kıyasla metabolik yollar, sekonder metabolit biyosentezi ve antibiyotik biyosentezinde up-regüle DEG’ler çoğunluktadır.

Ayrıca, DEG’lerdeki kümelenme bubble diagramı ile Şekil 4.51’de verilmiştir. Grafiklerde x eksenini zenginleştirme faktörü değerine (Q değeri) ilişkin bilgileri, y eksenini ise yolları temsil etmekte ve noktaların boyutu DEG sayısını, renk yoğunluğu ise istatistiksel önemini temsil etmektedir. Bubble diyagramlarında *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG, *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585 ve *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585 karşılaştırmalarında sayıca ve yoğunluk bakımından az olmakla birlikte penisilin ve sefalosporin biyosentezi ile ilişkili genlerin DEG olarak yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. Suşların karşılaştırılmasında DEG'lere ait yolak fonksiyonel zenginleştirme istatistiği a) *S. clavuligerus* Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585



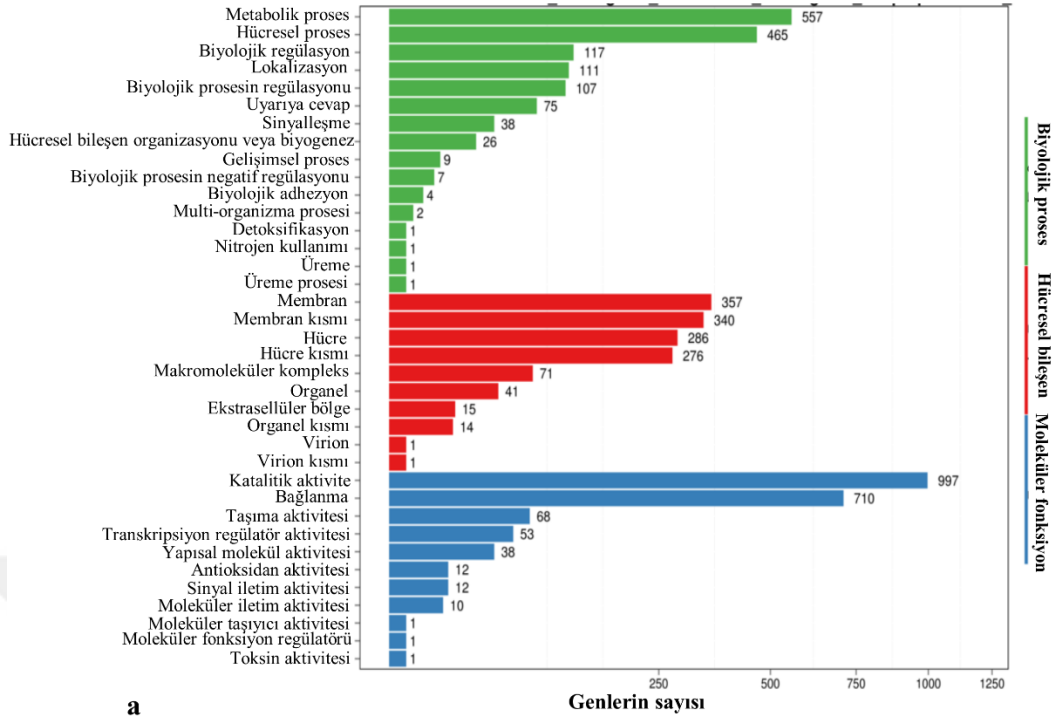
Şekil 4.51. Suşların karşılaştırılmasında DEG'lere ait yolak fonksiyonel zenginleştirme istatistiği c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

Çalışmamızın devamında gerçekleştirilen GO fonksiyonel zenginleştirme analizi, DEG'lerin hangi biyolojik işlevlere sahip olduğunun anlaşılmasına yardımcı

olan bir yöntemdir. Bu analiz, genler arasındaki farklı ifade düzeylerini inceleyerek, belirgin bir şekilde farklı ifade edilen genlerin hangi biyolojik süreçlerle ilişkili olduğunu ortaya çıkarır. Bu analiz tüm anlamlı DEG'leri veya hedef genleri, Gene Ontology veritabanındaki çeşitli terimlerle eşleştirmektedir (<http://www.geneontology.org/>). Çalışmamızın GO sonuçları aşağıdaki grafiklerde verilmektedir (Şekil 4.52).

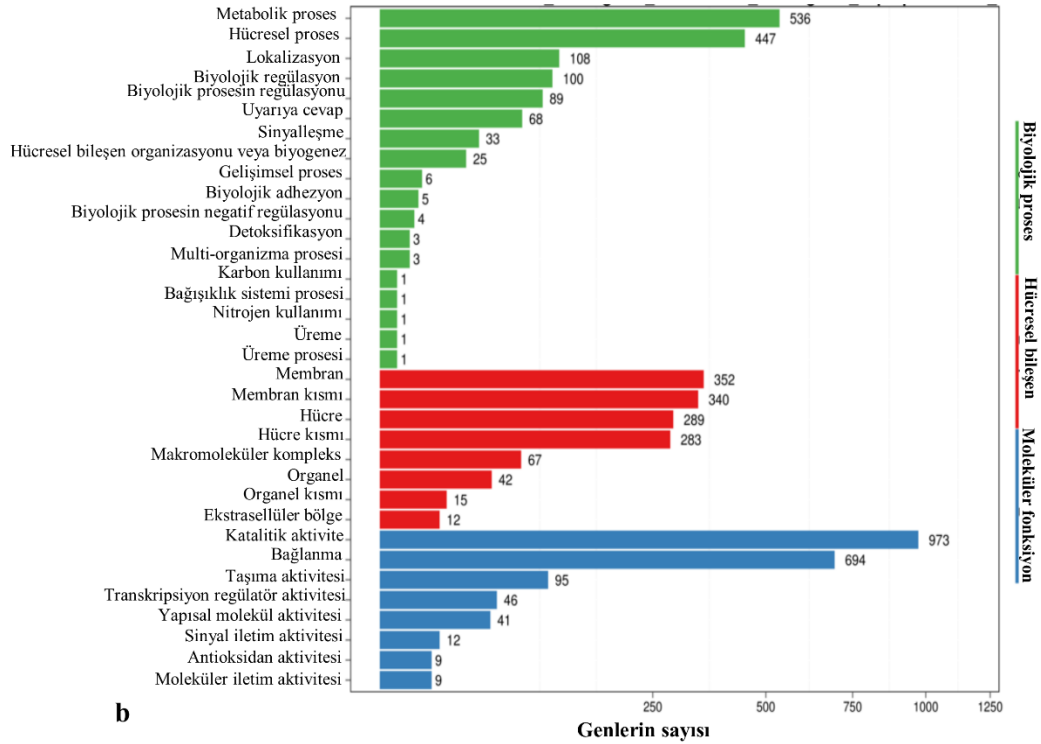


S. clavuligerus Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL3585 GO fonksiyonel sınıflandırması



a

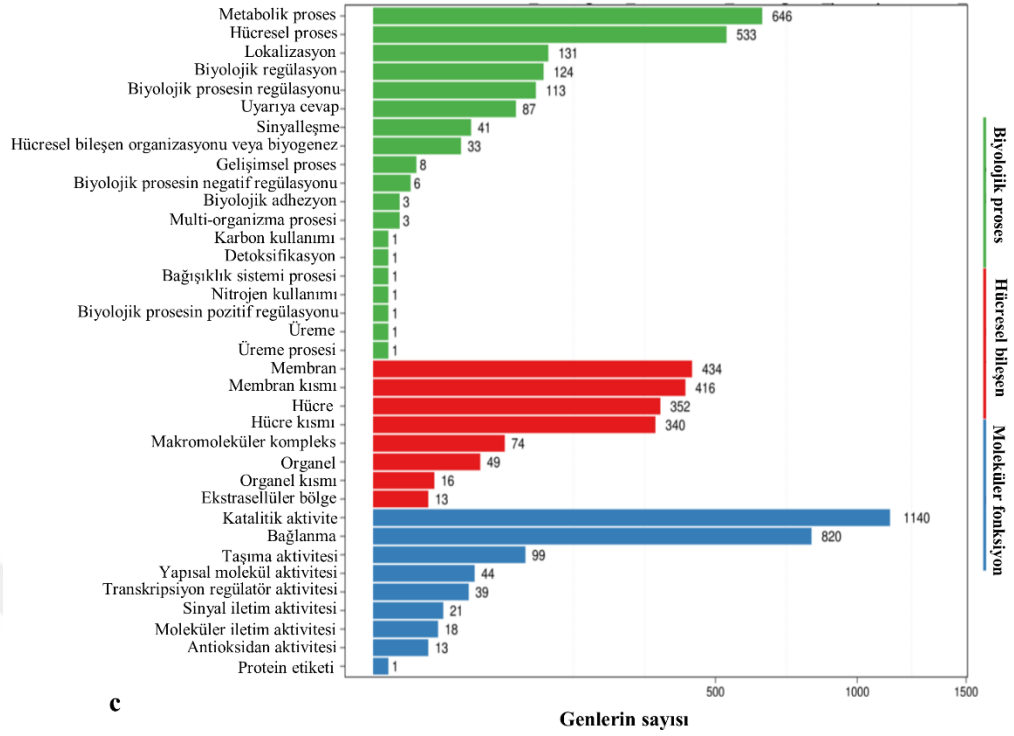
S. clavuligerus pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL3585 GO fonksiyonel sınıflandırması



b

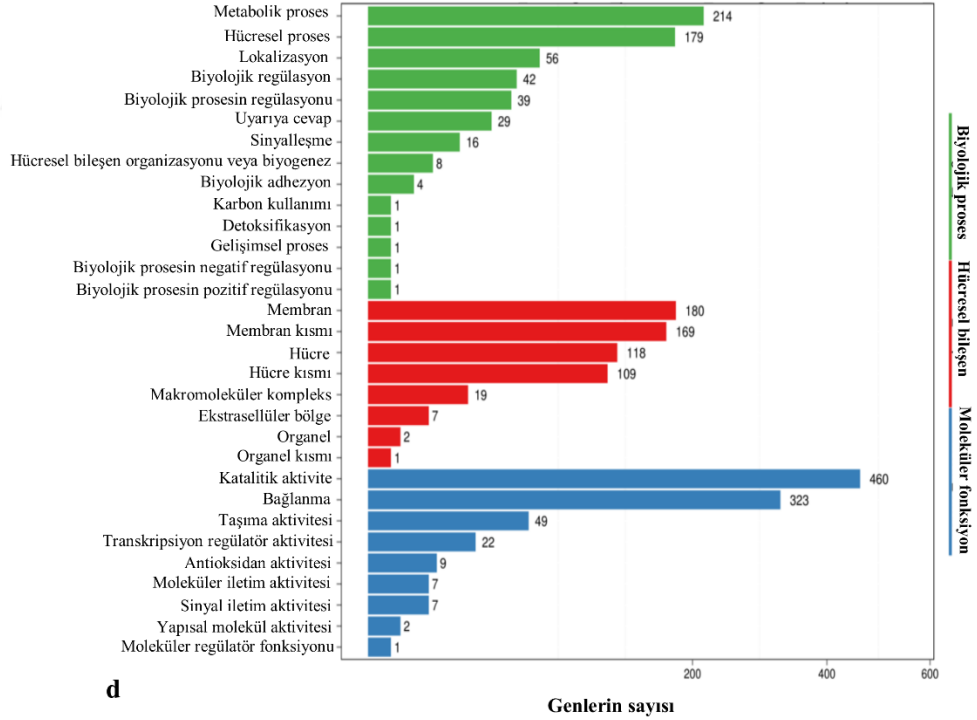
Şekil 4.52. Suşların karşılaştırılmasında DEG'lere ait fonksiyonel GO sınıflandırılması. a) *S. clavuligerus* Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585

S.clavuligerus pSPG vs *S.clavuligerus* NRRL3585 GO fonksiyonel sınıflandırması



c

S.clavuligerus pSPGadpA vs *S.clavuligerus* pSPG GO fonksiyonel sınıflandırması

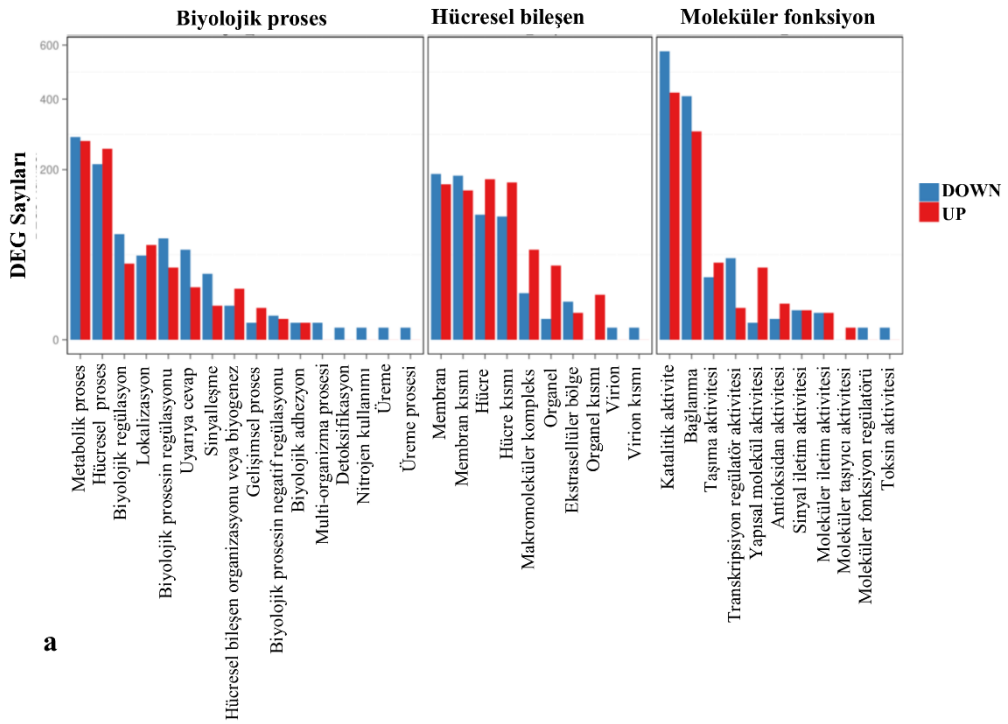


d

Şekil 4.52. Suşların karşılaştırmasında DEG'lere ait fonksiyonel GO sınıflandırılması. c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavulligerus* NRRL 3585 d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

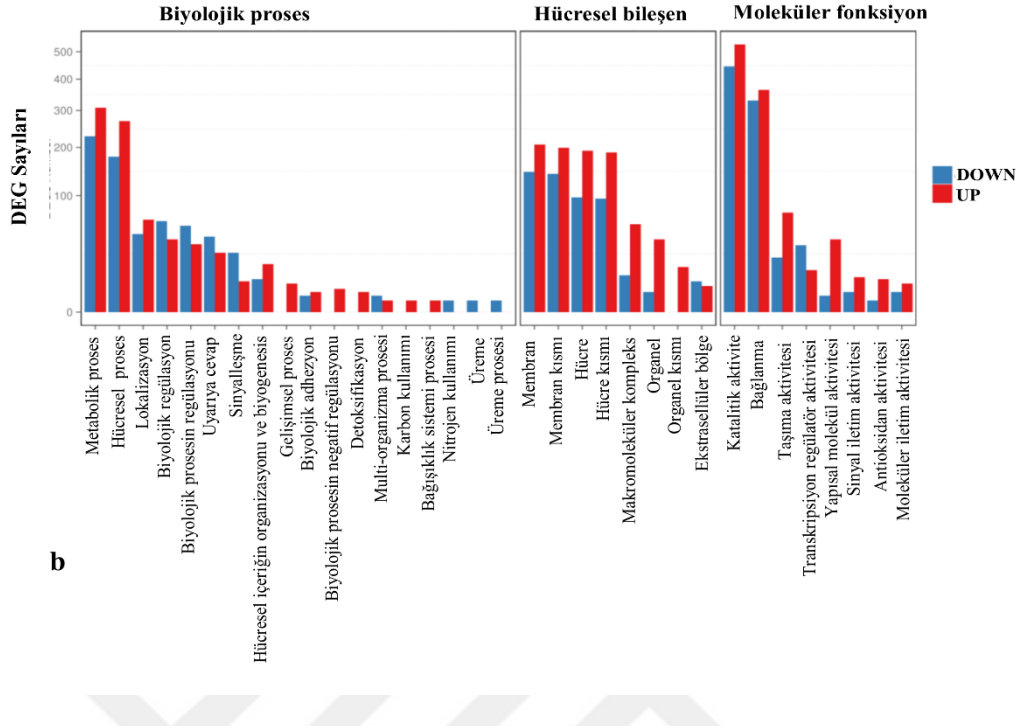
Şekil 4.52 incelendiğinde, tüm suşlarda biyolojik proseslerde en çok metabolik ve hüresel işlemler, hüresel bileşen kategorisinde başlıca membran ve hücre ile ilgili kısımlar, moleküler fonksiyon sınıfında ise en çok katalitik aktivite ve bağlanma aktivitelerinde DEG'ler bulunmaktadır. Bu veriler AdpA'nın pleiotropik bir regülatör oluşu ve morfogenez ile birlikte sekonder metabolit üretimi üzerine etki göstermesi ile bağlantılıdır. Şekil 4.53'de ise zenginleştirilmiş GO sınıflandırmasındaki up/down regüle DEG sayıları verilmektedir. Bu şekil incelendiğinde, *S. clavuligerus* Δ adpA suşunun GO sınıflandırmasında moleküler fonksiyon kategorisinde özellikle katalitik aktivite, bağlanma ve transkripsiyonel regülatör aktivitesi ile ilgili genlerin ifadesinin kontrol suşuna göre arttığı gözlemlenmiştir. Diğer karşılaştırmalarda moleküler fonksiyon sınıflandırmasında genel olarak genlerin ifadelerinin azaldığı görülmüştür.

S.clavuligerus Δ adpA vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında GO Zenginleşme yollarında DEG'lerin sayısı



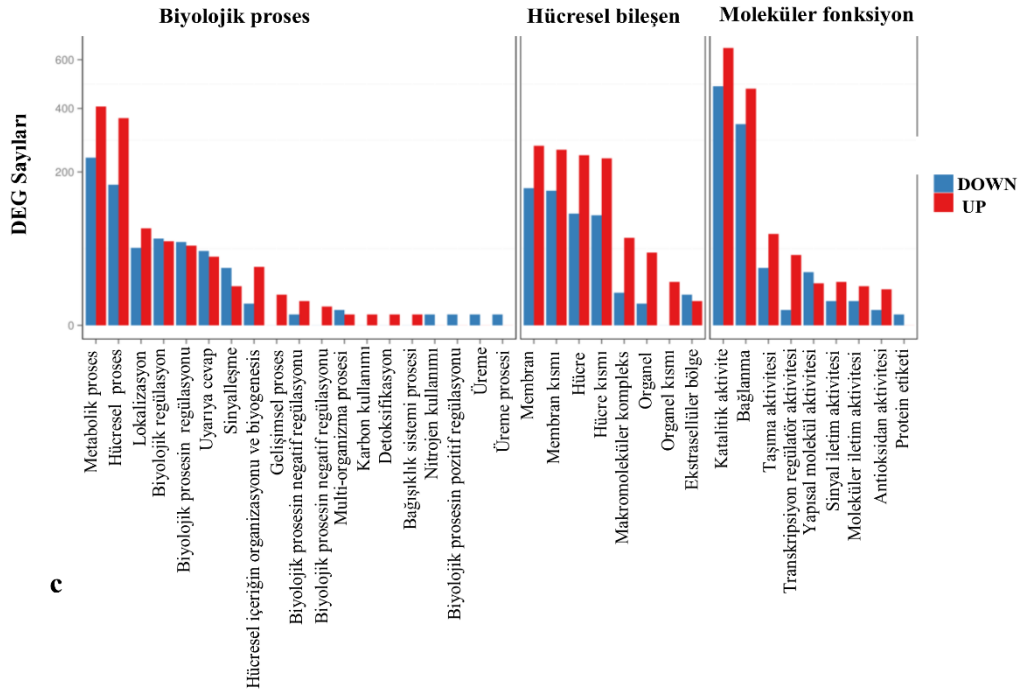
Şekil 4.53. Suşların karşılaştırılmasında up-regüle/down regüle DEG'lerin GO zenginleştirme sonuçları. a) *S. clavuligerus* Δ adpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585

S.clavuligerus pSPGadpA vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında GO Zenginleşme yollarında DEG'lerin sayısı



b

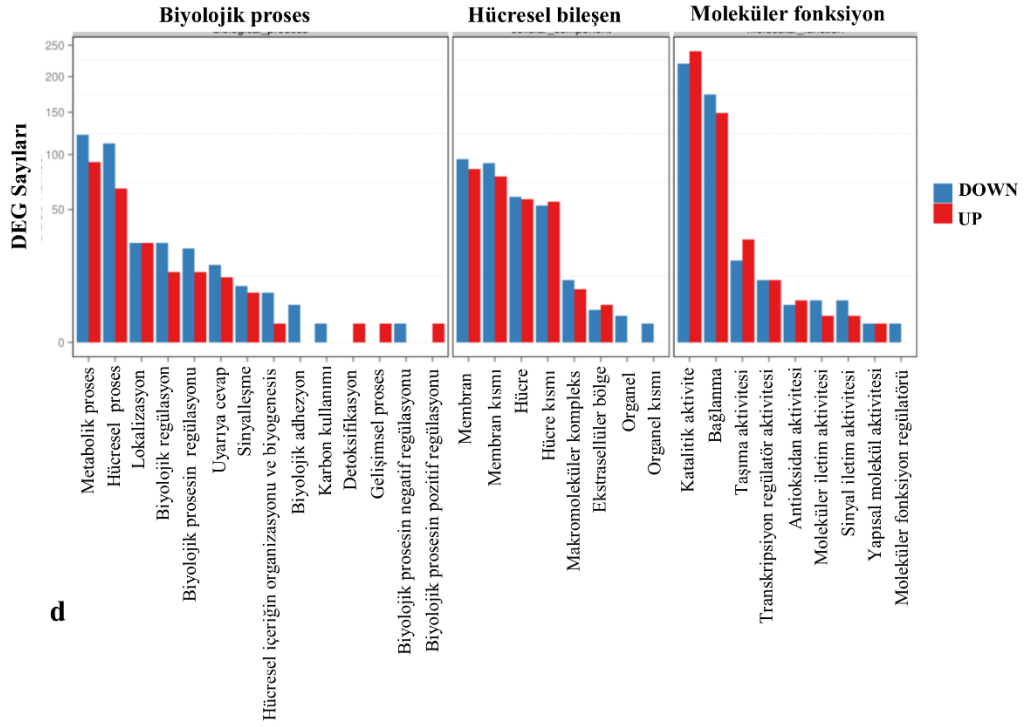
S.clavuligerus pSPG vs *S.clavuligerus* NRRL3585 karşılaştırmasında GO Zenginleşme yollarında DEG'lerin sayısı



c

Şekil 4.53. Suşların karşılaştırılmasında up-regüle/down regüle DEG'lerin GO zenginleştirme sonuçları. , b) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* NRRL 3585, c) *S. clavuligerus* pSPG vs *S. clavuligerus* NRRL 3585 (devam)

S.clavuligerus pSPGadpA vs *S.clavuligerus* pSPG karşılaştırmasında GO Zenginleşme yollarında DEG'lerin sayısı



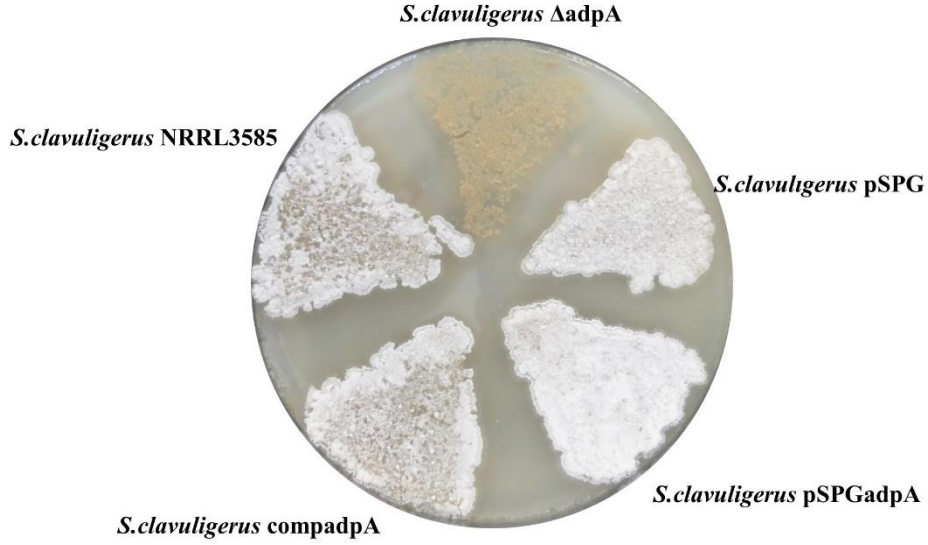
d

Şekil 4.53. Suşların karşılaştırılmasında up-regüle/down regüle DEG'lerin GO zenginleştirme sonuçları. d) *S. clavuligerus* pSPGadpA vs *S. clavuligerus* pSPG (devam)

4.6.4. Morfolojik Farklılaşma/Sporulasyon İle İlişkili DEG'lerin Analizi

Streptomyces cinsinin üyelerinde AdpA morfolojik farklılaşma ile ilgili yüzlerce genin ifadesini kontrol eden bir ana transkripsiyonel düzenleyicidir. Płachetka vd. (2021), *Streptomyces venezuelae*'da bir AdpA ortoloğu olan AdpA_{Sv}'nin genomdan silinmesi sonucu morfolojik farklılaşma ve kloramfenikol biyosentezi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda mutant suşun karakteristik olarak bald (çıplak) bir fenotip sergilediği, komplement suşun yabancı suşdan daha az olmak kaydıyla sporlandığı görülmüştür. Başka bir çalışmada Bu vd. (2019) *Streptomyces xiamenensis* 318 suşunda yine bir AdpA ortoloğu olan AdpA_{Sx}'nin, hücre gelişimi ve spor oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Sporulasyon ve morfolojik farklılaşmadaki durumun analiz edilebilmesi için mutant, yabancı ve *adpA_{Sx}*'in çok kopyasını içeren rekombinant suşu MSA'da üretilmiştir. İlgili çalışmada, *adpA_{Sx}*'in çok kopyasını içeren suşda belirgin bir şekilde spor oluşumunda kusurlu bir fenotip gözlenirken ve mutant suşun yabancı tipden daha erken hava hifleri ve spor oluşturduğu ortaya koyulmuştur. Araştırmada taramalı

elektron mikroskopu (SEM) analiz sonucunda yabancı tip suş ve mutant suşun bol miktarda spor zinciri içerdiği, *adpA_{Sx}*'in aşırı ifade edildiği suşda septa içermeyen vegetatif misellerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, *AdpA_{Sx}*'in hava miselyumu ve spor oluşumunu olumsuz etkilediğini göstermektedir. Zhang vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Streptomyces asterosporus* DSM 41452 suşunun sporlanmadan yoksun bald bir fenotip sergilediği bildirilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen proteom analizlerinde *adpA* mutantından *AdpA*'nın biyosentezinin gerçekleşmediği gösterilmiş, ve bir transpozonun *AdpA* promotörüne yerleştiği tespit edilmiştir. Bunun üzerine, işlevsel bir *adpA* sekansı ile rekombinant bir *Streptomyces asterosporus* DSM 41452 suşu elde ederek, rekombinant suşda morfolojik farklılaşmanın yeniden sağladığını ve nükleozidin antibiyotığının üretiminin desteklendiğini rapor etmişlerdir. Görüldüğü üzere *AdpA*'nın sporulasyon ve morfolojik farklılaşma ile ilgili yolaklar üzerinde doğrudan etkisinin olduğu görülmektedir. Özel olarak, López-García vd. (2010)'ne ait bir çalışmada *S. clavuligerus* genomunda *adpA*'nın apramisin gen kaseti ile tahrip edilmesi, mutant suşda, besiyerine bağımlı şekilde seyrek hava miselyum oluşumuna ve sporlanmayan bir fenotipe neden olmuştur. *S. clavuligerus*'ta *adpA* geninin genomdan silinmesi ve de hücrede çok kopya olarak ifade edilmesi şeklinde *AdpA*'nın etkisini iki yönlü incelediğimiz mevcut çalışmada ISP4 besiyerinde (EK2) sporlandırma sonucunda kontrol suşuna kıyasla *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ 'nın sporlanmadığı, *S. clavuligerus* *compadpA* komplement suşunda sporlanma yeteneğinin geri kazanıldığı ve yabancı suş ile aynı seviyede sporlanmanın olduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, en iyi sporlanma *S. clavuligerus* *pSPGadpA*'da tespit edilmiştir (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. ISP4 besiyerinde suşların sporlanma durumları

RNA-seq sonuçları incelendiğinde ise *adpA* geninin yokluğunda *S. clavuligerus*'ta fenotiple ilişkilendirilen genlerin ifadelerinin negatif yönde etkilendiği görülmüştür (Tablo EK6.1). Özellikle putatif sporlanma proteinini kodlayan *SCLAV_5519* geninin ifadesinin *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole göre 19.54 kat azaldığı, putatif sporülasyon K benzeri proteini kodlayan *SCLAV_0389* geninde ise ifadenin 14.77 kat azaldığı görülmüştür. Hücre bölünme proteinini kodlayan *SCLAV_4356* geninin ifadesi mutant suşda kontrole kıyasla 4.8 kat azalmış, diğer taraftan bu genin ifadesi kontrol gruplarına (yabanıl tip ve *S. clavuligerus* pSPG) kıyasla *adpA*'nın çok kopyasını içeren *S. clavuligerus* pSPGadpA'da 1.67 ila 2.51 kat artış göstermiştir. Buna ek olarak, sporlamanın ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde görev alan *SsgA*'yı kodlayan *ssgA* geninin, *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda ifadesi 2.83 kat daha azken, *S. clavuligerus* Δ adpA'da ise istatistiksel açıdan anlamlı bir düzeyde ifade edilmemiştir.

