

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

2006-303

CD'ler.

89812

EK-1

SEFAMİSİN C ÜRETİCİSİ *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*'UN HOMOSERİN DEHİDROGENAZ GENİNİN KLONLANMASI, ENZİMİN KARAKTERİZASYONU VE GEN BLOKASYONUNUN ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

PROJE NO: SBAG-2753

Yrd.Doç.Dr. Ebru İNCE YILMAZ (Proje Yürütücüsü)

Prof.Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Bilgin TAŞKIN

TEMMUZ 2006

ANKARA

ÖNSÖZ

Endüstriyel açıdan oldukça değerli sekonder metabolitlerin (antibiyotikler, antiviral ve antitümör ajanlar) üreticileri olan *Streptomyces* cinsinin önemli üyesi, *Streptomyces clavuligerus*, bir β -laktam antibiyotiği olan sefamisin C üreticisidir. Bu antibiyotiğin sentezi için öncül metabolit oluşturan aspartik asit metabolik yolunun lizin dalındaki karbon akışının, antibiyotik biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğu ve bu çataldaki öncül metabolitlerin artışının sefamisin C biyosentezini arttırdığı bilinmektedir. Projemizde sefamisin C sentezi için öncül metabolit oluşturan aspartik asit metabolik yolunun homoserin dehidrogenaz enzimi bloke edilerek karbon akışının tamamıyla lizin çatalına yönlendirilmesiyle antibiyotik biyosentezinde artış hedeflenmiştir. β -laktamların dünya antibiyotik pazarındaki yeri ve önemi hatırlanacak olursa, projemizin bulgularının, biyoteknoloji endüstrisinin gelişmesinin zorunlu olduğu ülkemizde uygulamaya aktarılması halinde ekonomiye çok önemli katkılarda bulunacağı bir gerçektir. Projemiz, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG-2753) tarafından desteklenmektedir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	5
ŞEKİL LİSTESİ.....	5
ÖZET	8
ABSTRACT.....	9
GİRİŞ	10
GENEL BİLGİLER	10
GEREÇ VE YÖNTEM	16
S. clavuligerus hücrelerinden kromozomal DNA izolasyonu.....	16
PCR ile hom geninin amplifikasyonu.....	17
hom geninin T vektörüne klonlanması.....	17
hom genininin ekspresyon vektörüne klonlanması.....	19
hom geninin E.coli 5075 mutant hücrelerinde heterolog ekspresyonu.....	21
Homoserin dehidrogenaz enzim aktivite testi.....	21
Homoserin dehidrogenaz enziminin saflaştırılması.....	21
Kanamisin Dirençlilik Kasetinin Oluşturulması.....	22
Antibiyotik Dirençlilik Kasetinin Streptomyces Vektörüne Klonlanması.....	24
Southern blot hibridizasyonu	25
S. clavuligerus hücrelerinin üretilmesi ve sefamisin C ölçümü.....	25
BULGULAR.....	25
hom geninin klonlanması ve karakterizasyonu.....	25
hom genininin ekspresyonu	29
Kanamisin Dirençlilik Kasetinin Oluşturulması	31
Antibiyotik dirençlilik kasetinin Streptomyces vektörüne klonlanması.....	33
hom geninin blokasyonunun Southern Blotting ile doğrulanması.....	39
Mutant ve Yabancıl S. clavuligerus hücrelerinde üreme evrelerine göre sefamisin C üretimi	42
TARTIŞMA VE SONUÇ	43
REFERANSLAR	45
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. *S. clavuligerus* rekombinant HSD'nın *E. coli*'den saflaştırılması.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sefamisin C ve Penisilin N'nin yapıları.

Şekil 2. İlk keşfedilen β -laktam antibiyotik penisilin'in bakteri hücre duvarında transpeptidasyon reaksiyonunu engellemesi.

Şekil 3. Aspartat ailesine ait amino asitlerin ve sefamisin C'nin üretildiği aspartat metabolik yolu.

Şekil 4. pGEM-T vektörü.

Şekil 5. pQE-30 vektörü.

Şekil 6. *E. coli* PK19 vektörü.

Şekil 7. pIJ486 plazmid.

Şekil 8. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2) PCR ile elde edilen *hom* geni.

Şekil 9. pGEM-T'den kesilerek çıkartılan *hom* geni. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2) *Pst*I ile linearize edilmiş pEB1, 3) *Sac*II ve *Pst*I ile kesilmiş pEB1.

Şekil 10. *S. clavuligerus* HSD'nın amino asit diziliminin diğer mikroorganizmalarla karşılaştırılması. Tamamen aynı olan amino asitler yıldız işareti ile gösterilmiştir. NADP bağlanma bölgesi ve *S. clavuligerus* ve diğer bakteriyel HSD'lerin konsensus bölgeleri bold karakterlerle gösterilmiştir. Kısaltmalar: S.c., *S. clavuligerus* (AY802988); S.Sp., *Streptomyces* sp. NRRL 5331 (AJ312095); S.co., *S. coelicolor* (NC 004917); B.s., *B. subtilis* (NC 006085); C.g., *C. glutamicum* (NC 003450); P.a., *P. aeruginosa* (AE004792); M.g., *M. glycogenes* (D14071).

Şekil 11. *hom* mutasyonunun *E. coli* (*hom*-) okzotrof mutantında komplementasyonu. A) *E. coli* CGSC 5075 (*hom*-), kontrol. B) pEBH1 ile transform edilmiş *E. coli* CGSC 5075.

Şekil 12. *S. clavuligerus* rekombinant HSD'nın *E. coli*'den saflaştırılması. 1) Markör (Fermentas, #SMO431); 2) IPTG ile indüklenmiş kültürün ham ekstraktı; 3) IPTG ile indüklenmemiş kültürün ham ekstraktı; 4) Saflaştırılmış HSD.

Şekil 13. L-Homoserin substrat olarak kullanılarak çizilen Lineweaver- Burk eğrisi.

Şekil 14. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2 ve 3) pK19 plazmidinin *kan* primerleriyle PCR ürünü.

Şekil 15. 1 ve 2) *Sac*II ile kesilmiş pGEM-T + *kan* 3) Lambda DNA/*Pst*I markör.

Şekil 16. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2 ve 3) *Sac*II ile kesilmiş pEBH1, 4 ve 5) *Sac*II ile kesilmiş pGEMT+ *kan*^r.

Şekil 17. Transformantlardan izole edilen plazmidlerde dirençlilik kasedinin restrüksiyon enzim kesimleriyle teyit edilmesi.1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2) pEBH1+*kan*^r *Sac*II kesimi, 3) pEBH1 *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 4) pEBH1 + *kan*^R nin *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 5) pEBH1 + *kan*^r *Bam*HI kesimi, 6) pEBH1 *Bam*HI kesimi

Şekil 18. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2 ve 3) pIJ486, 4 ve 5) pIJ486 +*hom*+ *kan*^r.

Şekil 19. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2 ve 3) pIJ486'nin *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 4 ve 5) pIJ486 +*hom*+ *kan*^r'nin *Bam*HI ve *Hind*III kesimi.

Şekil 20. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2) *hom* oligonükleotidleri kullanılarak pEBA486 ile PCR, 3) *kan* oligonükleotidleri kullanılarak pEBA486 ile PCR.

Şekil 21. "Double crossover" ile *hom* geninin inaktivasyonunun şematik gösterimi.

Şekil 22. AK39 ve yabancı ırk (WT) *S. clavuligerus*'un methionin ve threonin içeren ve içermeyen minimal besiyerinde üreme görünüşleri.

Şekil 23. *hom* oligonükleotidleri ile yapılan PCR sonuçları 1) pEBA486 (+ kontrol), 2) Yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı ile yapılan PCR, 3 ve 4) *S. clavuligerus* AK39'un kromozomal DNA'sı ile yapılan PCR.

Şekil 24. Şekil 23'de kutularla işaretlenmiş fragmentlerin jelden ekstrakt edildikten sonra yapılan PCR sonuçları; 1 ve 4) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2 ve 3) Şekil 23'deki 2 numaralı fragmentin ekstraksiyondan sonra *hom* primerleri ile amplifikasyonu, 5 ve 6) Şekil 23'deki 3 ve 4 numaralı fragmentlerin ekstraksiyondan sonra *kan* primerleri ile amplifikasyonu.

Şekil 25. *kan* geni kullanılarak yapılan Southern blot analizi; A) Blot yapılan jel fotoğrafı 1) Lambda DNA/*Pst*I markör 2) *Sac*II ile kesilmiş yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı, 3) *Sac*II ile kesilmiş *S. clavuligerus* AK39 kromozomal DNA'sı B) Blot yapılan jelin hibridizasyon sonucu 1) Lambda DNA/*Pst*I markör, 2) *kan* geni kullanılarak hibridize edilen *Sac*II ile kesilmiş yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı, 3) *kan* geni kullanılarak hibridize edilen *Sac*II ile kesilmiş *S. clavuligerus* AK39 kromozomal DNA'sı.

Şekil 26. *hom* geninin prob olarak kullanılmasıyla yapılan Southern blot analizi. 1) Lambda DNA/*Pst*I markör 2) Yabancı ırk kromozomal DNA'sından *hom* primerleri kullanılarak elde edilen 1.3 kb'lık PCR ürünü, *hom* geni ile hibridize edildi. 3) Mutant *S. clavuligerus*

kromozomal DNA'sından *hom* primerleri kullanılarak elde edilen 2.4 kb'lık PCR ürünü, *hom* geni ile hybridize edildi.

Şekil 27. Yabancı ırk ve mutant AK39 hücreleri tarafından CDM besiyerinde ölçülen spesifik sefamisin C üretimi. Açık semboller kuru hücre ağırlığını kapalı semboller ise sefamisin C üretimini göstermektedir. Yabancı ırk *S. clavuligerus* (▲), *hom* geni tahrip edilmiş mutant *S. clavuligerus* AK39 (■).

ÖZET

Streptomyces türleri, proteinleri ve sekonder metabolitleri yüksek kapasitede üretirler. Bu grubun önemli türlerinden biri olan *Streptomyces clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolundan L-lizin, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin gibi 4 temel amino asit ve hücre duvarı oluşumunda öncül bir molekül olan diaminopimelat (DAP) oluşmaktadır. Bu metabolik yoldan sekonder metabolit olarak tıbbi açıdan oldukça değerli bir β -laktam antibiyotiği olan sefamisin C ve güçlü bir β -laktamaz inhibitörü olan klavülanik asit üretilmektedir. Aspartik asit yolunun L-lizin dalındaki karbon akışının, sefamisin C biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğu bilinmektedir ve bu çataldaki öncül metabolitlerin artışı antibiyotik biyosentezini arttırmak için etkili bir stratejidir.

Bu çalışmada *S. clavuligerus*'un aspartat metabolik yolunun L-treonin, L-metiyonin ve L-izolösin sentezinde ilk basamağını kodlayan homoserin dehidrogenaz geni (*hom*) klonlanarak, bir *hom* mutanlığı olan *E. coli* 5075 suşunda heterolog olarak ifade edildi. Protein histidin-tag stratejisi kullanılarak saflaştırıldı ve saf enzimin temel kinetik ve regülasyon özellikleri belirlendi. Klonlanan *hom* geninin içerisine kanamisin dirençlilik kaseti yerleştirilerek gen bloke edildi ve inaktive edilen gen bir *Streptomyces* plazmidi olan pIJ486 üzerinde *S. clavuligerus* hücrelerine aktarıldı. Kromozomal *hom* geni ve plazmid üzerindeki bloke edilmiş *hom* geni arasındaki homolog rekombinasyon sonucu oluşan *hom* okzotrof bir suş (AK39) seçilerek *hom* geni blokasyonunun sefamisin C üretimine etkisi incelendi. *hom* geninin inaktivasyonu sonucunda, kimyasal olarak tanımlanmış (CDM) besiyerinde sefamisin C spesifik üretiminde 2 kat artış tespit edildi. Elde edilen mutantın oldukça stabil olması ve CDM gibi düşük ekonomik maliyetli bir besiyerinde 2 kat fazla sefamisin C üretmesi, AK39'un bu antibiyotiğin endüstriyel üretimi için kullanılabilmesi sonucunu doğurmaktadır. Daha fazla üretim için besiyeri optimizasyonu çalışmalarımız devam etmektedir.

ÖZET

Streptomyces türleri, proteinleri ve sekonder metabolitleri yüksek kapasitede üretirler. Bu grubun önemli türlerinden biri olan *Streptomyces clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolundan L-lizin, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin gibi 4 temel amino asit ve hücre duvarı oluşumunda öncül bir molekül olan diaminopimelat (DAP) oluşmaktadır. Bu metabolik yoldan sekonder metabolit olarak tıbbi açıdan oldukça değerli bir β -laktam antibiyotiği olan sefamisin C ve güçlü bir β -laktamaz inhibitörü olan klavülanik asit üretilmektedir. Aspartik asit yolunun L-lizin dalındaki karbon akışının, sefamisin C biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğu bilinmektedir ve bu çataldaki öncül metabolitlerin artışı antibiyotik biyosentezini arttırmak için etkili bir stratejidir.

Bu çalışmada *S. clavuligerus*'un aspartat metabolik yolunun L-treonin, L-metiyonin ve L-izolösin sentezinde ilk basamağını kodlayan homoserin dehidrogenaz geni (*hom*) klonlanarak, bir *hom* mutanı olan *E. coli* 5075 suşunda heterolog olarak ifade edildi. Protein histidin-tag stratejisi kullanılarak saflaştırıldı ve saf enzimin temel kinetik ve regülasyon özellikleri belirlendi. Klonlanan *hom* geninin içerisine kanamisin dirençlilik kaseti yerleştirilerek gen bloke edildi ve inaktive edilen gen bir *Streptomyces* plazmid olan pIJ486 üzerinde *S. clavuligerus* hücrelerine aktarıldı. Kromozomal *hom* geni ve plazmid üzerindeki bloke edilmiş *hom* geni arasındaki homolog rekombinasyon sonucu oluşan *hom* okzotrof bir suş (AK39) seçilerek *hom* geni blokasyonunun sefamisin C üretimine etkisi incelendi. *hom* geninin inaktivasyonu sonucunda, kimyasal olarak tanımlanmış (CDM) besiyerinde sefamisin C spesifik üretiminde 2 kat artış tespit edildi. Elde edilen mutantın oldukça stabil olması ve CDM gibi düşük ekonomik maliyetli bir besiyerinde 2 kat fazla sefamisin C üretmesi, AK39'un bu antibiyotiğin endüstriyel üretimi için kullanılabileceği sonucunu doğurmaktadır. Daha fazla üretim için besiyeri optimizasyonu çalışmalarımız devam etmektedir.

ABSTRACT

The members of the genus *Streptomyces* are well-known microorganisms for their capacity to synthesize a vast repertoire of secondary metabolites, including many useful antibiotics and proteins. *Streptomyces clavuligerus* is the producer of the medically important β -lactam antibiotics, including cephamycin C and the potent β -lactamase inhibitor clavulanic acid. The aspartate pathway of *S. clavuligerus* is an important primary metabolic pathway which provide substrates for the antibiotic-specific synthetases. This pathway uses L-aspartic acid as the precursor for the biosynthesis of the amino acids L-lysine, L-methionine, L-isoleucine, L-threonine and several important metabolic intermediates including diaminopimelic acid, a key component required for cross-linking in bacterial cell-wall biosynthesis. The carbon flow through the lysine-specific branch of aspartate pathway is a rate limiting step for the formation of cephamycin C. The studies conducted so far have that increasing precursor flux is an effective strategy for enhancing biosynthesis of β -lactam antibiotics.

In this study, we cloned the homoserine dehydrogenase gene (*hom*) which encodes for the first enzymatic step of the other branch of the pathway leading to L-methionine, L-isoleucine, and L-threonine. It is expected that blocking of the cloned *hom* gene will result in an increase the carbon flow toward to the lysine by closing the other branch. The cloned homoserine dehydrogenase was expressed heterologously in the *hom* mutant of *E. coli* 5075, and purified by using histidine-tag strategy. Kinetics and regulation properties of the pure enzyme were determined. The *hom* gene was disrupted via insertion of a kanamycin resistance cassette into this gene which was subsequently transferred to *S. clavuligerus* cells using the *Streptomyces* plasmid vector pIJ486. A *hom* mutant of *S. clavuligerus* (AK39) was formed through integration into the chromosome by double crossing over and the effects of *hom* disruption on cephamycin C yields were investigated. Disruption of *hom* gene resulted in a 2 fold increase in specific cephamycin C production in chemically defined medium (CDM). Since the mutant is quite stable and 2 fold increasing was obtained in cephamycin C yields at CDM medium that is low economic cost, mutant AK39 can be used for antibiotic production for industrial application. In order to elevate the yield of cephamycin C, medium optimization attempts have maintained.