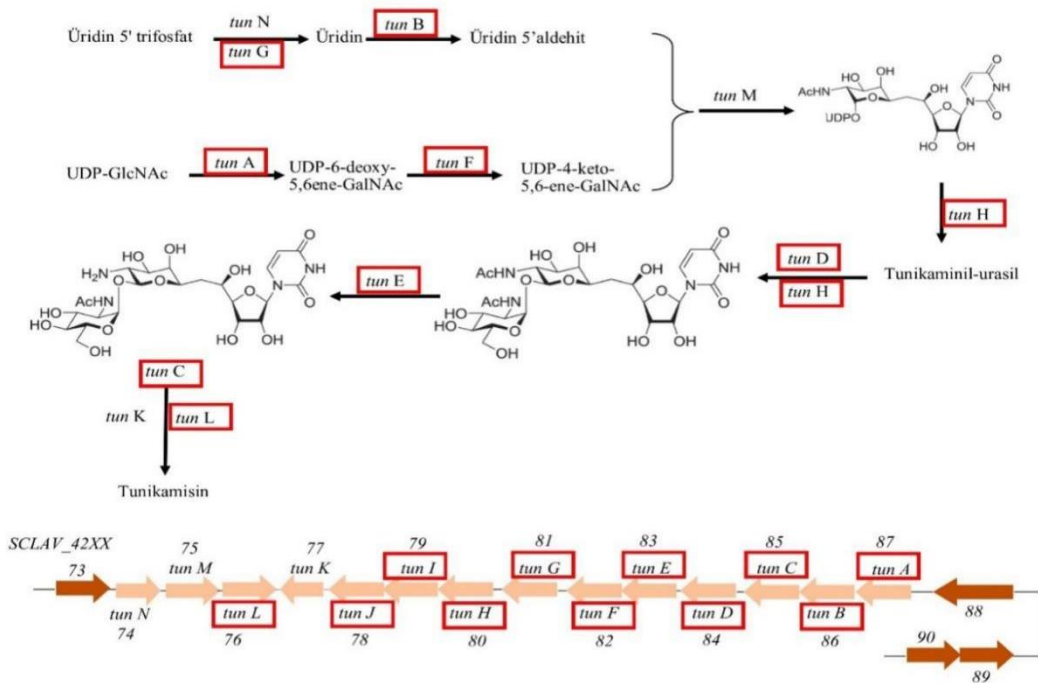
Yine, WhiB benzeri putatif transkripsiyon faktörü olan *WblA*'yı kodlayan *SCLAV_2573* geninin ifadesinde kontrole kıyasla *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda 18.02 kat azalma ve *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise vektör kontrolüne göre ise 2.75 kat artış gözlemlenirken, WhiB ailesi transkripsiyonel düzenleyicisi olan WhiB'yi kodlayan *SCLAV_3950* geninin ifadesi *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda 2.98 kat azalmış ve *WblE*'yi kodlayan *SCLAV_4100* geninin ifadesi 3.3 kat artmıştır. Hava miseli oluşumundan sorumlu olan *afsK-g* (*SCLAV_3467a-3467b*) geninin ifadesi *S.*

clavuligerus Δ adpA suşunda 13.12 kat artarken, *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunun vektör kontrolü ile karşılaştırmasında 4.38 kat düşük ifade düzeyi tespit edilmiştir. Ayrıca, *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda morfolojik farklılaşma ile ilişkili olan *brp* (Butirolakton otoregülatör reseptör proteinini kodlayan *SCLAV_2349* ifadesi 14.44 kat), *adsA/bldN* (ECF alt ailesi RNA polimeraz sigma faktörü 70'i kodlayan *SCLAV_2349* ifadesi 4.85 kat), *bldM* (LuxR ailesi iki bileşenli transkripsiyonel düzenleyiciyi kodlayan *SCLAV_3699* ifadesi 3.11 kat) ve *arpA/scbA* (Transkripsiyonel düzenleyici, ScaA-/BarX gama-butirolakton biyosentezi proteinini kodlayan *SCLAV_2310* ifadesi 2.95 kat) genlerinin ifadeleri *adpA*'nın *S. clavuligerus* genomundan silinmesi ile önemli ölçüde azalmıştır. Daha önceki bir çalışmada, *S. clavuligerus* Δ brp'de *adpA*'nın transkripsiyon seviyesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (López-García vd., 2010). Ek olarak, *S. clavuligerus*'ta *adpA*'nın yokluğunda, çoğunlukla GntR-, TetR-, LysR- ve AraC-ailesi transkripsiyonel düzenleyicileri kodlayan çeşitli genlerin ifade düzeylerinde 15.01 kata kadar düşüş tespit edilmiştir (Tablo EK6.6). Lee vd. (2013) *S. coelicolor*'da *adpA* mutantında, morfolojik farklılaşma ve ikincil metabolizmanın kilit bir düzenleyicisi olan *wblA* geninin ifadesinin arttığını, dolayısıyla AdpA'nın, *wblA* transkripsiyonunu negatif olarak düzenlediğini ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada, Guyet vd. (2014) *adpA* mutantı olan *S. lividans*'da, AraC-ailesi üyelerinden *bldH*'nin ifadesinin 0.39 kat, RNA polimeraz ana sigma faktörü *hrdD*'nin 2.50 kat, putatif RNA polimeraz sigma faktörü *bldN*'nin 0.39 kat ve putatif regülatör *wlbA*'nın 0.31 kat ifade değişimi gösterdiğini tespit ederek AdpA'nın regülasyonda görev alan genler üzerindeki etkisini vurgulamışlardır. Bu vd. (2019) *S. xiamenensis* 318'de *adpA_{Sx}* geninin aşırı ekspresyonunun, morfolojik farklılaşma üzerinde olumsuz etkiler yarattığını ve putatif *ssgA*, *ftsZ*, *ftsH*, *amfC*, morfolojik farklılaşmayı düzenleyen WhiB ailesi proteinlerinden *whiB*, *wblA1*, *wblA2*, *wblE* genlerinin ve sporulasyon ile ilişkili bir proteini kodlayan (*sxim_29740*) genin ifadesinin azalmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

4.6.5. Sekonder Metabolit Biyosentez Kümeleri ile İlişkili DEG'lerin Analizi

4.6.5.1. Tunikamisin Gen Kümesi

RNA-seq sonuçlarına göre, yabancı suşa kıyasla *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda tunikamisin gen kümesindeki genlerin ifadeleri genel olarak 1.14 ila 2.68 kat artmıştır. İfadesi artan genler *tunA* (2.68 kat), *tunB* (2.18 kat), *tunC* (1.80 kat), *tunD* (1.60), *tunE* (1.14 kat), *tunF* (1.45 kat), *tunG* (1.67 kat), *tunH* (1.36 kat), *tunI* (1.42 kat), *tunJ* (1.95 kat) ve *tunL* (1.22 kat)'dir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, ilgili genlerin ifadelerinin *adpA*'nın çok kopyalı olduğu *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda her iki kontrole kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre, *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda *S. clavuligerus* NRRL 3585'e kıyasla ifadesi azalan genler ve log2 kat değişimleri *tunA* (-1.44 kat), *tunB* (-1.76 kat), *tunC* (-2.01 kat), *tunD* (-2.59 kat), *tunE* (-3.45 kat), *tunF* (-2.95 kat), *tunG* (-1.77 kat), *tunH* (-2.27 kat), *tunI* (-2.58 kat), *tunJ* (-3.08 kat) ve *tunL* (-2.31 kat)'dir. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda *S. clavuligerus* pSPG'ye kıyasla ifadesi azalan genler ve log2 kat değişimleri *tunA* (-1.89 kat), *tunB* (-1.86 kat), *tunC* (-1.97 kat), *tunD* (-2.42 kat), *tunE* (-2.90 kat), *tunF* (-2.97 kat), *tunG* (-1.54 kat), *tunH* (-2.06 kat), *tunI* (-2.29 kat), *tunJ* (-2.96 kat) ve *tunL* (-1.83 kat)'dir (Tablo 4.9). *S. clavuligerus* Δ adpA suşda yabancı suşa kıyasla tunikamisin biyosentez kümesinde ve yolağında yer alan up-regüle (kırmızı) genler Şekil 4.55'de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla tunikamisin biyosentez yolağı ve tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki ifadesi artan genler (kırmızı)

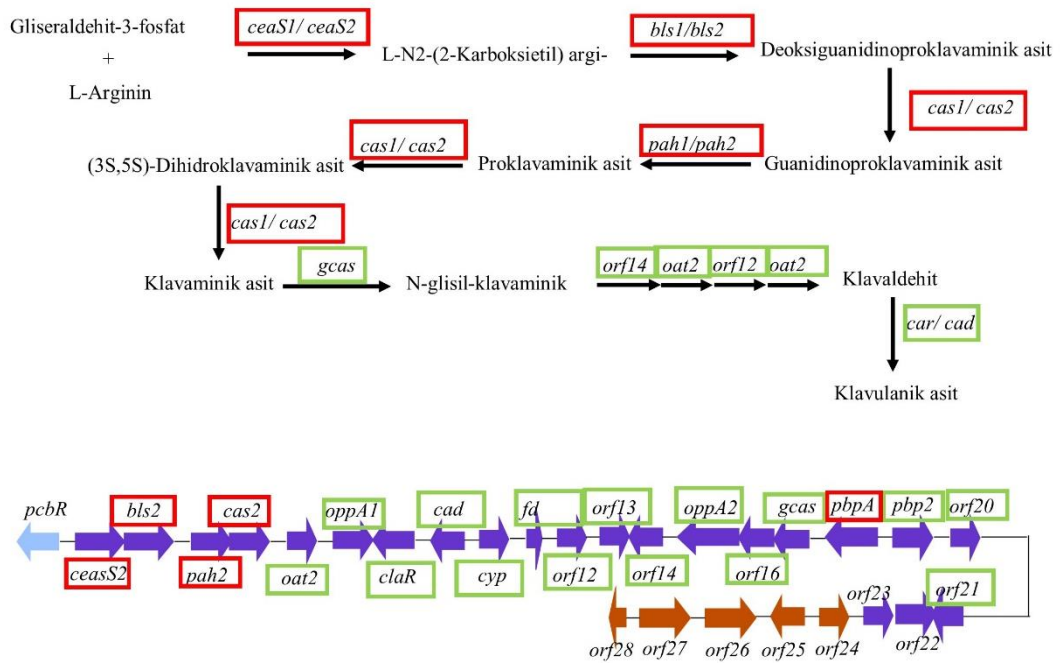
Widdick vd. (2018)'ne ait ve *S. chartreusis*'in tunikamisin gen kümesini (*tunI-14; tunA-tunN*) heterolog olarak ifade eden *S. coelicolor* ile yapılan mutasyon analizi çalışmalarında, bu genlerden yalnızca altısının (*tunABCDEH*) heterolog konakçı *S. coelicolor*'da tunikamisin üretimi için gerekli olduğu, birincil metabolizmada muhtemel karşılıkları olan *tunFGKLN* genlerinin esansiyel olmayıp büyük olasılıkla antibiyotiğin verimli üretimini sağlamada görev aldıkları ortaya koyulmuştur. Antibiyotiğin hücre dışına salınımında görev yapan iki bileşenli bir ABC taşıyıcısını kodlayan *tunI* ve *tunJ* ile bir S-adenosilmetiyonin (SAM) bağımlı metiltransferazı kodlayan *tunM* genlerinin *S. coelicolor*'da ifadelerinin hücrenin bu antibiyotiğe direnç kazandırdığı da aynı çalışmada bildirilmiştir. *S. clavuligerus* Δ adpA'da tunikamisin biyosentezinin erken aşamalarında rol oynayan esansiyel *tunABCDEH* biyosentetik genleri ile tunikamisin verimi ile ilişkili *tunF*, *tunG* ve *tunL* genlerinin artan seviyede ekspresyonu literatür verilerini doğrulamakta ve aynı zamanda AdpA'nın tunikamisin biyosentezi üzerindeki baskılayıcı etkisini işaret etmektedir.

4.6.5.2. CA Biyosentetik Gen Kümesi

CA biyosentetik gen kümesindeki genlerin ifadelerine ait RNA-seq datası incelendiğinde, *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla *oat2*, *oppA1*, *orf14*, *orf16*, *gcaS*, *pbp2* ve *orf20* genlerinin ifadeleri önemli ölçüde azaldığı görülmektedir (1.22 ila 4.23 kat). CA biyosentetik gen kümesinde, mutant suşta yabancı suşa kıyasla ifadesi en fazla azalan gen 11.42 katlık aşağı yönde regülasyon ile *orf21* olarak (RNA polimeraz sigma faktörü) tespit edilmiştir. *orf21* geninin tahrip edildiği *S. clavuligerus* mutantına ait Nişasta asparajin (SA) tanımlanmış besiyerinde CA seviyesinin %10-15 oranında azaldığı, buna karşın, genin hücrede çoklu ifadesi durumunda SA kültürlerinde CA veriminin 1.43 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (Jnawali vd., 2011; López-Agudelo vd., 2021). Patiño vd. (2022)'ne ait bir çalışmada *orf21* geni *ermE** promotörü altında aşırı ifade olan rekombinant *S. clavuligerus*'un GSPG kültürlerinde CA üretiminde 2.6 kat artış ISP kültürlerinde ise 1.8 kat düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca, GSPG kültürlerinde *adpA* ve *gcaS* genlerinin ifadeleri hafif seviyede artmıştır. ISP kültürlerinde ise *claR* ifadesi büyük ölçüde azalmıştır. Yani, Orf21 proteini ortamın besinsel bileşimine bir yanıt olarak CA biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

ceaS2 (1.18 kat), *pah2* (1.03 kat) ve *pbpA* (1.40 kat) genleri ise *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla ifadeleri artan genlerdir. *claR* CSR, *S. clavuligerus* pSPGadpA’da vektör kontrole kıyasla 2.08 kat daha düşük seviyede ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra *argR* baskılayıcı geninin ifadesi *S. clavuligerus* Δ adpA’da 1.4 kat azalmıştır (Tablo EK6.7). Literatürde, *S. clavuligerus*’un *adpA* mutantlarında, CA üretiminde önemli bir azalma meydana geldiği, ayrıca *ccaR* (7 kat azalma) ve *claR* (4 kat azalma) ifadelerinde ciddi düşüişlere bağlı olarak CA oluşumunun erken aşamaları için biyosentez enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonunda büyük bir azalma da literatürde bildirilmiştir (López-García vd., 2010; Paradkar, 2013).

CA yolağında ve biyosentez kümesinde, *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrol suşuna kıyasla up-regüle (kırmızı) ve down-regüle (yeşil) genler Şekil 4.56’da verilmiştir.

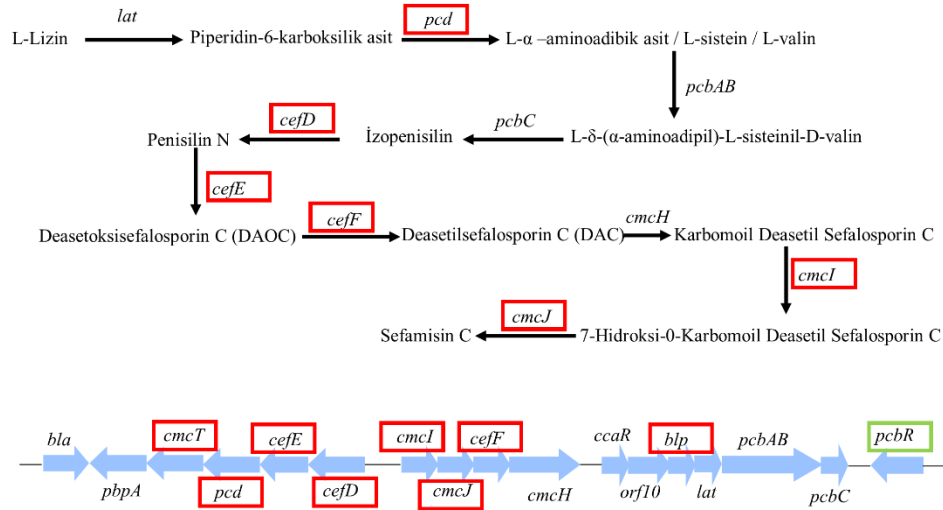


Şekil 4.56. *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla CA biyosentez yolağı ve CA biyosentetik gen kümesindeki farklı ifade olan up-regüle (kırmızı) ve down-regüle (yeşil) genler

4.6.5.3. CephC Biyosentetik Gen Kümesi

CephC gen kümesindeki genlerin ifadeleri incelendiğinde, *S. clavuligerus* Δ adpA’da yabanıl suşa kıyasla *cmcT* (1.65 kat), *pcd* (1.38 kat), *cefE* (1.73 kat), *cefD* (1.15 kat), *cefF* (1.35 kat), *cmcI* (1.57 kat), *cmcJ* (1.02 kat), ve *blp* (3.69 kat) genleri

daha yüksek ekspresyon profili sergilemiştir. Yolaktaki genler içerisinde en önemli ifade artışı *blp* (Beta-laktamaz inhibitör protein benzeri protein) geninde meydana gelmiştir. CephC biyosentetik gen kümesindeki *pbpR* geninin ifadesi mutant suşta 1.67 kat azalmıştır (Tablo EK6.7). Diğer taraftan, *S. clavuligerus* pSPGadpA'da vektör kontrolüne kıyasla da CephC genlerinin ifadeleri azalmıştır. Genlerin ifadelerinin rekombinant suşdaki log₂ kat azalışları şu şekildedir: *cmcT* (-1.83), *pcd* (-1.63), *cefE* (-1.57), *cefD* (-1.88), *cmcI* (-1.47), *cmcJ* (-1.57), *cefF* (-1.79), *cmcH* (-1.76), *ccaR* (-1.31), *orf10* (-2.05), *blp* (-2.32), *lat* (-1.66), *pcbAB* (-1.91), ve *pcbC* (-1.63). CephC yolağında ve biyosentez kümesinde, *S. clavuligerus* ΔadpA suşunda kontrol suşuna kıyasla up-regüle genler kırmızı renkle, down-regüle genler ise yeşil renk gösterilmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. *S. clavuligerus* ΔadpA suşunda kontrole kıyasla CephC biyosentez yolağı ve CephC biyosentetik gen kümesindeki farklı ifade olan up-regüle (kırmızı) ve down-regüle (yeşil) genler

Transkripsiyonel regülatörlerin sekonder metabolitlerin biyosentetik gen kümeleri üzerinde güçlü etkileri vardır. *S. clavuligerus*'ta tunikamisin, CephC ve CA gen kümeleri bisistonik ve hatta daha büyük polisistonik transkriptler halinde organize edilmiştir (Santamarta vd., 2011). Martínez-Burgo vd. (2019) transkripsiyonel aktivatörlerin heterolog ekspresyonunun, sekonder metabolitlerin biyosentetik yollarını aktive etmek için güçlü bir araç olabileceğini öne sürdükleri çalışmalarında birden fazla *Streptomyces* suşunda işlevsel olarak korunmuş olan PAS-LuxR ailesine üye regülatör bir protein olan PimM'yi *S. clavuligerus* ATCC

27064'te çok kopyalı olacak şekilde ifade etmişlerdir. İlgili çalışmada, *pimM* genini taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* suşunda yabancı suşa kıyasla tüm CA biyosentetik genlerinin 1.5 ila 8 kat daha fazla ifade oldukları, benzer şekilde CephC gen kümesinde de genel olarak genlerin ifadelerinde artış kaydedildiği bildirilmiştir. Diğer taraftan *pimM* ekspresyonunun, tunikamisin gen kümesi transkripsiyonunu etkilemediği ortaya koyulmuştur (Martínez-Burgo vd., 2019). Bir başka çalışmada ise CephC-CA süperkümesinin CSR'si olan SARP tipi protein ailesinden CcaR proteinini kodlayan *ccaR* geninin *S. clavuligerus* ATCC 27064 suşunun genomundan silinmiş mutant suşu ile yapılan mikroarray çalışması sonucunda CephC ve CA biyosentez genlerinin ifadelerinin mutantta yabancı suşa kıyasla büyük ölçüde azaldığı saptanmıştır (Álvarez-Álvarez vd., 2014). CephC ve CA biyosentetik gen kümeleri üzerinde CSR etkileri tespit edilmiş olmasına rağmen tunikamisin gen kümesine ait henüz bir CSR geni tanımlanmamıştır ve tunikamisin biyosentezinin düzenleyici mekanizmaları henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Grubumuza ait bir çalışma ile (Baş vd., 2020) tunikamisin biyosentezi üzerinde BldG pleiotropik regülatörün pozitif etkisi tespit edilmiştir. *Streptomyces ghanaensis*'teki moenomisin gen kümesi CSR geni içermemektedir ve ifadesi doğrudan AdpA ve BldA pleiotropik regülatörler tarafından düzenlenmektedir (Makitrynsky vd., 2020). Bu literatür verisi *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezinin kontrolünde AdpA regülatörün düzenleyici etkisini ortaya çıkarmaya yönelik bulgularımızı desteklemektedir.

4.6.6. Transporter ile İlişkili Genler

Transporterlar, tüm canlı organizmalarda metabolizmayı kolaylaştırmak, hücreler arası iletişimi sağlamak, biyolojik sentez ve üreme süreçlerini desteklemek için kritik öneme sahiptir. Bu proteinler, çevreden besinlerin alınmasında, metabolitlerin salgılanmasında, ilaç ve toksinlerin dışarı atılmasında, iyon konsantrasyonu gradyanının membranlar boyunca korunmasında, şekerler, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin salgılanmasında, sinyal moleküllerinin iletilmesinde ve membran proteinlerinin taşınmasında rol oynarlar. *Streptomyces* sp. özelinde, bakteri çeşitli yaşam alanlarına adapte olabilmek için güçlü taşıma sistemleri geliştirmişlerdir. Genel olarak, transporterler *Streptomyces* sp. proteomunun %10'unun üzerinde bir kısmını oluşturmaktadır (Zhou vd., 2016).

Örneğin, *S. coelicolor*'da, 600'den fazla taşıma proteini bulunduğu tahmin edilmektedir. Bunların büyük bir kısmını antibiyotikler de dahil olmak üzere sekonder metabolitlerin taşınmasında rol alan ATP-bağlayıcı Kaset (ABC) ve Majör Kolaylaştırıcı Süper Ailesi (MFS) taşıyıcıları oluşturmaktadır (Bentley, 2002; Zhou vd., 2016). Özellikle bu taşıyıcı sistemin içerisinde ABC taşıyıcılar miselyumlara peptidlerin taşınmasında önemli görevler üstlenirler (Akanuma vd., 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerde; *SCLAV_4936* (15.22 kat), *SCLAV_4935* (11.14 kat) ve *SCLAV_2954* (12.03 kat) gibi ABC taşıyıcıları kodlayan genler kontrole kıyasla *S. clavuligerus* Δ adpA'da aşırı ifade edilmiştir. Aynı genlerin *S. clavuligerus* pSPGadpA'da yabancı suşa kıyasla ifadelerinin arttığı (sırasıyla 3.85, 1.31 ve 2.81 oranında artış) ancak bu artışın mutant suştaki kadar yüksek olmadığı görülmektedir (Tablo EK6.2). Diğer taraftan, *S. clavuligerus* Δ adpA'da *SCLAV_5697* (putatif membran proteini kodlayan gen) yabancı suş ile kıyaslandığında 19.23 katlık azalan bir ifade gösterirken *S. clavuligerus* pSPGadpA'da kendi vektör kontrolüne kıyasla 1.69 kat artış göstermiştir. Genel olarak *adpA* geninin silinmesi, *S. clavuligerus*'ta çeşitli taşıyıcılarla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini artırmıştır. Literatür incelendiğinde yapılan çalışmalarda özellikle ABC taşıyıcıları ile ilişkili transporter genlerinin *adpA* mutantı olan diğer *Streptomyces* suşlarında da bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle gibi artan ifade profili sergilediği görülmektedir. Örneğin Akanuma vd. (2009), *S. griseus* *adpA* mutantının proteom analizinde putatif peptid ABC taşıyıcısının (SGR2418) ifadesinin yabancı suşa kıyasla 5.36 kat artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı şekilde Guyet vd. (2014) *S. lividans* *adpA* mutantında yabancı suşa kıyasla çeşitli ABC taşıyıcı genlerin ifadelerinde yaklaşık 2 kat artış tespit etmişlerdir.

4.6.7. Siderofor ile İlişkili Genler

Sideroforlar; bakterilerin çoğu tarafından salgılanan ve hücre sel solunum ile metabolizma için hayati öneme sahip olan ferrik demire yüksek bir afinite gösteren küçük moleküllerdir (Challis ve Hopwood 2003). Demir, aerobik ortamda çoğunlukla ferrik iyonlar olarak bulunur ve organizmalar için hayati bir elementtir. Ferrik iyonların su içinde nötr pH'da düşük çözünürlüğü, onu sınırlı minerallerden biri yapar (Salwan ve Sharma, 2020). Sideroforlar, ferrik demirle kompleks oluşturarak bu kompleksi hücre içine aktif olarak taşır, hücre içinde ayrışarak ferrik

demirin çeşitli hücrel süreçlerde kofaktör olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Challis ve Hopwood 2003). Hücrenin ferrik demiri yeterli miktarda alamaması durumunda genellikle sekonder metabolit biyosentezini etkinleştirdiği bilinmektedir. (Hwang vd., 2019, Abanoz-Seçgin vd., 2023). Lee vd. (2020), demir kısıtlamasının sekiz *Streptomyces* türünde 21 sekonder metabolit gen kümesinin ifadesi için ortak bir tetikleyici olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerde; siderofor etkileşimli proteini kodlayan *SCLAV_1947 (sidE)* geninin ifadesinin *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ 'da yabancı suşa kıyasla 14.1 kat ifade artışı tespit edilirken *adpA*'nın aşırı ifade edildiği *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise *sidE* geninin ifadesinde 12.8 katlık bir artış elde edilmiştir. Hücrede enerji üretiminde görev alan *SCLAV_3543 (ccsB)* geninde ise yabancı suşa kıyasla *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ 'da 4.1 kat, *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise 3.1 kat artış gözlenmiştir. *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise vektör kontrolüne kıyasla bu genin ifadesinde 1.2 kat azalma söz konusudur (EK6.3). Guyet vd. (2014)'e ait çalışmada *S. lividans*'ın *adpA* mutantında yabancı suşa kıyasla siderofor ile ilişkili genlerden *SLI0454 (cchF)*, *SLI0456 (cchD)* ve *SLI0457 (cchC)*'in ifadelerinde sırasıyla 0.6, 0.4, ve 0.4 kat artış kaydedilmiştir. Bu veriler çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

4.6.8. İki Bileşenli Sistem (TCS)'ler ile İlişkili Genler

İki bileşenli sistem (TCS), bir histidin kinaz (HK) ve bir yanıt düzenleyiciden (RR) oluşur ve bakterilerde özellikle *Streptomyces* gibi organizmalarda hücre içi veya hücre dışı uyarılara hızlı bir şekilde yanıt vermek için kullanılır (Parkinson ve Kofoid, 1992; Jin vd., 2023). *Streptomyces* türlerinde, TCS'ler genellikle sekonder metabolitlerin üretimini düzenlerler (Rodríguez vd., 2013). *Streptomyces* cinsine ait bakteriler, diğer bakteri cinslerine kıyasla daha fazla sayıda TCS'ye sahiptirler. Bu durumun muhtemel sebebi, *Streptomyces*'lerin çevresel değişikliklere hızlı ve etkili bir şekilde yanıt verebilmelerini sağlamaktır (Rodríguez vd., 2013). Fu vd. (2019)'ne ait bir çalışmada *S. clavuligerus*'da CagRS'nin CA üretimi üzerinde olumlu etkisi olan pleiotropik bir düzenleyici TCS olduğu bildirilmiştir. Mutant $\Delta cagRS$ ve yabancı suşun karşılaştırmalı transkriptom analizi sonucunda CagRS TCS'nin CA biyosentetik gen yolunu yukarı yönde (up-regüle) düzenlediği tespit edilmiştir. *S. clavuligerus* için başka TCS'ler de tanımlanmıştır. Kwong vd. (2012), Cvm7p transkripsiyon aktivatörünün transkripsiyonunun *snk* ve *res2* tarafından oluşturulan

bir TCS tarafından kontrol edildiğini bulmuşlardır. *S. clavuligerus*'ta *res2* ve *snk* mutantları, 5S klavam yolu metabolitlerini sentezleyememiştir (Kwong vd., 2012). Salehghamari vd. (2012), *S. clavuligerus*'da bakterilerde fosfat ihtiyacına yanıt olarak bilinen tek düzenleyici mekanizma ve aynı zamanda bir TCS olan Pho regulonu üzerinde çalışmışlar ve *S. clavuligerus*'ta *pho* regulonunun varlığının, fosfat sınırlaması altında hücrenin yüksek CA üretimini desteklediğini bildirmişler, ve 31 genin promotör bölgelerinde PHO bağlanma dizilerini tanımlayarak bu regulonun varlığını göstermişlerdir. Paraluji vd. (2005) ise *asfR-p*'yi *S. clavuligerus* da dahil olmak üzere çeşitli *Streptomyces* bakterilerinde aşırı eksprese ederek bu pleiotropik düzenleyici etkisini göstermişlerdir. Fu vd. (2019b); CepRS'nin (sefamisin düzenleyici/algılayıcı) CephC biyosentezinde kilit rol oynayan bir TCS düzenleyicisi olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamıza ait RNA-Seq sonuçlarında TCS'lerin ifadelerinde anlamlı değişiklikler olduğu görülmüştür (EK6.3). *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla *SCLAV_1381*, *SCLAV_2807* TCS'lerinin ifadeleri sırasıyla 11.8 ve 11.7 kat artarken, *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise aynı genlerde bu artışın sırasıyla 7.8 ve 9.5 kat seviyesinde olduğu görülmüştür. *SCLAV_5389* ve *SCLAV_p1461* TCS'lerinde ise *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla ifadelerinde 11.7 ve 11.2 kat azalma kaydedilmiştir (EK6.5).

4.6.9. Kemotaksis ile İlişkili Genler

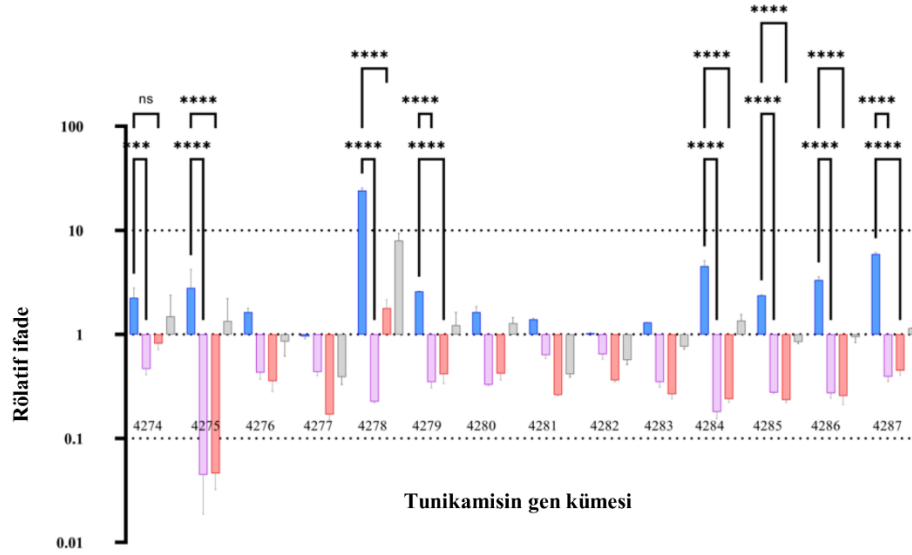
Kemotaksis, hücrelerin kimyasal uyarıcılara yanıt olarak yön değiştirmesidir ve bu süreç, birçok bakteri türünde hayatta kalma ve çevresel adaptasyon için kritik bir durumdur. Bu süreç, kemotaksis sinyal yolları aracılığıyla hücrelerin kimyasal uyarıcılara yanıt olarak hareketlerini düzenlemesiyle gerçekleşir ve değişimin süresini ayarlayarak bakterilerin yön değiştirmelerini sağlar. Genellikle, kemotaksis organizmaların besin veya enerji kaynağı olarak kullanabilecekleri kimyasal maddelere yöneldiği bir besin arama stratejisi olmasının yanı sıra stres faktörlerinden kaçınmasını sağlayan bir harekettir (Keegstra vd., 2022). Kemotaksis, bakterilerin çevrelerini daha etkili bir şekilde kolonileştirmelerine ve en uygun gelişme koşullarını bulmalarına olanak tanır (Guo vd., 2020). Çalışmamızda bir metil-alıcı kemotaksis duyuşal transdüser proteinini kodlayan *SCLAV_p1093* geninin ifadesi *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla 18.1 kat azalmıştır. *S. clavuligerus* pSPGadpA'da ise aynı genin ifadesinde 0.7 katlık bir azalma meydana gelmiştir

(EK6.4). Bu genin kodladığı reseptör protein hücrenin etrafındaki kimyasal sinyalleri algılamakta ve hücrenin hareket yönünü belirleyen sinyal yollarını etkinleştirmektedir (Hangman vd., 1997). Dolayısıyla AdpA mutasyonunun bu genin ifadesini mutant suşta önemli derece azaltarak hücrenin kemotaksis yeteneğini sınırladığı düşünülebilir.