GİRİŞ

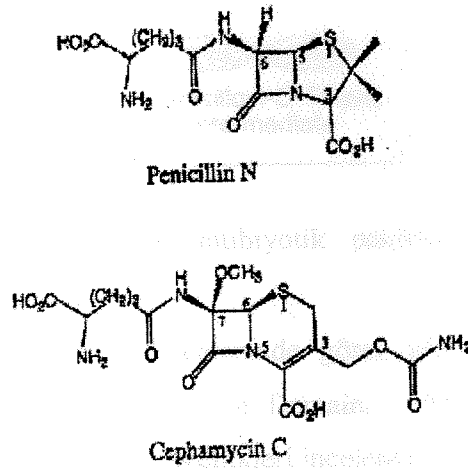
Aktinomisetler yüksek kapasitede protein ve sekonder metabolit üreticisidirler. Endüstrinin ilgisini üzerine çeken sekonder metabolitlerin başlıcaları; antibiyotikler, antiviral ve antikanser ilaçlardır. Bu grubun önemli türlerinden biri olan *Streptomyces clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolu L-lizin, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin gibi 4 temel amino asiti ve hücre duvarı oluşumunda öncül bir molekül olan diaminopimelat (DAP) oluşturmasının yanısıra bu organizmada sekonder metabolizma için substrat sağlayan en önemli primer metabolik yoldur. Bu metabolik yoldan sekonder metabolit olarak tıbbi açıdan oldukça değerli bir β -laktam antibiyotiği olan sefamisin C ve güçlü bir β -laktamaz inhibitörü olan klavülanik asit üretilmektedir. Aspartik asit yolunun lizin dalındaki karbon akışının, sefamisin C biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğu bilinmektedir ve bu çataldaki öncül metabolitlerin artışı antibiyotik biyosentezini de arttırmaktadır. Projemizde, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin sentezinin ilk basamağında yer alan homoserin dehidrogenaz enzimini kodlayan genin klonlanması, ifade edilmesi ve karakterizasyonunun yanısıra genin blokasyonu ile metabolik yolun bu çatalının kapatılması ve karbon akışının lizin çatalına doğru yönlendirilmesi ile sefamisin C biyosentezinin artırılması hedeflenmiştir. Ayrıca aspartik asit metabolik yolunun ilk basamağında bulunan aspartokinaz enzimi L-lizin ve L-treoninin birlikte etkisiyle geri-bildirimli olarak inhibe olmaktadır. Homoserin dehidrogenaz genindeki bu blokasyon hücrede aynı zamanda L-threonin oluşmasını engileyerek aspartokinazın inhibisyonu ortadan kaldırmaktadır.

GENEL BİLGİLER

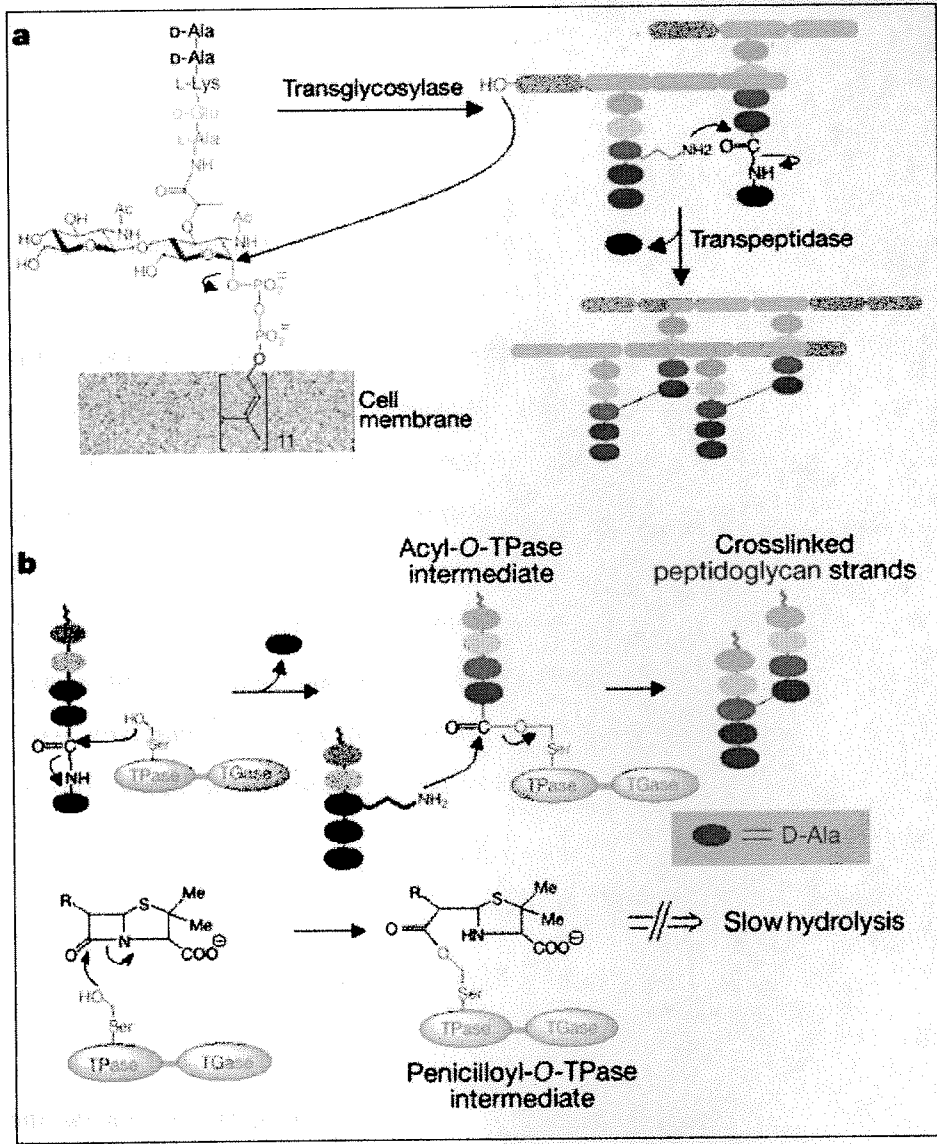
Mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin en iyi bilinen grubu antibiyotiklerdir. 1940'lardan başlayarak, antibiyotiklerin tıp, tarım ve temel araştırmalarda kullanımlarında büyük bir patlama yaşanmıştır. Bunların içinde β -laktam antibiyotikleri hem tarihsel, hem de tıbbi açıdan en önemli antibiyotik sınıfını oluştururlar. Antibiyotik pazarında çok önemli bir yere sahip olan β -laktamlar, antibiyotiklerin 30 milyar dolarlık toplam dünya marketinde 15 milyar dolarlık kısmını oluşturmaktadır (Demain, 2000). Bu grubun en önemli özelliklerinden biri ökaryotik canlılarda bulunmayan peptidoglikan (bakteri duvarı bileşeni) sentez reaksiyonunu engellemeleridir. Bundan dolayı toksisiteleri üst düzey canlılar için çok az olmasına

karşılık patojenik bakterilere karşı oldukça etkilidir. Penisilinler ve sefalosporinler β -laktam grubunun klasik üyeleridir (Glazer ve Nikaido, 1998).

Aktinomisetler; antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler ve immünbaskılayıcı ajanları da içeren çok çeşitli, doğal, biyoaktif ürünlerin zengin kaynaklarıdır. *S. clavuligerus* tıbbi açıdan çok önemli β -laktam antibiyotikleri üretme yeteneğinden dolayı çok iyi bilinen bir aktinomiset türüdür (Paradkar, 2001). *S. clavuligerus* tarafından üretilen en önemli β -laktam bileşikler Şekil 1'de verilmiştir. Sefamisin, sefalosporinlerin yapısından farklı olarak çekirdek yapısının 7- α pozisyonunda bir metoksil grubu taşır (Glazer ve Nikaido, 1998). Metoksil grubunun eklenmesi bu antibiyotiklerin bakteriyel hücre duvarı sentezinde görev alan transpeptidaz enzimi üzerindeki engelleyici etkilerini arttırarak β -laktamaz enzimi tarafından inaktif olma risklerini de azaltır (Şekil 2). Bu özellikler sefamisinleri vazgeçilmez klinik antibiyotikleri sınıfına sokar. Sefamisinlerin tipik örneği olan sefamisin C, sefalosporinlere dirençli olan bir çok bakteriye karşı etkilidir.



Şekil 1. Sefamisin C ve Penisilin N'nin yapıları.

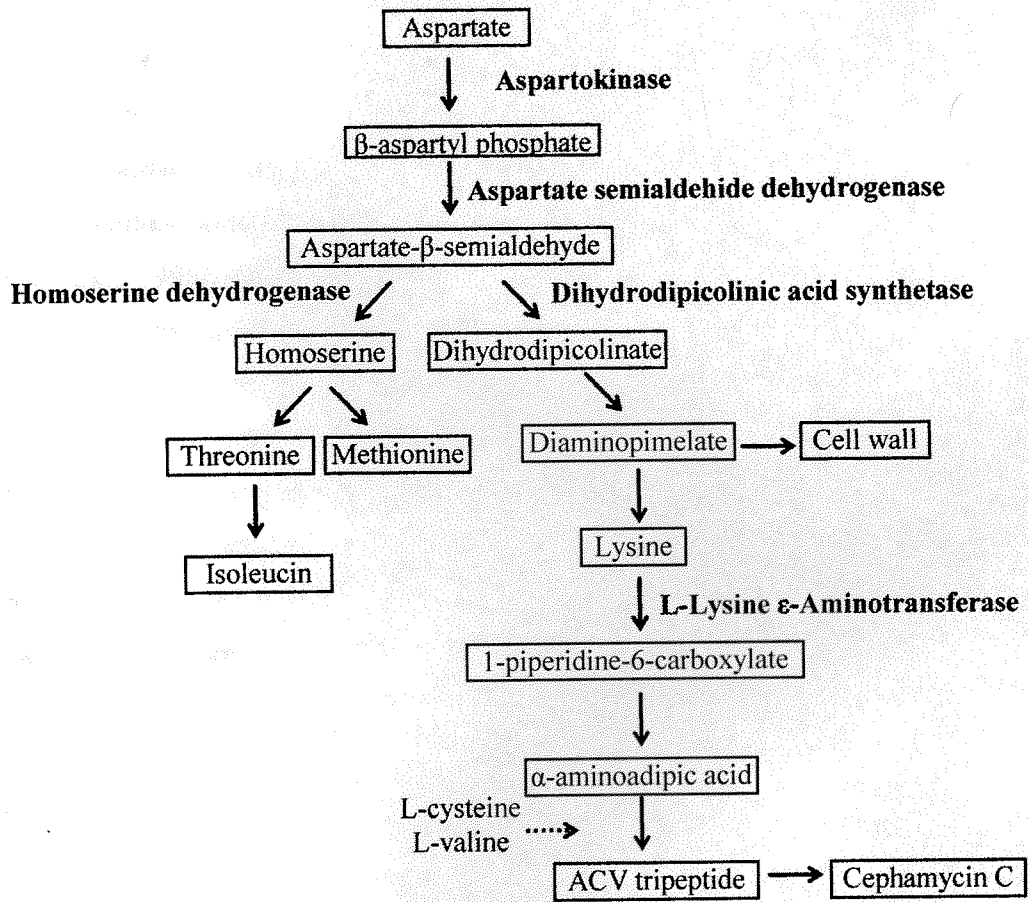


Şekil 2. İlk keşfedilen β -laktam antibiyotik penisilin bakteriyel hücre duvarında transpeptidasyon reaksiyonunu engellemesi.

S. clavuligerus' un β -laktam biyosentezinde görev alan enzimleri kodlayan genleri klonlanmış (Madduri ve ark., 1991; Jensen ve Demain, 1995; La Fuente ve ark., 1997), enzimlerin bir çoğu saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir (Jensen ve Demain, 1995; La Fuente ve ark., 1997; Romero ve ark., 1997). Biyosentetik basamaklarla ilgili bulgular ve metabolik yollardaki enzimlerin kinetik verileri kullanılarak antibiyotik oluşumdaki hız sınırlayıcı basamaklar ve öncül metabolitlerin akışı analiz edilmiştir (Malmberg ve Hu, 1991). Kapsamlı fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar β -laktam antibiyotiklerinin üretiminin kontrolünde, primer metabolitlerin doğrudan rol oynadıklarını göstermiştir (Mendelovitz ve Aharonowitz, 1982). Antibiyotik üretim yolunda görev yapan sentetazlar için substrat sağlayan primer metabolizma ürünleri, antibiyotik biyosentezinin regülasyonu için en önemli hedefler

arasındadır. β -laktam üreticisi *S. clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolu bu hedeflerden bir tanesidir.

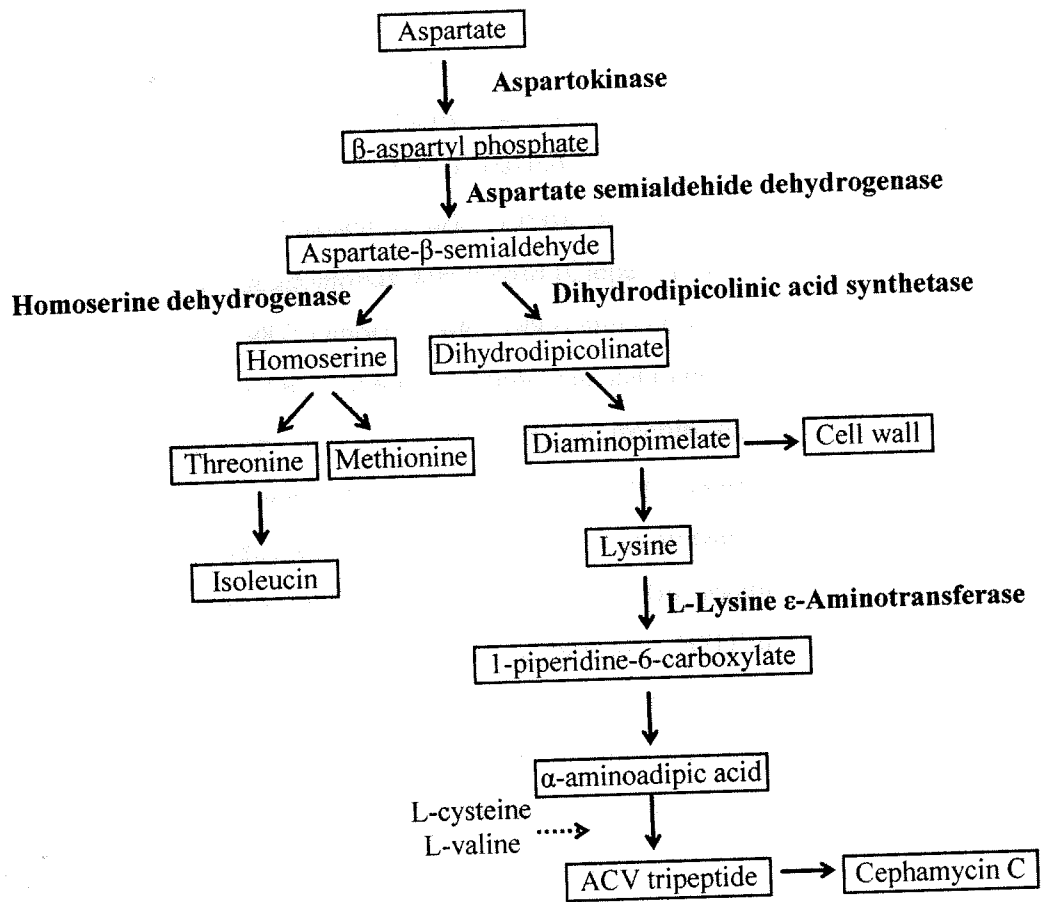
Aspartik asit ailesine dahil amino asitleri bütün bakterilerde benzer biyokimyasal reaksiyonlarla sentezlenir. *S. clavuligerus*'ta da aspartik asit metabolik yolundan L-lizin, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin amino asitleri ve hücre duvarı oluşumunda öncül bir molekül olan DAP oluşmaktadır (Şekil 3). Bu metabolik yol aynı zamanda sefamisin C ve klavülanik asit gibi önemli β -laktam antibiyotiklerinin üretiminde görev yapan sentetazlar için substrat sağlamasından dolayı büyük önem taşımaktadır. Aspartat metabolik yolunda özellikle aspartik asitin homoserine dönüşüm basamakları çok iyi korunmuştur. Ancak, bu yolun regülasyonundaki farklılıklar bazı enzimlerin değişik formlarının oluşmasına sebep olmuştur. Enzim çeşitliliği organizmaya bağlı olarak değişmektedir (Theze ve ark., 1974).



Şekil 3. Aspartat ailesine ait amino asitlerin ve sefamisin C'nin üretildiği aspartat metabolik yolu.

arasındadır. β -laktam üreticisi *S. clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolu bu hedeflerden bir tanesidir.

Aspartik asit ailesine dahil amino asitleri bütün bakterilerde benzer biyokimyasal reaksiyonlarla sentezlenir. *S. clavuligerus*'ta da aspartik asit metabolik yolundan L-lizin, L-metiyonin, L-izolösin ve L-treonin amino asitleri ve hücre duvarı oluşumunda öncül bir molekül olan DAP oluşmaktadır (Şekil 3). Bu metabolik yol aynı zamanda sefamisin C ve klavülanik asit gibi önemli β -laktam antibiyotiklerinin üretiminde görev yapan sentetazlar için substrat sağlamasından dolayı büyük önem taşımaktadır. Aspartat metabolik yolunda özellikle aspartik asitin homoserine dönüşüm basamakları çok iyi korunmuştur. Ancak, bu yolun regülasyonundaki farklılıklar bazı enzimlerin değişik formlarının oluşmasına sebep olmuştur. Enzim çeşitliliği organizmaya bağlı olarak değişmektedir (Theze ve ark., 1974).



Şekil 3. Aspartat ailesine ait amino asitlerin ve sefamisin C'nin üretildiği aspartat metabolik yolu.

Homoserin dehidrogenaz (HSD), aspartate semialdehidi (ASA), NAD(P)H yardımıyla indirgeyerek homoserine dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon, L-lizin, L-metiyonin, L-treonin ve L-izolösin sentezi için öncül metabolit olarak substrat sağlamasından dolayı metabolik yolun kilit bir noktasını oluşturmaktadır. HSD tarafından katalizlenen reaksiyonun regülasyonu, dallanan metabolik yolda substrat akışını kontrol ettiği için hayati önem taşımaktadır. HSD *Escherichia coli* gibi Gram-negatif bakterilerde aspartokinaz ile beraber bifonksiyonel enzim olarak katalitik bir bölgeye sahiptir ve her iki enzimin de allosterik regülasyonu aspartokinaz üzerinden olmaktadır. Bu bakteride, aspartokinaz I-homoserin dehidrogenaz I (ASKI-HSDI) *thrA* ile, aspartokinaz II-homoserine dehidrogenazII (ASKII-HSDII) ise *metLM* ile kodlanmaktadır. ASKI-HSDI aktivitesi L-treonin ile geri-bildirimli (feedback) inhibe olurken, enzimlerin sentezi ise L-treonin ve L-izolösin ile represe edilmektedir. ASKII-HSDII ise L-metiyonin ile represe edilmektedir.

Gram-negatiflerin aksine, Gram-pozitif bakterilerde HSD aspartokinazdan ayrı bir enzimdir ve farklı mekanizmalarla regüle edilmektedir. L-treonin biyosentez genleri bazı mikroorganizmalardan klonlanmıştır. Bunlar arasında *Corynebacterium* türleri (Mateos ve ark., 1987), *Lactobacillus lactis* (Madsen ve ark., 1996), *Bacillus* türleri (Parsot and Cohen, 1988; Malubres ve ark., 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Clepet ve ark., 1992) ve *Enterobacter* türleri (Cohen and Saint-Girons, 1987; Omori ve ark., 1993) mevcuttur.

Aspartat semialdehidten L-treonine dönüşümü katalizleyen 3 enzim HSD (EC 1.1.1.3, *hom*), homoserin kinaz (HK, EC 2.7.1.39, *thrB*) ve treonin sentaz (TS, EC 4.2.99.2, *thrC*) *Corynebacterium glutamicum*'dan klonlanmış, bunların ekspresyonları ve regülasyonları çalışılmıştır (Follettie, 1988). *C. glutamicum*'da L-treonin biyosentezinin temel kontrolü HSD'ın L-treonin ile güçlü feedback inhibisyonu ile olmaktadır. Bu organizmada HSD 1 ile 5 mM L-treonin konsantrasyonlarında tamamen inhibe olmaktadır. HSD'ın treonin ile regülasyonu C-terminalinin yakınında bulunan bir bölge ile kontrol edilmektedir. Bu bölgenin mutasyona uğratılması sonucu regülasyonu ortadan kaldırılmış mutantlar elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* HSD'ı *C. glutamicum* ile yüksek oranda homoloji göstermektedir. Bu enzimlerin amino asit sekansları ile yapılan çalışmalarda, C-terminal domainlerinde içerdikleri yaklaşık 100 amino asitlik bölgenin *E. coli* HSD enziminde bulunmadığı gösterilmiştir. Çalışmalar sonucunda bu bölgenin L-treonin tarafından enzimin allosterik regülasyonun sağlandığı bölge olduğu ortaya çıkarılmıştır (Viola, 2001).

Brevibacterium lactofermantum (Mateos ve ark., 1987b) ve *C. glutamicum* (Peoples ve ark., 1988) genomlarında *hom* ve *thrB* genleri aynı operonda bulunmasına rağmen *thrC* kromozomda başka bir yerde lokalize olmuştur. *Bacillus* türlerinde ise *hom-thrC-thrB* beraber bir küme oluşturmaktadır (Malubres ve ark., 1995). *B. lactofermantum* *hom* geni de *B. subtilis*' te olduğu gibi sadece homoserin dehidrogenaz enzimini şifrelemekte ve aspartokinaz aktivitesi bulunmamaktadır. *Brevibacterium flavum* ve *B. lactofermantum* HSD'larının L-metiyonin ile represe, L-treonin ile inhibe olduğu ve HSD aktivitesi azaltılmış mutantların daha fazla lizin ürettiği bulunmuştur. *Corynebacterium* ve *Brevibacterium* türlerinde; ortamda herhangi bir inhibitor olmadığı durumlarda, homoserin dehidrogenazın spesifik aktivitesinin dihidrodipikolinattan oldukça fazla olmasından dolayı, karbon akışı aspartat semi aldehidten treonin-metiyonin çatalına doğru olmaktadır. Treonin ve metiyonin konsantrasyonundaki artış, HSD'ın metiyonin ile represyonuna treonin ile inhibisyonuna neden olmaktadır (Malubres and Martin, 1996).

hom-thrC-thrB genleri *P. aeruginosa*'dan da klonlanmış, *hom* ve *thrC* genlerinin bir bisistonik operonda organize olduğu bulunmuştur. HSD aktivitesinin L-treonin ile geri-bildirimli olarak inhibe olduğu tespit edilmiştir (Clepet, 1992).

L-treonin biyosentezinden sorumlu yukarıda bahsedilen 3 gen (*hom-thrB-thrC*) zorunlu metilotrof bir bakteri olan *Methylobacillus flagellatus*'tan klonlanmıştır. *hom* 51 kDa, *thrC* ise 48 kDa büyüklüğündeki proteinleri sentezlemektedir. Yapılan mRNA analizleri sonucunda *hom* ve *thrC* genlerinin beraber transkribe edildiği ve *hom-thrC* arasında fonksiyonel bir promotor bulunmadığı tespit edilmiştir. *thrB* geninin ise diğer iki genden bağımsız transkribe edildiği saptanmıştır (Marchenko, 1999). *hom* ve *thrC* bir başka metillobacillus olan *Methylobacillus glycogenes*'ten de klonlanmıştır. Rekombinant *E. coli* hücrelerinde eksprese edilen HSD'ın önemli bir regülatör enzim olduğu, L-treonin ile olduğu kadar aromatik bir amino asit olan L-fenilalanin ile de inhibe olduğu gösterilmiştir (Motoyama, 1994).

hom, *thrB* ve *thrC* genleri, bir bitki toksini olan aminoetoksivinilglisin (AVG) üreticisi *Streptomyces* sp. NRRL 5331' den klonlanmıştır. Yapılan operon analizlerinde *hom* ve *thrC* genlerinin metillobacillus'larda olduğu gibi bisistonik bir operonda organize olduğu bulunmuştur. *thrB* geni ise monosistonik olarak transkribe olmaktadır (Fernandez, 2002). Bu çalışmada enzimlerin aktivite veya regülasyon özellikleri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır.

Endüstriyel öneme sahip maddelerin üretiminin artırılması için gen blokasyonu oldukça sık kullanılmaktadır. Fernandez-Gonzales'in 1996 yılında *B. lactofermentum* ile yaptıkları bir çalışmada *hom* ve *thrB* genleri bloke edilerek aşırı lizin üreten mutantlar oluşturulmuştur. Glutamat üreticisi *Brevibacterium divarcatum*'da da treonin biyosentez genleri kanamisin dirençlilik geninin bu genlerin içine sokulmasıyla inaktif duruma getirilerek lizin üretimi artan mutantlar elde edilmiştir.

Sefamisin C üreticisi *S. clavuligerus* aspartik asit metabolik yolunun biyokimyası ve fizyolojisi üzerine birkaç çalışma mevcuttur. Mendelovitz ve Aharonowitz (1982) aspartat metabolik yolunun kilit enzimlerinin (aspartokinaz, dihidrodipikolinik asit sentaz ve homoserin dehidrogenaz) son ürün amino asitler ile regülasyonunu çalışmış ve öncül primer metabolitlerin sefamisin C üretimine etkisini incelemişlerdir. L-lizin dalındaki karbon akışının, sefamisin C biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğunu ve bu çataldaki öncül metabolitlerin artışının antibiyotik biyosentezini de arttırdığını tespit etmişlerdir. Homoserin dehidrogenaz geni daha önce antibiyotik üreticisi bir *Streptomyces* türünden klonlanmamış olduğundan enzimin regülasyon mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. Yaklaşımımız, *hom* geninin bloke edilerek karbon akışının L-lizin spesifik dalına kaydırılması ile *S. clavuligerus*'da antibiyotik biyosentezinin artırılmasını hedeflemektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

S. clavuligerus hücrelerinden kromozomal DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için, *S. clavuligerus*, % 0.5 maltoz içeren Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) sıvı besiyerine aşılanarak 30 °C' de 250 rpm' de çalkalamalı olarak 48 saat inkübe edildi. Kromozomal DNA'lar Kieser ve ark.'nın (2000) metoduna göre izole edildi.

Homoserin dehidrogenaz geninin amplifikasyonu için oligonükleotid dizayn edilmesi

hom geninin amplifikasyonunu sağlamak amacıyla GenBank'da şimdiye kadar bulunmuş olan gerek *Streptomyces* cinsine ait gerekse başka bakterilerin *hom* gen sekansları kıyaslandı. Gen dizilerini alignment yapmak için "DNASar" programı kullanıldı. Yapılan alignment sonucunda korunmuş olan bölgelerden oligonükleotidler dizayn edildi. Bu oligonükleotidlerde genin başlangıç ve bitiş kodonlarının olmasına özen gösterildi. Dizayn edilen oligonükleotidler EB1 ve EB2 olarak isimlendirildi.

İleri (EB1): 5'- GGATGATGCTGACGCGTCCGCTG-3'

Gerisi (EB2): 5'- CTTTACTCCCCTTCAACACGCAT-3'

PCR ile hom geninin amplifikasyonu

PCR, Fermentas firmasının tampon çözeltisi ve *Taq* polimerazı kullanılarak yapıldı. Çözeltilerin stok konsantrasyonları parantez içinde verilmiştir.

PCR koşulları;

4 µL dNTP (Herbir deoksinükleotid trifosfat 10 mM stok olarak hazırlandı ve 1' er µL olarak eklendi)

5 µL PCR buffer

6 µl MgCl₂

2.5 µL genomik DNA (1/10 oranında sulandırılmış)

0.5 µL ileri oligonükleotid (100 pmol)

0.5 µL geri oligonükleotid (100 pmol)

2 µL DMSO (Sigma)

1 µL *Taq* DNA polimeraz

Steril distile su ile 50 µL hacime tamamlandı.

Amplifikasyon koşulları;

95 °C 10' (başlangıç denatürasyonu)

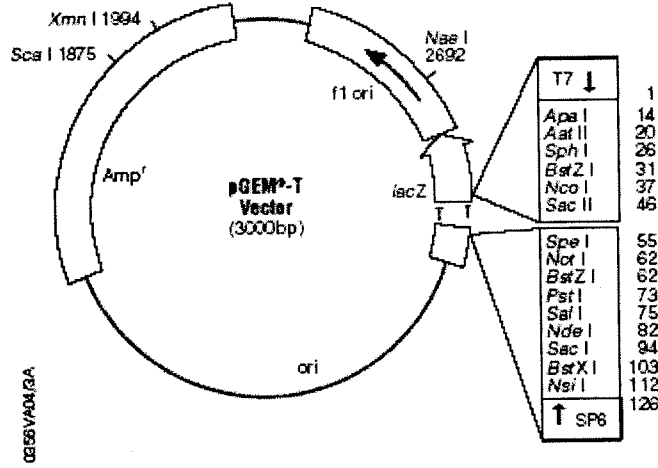
95 °C 1'

63 °C 1'

72 °C 2' olarak 30 döngü uygulandı.

hom geninin T vektörüne klonlanması

Agaroz jelden kesilen ve ekstrakt edilen 1.3 kb'lık fragment pGEM-T (Şekil 4) (Promega) vektörüne klonlandı.



Şekil 4. pGEM-T vektörü.

Ligasyon koşulları;

5 µL 2x T4 tamponu

1 µL pGEM-T vektör

3 µL PCR ürünü (jelden ekstrakt edilmiş, 100 ng/µL)

1 µL T4 ligaz enziminin eklenmesiyle 1 gece +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde daha önce hazırlanmış olan *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapıldı. Transformantlar X-gal, IPTG ve 100 µg/ml ampisilin içeren LB (Luria Broth) agarlara yayılarak 1 gece 37 °C’de inkübe edildi. Ertesi gün mavi-beyaz koloni seleksiyonu yapılarak β-galaktosidaz geni *hom* geni aktarılarak bozulmuş olan beyaz koloniler seçildi. Bunlar sıvı LB kültürlerine aşılandı, 1 gece inkübasyondan sonra Qiagen mini plazmid izolasyon kiti ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler pGEM-T vektörünün klonlama bölgesinden seçilen bir çift restriksiyon enzimi ile ikili kesim yapılarak (*SacII* ve *PstI*) agaroz jelde incelendi (Şekil 3).

hom geni içerdiği düşünülen pGEM-T vektörü pEB1’in, PCR amplifikasyonunda kullanılan oligonükleotidler kullanılarak DNA sekansı İONTEK A.Ş.’ne (İSTANBUL) yaptırıldı. Baştan ve sondan dizayn edilen primerler 1.3 kb uzunluğundaki fragmenti sekanslamaya yeterli gelmediği için, genin orta bölgesinden bir primer daha dizayn edildi.

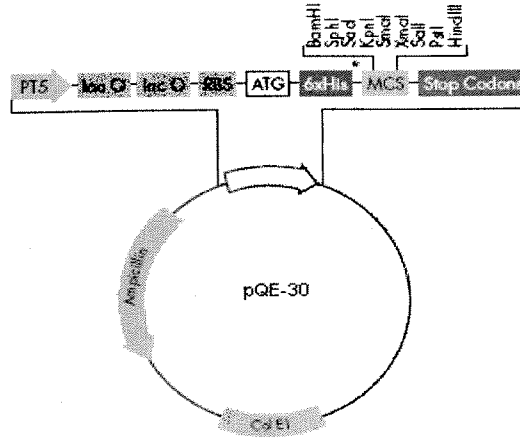
Homwalk 1: 5’- ACTCTACTTCGAGGCCGC -3’

Homwalk primeri ile de 3. sekans yaptırılarak genin sekansı bütünüyle saptandı. www.ncbi.nlm.nih.gov adresinden “BLAST SEARCH” yapılarak DNA sekansı yapılan genin *hom* geni olduğu teyit edildi ve şimdiye kadar bulunan *hom* genleriyle benzerlik oranı tespit edildi. Klonladığımız

hom geninin sekansına AY802988 GenBank giriş numarasıyla yukarıdaki internet adresinden erişilebilir.

***hom* geninin ekspresyon vektörüne klonlanması**

hom genini ekspres etmek için ticari olarak elde edilen pQE-30 (Şekil 5) (Qiagen) ekspresyon vektörü kullanıldı.



Şekil 5. pQE- 30 vektörü.

Bu vektörün çoklu klonlama bölgesindeki *Bam*HI ve *Hind*III arasında klonlama yapmak için *hom* geni pGEM-T vektöründen PCR ile çoğaltıldı. pGEM-T vektöründe pQE- 30 vektörüne klonlama yapmak için uygun restrüksiyon enzimleri olmadığından *hom* geni PCR ile çoğaltıldı. PCR’da kullanılan oligonükleotidler, genin başına *Bam*HI sonuna da *Hind*III restrüksiyon enzimleri olacak şekilde dizayn edildi. Oligonükleotidler;

İleri (EB1-B): 5’- AGGATCCGATGATGCTGACGCGTCCG-3’

*Bam*HI

Geri (EB2-H): 5’- TAAGCTTTTACTCCCCTTCAACACG-3’

*Hind*III (AAGCTT)

Amplifikasyonda ProofStart DNA polimerase kiti kullanıldı (Qiagene)

PCR koşulları;

1.5 µL dNTP mix (final konsantrasyon 300 µM)

5 µL PCR buffer

10 µL Q-Solution

3 µl MgCl₂

2 µL plazmid (pGEM-T vektör+*hom* geni) (final konsantrasyon 100 ng)

1 µL forward oligonükleotid (final konsantrasyon 100 pmol)

1 µL reverse oligonükleotid (final konsantrasyon 100 pmol)

1 µL *Taq* DNA polimeraz

Steril distile su ile 50 µL hacime tamamlandı.