4.7. Tunikamisin Gen Kümesine Ait RNA-seq Ekspresyon Seviyelerinin qRT-PCR Verileri ile Validasyonu

Çalışmamızda, 48 saatlik TYD kültürlerinden izole edilen RNA örnekleri ile tunikamisin biyosentetik yolağında bulunan genlerin ifadelerindeki değişimin incelenmesi için qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.58’de tüm suşlarda T₄₈’de genlerin rölatif ifade değerleri gösterilmiştir.

- *S.clavuligerus* ΔadpA ve *S.clavuligerus* NRRL3585
- *S.clavuligerus* pSPGadpA ve *S.clavuligerus* pSPG
- *S.clavuligerus* pSPG ve *S.clavuligerus* NRRL3585
- *S.clavuligerus* pSPGadpA ve *S.clavuligerus* NRRL3585



Şekil 4.58. qRT-PCR ile tunikamisin gen kümesine ait genlerin 48. saatteki rölatif ifade değerleri (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ve ****: $p < 0.0001$)

Tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki genlerin *S. clavuligerus* ΔadpA suşunda kontrol suşuna kıyasla ifadelerine ait qRT-PCR sonuçları RNA-seq

verilerini doğrulamaktadır (Tablo 4.4). *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla *SCLAV_4274* (*tunN*), *_4276* (*tunL*), *_4278*(*tunJ*) *_4279* (*tunI*), *_4280* (*tunH*), *_4283* (*tunE*), *_4284* (*tunD*), *_4286* (*tunB*) ve *_4287* (*tunA*) genlerinin ifadelerinin arttığı belirlenirken, diğer genlerde kontrolle aynı ya da daha düşük seviyede ifade tespit edilmiştir. *S. clavuligerus* pSPGadpA’da ise bu genlerin ifadelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Gen seviyelerindeki bu ifade değişiklikleri, AdpA regülatörünün yokluğunda *S. clavuligerus*'ta tunikamisin gen kümesine ait genlerin ifadelerinde artış olduğunu ve AdpA’nın bu gen kümesi üzerinde negatif bir regülasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.4. TYD kültürlerinde 48. saatte, tunikamisin gen kümesinde gen ifade farklılıkları

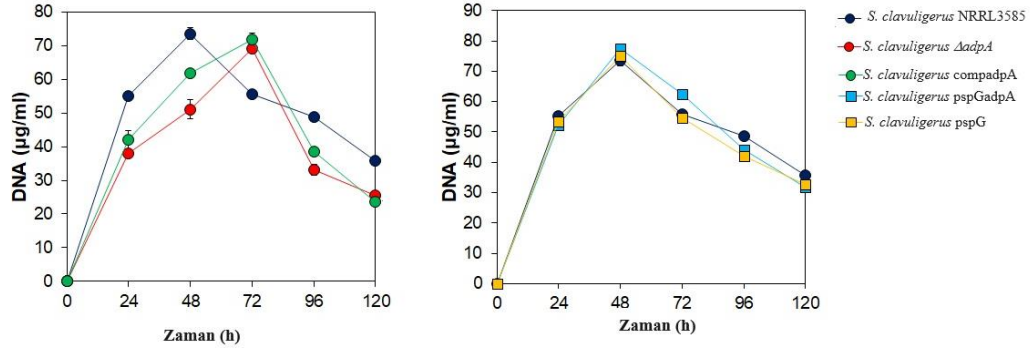
Gen	log2 kat değişim (log2FC)							
	Δ adpA vs NRRL 3585		pSPGadpA vs NRRL 3585		pSPG vs NRRL 3585		pSPGadpA vs pSPG	
	RNA seq	qRT-PCR	RNA seq	qRT-PCR	RNA seq	qRT-PCR	RNA seq	qRT-PCR
<i>4274</i> (<i>tunN</i>)	ND*	2.08	ND*	0.82	ND*	1.49	ND*	0.45
<i>4275</i> (<i>tunM</i>)	ND*	2.38	ND*	0.05	ND*	1.34	ND*	0.04
<i>4276</i> (<i>tunL</i>)	1.21	1.59	-2.30	0.36	-0.48	0.85	-1.82	0.43
<i>4277</i> (<i>tunK</i>)	ND*	0.94	ND*	0.17	ND*	0.39	ND*	0.44
<i>4278</i> (<i>tunJ</i>)	1.93	24.46	-3.08	1.79	-0.12	7.94	-2.95	0.22
<i>4279</i> (<i>tunI</i>)	1.42	2.58	-2.57	0.42	-0.28	1.22	-2.28	0.35
<i>4280</i> (<i>tunH</i>)	1.35	1.57	-2.26	0.42	-0.20	1.28	-2.06	0.33
<i>4281</i> (<i>tunG</i>)	1.66	1.38	-1.76	0.26	-0.23	0.42	-1.53	0.63
<i>4282</i> (<i>tunF</i>)	1.44	1.03	-2.95	0.36	0.01	0.57	-2.96	0.64
<i>4283</i> (<i>tunE</i>)	1.13	1.30	-3.44	0.27	-0.55	0.77	-2.89	0.35
<i>4284</i> (<i>tunD</i>)	1.59	4.68	-2.58	0.24	-0.16	1.36	-2.41	0.18
<i>4285</i> (<i>tunC</i>)	1.79	2.37	-2.01	0.23	-0.04	0.85	-1.96	0.27
<i>4286</i> (<i>tunB</i>)	2.17	3.24	-1.76	0.26	0.09	0.95	-1.85	0.27
<i>4287</i> (<i>tunA</i>)	2.67	5.85	-1.43	0.45	0.45	1.15	-1.89	0.39

*ND: belirtilmedi.

4.8. *S. clavuligerus*'ta AdpA Regülatörünün Antibiyotik Üretimi Üzerindeki Etkisinin Biyoassay ile Belirlenmesi

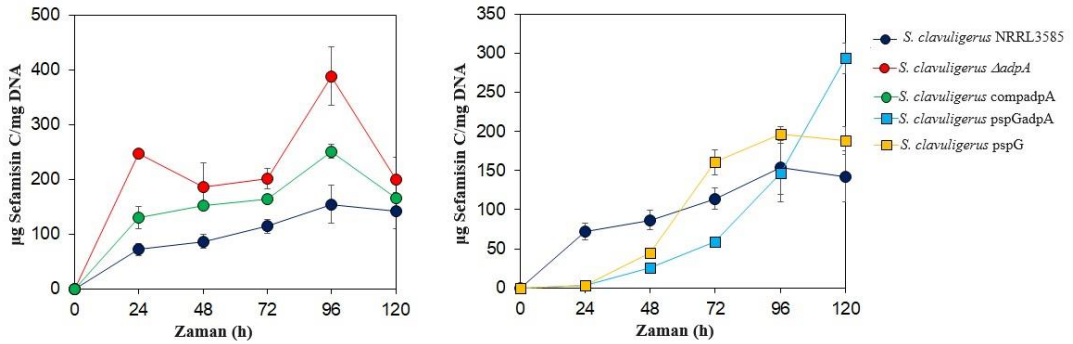
Streptomyces sp.'de sekonder metabolitlerin üretilmesinde AdpA'nın düzenleyici etkisi birçok farklı çalışma ile ortaya konmuştur. Örneğin, Yu vd. (2018)'ne ait bir çalışmada, *S. chattanoogensis* L10'da AdpA ortoloğu olan AdpA_{ch}'nin natamisin biyosentetik gen kümesinde bağlandığı iki bölgede yapılan mutasyon sonucunda natamisin antibiyotiğinin üretiminin %21 ve %25 oranında arttığı tespit edilmiş ve ilgili raporda, natamisin biyosentezinde AdpA'nın üst düzey bir pleiotropik düzenleyici olduğu bildirilmiştir. Yine, Płachetka vd. (2021)'ne ait bir çalışmada *S. venezuelae*'da bir AdpA ortoloğu olan AdpA_{Sv}'nin kloramfenikol antibiyotiği üzerine olan etkisi araştırılmış ve AdpA_{Sv}'nin *S. venezuelae* genomundan silinmesi sonucu elde edilen mutant hücrelerde kloramfenikol üretiminin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar, *Streptomyces*'te AdpA tarafından morfolojik gelişim ve antibiyotik üretimine ilişkin düzenlemenin kullanılan besiyerine bağımlı olduğunu da göstermektedir (Liu vd., 2013).

Çalışmamızda *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. clavuligerus* ΔadpA, *S. clavuligerus* compadpA, *S. clavuligerus* pSPGadpA ve *S. clavuligerus* pSPG suşlarına ait TYD kültürlerinde 120 saatlik fermantasyon sonrasında suşların üreme profilleri incelendiğinde mutant suşun 72. saat dışında tüm fermantasyon süresince yabancı suştan daha yavaş ürettiği, komplement suşun ise yabancı suşa daha yakın bir üreme profili sergilediği belirlenmiştir. Öte yandan, *S. clavuligerus* pSPGadpA hem yabancı suş hem de vektör kontrol suşuna kıyasla 48 ve 72. saatlerde biraz daha iyi gelişmiş, ancak 96 ve 120. saatlerde ya aynı (vektör kontrolüne kıyasla) ya da daha düşük (yabancı suşa kıyasla) bir üreme profili göstermiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı üreme profilleri

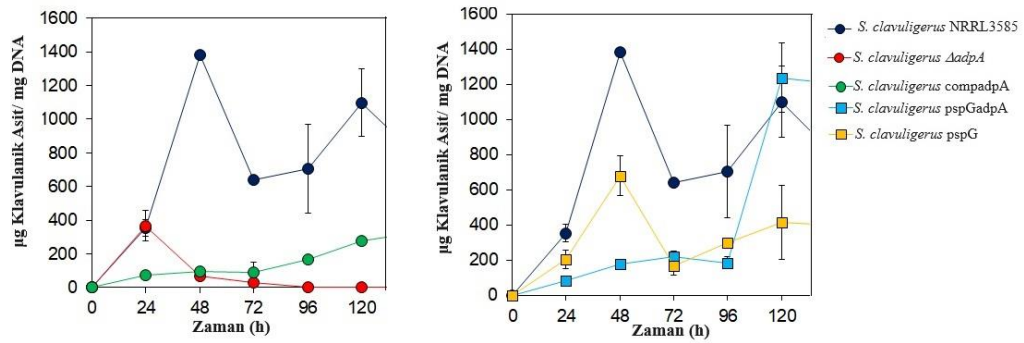
TYD kültürlerinde suşların spesifik CephC üretimleri karşılaştırıldığında, *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda fermantasyonun tüm saatlerinde daha yüksek CephC biyosentezinin gerçekleştiği görülmektedir. Mutant suşun en verimli spesifik CephC üretimi T₉₆'da ve 388.91 µg CephC/mg DNA olarak belirlenmiştir. Bu değer yabancı suşun spesifik CephC üretiminden 2.51 kat daha yüksektir. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda T₉₆'ya kadar spesifik CephC üretimi her iki kontrolden daha az miktarda olurken, sadece fermantasyonun 120. saatinde, ancak istatistiksel açıdan anlamsız bir artış görülmüştür (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik CephC üretimi

Suşların spesifik CA üretimi incelendiğinde en yüksek spesifik CA üretimi fermantasyonun 48. saatinde ve kontrol suşu tarafından sağlanmıştır. T₄₈'de yabancı suş ile mutant suşun CA üretimleri aynı iken mutantın spesifik CA üretimi zamanla giderek azalmış ve 120. saatte son bulmuştur. Komplement suşun spesifik CA üretimi kontrolden az ancak *S. clavuligerus* Δ adpA suşu ile kıyaslandığında daha fazladır. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşu ise T₁₂₀'de yabancı suş ile aynı miktarda CA

üretmiştir. *S. clavuligerus*'ta *adpA* geninin aşırı ifadesi spesifik CA üretiminde olumlu bir katkı sağlayamamıştır (Şekil 4.61).

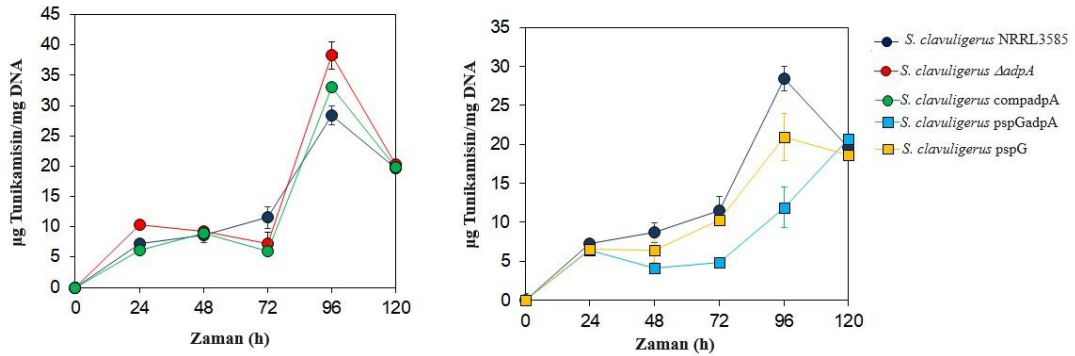


Şekil 4.61. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik CA üretimi

López-García vd. (2010)'nin yapmış oldukları çalışmada tanımlanmış besiyeri olan SA ve zengin besiyeri TSB'de çoğaltılan *adpA* geni apramisin ile tahrip edilmiş mutant *S. clavuligerus*'ta antibiyotik üretimi araştırılmıştır. Bu mutanttaki CA üretimi kullanılan besiyerine bağlı olarak farklılık göstermekte olup, 36. saatte TSB kültüründe yabancı suşun ürettiği CA seviyesinin %14'üne ve SA kültüründe ise 60. saatte %5'ine inmiştir. $\Delta adpA$ mutantında CephC üretimi ise TSB kültürlerinde kontrolle hemen hemen aynı iken, SA kültürlerinde 36. saatten sonra azalmıştır. Bununla birlikte, *adpA* kopya sayısının artırılmasıyla rekombinant *S. clavuligerus*'ta CA ve CephC üretiminin güçlü bir şekilde uyarıldığı tespit edilmiştir (López-García vd., 2010). Bizim çalışmamızda, TYD kültürlerinde, *adpA* geninin genomdan silinmesi CA üretiminde azalışa, CephC üretiminde ise artışa neden olurken, *adpA* geninin çok kopyasını içeren rekombinant *S. clavuligerus*'ta CephC üretimi azalırken, CA üretiminde herhangi bir artış kaydedilmemiştir.

Tunikamisin açısından değerlendirildiğinde, *adpA*'nın silindiği *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ suşunda T₂₄ ve T₉₆'da spesifik tunikamisin üretimi diğer suşlara kıyasla nispeten daha yüksek iken T₇₂'de tunikamisin üretiminin kontrol suşunda biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Komplement suşda da tunikamisin üretim profili *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ suşu ile benzerdir. Ancak en yüksek tunikamisin verimi T₉₆'da ve mutant suş tarafından sağlanmış olup, 38.2 µg tunikamisin/mg DNA'dır. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda ise T₁₂₀ dışında tüm örneklem

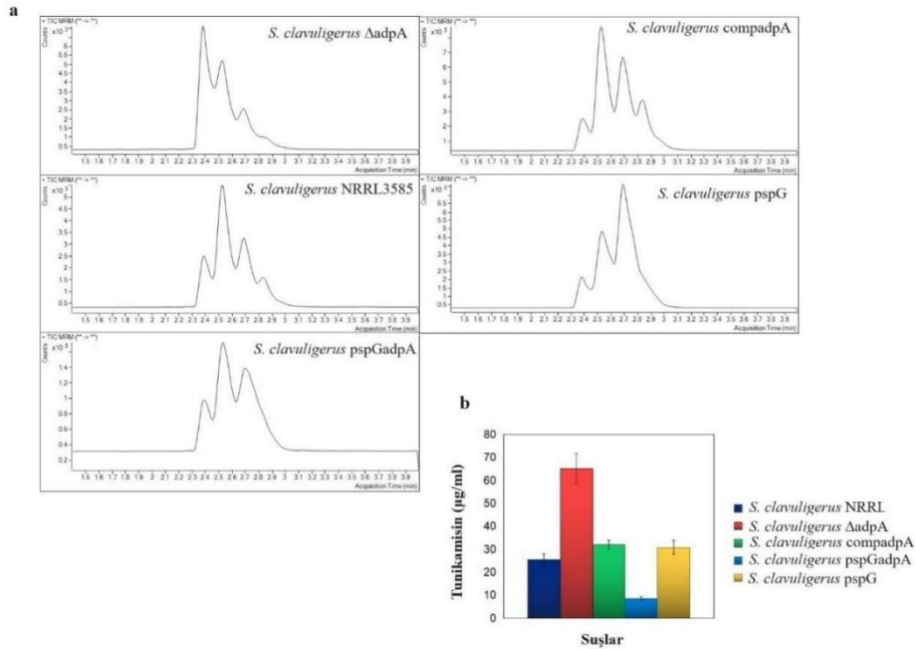
saatlerinde kontrollerden daha az miktarda tunikamisin üretimi gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. Suşların TYD kültürlerinde zamana bağlı spesifik tunikamisin üretimi

4.9. Suşlarda Tunikamisin Üretimini LS-MS/MS ile Belirlenmesi

Çalışmamızda mutant, kontrol ve manipüle suşlara ait TYD kültürlerindeki tunikamisin üretimlerine ait biyoassay verilerinde en yüksek tunikamisin üretim saati baz alınarak T₉₆'ya ait örneklerin LC-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Deney iki kez tekrarlanmıştır. T₉₆'da suşların tunikamisin üretimlerine ilişkin ilgili kromatogramlar Şekil 4.63'de verilmiştir.



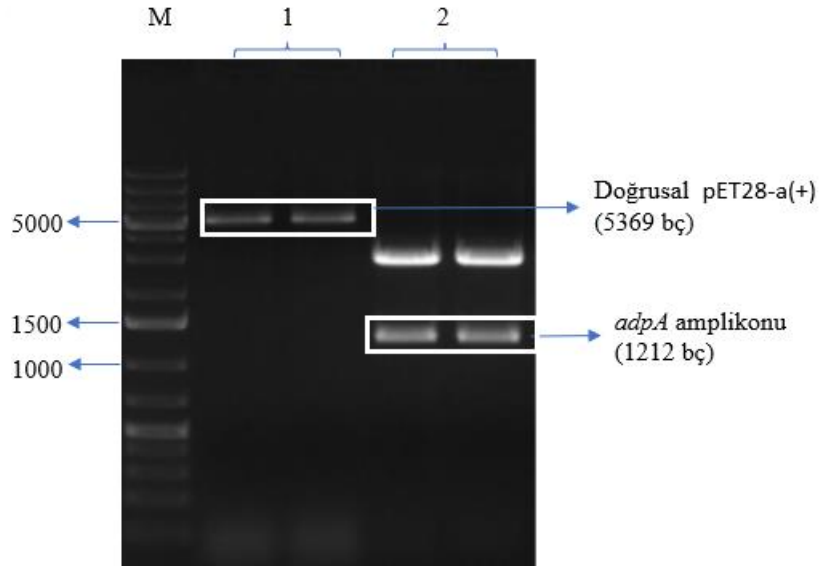
Şekil 4.63. (a) T₉₆'da TYD kültürlerinde suşlar tarafından üretilen tunikamisin homologlarının kromatogramları, (b) Kümülatif LC-MS/MS sonuçları

LC-MS/MS verileri incelendiğinde *S. clavuligerus* compadpA, *S. clavuligerus* pSPG ve *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşlarının hemen hemen aynı miktarda tunikamisin ürettikleri, buna karşın *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla tunikamisin üretiminin 2.55 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde, *adpA*'nın aşırı ekspresyonunun, tunikamisin üretiminin kontrole kıyasla 2.99 kat azalmasına yol açtığı saptanmıştır. LC-MS/MS verileri biyoassay datası ile uyumlu olup, bize AdpA'nın tunikamisin üretimi üzerinde negatif düzenleyici etkisi olduğunu göstermektedir.

4.10. rAdpA Proteininin Saflaştırılması

4.10.1. *adpA* Geninin pET28-(a)+ Vektörüne Klonlanması

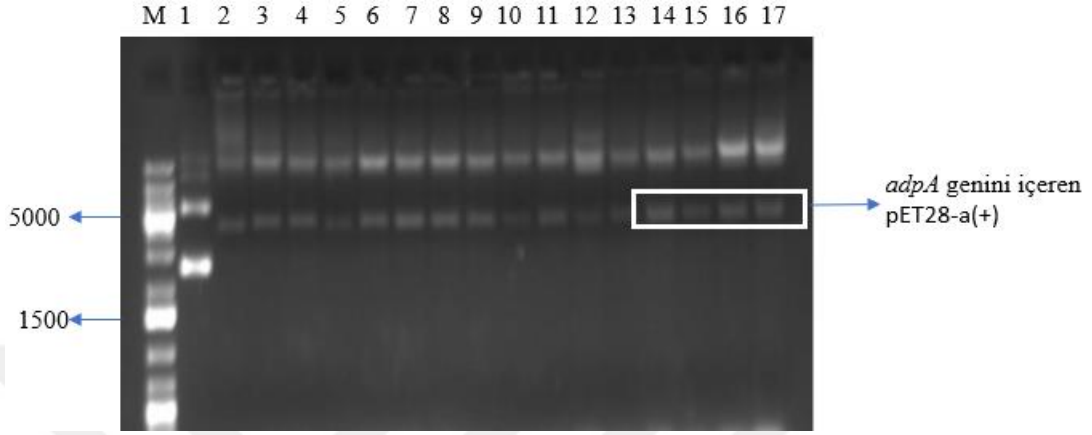
rAdpA proteinin pET28-a(+) ekspresyon vektörü aracılığı ile *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ifadesi gerçekleştirilmiştir. pET28-a(+) ekspresyon vektörüne *adpA* geninin klonlanması için rekombinant pGEMTadpA vektörü kullanılmıştır. Bu amaçla; *adpA* geni, pGEMTadpA rekombinant vektöründen NotI-NdeI enzimleri kullanılarak çıkarılmış ve pET28-a(+) vektörü de aynı enzimlerle kesilip doğrusal hale getirilmiştir (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. pGEMTadpA ve pET28-a(+) vektörlerinin NotI ve NdeI enzimleri ile kesim sonuçları. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: NotI ve NdeI enzimleri ile kesilmiş pET28-a(+), 2: NotI ve NdeI enzimleri ile kesilmiş pGEMTadpA

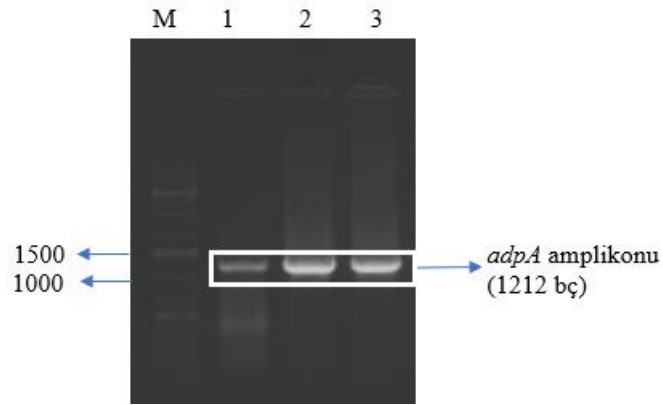
Jel ekstraksiyonu ile 5.1 ng/ μ l pET28-a(+) ve 14 ng/ μ l *adpA* fragmenti jelden ekstrakte edilmiştir. Ligasyon reaksiyonunda 20 ng pET28-a(+) vektörü

kullanılmıştır. Ligasyon ürünleri transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Hücreler 30 μ g/ml kanamisin içeren LA besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 16 saat inkübe edilmişlerdir. Oluşan kolonilerden manuel plazmid izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.65).

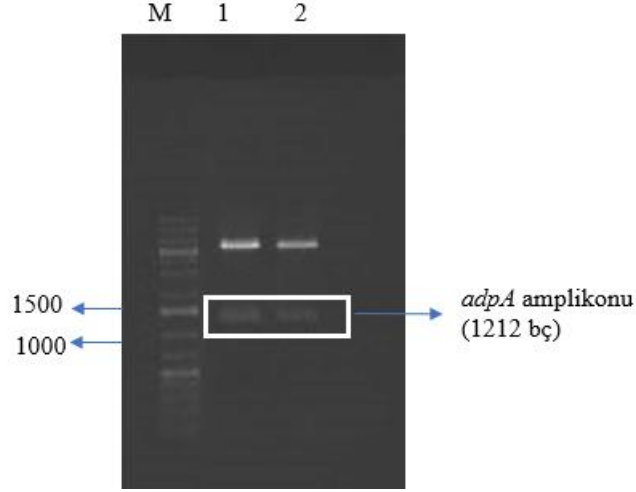


Şekil 4.65. Transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler, M: O’GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pET28-a(+) plazmid, 2-17: *adpA* genini taşıyan rekombinant pET28-a(+) plazmidleri

Aday rekombinant pET28-a(+) plazmidleri elde etmek amacıyla 15 ve 16 numaralı koloniler seçilmiştir. Kit ile plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra aday rekombinant plazmidleri doğrulamak için PCR ve enzim kesimi yapılmıştır (Şekil 4.66, Şekil 4.67).

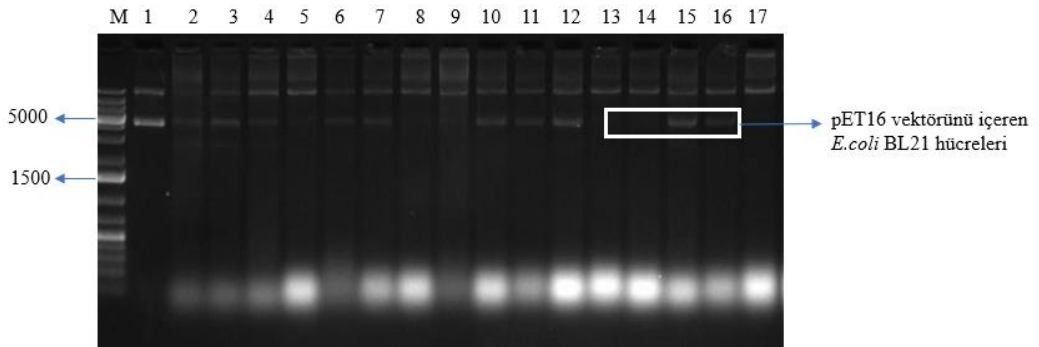


Şekil 4.66. *adpA* genini taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörlerinin PCR ile doğrulama sonuçları. M: O’GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA’sı kullanılarak yapılan PCR, 2: Kalıp olarak 15 numaralı rekombinant pET28-a(+) plazmidinin kullanıldığı PCR, 2: Kalıp olarak 16 numaralı rekombinant plazmidin kullanıldığı PCR sonucu



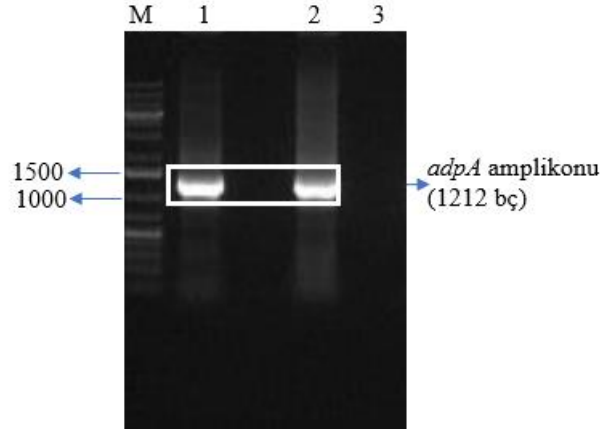
Şekil 4.67. *adpA* genini taşıyan rekombinant pET28-a(+) vektörlerinin NdeI-NotI enzim kesimi ile doğrulama sonuçları. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder 15: Kalıp olarak *adpA* ampliconunun yerleştirildiği 15 numaralı pET28-a(+) plazmidinin kullanıldığı enzim kesimi, 16: Kalıp olarak *adpA* ampliconunun yerleştirildiği 16 numaralı pET28-a(+) plazmidin kullanıldığı enzim kesimi

Doğrulama çalışmaları sonucu plazmidlerin genleri doğru yönde taşıdıkları tespit edilmiştir. Rekombinant plazmidler pET15 ve pET16 olarak, bu plazmidi taşıyan rekombinant *E. coli* DH5 α hücreleri ise *E. coli* pET15 ve *E. coli* pET16 şeklinde isimlendirilmiştir. İlgili vektörlerden pET16 transformasyon aracılığı ile *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonucu üreyen kolonilerden manuel plazmid izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.68).