Amplifikasyon koşulları:

95 °C 5' (başlangıç denatürasyonu)

95 °C 1'

63 °C 1'

72 °C 2' olarak 30 döngü uygulandı.

Yukarıdaki reaksiyon koşullarında yapılan amplifikasyon sonucunda elde edilen *hom* geni PCR ile amplifiye edildikten sonra pGEM-T'ye tekrar klonlandı. *Taq* polimeraz enzimi 3' uçlarında poli A bıraktığı için öncelikle bir T vektöre klonlamak gerekmektedir.

Ligasyon koşulları:

5 µL 2x T4 tamponu

1 µL pGEM-T vektör

3 µL PCR ürünü (jelden ekstrakt edilmiş, 100 ng/µL)

1 µL T4 ligaz enziminin eklenmesiyle 2 saat +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon bitiminde daha önce hazırlanmış olan *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapıldı. Kompetent hücreler Manatis ve ark. (2)' na göre hazırlanıp transform edildi. Transformantlar X-gal, IPTG ve 100 µg/ml ampisilin içeren LB (Luria Broth) agarlara yayılarak 1 gece 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün mavi-beyaz koloni seleksiyonu yapılarak β-galaktosidaz geni *hom* geni aktarılarak bozulmuş olan beyaz koloniler seçildi. Bunlar sıvı LB kültürlerine aşılandı, 1 gece inkübasyondan sonra Qiagen mini plazmid izolasyon kiti ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler oligonükleotidlere eklenmiş olan *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimi ile ikili kesim yapılarak pGEM-T vektöründen çıkarıldı. Aynı ikili enzimlerle pQE-30 vektörü de kesilerek jelden ekstraksiyon yapıldı (Şekil 2). Her iki fragment agaroz jelden ekstrakt edilerek ligasyon yapıldı.

Ligasyon koşulları:

400 ng *hom* gen fragmenti

100 ng lineer vektör,

2 µL tampon (NEB)

1 µL DNA ligaz (NEB) eklenerek su ile 10 µL hacime tamamlandı. Bir gece +4 derecede inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hazırlanan kompetent *E. coli* 5075 mutantlarına transforme edildi. Transformantlar

mavi-beyaz seleksiyon yöntemine göre ampisilinli ortamda seçildi. Seçilen transformantlardan plazmid izolasyonları (Qiagen) yapılarak plazmidler *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek klonlama doğrulandı. Rekombinant plazmid pEBH1 olarak isimlendirildi.

***hom* geninin *E.coli* 5075 mutant hücrelerinde heterolog ekspresyonu**

hom genini taşıyan pEBH1 plazmidini *E. coli* 5075 (*hom*-) transform edildikten sonra rekombinant hücrelerin komplementasyonu 100 µg/mL ampisilin içeren M9 minimal besiyerinde (Sambrook, 1989) yapıldı.

pQE-30 plazmidine klonladığımız *hom* geni Şekil 1 de pQE-30 vektöründe de görüleceği üzere N-terminalinde 6 tane histidin amino asidi ile ekspres olmaktadır. Bu da bir sonraki aşama olan homoserin dehidrogenaz enziminin Ni-agaroz kolonları kullanılarak saflaştırılması için gereklidir. Saflaştırmada kullanılacak ekspresyon kültürleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

- 1) 100 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL kanamisin içeren 10 mL Luria Broth (LB) besiyerine 50 mL erlenmayer içerisinde inokülasyon yapıldı ve 37 °C’de bir gece üretildi.
- 2) Ertesi gün, yukarıdaki antibiyotikleri içeren 100 mL’lik önceden ısıtılmış LB besiyerine bir gecelik kültürden 5 mL inoküle edildi. OD₆₀₀ de 0.6 olana kadar çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi (yaklaşık 45-60 dakika)
- 3) *hom* genini indüklemek için ortama son konsantrasyonu 1 mM olaak şekilde IPTG eklendi.
- 4) Kültür 5 saat daha inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon sonucunda hücreler 4000 x g’ de 20 dakika santrifüjlendi.
- 6) Hücre peleti -20°C’ de bir gece bekletildi.

Homoserin dehidrogenaz enzim aktivite testi

5 mM EDTA içeren 500 mM Tris-HCl, pH 8.4 tamponundan 0.2 mL; 0.1 mL 100 mM L-homoserin, pH 7.0; 0.1 mL 4 mM NADP solusyonu ve 0.5 mL su eklendi. Karıştırıldıktan sonra 0.1 mL of enzim eklenerek spektrofotometrede 340 nm’deki artış ölçüldü. HSD’ nin spesifik aktivitesi bir dakikada bir mg proteinden oluşan mikromol NADPH olarak ifade edildi. Protein miktarı Bradford (1976) yöntemi ile belirlendi.

Homoserin dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

Homoserin dehidrogenaz enziminin N-terminalinde 6xHis ile ekspres olması proteinin Ni-NTA (Nikel-Nitriloasetik asit) matriksine olan affinitesini oldukça arttırmaktadır. 6xHis eklentisi saflaştırılan proteinin yapısını veya fonksiyonunu değiştirmedeği için yaygın olarak kullanılmaktadır. NTA, Ni iyonlarının koordinasyon küresinde bulunan altı bağlanma bölgesinin dördüne bağlanır, kalan iki bölgeye

de 6xHis bağlanmaktadır. Ni-NTA agaroz Ni-NTA'nın Sepharose CL-6B'ye bağlanmasıyla oluşmuştur. Böylelikle matrikse bağlanmış olan histidin eklentili protein imidazol konsantrasyonları artırılarak kolondan indirilir.

Natif koşullarda pürifikasyonda izlenen metodoloji aşağıdaki gibidir.

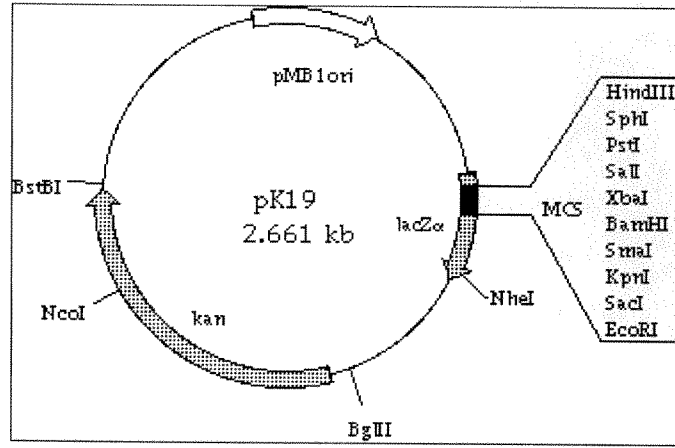
- 1) 1 gece -20 °C'de bekletilen hücre peletleri 15 dakika buzda bekletildikten sonra sonikasyon tamponunda çözüldü (Sonikasyon tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole; NaOH kullanılarak pH 8.0'a ayarlandı).
- 2) 1 mg/mL olacak şekilde lizozim eklendi ve 30 dakika buzda inkübe edildi.
- 3) Buz içerisinde 30 saniye aralıklarla 2 dakika sonike edildi.
- 4) 15.000 x g'de 30 dakika +4 °C'de santrifüjendi.
- 5) Supernatantın 4 mL'si %50 Ni-NTA karışımının 1 mL'sine eklendi. 200 rpm de +4 °C'de çalkalalamalı inkübatörde 60 dakika inkübe edildi.
- 6) Hazırlanan karışım kolona yüklenerek, kolon iki kez 4'er mL yıkama tamponuyla yıkandı. (Yıkama tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole; NaOH kullanılarak pH 8.0'a ayarlandı).
- 7) Proteinler elüsyon tamponu ile indirildi (Elüsyon tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole; NaOH kullanılarak pH 8.0'a ayarlandı).

Kanamisin Dirençlilik Kasetinin Oluşturulması

Şekil 6'da haritası görülen PK19 *E. coli* plazmid vektöründe bulunan kanamisin dirençlilik geni (*kan*), başına ve sonuna *SacII* restriksiyon bölgeleri eklenerek PCR ile çoğaltıldı. Bunun için ilk olarak, GeneBank veritabanından PK19 *kan* geninin sekansı temin edildi. Bu sekansa göre ileri (*kanF*) ve geri (*kanR*) primerler dizayn edildi. Daha önce klonlanmış ve sekanslanmış olan 1.3 kb büyüklüğündeki homoserin dehidrogenaz (*hom*) genini (accession number: AY802988) sadece 404. nükleotidinden kesen *SacII* restriksiyon enziminin, kanamisin direnç kasetini *hom* geninin içerisine yerleştirmek için en uygun enzim olduğuna karar verildi. Bu nedenle *kan* için dizayn edilmiş primerlerin 5' ucuna *SacII* restriksiyon bölgeleri (ccgctg) eklendi.

KanF 5'-GCCGCGGGAACACGTAGAAAGCCAGT-3'

KanR 5'-CCC GCGGTCAGAAGA AACTCGTCAAGA-3'



Şekil 6. *E. coli* PK19 vektörü.

KanF ve KanR primerleri ile 1.1 kb büyüklüğündeki *kan* geni aşağıdaki koşullarda çoğaltıldı.

PCR koşulları;

2 µL 10 mM dNTP mix

5 µL PCR buffer

2 µL DMSO

6 µl MgCl₂

3 µL plazmid (pK19) (final konsantrasyon 100 ng)

1 µL KanF oligonükleotid (final konsantrasyon 50 pmol)

1 µL KanR oligonükleotid (final konsantrasyon 50 pmol)

1 Ünite *Taq* DNA polimeraz

Steril distile su ile 50 µL hacime tamamlandı.

Amplifikasyon koşulları;

95 °C 5' (başlangıç denatürasyonu)

95 °C 1'

63 °C 1'

72 °C 1' olarak 30 döngü uygulandı.

Elde edilen *kan* geni jelden ekstrakte edildikten sonra pGEM-T'ye klonlandı.

Ligasyon koşulları;

5 µL 2x T4 tamponu

1 µL pGEM-T vektör

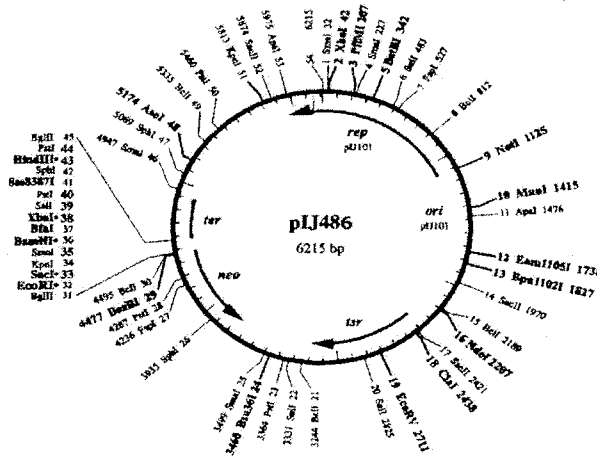
3 µL PCR ürünü (jelden ekstrakt edilmiş, 100 ng/µL)

1 µL T4 ligaz enziminin eklenmesiyle 2 saat +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde daha önce hazırlanmış olan *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapıldı. Kompetent hücreler Sambrook ve ark.'na (1989) göre hazırlanıp transform edildi. Transformantlar 100 µg/ml ampisilin ve 25 µg/ml kanamisin içeren LB (Luria Broth) agarlara yayılarak 1 gece 37 °C'de inkübe edildi.

Antibiyotik Dirençlilik Kasedinin *Streptomyces* Vektörüne Klonlanması

Streptomyces hücreleri ile yapılan bütün deneyler (DNA izolasyonu, ligasyon ve transformasyon gibi) Kieser ve ark.'nın (2000) tanımladıkları standart metodlara göre yapıldı. pEBA2 plazmidinden *Bam*HI ve *Hind*III ile kesilen 2.4 kb uzunluğundaki tahrip edilmiş *hom* geni bir *Streptomyces* vektörü olan pIJ486 (Şekil 7)' ya klonlandı.

Plazmid öncelikle *S. lividans* sonrasında da *S. clavuligerus* hücrelerine transforme edildi. Thiostrepton ve kanamisine dirençli koloniler seçildi. Plazmidler saflaştırılıp rekombinant oldukları PCR ve restriksiyon enzim kesimleriyle doğrulandı. Daha sonrabu hücreler thiostrepton içermeyen sporulasyon agarlarda 4 kuşak sporlandırıldı. Thiostreptona duyarlı ve kanamisine dirençli hücreler homolog rekombinasyonun gerçekleştiği pütatif mutantlar olduğu için bunlarda mutasyonu doğrulayacak testler yapıldı. Southern hibridizasyonu için kromozomal DNA'lar izole edilerek farklı restriksiyon enzimleri ile kesildi.



Şekil 7. pIJ486 plazmidi.

Southern blot hibridizasyonu

Southern blotting Sambrook ve ark. (1989) yöntemi benimsenerek yapıldı. Farklı restriksiyon enzimleri ile kesilen kromozomal DNA'lar %1 agaroz jelde 25 voltta 21-22 saat yürütüldü. Elektroforezi takiben, jel 45'er dakika sırayla denatürasyon ve nötralizasyon solusyonlarında bekletildi. Daha sonra 20 saat 20 x SSC tamponunda pozitif yüklü naylon membran (Ambion Brightstar™-Plus) kullanılarak blot edildi. Probe DNA, "Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System" (Amersham) kiti kullanılarak işaretlendi. 2 saat boyunca X-ray filmine (Kodak Scientific Imaging Film) maruz bırakıldıktan sonra banyo yapıldı.

S. clavuligerus hücrelerinin üretilmesi ve sefamisin C ölçümü

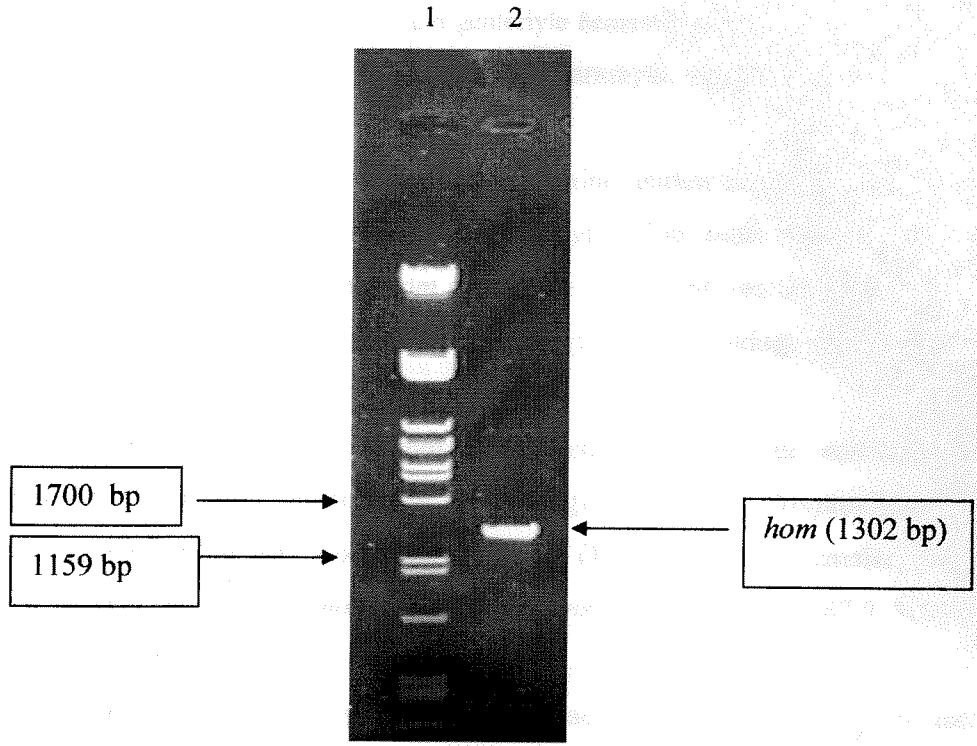
3 mL *S. clavuligerus* misel stoğu 100 mL CDM (chemically defined medium) (Kieser ve ark., 2000) içeren 500 mL'lik triple-baffled erlenmayere inoküle edildi. *hom* mutan *S. clavuligerus*'un üremesi için ortama L-methione and L-threonine'den 50'şer mg/l olacak şekilde eklendi. 28 °C'de 220 rpm'de 24 saat inkübasyon sonucunda optik yoğunluk (OD₅₉₅) 0.2-0.32'ye ulaştıktan sonra, bu kültürden 15 mL olarak 100 mL taze CDM besiyerine ekildi. 220 rpm'de 120 saat inkübe edilerek; optik yoğunluk ölçümü, kuru hücre ağırlığı, HSD enzim aktivite testi ve sefamisin C tespiti için; 24., 48., 60., 72., 96. ve 120. saatlerde örnek alındı.

Hücre büyümesi ve kuru hücre ağırlığı Malmberg ve ark.'nın (1993) metodları benimsenerek yapıldı. Sefamisin C üretimini test etmek için β -laktam antibiyotiklerine duyarlı *E. coli* ESS indikatör olarak kullanıldı. Sefalosporin C standart olarak kullanılarak agar difüzyon yöntemi ile antibiyotik üretimi tespit edildi.

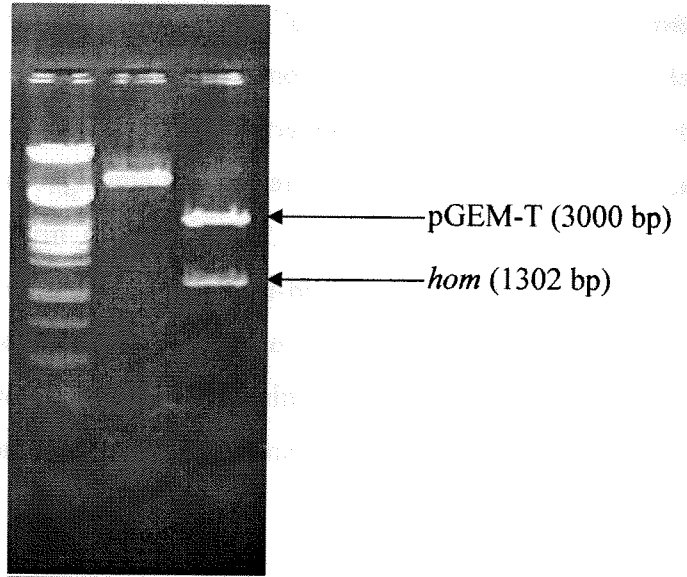
BULGULAR

hom geninin klonlanması ve karakterizasyonu

Yukarıdaki reaksiyon koşullarında yapılan amplifikasyon sonucunda % 0.9'luk agaroz jelde markör ile kıyaslandığında 1.3 kb uzunluğunda bir band elde edildi (Şekil 8). Jelden ekstrakt edilen fragment pGEM-T ye klonlandı (Şekil 9).



Şekil 8. 1) Lambda DNA/PstI markör, 2) PCR ile elde edilen *hom* geni.



Şekil 9. pGEM-T'den kesilerek çıkartılan *hom* geni. 1) Lambda DNA/PstI markör, 2) *PstI* ile linearize edilmiş pEB1, 3) *SacII* ve *PstI* ile kesilmiş pEB1.

hom geni içerdiği düşünülen pGEM-T vektörü pEB1'in, PCR amplifikasyonunda kullanılan oligonükleotidler kullanılarak DNA sekansı IONTEK A.Ş.'ne (İSTANBUL) yaptırıldı.. www.ncbi.nlm.nih.gov adresinden "BLAST SEARCH" yapılarak, DNA sekansı yapılan genin *hom* geni

olduğu teyit edildi ve şimdiye kadar bulunan *hom* genleriyle benzerlik oranı tespit edildi. Klonladığımız *hom* geninin sekansına AY802988 GenBank giriş numarasıyla yukarıdaki internet adresinden erişilebilir.

Bütünüyle sekansı yaptırılan *hom* geninin 433 amino asitten oluştuğu ve enzimin tahmini molekül ağırlığının (M_r) 44.9 kDa olduğu DNASTar programı ile tespit edildi. Genin amino asit dizilimi ve diğer mikroorganizmalara ait *hom* genleri ile alignment yapılarak homolog bölgeleri belirlendi. *hom* geninin de G+C içeriği diğer *Streptomyces*'larda olduğu gibi oldukça yüksek olduğu bulundu (% 72.1 mol).

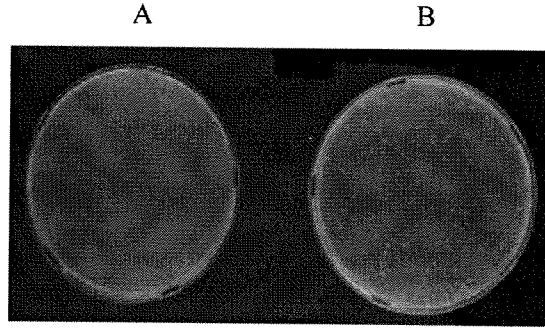
S. clavuligerus *hom* geninin tahmini amino asit sekansı diğer mikroorganizmalarla kıyaslandı (Şekil 10). Bir bitki toksini olan aminoetilglisin üreticisi *Streptomyces* sp. NRRL 5331'in amino asit dizilimi ile %89.8 benzerlik bulundu. Diğer mikroorganizmalar; *S. coelicolor*, *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ve *M. glycogens* ile de sırasıyla %87.9, %54.4, %38.4, %36.6 ve %31.1 benzerlik tespit edildi.

Karşılaştırılan amino asit sekansları arasında birkaç tane iyi korunmuş amino asit dizilimi tespit edildi. Bunlardan 13. ve 18. pozisyonadaki G-X-G-X-X-G motifi homoserin dehidrogenaz enzimlerinin NAD(P) bağlanma bölgesidir. Diğer HSD'ler gibi NAD(P) enzimin kofaktörü olarak bu bölgeye bağlanmaktadır. HSD enzimleri arasında en korunmuş bölge 199. ile 228. pozisyonlar arasında bulunmaktadır. Bu sekans motifi içerisinde 29 amino asitten 21'i birbiriyle aynı olup, bu motifin enzimin substrat bağlanma yada katalitik bölgesi olduğu düşünülmektedir. Birçok mikroorganizmaya ait HSD'lerin (*B. subtilis*, *C. glutamicum*, *M. flagellatum* ve *M. glycogens*), C-terminallerinde enzimin L-threonin ile geri-bildirimli (feedback) inhibisyonunda rol alan bölgelerin olduğu bilinmektedir. *S. clavuligerus* HSD enziminin de C-terminalinin diğerleriyle homoloji gösteren bölgeler içermesi bu enzimin de C-terminalindeki korunmuş bazı motifler ile feedback olarak regüle olabileceğini düşündürmektedir.

Şekil 10. *S. clavuligerus* HSD'nın amino asit diziliminin diğer mikroorganizmalarla alignmenti. Tamamen aynı olan amino asitler yıldız işareti ile gösterilmiştir. NADP-bağlanma bölgesi ve *S. clavuligerus* ve diğer bakteriyel HSD'lerin konsensus bölgeleri bold karakterlerle gösterilmiştir. Kısaltmalar: S.c., *S. clavuligerus* (AY802988); S.Sp., *Streptomyces* sp. NRRL 5331 (AJ312095); S.co., *S. coelicolor* (NC 004917); B.s., *B. subtilis* (NC 006085); C.g., *C. glutamicum* (NC 003450); P.a., *P. aeruginosa* (AE004792); M.g., *M. glycogenes* (D14071).

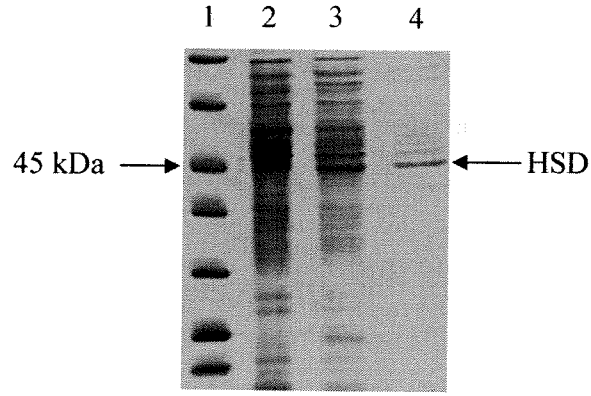
hom geninin ekspresyonu

pQE-30 ekspresyon vektörüne klonlanan *hom* geni *E. coli* 5075 (*hom*-) hücrelerine transforme edildi. Seçilen transformantlardan plazmid izolasyonları (Qiagen) yapılarak plazmidler *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek klonlama doğrulandı. Rekombinant plazmid pEBH1 olarak isimlendirildi. *hom* genini taşıyan pEBH1 plazmidini *E. coli* 5075 (*hom*-) transform edildikten sonra rekombinant hücrelerin komplementasyonu 100 µg/mL ampisilin içeren M9 minimal besiyerinde yapıldı. İçinde plazmid olmayan mutant hücreler L-threonine ve L-metiyonin içeren M9 minimal besiyerinde üreyip, bu amino asitlerin yokluğuna üreyemediler. pEBH1 plazmidini ile transform olan hücreler her iki amino asit yokluğunda üreyip mutantların prototrofik özelliklerini geri kazandırmışlardır (Şekil 11).



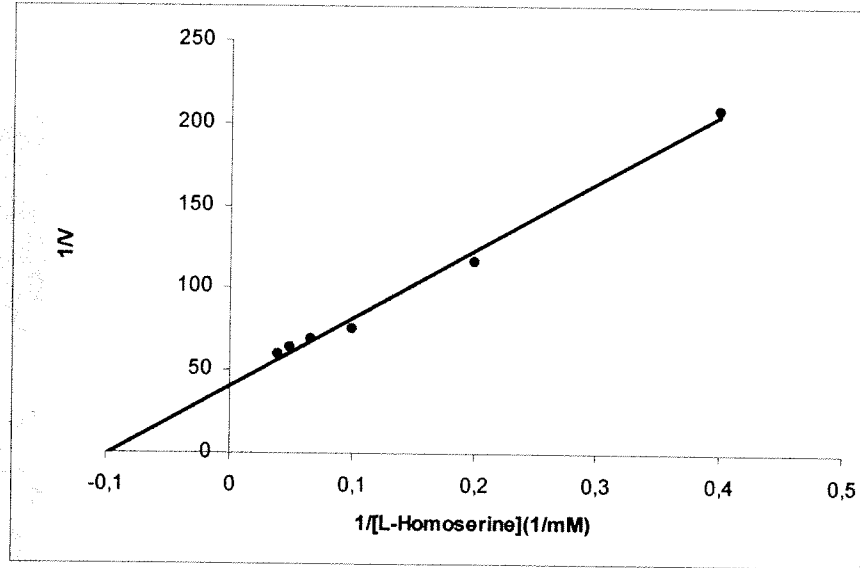
Şekil 11. *hom* mutasyonunun *E. coli* (*hom*-) okzotrof mutantında komplementasyonu. A) *E. coli* CGSC 5075 (*hom*-), kontrol. B) pEBH1 ile transform edilmiş *E. coli* CGSC 5075.

Mutant *E. coli* 5075 herhangi bir HSD aktivitesi göstermezken *hom* ile komplemente olan *E. coli* hücrelerinde kayda değer bir aktivite gözlemlendi. Homoserin dehidrogenaz enzimi histidine-tag stratejisi ile natif koşullarda saflaştırıldı. Denature saflaştırmada ürün daha fazla olmasına rağmen HSD çok hassas bir enzim olduğu, kolaylıkla aktivitesini kaybedebildiği ve saflaştırma sonrasında kolayca renatüre olmadığı için natif koşullar tercih edildi. Yüksek imidazole konsantrasyonlarında elüsyonu yapılan HSD, SDS-PAGE (Laemmli, 1970)'de incelendi. Buna göre amino asit sekansından da tahmin edildiği üzere HSD'ın 45 kDa ağırlığında olduğu tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 12. *S. clavuligerus* rekombinant HSD'ın *E. coli*'den saflaştırılması. 1) Markör (Fermentas, #SMO431); 2) IPTG ile indüklenmiş kültürün ham ekstraktı; 3) IPTG ile indüklenmemiş kültürün ham ekstraktı; 4) Saflaştırılmış HSD.

Elüsyon için 250 mM'ın üzerindeki imidazol konsantrasyonları kullanıldığında enzim tek bant olarak da elde edilmesine rağmen, aktivitesi çalışılmayacak kadar düşük olduğu için yukarıdaki resimde görünen 250 mM ile indirilmiş enzim kullanıldı. Saflaştırılan HSD'in spesifik aktivitesinin ham ekstraktlardakinden 70 kat daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 1). Saflaştırılan enzimin K_m değeri L-homoserine için 10.2 mM, V_{max} ise $0.024 \mu\text{mol min}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 13. L-Homoserin substrat olarak kullanılarak çizilen Lineweaver- Burk eğrisi.

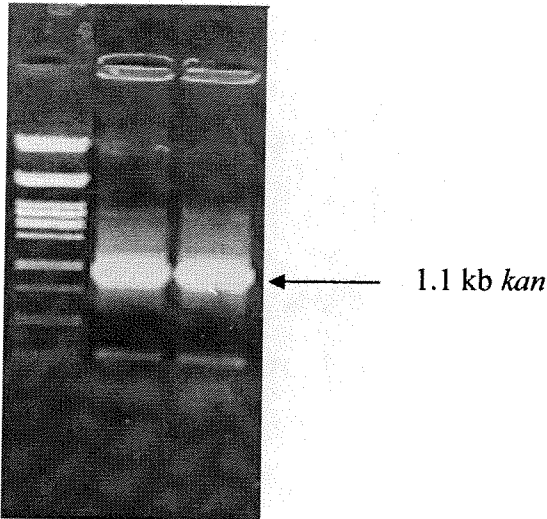
HSD aktivitesi 5 mM L-threonine ile %45 inhibe olurken L-threonine ve L-methionine ile %55 inhibe olmaktadır. Parental HSD'nin aynı amino asitlerle inhibisyonu *S. clavuligerus*' un amonyum sülfat presipitasyonlarında %75 olarak saptandı. Bu regülasyon özelliklerinin daha önce çalışılan mikroorganizmalarla (*M. flagellatum*, *B. subtilis* and *corynebacteria*) benzer olduğu bulundu.

Tablo 1. *S. clavuligerus* rekombinant HSD'nin *E. coli*' den saflaştırılması

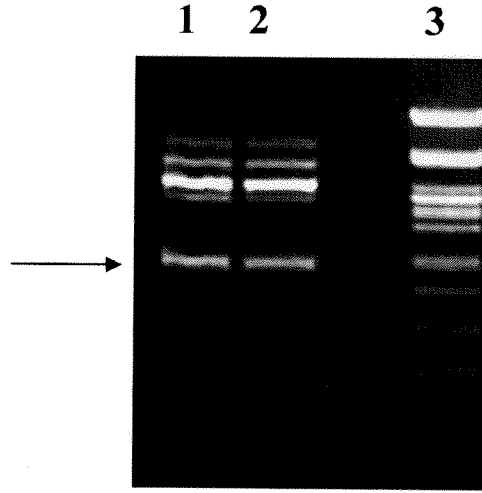
	Total protein (mg)	Total aktivite ($\mu\text{mol of NADPH min}^{-1}$)	Spesifik aktivite (aktivite mg^{-1} protein)	Pürifikasyon katsayısı
Ham ekstrakt	30	0.57	0.019	1.0
Saflaştırılmış rHSD	0.12	0.159	1.33	70

Kanamisin Dirençlilik Kasetinin Oluşturulması

Kanamisin dirençlilik geni (*kan*) PK19 vektöründen ileri ve geri primerlere *SacII* restriksiyon bölgelerinin eklenmesiyle çoğaltıldı (Şekil 14). pGEM-T'ye klonlandıktan sonra da transforme edildiği *E. coli* hücrelerinden saflaştırılarak klonlama teyit edildi (Şekil 15).

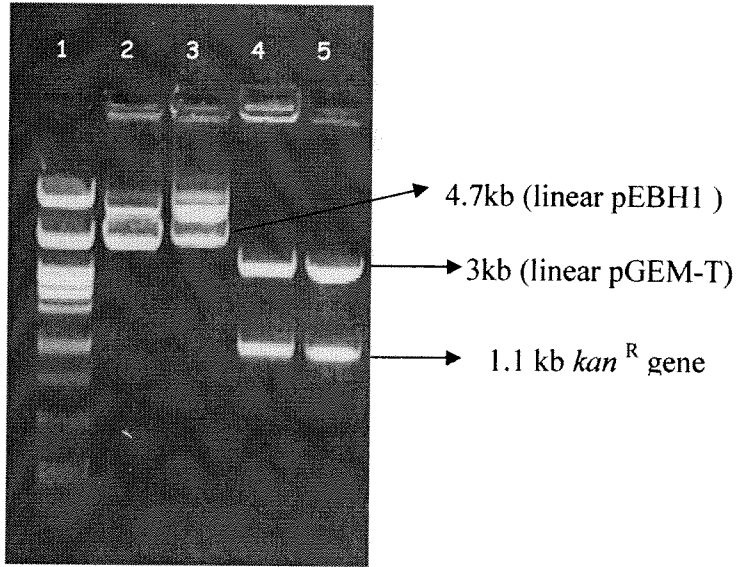


Şekil 14. 1) λ pstI markör, 2 ve 3) :PK19 plazmidinin *kan* primerleriyle PCR ürünü.