Şekil 4.68. Transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden manuel yöntemle izole edilen plazmidler, M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Halkasal pET28-a(+) plazmidi, 2-17: pET16 vektörü kullanılarak *E.coli* BL21 hücrelerine yapılan transformasyon sonucu elde edilen plazmidler

Manuel plazmid izolasyonu sonucu elde edilen 2 numaralı koloniden kit ile yeniden plazmid izolasyonu yapılmış ve bu plazmidde rekombinasyonun doğruluğu PCR ile ispatlanmıştır (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. *E. coli* BL21 hücrelerine pET16 vektörlerinin transformasyonla aktarılmasının PCR ile doğrulanması M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Kalıp olarak *S. clavuligerus* NRRL 3585 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PCR, 2: Kalıp olarak *E. coli* BL21'den izole edilmiş pET16 plazmidinin kullanıldığı PCR, 3:DNA yerine distile su kullanılarak yapılan negatif kontrol PCR'ı

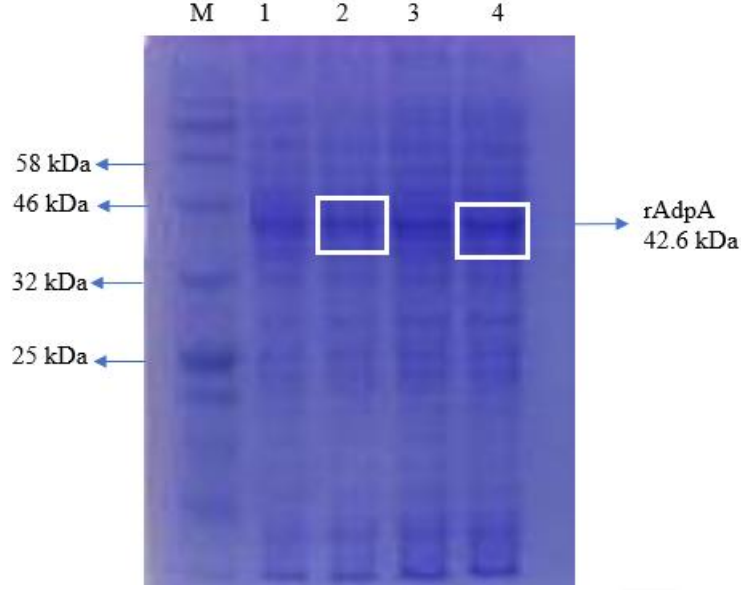
PCR reaksiyonu ile doğrulanan rekombinant vektör pET16BL olarak isimlendirilirken bu vektörü taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri *E. coli* pET16BL olarak isimlendirilmiştir. Rekombinant genin vektör üzerindeki konumu Şekil 4.70'de verilmiştir.



Şekil 4.70. *adpA* geninin pET28a(+) daki konumu

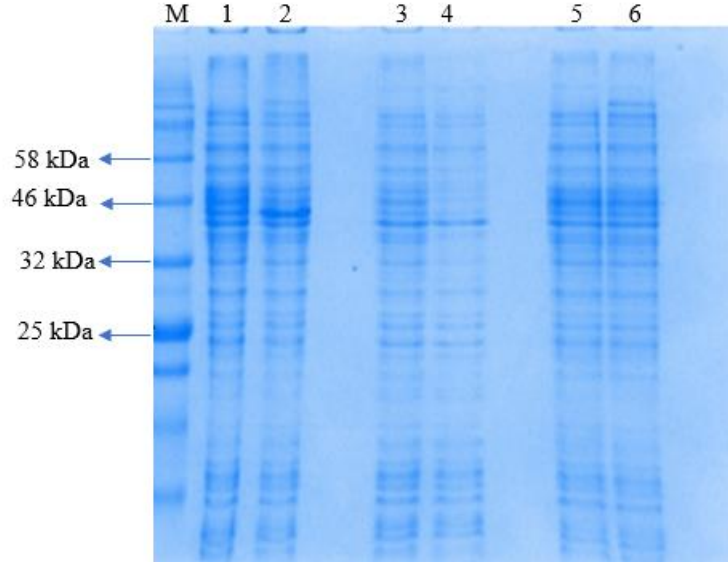
4.10.2. rAdpA Proteininin Saflaştırılması

rAdpA proteini ExPasy programıyla biyoinformatik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerde 399 amino asit uzunluğuna ve teorik olarak 9.6 pI değeri ile 42.6 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein olduğu görülmüştür (<https://web.expasy.org/translate/>; https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool). Proteinin saflaştırılması için *E. coli* pET16-BL kültürü 1 mM IPTG ile indüklenmiştir. Kültür çöktürülerek pellet elde edilmiş, pelletler LEW tamponunda çözündürülerek sonike edilmişlerdir. Sonikasyonla elde edilen protein çözeltileri önce SDS_PAGE'de yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.71).



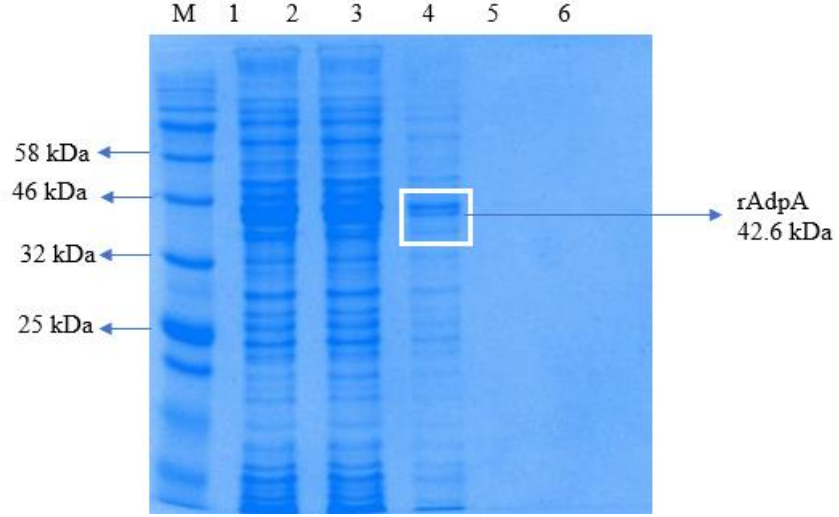
Şekil 4.71. IPTG ile indüklenmiş kültürlerde AdpA ifadesi. M: Prestained protein moleküler ağırlık markörü, 1: 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmemiş örnek, 2: 30°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmiş örnek, 3: 37°C'de IPTG ile indüklenmemiş kontrol örneği, 4: 37°C'de 1 mM IPTG ile indüklenmiş örnek

Her iki indükleme sıcaklığında, kontrol ve IPTG indüklenmiş örneklerde rAdpA bandı gözlenmiştir. Kontrolde rAdpA proteinin ifadesinin görülmesinin sebebi; *lac* ve L8-UV5 promotorları, IPTG yokluğunda iyi bir şekilde baskılanmış olmasına rağmen her ikisinin de bazal aktiviteye sahip olmasından dolayıdır (Kaur vd., 2018). Optimizasyon çalışmaları sonucunda *E. coli* pET-16BL suşunda IPTG ile indükleme sonrasında rekombinant rAdpA proteininin ekspresyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla *E. coli* pET16-BL suşu, *adpA* genini içermeyen boş pET28-a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21 suşu ile karşılaştırılmıştır. Her iki suş da 37°C'de OD₆₀₀~ 0.5 değerine ulaştığında erlenlerden bir tanesine 2 mM IPTG eklenmiş ve 5 saatlik inkübasyon sonrasında protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.72'de her kültürden elde edilen protein ifadeleri gösterilmektedir.



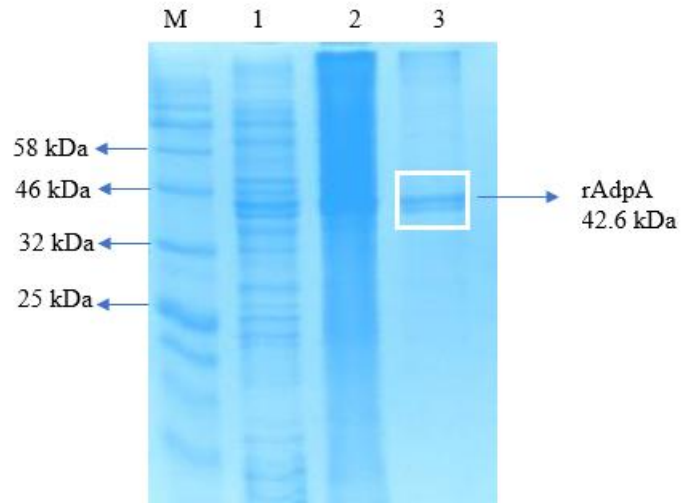
Şekil 4.72. Kültürlerde rAdpA ifadesi. M: Prestained protein moleküler ağırlık markörü (NEB# P7212S), 1: IPTG eklenmemiş *E. coli* pET16-BL kontrol kültüründen toplam protein, 2: IPTG ile indüklenmiş *E. coli* pET16-BL kültürüne ait total protein, 3: *adpA* geni içermeyen boş pET28-a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21 e ait IPTG eklenmemiş kültürden elde edilen protein, 4: *adpA* geni içermeyen boş pET28-a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21 e ait IPTG eklenmiş kültürden elde edilen protein, 5: pET28-a(+) vektörünü içermeyen *E. coli* BL21 e ait IPTG ile indüklenmemiş kültüre ait total protein 6: pET28-a(+) vektörünü içermeyen *E. coli* BL21 e ait IPTG ile indüklenmiş kültüre ait total protein profili

Şekil 4.72 incelendiğinde; kontrol *E. coli* BL21, *adpA* genini içermeyen boş pET28-a(+) vektörüne sahip olan *E. coli* BL21 suşunda, ve ifade vektörünü taşımayan standart *E. coli* BL21 suşunda IPTG indüklemesi varlığında/yokluğunda herhangi bir rAdpA ifadesinin olmadığı görülmektedir. Bu bulgular, spesifik rAdpA ifadesinin sadece pET-BL16 vektörüne sahip rekombinant *E. coli* BL21 suşunda gerçekleştiğini göstermektedir. Optimizasyon çalışmalarından sonra, Protino Ni-TED kolonları (Macherey-Nagel) kullanılarak rAdpA proteini saflaştırılmıştır (Şekil 4.73).



Şekil 4.73. Protino Ni-TED kolonları kullanılarak rAdpA proteininin saflaştırılması. M: Unstained protein moleküler ağırlık markörü, 1: IPTG ile indüklenmiş örnek, 2: Flow through örneği, 3: Birinci yıkama örneği, 4: İkinci yıkama örneği, 5: Üçüncü yıkama örneği, 6: Elüsyon örneği

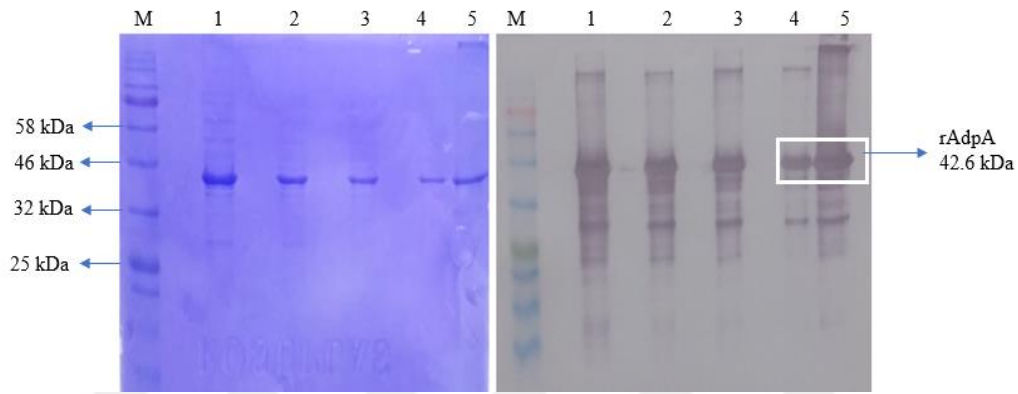
Örneklere konsantre etmek için 30 kDa cutoff değerine sahip Amicon® Ultra-15 30K santrifüj filtresi kullanılmıştır. Konsantre edilmiş ve saf rAdpA proteini Şekil 4.74'de gösterilmektedir.



Şekil 4.74. Amicon® Ultra-15 30K santrifüj filtresi kullanılarak rAdpA'nın saf ve konsantre halde elde edilmesi. 1: IPTG ile indüklenmiş örnek, 2: Birinci yıkamaya ait örnek, 3: İkinci yıkamadan elde edilen rAdpA proteini

4.11. Western Blot Deneyi ile Rekombinant Saf rAdpA Proteininin Varlığının Doğrulanması

Saflaştırma çalışması sonucu elde edilen proteinin rAdpA olduğu yapılan Western blot analizi ile doğrulanmıştır. Ni-TED saflaştırma kolonunun çalışma prensibine göre histidin amino asidi eklentisine sahip proteinler kolondan geçirilerek saflaştırılmaktadır. His-Tag primer antikor kullanılarak gerçekleştirilen Western blot çalışması ile His-Tag eklentisine sahip rAdpA proteininden sinyal elde edilmiştir (Şekil 4.75).



Şeki 4.75. Saf rekombinant rAdpA proteininin SDS-PAGE (a) ve Western blot (b) analizleri. M: Prestained markör (New England Biolabs P7712), 1: 50 µg AdpA, 2: 25 µg AdpA, 3: 15 µg AdpA, 4: 5 µg AdpA, 5: 25 µg ısı ile denatüre edilmiş AdpA

4.12. Jel Retardasyon Deneyi-EMSA (Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi)

4.12.1. AdpA Proteininin Bağlanma Bölgelerinin EMSA ile Belirlenmesi

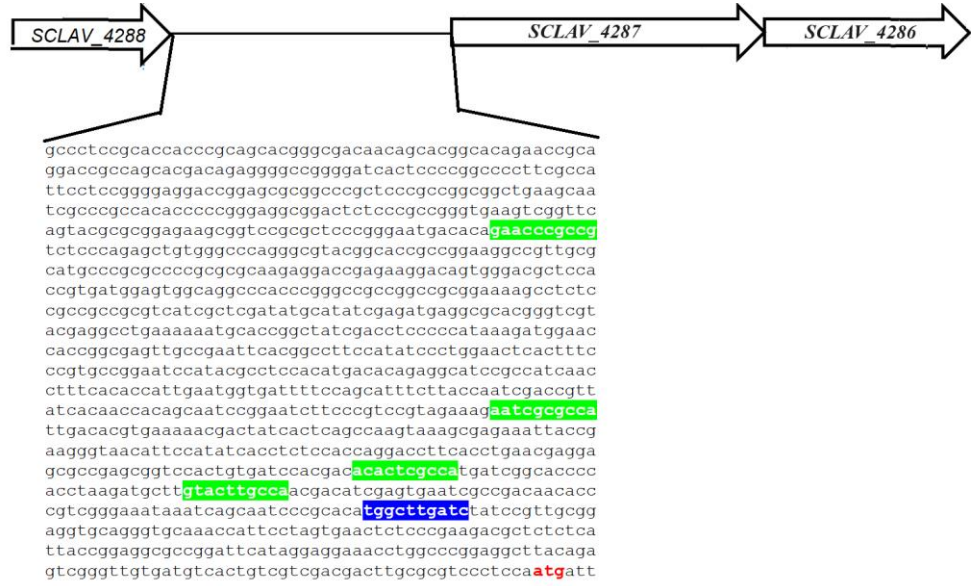
AdpA sekonder metabolitlerin üretiminde biyosentetik yolların doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenmesinde görev almaktadır. Yapılan birçok çalışmada AdpA proteininin biyosentetik yollara veya öncülerine bağlanarak metabolitlerin üretimini etkilediği görülmektedir. Örneğin, Kang vd. (2023)'ne ait bir çalışmada *S. lincolnensis*'teki sekonder metabolizmanın transkripsiyonel düzenleme ağında AdpA'nın etkisi araştırılmıştır. EMSA çalışmaları ile AdpA_{lin}'nin *S. lincolnensis*'te linkomisin ve ayrıca melanin biyosentezi için gerekli olan anahtar enzimlerin üretiminden sorumlu çeşitli genler ile doğrudan etkileşime girdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, aynı bakteride, AdpA_{lin}'nin ayrı ayrı bu sekonder metabolitlerin biyosentezleri üzerinde aktivatör/represör rolü tespit edilmiştir. Bu vd. (2019)

tarafından, *S. xiamenensis*'te bir AdpA ortoloğu olan AdpA_{Sx} proteininin, xiamenmisin ve polisiklik tetramat makrolaktamların (PTM'ler) biyosentetik gen kümelerinde bulunan yapısal genlerin promotör bölgelerine bağlandığı EMSA ile gösterilmiştir.

S. clavuligerus'a ait tunikamisin gen kümesinde henüz regülatör bir gen tanımlanmadığından tunikamisin üretimin global bir kontrol mekanizmasının altında olması muhtemeldir. *Streptomyces* genomunda nadir görülen TTA lösin kodonu *adpA* gen dizisinde yer almaktadır ve devamındaki nükleotid Y (C veya T)'dir. Tunikamisin gen kümesi incelendiğinde *SCLAV_4288* ve *SCLAV_4287* geni arasındaki intergenik bölgenin nükleotid dizisinde de aynı motif bulunmaktadır. *Streptomyces* genomunda bağlandığı konsensus dizisi TGGCSNGWWY (S: G veya C; W: A veya T; Y: T veya C; N: herhangi bir nükleotid)'dir (Ohnishi vd., 2005). Bu dejenere konsensüs dizisi nedeniyle AdpA düşük bir DNA bağlama özgülüğü sergilemektedir. Bu özellik, AdpA'nın çeşitli transkripsiyon faktörleriyle kompleksler oluşturmasını sağlayarak birden fazla genin ekspresyonunu kontrol eden temel düzenleyici ağların meydana getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Higo vd., 2012; Płachetka vd., 2022). Yapılan FIMO (version 5.1.1.- motif araştırma aracı, meme-suite.org) analizine göre AdpA proteininin tunikamisin gen kümesindeki promotör dizilerine potansiyel bağlanma noktaları *SCLAV_4288* ve *SCLAV_4287* geni arasındaki intergenik bölgededir (Tablo 4.5 ve Şekil 4.76).

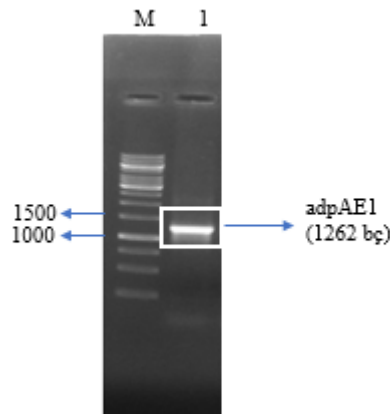
Tablo 4.5. *S. clavuligerus*'a ait tunikamisin gen kümesinde AdpA proteininin bağlandığı konsensus dizisinin bulunduğu lokasyonlar ve nükleotid dizileri

Direkt/Revers (Gene göre konumu)	<i>SCLAV_4287</i> başlangıç kodonundan uzaklık (bç)	Eşleşen Konsensus dizisi TGGCSNGWWY
Revers	411-420	[TGGCGCGATT]
Revers	268-277	[TGGCGAGTGT]
Revers	232-241	[TGGCAAGTAC]
Direkt	163-172	[TGGCTTGATC]
Revers	879-888	[CGGCGGGTTC]



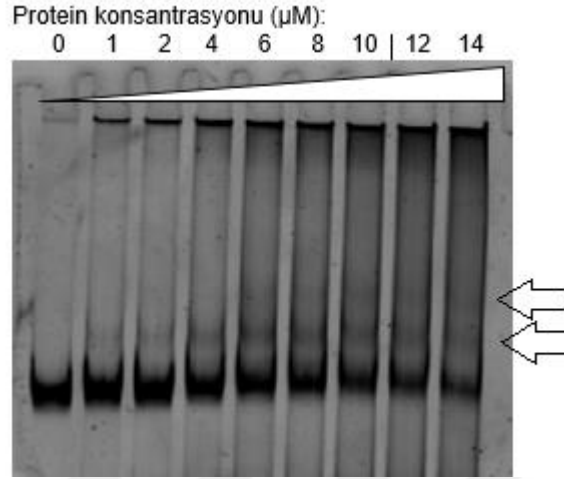
Şekil 4.76. *SCLAV_4288* ve *SCLAV_4287* arasındaki intergenik bölgenin nükleotid dizisi. Yeşil (Revers) ve mavi (Direkt) renklendirme (Gene göre Revers ve Direkt bağlanma konumu temsil eder), eşleşen dizilerdeki korunmuş TGGCSNGWWY motiflerini göstermektedir

AdpA pleiotropik regülatör proteininin tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki promotor bölgelerine bağlanma kapasitesini belirlemek ve *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentezi üzerindeki olası düzenleyici rolünü anlamak amacıyla EMSA çalışmaları gerçekleştirilmiştir. EMSA için tespit edilen bölge adpAE1 olarak isimlendirilmiştir. İlgili 1262 bç'lik bölge AdpAE1 primerleri (EK5) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.77).



Şekil 4.77. AdpA regülatörünün bağlanma bölgelerini belirlemek üzere EMSA'da kullanılan PCR ampliconu. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: adpAE1 ampliconu

Makitrynsky vd. (2013) tarafından rapor edilen yöntem optimize edilerek reaksiyon içeriği ve koşulları oluşturulmuş ve EMSA sonucu Şekil 4.78'de verilmiştir.

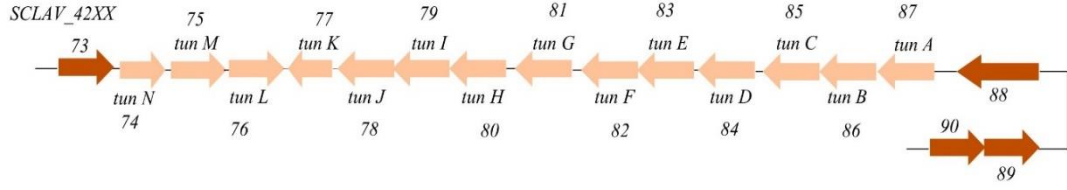


Şekil 4.78. *S. clavuligerus*'ta rAdpA bağlanma bölgelerinin EMSA analizi (a) 0: rAdpA içermeyen serbest prob, 1: 1 µM (0.042 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 2: 2 µM (0.085 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 4: 4 µM (0.171 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 6: 6 µM (0.258 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 8: 8 µM (0.344 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 10: 10 µM (0.430 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 12: 12 µM (0.516 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon, 14: 14 µM (0.602 µg/ml) rAdpA içeren reaksiyon

EMSA sonucunda, rAdpA proteininin adpAE1 olarak isimlendirilen prob bölgesine bağlandığı belirlenmiştir. Widdick vd. (2018)'nin, *S. chartreusis* üzerinde yaptıkları araştırmada, *tunA*'nın yukarı akış bölgesinde iki promotor bölgesinin (*tunp1* ve *tunp2*) transkripsiyonda birleşik bir operon görevi gördüğü bildirilmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızın sonuçları *S. clavuligerus*'ta böyle bir promotorun *tunA*'nın yukarısında mevcut olabileceği fikrini desteklemektedir. EMSA sonucumuz, global düzenleyicilerden AdpA'nın, yalnızca CSR'ler aracılığıyla sekonder metabolit gen kümelerinin ifadelerini kontrol etmediğini, aynı zamanda biyosentetik gen kümelerine doğrudan bağlanarak da düzenleyici etkilerini gösterebildiklerine dair yeni literatür bulgularını desteklemektedir (Bednarz vd., 2019).

4.13. *S. clavuligerus* NRRL 3585 Suşunda Tunikamisin Biyosentetik Yolağındaki Genlerin Ortak Transkripsiyonel Profili

Tunikamisin gen kümesindeki lokalize olmuş olan genler birbirine çok yakın konumlanmıştır (Şekil 4.79).

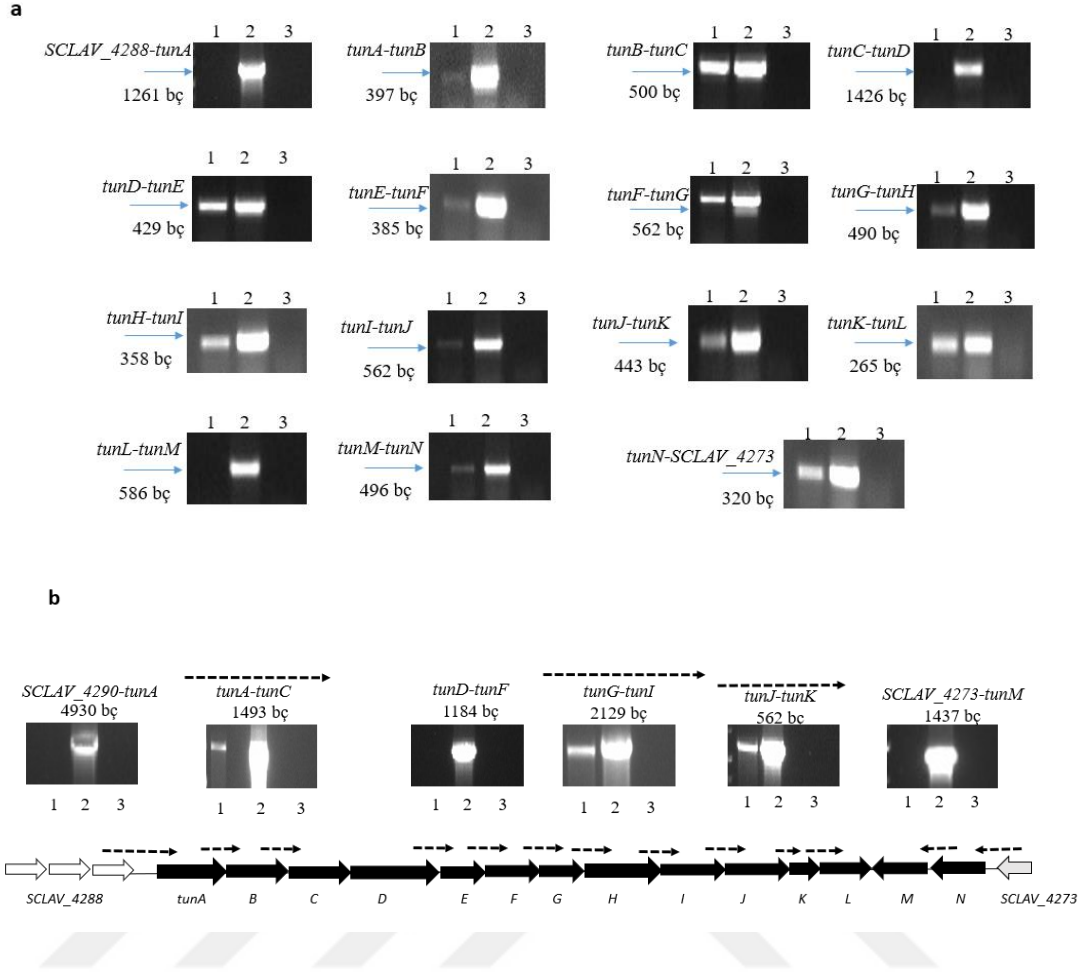


Şekil 4.79. *S. clavuligerus*'ta tunikamisine ait gen kümesi

Genlerin ortak transkripsiyonel profilinin belirlenebilmesi için genler arasındaki intergenik bölgeleri de kapsayacak primerler (EK5) kullanılarak yapılan RT-PCR analizi ile çoğaltılan bölgelerin uzunlukları Tablo 4.6'da verilmiştir. RT-PCR deney sonuçları ise Şekil 4.80'de verilmektedir.

Tablo 4.6. Genlerin ortak transkripsiyonel profilinin belirlenebilmesi için çoğaltılan bölgelerin uzunlukları

RT-PCR ile çoğaltılan bölgeler	Çoğaltılan bölgelerin uzunlukları (bp)
<i>SCLAV_4288-tunA</i>	1261
<i>tunA-tunB</i>	397
<i>tunB-tunC</i>	500
<i>tunC-tunD</i>	1426
<i>tunD-tunE</i>	429
<i>tunE-tunF</i>	385
<i>tunF-tunG</i>	562
<i>tunG-tunH</i>	490
<i>tunH-tunI</i>	358
<i>tunI-tunJ</i>	562
<i>tunJ-tunK</i>	443
<i>tunK-tunL</i>	265
<i>tunL-tunM</i>	586
<i>tunM-tunN</i>	496
<i>tunN- SCLAV_4273</i>	320



Şekil 4.80. *S. clavuligerus*'taki (a, b) tunikamisin gen kümesinin ortak transkripsiyonel profili. 1: RT-PCR'de kalıp olarak RNA kullanılmıştır, 2: Pozitif kontrol reaksiyonu (kalıp olarak *S. clavuligerus* genomik DNA'sı kullanılmıştır), 3: Negatif kontrol reaksiyonu (Kalıp olarak RNA ve enzim olarak platinum *Taq* polimeraz kullanılmıştır)

RT-PCR sonucunda elde edilen verilerde *tunA-tunB*, *tunB-tunC*, *tunD-tunE*, *tunE-tunF*, *tunF-tunG*, *tunG-tunH*, *tunH-tunI*, *tunI-tunJ*, *tunJ-tunK*, *tunK-tunL*, *tunM-tunN* ve *tunN- SCLAV_4273* genlerinin birlikte ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.80a). *tunL* ve *tunM*'nin tunikamisin gen kümesinde birbirine ters yönde konumlandıklarından monosistronik transkriptler vermeleri beklenen bir durumdur. Ancak, RT-PCR çalışmalarımızda aynı yönde konumlanan *tunC-tunD* genlerinin birlikte ifade olmadığı tespit edilmiştir. Tunikamisin biyosentezindeki erken aşamalarda görev alan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının (*tunA-tunC*, *tunG-tunI* ve *tunI-tunK*) polisistronik transkriptler aracılığıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır. Ancak *SCLAV_4273-tunM*, *tunD-tunF* ve *SCLAV_4290-tunA* bölgeleri için olumlu sonuçlar alınamamıştır.

5. SONUÇ

S. chartreusis ve *S. clavuligerus*'ta klonlama ve heterolog ekspresyon çalışmaları ile tunikamisin gen kümesinde toplam 14 gen (*tunA-tunN* / *SCLAV_4287-4274*) tanımlanmıştır (Chen vd., 2010; Wyszynski vd., 2010; Karki vd., 2011). Literatürde tunikamisin üretimi üzerine global ve yolak özgü regülatörlerin etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Henüz tunikamisin gen kümesinde regülatör bir genin tespit edilmemesi bu antibiyotiğin biyosentezinin düzenlenmesinde pleiotropik/global regülatörlerin olası etkisinin varlığını akla getirmektedir. Söz gelimi, PimM regülatörünün *S. clavuligerus* ATCC 27064'te heterolog ifadesi ile yabancı suşta aktif olmayan tunikamisin gen kümesinin aktif hale geldiği ve rekombinant suşta tunikamisin kompleksinin üretiminde beş kat artışın sağlandığı tespit edilmiştir (Martínez-Burgo vd., 2019). Daha önce ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada; tunikamisin biyosentezinin düzenlenmesinde *S. clavuligerus*'ta BldG pleiotropik düzenleyicinin olumlu etkisi rapor edilmiştir (Baş vd., 2020). Literatürde *S. ghanaensis*'te bir CSR içermeyen moenomisin gen kümesinin ifadesinin doğrudan AdpA ve BldA pleiotropik regülatörler tarafından düzenlendiği (Makitrynsky vd., 2020) bilgisini de dikkate alarak çalışmamız kapsamında AdpA regülatörünün *S. clavuligerus*'ta tunikamisin ve diğer sekonder metabolitlerin biyosentezi ve global mekanizma üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

S. clavuligerus NRRL 3585 suşunun genomundan *adpA* geni *I-SceI* meganükleaz yöntemi aracılığıyla başarılı şekilde silinerek mutant *S. clavuligerus* Δ*adpA* suşu ve daha sonra komplementasyon için mutant suşa tekrar *adpA* geni pSET152ermE* entegrasyon vektörü aracılığıyla aktararak komplement *S. clavuligerus* compadpA suşu elde edilmiştir. Southern Blot deneyi ile *S. clavuligerus* Δ*adpA* ve komplement suşta yapılan genetik manipülasyon doğrulanmıştır. Ayrıca, *adpA* geninin çok kopyalı şekilde *S. clavuligerus* genomunda ifade edilebilmesi için, *adpA* pSPG ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. pSPG ekspresyon vektörü güçlü bir gliserol promotörünü içermektedir. Elde edilen rekombinant plazmid *S. clavuligerus* NRRL 3585 suşuna konjugasyon reaksiyonu ile aktarılmıştır. Aynı zamanda, rekombinant suşun değerlendirildiği deneylerde vektör etkisinin tayin edilebilmesi için kontrol olarak boş pSPG içeren *S. clavuligerus* pSPG suşu elde edilmiştir. *S. clavuligerus* genomundan *adpA* delesyonunun ve *adpA* geninin hücrede çok kopyalı

ifadesinin etkilerinin tespit edilebilmesi için *S. clavuligerus* Δ adpA ve rekombinant suşlar ile TYD besiyerinde fermantasyon deneyi yürütülmüştür. Suşların üreme kapasiteleri için DNA kuantifikasyonu, antibiyotik üretim oranlarının kıyaslanabilmesi için biyoassay ve tunikamisin üretiminin belirlenebilmesi için LC-MS/MS analizleri, tunikamisin biyosentetik yolağındaki genlerin ifade değişimleri ve suşlarda farklı ifade olan genlerin tespit edilebilmesi için 48. saatte alınan örneklerden RNA izolasyonu yapılarak RNA-seq çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca EMSA çalışmaları ile tunikamisin gen kümesinde AdpA regülatörünün bağlanma bölgeleri araştırılmıştır. Ayrıca, bu çalışmalardan bağımsız olarak, *S. clavuligerus*'ta tunikamisin biyosentetik kümesinin transkripsiyonel profili belirlenmiştir.

DNA kuantifikasyonu ile suşların üreme profilleri incelendiğinde genel olarak T₇₂ dışında tüm suşlarda benzer bir üreme profili tespit edilmiştir. T₇₂'de üremenin *S. clavuligerus* Δ adpA ve komplement suşlarda yabancı suşa kıyasla yüksek olduğu görülmüştür. 48. saate ait RNA-seq analizler sonucu *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla tunikamisin biyosentetik gen kümesine ait *SCLAV_4274*, *_4276*, *_4278*, *_4279*, *_4280*, *_4283*, *_4284*, *_4286* ve *_4287* genlerinde ifade artışı gözlenirken, diğer genlerde kontrole aynı ya da daha düşük ifadeler kaydedilmiştir. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda ise tam tersi yönde bu genlerin ifadelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Tunikamisin biyosentetik yolağında meydana gelen bu değişimlerin üretime olan etkisini belirlemek için biyoassay ve LC-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Biyoassay sonuçlarında spesifik tunikamisin üretiminin *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrol ve komplement suşa göre daha yüksek olduğu, *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda ise yabancı suşdan daha az tunikamisin üretiminin gerçekleştiği görülmüştür. Bununla birlikte, T₉₆'ya ait LC-MS/MS datası incelendiğinde, *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda spesifik tunikamisin üretiminin kontrole kıyasla 2.55 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Paralel olarak, hücrede *adpA*'nın aşırı ekspresyonu tunikamisin üretiminin kontrole kıyasla 2.99 kat daha düşük olmasına yol açmıştır. Biyoassay/LC-MS/MS verileri RNA seq datasını doğrulamaktadır. Aynı zamanda, qRT-PCR çalışmaları ile tunikamisin biyosentetik gen kümesindeki genlerin ifadelerindeki değişimler analiz edilmiş ve RNA-seq verileri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda yabancı

suşa kıyasla tunikamisin biyosentez genlerinin ifadelerinde ve de tunikamisin üretimindeki artış AdpA'nın tunikamisin üretimi üzerinde negatif düzenleyici etkisini göstermektedir.

CA biyosentetik gen kümesinde; *S. clavuligerus* Δ adpA'da kontrole kıyasla *argR*, *oat2*, *oppA1*, *orf14*, *orf16*, *gcaS*, *pbp2*, *orf20* ve *orf21* genlerinin ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Yolakda konumlanmış diğer genlerde *ceaS2*, *pah2* ve *pbpA*'nın ifadesi *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda artmıştır. *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda ise mutant suşda elde edilen ekspresyonların tam tersi sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan biyoassay çalışması, RNA-seq verileri ve de literatürle uyumlu (Lopez-García vd., 2010) olarak *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda CA üretiminin kontrole kıyasla daha az olduğu, özellikle T₇₂'den sonra neredeyse hiç üretimin gerçekleşmediği görülmüştür.

CephC gen kümesinin ifadeleri incelendiğinde, *S. clavuligerus* Δ adpA'da yabancı suşa kıyasla *pbpA*, *cmcT*, *pcd*, *cefE*, *cefD*, *cefF*, *cmcI*, *cmcJ*, *ccaR* ve *cmcH* genlerinin ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. Yolakta yer alan diğer genlerden *orf10*, *lat*, *pcbAB*, *pcbC* ve *pbpR*'nin ifadelerinde ise azalma görülmüştür. *S. clavuligerus* pSPGadpA'da kontrole kıyasla tüm genlerin ifadeleri artmıştır. Biyoassay sonuçları incelendiğinde spesifik CephC üretiminde *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda özellikle T₉₆ olmak üzere tüm saatlerde en yüksek CephC titresine ulaşıldığı görülmüştür. *S. clavuligerus* Δ adpA'nın 48 saatlik TYD kültürlerinde CephC'nin üretiminin yüksek olması ve aynı zamanda biyosentezin orta ve son kademelerindeki genlerinin ifadelerinde artış *S. clavuligerus*'ta AdpA'nın düzenleyici etkisinin besiyerine de bağımlı olduğu (Lopez-García vd., 2010) bilgisini desteklemektedir.

RNA-seq datasından elde edilen verilerde; DEG'ler ile KEGG yolak sınıflandırması ve fonksiyonel zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Özellikle global ve genel bakış haritaları başta olmak üzere, mertabolizma kategorisinde; karbonhidrat, amino asit, enerji ve poliketid metabolizmalarında DEG'lerin kategorize olduğu tespit edilmiştir. *S. clavuligerus* Δ adpA suşunda kontrole kıyasla, global ve genel bakış haritaları, karbonhidrat metabolizması, sekonder metabolit biyosentezi, antibiyotik biyosentezi gibi farklı metabolizma yollarında çok sayıda DEG bulunurken, *S. clavuligerus* pSPGadpA suşunda da aynı kategorilerde fakat

daha az sayıda DEG'ler yer almaktadır. GO zenginleştirme analizinde tüm suşlarda biyolojik proseslerde en çok metabolik ve hücrel işlemler, hücrel bileşen kategorisinde başlıca membran ve hücre ile ilgili kısımlar, moleküler fonksiyon sınıfında ise en çok katalitik aktivite ve bağlanma aktivitelerinde DEG'ler ifade olmuştur.

S. clavuligerus'ta RNA-seq, qRT-PCR, biyoassay ve LC-MS/MS analizleri AdpA pleiotropik regülatörünün tunikamisin biyosentezi üzerindeki baskılayıcı etkisini göstermiştir. Diğer yandan, AdpA'nın tunikamisin gen kümesi üzerindeki etkisinin doğrudan promotor bölgesi/lerine bağlanma şeklinde gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti için EMSA yapılmıştır. Önce, FIMO analizleri ile AdpA regülatörünün bağlandığı konsensus dizisi tunikamisin biyosentetik yolağındaki potansiyel bölgelerde taranmış ve *tunA*'nın 5' bölgesinde Widdick vd. (2018)'nin, *S. chartreusis*'deki *tunA*'nın yukarı akış bölgesinde bulunduğu bölgeye benzer bir bağlanma dizisi tespit edilmiştir. AdpA proteininin elde edilebilmesi için *S. clavuligerus* genomundan çoğaltılan *adpA* geni His-Tag ifade vektörü olan pET28-a(+)'ya klonlanmış ve *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmıştır. IPTG indüklenen rekombinant *E. coli* BL21 hücrelerinde ifadesi gerçekleşen rAdpA saflaştırılıp konsantre edilmiş ve Western Blot deneyi ile üretimi doğrulanmıştır. EMSA çalışması öncesinde FIMO analizi ile tespit edilen konsensus dizisini içeren bölge PCR ile çoğaltılmış ve rAdpA ile reaksiyona tabi tutulmuştur. *tunA* geninin yukarı akış bölgesinde bulunan ve adpAE1 olarak isimlendirilen bölgeye rAdpA proteininin bağlandığı tespit edilmiştir. Bu sonuç diğer *Streptomyces*'lerde AdpA regülatörünün sekonder metabolit biyosentetik genlerinin promotor bölgelerine bağlandığını gösteren literatürdeki çalışmalarla uyumludur (Bu vd., 2019; Bednarz vd., 2019).

RT-PCR sonucunda elde edilen verilerde *S. clavuligerus*'ta *tunA-tunB*, *tunB-tunC*, *tunD-tunE*, *tunE-tunF*, *tunF-tunG*, *tunG-tunH*, *tunH-tunI*, *tunI-tunJ*, *tunJ-tunK*, *tunK-tunL*, *tunM-tunN* ve *tunN- SCLAV_4273* birlikte ifade edildiği tespit edilmiştir. küme içinde zıt yönlerde konumlanan *tunL* ve *tunM*'nin monosistronik transkriptler oluşturduğu gösterilmiştir. Ancak aynı yönde bulunan *tunC-tunD* genlerinin birlikte ifade olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, tunikamisin biyosentezindeki erken aşamalarda görev alan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunun (*tunA-tunC*, *tunG-tunI* ve *tunI-tunK*) polisistronik transkriptleri yoluyla gerçekleştiği

belirlenmiştir. Ancak *SCLAV_4273-tunM*, *tunD-tunF* ve *SCLAV_4290-tunA* bölgeleri için olumlu sonuçlar alınamamıştır.

Literatürde daha önce *S. clavuligerus*'ta AdpA pleiotropik regülatörünün doğrudan bir biyosentetik gen kümesine bağlandığına ve aynı zamanda düzenleyici etkisinin baskılayıcı yönde olduğuna dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, literatürde ilk defa bir RNA-seq çalışması ile *S. clavuligerus*'ta AdpA pleiotropik regülatörünün tunikamisin biyosentez kümesi üzerindeki negatif regülasyonu ortaya koyulmuş, ayrıca rAdpA'nın tunikamisin biyosentetik gen kümesinde *tunA* geninin promotor dizisine bağlandığı gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular bu bakteride β -laktam antibiyotiklerine alternatif olarak kullanılma potansiyeli olan tunikamisin antibiyotiğinin moleküler düzenlemesi üzerinde yapılan ilk çalışma olması bakımında önem taşımaktadır. Temel bilimlere yapılan bu katkı endüstriyel ölçekli antibiyotik üretimi için kullanılabilir önemli bir *S. clavuligerus* suşun geliştirilmesinde aday genler/yolaklar sunmaktadır. RNA-seq verilerinin derinlemesine incelenmesi ile AdpA'nın düzenleyici etkilerinin daha iyi anlaşılması ve antibiyotik biyosentezinde yapılacak optimizasyon çalışmaları neticesinde ilaç hammaddesi üretiminde büyük ölçekli ticari üretim için önemli avantajlar sağlanabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmamızda, özellikle, tunikamisin ve CephC antibiyotiklerinin eldesinde ülke ekonomisine ticari anlamda katkı sağlayabilecek prototip bir mutant suş geliştirilmiştir. Bu suşun, ilaç endüstrisinde antibiyotik üretiminin verimliliğini artırarak, daha ekonomik ve sürdürülebilir üretim süreçlerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abanoz-Seçgin, B., Otur, Ç., Okay, S., and Kurt-Kızıldoğan, A. (2023). "The regulatory role of Fur-encoding *SCLAV_3199* in iron homeostasis in *Streptomyces clavuligerus*". *Gene*, 878, 147594.
- AbuSara, N. F., Piercey, B. M., Moore, M. A., Shaikh, A. A., Nothias, L. F., Srivastava, S. K., and Tahlan, K. (2019). "Comparative genomics and metabolomics analyses of clavulanic acid-producing *Streptomyces* species provides insight into specialized metabolism". *Frontiers in Microbiology*, 10, 2550.
- Aharonowitz, Y., and Demain, A. L. (1978). "Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(2), 159-164.
- Akanuma, G., Hara, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2009). "Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*". *Molecular Microbiology*, 73(5), 898-912.
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y. M., Hao, J., Song, C., and Li, A. (2022). "*Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites". *Frontiers in Microbiology*, 13, 968053.
- Aliashkevich, A., and Cava, F. (2022). "LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers". *The FEBS Journal*, 289(16), 4718-4730.
- Anderson, A. S., and Wellington, E. M. (2001). "The taxonomy of *Streptomyces* and related genera". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 797-814.
- Baggaley, K. H., Brown, A. G., and Schofield, C. J. (1997). "Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams". *Natural Product Reports*, 14(4), 309-333.
- Banerjee, S., Ansari, A. A., Upadhyay, S. P., Mettman, D. J., Hibdon, J. R., Quadir, M., and Banerjee, S. K. (2024). "Benefits and pitfalls of a glycosylation inhibitor yunicamycin in the therapeutic implication of cancers". *Cells*, 13(5), 395.
- Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., and Restaino, O. F. (2021). "*Streptomyces* as platform for biotechnological production processes of drugs". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 551-568.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., and van Wezel, G. P. (2016). "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Baş, L., Otur, Ç., and Kurt-Kızıldoğan, A. (2020). "Enhanced tunicamycin biosynthesis in BldG overexpressed *Streptomyces clavuligerus*". *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56, 412-419.
- Baskaran, A., Manikkam, R., Kaari, M., Joseph, J., Venugopal, G., and Ramasamy, B. (2022). "Miniaturized production of bioactive extracts from actinobacteria". *Methods in Actinobacteriology*, 367-370.
- Bech, P. K. (2022). "The potential of microbial secondary metabolites in marine systems and their influence on microbial diversity". *Ph.D. thesis*, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., and Hopwood, D. A. (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., and Leskiw, B. K. (2005). "Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin 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., and Bugg, T. D. (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.
- Brites, L. M., Oliveira, L. M., and Barboza, M. (2013). "Kinetic study on cephamycin C degradation". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 2121-2128.
- Bu, X. L., Weng, J. Y., He, B. B., Xu, M. J., and Xu, J. (2019). "A novel AdpA homologue negatively regulates morphological differentiation in *Streptomyces xiamenensis* 318". *Applied and Environmental Microbiology*, 85(7), e03107-18.
- Bussari, B., Survase, S. A., Saudagar, P. S., and Singhal, R. S. (2009). "An integrated approach for production of cephamycin C using *Streptomyces clavuligerus* NT4: Sequential optimization of production medium and effect of amino acids". *Current trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3(4), 372-384.
- Casneuf, T., Van de Peer, Y., and Huber, W. (2007). "In situ analysis of cross-hybridisation on microarrays and the inference of expression correlation". *BMC Bioinformatics*, 8, 1-13.
- Challis, G. L., and 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.
- Chen, W., Qu, D., Zhai, L., Tao, M., Wang, Y., Lin, S., and Deng, Z. (2010). "Characterization of the tunicamycin gene cluster unveiling unique steps involved in its biosynthesis". *Protein & Cell*, 1, 1093-1105.
- Coque, J. J., Enguita, F. J., Martin, J. F., and Liras, P. (1995). "A two-protein component 7 alpha-cephem-methoxylase encoded by two genes of the cephamycin C cluster converts cephalosporin C to 7-methoxycephalosporin C". *Journal of Bacteriology*, 177(8), 2230-2235.
- Cuebas-Irizarry, M. F., and Grunden, A. M. (2024). "*Streptomyces* spp. as biocatalyst sources in pulp and paper and textile industries: Biodegradation, bioconversion and valorization of waste". *Microbial Biotechnology*, 17(1), e14258.
- Davies, J. A., Anderson, G. K., Beveridge, T. J., and Clark, H. C. (1983). "Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain". *Journal of Bacteriology*, 156(2), 837-845.
- Dawood, A., and Alnori, H. A. M. (2020). "Tunicamycin anticancer drug may reliable to treat coronavirus disease-19". *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 8(T1), 129-133.
- de Freitas Junior, J. C. M., Silva, B. D. R. D. A., de Souza, W. F., de Araújo, W. M., Abdelhay, E. S. F. W., and Morgado-Díaz, J. A. (2011). "Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68, 227-238.

- de Lima Procópio, R. E. da Silva, I. R. Martins, M. K. de Azevedo, J. L. and de Araújo, J. M. (2012). "Antibiotics produced by *Streptomyces*". *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 466-471.
- Deck, D.H. and Winston, L.G. (2012): "Beta-Lactam & Other Cell Wall- & Membrane-Active Antibiotics" In: *Basic and Clinical Pharmacology*. 43. 12e.
- Dharmaraj, S. (2010). "Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2123-2139.
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., and Taufan, T. (2022). "*Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective". *Microbiology Research*, 13(3), 418-465.
- Du, Y. L., Li, S. Z., Zhou, Z., Chen, S. F., Fan, W. M., and Li, Y. Q. (2011). "The pleiotropic regulator AdpA is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*". *Microbiology*, 157(5), 1300-1311.
- Egan, L. A., Busby, R. W., Iwata-Reuyl, D., and Townsend, C. A. (1997). "Probable role of clavaminic acid as the terminal intermediate in the common pathway to clavulanic acid and the antipodal clavam metabolites". *Journal of the American Chemical Society*, 119(10), 2348-2355.
- Enguita, F. J., Liras, P., Leitao, A. L., and Martín, J. F. (1996). "Interaction of the two proteins of the methoxylation system involved in cephamycin C biosynthesis: Immunoaffinity, protein cross-linking, and fluorescence spectroscopy studies". *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33225-33230.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., Coimbra, J. S. D. R., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., and Medeiros, E. A. A. (2012). "Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications". *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1447-1464.
- Fernández-Martínez, L. T., and Bibb, M. J. (2014). "Use of the meganuclease I-SceI of *Saccharomyces cerevisiae* to select for gene deletions in actinomycetes". *Scientific Reports*, 4(1), 7100.
- Flett, F., Mersinias, V., and 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.
- Fouillaud, M., and Dufossé, L. (2022). "Microbial secondary metabolism and biotechnology". *Microorganisms*, 10(1), 123.
- Fu, J., Xie, X., Zhang, S., Kang, N., Zong, G., Zhang, P., and Cao, G. (2023). "Rich organic nitrogen impacts clavulanic acid biosynthesis through the arginine metabolic pathway in *Streptomyces clavuligerus* F613-1". *Microbiology Spectrum*, 11(1), e02017-22.
- Gabani, B. B., Sulochana, S. P., Kiran, V., Todmal, U., and Mullangi, R. (2019). "Validated LC-ESI-MS/MS method for the determination of tunicamycin in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study". *Biomedical Chromatography*, 33(11), e4661.
- Ghorbel, S., Kormanec, J., Artus, A., and Virolle, M. J. (2006). "Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24". *Journal of Bacteriology*, 188(2), 677-686.
- Gong, J., Yi, J. S., Cho, H. S., Shin, C. H., Won, H. J., Cho, B. K., and Yoon, Y. J. (2023). "Transcriptome profiles of *Streptomyces clavuligerus* strains producing different titers of clavulanic acid". *Scientific Data*, 10(1), 804.

- Guan, S., Xu, Q., Ma, D., Zhang, W., Xu, Z., Zhao, M., and Guo, Z. (2019). "Transcriptomics profiling in response to cold stress in cultivated rice and weedy rice". *Gene*, 685, 96-105.
- Guo, Q., Shi, M., Chen, L., Zhou, J., Zhang, L., Li, Y., and Lai, H. (2020). "The biocontrol agent *Streptomyces pactum* increases *Pseudomonas koreensis* populations in the rhizosphere by enhancing chemotaxis and biofilm formation". *Soil Biology and Biochemistry*, 144, 107755.
- Gust, B., Kieser, T., and Chater, K. (2002). "PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)". *John Innes Centre*, 3(2), 1-39.
- Guyet, A., Benaroudj, N., Proux, C., Gominet, M., Coppée, J. Y., and Mazodier, P. (2014). "Identified members of the *Streptomyces lividans* AdpA regulon involved in differentiation and secondary metabolism". *BMC Microbiology*, 14, 1-12.
- Hagman K.E., Porcella S.F., Popova T.G., Norgard M.V. (1997). "Evidence for a methyl-accepting chemotaxis protein gene (*mcpI*) that encodes a putative sensory transducer in virulent *Treponema pallidum*". *Infection and Immunity*, 65(5):1701-9.
- Hakenbeck, R., and Stock, J. B. (1996). "Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation". *Methods in Enzymology*, 273, 281-300.
- Hamill, R. L. (1980). "Process for preparing tunicamycin". U.S. Patent No. 4,237,225. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Han, X., Zhang, X., Li, H., Huang, S., Zhang, S., Wang, F., and Shi, Y. (2015). "Tunicamycin enhances the antitumor activity of trastuzumab on breast cancer in vitro and in vivo". *Oncotarget*, 6(36), 38912.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- Hellman, L. M., and Fried, M. G. (2007). "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions". *Nature Protocols*, 2(8), 1849-1861.
- Hering, J., Dunevall, E., Snijder, A., Eriksson, P. O., Jackson, M. A., Hartman, T. M. and Ek, M. (2020). "Exploring the active site of the antibacterial target MraY by modified tunicamycins". *ACS Chemical Biology*, 15(11), 2885-2895.
- Higgins, C. E., and Kastner, R. E. (1971). "*Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -lactam antibiotic producer". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21(4), 326-331.
- Higo, A., Hara, H., Horinouchi, S., and Ohnishi, Y. (2012). "Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network". *DNA Research*, 19(3), 259-274.
- Hiss, D. C., Gabriels, G. A., and 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, 1-14.
- Hodgson, J. E., Fosberry, A. P., Rawlinson, N. S., Ross, H. N., Neal, R. J., Arnell, J. C., ... and Lawlor, E. J. (1995). "Clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*: gene cloning and characterization". *Gene*, 166(1), 49-55.
- Hong, B., Phornphisutthimas, S., Tilley, E., Baumberg, S., and McDowall, K. J. (2007). "Streptomycin production by *Streptomyces griseus* can be modulated by a mechanism

- not associated with change in the *adpA* component of the A-factor cascade". *Biotechnology Letters*, 29, 57-64.
- Hopwood, D. A. (1985). "Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual". D.A. Hopwood (and Others), Norwich: *The John Innes Foundation*, . Print.
- Horinouchi, S. (2002). "A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*". *Frontiers in Bioscience*, 7, 2045-2057.
- Horinouchi, S., and Beppu, T. (2007). "Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*". *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 83(9+10), 277-295.
- Huang, F., Haydock, S. F., Mironenko, T., Spittler, D., Li, Y., and Spencer, J. B. (2005). "The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine". *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(8), 1410-1418.
- Huang, R., Liu, H., Zhao, W., Wang, S., Wang, S., Cai, J., and Yang, C. (2022). "AdpA, a developmental regulator, promotes ϵ -poly-l-lysine biosynthesis in *Streptomyces albulus*". *Microbial Cell Factories*, 21(1), 60.
- Hwang, S., Lee, N., Jeong, Y., Lee, Y., Kim, W., Cho, S., and Cho, B. K. (2019). "Primary transcriptome and translome analysis determines transcriptional and translational regulatory elements encoded in the *Streptomyces clavuligerus* genome". *Nucleic Acids Research*, 47(12), 6114-6129.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., and Ōmura, S. (2003). "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*". *Nature Biotechnology*, 21(5), 526-531.
- Jacenic, D., Karagiannidis, I., and Beswick, E. J. (2023). "Th2 cells inhibit growth of colon and pancreas cancers by promoting anti-tumorigenic responses from macrophages and eosinophils". *British Journal of Cancer*, 128(2), 387-397.
- Jacobs, L. M., Consol, P., and Chen, Y. (2024). "Drug Discovery in the field of β -Lactams: An Academic Perspective". *Antibiotics*, 13(1), 59.
- Jensen, S. E. (2012). "Biosynthesis of clavam metabolites". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 1407-1419.
- Jensen, S. E., and Paradkar, A. S. (1999). "Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid". *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75, 125-133.
- Jin, S., Hui, M., Lu, Y., and Zhao, Y. (2023). "An overview on the two-component systems of *Streptomyces coelicolor*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 78.
- Jnawali HN, Liou K and Sohng JK (2011). " Role of σ -factor (*orf21*) in clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585". *Microbiol Research*, 166(5):369-79.
- Jnawali, H. N., Oh, T. J., Liou, K., Park, B. C., and Sohng, J. K. (2008). "A two-component regulatory system involved in clavulanic acid production". *The Journal of Antibiotics*, 61(11), 651-659.
- Kamogashira, T., Takegata, S., and Sugiura, K. (1988). "Isolation of tunicamycin produced by *Bacillus cereus* K-279". *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(3), 859-861.
- Kämpfer, P. (2006). "The family *Streptomycetaceae*, part I: taxonomy". *The Prokaryotes*, 3, 538-604.

- Kang, Y., Wu, W., Zhang, F., Chen, L., Wang, R., Ye, J., and Zhang, H. (2023). “AdpAlin regulates lincomycin and melanin biosynthesis by modulating precursors flux in *Streptomyces lincolnensis*”. *Journal of Basic Microbiology*, 63(6), 622-631.
- Karki, S., Kwon, S. Y., and 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, 136-140.
- Katz, E., Margalith, E., and Duksin, D. (1980). “Antiviral activity of tunicamycin on herpes simplex virus”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17(6), 1014-1022.
- Kaur, J., Kumar, A., and Kaur, J. (2018). “Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822.
- Keegstra, J. M., Carrara, F., and Stocker, R. (2022). “The ecological roles of bacterial chemotaxis”. *Nature Reviews Microbiology*, 20(8), 491-504.
- Keijsers, B. J., van Wezel, G. P., Canters, G. W., Kieser, T., and Vijgenboom, E. (2000). “The ram-dependence of *Streptomyces lividans* differentiation is bypassed by copper”. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 565-574.
- Kenig, M., and Reading, C. (1979). “Holomycin and an antibiotic (MM19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*”. *The Journal of Antibiotics*, 32(6), 549-554.
- Khadayat, K., Sherpa, D. D., Malla, K. P., Shrestha, S., Rana, N., Marasini, B. P., and Parajuli, N. (2020). “Molecular identification and antimicrobial potential of *Streptomyces* species from Nepalese soil”. *International Journal of Microbiology*, 2020.
- Khan, S., Gul, A., Jehan, S., Khan, Z., Saeed, J., Shirazi, R. R., and Ullah, H. (2023). “Biodiversity of actinomycetes and their secondary metabolites: A comprehensive review”. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 36-48.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2015). “HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements”. *Nature Methods*, 12(4), 357-360.
- Kitani, S., Miyamoto, K. T., Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K. and Nihira, T. (2011). “Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16410-16415.
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Ōmura, S., Cane, D. E., and Ikeda, H. (2010). “Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2646-2651.
- Kukurba, K. R., and Montgomery, S. B. (2015). “RNA sequencing and analysis”. *Cold Spring Harbor Protocols*, (11), pdb-top084970.
- Kurt, A. (2011). “The regulatory effect of CcaR activator on the cephamycin C gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*”. *Ph.D. thesis*. Middle East Technical University, Ankara.
- Kurt, A., Álvarez-Álvarez, R., Liras, P., and Özcengiz, G. (2013). “Role of the *cmcH-ccaR* intergenic region and *ccaR* overexpression in cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5869-5880.
- Kwong, T., Zelyas, N. J., Cai, H., Tahlan, K., Wong, A., and Jensen, S. E. (2012). “5S clavam biosynthesis is controlled by an atypical two-component regulatory system in

- Streptomyces clavuligerus*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4845-4855.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2". *Nature Methods*, 9(4), 357-359.
- Law, J. W. F., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Wong, S. H., Goh, B. H., and Lee, L. H. (2019). "A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery". *Progress in Microbes & Molecular Biology*, 2(1).
- Lee, H. N., Kim, J. S., Kim, P., Lee, H. S., and Kim, E. S. (2013). "Repression of antibiotic downregulator WblA by AdpA in *Streptomyces coelicolor*". *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4159-4163.
- Lehrman, M. A. (1991). "Biosynthesis of N-acetylglucosamine-PP-dolichol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly". *Glycobiology*, 1(6), 553-562.
- Leite, C. A., Cavallieri, A. P., and Araujo, M. L. (2013). "Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*". *BMC Microbiology*, 13, 1-11.
- Li, B., and Dewey, C. N. (2011). "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome". *BMC Bioinformatics*, 12, 1-16.
- Li, B., and 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.
- Li, R., and Townsend, C. A. (2006). "Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*". *Metabolic Engineering*, 8(3), 240-252.
- Liras, P., and Martín, J. F. (2005). "Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*". *Microbial Processes and Products*, 149-164.
- Liras, P., Rodríguez-García, A., and Martín, J. F. (1998). "Evolution of the clusters of genes for β -lactam antibiotics: a model for evolutive combinatorial assembly of new β -lactams". *International Microbiology*, 1(4), 271-278.
- Liu, X. D., Gu, K. B., Xia, S. S., Zhang, D. J., and Li, Y. G. (2018). "Dolyemycins A and B, two novel cyclopeptides isolated from *Streptomyces griseus* subsp.HYS31". *The Journal of Antibiotics*, 71(10), 838-845.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method". *Methods*, 25(4), 402-408.
- López-Agudelo, V. A., Gómez-Ríos, D., and Ramirez-Malule, H. (2021). "Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: Insights from systems biology, strain engineering, and downstream processing". *Antibiotics*, 10(1), 84.
- López-García, M. T., Santamarta, I., and Liras, P. (2010). "Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus* *adpA*-deleted mutant". *Microbiology*, 156(8), 2354-2365.
- Ma, L., Yang, L., Liu, Y., Shi, G., Yang, C., Zhou, C., and Hou, T. (2010). "Microbial transformation of neomycin by a mutant of neomycin-producing *Streptomyces fradiae*". *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8445-8453.

- Mackenzie, A. (2007). "Studies on the biosynthetic pathways of clavulanic acid and cephamycin C in *Streptomyces clavuligerus*". *Ph.D. thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Makitrynsky, R., Tsypik, O., Nuzzo, D., Paululat, T., Zechel, D. L., and Bechthold, A. (2020). "Secondary nucleotide messenger c-di-GMP exerts a global control on natural product biosynthesis in *Streptomyces*". *Nucleic Acids Research*, 48(3), 1583-1598.
- Mao, X. M., Luo, S., Zhou, R. C., Wang, F., Yu, P., Sun, N., and Li, Y. Q. (2015). "Transcriptional regulation of the daptomycin gene cluster in *Streptomyces roseosporus* by an autoregulator, AtrA". *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7992-8001.
- Martín, J. F., and Liras, P. (2021). "Molecular mechanisms of phosphate sensing, transport and signalling in *Streptomyces* and related actinobacteria". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1129.
- Martínez-Burgo, Y., Santos-Aberturas, J., Rodríguez-García, A., Barreales, E. G., Tormo, J. R., Truman, A. W., and Liras, P. (2019). "Activation of secondary metabolite gene clusters in *Streptomyces clavuligerus* by the PimM regulator of *Streptomyces natalensis*". *Frontiers in Microbiology*, 10, 439633.
- Medema, M. H., Alam, M. T., Heijne, W. H., Van Den Berg, M. A., Müller, U., Trefzer, A., and Takano, E. (2011). "Genome-wide gene expression changes in an industrial clavulanic acid overproduction strain of *Streptomyces clavuligerus*". *Microbial Biotechnology*, 4(2), 300-305.
- Mora-Ochomogo, M., and Lohans, C. T. (2021). "β-Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates". *RSC Medicinal Chemistry*, 12(10), 1623-1639.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M. (2008). "The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing". *Science*, 320 (5881), 1344-1349.
- Nagarajan, R., Boeck, L. D., Gorman, M., Hamill, R. L., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., and Whitney, J. G. (1971). "Beta.-Lactam antibiotics from *Streptomyces*". *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2308-2310.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014". *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., and Horinouchi, S. (1999). "The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor". *Molecular Microbiology*, 34(1), 102-111.
- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J. Y., Tomono, A., and Horinouchi, S. (2005). "AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(3), 431-439.
- Okay, S., Çetin, R., Karabulut, F., Doğan, C., Sürücüoğlu, S., and Kızıldoğan, A. K. (2019). "Immune responses elicited by the recombinant Erp, HspR, LppX, MmaA4, and OmpA proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in mice". *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(2), 219-234.
- Okuda, S., Yamada, T., Hamajima, M., Itoh, M., Katayama, T., Bork, P., and Kanehisa, M. (2008). "KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways". *Nucleic Acids Research*, 36, W423-W426.

- Otur, Ç., and Kurt-Kızıdoğan, A. (2020). “Homologous expression of *lysA* encoding diaminopimelic acid (DAP) decarboxylase reveals increased antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 547-556.
- Öster, L. M., Lester, D. R., van Scheltinga, A. T., Svenda, M., van Lun, M., Génereux, C., and Andersson, I. (2006). “Insights into cephamycin biosynthesis: the crystal structure of CmcI from *Streptomyces clavuligerus*”. *Journal of Molecular Biology*, 358(2), 546-558.
- Özcengiz, G., and Demain, A. L. (2013). “Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation”. *Biotechnology Advances*, 31(2), 287-311.
- Pan, Y., Liu, G., Yang, H., Tian, Y., and Tan, H. (2009). “The pleiotropic regulator AdpA-L directly controls the pathway-specific activator of nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*”. *Molecular Microbiology*, 72(3), 710-723.
- Paradkar, A. (2013). “Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement”. *The Journal of Antibiotics*, 66(7), 411-420.
- Parajuli, N., Viet, H. T., Ishida, K., Tong, H. T., Lee, H. C., Liou, K., and Sohng, J. K. (2005). “Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952”. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 707-712.
- Parkinson, J. S., and Kofoid, E. C. (1992). “Communication modules in bacterial signaling proteins”. *Annual Review of Genetics*, 26(1), 71-112.
- Parte A. C. Sardà Carbasse J. Meier-Kolthoff J. P. Reimer L. C. and Göker M. (2020). “List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70. 5607-5612, <https://lpsn.dsmz.de/search?word=streptomyces> (25.05.2024).
- Patiño, L.F.; Aguirre-Hoyos, V.; Pinilla, L.I.; Toro, L.F.; Ríos-Estapa, R. (2022) “Environmental factors modulate the role of *orf21* sigma factor in clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064”. *Bioengineering*, 9, 78.
- Pérez-Llarena, F. J., Liras, P., Rodriguez-Garcia, A., and 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.
- Pitt, J. J. (2009). “Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry”. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.
- Pospiech, A., and Neumann, B. (1995). “A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria”. *Trends in Genetics: TIG*, 11(6), 217-218.
- Price, N. P., and Tsvetanova, B. (2007). “Biosynthesis of the tunicamycins: a review”. *The Journal of Antibiotics*, 60(8), 485-491.
- Price, N. P., Labeda, D. P., Naumann, T. A., Vermillion, K. E., Bowman, M. J., Berhow, M. A., and Bischoff, K. M. (2016). “Quinovosamycins: new tunicamycin-type antibiotics in which the α , β -1", 11'-linked N-acetylglucosamine residue is replaced by N-acetylquinovosamine”. *The Journal of Antibiotics*, 69(8), 637-646.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Kinoshita, H., Lee, C. K., and Nihira, T. (2007). “Identification of the *bkdAB* gene cluster, a plausible source of the starter-unit for virginiamycin M production in *Streptomyces virginiae*”. *Archives of Microbiology*, 187, 459-466.

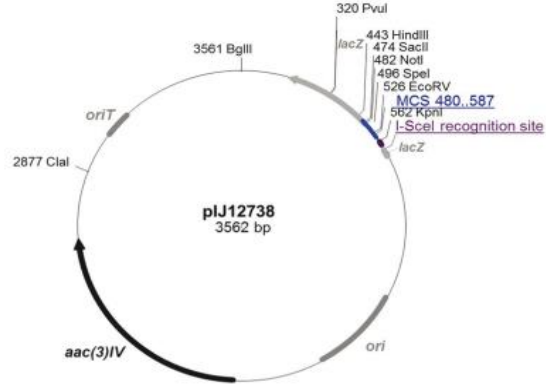
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., and Santamaría, R. I. (2013). "Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways". *Microbial Cell Factories*, 12, 1-10.
- Romero, J., Liras, P., and Martin, J. F. (1984). "Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20, 318-325.
- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., and Sánchez, S. (2015). "An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1017-1039.
- Şafak, H., Otur, Ç., and Kurt-Kızıldoğan, A. (2020). "Molecular and biochemical characterization of a recombinant endoglucanase rCKT3eng, from an extreme halophilic *Haloarcula* sp. strain CKT3". *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1173-1180.
- Salehghamari, E., Hamed, J., Elahi, E., Sepehrizadeh, Z., Sadeghi, M., and Muth, G. (2012). "Prediction of the pho regulon in *Streptomyces clavuligerus* DSM 738". *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*, 35(4), 447.
- Salwan, R., and Sharma, V. (2020). "Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria". *Microbiological Research*, 231, 126374.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY, No. Ed. 2
- Santamarta, I., López-García, M. T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., and 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.
- Saudagar, P. S., Survase, S. A., and Singhal, R. S. (2008). "Clavulanic acid: a review". *Biotechnology Advances*, 26(4), 335-351.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray". *Science*, 270(5235), 467-470.
- Schneider, J., Yepes, A., Garcia-Betancur, J. C., Westedt, I., Mielich, B., and López, D. (2012). "Streptomycin-induced expression in *Bacillus subtilis* of YtnP, a lactonase-homologous protein that inhibits development and streptomycin production in *Streptomyces griseus*". *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 599-603.
- Schoberer, J., Shin, Y. J., Vavra, U., Veit, C., and Strasser, R. (2018). "Analysis of protein glycosylation in the ER". *The Plant Endoplasmic Reticulum: Methods and Protocols*, 205-222.
- Seltmann, G., and Holst, O. (2002). "The bacterial cell wall". *Springer Science & Business Media. 1st ed. Berlin*, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Shaabani, N., Honke, N., Lang, P. A., Görg, B., Proksch, P., Gailus, N., and Lang, K. S. (2012). "Tunicamycin inhibits diabetes". *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29(3-4), 595-602.
- Shendure, J. (2008). "The beginning of the end for microarrays?". *Nature Methods*, 5(7), 585-587.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Crouch, S. R. (2019). "Textbook "principles of instrumental analysis.". *Cengage Learning*. core. ac. uk. <https://core.ac.uk/download/pdf/232277508>.

- Som, N. F., Heine, D., Holmes, N. A., Munnoch, J. T., Chandra, G., Seipke, R. F., and Hutchings, M. I. (2017). "The conserved actinobacterial two-component system MtrAB coordinates chloramphenicol production with sporulation in *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442". *Frontiers in Microbiology*, 8, 1145.
- Song, J. Y., Jensen, S. E., and Lee, K. J. (2010). "Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 659-669.
- Song, J. Y., Jeong, H., Yu, D. S., Fischbach, M. A., Park, H. S., Kim, J. J., and Kim, J. F. (2010). "Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites". *Journal of Bacteriology*, 192(23), 6317-6318.
- Song, J. Y., Kim, E. S., Kim, D. W., Jensen, S. E., and Lee, K. J. (2009). "A gene located downstream of the clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 encodes a putative response regulator that affects clavulanic acid production". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 301-311.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds". *Glycobiology*, 12(4), 43R-56R.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). "Two-component signal transduction". *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183-215.
- Tahlan, K., Anders, C., and Jensen, S. E. (2004). "The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*". *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6286-6297.
- Takatsuki, A., and Tamura, G. (1971). "Tunicamycin, a new antibiotic. II some biological properties of the antiviral activity of tunicamycin". *The Journal of Antibiotics*, 24(4), 224-231.
- Tejera, E. Currie, S. A. Flor, J. E. and Monaghan, R. L. (1982). "Process for producing tunicamycin". *United States Patent* 4330624.
- Thai, W., Paradkar, A. S., and Jensen, S. E. (2001). "Construction and analysis of β -lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*". *Microbiology*, 147(2), 325-335.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., and Mesirov, J. P. (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration". *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178-192.
- Thykaer, J., and Nielsen, J. (2003). "Metabolic engineering of β -lactam production". *Metabolic Engineering*, 5(1), 56-69.
- Trepanier, N. K., Jensen, S. E., Alexander, D. C., and Leskiw, B. K. (2002). "The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant". *Microbiology*, 148(3), 643-656.
- Tsvetanova, B. C., and Price, N. P. (2001). "Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry of Tunicamycin-type antibiotics". *Analytical Biochemistry*, 289(2), 147-156.
- Tsvetanova, B. C., Kiemle, D. J., and 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.

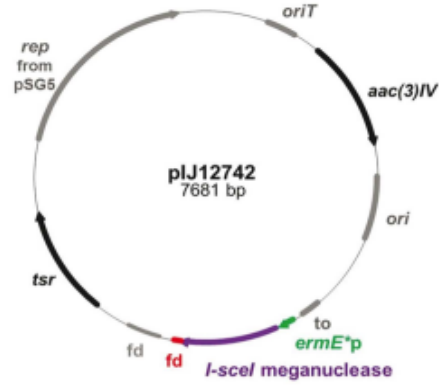
- Vanlı, G. (2010). "Integration of clavamate synthase 2 gene into the chromosome of an industrial strain of *Streptomyces clavuligerus* for enhanced clavulanic acid production". *Master's Thesis*. Middle East Technical University, Ankara.
- Wang, H. (2014). "Semi-synthesis and biological evaluations of tunicamycin lipid analogues and investigation of the tunicamycin biosynthetic pathway". *Ph.D. thesis*. University of Oxford, Oxford.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics". *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Wei, W., Kim, G., Miao, L., Behnke, C., and Almanza, B. (2018). "Consumer inferences of corporate social responsibility (CSR) claims on packaged foods". *Journal of Business Research*, 83, 186-201.
- Widdick, D., Royer, S. F., Wang, H., Vior, N. M., Gomez-Escribano, J. P., Davis, B. G., and Bibb, M. J. (2018). "Analysis of the tunicamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chartreusis* reveals new insights into tunicamycin production and immunity". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(8), 10-1128.
- Wolański, M., Jakimowicz, D., and Zakrzewska-Czerwińska, J. (2012). "AdpA, key regulator for morphological differentiation regulates bacterial chromosome replication". *Open Biology*, 2(7), 120097.
- Wyszynski, F. J., Hesketh, A. R., Bibb, M. J., and 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.
- Xu, J., Zhang, J., Zhuo, J., Li, Y., Tian, Y., and Tan, H. (2017). "Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansochromogenes*". *Journal of Biological Chemistry*, 292(48), 19708-19720.
- Yamamoto, K., and Ichikawa, S. (2019). "Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis". *The Journal of Antibiotics*, 72(12), 924-933.
- Yanai, K., and Murakami, T. (2004). "The kanamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kanamyceticus*". *The Journal of Antibiotics*, 57(5), 351-354.
- Yin, H., Wang, W., Fan, K., and Li, Z. (2019). "Regulatory perspective of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*". *Science China Life Sciences*, 62, 698-700.
- Yu, P., Bu, Q. T., Tang, Y. L., Mao, X. M., and Li, Y. Q. (2018). "Bidirectional regulation of AdpA in controlling the expression of *scnRI* and *scnRII* in the natamycin biosynthesis of *Streptomyces chattanoogensis* L10". *Frontiers in Microbiology*, 9, 342689.
- Zhang, S., Gui, C., Shao, M., Kumar, P. S., Huang, H., and Ju, J. (2020). "Antimicrobial tunicamycin derivatives from the deep sea-derived *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077". *Natural Product Research*, 34(11), 1499-1504.
- Zhou, J., Cai, Y., Liu, Y., An, H., Deng, K., Ashraf, M. A., and Wang, J. (2022). "Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy". *Frontiers in Microbiology*, 13, 952633.

EKLER

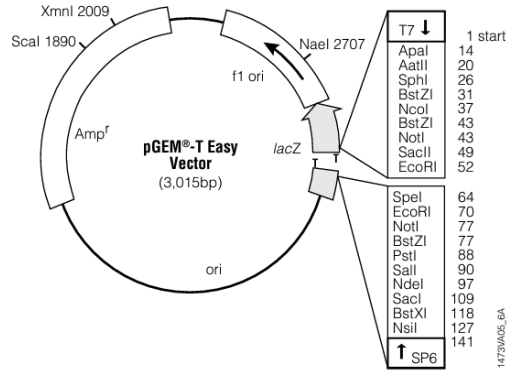
EK1: Plazmid Vektörlerin ve Markörlerin Haritaları



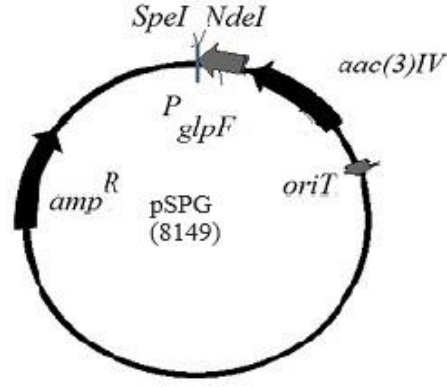
Şekil EK1.1. *Streptomyces* konjugatif vektör pIJ12738 plazmidinin yapısı



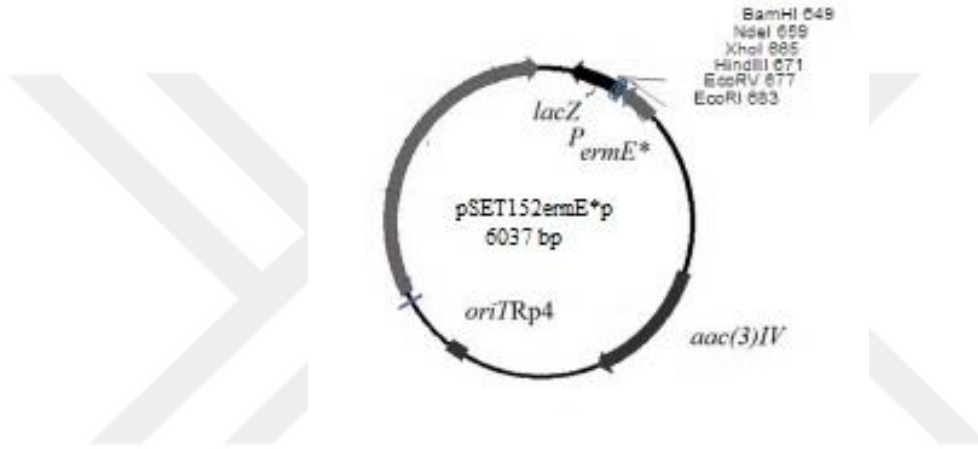
Şekil EK1.2. *ermE***p-I-SceI* geni taşıyan pIJ12742 plazmidinin yapısı



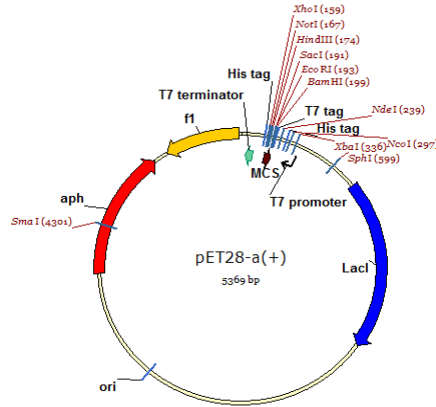
Şekil EK1.3. *E. coli* ara klonlama vektörü pGEM-T® Easy plazmidinin yapısı



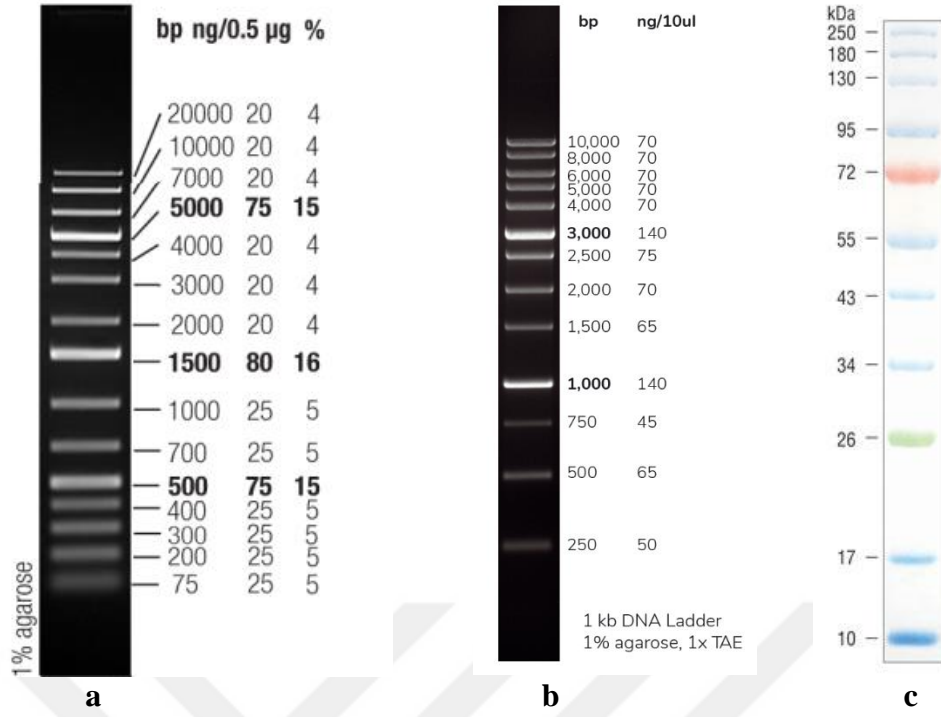
Şekil EK1.4. *Streptomyces* ekspresyon vektörü pSPG plazmidinin yapısı



Şekil EK1.5. *E. coli*/*Streptomyces* mekik vektörü pSET152ermE* plazmidinin yapısı



Şekil EK1.6. His-Tag etiketi taşıyan ifade vektörü olan pET28-a(+) plazmidinin yapısı



Şekil EK1.7. Markörlerin haritaları. a) O'GeneRuler 1 kb plus DNA markörü b) NEB 1 kb Plus DNA Markörü c) Renk Korumalı Protein Standardı

EK2: Kùltür Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanışı

Sıvı Besiyerleri

Luria Broth (LB)

	<u>g/l</u>
Trypton	1
NaCl	0.5
Maya Özütü	0.5
pH:7.2'ye ayarlanır.121°C'de15 dk otoklavlanır.	

Triptikaz Soya Broth (TSB)

	<u>g/l</u>
Triptikaz Soya Broth	30
121°C'de 15 dk otoklavlanır.	

TYD

	<u>g/l</u>
Trypton	2
Maya Özütü	2
Glukoz	6
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.3
pH:7.2'ye ayarlanır.121°C'de15 dk otoklavlanır.	

SOC Besiyeri

Trypton	%2
Maya Özütü	%0.5
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM
pH 7.2 121°C'de 15 dk otoklavlanır.	

Katı Besiyerleri

LB Agar

	<u>g/l</u>
Tryptone	1
NaCl	0,5
Yeast ekstrakt	0,5
pH:7.2'ye ayarlanır.	
Agar	15
121°C'de15 dk otoklavlanır.	

TSA

	<u>g/l</u>
Triptikaz Soya Broth	30
Agar	15
121°C'de 15 dk otoklavlanır.	

Mannitol Soya Unu Agar (MSA)

	<u>g/l</u>
Soya unu	20
Mannitol	20

Agar 20
121°C'de 15 dk olmak üzere iki kez otoklavlanır.

Inorganic Salt Agar (ISP4 agar)

	g/l
Nişasta	10
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1
NaCl	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
CaCO ₃	2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.001
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.001
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.001
pH: 7.2 olarak ayarlanır.	
Agar	20
121°C'de 15 dk otoklavlanır.	



EK3 Tamponlar ve Solüsyonlar

Plazmid ve DNA izolasyonunda kullanılanlar

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)	1 mM

STE tamponu

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

Lizis çözeltisi

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 sıcaklığın da saklanır ve ışıktan korunur.

Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılanlar

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

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.

Yükleme tamponu (6X)

Bromo fenol mavisi	% 0.25
Zaylan siyanol FF	% 0.25
Sükroz çözeltisi (su içinde)	% 40

Etidyum Bromür Çözeltisi

Etidyum Bromür (10 mg/ml)	100 µl/l
TAE Tamponu (1X)	1 l

Rekombinant kolonilerin seçilmesi kullanılanlar

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

X-Gal	20 mg
Dimetil formamit	1 ml

Çözelti ışıktan korunacak şekilde ve -20°C’de muhafaza edilir.

IPTG (İzopropil-β-D-tiyogalaktozidaz)

IPTG	100 mg
dH ₂ O	1 ml

Çözelti filtrasyonla steril edilir ve -20°C’de saklanır.

E. coli kompetan hücre hazırlığında kullanılan tamponlar

Tampon 1

Potasyum asetat	30 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Gliserol (% 87)	8.6 ml

Hacim dH₂O ile 50 ml’ye tamamlanır ve filtrasyon ile steril edilir.

Tampon 2

MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Gliserol (% 87)	8.6 ml

Çözeltinin pH’sı 0.2 M KOH ile 6.8’e ayarlanır. Hacim dH₂O ile 50 ml’ye tamamlanır ve filtrasyon ile steril edilir.

Bakterilerin üremesinin DNA kuantifikasyonu ile belirlenmesi

Difenilamin Ayracı

Difenilamin	1.5 g
Glasiyal asetik asit	100 ml

Işıktan korumak için naliminyum folyo ile sarılır.
Kullanmadan önce üzerine aşağıdaki maddeler ilave edilir:

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

Su ile hazırlanan Asetaldehid (%1.6) çözeltisi

Asetaldehid	1 ml
dH ₂ O	49 ml

1 N HClO₄HClO₄ (%80)

10.87 ml/100 ml

HClO₄ (%60)

16.74 ml/100 ml

Protein saflaştırmasında kullanılanlar**LEW Tamponu**

Üre

8 M

NaH₂PO₄

50 mM

NaCl

300 mM

pH 8.0

Dengeleme Tamponu

LEW tamponuna 10 mM imidazol, pH 8.0, eklenerek hazırlanır.

Yıkama Tamponu

LEW tamponuna 20 mM imidazol, pH 8.0, eklenerek hazırlanır.

Elüsyon Tamponu

LEW tamponuna 250 mM imidazol, pH 8.0, eklenerek hazırlanır.

Diyaliz Tamponu

Üre

2.5 M

NaH₂PO₄

50 mM

NaCl

300 mM

pH 8.0

Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde kullanılanlar**Bradford Ayracı (Belirteci) (5X)**

Coomassie Brilliant mavisi G250

100 mg

50 ml % 95'lik etanolde çözülür. Çözelti 100 ml %85'lik fosforik asit ile karıştırılır ve dH₂O ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır. Bradford belirteci Watman No.1 filtre kağıdı kulnalarak süzülür ve etrafı aliminyum folyo ile sarılarak 4°C'de saklanır.

Tris HCl (1.5 M)

Tris bazı

54.45 g

dH₂O

150 ml

Çözeltinin pH'sı 8.8 değerine getirilir, hacmi dH₂O ile 300 ml'ye tamamlanır ve 4°C'de saklanır.

Tris HCl (0.5 M)

Tris bazı

6 g

dH₂O

60 ml

Çözeltinin pH'sı 6.8 değerine getirilir, hacmi dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır ve 4°C'de saklanır.

Akrilamid/Bis (30:1)

Akrilamid	146 g
N.N'-Metilen-bisAkrilamid	4 g
dH ₂ O	500 ml

Çözelti süzülür ve 4°C'de saklanır. Işıktan korunur.

Coomassie R-250 Boyama Çözeltisi

Coomassie mavisi R-250	0.25 g
Metanol	125 ml
Glasiyal Asetik asit	25 ml
dH ₂ O	100 ml

Tesbit (Fiksasyon) Çözeltisi

Etanol	40 ml
Glasiyal Asetik asit	10 ml
dH ₂ O	50 ml

Destaining Çözeltisi

Metanol	100 ml
Glasiyal Asetik asit	100 ml
dH ₂ O	800 ml

SDS-PAGE için Running (Yürütme) Tamponu (5X)

Tris bazı	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g
dH ₂ O	1000 ml

4°C'de saklanır.

Yükleme Tamponu (4X)

dH ₂ O	3 ml
Tris HCl (0.5 M)	1 ml
Gliserol	1.6 ml
SDS (% 10)	0.4 ml
β-merkaptetanol	0.4 ml
Bromofenol mavisi (%0.5, w/v)	0.4 ml

Southern Blotlama için kullanılanlar

20X SSC Tamponu

Sodyum sitrat dihidrat	88.2 g/l
NaCl	175.3 g/l

pH 7.0

Yıkama Solüsyonu 1

2x SSC
%0.1 SDS

Yıkama Solüsyonu 2

0.5x SSC
%0.1 SDS

EMSA için kullanılanlar

TBE (0.25X) (Native PAGE için)	%60
Gliserol	%40
Bromo fenol mavisi (w/v)	%0.2

Native PAGE için Tris-Borat Tamponu (TBE) (1X)

Tris Bazı	90 mM
Borik Asit	90 mM
EDTA (0.5 M, pH: 8.3)	4 ml/l

pH 8.0-8.3 değer aralığına ayarlanır ve hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

EK4 Kimyasallar, Enzimler, Kitler ve Antibiyotikler

Kimyasallar

Asetaldehid	Sigma
Akrilamid	Sigma
Agar	Merck
Agaroz	Prona
Ammonyum persulfat	Sigma
Apramisin	Sigma
Borik asit	Merck
Bovine serum albumin	Sigma
Bromo fenol mavisi	Sigma
β -merkaptoetanol	Sigma
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Sefalosporin C	Sigma
Potasyum klavulanat	Sigma
Kloroform	Merck
Kloramfenikol	Sigma
Coomassie Brillant Mavisi R-250	Sigma
Difenilamin	Sigma
DMSO	Sigma
Ditiotreitol (DTT)	Merck
EDTA	Sigma
Etanol	Sigma
Ethidyum bromür	Sigma
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Glasiyal Asetik asit	Merck
Gliserol	Merck
Glisin	Merck
HEPES	Merck
Herring sperm DNA'sı	Sigma
HCl	Sigma
HClO ₄	Merck
H ₂ SO ₄	Merck
İmidazol	Merck
IPTG	Sigma
İzoamilalkol	Sigm
İzopropanol	Merck
Potasyum acetate	Merck
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Meck

KH ₂ PO ₄	Merck
L-Asparajin	Sigma
Mannitol	Merck
Metanol	Sigma
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck
MOPS	Sigma
Sodyum asetat	Merck
NaCl	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Merck
Nalidiksik asit	Sigma
NaOH	Merck
NN'Metilen Bisakarilamid	Sigma
Penisilin G	Sigma
Fenol	Amresco
Poly[d(I-c)]	Roche
RuCl ₂	Merck
SDS	Merck
Soya unu	Ticari
Nişasta	Merck
Sukroz	Merck
TEMED	Merck
Tris-HCl	Merck
Tryptik Soya Broth	Oxoid
Üre	Sigma
X-Gal	Sigma
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Whatman Kağıdı	Sigma

Enzimler

Lizozim	Sigma
Proteinaz K	Sigma
T4 DNA Ligaz	Thermo Scientific™
EcoRI	Thermo Scientific™
BlpI	Thermo Scientific™
HindIII	Thermo Scientific™
XbaI	Thermo Scientific™
NotI	Thermo Scientific™
NdeI	Thermo Scientific™
SpeI	Thermo Scientific™

Dream <i>Taq</i> DNA polimeraz	Thermo Scientific™
T4 DNA Polimeraz	Thermo Scientific™
Alkalin Fosfataz	Thermo Scientific™
Q5 DNA polimeraz	NEB
CloneAmp™ HiFi PCR Premix	TAKARA

Kitler

Plazmid izolasyon Kiti	Macharey-Nagel
Gel Elüsyon Kiti	Macharey-Nagel
RNA mini izolasyon kiti	Macharey-Nagel
DNAaz-free TM kiti	Thermo Scientific™
Phase lock gel heavy tüpleri	5-Prime
Superscript™ One-Step RT-PCR kiti	Invitrogen
Super Script™ III Reverse Transcriptase kiti	Invitrogen
GoTaq®qPCR	Promega
SYBR Green I Nükleik asit jel boyası	Invitrogen
Protino®Ni-TED 2000 kolonları	Macherey-Nagel
Amicon®Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Merck
AP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad
In-Fusion® HD Cloning Kit	TAKARA

Antibiyotikler

	<u>Stok Konsantrasyonu</u>
Ampisilin	100 mg/ml dH ₂ O
Kanamisin	50 mg/ml dH ₂ O
Kloramfenikol	25 mg/ml Etanol
Penisilin G	10 mg/ml dH ₂ O
Apramisin	50 mg/ml dH ₂ O

EK5 Primer Listesi

Gen silinmesi ve aşırı ekspresyonu için primerler	5'---3'	Uzunluk (bç)	Kullanım amacı
Oligo1	cgacctcgagggggggcccgaccggacgggcccgcgcga	2419	<i>adpA</i> geninin 5' flanking bölgelerinin çoğaltılması
Oligo2	cgactaccttgacgctaagccccctcggtatt		
Oligo3	gcttagcgtcaaggtagtcgcatgaacga	2987	<i>adpA</i> geninin 3' flanking bölgelerinin çoğaltılması
Oligo4	ctcactataggcggaattggatgagatgggccctggtca		
Aph_II_F	gaacacgtagaaagccagt	1108	Kanamisin direnç geninin çoğaltılması
AphII_R	tcagaagaactcgtcaaga		
I_SceI_check_F	catgcagttcagtggaaga	235	<i>I_SceI</i> gen bölgesinin çoğaltılması
I_SceI_check_R	cgggatggtcttctgtgt		
AdpA_F	catatgatgagtcaggactccgccgcac	1212	<i>adpA</i> geninin çoğaltılması
AdpA_R	actagtttatggcgcgctccgctgc		
adpAD_F	gcttcgcgccaagtctcat	314	<i>adpA</i> nükleotid dizisini içermeyen bölgenin çoğaltılması
adpAD_R	tcgccgagcacattcagttc		
ermEI_SceI_F-	taggatccagcccgaccgcgagc	1050	pIJ12742 plazmidinin tespit edilmesi
ermEI_SceI_R-	acgaattcgatatcgcgcgcg		
pIJ12738_D1	ggacatccaggatttctggccatc	550	Δ adpA-füzyon fragmentinin doğrulanması
pIJ12738_D2	acgaattcgatatcgcgcgcg	570	Δ adpA-füzyon fragmentinin doğrulanması
pIJ12738_D3	taggatccagcccgaccgcgagc	550	Δ adpA-füzyon fragmentinin doğrulanması
pIJ12738_D4	acgaattcgatatcgcgcgcg	570	Δ adpA-füzyon fragmentinin doğrulanması
pIJ12738_D5	taggatccagcccgaccgcgagc	550	Δ adpA-füzyon fragmentinin doğrulanması
qRT-PCR için primerler	5'---3'	Uzunluk (bç)	Kullanım amacı
tunN-F	tgtgctggtgaccccttgctgcta	144	<i>tunN</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunN-R	gggcggctgatgtcctgctcc		<i>tunN</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer

tunM-F	gtgaggaggaagggacggc	81	<i>tunM</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunM-R	attgaaggcgacacaggtcg		<i>tunM</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunL-F	tccgactcgcccaggaca	101	<i>tunL</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunL-R	attgccccaggaggtgatgaa		<i>tunL</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunK-F	cttcggcgatctggatgtggac	146	<i>tunK</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunK-R	gctgacccggcgatgtattc		<i>tunK</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunJ-F	gcgagcaccggagcctttgagta	102	<i>tunJ</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunJ-R	gcgggcagcgagagcagtgagaa		<i>tunJ</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunI-F	ccgcatcgaggaggggagtt	148	<i>tunL</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunI-R	gtaccgggagtgggcgaagacat		<i>tunL</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunH-F	cgagaagagctcactaccg	153	<i>tunH</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunH-R	gccagacgtcaggatcac		<i>tunH</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunG-F	ggcggagtctggcacgatttc	147	<i>tunG</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunG-R	ctcccgccaccgttcagcagttct		<i>tunG</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunF-F	cctgcgccgggtctttc	104	<i>tunF</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunF-R	cccggtagtacgtggatgctc		<i>tunF</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunE-F	cgggagaactgggtgcaaggaga	150	<i>tunE</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunE-R	ccgggtgggtgggtgaggacagat		<i>tunE</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunD-F	ggccttgcgcgacggctcactc	114	<i>tunD</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer

tunD-R	tcggcgaaaggcggcacactcac		<i>tunD</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunC-F	atctcctcgggtcatcgtcgtg	90	<i>tunC</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunC-R	gagccgtgcggtgtcgtgta		<i>tunC</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunB-F	ccgtccgcaaggggttctgg	88	<i>tunB</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunB-R	tggttgccgcgttggtgatg		<i>tunB</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
tunA-F	ccggaggggacaggtaaat	98	<i>tunA</i> iç bölgesini çoğaltmak için ileri primer
tunA-R	ttgtcgcaggctagatggtaaa		<i>tunA</i> iç bölgesini çoğaltmak için geri primer
RT-PCR için primerler	5'---3'	Uzunluk (bç)	Kullanım amacı
88-87co-F	tcgacaacgggtcgaagtagg	1261	<i>SCLAV_4288-tunA</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
88-87co-R	gcgaggctagatggtaaacg		<i>SCLAV_4288-tunA</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
87-86co-F	ggctccggtatctccttctc	397	<i>tunA-tunB</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
87-86co_R	aactgctgatggagagcat		<i>tunA-tunB</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
86-85co-F	tgtcccctatctggtgagg	500	<i>tunB-tunC</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
86-85co-R	aggtgtgatgtcgcagcta		<i>tunB-tunC</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
85-84co-F	atccaccggtccttctcac	512	<i>tunC-tunD</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer

85-84co-R	cacactcacggtgtccaga		<i>tunC-tunD</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
84-83co-F	acagcgcgtcgaatatctct		<i>tunD-tunE</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
84-83co-R	gatgtggatgtgcacctgag	429	<i>tunD-tunE</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
83-82co-F	ccgatgtcttctacacgtg	385	<i>tunE-tunF</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
83-82co-R	gatgtccacgacctcagat		<i>tunE-tunF</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
82-81co-F	acatccatgtggaggacctg		<i>tunF-tunG</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
82-81co-R	actcccagtgatctcggtg	562	<i>tunF-tunG</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
81-80co-F	caacgagatccactgggagt		<i>tunG-tunH</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
81-80co-R	gggcgagattgaagaaatca	490	<i>tunG-tunH</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
80-79co-F	agctccaggaggaagtgaca		<i>tunH-tunI</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
80-79co-R	cagaccgatcatctgcttga	358	<i>tunH-tunI</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
79-78co-F	cattctgatccaccacaacg		<i>tunI-tunJ</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
79-78co-R	ttgctggcaatcttgttctg	562	<i>tunI-tunJ</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer

78-77co-F	accaccatagagcagcgcac		<i>tunJ-tunK</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
78-77co-R	ctgggtcagggagtccacat	442	<i>tunJ-tunK</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
77-76co-F	atgtggactccctgaaccag		<i>tunK-tunL</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
77-76co-R	cgacctggtcaattcctgt	265	<i>tunK-tunL</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
76-75co-F	ctcctcaaggagtggtgga		<i>tunL-tunM</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
76-75co-R	actctccacccgctgtacc	586	<i>tunL-tunM</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
75-74co-F	ggtacagcgggtggagagt		<i>tunM-tunN</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
75-74co-R	gcccgagatategagaagt	496	<i>tunM-tunN</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
74-73co-F	gagccggtgatagtggtcat		<i>tunN-SCLAV_4273</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
74-73co-R	ggtccgggtcttctcgta	320	<i>tunN-SCLAV_4273</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
90-87co-F	ggacctggtgctgatgga		<i>SCLAV_4290-tunA</i> intergenik bölgesini çoğaltan ileri primer
90-87co-R	aactgctgatggagagcat	4930	<i>SCLAV_4290-tunA</i> intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
73-75co-F	ggtacagcgggtggagagt	1437	<i>SCLAV_4273-tunM</i> intergenik bölgesini

				çoğaltan ileri primer
		ggttccgggtcttctcgta		<i>SCLAV_4273-tunM</i>
73-75co-R				intergenik bölgesini çoğaltan geri primer
EMSA primerler	için	5'---3'	Uzunluk (bç)	Kullanım amacı
AdpAE1-F		tcgacaacggctgaagtagg	1261	<i>tunA</i> 'nın yukarı akış bölgesi için ileri primer
AdpAE1-R		gcgaggctagatggtaaacg		<i>tunA</i> 'nın yukarı akış bölgesi için geri primer



EK6 RNA-Seq Analizi Verilerine Göre Farklı İfade Olan Genlerin Listesi

Tablo EK6.1. Sporulasyon ve hücre bölünmesi ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_5519</i>	E2Q1G0	Putatif sporulasyon kontrol protein	-19,54399468	0,032081804	-1,184086437	1,216168241	K06377 1 2.4e-187 659.8 sc1f:BB341_00945 sporulation-control protein
<i>SCLAV_0389</i>	E2Q8D3	Putatif sporulasyon proteini K benzeri protein	-14,77375737	-3,006814431	-3,610107696	0,603293265	K06413 1 2.3e-59 236.5 lpi1:LIP_1733 stage V sporulation protein K
<i>SCLAV_1930</i>	E2Q4G5	Putatif FtsK/SpoIIIE ailesi proteini	1,86560406	1,974499628	2,207876017	-0,23337639	K03466 1 0.0e+00 2625.9 sc1f:BB341_18690 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family
<i>SCLAV_0949</i>	E2PXA4	TIR alanı içeren protein* spoIIIE	-5,056786596	-2,061342822	-4,22038931	2,159046489	K11749 1 1.4e-14 86.3 msd:MYSTI_02958 regulator of sigma E protease
<i>SCLAV_4357</i>	E2Q6Y1	Putatif sporulasyon proteini K	-9,632995197	-6,311067102	-3,311067102	-3	K06413 1 2.4e-59 236.1 tmr:Tmar_1080 stage V sporulation protein K
<i>SCLAV_4356</i>	E2Q6Y0	Hücre bölünmesi ile ilgili protein	-4,799975392	2,510312788	1,671119144	0,839193643	K03466 1 0.0e+00 3053.8 sc1f:BB341_07075 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family

Tablo EK6.1. Sporulasyon ve hücre bölünmesi ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_0317/kd pD</i>	E2Q861	DUF2334 alanı içeren protein	-3,549798616	3,053888196	-0,66768724	3,721575436	K07646 1 2.4e-18 99.4 maqu:Maq22A_c17265 two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase KdpD
<i>SCLAV_4923</i>	B5H390	Putatif salgılanan protein	6,714245518	3,292781749	7,094869433	-3,802087683	K03466 1 2.2e-18 99.0 bmu:Bmul_0956 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family
<i>SCLAV_p0751/k dpE</i>	D5SJZ5	Salgılanan protein	-7,888743249	3,897934785	-4,566815154	8,464749939	K07667 1 6.8e-09 67.0 mee:DA075_07365 two-component system, OmpR family, KDP operon response regulator
<i>SCLAV_4479/cw IO</i>	B5H3N0	YceI ailesi proteini	-5,675092319	-1,891443844	-3,405300547	1,513856704	K21471 1 5.4e-07 60.1 ams:AMIS_2040 peptidoglycan DL-endopeptidase CwIO
<i>SCLAV_3091</i>	B5GT64	Fosforibozilamin -glisin ligazı	-7,440445013	-2,898786296	-3,928394883	1,029608587	K03466 1 1.2e-25 123.2 bmu:Bmul_0956 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family
<i>SCLAV_p1379</i>	D5SLS0	Plastosiyon, PetE	-14,87550939	-1,095892623	-2,451343105	1,355450482	K17680 1 4.4e-14 84.7 btr:BT_2129 twin kle protein

Tablo EK6.2. Taşıma ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (ΔadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_4935</i>	E2PW18	ABC tipi Fe ³⁺ taşıma sistemi, geçirgenlik bileşeni	11,13506795	4,008988783	7,857980995	-3,848992212	K02011 1 1.2e-292 1010.4 scf:BB341_04260 iron(III) transport system permease protein
<i>SCLAV_2953</i>	B5GZT2	ABC taşıyıcı ile ilişkili protein	10,56128795	4,906890596	7,378511623	-2,471621028	K02004 1 4.1e-235 818.9 scf:BB341_13810 putative ABC transport system permease protein
<i>SCLAV_0509</i>	B5H2K2	Integral membran protein	13,47104009	8,469641817	9,068778278	-0,599136461	K02351 1 8.2e-156 555.1 spri:SPRI_6333 putative membrane protein
<i>SCLAV_2954</i>	B5GZT3	ABC taşıyıcı, ABC taşıyıcı ile ilişkili protein	12,0317012	6,392317423	9,199426968	-2,807109545	K02003 1 1.1e-142 511.1 scf:BB341_13805 putative ABC transport system ATP-binding protein
<i>SCLAV_2165</i>	B5GXT5	Di-tripeptid taşıyıcı	11,36194377	7,981281854	9,011227255	-1,029945401	K03305 1 1.2e-222 777.7 srn:A4G23_02066 proton-dependent oligopeptide transporter, POT family
<i>SCLAV_4936</i>	E2PW19	ABC tipi Fe ³⁺ taşıma sistemi, periplazmik bileşen	15,21515377	9,731319031	11,03871327	-1,307394236	K02012 1 2.4e-196 689.9 scf:BB341_04255 iron(III) transport system substrate-binding protein

Tablo EK6.2. Taşıma ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_0787</i>	B5H264	İntegral membran protein	13,75655632	9,289557848	10,54930337	-1,25974552	-
<i>SCLAV_5150</i>	E2PY48	TrkA-C alanı içeren protein-potasyum taşıyıcı	14,36461347	8,611393726	9,526694846	-0,91530112	K07228 1 2.1e-83 313.5 sc1f:BB341_03240 TrkA domain protein
<i>SCLAV_5697</i>	B5H3Y6	Putatif membran protein	-19,27697403	-6,011652005	-7,698129637	1,686477633	-
<i>SCLAV_2856 (cydD)</i>	E2PVL5	Putatif ABC taşıyıcı ATP bağlayıcı protein ve geçirgenlik bileşeni	2,934683555	2,580157517	4,648597412	-2,068439895	K16014 1 0.0e+00 2362.8 sc1f:BB341_14275 ATP-binding cassette, subfamily C, bacterial CydCD
<i>SCLAV_4683</i>	B5GW54	Transkripsiyonel baskılayıcı, NrdR	2,638340844	2,688231941	3,590056278	-0,901824337	K07738 1 9.2e-93 344.7 sc1f:BB341_05485 transcriptional repressor NrdR
<i>SCLAV_2087</i>	B5H186	İntegral membran protein	-3,966262258	-4,072520946	-9,0452136	4,972692654	K13668 1 1.5e-45 189.1 stre:GZL_06384 phosphatidyl-myoinositol dimannoside synthase
<i>SCLAV_5410</i>	B5GYE2	Hücre yüzeyi protein, Bakır-bağlayıcı protein	-10,75739001	1,658351759	-3,314446514	4,972798272	K11904 1 1.3e-23 116.3 yro:CH64_3139 type VI secretion system secreted protein VgrG

Tablo EK6.2. Taşıma ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_2086</i>	B5H185	İntegral membran taşıma proteini, Şeker ABC taşıyıcı geçirgenlik protein	-2,658948812	-2,425711299	-4,587404758	2,161693458	K10234 1 1.9e-190 670.2 sc1f:BB341_17890 alpha-glucoside transport system permease protein
<i>SCLAV_2087</i>	B5H186	İntegral membran protein	-3,966262258	-4,072520946	-9,0452136	4,972692654	K13668 1 1.5e-45 189.1 stre:GZL_06384 phosphatidyl-myo-inositol dimannoside synthase
<i>SCLAV_1862</i>	B5GV88	Hücre yüzeyi protein, Bakır-bağlayıcı protein	-6,58757006	-5,695936668	-7,624406828	1,928470161	K03466 1 9.0e-17 93.6 bmj:BMULJ_02308 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family

Tablo EK6.3. Siderefor ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_1947-sidE</i>	E2Q4I2	Siderofor etkileşen protein	14,11374217	12,84268426	9,523953939	3,318730322	K02013 1 5.2e-32 143.7 bsau:DWV08_10890 iron complex transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.34]
<i>SCLAV_3543 (ccsB)</i>	B5GWC2	Sitokrom C montaj protein	4,168704212	3,147227816	4,379663169	-1,232435353	K02343 1 7.9e-14 83.6 salf:SMD44_04110 DNA polymerase III subunit gamma/tau [EC:2.7.7.7]

Tablo EK6.4. Kemotaksis ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_p1093</i>	D5SKY6	Metil kabul eden kemositaksi duyuşal transdüşer	-18,17596	-0,743278	-0,013971	-0,729307	K02519 1 4.9e-09 67.0 rrz:CS378_01410 translation initiation factor IF-2

Tablo EK6.5. TCS ile ilişkili farklı ifade olan genler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_1381</i>	B5GUZ0	İki bileşenli sistem yanıt regülatörü	11,89708913	7,8703647	8,6780719	-0,807707	K07696 1 5.9e-39 166.4 pmw:B2K_08860 two-component system, NarL family, response regulator NreC
<i>SCLAV_2807</i>	B5GWL4	İki bileşenli sistem yanıt regülatörü	11,72366094	9,5493996	10,579316	-1,029916	K02483 1 1.1e-132 478.0 sclf:BB341_14510 two-component system, OmpR family, response regulator
<i>SCLAV_2045</i>	E2Q577	Putatif iki bileşenli sistem yanıt regülatörü	1,73956062	-0,401113	0,3033961	-0,704509	K07664 1 1.3e-48 198.7 pspu:NA29_03610 two-component system, OmpR family, response regulator BaeR
<i>SCLAV_5389</i>	B5GYG3	İki bileşenli transkripsiyonel regülatör, LuxR ailesi proteini	-11,70043972	-1,61696	-1,071994	-0,544966	K07692 1 7.5e-40 169.5 mta:Moht_0975 two-component system, NarL family, response regulator DegU
<i>SCLAV_p1461</i>	B5GLT5	İki bileşenli transkripsiyonel regülatör, kanatlı eliks ailesi	-11,22761594	-3,605564	-2,213595	-1,391969	K02483 1 2.1e-65 254.2 rop:ROP_pROB01-01890 two-component system, OmpR family, response regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_2573</i> (<i>wblA</i>)	E2Q9R8	WhiB ailesi transkripsiyonel regülatör, WblA	-18,01537694	-1,83019177	-4,584924386	2,754732615	K18955 1 1.6e-68 263.8 slv:SLIV_20395 WhiB family transcriptional regulator, redox-sensing transcriptional regulator
<i>SCLAV_1957</i> (<i>adpA</i>)	B5H1M7	AdpA	-15,10938178	2,212246894	0,72130672	1,490940174	K13633 1 8.1e-84 316.2 vma:VAB18032_10960 AraC family transcriptional regulator, transcriptional activator FtrA
<i>SCLAV_4100</i> (<i>wblE</i>)	B5GQD1	WhiB ailesi transkripsiyonel regülatör	3,311725461	1,911359143	1,903573212	0,007785931	K18955 1 6.7e-44 181.4 kab:B7C62_25240 WhiB family transcriptional regulator, redox-sensing transcriptional regulator
<i>SCLAV_4054</i>	B5GQ86	Transkripsiyonel regülatör WhiB	-0,135782579	0,519683012	1,765384356	-1,245701343	K18958 1 5.7e-65 251.9 sclf:BB341_08490 WhiB family transcriptional regulator, redox-sensing transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_3950</i>	B5GTU5	Transkripsiyonel regülatör WhiB	-2,978603147	-2,756944111	-3,462333336	0,705389225	K18955 1 3.1e-60 236.1 sclf:BB341_08985 WhiB family transcriptional regulator, redox-sensing transcriptional regulator
<i>SCLAV_3699 (bldM)</i>	B5GYV1	İki bileşenli transkripsiyonel regülatör, LuxR ailesi, İki bileşenli sistem yanıt regülatörü	-3,10871468	-0,231157148	-2,937861858	2,706704709	K02479 1 1.4e-28 131.7 xcv:XCV2153 two-component system, NarL family, response regulator
<i>SCLAV_2349 (adsA/bldN)</i>	B5H2H8	AdsA, RNA polimeraz sigma faktör 70, ECF alt ailesi	-4,858580245	0,584762778	-1,702238216	2,287000995	K03088 1 1.3e-155 554.3 sclf:BB341_16660 RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
<i>SCLAV_3110 (bldC)</i>	B5GT44	DNA bağlayıcı protein, MerR ailesi transkripsiyonel regülatör bldC	-0,910639783	-0,556304567	-1,508515384	0,952210817	-
<i>SCLAV_3467b-3467a (afsK-g)</i>	E2Q133	Belirli olmayan serin/treonin protein kinazı	13,11926538	5,786596362	10,16616308	-4,379566721	K12132 1 1.1e-72 278.9 tcu:Tcur_4168 eukaryotic-like serine/threonine-protein kinase

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_0719</i> (<i>bltD</i>)	B5GWZ7	DNA bağlayıcı protein	-0,428885189	-1,121397716	-0,927533562	-0,193864154	K02343 1 1.6e-06 58.2 salf:SMD44_04110 DNA polymerase III subunit gamma/tau [EC:2.7.7.7]
<i>SCLAV_2310</i> (<i>arpA/scbA</i>)	E2Q7H7	Transkripsiyonel regülatör, ScaA-/BarX gamma-bütrolakton biyosentez proteini	-2,951760237	-5,416399681	-5,464937052	0,04853737	K22463 1 1.8e-18 660.2 scIf:BB341_16850 2-oxo-3-(phosphoxy)propyl 3-oxoalkanoate synthase
<i>SCLAV_p0894</i> (<i>brp</i>)	Q84E47	Bütrolakton otoregülatör reseptör protein	-14,44436787	-1,007005907	-0,771721542	-0,235284365	K03723 1 7.6e-18 96.3 ncy:NOCYR_4665 transcription-repair coupling factor (superfamily II helicase)
<i>SCLAV_0477</i> (<i>afsR</i>)	E2Q9D3	AfsR/SARP ailesi yol spesifik regülasyon proteinleri	-0,468737498	-0,666551896	-1,946582453	1,280030557	K01990 1 7.7e-41 172.9 sesp:BN6_53560 ABC-2 type transport system ATP-binding protein
<i>SCLAV_0768</i> (<i>ssgA</i>)	E2PV97	SsgA, sporlamanın ve hücre bölünmesinin protein düzenleyicisi	-0,343157229	-2,8325865	-2,879618348	0,047031848	-

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_3860</i>	B5GSU4	GntR ailesi transkripsiyonel regülatör	-15,1049263	0,379078361	0,745455902	-0,36637754	K03710 1 1.4e-46 191.8 ahg:AHOG_19565 GntR family transcriptional regulator
<i>SCLAV_p0758</i>	B5GN70	Olası DNA bağlayıcı protein	-15,09436639	-2,596514557	-2,962509433	0,365994876	K03711 1 7.8e-07 60.5 orn:DV701_01265 Fur family transcriptional regulator, ferric uptake regulator
<i>SCLAV_p1581</i>	D5SMB9	Transkripsiyonel regülatör, BadM/Rrf2 ailesi	-14,70081898	-1,926855614	-1,603609839	-0,323245775	K19587 1 2.0e-08 64.3 phh:AFB00_10575 Rrf2 family transcriptional regulator, repressor of oqxAB
<i>SCLAV_p0607</i>	B5GTM7	Arsr2	-13,80342483	-3,601301008	-3,377160077	-0,224140931	K03892 1 1.3e-48 197.6 srw:TUE45_05059 ArsR family transcriptional regulator, arsenate/arsenite/antimoni te-responsive transcriptional repressor
<i>SCLAV_p1175</i>	B5H127	PadR benzeri aile transkripsiyonel regülatör	-13,75447	-1,520251317	-1,333457139	-0,186794178	K10917 1 5.8e-24 116.3 axe:P40_14000 PadR family transcriptional regulator, regulatory protein AphA

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_p0239</i> (<i>traR</i>)	D5SII7	Transkripsiyonel regülatör, TraR	-13,66877421	-0,832526561	-1,927728631	1,09520207	K03710 1 4.0e-84 316.6 svl:Strvi_9022 GntR family transcriptional regulator
<i>SCLAV_p0166</i>	B5GUE4	AraC ailesi düzenleyici proteini	-13,51076417	-4,151014608	-10,18883607	6,037821465	K14063 1 4.1e-17 94.4 pset:THL1_3182 AraC family transcriptional regulator, positive regulator of tynA and feaB
<i>SCLAV_3441</i>	B5GNU5	AraC ailesi transkripsiyonel regülatör	-13,18827975	-0,229908291	0,623997849	-0,85390614	K07506 1 1.3e-15 89.0 ppw:PputW619_2736 AraC family transcriptional regulator
<i>SCLAV_p0568</i>	D5SJJ4	IclR ailesi transkripsiyonel regülatör	-13,10934097	-1,16866032	-2,776185618	1,607525298	K02624 1 6.7e-10 70.1 pmad:BAY61_09170 IclR family transcriptional regulator
<i>SCLAV_3595</i>	E2Q279	Yanıt regülatörü transkripsiyon faktörü	-12,80755618	-1,660987501	-1,224943726	-0,436043776	K13419 1 2.5e-87 327.0 roa:Pd630_LPD06849 serine/threonine-protein kinase PknK
<i>SCLAV_1025</i>	E2PXI1	GntR ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,75739001	-2,45132832	-0,406450828	-2,044877492	K03710 1 6.8e-25 119.8 fsy:FsymDg_1267 GntR family transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_5384</i>	B5GYG9	GntR ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,71145189	-0,95907124	-0,194274634	-0,764796606	K11475 1 5.2e-16 90.1 pde:Pden_3536 GntR family transcriptional regulator, vanillate catabolism transcriptional regulator
<i>SCLAV_p0596</i>	B5GTL5	Transkripsiyonel regülatör, PadR ailesi	-12,67330908	-1,207742671	-2,398348603	1,190605933	K10947 1 6.3e-47 191.8 kfl:Kfla_1096 PadR family transcriptional regulator, regulatory protein PadR
<i>SCLAV_p0892</i>	D5SKD6	Transkripsiyonel regülatör, TetR ailesi proteini	-12,66422504	-0,606571701	0,042486804	-0,649058505	K18476 1 2.7e-13 81.3 scy:SCATT_p04750 TetR/AcrR family transcriptional regulator, tetracycline repressor protein
<i>SCLAV_p0530</i>	B5GRH0	Transkripsiyonel regülatör	-12,60686784	0,271183075	0,145930921	0,125252154	K07110 1 7.6e-08 63.2 mnl:Msil_3158 XRE family transcriptional regulator, fatty acid utilization regulator
<i>SCLAV_2721</i>	B5GY80	GntR ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,49460562	-0,04726405	0,314961567	-0,362225617	K03710 1 2.6e-27 127.9 sle:sle_20770 GntR family transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_5570</i>	E2Q1L1	Olası transkripsiyonel baskılayıcı/TetR ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,45789384	-2,020141765	-1,797006567	-0,223135198	K21471 1 4.9e-10 70.1 cccu:CBR64_04160 peptidoglycan DL-endopeptidase CwlO
<i>SCLAV_5454</i>	B5GWQ1	Olası transkripsiyonel regülatör	-12,39392668	-2,38269942	-0,326156218	-2,056543202	K16137 1 4.8e-36 156.4 amyb:BKN51_33665 TetR/AcrR family transcriptional regulator, transcriptional repressor for nem operon
<i>SCLAV_0064</i>	E2Q5Y0	AraC ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,169925	-0,874156067	0,834822156	-1,708978223	K14063 1 3.9e-12 77.8 eno:ECENHK_10280 AraC family transcriptional regulator, positive regulator of tynA and feaB
<i>SCLAV_4319</i>	B5GL05	MarR ailesi transkripsiyonel regülatör	-12,10689005	-2,796277263	-1,402121806	-1,394155458	K03712 1 8.7e-07 58.9 noa:BKM31_12665 MarR family transcriptional regulator, multiple antibiotic resistance protein MarR;
<i>SCLAV_0415</i>	E2Q8F9	Transkripsiyonel regülatör, TetR ailesi	-11,74861218	-1,163649676	-4,163649676	3	K15733 1 2.8e-174 616.7 strc:AA958_12605 dye decolorizing peroxidase [EC:1.11.1.19]

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_3697</i>	E2Q2I1	LysR ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,95673915	-0,893344064	-1,292291861	0,398947797	K09681 1 2.0e-26 125.2 acts:ACWT_2405 LysR family transcriptional regulator, transcription activator of glutamate synthase operon
<i>SCLAV_2073</i>	B5GSI7	LysR ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,76404222	-1,692579855	-1,107617354	-0,584962501	K21757 1 4.2e-26 124.0 pge:LG71_13735 LysR family transcriptional regulator, benzoate and cis,cis-muconate-responsive activator of ben and cat genes
<i>SCLAV_p1262</i>	B5H461	LysR ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,75905594	-2,28535019	-0,15589326	-2,12945693	K11921 1 6.3e-28 130.2 psin:CAK95_05780 LysR family transcriptional regulator, cyn operon transcriptional activator
<i>SCLAV_5400</i>	E2Q0C4	AraC ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,65731845	-2,499971514	-1,370760688	-1,129210826	K02099 1 2.1e-23 115.2 slo:Shew_2711 AraC family transcriptional regulator, arabinose operon regulatory protein

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_5692</i>	E2Q2P8	LysR ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,3858624	-0,438225463	0,784375652	-1,222601114	K09681 1 7.0e-24 117.1 pjd:Pjdr2_1709 LysR family transcriptional regulator, transcription activator of glutamate synthase operon
<i>SCLAV_p0844</i>	B5GMY1	ArsR ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,36577564	-0,937415463	-0,282296308	-0,655119155	K03497 1 3.3e-08 64.7 scl:sce_pseudo_02 chromosome partitioning protein, ParB family
<i>SCLAV_5422</i>	E2Q0E6	Olası TetR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-11,2911707	-0,799317603	-0,66911888	-0,130198723	K18476 1 2.1e-18 98.2 sauo:BV401_10415 TetR/AcrR family transcriptional regulator, tetracycline repressor protein
<i>SCLAV_p0760</i>	B5GN68	Transkripsiyonel regülatör	-11,08148344	-2,972958981	-2,162620201	-0,81033878	K18954 1 5.4e-27 127.1 cdn:BN940_06656 AraC family transcriptional regulator, transcriptional activator of pobA
<i>SCLAV_p1262</i>	B5H461	LysR ailesi transkripsiyonel regülatör	-6,64305184	-3,169499114	-1,454848105	-1,714651008	K02519 1 1.1e-16 92.8 kab:B7C62_27725 translation initiation factor IF-2

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_5681</i>	E2Q2N7	Olası transkripsiyonel regülatör	-10,62021983	0,116182106	-2,581300836	2,697482942	K21405 1 1.2e-34 152.9 bkw:BkAM31D_16385 sigma-54 dependent transcriptional regulator, acetoin dehydrogenase operon transcriptional activator AcoR
<i>SCLAV_p0084</i>	B5GW26	SARP ailesi transkripsiyonel regülatör	-10,26561505	-2,673158009	-3,458260124	0,785102115	K22894 1 3.3e-34 152.1 nfr:ERS450000_04489 SARP family transcriptional regulator, regulator of embCAB operon
<i>SCLAV_5602</i>	E2Q1P3	Olası transkripsiyonel aktivatör srcap-benzeri protein	-10,2632692	2,731437795	0,248483453	2,482954341	K21449 1 5.5e-58 231.9 aun:AWM73_05835 trimeric autotransporter adhesin
<i>SCLAV_p1122 (staR)</i>	D5SL15	Staurosporin biyosentezi transkripsiyonel aktivatörü StaR	-8,924812504	4,820336574	3,444784843	1,375551731	K21449 1 6.5e-45 188.3 aun:AWM73_05835 trimeric autotransporter adhesin
<i>SCLAV_0472</i>	E2Q9C8	LuxR yanıt regülatör alıcısı	-4,403958672	-3,50385652	-4,387787991	0,88393147	K07693 1 1.2e-104 384.4 scIf:BB341_25510 two-component system, NarL family, response regulator DesR

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_4985</i>	E2PWY1	Olası LuxR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-4,270484181	-8,332260378	-4,577372876	-3,754887502	K21685 1 3.8e-152 542.7 scif:BB341_04030 LuxR family transcriptional regulator, regulator of acetate metabolism
<i>orn</i>	B5H1M6	Oligoribonükleaz	-4,13463501	0,753662756	0,669417289	0,084245467	K13288 1 2.1e-109 400.2 scif:BB341_18550 oligoribonuclease
<i>SCLAV_0876</i>	E2PWC0	Olası gliserol operon regülatör protein, IclR-ailesi	-3,679629827	0,448337063	-0,290971282	0,739308345	K13641 1 8.6e-31 139.4 aac:Aaci_2531 IcIR family transcriptional regulator, acetate operon repressor
<i>SCLAV_1107</i>	B5GYM5	Olası DNA bağlayıcı protein	-3,458230318	-1,764920623	-2,542852396	0,777931773	K21686 1 9.8e-07 59.7 buj:BurJV3_0219 XRE family transcriptional regulator, fatty acid utilization regulator
<i>SCLAV_1314</i>	E2PZT4	TetR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-3,261734322	-1,383428975	-1,353100936	-0,03032804	K09017 1 1.0e-13 82.4 cpe:CPE0029 TetR/AcrR family transcriptional regulator
<i>SCLAV_2860</i>	B5GXD4	LacI-ailesi transkripsiyonel regülatör	1,342189539	0,132083099	0,161909604	-0,029826505	K02529 1 3.2e-42 177.9 nal:B005_0256 LacI family transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_2049</i>	E2Q581	Olası IclR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-2,918001183	-2,039578903	-3,231645292	1,192066388	K13641 1 1.8e-13 81.6 tos:Theos_1800 IcIR family transcriptional regulator, acetate operon repressor
<i>SCLAV_3828</i>	B5GSX2	DeoR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-2,514382998	-0,599317516	-1,765329518	1,166012001	K03436 1 2.4e-44 184.9 sth:STH793 DeoR family transcriptional regulator, fructose operon transcriptional repressor
<i>SCLAV_3855</i>	B5GSU9	MarR-ailesi transkripsiyonel regülatör	-1,73244874	0,233997412	-0,988581749	1,222579161	K06075 1 5.6e-10 69.7 bho:D560_0898 MarR family transcriptional regulator, transcriptional regulator for hemolysin
<i>SCLAV_5124</i>	E2PY21	DNA bağlayıcı protein	-1,595272177	-1,707510611	-5,482622586	3,775111974	K03466 1 1.0e-23 116.3 bmj:BMULJ_02308 DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE, S-DNA-T family
<i>SCLAV_0797 (argR)</i>	B5H255	Arginin repressörü (ArgR)	-1,407634588	-0,265177899	0,127994455	-0,393172353	K03402 1 1.2e-92 344.4 scf:BB341_23960 transcriptional regulator of arginine metabolism

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_4104</i> (<i>rshA</i>)	E2Q5G5	Olası anti-sigma faktör rshA	-1,098226028	-1,458161103	-1,234380225	-0,223780879	K04757 1 1.6e-68 263.8 sc f:BB341_08245 serine/threonine-protein kinase RsbW [EC:2.7.11.1]
<i>SCLAV_1959</i>	B5H1M5	Histidin kinazı	0,779615292	-0,924178565	-1,750958986	0,826780421	K07638 1 1.6e-22 112.8 asz:ASN_3020 two-component system, OmpR family, osmolarity sensor histidine kinase EnvZ [EC:2.7.13.3]
<i>SCLAV_0698</i>	E2PV27	Olası transkripsiyonel regülatör	1,012558165	0,183199406	0,613803132	-0,430603726	K05346 1 1.5e-27 129.0 cax:CATYP_03935 deoxyribonucleoside regulator
<i>rex</i> , <i>SCLAV_2346</i>	E2Q7L3	Redoks algılayan transkripsiyonel baskılayıcı Rex	1,381520458	1,090695069	0,559269698	0,531425371	K01926 1 5.9e-130 468.8 sc f:BB341_16675 redox-sensing transcriptional repressor
<i>SCLAV_5278</i>	E2PZ90	AmphRI benzeri transkripsiyonel regülatör	1,582109068	2,971608288	3,818793354	-0,847185066	K01708 1 6.4e-23 115.2 maqu:Maq22A_c21660 galactarate dehydratase [EC:4.2.1.42]
<i>SCLAV_0930</i>	E2PWH4	GntR ailesi transkripsiyonel regülatör	1,876085051	0,35236277	0,297662817	0,054699954	K03710 1 1.8e-137 493.8 sc f:BB341_23330 GntR family transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV_4802</i>	E2PUX8	MarR ailesi transkripsiyonel regülatör	2,326295419	0,880165785	2,211720541	-1,331554756	K02519 1 6.1e-13 79.7 kra:Krad_1443 translation initiation factor IF-2
<i>cutR, SCLAV_4788</i>	B5GUQ3	Transkripsiyonel düzenleyici protein cutR	2,333603408	1,915701766	2,616685032	-0,700983266	K18352 1 2.0e-73 280.8 frp:AX769_07730 two-component system, OmpR family, response regulator VanR
<i>SCLAV_4683</i>	B5GW54	Transkripsiyonel baskılayıcı, NrdR	2,638340844	2,688231941	3,590056278	-0,901824337	K07738 1 9.2e-93 344.7 scf:BB341_05485 transcriptional repressor NrdR
<i>SCLAV_4319</i>	B5GL05	Düzenleyici protein	2,724179439	1,525142415	2,011446527	-0,486304112	K15973 1 2.1e-09 67.8 vil:CFK37_00270 MarR family transcriptional regulator, 2-MHQ and catechol-resistance regulon repressor
<i>SCLAV_4951-4950</i>	E2PW34/E2PW33	Olası transkripsiyonel baskılayıcı GalR/LacI ailesi/LacI ailesi transkripsiyonel regülatör	2,769509394	0,614475781	1,508827665	-0,894351884	K02529 1 1.2e-27 129.4 nal:B005_0256 LacI family transcriptional regulator

Tablo EK6.6. Regülatör DEG'ler

Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>SCLAV</i> ₂₃₇₉	E2Q7P6	Transkripsiyonel düzenleyici protein cseB	3,019632466	3,626246182	3,68030408	-0,054057898	K07670 1 5.6e-53 213.0 cdt:CDHC01_0632 two-component system, OmpR family, response regulator MtrA
<i>SCLAV</i> ₂₉₇₅	B5GZV7	Olası TetR-ailesi transkripsiyonel regülatör	3,165631057	3,04292227	3,653433995	-0,610511725	K22108 1 4.8e-16 90.1 dpc:A6048_03215 TetR/AcrR family transcriptional regulator, cholesterol catabolism regulator
<i>SCLAV</i> ₅₂₄₆	E2PZ58	TetR-ailesi transkripsiyonel regülatör	3,346257107	1,201427511	1,867506353	-0,666078842	K21471 1 6.5e-13 79.7 cceu:CBR64_04160 peptidoglycan DL-endopeptidase CwIO
<i>SCLAV</i> ₃₂₇₇	E2PZ17	RpiR-ailesi transkripsiyonel regülatör	11,81618368	9,506605116	8,241268177	1,265336938	K11904 1 6.9e-34 150.2 bac:BamMC406_6682 type VI secretion system secreted protein VgrG
<i>SCLAV</i> ₁₉₀₅	E2Q4E0	MarR-ailesi transkripsiyonel regülatör	13,7320614	11,27093768	9,808159773	1,462777906	-

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

Sefamisin C gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>bla/SCLAV_4215/CRV15_07440</i>	E2Q5S6	Ramnozil O-metiltransferaz					
<i>pbpA/SCLAV_4214</i>	E2Q5S5	Penisilin bağlayıcı protein PbpA	0,37450741	2,131763028	3,063940692	-0,932177665	K07258 1 0.0e+00 1365.9 sc1f:BB341_07725 serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5/6) [EC:3.4.16.4]
<i>cmcT/SCLAV_4213</i>	E2Q5S4	CmcT proteini	1,651820513	3,44671409	5,27589585	-1,82918176	K08166 1 2.4e-66 258.5 shy:SHJG_3729 MFS transporter, DHA2 family, methylenomycin A resistance protein
<i>pcd/SCLAV_4212</i>	B5GLA9	Aldehit dehidrogenazi (NAD(+))	1,380176041	1,488271813	3,11369178	-1,625419966	K00128 1 9.2e-250 867.8 sct:SCAT_5688 aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
<i>cefE/SCLAV_4211</i>	B5GLB0	Deasetoksefalosp orin C sentetaz	1,733642324	1,688861325	3,253526287	-1,564664962	K12744 1 8.0e-180 634.8 sc1f:BB341_07740 deacetoxycephalosporin-C synthase [EC:1.14.20.1]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

Sefamisin C gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>cefD</i> / <i>SCLAV_4210</i>	B5GLB1	İsopenisilin N epimeraz	1,15120197	1,665277149	3,546635671	-1,881358522	K04127 1 7.5e-231 804.7 scf:BB341_07745 isopenicillin-N epimerase [EC:5.1.1.17]
<i>cmcI</i> / <i>SCLAV_4208</i>	B5GLB3	Ramnozil O-metiltransferaz	1,569894294	1,702683741	3,176457612	-1,473773871	K18062 1 4.0e-139 499.2 scf:BB341_07750 cephamycin biosynthesis protein C
<i>cmcJ</i> / <i>SCLAV_4207</i>	B5GLB4	7-alfa-sefem-metoksilaz P8 zinciri	1,021057635	1,574117422	3,144902498	-1,570785076	K18063 1 3.5e-183 646.0 scf:BB341_07755 cephamycin biosynthesis protein C
<i>cefF</i> / <i>SCLAV_4206</i>	B5GLB5	Deasetoksefalosporin C hidroksilaz	1,354196859	1,604260911	3,398835876	-1,794574965	K12745 1 8.7e-182 641.3 scf:BB341_07760 deacetoxycephalosporin-C hydroxylase [EC:1.14.11.26]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

Sefamisin C gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>cmcH</i> / <i>SCLAV_4205</i>	B5GLB6	3'-hidroksimetilsefe m-O-karbamoiltransferaz	0,813146992	1,089312127	2,844465175	-1,755153048	K04128 1 5.2e-309 1064.7 sclf:BB341_07765 hydroxymethyl cephem carbamoyltransferase [EC:2.1.3.7]
<i>ccaR</i> / <i>SCLAV_4204</i>	B5GLB7	Pozitif regülatör	0,252220126	0,130297639	1,441540271	-1,311242632	K22894 1 1.3e-29 135.6 nbr:O3I_040155 SARP family transcriptional regulator
<i>ORF10</i> / <i>SCLAV_4203</i>	B5GLB9	Salgılanan protein	-0,241116049	1,827400864	3,878309569	-2,050908705	K02519 1 9.7e-06 56.6 mno:Mnod_4618 translation initiation factor IF-2
<i>blp</i> / <i>SCLAV_4202</i>	B5GLC0	Beta-Laktamaz İnhibitör Protein-Benzeri Protein	3,692709731	2,935482115	5,258636671	-2,323154556	K08303 1 3.1e-06 57.4 sta:STHERM_c21690 putative protease [EC:3.4.-.-]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

Sefamisin C gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>lat/SCLAV_4201</i>	B5GLC1	L-lizin 6-transaminaz	-0,02065715	0,18208005	1,843059181	-1,660979131	K03918 1 5.9e-264 914.8 sc1f:BB341_07785 L-lysine 6-transaminase [EC:2.6.1.36]
<i>pcbAB/SCLAV_4200</i>	E2Q5R1	N-5-amin-5-karboksipentanoi l-L-sisteinil-D-valin sentetazi	-0,116150603	0,415065357	2,328154765	-1,913089409	K12743 1 0.0e+00 7471.7 sc1f:BB341_07790 N-(5-amino-5-carboxypentanoyl)-L-cysteiny-D-valine synthase [EC:6.3.2.26]
<i>pcbC, SCLAV_4199</i>	E2Q5R0	İsopenisilin N sentetazi	-0,023925375	-0,365364216	1,262141646	-1,627505862	K04126 1 5.5e-195 685.3 sc1f:BB341_07795 isopenicillin-N synthase [EC:1.21.3.1]
<i>pcbR/SC LAV_4198</i>	B5GLC4	Salgılanan penisilin bağlayıcı protein	-1,659147035	-0,061646684	0,829154839	-0,890801523	K01286 1 7.1e-38 164.1 cgb:cg2199 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase [EC:3.4.16.4]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

CA gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>ceaS2 / SCLAV_4197</i>	E2Q5Q8	Karboksietylarginin sentazı	1,179215737	1,533409205	2,092511585	-0,559102381	K12673 1 0.0e+00 1135.2 scf:BB341_07805 N2-(2-carboxyethyl)arginine synthase [EC:2.5.1.66]
<i>bls2/SC LAV_4196</i>	B5GLC7	Karboksietylarginin beta-laktam sentazı	0,972189833	1,87076818	2,645230674	-0,774462494	K12674 1 4.7e-294 1015.0 scf:BB341_07810 (carboxyethyl)arginine beta-lactam-synthase [EC:6.3.3.4]
<i>pah2/SC LAV_4195</i>	B5GLC8	Proklavaminat amidinohidrolaz	1,033543997	1,78264087	2,610851012	-0,828210142	K12676 1 9.5e-181 637.9 scf:BB341_07815 proclavaminat amidinohidrolase [EC:3.5.3.22]
<i>cas2/SC LAV_4194</i>	Q53939	Klavaminat sentazı	0,257894097	0,767705665	1,416062301	-0,648356636	K12675 1 1.5e-149 534.3 scf:BB341_13950 clavaminat synthase [EC:1.14.11.21]
<i>oat2/ SCLAV_4193</i>	E2Q5Q4	Arginin biyosentezi bifonksiyonel proteini ArgJ	-1,685443553	-0,060554709	0,804210472	-0,864765181	K00620 1 1.3e-219 767.3 scf:BB341_07825 glutamate N-acetyltransferase / amino-acid N-acetyltransferase [EC:2.3.1.35 2.3.1.1]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

CA gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>oppA1/SCLAV_4192</i>	E2Q5Q3	ABC tipi dipeptit taşıma sistemi, periplazmik bileşen	-1,33361149	1,301362036	1,866669169	-0,565307132	K02035 1 0.0e+00 1144.0 scif:BB341_07830 peptide/nickel transport system substrate-binding protein
<i>clara/SCLAV_4191</i>	O66038	Transkripsiyonel aktivatör ClaR	-0,570720711	0,680173132	2,763186686	-2,083013555	K02519 1 2.7e-24 118.6 fri:FraEuI1c_1102 translation initiation factor IF-2
<i>cad/SCLAV_4190</i>	B5GLD3	Klavaldehit dehidrogenaz	-0,698255905	2,081517458	2,432702095	-0,351184636	K12677 1 1.9e-13 473.8 scif:BB341_07840 clavulanate-9-aldehyde reductase
<i>cyp/SCLAV_4189</i>	B5GLD4	Sitokrom P450-SU2	-0,953663031	1,64156869	2,503841639	-0,862272949	K17876 1 1.2e-85 322.4 sct:SCAT_0296 pentalenic acid synthase [EC:1.14.15.11]
<i>fd/SCLAV_4188</i>	E2Q5P9	Ferredoksin					
<i>cpe/SCLAV_4187</i>	B5GLD6	Sefalosporin esterazı	-0,817872036	1,251250802	2,136684939	-0,885434136	K21471 1 2.3e-18 99.0 cceu:CBR64_04160 peptidoglycan DL-endopeptidase Cw10 [EC:3.4.-.-]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

CA gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>orf13/SCLAV_4186</i>	Q8KRB6	İntegral membran protein DUF6	-0,662916106	1,630635357	2,523863025	-0,893227668	K15268 1 4.2e-190 669.1 sclf:BB341_07860 O-acetylserine/cysteine efflux transporter
<i>orf14/SCLAV_4185</i>	Q8KRB5	Asetiltransferaz GNAT ailesi proteini	-1,241044201	1,647013715	2,348467452	-0,701453737	K02519 1 1.9e-17 95.5 sgv:B1H19_29105 translation initiation factor IF-2
<i>oppA2/SCLAV_4183</i>	Q8KRB4	ABC tipi dipeptit taşıma sistemi, çözücü bağlayıcı proteini	-0,749593202	2,951721125	3,822698277	-0,870977152	K02035 1 0.0e+00 1157.1 sclf:BB341_07870 peptide/nickel transport system substrate-binding protein
<i>orf16/SCLAV_4182</i>	B5GLE0	DUF482 alanı içeren protein	-1,251693195	2,547318296	3,44764888	-0,900330584	K09919 1 1.8e-232 810.1 sclf:BB341_07875 uncharacterized protein
<i>gcaS/SCLAV_4181</i>	E2Q5P2	Biotin karboksilaz	-1,308553144	2,131890924	2,86661989	-0,734728965	K22847 1 4.4e-43 181.0 aoi:AORI_5322 S-sulfo-L-cysteine synthase (3-phospho-L-serine-dependent) [EC:2.8.5.1]

Tablo EK6.7. Sekonder metabolitler biyosentezi ile ilişkili DEG'ler

CA gen kümesi							
Gen ismi	Uniprot numarası	Protein ürünü	log2FC (Δ adpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs NRRL3585)	log2FC (pSPG vs NRRL3585)	log2FC (pSPGadpA vs pSPG)	KEGG Orthology
<i>pbpA/</i> <i>SCLAV_4180</i>	Q8KRB1	Penisilin bağlayıcı protein PBP	1,404413539	0,205612411	0,82418412	-0,618571708	K05364 1 3.4e-281 972.2 scf:BB341_07885 penicillin-binding protein A
<i>pbp2/</i> <i>SCLAV_4179</i>	Q83Z59	Penisilin bağlayıcı protein	-1,215748944	-0,66038466	-0,516931498	-0,143453161	K05515 1 0.0e+00 1117.4 sgu:SGLAU_11885 penicillin-binding protein 2 [EC:3.4.16.4]
<i>orf20/</i> <i>SCLAV_4178</i>	E2Q5N9	Sitokrom P450	-4,228223642	-3,488286481	-3,15100414	-0,337282342	K19106 1 2.2e-70 271.6 ami:Amir_4596 nocardicin N-oxygenase [EC:1.14.13.-]
<i>orf21/</i> <i>SCLAV_4177</i>	B1PR38	Putatif RNA polimeraz sigma faktörü	-11,41679753	-3,603016336	-2,798412025	-0,804604311	K03088 1 6.7e-111 405.2 scf:BB341_07900 RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
<i>HK/</i> <i>SCLAV_4176</i>	B1PR39	Histidin kinazı					
<i>RR/</i> <i>SCLAV_4175</i>	B2LX15	Putatif iki bileşenli sistem yanıt regülatörü					

ÖZ GEÇMİŞ

Çiğdem OTUR, Ordu/Ordu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nden 09.06.2014 tarihinde mezun olmuştur. 2014 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programını 06.06.2017 tarihinde tamamlamıştır. 2020-2021 Eğitim Öğretim Yılı Bahar Döneminde "Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji" öncelikli alanında 100/2000 YÖK Doktora bursunu kazanarak doktora eğitimine başlamıştır. 2021 yılından itibaren Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji öncelikli alanında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-3337-7990

Yayımlar:

Uluslararası Makale (SCI- EXPANDED)

1. **Otur Ç.**, Kurt-Kızıldoğan A. Homologous expression of *lysA* encoding diamminopimelic acid (DAP) decarboxylase reveals increased antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*, Brazilian Journal of Microbiology, 2020. DOI: 10.1007/s42770-019-00202-2
2. Şafak H., **Otur Ç.**, Kurt-Kızıldoğan A. (2020). Molecular and biochemical characterization of a recombinant endoglucanase rCKT3eng, from an extreme halophilic *Haloarcula* sp. strain CKT3, International Journal of Biological Macromolecules, 11/2019, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.161.
3. Konus, M., Çetin, D., Yılmaz, C., Arslan, S., Mutlu, D., Kurt-Kızıldoğan, A., **Otur Ç.**, Ozok O., AS Algo M. & Kivrak, A. (2020). Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Novel Thiophene-Based Indole Derivatives as Potential Antibacterial, GST Inhibitor and Apoptotic Anticancer Agents. ChemistrySelect, 5(19), 5809-5814, DOI: 10.1002/slct.202001523.
4. Baş, L., **Otur, Ç.**, & Kurt-Kızıldoğan, A. (2020). Enhanced tunicamycin biosynthesis in BldG overexpressed *Streptomyces clavuligerus*. Applied Biochemistry and Microbiology, 56(4), 412-419, DOI: 10.1134/S000368382004002X.

5. Yılmaz, C., Arslan, S., Mutlu, D., Konus, M., Kayhan, A., KurtKızıldoğan, A., **Otur Ç.**, Ozok O., Kivrak, A. (2020) Identification of 3-Bromo-1-Ethyl-1H-Indole as a Potent Anticancer Agent with Promising Inhibitory Effects on GST Isozymes. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, DOI: 10.2174/18715206206662009181119406.
6. Kurt-Kızıldoğan A., **Otur Ç.**, Yılmaz C., Arslan S., Mutlu D., Kivrak A., Algo M., Kayhan A., Çetin D., Konus M. (2021). Synthesis, cytotoxicity, antioxidant and antimicrobial activity of indole based novel small molecule. *Letters in Drug Design & Discovery*, DOI: 10.2174/1570180817999201109203226.
7. Latifian, E., **Otur Ç.**, Abanoz-Secgin, B., Arslanoglu, S. F., & Aslıhan, K. K. (2021). Evaluation Of Antimicrobial Activitiy in Extracts Of Different Parts Of Three *Tagetes* Species. *Turkish Journal Of Field Crops*, 26(1), 117-122. DOI:10.17557/tjfc.950272
8. Kurt-Kızıldoğan, A., Akarsu, N., **Otur, Ç.**, Kivrak, A., Aslan-Ertas, N., Arslan, S., Mutlu, D., Konus, M., Yılmaz, C., Cetin, D., Topal, T., & Şahin, N. (2021). A Novel 4H-Chromen-4-One Derivative from Marine *Streptomyces ovatisporus* S4702T as Potential Antibacterial and Anti-Cancer Agent. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*. DOI: 10.2174/1871520621666210311085748
9. Kurt-Kızıldoğan, A., Türe, E., Okay, S., & **Otur, Ç.** (2021). Improved production of poly (3-hydroxybutyrate) by extremely halophilic archaeon *Haloarcula* sp. TG1 by utilization of rCKT3eng-treated sugar beet pulp. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11. DOI: 10.1007/s13399-021-02011-
10. Kurt-Kızıldoğan, A., Akarsu, N., **Otur, Ç.**, Kivrak, A., Aslan-Ertas, N., Arslan, S., Mutlu, D., ... & Şahin, N. (2022). A novel 4H-chromen-4-One derivative from marine *Streptomyces ovatisporus* S4702T as potential antibacterial and anti-cancer agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(2), 362-370.
11. Yılmaz, C., Othman Pirdawid, A., Fidan Babat, C., Konuş M., Çetin, D., Kivrak, A., Algo, M.S.A., Arslan, Ş., Mutlu, D., **Otur, Ç.**, Kurt Kızıldoğan, A. (2022). A thiophene derivative, 2-Bromo-5-(2-(methylthio) phenyl)

thiophene, has effective anticancer potential with other biological properties. ChemistrySelect, 7(15), e202200784.

12. Konus, M., Çetin, D., Kızıllkan, N. D., Yılmaz, C., Fidan, C., Algo, M., Kavak, E., Kurt-Kızıldoğan, A., **Otur, Ç.**, Mutlu, D., Abdelselam, A.H., Arslan, S. (2022). Synthesis and biological activity of new indole based derivatives as potent anticancer, antioxidant and antimicrobial agents. Journal of Molecular Structure, 1263, 133168.
13. **Otur, Ç.**, Okay, S., & Kurt-Kızıldoğan, A. (2023). Whole genome analysis of *Flavobacterium aziz-sancarii* sp. nov., isolated from Ardley Island (Antarctica), revealed a rich resistome and bioremediation potential. Chemosphere, 313, 137511.
14. Kavas, M., Abdulla, M. F., Mostafa, K., Seçgin, Z., Yerlikaya, B. A., **Otur, Ç.**, Gökdemir, G., Kurt-Kızıldoğan, A., Al-Khayri, J. M., Jain, S. M. (2022). Investigation and Expression Analysis of R2R3-MYBs and Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes during Seed Color Development of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Plants, 11(23), 3386.
15. Kurt-Kızıldoğan, A., **Otur, Ç.**, Yıldırım, K., Kavas, M., & Abanoz-Seçgin, B. (2023). In-depth comparative transcriptome analysis of *Purpureocillium* sp. CB1 under cadmium stress. Applied Microbiology and Biotechnology, 107(17), 5453-5467.
16. Abanoz-Seçgin, B., **Otur, Ç.**, Okay, S., Kurt-Kızıldoğan, A. (2023). The regulatory role of Fur-encoding *SCLAV_3199* in iron homeostasis in *Streptomyces clavuligerus*. Gene, 147594.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. **Çiğdem OTUR**, Lokman BAŞ, Dursune Merve KARATAŞ, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN *Streptomyces clavuligerus*'a Ait BldG Proteininin *Escherichia coli* BL21(DE3) Hücrelerinde İfadesi, 12 / 2015, Konya [Ulusal]
2. Büşra ABANOZ, Lokman BAŞ, **Çiğdem OTUR**, Sezer OKAY, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN *Streptomyces clavuligerus*'ta demir regülasyonunda rol alması muhtemel üç regülatör genin antibiyotik direnç genleriyle tahrip edilmesi, 12 /2015, Konya [Ulusal]

3. **Çiğdem OTUR**, Sümeyye Esmâ KAYA, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN. *Streptomyces clavuligerus'* ta Farklı Besiyeri Tiplerinin Antibiyotik Üretimi Üzerine Olan Etkileri, 1-3/2016, Samsun[Ulusal]
4. Büşra ABANOZ, Lokman BAŞ, **Çiğdem OTUR**, Merve BİBER, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN, Üç Farklı *Bacillus thuringiensis* Alttürünün Kitinaz Üretimlerinin Karşılaştırılması, 6 / 2016, Samsun [Ulusal]
5. Aslıhan KURT-KIZILDOĞAN, Eylem TÜRE, Büşra. ABANOZ, Sezer OKAY, **Çiğdem OTUR**. Siderophore production in fur-related *SCLAV_01120* mutant of *Streptomyces clavuligerus* 11 /2017, Sofia [Uluslararası]
6. Aslıhan KURT-KIZILDOĞAN, Büşra ABANOZ, **Çiğdem OTUR**, Sezer OKAY, Eylem TURE, Haktan ŞAFAK, Çağrı AKCAN. RNA-SEQ analysis of FUR-like *SCLAV_01120* mutant of *Streptomyces clavuligerus* 11 / 2017, Sofia [Uluslararası]
7. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN, Lokman Baş, **Çiğdem OTUR**. The Possible Effects of *ccaR* and *bldG* Regulatory Genes in the Expression of Tunicamycin Gene Cluster in *Streptomyces clavuligerus* 04/2017, Kırşehir [Uluslararası]
8. **Çiğdem OTUR**, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN, Gülay ÖZCENGİZ. *Streptomyces clavuligerus'*ta *lysA* ve *ccaR* Genlerinin Sefamisin C Biyosentezi Üzerindeki Etkileri 12/2017, Eskişehir [Ulusal]
9. Elnaz LATİFİAN, **Çiğdem OTUR**, Büşra ABANOZ-SEÇGİN, Şahane Funda ARSLANOĞLU, Aslıhan KURT-KIZILDOĞAN. Üç Farklı *Tagetes* Türünün Farklı Kısımlarına Ait Ekstraktlarda Antimikrobiyal Aktivite Tayini 1-4/2019, Antalya [Ulusal]
10. **Çiğdem OTUR**, Ömer KONUKSEVER, Fulya ÖZAYDIN, Sezer OKAY, Sedef TUNCA-GEDİK, Aslıhan KURT-KIZILDOĞAN. TunRS İki Bileşenli Sistemin *Streptomyces clavuligerus'*ta Sefamisin C ve Klavulanik Asit Üretimi Üzerindeki Düzenleyici Etkisi. 10/ 2023, Ankara [Ulusal]
11. Aslıhan KURT-KIZILDOĞAN, **Çiğdem OTUR**, Sezer OKAY, Sedef TUNCA-GEDİK. RNA-Seq Analysis of *Streptomyces clavuligerus* Lacking TunRS Two-Component System. 05/2024, Samsun [Uluslararası]

Araştırma Projeleri & Araştırma Deneyimi Tübitak Destekli Projeler:

1. 1001 - Araştırma, 114Z948, *Streptomyces clavuligerus*'ta Demir Regülasyonu ve Antibiyotik Biyosentezi Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Bursiyer, (2015-2017)
2. 1001 - Araştırma, 117Z808, *Streptomyces clavuligerus*'ta AdpA Pleiotropik Regülatörünün Tunikamisin Biyosentezi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Bursiyer, (2018-2020).
3. 1001 - Araştırma, 121Z821, TunRS İki Bileşenli Sistemin *Streptomyces clavuligerus*'ta Tunikamisin Biyosentezi Üzerindeki Düzenleyici Etkisinin Araştırılması, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Bursiyer (2021- Devam ediyor).

Araştırma Projeleri & Araştırma Deneyimi BAP Destekli Projeler:

1. *Streptomyces clavuligerus*'ta Sefamisin C Antibiyotik Üretiminin Arttırılması, OMÜ, BAP Projesi , PYO.ZRT.1902-A.15.001, Araştırmacı (2015-2017).
2. *Streptomyces clavuligerus*' ta demir regülasyonu ve antibiyotik biyosentezi arasındaki ilişkinin belirlenmesi, OMÜ, BAP Projesi, PYO.ZRT.1905.17.001, Araştırmacı (2017-2018).
3. Ardley Adası Gölü'nden izole edilen üç bakterinin moleküler karakterizasyonu ve biyoteknolojik potansiyellerinin belirlenmesi, OMÜ, BAP Projesi, PYO.ZRT.1901.22.003, Araştırmacı (2022-2023).
4. Rekombinant bir ekstremozimin karakterizasyonu ile serbest ve immobilize durumda aktivite ve stabilitesinin belirlenmesi, OMÜ, BAP Projesi, PYO.ZRT.1901.21.006, Araştırmacı (2022-2024).
5. *Streptomyces clavuligerus*'ta AdpA Pleiotropik Regülatörünün Antibiyotik Biyosentezi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi, OMÜ, BAP Projesi, PYO.ZRT.1904.21.008, Araştırmacı (2021- 2023).
6. Mikroorganizmalarda asbest kirliliğine toleransın moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve asbest biyoremediasyonu için bir prototip suşun karakterizasyonu, OMÜ, BAP Projesi, BAP01-2024-4833, Araştırmacı (2024- Devam ediyor).

7. Biyoaktivite rehberliğinde *Streptomyces* sp. GA3ten ilaç aday molekülü taranması ve karakterizasyonu, OMÜ, BAP Projesi, BAP07-2024-5258, Araştırmacı (2024-Devam ediyor).

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. “Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji” Öncelikli Alanında 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı 2019-2020 Eğitim Öğretim yılı Bahar dönemi /Bursiyer
2. TÜBİTAK- Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2022 - 1/Bursiyer
3. TÜBİTAK- Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2023 - 1/Bursiyer
4. TÜBİTAK- Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2023 - 2/Bursiyer
5. TÜBİTAK- Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2024 - 1/Bursiyer