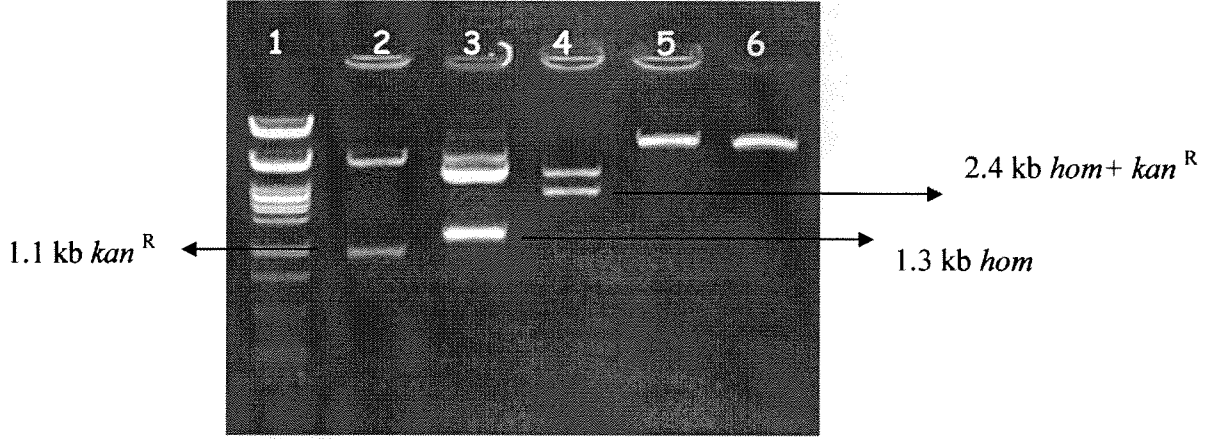


Şekil 15. 1 ve 2) *SacII* ile kesilmiş pGEM-T + *kan* 3) λ *pst*-1 markör,

pEBH1 vektörü de *SacII* ile linearize edilerek (Şekil 16) yukarıdaki gibi elde edilen *kan* geni ile ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünü, *E. coli* DH5-alfa kompetant hücrelerine aktarıldı ve transformantlar, hem ampisiline hem de kanamisine dirençli olmaları ile seçildi. Transformantlardan plazmid izolasyonu yapıldı ve plazmidin rekombinant olduğu restriksiyon analizi ile teyit edildi (Şekil 17).



Şekil 16. 1) λ *PstI* markör, 2 ve 3) *SacII* ile kesilmiş pEBH1, 4 ve 5) *SacII* ile kesilmiş pGEMT+ *kan*^R.



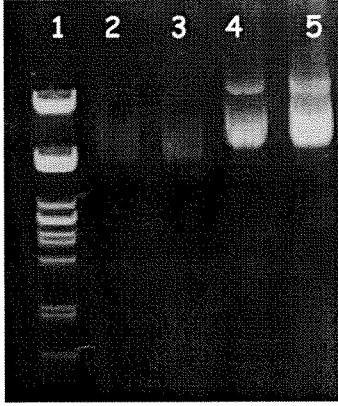
Şekil 17. Transformantlardan izole edilen plazmidlerde dirençlilik kasedinin restriksiyon enzim kesimleriyle teyit edilmesi. 1) λ *Pst*I markör, 2) pEBH1+*kan*^R *Sac*II kesimi, 3) pEBH1 *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 4) pEBH1 + *kan*^R'nin *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 5) pEBH1 + *kan*^R *Bam*HI kesimi, 6) pEBH1 *Bam*HI kesimi.

*Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilen pEBH1 + *kan*^R plazmidinden elde edilen 2.4 kb büyüklüğündeki fragmentin *kan*^R ile bloke edilmiş *hom* geninden oluşan dirençlilik kaseti olduğu tespit edildi. Elde edilen plazmid pEBA2 olarak isimlendirildi. *E. coli* DH5- α 'dan izole edilen pEBA2 plazmidi daha sonra *E. coli* ET12567 hücrelerine aktarıldı. Bu hücreler metilasyon mutanlığı olup yabancı DNA'ları transfer etmeye engel olan güçlü bir restriksiyon modifikasyon sistemine sahip *Streptomyces* hücrelerinin bu özelliklerini elimine etmek içindir.

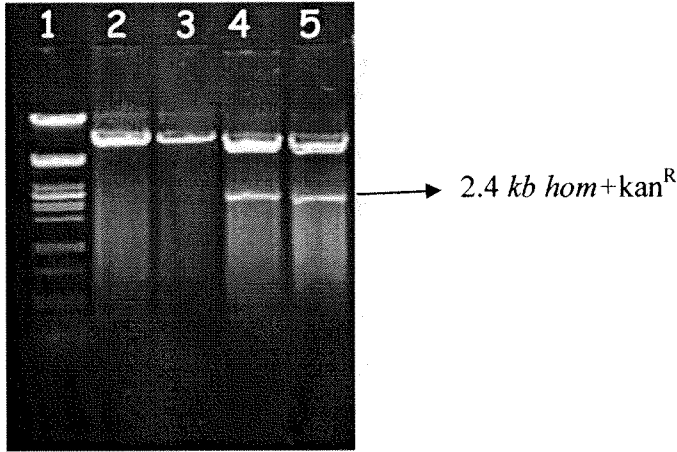
Antibiyotik dirençlilik kasedinin *Streptomyces* vektörüne klonlanması

pIJ486 plazmidi çok kopyalı bir *Streptomyces* vektörü olup thioestrepton antibiyotik direnç geni içermektedir. Hücreler antibiyotik olmayan besiyerlerinde üretildiğinde, vektör, hücreler içerisinde (özellikle sporlar) oldukça dayanıksızdır. Bu bizim çalışmalarımızda 3 kuşak olarak tespit edilmiştir. Üç kuşak boyunca thioestrepton yokluğunda sporlandırılan hücrelerde plazmid rastlanmamaktadır. Bundan dolayı homolog rekombinasyon çalışmalarında "double crossing over" mutantları seçmek için plazmidlerin hücrelerden elimine edilmesi açısından uygun bir vektördür.

*Bam*HI ve *Hind*III ile çoklu klonlama bölgesinden kesilen pIJ486 plazmidine önceden hazırlanan dirençlilik kasedi klonlandı. Daha sonra *Streptomyces* hücrelerine transform edilen yeni plazmid (pEBA486), thio^R ve kan^R fenotipinde seçildi. Klonlamayı teyit için transformantlardan plazmid izolasyonu yapıldı (Şekil 18). Büyük olan plazmidler kesilerek kasedin girip girmediği kontrol edildi (Şekil 19)

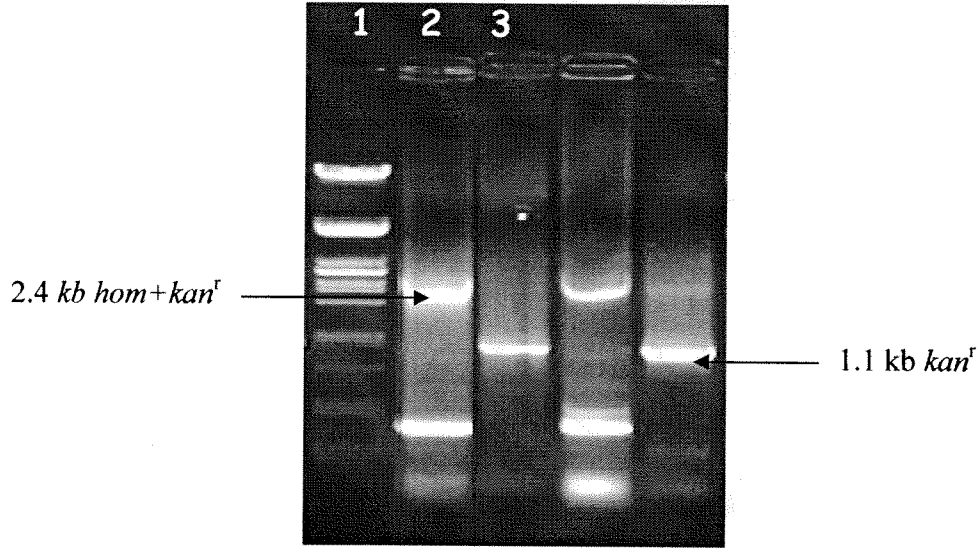


Şekil 18. 1) λ pst markör, 2 ve 3) pIJ486, 4 ve 5) pIJ486 +*hom*+ kan^R.



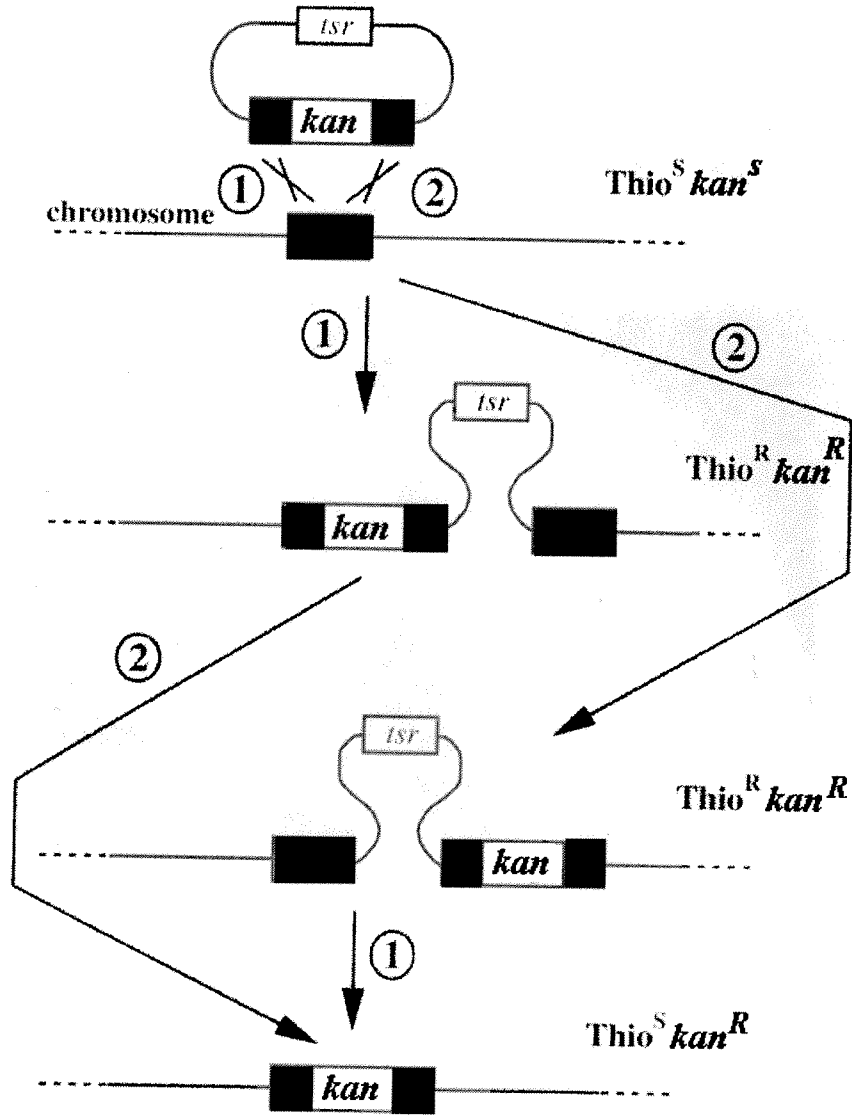
Şekil 19. 1) λ pst markör, 2 ve 3) pIJ486'nın *Bam*HI ve *Hind*III kesimi, 4 ve 5) pEBA486'nın *Bam*HI ve *Hind*III kesimi.

Enzim kesimi ile doğrulanan rekombinant plazmid üzerinden *hom* ve *kan* geninin oligonükleotidleri ile PCR yapılarak kasedin varlığı doğrulandı (Şekil 20)



Şekil 20. 1) λ pstI markör, 2) *hom* oligonükleotidleri kullanılarak pEBA486 ile PCR, 3) *kan* oligonükleotidleri kullanılarak pEBA486 ile PCR.

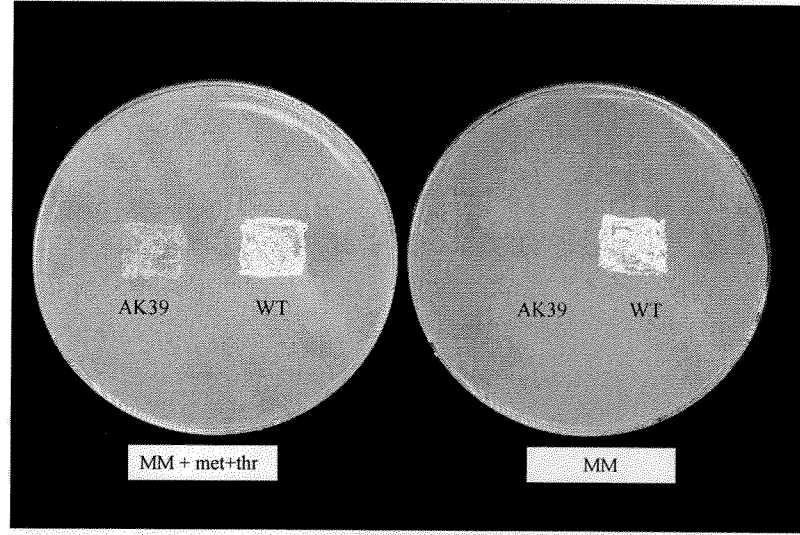
Böylelikle hem restriksiyon enzim kesimleri hemde PCR ile antibiyotik dirençlilik kasedinin *S. clavuligerus* içerisinde doğrulandığı thioestrepton ve ampisiline dirençli rekombinant hücreler, 4 kuşak boyunca *Streptomyces* sporulasyon agarında sporlandırıldı. Daha sonra 4. kuşak sporlar kanamisin ve thioestrepton içeren tripton soy agarlara (TSA) replika yapıldı. Kanamisine dirençli olup thioestrepton varlığında üreyemeyen koloniler seçildi. Bu koloniler plazmid içermeyen ve bir “double crossing over” sonucunda kanamisin geninin genoma geçtiği varsayılan kolonilerdir. Beklenen homolog rekombinasyon Şekil 21’de ifade edilmiştir.



Şekil 21. “Double crossing over” ile *hom* geninin inaktivasyonunun şematik gösterimi.

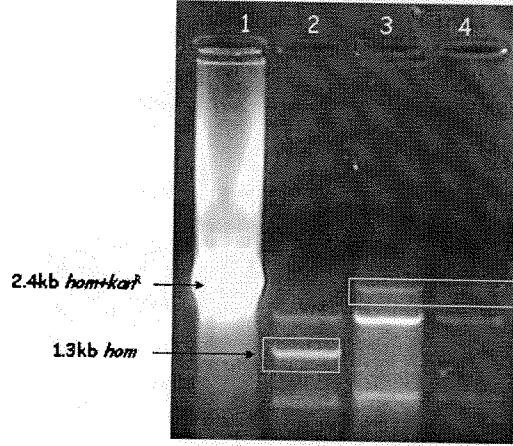
Yukarıda bahsedilen özelliklere sahip olan koloniler seçilerek okzotrofik mutant olup olmadıkları araştırıldı. Eğer plazmid üzerindeki *hom* geni kromozom üzerindeki *hom* geni ile rekombine olmuş ise yeni kopyanın içerisinde kanamisin geni olacağından kromozom üzerindeki kopyanın inaktif olması beklenmektedir. Bu şekilde ortaya çıkan mutantların homoserin

dehidrogenaz enziminin eksikliğinden dolayı methionin ve threonin amino asitlerinin yokluğunda üreyememesi gerekir. Bunu test etmek için pütatif mutantlar bu amino asitleri içermeyen MM (*Streptomyces* minimal medium, Kieser ve ark., 2000) besiyerine ekildi. Çalışmalar sonucunda taranan binlerce koloni arasından bir koloninin methionin ve threonin olmayan besiyerinde üreyemeyip bunlar besiyerine eklendiği takdirde oldukça iyi ürediği tespit edildi. Bu pütatif mutant *S. clavuligerus* AK39 olarak isimlendirildi (Şekil 22).



Şekil 22. AK39 ve yabanıl ırk (WT) *S. clavuligerus*'un methionin ve threonin içeren ve içermeyen minimal besiyerinde üreme görünüşleri.

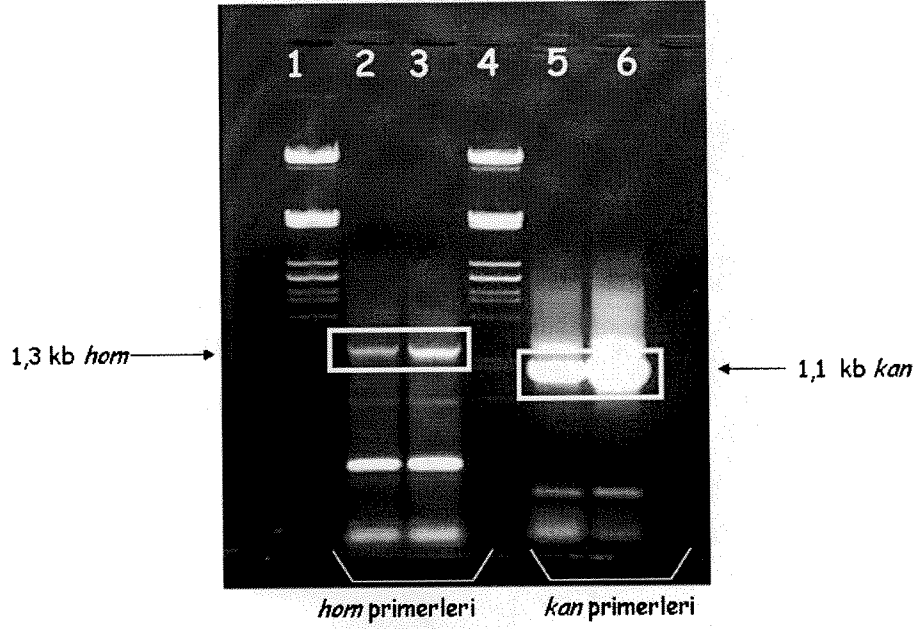
AK39 pütatif *hom* mutantının içinde plazmid olma olasılığına karşın plazmid izolasyonları yapıldı ve plazmid tespit edilemedi. Bunun yanısıra total DNA'sı saflaştırılarak plazmide ait genlerin (örneğin thiostrepton) oligonükleotidleri ile PCR yapıldı ve hücre içerisinde plazmid olmadığı kanıtlanmış oldu. Mutant hücre DNA'sı ile yapılan PCR testlerinde *hom* geninin oligonükleotidleri kullanıldığında genin orjinal uzunluğu olan 1.3 kb uzunluğunda bir ürün elde edilemezken, içine *kan* geninin girmesiyle 2.4 kb olan tahrip edilmiş gen amplifiye edilebilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. *hom* oligonükleotidleri ile yapılan PCR sonuçları 1) pEBA486 (+ kontrol), 2) Yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı ile yapılan PCR, 3 ve 4) *S. clavuligerus* AK39'un kromozomal DNA'sı ile yapılan PCR.

PCR sonucunda spesifik olmayan başka bantlar olduğu için yabancı ırktan elde edilen 1.3 kb'lık fragmentin *hom* geni ve mutanttan elde edilen 2.4 kb'lık fragmentinin *kan* geni içeren *hom* geni olup olmadığını anlayabilmek için bu bantlar jelden izole edildi ve template olarak kullanılarak yeniden PCR yapıldı. Şekil 24'de de görüldüğü gibi mutanttan elde edilen 2.4 kb lık fragment template olarak kullanıldığında 1.1. kb'lık kanamisin geni amplifiye olmaktadır ve bu bant yabancı ırktan hiçbir şekilde amplifiye olmamaktadır.

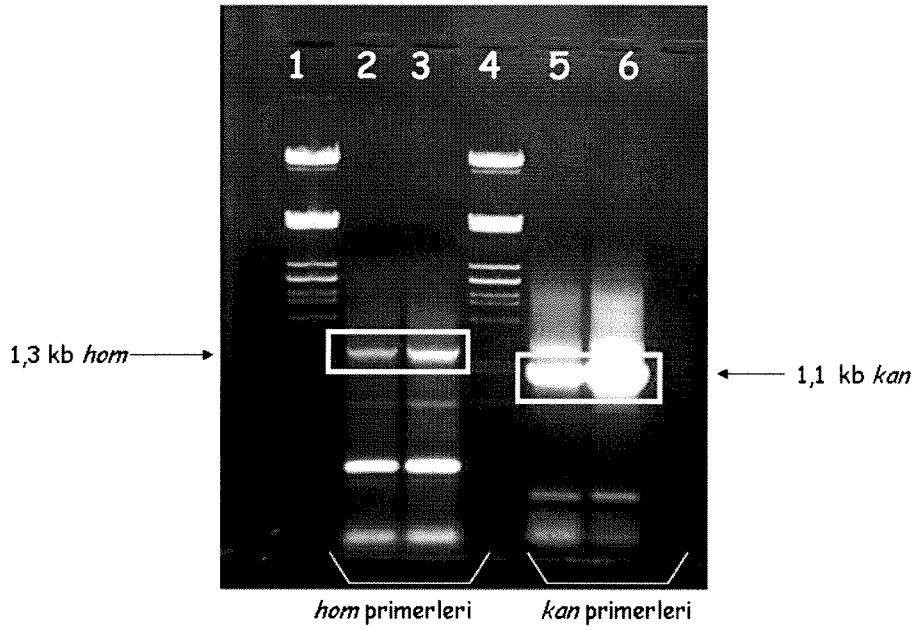
Pütatif mutantta ve yabancı ırkda ayrıca homoserin dehidrogenaz enzim aktivite testi yapıldı. İkinci gelişme raporunda ayrıntısıyla anlatılan enzim test sistemine göre muttanta hiçbir şekilde enzim aktivitesine rastlanmazken yabancı *S. clavuligerus* hücrelerinde spesifik aktivite $0.013 \mu\text{mol of NADPH min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ olarak hesaplandı



Şekil 24. Şekil 23’de kutularla işaretlenmiş fragmentlerin jelden ekstrakt edildikten sonra yapılan PCR sonuçları; 1 ve 4) λ pstI markör, 2 ve 3) Şekil 23’deki 2 numaralı fragmentin ekstraksiyondan sonra *hom* primerleri ile amplifikasyonu, 5 ve 6) Şekil 23’deki 3 ve 4 numaralı fragmentlerin ekstraksiyondan sonra *kan* primerleri ile amplifikasyonu.

***hom* geninin blokasyonunun Southern Blotting ile doğrulanması**

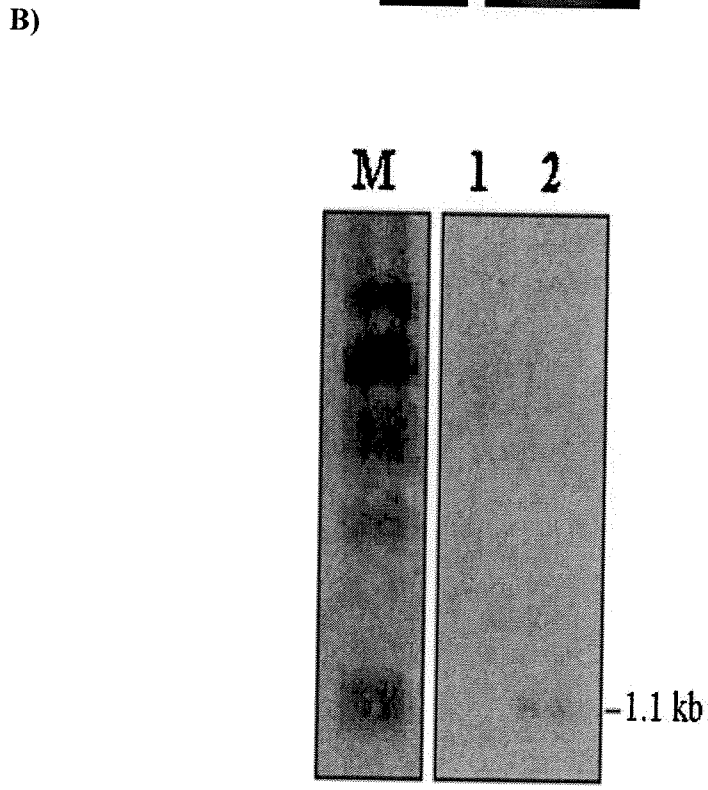
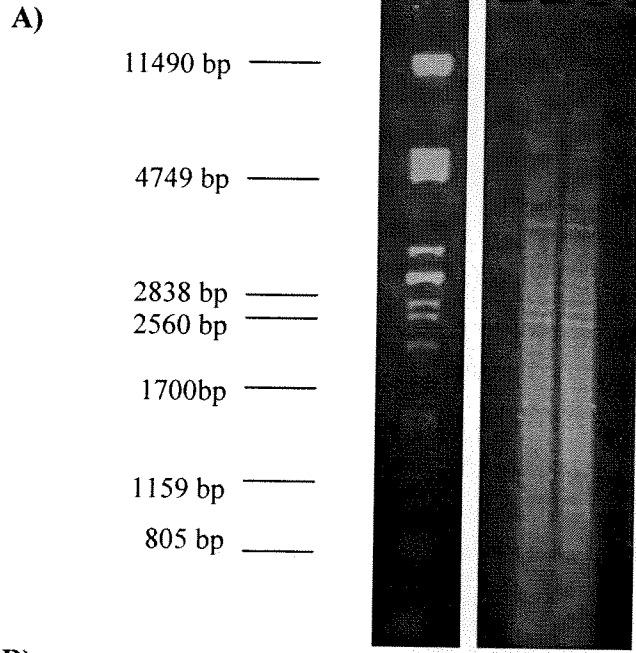
Yabani ve mutant *S. clavuligerus* kromozomal DNA’ları *SacII* enzimiyle kesildi (Şekil 25A) ve kanamisin geni prob olarak kullanılarak hibridizasyon yapıldı (Şekil 25B). Blot sonucunda probun mutant *S. clavuligerus* DNA’sı ile hibridizasyonu gözlenirken yabani *S. clavuligerus* ile herhangi bir sinyal elde edilemedi. *SacII* kesimi sonucunda 1.1 kb uzunluğunda ve homolog rekombinasyon ile plazmidten genoma yerleşmiş olan kanamisin dirençlilik geni ortaya çıkmış ve prob ile hibridize olmuştur.



Şekil 24. Şekil 23’de kutularla işaretlenmiş fragmentlerin jelden ekstrakt edildikten sonra yapılan PCR sonuçları; 1 ve 4) λ pstI markör, 2 ve 3) Şekil 23’deki 2 numaralı fragmentin ekstraksiyondan sonra *hom* primerleri ile amplifikasyonu, 5 ve 6) Şekil 23’deki 3 ve 4 numaralı fragmentlerin ekstraksiyondan sonra *kan* primerleri ile amplifikasyonu.

***hom* geninin blokasyonunun Southern Blotting ile doğrulanması**

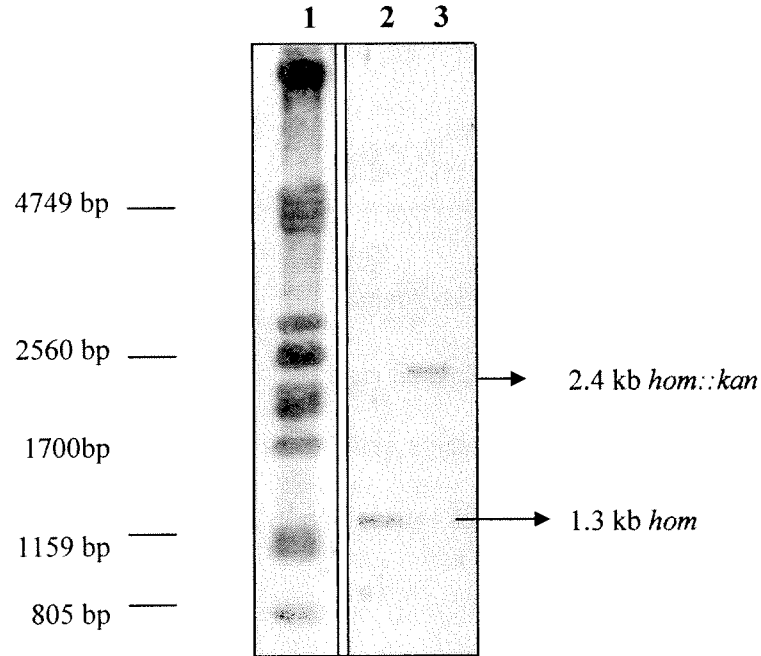
Yabani ve mutant *S. clavuligerus* kromozomal DNA’ları *SacII* enzimiyle kesildi (Şekil 25A) ve kanamisin geni prob olarak kullanılarak hibridizasyon yapıldı (Şekil 25B). Blot sonucunda probun mutant *S. clavuligerus* DNA’sı ile hibridizasyonu gözlenirken yabani *S. clavuligerus* ile herhangi bir sinyal elde edilemedi. *SacII* kesimi sonucunda 1.1 kb uzunluğunda ve homolog rekombinasyon ile plazmidten genoma yerleşmiş olan kanamisin dirençlilik geni ortaya çıkmış ve prob ile hibridize olmuştur.



Şekil 25. *kan* geni kullanılarak yapılan Southern blot analizi; A) Blot yapılan jel fotoğrafı 1) Lambda *Pst*I markör 2) *Sac*II ile kesilmiş yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı, 3)

SacII ile kesilmiş *S. clavuligerus* AK39 kromozomal DNA'sı B) Blot yapılan jelin hibridizasyon sonucu 1) Lambda *PstI* marker, 2) *kan* geni ile hybridize edilen *SacII* ile kesilmiş yabancı ırk *S. clavuligerus* kromozomal DNA'sı, 3) *kan* geni ile hybridize edilen *SacII* ile kesilmiş *S. clavuligerus* AK39 kromozomal DNA'sı.

kan geninin *hom* genine olan integrasyonu başka bir şekilde daha doğrulandı. *hom* primerleri ile hem mutant hem de yabancı ırk'dan amplifiye edilen *hom* geni jelden ekstrakt edilerek Southern blot analizi için jele yüklendi. *hom* geni prob olarak kullanılarak hibridizasyon yapıldı. Yabancı ırk dan elde edilen 1.3 kb ve mutanttan elde edilen 2.4 kb uzunluğundaki fragmentler *hom* probu ile hibridize oldu (Şekil 26). Mutantta *hom* geninin 1.1 kb daha uzun olmasının sebebi içerisinde *kan* geninin bulunmasından dolayıdır.

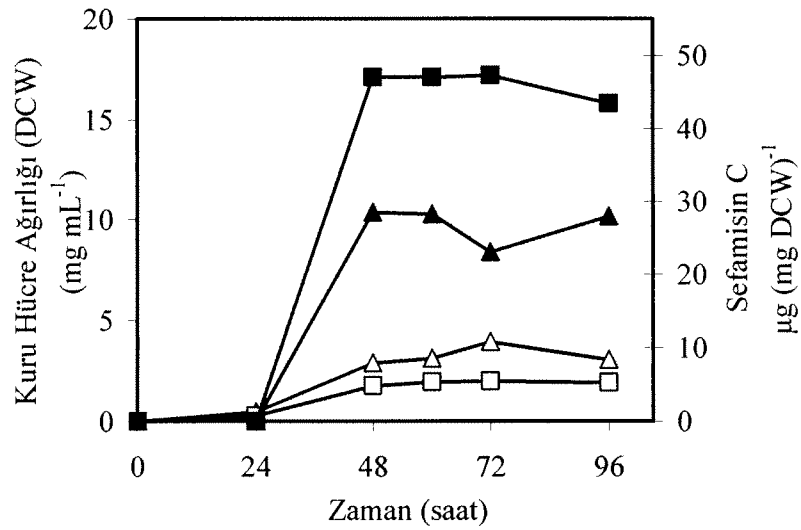


Şekil 26. *hom* geninin prob olarak kullanılmasıyla yapılan Southern blot analizi. 1) Lambda *PstI* marker 2) Yabancı ırk kromozomal DNA'sından *hom* primerleri kullanılarak elde edilen 1.3 kb'lık PCR ürünü, *hom* geni ile hybridize edildi. 3) Mutant *S. clavuligerus* kromozomal

DNA'sından *hom* primerleri kullanılarak elde edilen 2.4 kb'lık PCR ürünü, *hom* geni ile hybridize edildi.

Mutant ve Yabanıl *S. clavuligerus* hücrelerinde üreme evrelerine göre sefamisin C üretimi

hom geninin inaktivasyonunun sefamisin C üretimi üzerine etkisi, CDM (chemically defiend medium, Keiser et al., 2000) besiyerinde tespit edildi (Şekil 27). Beklenildiği üzere, yabanıl ırk ile kıyaslandığında *hom* geni tahrip edilmiş AK39 mutantında spesifik sefamisin C üretimi 48. ve 72. saatler arasında 1.7 ile 2 kat arasında daha yüksek olduğu bulundu.



Şekil 27. Yabanıl ırk ve mutant AK39 hücreleri tarafından CDM besiyerinde ölçülen spesifik sefamisin C üretimi. Açık semboller kuru hücre ağırlığını kapalı semboller ise sefamisin C üretimini göstermektedir. Yabanıl ırk *S. clavuligerus* (▲), *hom* geni tahrip edilmiş mutant AK39 (■).

TARTIŞMA VE SONUÇ

β -laktamlar tıp dünyasında kullanılan en önemli antibiyotik sınıfını oluşturlar. Bunun sebebi, bu grup antibiyotiklerin, ökaryotik canlılarda bulunmayan peptidoglikan (bakteri duvarı) sentez reaksiyonunu engelleyerek patojenik bakterileri kolaylıkla etkisiz hale getirmeleri ve kalıtsal toksisitelerinin üst düzey canlılar için çok az olmasıdır. β -laktam antibiyotikler bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için geniş çapta kullanılmakta, hatta kullanılan antibiyotiklerin yarısından çoğunu bu grup antibiyotikler oluşturmaktadır; alt solunum yolları enfeksiyonları, notropenik hastalarda febril episodunun tedavisinde, sepsis/bacteremiya tedavisinde, idrar yolları enfeksiyonlarında, deri enfeksiyonlarında, alt karın veya jinekolojik enfeksiyonlarda ve menenjit gibi önemli rahatsızlıkların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, β -laktam antibiyotiklerinin üretiminin kontrolünde primer metabolitlerin direkt olarak rol oynadıkları ve öncül metabolit (precursor) akışındaki artışın antibiyotik biyosentezini arttırmak için etkili bir strateji olduğunu göstermiştir. Beta-laktam üreticisi *Streptomyces clavuligerus*'un aspartik asit metabolik yolu da antibiyotik üretiminde görev yapan sentetazlar için substrat sağlayan önemli bir primer metabolik yoldur. Bu aspartik asit yolunun lizin spesifik dalındaki karbon akışının, ikincil kuşak sefalosporin olarak da bilinen sefamisin C biyosentezinde hız limitleyen basamak olduğu bilinmektedir.

Araştırma projemizde proje takvimine sadık kalınarak öncelikle *hom* geni *S. clavuligerus* hücrelerinden klonlanmıştır. Başarılı bir şekilde *E. coli*'de heterolog ekspresyonu sağlanarak enzimin temel özellikleri incelenmiştir. Antibiyotik dirençlilik kasedi hazırlanarak *hom* geni tahrip edilmiş ve tahrip edilen plazmidteki *hom* kopyasının kromozomdaki sağlam kopya ile homolog rekombinasyon sonucu yer değiştirmesi sağlanmıştır. Bu teknik *Streptomyces* genlerinin inaktivasyonu için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Jensen ve ark., 2004; Paradkar ve ark., 2001; Li ve ark., 2000; Mosher ve ark., 1999). Böylelikle elde edilen *hom* mutan AK39'da, lizin çatalına yönlendirilen karbon akışı sayesinde 2 kat daha fazla antibiyotik üretimine rastlanmıştır.

S. clavuligerus NRRL 3585'de β -laktam biyosentezinde gerekli tüm sekonder metabolizma enzimlerini kodlayan genler klonlanmış, enzimler saflaştırılıp kinetik özellikleri

tespit edilmiştir. Sefamisin C biyosentezi için zorunlu olan tüm yapısal genlerin bir küme şeklinde genomda yer aldığı bulunmuştur (Leskiw ve ark., 1988; Jensen ve Demain, 1995; La Fuente ve ark., 1997; Khetan ve ark., 1999; Santamarta ve ark., 2002). Bununla beraber, primer metabolizmadan gelen öncül metabolit akışının manipülasyonu ile sefamisin C üretimini artırma stratejisi üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Malmberg ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada primer ile sekonder metabolizma arasında geçiş teşkil eden ve sefamisin C üretiminde ilk basamağı kodlayan *lat* (lizin aminotransferaz) geninin ikinci bir kopyasını kromozoma aktarmışlardır. Elde ettikleri rekombinantlarda sefamisin C üretimini 2 ile 4 kat arasında arttırmayı başarmışlardır. Başka bir çalışmada ise, Mendelovitz and Aharonowitz (1983), bir lizin analogu olan AEC'ye dirençli aspartokinaz deregüle mutantları elde etmişlerdir ve bu mutantlarda sefamisin C üretimini 2 ile 7 kat arasında artırmışlardır. Bu deregüle mutantlarda aspartat metabolik yolunun ilk enzimi olan aspartokinaz, lizin ve treoninin amino asitleri birikiminden geri-bildirimli olarak inhibe olmadığı için ortamdaki lizin artışından dolayı sefamisin C üretiminde artış gözlenmiştir. Bununla beraber bu mutasyon her zaman geri dönebilme potansiyeli taşıdığından, mutantlar antibiyotik üretimi için kullanışlı değildir. Mendelovitz and Aharonowitz 1982 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise aspartik asit metabolik yolu amino asitlerinin *S. clavuligerus*'da sefamisin C üretimine etkisini çalışmışlar ve ortama lizin eklendiğinde antibiyotik üretimin 1.7 kat arttığını tespit etmişlerdir. Fakat ortama lizin eklenmesi gerekliliği, antibiyotiğin endüstriyel olarak üretilmesi düşünüldüğünde ayrıca bir ekonomik külfet gerektirmektedir. Bu projede elde ettiğimiz stabil AK39 *hom* mutantının oldukça düşük maliyetli kimyasal tanımlı besiyerinde yabancı ırk hücrelere göre 2 kat fazla antibiyotik üretmesi bulgularımızın endüstriyel üretimlerde kullanılabileceği sonucunu doğurmaktadır. Bilindiği üzere besiyerindeki karbon-azot kaynakları ve mineraller sekonder metabolitlerin üretimi üzerine oldukça etkilidir. Bundan dolayı mutant AK39'un antibiyotik üretimini arttırmak için en uygun ve ekonomik besiyeri tespiti için çalışmalarımız devam etmektedir.

Çalışmamızın diğer boyutu da daha önce klonladığımız (Tunca ve ark., 2004) ve çok kopyalı bir *Streptomyces* vektörü üzerinde ekspres ettiğimiz (Taşkın, 2005) aspartokinaz geninin (*ask*) (Bu çalışma da 2002-2004 yılları arasında TBAG-2176 nolu proje ile desteklenmiştir.) mutant AK39 hücrelerine aktarılmasıdır. Genel bilgilerden anlaşılacağı üzere aspartik asit metabolik yolunun ilk enzimi olan aspartokinaz aktivitesi arttıkça hücrede lizin miktarı ve

dolayısıyla sefamisin C miktarı da artmaktadır. Çalışmalarımıza göre *ask* çok kopyalı bir vektör üzerinde yabancı ırk *S. clavuligerus* hücrelerinde eksprese olduğunda antibiyotik üretimi 2 ile 3 kat arasında artış göstermektedir. AK39 mutantında ekspres edilmesi durumunda bu artışın daha fazla olması beklenmektedir.

REFERANSLAR

- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Clepet, C., Borne, F., Baird C., Patte, J.C., Cami, B. (1992).** Isolation, organization and expression of *Pseudomonas aeruginosa* threonine genes. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3109-3119.
- Cohen, G.N., Saint-Girons, I. (1987).** Biosynthesis of of threonine, lysine and methionine. In *E. coli and S. typhimurium: Cellular and molecular Biology*, pp. 429-444. Edited by ASM.
- Demain, A.L. (2000).** Microbial biotechnology. *TIBTECH*, **18**, 26-31.
- Fernandez, M., Cuadrado, Y., Recio, E., Aparicio, J.F., Martin J.F. (2002).** Characterization of the *hom-thrC-thrB* cluster in aminoethoxyvinylglycine-producing *Streptomyces* sp. NRRL 5331. *Microbiology*, **148**, 1413-1420.
- Fernandez-Gonzalez, C., Gil, J. A., Mateos, L. M., Schwarzer, A., Martin, J. F. (1996).** Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 554-558.
- Follettie MT, Shin HK, Sinskey AJ. (1988).** Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol Microbiol. Jan;2(1):53-62.*
- Glazer, A.N. and Nikaido, H. (1998).** In: *Microbial Biotechnology-fundamentals of Applied Microbiology*, W.H. Freeman and Company, New York, USA. 431-510.

- Jensen, S.E., and Demain, A.L. (1995).** Beta-lactams. In *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*. Vining, L.C., and Stuttard, C. (eds). Butterworth-Heinemann, pp. 239-268.
- Jensen S.E., Paradkar A.S., Mosher R.H., Anders C., Beatty P.H., Brumlik M.J., Griffin A., Barton B. (2004).** Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1):192-202.
- Keiser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000)** *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Khetan A., Malmberg L.H., Kyung Y.S., Sherman D.H., Hu W.S. (1999).** Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Prog.* 15(6):1020-7.
- La Fuente, J.L., Rumbero, A., Martin, J.F, and Liras, P. (1997).** Delta-1-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-aminoadipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. *Biochem J.* 327, 59-64.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leskiw B.K., Aharonowitz Y., Mevarech M., Wolfe S., Vining L.C., Westlake D.W., Jensen S.E. (1988).** Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene.* 62(2):187-96.
- Li R., Khaleeli N., Townsend C.A. (2000).** Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 182(14):4087-95.

- Madduri, K., Stuttard, C., and Vining, L.C. (1991).** Cloning and location of a gene governing lysine epsilon-aminotransferase, an enzyme initiating beta-lactam biosynthesis in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **175**, 6916-6924.
- Madsen SM, Albrechtsen B, Hansen EB, Israelsen H (1996)** Cloning and transcriptional analysis of two threonine biosynthetic genes from *Lactococcus lactis* MG1614. *J Bacteriol* **178**: 3689-94.
- Malmberg, L.H., and Hu, W.S. (1991).** Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 941-947.
- Malmberg LH, Hu WS, Sherman DH (1993)** Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine epsilon-aminotransferase (*lat*) gene in cephamycin C biosynthesis. *J Bacteriol* **175** (21): 6916-24
- Malubres M, Mateos LM, Guerrero C, Martin JF. (1995).** Molecular cloning of the *hom-thrC-thrB* cluster from *Bacillus* sp. ULM1: expression of the *thrC* gene in *Escherichia coli* and corynebacteria, and evolutionary relationships of the threonine genes. *Folia Microbiol (Praha)*, **40**(6):595-606.
- Malubres, M., Martin, J.F. (1996).** Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid-producing cornebacteria: Redirecting carbon flow. *FEMS Microbiology Letters*, **143**, 103-114.
- Marchenko, G.N., Marchenko, D.N., Tsygankov, Y.D., Chistoserdov, A.Y. (1999).** Organization of threonine biosynthesis genes from the obligate methyloph *Methylobacillus flagellatus*. *Microbiology*, **145**,3273-3282.
- Mateos, L.M., Del Real, G., Aguilar, A., Martin, J.F. (1987b).** Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase gene of *B. lactofermentum*. *Nucleic Acid Res.*, **15**, 10598.

- Mendelovitz, S. and Aharonowitz, Y. (1982).** Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 74-84.
- Mendelovitz S., Aharonowitz Y. (1983).** Beta-lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* mutants impaired in regulation of aspartokinase. *J Gen Microbiol.* 129(7):2063-9
- Mosher R.H., Paradkar A.S., Anders C., Barton B., Jensen S.E. (1999).** Genes specific for the biosynthesis of clavam metabolites antipodal to clavulanic acid are clustered with the gene for clavamate synthase 1 in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(5):1215-24.
- Motoyama, H., Maki, K., Anazawa, H., Ishino, S., Teshiba, S. (1994).** Cloning and Nucleotide Sequences of the Homoserine Dehydrogenase Genes (*hom*) and the Threonine Synthase Genes (*thrC*) of the Gram-Negative Obligate Methylophilic *Methylobacillus glycogenus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1), 11-119.
- Omori, K., Imai, Y., Suzuki, S., Komatsubara, S. (1993).** Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* threonine operon and analysis of the threonine operon mutations which alter feedback inhibition of both aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I. *Journal of Bacteriology*, 175 (3), 785-794.
- Paradkar, A.S., Mosher, R.H., Anders, C., Jensen, S.E. (2001).** Applications of gene replacement technology to *S. clavuligerus* strain development for clavulanic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5), 2292-2297.
- Parsot, C., Cohen, G. N. (1988).** Cloning and Nucleotide Sequence of the *Bacillus subtilis* *horn* Gene Coding for Homoserine Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry.* 263 (29), 14654-660.

- Peoples OP, Liebl W, Bodis M, Maeng PJ, Folletie JT, Archer JA, Sinskey AJ (1988)**
Nucleotide sequence and structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* hom-thrB operon. *Mol Microbiol* 2: 63-72.
- Romero, J., Martin, J.F., Liras, P., Demain, A.L., and Rius, N. (1997).** Partial purification, characterization and nitrogen regulation of the lysine epsilon-aminotransferase of *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol. Biotech.* 18, 241-246.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Santamarta, I., Rodríguez-García, A., Pérez-Redondo, R., Martin, J.F. and Liras, P. (2002).** CcaR is an autoregulatory protein that binds to the ccaR and cefD-cmcl promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol* 184 (11): 3106-3113.
- Taskin, B (2005).** Effect of homologous multiple copies of aspartokinase gene on cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. A thesis study submitted to the The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Turkey. (MSc. in Biotechnology), July.
- Theze, J., Margarita, D., Cohen, G.N., Borne, F. and Patte, J.C. (1974).** Mapping of the structural genes of three aspartokinases and of the two homoserine dehydrogenases of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 117, 133-143.
- Tunca, S., Yilmaz, E.İ., Piret, J., Liras, P., Özcengiz, G. (2004).** Cloning, characterization and heterologous expression of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase genes of cephamycin C-producer *Streptomyces clavuligerus*. *Res Microbiol* 155: 525-534.

Viola, R.E. (2001). The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. *Acc. Chem. Res.* **34**, 339-349.

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: SBAG-2753
Proje Başlığı: Sefamisin C Üreticisi <i>Streptomyces clavuligerus</i> 'un Homoserin Dehidrogenaz Geninin Klonlanması, Enzimin Karakterizasyonu Ve Gen Blokasyonun Antibiyotik Üretimine Etkisinin İncelenmesi.
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yrd.Doç.Dr. Ebru İNCE YILMAZ (Proje Yürütücüsü), Prof.Dr. Gülay ÖZCENGİZ, Ayşe KOCA ÇAYDAŞI (MSc), Bilgin TAŞKIN (PhD).
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü 06531 ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu Atatürk Bulvarı No: 221 06100 Kavaklıdere, ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Temmuz 2004-Temmuz 2006
Öz (en çok 70 kelime) Projemizde; <i>Streptomyces clavuligerus</i> 'da sefamisin C sentezi için öncül metabolit oluşturan aspartik asit metabolik yolunun homoserin dehidrogenaz enzimi bloke edilerek karbon akışının tamamıyla lizin çatalına yönlendirilmesiyle antibiyotik biyosentezinde iki kat artış elde edilmiştir. β -laktamların dünya antibiyotik pazarındaki yeri ve önemi düşünülecek olursa, projemizin bulgularının uygulamaya aktarılması halinde, biyoteknoloji endüstrisinin gelişmesinin zorunlu olduğu ülkemizde ekonomiye çok önemli katkılarda bulunacağı bir gerçektir.
Anahtar Kelimeler: <i>Streptomyces clavuligerus</i> , Sefamisin C, Aspartik asit metabolik yolu, Homoserin dehidrogenaz, Gen klonlaması ve inaktivasyonu.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: <u>Bilimsel Yayınlar</u> -Ebru I. Yilmaz, Ayse K. Caydasi ve Gulay Ozcengiz. Cloning and Characterization of Homoserine Dehydrogenase Gene of <i>Streptomyces clavuligerus</i> and the Effects of Its Disruption on Cephamycin C Production (FEMS Microbiology Letters dergisine sunuldu,

Temmuz 2006).

-Bilgin Taskın, Ayse K. Caydasi, Ebru I. Yilmaz ve Gulay Ozcengiz. The effects of multiple copies of *ask* gene in *hom* mutant *S. clavuligerus* AK39 on cephamycin C production (Yayına hazırlanıyor).

Uluslararası ve Ulusal Kongre Sunumları

-Disruption of *hom* gene of *Streptomyces clavuligerus* and its effects on cephamycin C production. Çaydaşı A.K., Yılmaz E.İ., Özcengiz G., 31st FEBS Congress: Molecules in Health and Disease. The FEBS Journal, V. 273 Supplement 1, Abstracts, p.325, 24-29 June 2006, İstanbul.

-Aspartate pathway engineering for improving cephamycin C yields in *S. clavuligerus*. Taşkın, B., Çaydaşı, A.K., Yılmaz, E.İ. and Özcengiz, G., 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Book of Abstracts. p. 128, 4-8 July 2006, Madrid.

-Sefamisin C üreticisi *Streptomyces clavuligerus*' un homoserin dehidrogenaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve gen blokasyonunun antibiyotik üretime etkisinin incelenmesi. Yılmaz E.İ., Koca A., Özcengiz G., 14. Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos-2 Eylül 2005, Eskişehir.

-Cloning, expression and characterization of homoserine dehydrogenase gene from *Streptomyces clavuligerus* and the effect of gene disruption on Cephamycin C production. Yılmaz E.İ., Koca A., Tunca S., Özcengiz G., 5th International Symposium on Industrial Microbiology and Biotechnology, In Honor of Prof. Army Demain, June 27-29, 2005, Shanghai/China.

Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu: