

**STREPTOMYCES CLAVULIGERUS' TA CCAR REGÜLATOR
GENİNİN SEFAMİSİN C BİYOSENTEZİNE OLAN ETKİSİNİN
TRANSKRİPSİYONEL VE PROTEOM ÖLÇEKLİ ANALİZİ**

PROJE NO : TBAG-109T962

**PROF. DR. GÜLAY ÖZCENGİZ
DR. ASLIHAN KURT**

**Mayıs 2012
ANKARA**

ÖNSÖZ

Bu rapor, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TBAG-109T962 kodlu projenin yürütülmesi sürecinde elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Çalışmamızda, gram pozitif bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan ikinci jenerasyon antibiyotiklerden biri olan sefamisin C' nin orijinal üreticisi olan *Streptomyces clavuligerus*' ta sefamisin C gen kümesinin CcaR tarafından regülasyonunun gen ve protein düzeyindeki etkileri, RT-PCR, qRT-PCR, proteomik çalışmalar ve EMSA deneyleri ile belirlenmiştir.

Raporda verilen araştırmalar, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmüş olup Aslıhan Kurt' un doktora tez çalışmalarını oluşturmuştur. Bu çalışmaların bulgularıyla SCI-core dergisinde bir makale yayına hazırlık aşamasında olup, bir adet tebliğ yayınlanmıştır.

Araştırmamıza verilen destekten ötürü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Temel Bilimler Araştırma Grubu'na şükranlarımızı sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	xi
ÖZ.....	xii
ABSTRACT	xiii
GİRİŞ	1
1.1. <i>Streptomyces</i> cinsi	1
1.2. Biyoteknolojik açıdan önemli bir β -laktam üreticisi olan <i>Streptomyces clavuligerus</i> (<i>S. clavuligerus</i>)	4
1.3. β -laktamlar; biyoteknolojik açıdan ilgi çekici antibiyotikler	5
1.4. Sefamisin C Biyosentezi	8
1.7. Sefamisin C kümesinin transkripsiyonel analizi.....	17
1.8. <i>S. clavuligerus</i> 'da antibiyotik üretiminin regülasyonu: Global pleiotropik faktörler ve yolak-özü regülatörler	19
1.9. <i>S. clavuligerus</i> 'da sefamisin C biyosentezinin besinsel regülasyonu.....	22
1.10. <i>S. clavuligerus</i> 'a ait genom dizisi	23
1.12. Kantitatif RT-PCR	24
1.13. Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi (EMSA)	27
1.14. Karşılaştırmalı proteom.....	28
1.14. Mevcut çalışma	29
GELİŞME	30
2.1. Bakteri suşları, plazmidleri, besiyerleri ve kültür koşulları	30
2.2. Kültür besiyerleri.....	32
2.3. Tamponlar ve çözeltiler.....	32
2.4. Kimyasallar ve enzimler.....	32
2.5. <i>S. clavuligerus</i> ' dan genomik DNA izolasyonu	32

2.6. <i>S. clavuligerus</i> ve <i>E. coli</i> ' den plasmid DNA izolasyonu	33
2.7. <i>E. coli</i> kompetan hücrelerinin hazırlanması.....	33
2.8. <i>E. coli</i> kompetan hücrelerinin transformasyonu	34
2.9. Konjugasyon metodu ile <i>E. coli</i> ve <i>S. clavuligerus</i> arasında plasmid DNA transferi	34
2.10 DNA' nın manipülasyonu	35
2.10.1. Restriksiyon endonukleaz kesimleri	35
2.10.2. Agaroz jel elektroforezi	35
2.10.3. DNA parçalarının agaroz jelden ekstraksiyonu	35
2.10.4. Ligasyonlar	35
2.11. Primer dizaynı	36
2.12. Polimeraz zincir reaksiyonu	36
2.12.1. Standart PCR	36
2.12.2. Koloni PCR	37
2.13. Dizileme reaksiyonu	37
2.14. Fermentasyon çalışmaları: Bioassay ve HPLC analizleri	37
2.14.1. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi.....	37
2.14.2. Kültürlerdeki sefamisin C ve klavulanik asit miktarlarının biyoassay deneyleri ile belirlenmesi	37
2.14.3. HPLC ile örneklerdeki klavulanik asit miktarının belirlenmesi	38
2.14.4. Örnek toplama ve HPLC koşulları	39
2.15. RNA örneklerinin hazırlanması	39
2.16. Revers Transripsiyon PCR (RT-PCR).....	40
2.17. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR)	41
2.17.1. qRT-PCR verilerinin verimlilik-düzeltilmiş rölatif kuantifikasyonu	42
2.17.2. qRT-PCR verilerinin istatistiksel analizi	42
2.18. CcaR proteininin saflaştırılması	42
2.19. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	43
2.20. Elektroforetik hareket değişim deneyi (EMSA).....	43
2.21. Proteom çalışmaları.....	44
2.21.1. Total protein izolasyonu	44
2.21.2. İzoelektrik fokuslama ve proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları	45
2.21.3. Protein spotlarının analizi.....	45
2.22. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)	45
2.22.1. Native PAGE	45
2.22.2. SDS-PAGE	46
2.23. Poliakrilamid jellerin boyanması.....	46
2.23.1. Doğal-Poliakrilamid jellerin SYBR Green I nükleik asit boyası ile boyanması	46
2.23.2. Coomassie Blue R-250 ile SDS-Poliakrilamid jellerin boyanması.....	46
2.23.3. Coomassie Blue G-250 ile SDS-Poliakrilamid jellerin boyanması	46
BULGULAR.....	48
3.1. <i>ccaR</i> geninin güçlü bir gliserol promotörü taşıyan pSPG ekspresyon vektöründe ifade edilmesi ya da kendi promotörü ile birlikte pSET152 vektörüyle integrative ekspresyonu	48
3.1.1. <i>ccaR</i> geninin güçlü bir gliserol promotörü (PgIP) taşıyan pSPG ekspresyon vektörüne klonlanması.....	48

3.1.2. <i>ccaR</i> geninin kendi promotörü (<i>pccaR</i>) ile birlikte <i>S. clavuligerus</i> kromozomuna entegrasyonu.....	50
3.1.3. Rekombinant <i>E.coli</i> hücreleri ve <i>S. clavuligerus</i> arasında konjugasyon	53
3.1.4. TSB ve SA besiyerlerinde üreyen rekombinant <i>S. clavuligerus</i> suşlarının sefamisin C ve klavulanik asit üretim kapasitelerinin biyoassay ve HPLC analizleri ile karşılaştırılması	54
3.2. Revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) ve qRT-PCR deneylerinde kullanılacak RNAların izolasyonu	58
3.3.1. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064' a ait <i>ccaR::aphII</i> mutantında sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel profili	59
3.3.2. <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonel profili.....	61
3.3.3. <i>S. clavuligerus</i> C11' sefamisin C gen kümesine ait genlerin transkripsiyonel analizi	63
3.3.4. <i>S. clavuligerus</i> NRRL3585' de sefamisin C gen kümesindeki genlerin o-transkripsiyonel profili	65
3.4. <i>ccaR</i> geninin sefamisin C gen kümesi üzerinde regülatör etkisinin qRT-PCR ile analizi 68	
3.4.1. qRT-PCR koşullarının optimizasyonu	68
3.4.2. Standard eğri oluşturularak amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması	74
3.4.3. qRT-PCR ile parental suşda ve onun <i>ccaR</i> -negatif suşunda sefamisin C biyosentetik gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon modelinin belirlenmesi.....	77
3.4.4. qRT-PCR ile parental suşda ve rekombinant C11 suşunda sefamisin C biyosentetik gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon modelinin belirlenmesi	81
3.5. <i>CcaR</i> regülatörünün sefamisin C gen kümesindeki DNA-bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu	86
3.5.1. <i>ccaR</i> geninin pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanması	86
3.5.2. <i>CcaR</i> ' nin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) hücrelerindeki ekspresyonu ve His Tag Afinite Kromatografisi ile saflaştırılması	87
3.5.3. Sefamisin C gen kümesi üzerindeki <i>CcaR</i> ' ye ait DNA'ya-bağlanma bölgelerinin Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi-EMSA ile belirlenmeleri.....	88
3.6. Parental <i>S. clavuligerus</i> suşu ile rekombinant C11 suşlarının karşılaştırmalı proteomu .90	
3.6.1. Protein izolasyonu metodunun optimizasyonu	90
3.6.2. İzoelektrik fokuslamada yapılan optimizasyonlar.....	91
3.6.3. Parental <i>S. clavuligerus</i> suşuna ait toplam hücre proteomu.....	91
3.6.4. <i>S. clavuligerus</i> C11 suşuna ait toplam hücre proteomu	92
3.6.5. Parental ve rekombinant suşda pI:4-7 aralığındaki protein profilinin karşılaştırılması	92
I. TARTIŞMA.....	94
II. ÖNERİLER.....	99
DEĞERLENDİRME	100
KAYNAKLAR.....	103
EK A.....	112
EK B.....	115
EK C.....	120
EK D.....	122
EK E.....	128
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	131

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1. Bergey'in "Sistemik Biyoloji" el kitabına göre <i>Streptomyces</i> cinsinin sınıflandırılması.....	1
Tablo 1. 2. Sefamisin C kümesindeki genler ve fonksiyonları	11
Tablo 1. 3. <i>ccaR</i> , <i>blp</i> ve <i>orf10</i> genlerinin <i>S. clavuligerus</i> NRRL3585 and ATCC27064 suşlarında sekanslarının karşılaştırılması.....	16
Tablo 1. 4. <i>S. clavuligerus</i> NRRL3585 ve ATCC27064'da sefamisin C kümesinin genler arası bölgelerindeki uzunluk farkları	17
Tablo 2. 1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmidler	31
Tablo 2. 2. Standart bir PCR reaksiyonu ve uygulanan koşullar	36
Tablo 2. 3. Standart RT-PCR reaksiyon koşulları	40
Tablo 2. 4. LightCycler 1.5 cihazında Real time PCR koşulları	41
Tablo 2. 5. Native poliakrilamid jellerin hazırlanışı	45
Tablo 2. 6. SDS-poliakrilamid jellerin hazırlanışı.....	46
Tablo 3. 1. Amplifikasyon eğrileri ve melting peaklerin Ct ve Tm değerleri.....	73
Tablo 3. 2. Sefamisin C gen kümesinde her bir gene ait amplifikasyon verimlilikleri	76
Tablo B. 1. <i>ccaR</i> geninin amplifikasyonu ve rekombinasyonunun doğrulanması için PCR' da kullanılan primerlere ait nükleotit dizileri	116
Tablo B. 2. Sefamisin C gen kümesindeki genlerin parental suş ve manipüle suşlardaki ekspresyonlarının RT-PCR ve qRT-PCR analizler için tasarlanan primerler ve ilgili nükleotit dizileri.....	117
Tablo B. 3. Sefamisin C gen kümesindeki genlerin ko-transkripsiyonel profillerinin analizi için tasarlanan primerler	118
Tablo B. 4. EMSA deneylerinde kullanılan problemlerin amplifikasyonunda kullanılan primerlere ait nükleotit dizileri	119

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. <i>S. coelicolor</i> ' ait yaşam döngüsü.....	2
Şekil 1. 2. <i>S. lividans</i> ' a ait koloni gelişim safhalarının taramalı mikroskop altında görünümü. 3	
Şekil 1. 3. <i>S. clavuligerus</i> tarafından üretilen β -laktam bileşikleri.....	5
Şekil 1. 4. Hücre duvarı yapısı.....	6
Şekil 1. 5. Fungus ve bakterilerde β -laktam gen kümeleri ve lokasyonları.....	7
Şekil 1. 6. <i>S. clavuligerus</i> 'ta sefamisin C biyosentez yolu.....	10
Şekil 1. 7. <i>S. clavuligerus</i> ' ta sefamisin C gen kümesi.....	11
Şekil 1. 8. qRT-PCR' a ait tipik bir amplifikasyon eğrisinin (a) ve qRT-PCR' a ait dört karakteristik fazın gösterimi (b)......	25
Şekil 2.1. Biyoassay deneylerinde kullanılmak üzere SA (b,c) ve TSB (a) besiyerlerinde üreyen kültürlerden elde edilen sefalosporin C ve klavulanik asit kalibrasyon eğrileri.	
Şekil 3. 1. <i>ccaR</i> geninin PCR amplifikasyonu.	48
Şekil 3. 2. Rekombinasyonun PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile doğrulanması.....	49
Şekil 3. 3. <i>ccaR</i> geninin pG23 plazmidinin MCS bölgesindeki yerleşim yönü.....	49
Şekil 3. 4. pSPG ve pG23 vektörlerinin <i>SpeI</i> ve <i>NdeI</i> enzimleri ile kesimleri.....	49
Şekil 3. 5. PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile <i>ccaR</i> geninin pSPG vektörüne klonlanmasının doğrulanması.....	50
Şekil 3. 6. <i>ccaR</i> geninin pAK23 vektöründeki yerleşim yönü.....	50
Şekil 3. 7. <i>S. clavuligerus</i> ' un genomik DNA' sı kalıp olarak kullanılarak <i>ccaR</i> geninin kendi promotörü (<i>pccaR</i>) ile birlikte PCR reaksiyonu ile amplifiye edilmesi.....	50
Şekil 3. 8. <i>pccaR</i> geninin pGEM-T easy vektöre klonlanmasının PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile doğrulanması.....	51
Şekil 3. 9. <i>pccaR</i> geninin pG15 vektöründeki yerleşim yönü.....	51
Şekil 3. 10. pG15 ve pSET152 vektörlerinin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> enzimleri ile kesilmeleri.....	52
Şekil 3. 11. <i>pccaR</i> geninin pSET152 entegrasyon vektörüne klonlanmasının PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile doğrulanması.....	52
Şekil 3. 12. <i>pccaR</i> geninin pSET-PC vektörünün MCS'indeki yerleşim yönü.	52
Şekil 3. 13. Rekombinant <i>S. clavuligerus</i> C11 ve PC suşlarının PCR ile doğrulanmaları.....	53
Şekil 3. 14. Parental suş <i>S. clavuligerus</i> NRRL3585 (■) ve rekombinant suşlar olan, C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△)' nin SA (a) ve TSB (b) besiyerlerinde zamana bağlı üreme profilleri.....	55
Şekil 3. 15. SA besiyerinde parental suşa (■) kıyasla C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının fermentasyon süresince volumetrik (a) ve spesifik (b) sefamisin C üretimlerinin biyoassay çalışmalarıyla karşılaştırılmaları.....	56

Şekil 3. 16. TSB besiyerinde üreyen rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının fermentasyon süresinde parental suşa (■) kıyasla ürettikleri volumetrik (a) ve spesifik (b) sefamisin C miktarlarının biyoassay çalışmalarıyla karşılaştırılmaları.	56
Şekil 3. 17. Fermentasyon boyunca, SA besiyerinde üreyen rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının parental suşunkine (■) göre volumetrik (a) ve spesifik (b) klavulanik asit titrelerinin karşılaştırılmaları.	57
Şekil 3. 18. Fermentasyon süresince rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının parental suşa (■) kıyasla, SA (a) ve TSB (b) besiyerlerinde klavulanik asit üretimlerinin HPLC ile belirlenmesi.	57
Şekil 3. 19. Parental <i>S. clavuligerus</i> (ATCC27064 (◆) ve NRRL3585 (■)) suşları, C11 (●), pGV(○) rekombinantları ve <i>ccaR</i> geni tahrip <i>S. clavuligerus</i> suşu (◇)' na ait üreme (a), spesifik sefamisin C titresi (b) ve mg DNA başına düşen µg RNA miktarı (c).	58
Şekil 3. 20. Zamana bağlı olarak, <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 ve <i>ccaR</i> geni tahrip edilmiş suşda sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. (a) <i>ccaR</i> , (b) <i>orf10</i> , (c) <i>blp</i> , (d) <i>lat</i> , (e) <i>pcbAB</i> , (f) <i>pcbC</i> , (g) <i>pcbR</i>	59
Şekil 3. 21. Zamana bağlı olarak, <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 ve <i>ccaR</i> geni tahrip edilmiş suşda sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. (a) <i>cmcl</i> , (b) <i>cmcJ</i> , (c) <i>cefF</i> , (d) <i>cmcH</i>	60
Şekil 3. 22. Zamana bağlı olarak, <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064 ve <i>ccaR</i> geni tahrip edilmiş suşda sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. (a) <i>cefD</i> , (b) <i>cefE</i> , (c) <i>pcd</i> , (d) <i>cmcT</i> , (e) <i>pbpA</i> , (f) <i>bla</i>	61
Şekil 3. 23. T ₂₄ ' de <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonle profilinin RT-PCR ile gösterilmesi.	62
Şekil 3. 24. Zamana bağlı olarak rekombinant <i>S. clavuligerus</i> C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. (a) <i>ccaR</i> , (b) <i>orf10</i> , (c) <i>blp</i> , (d) <i>lat</i> , (e) <i>pcbAB</i> , (f) <i>pcbC</i> , (g) <i>pcbR</i>	63
Şekil 3. 25. Zamana bağlı olarak rekombinant <i>S. clavuligerus</i> C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. (a) <i>cmcl</i> , (b) <i>cmcJ</i> , (c) <i>cefF</i> , (d) <i>cmcH</i>	64
Şekil 3. 26. Zamana bağlı olarak rekombinant <i>S. clavuligerus</i> C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. (a) <i>cefD</i> , (b) <i>cefE</i> , (c) <i>pcd</i> , (d) <i>cmcT</i> , (e) <i>pbpA</i> , (f) <i>bla</i>	64
Şekil 3. 27. T ₂₄ ' de <i>S. clavuligerus</i> NRRL3585' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonle profilinin RT-PCR ile gösterilmesi. (a) <i>ccaR-orf10</i> , (b) <i>orf10-blp</i> , (c) <i>blp-lat</i> , (d) <i>lat-pcbAB</i> , (e) <i>pcbAB-pcbC</i> , (f) <i>cmcl-cmcJ</i>	65
Şekil 3. 28. T ₂₄ ' de <i>S. clavuligerus</i> ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonle profilinin RT-PCR ile gösterilmesi. (g) <i>cmcJ-cefF</i> , (h) <i>cefF-cmcH</i> , (i) <i>cefD-cefE</i> , (j) <i>cefE-pcd</i> , (k) <i>pcd-cmcT</i> , (l) <i>cmcT-pbp2</i> , (m) <i>cmcH-ccaR</i> intergenic regions.	66
Şekil 3. 29. Sefamisin C gen kümesindeki genler arası bölgelerin transkripsiyonel organizasyonunun RT-PCR ile analizi, CcaR aktivatörünün parental suşa kıyasla <i>ccaR::aphII</i> ve C11 suşlarında sefamisin C genlerinin transkripsiyonları üzerindeki etkisi. ...	67
Şekil 3. 30. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. (a) <i>hrdB</i> , (b) <i>ccaR</i> , (c) <i>orf10</i> , (d) <i>blp</i>	69
Şekil 3. 31. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. (e) <i>lat</i> , (f) <i>pcbAB</i> , (g) <i>pcbC</i> , (h) <i>pcbR</i>	70
Şekil 3. 32. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. (i) <i>cmcl</i> , (j) <i>cmcJ</i> , (k) <i>cefF</i> , (l) <i>cmcH</i>	71
Şekil 3. 33. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol	

reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (m) <i>cefD</i> , (n) <i>cefE</i> , (o) <i>pcd</i> , (p) <i>cmcT</i>	72
Şekil 3. 34. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. (r) <i>pbpA</i> , (s) <i>bla</i>	73
Şekil 3. 35. Referans gen (<i>hrdB</i>) ve sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (<i>ccaR</i> , <i>orf10</i> , <i>blp</i> , <i>lat</i> , <i>pcbAB</i> , <i>pcbC</i> , ve <i>pcbR</i>) standard eğrileri ve herbir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.....	74
Şekil 3. 36. Sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (<i>cmcl</i> , <i>cmcJ</i> , <i>cefF</i> , <i>cmcH</i> , <i>cefD</i> , <i>cefE</i> , <i>pcd</i> ve <i>cmcT</i>) standard eğrileri ve herbir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.	75
Şekil 3. 37. Sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (<i>pbpA</i> and <i>bla</i>) standard eğrileri ve herbir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.	76
Şekil 3. 38. Parental suş ve <i>ccaR</i> mutant suşunda, <i>orf10</i> , <i>blp</i> , <i>lat</i> , <i>pcbAB</i> , <i>pcbC</i> ve <i>pcbR</i> gen ekspresyonlarının zamana bağlı olarak qRT-PCR ile kuantifikasyonu	77
Şekil 3. 39. Parental suş ve <i>ccaR</i> mutant suşunda, <i>cmcl</i> , <i>cmcJ</i> , <i>cefF</i> ve <i>cmcH</i> gen ekspresyonlarının zamana bağlı olarak qRT-PCR ile kuantifikasyonu.	78
Şekil 3. 40. Parental suş ve <i>ccaR</i> mutant suşunda, <i>cefD</i> , <i>cefE</i> , <i>pcd</i> , <i>cmcT</i> , <i>pbpA</i> ve <i>bla</i> gen ekspresyonlarının zamana bağlı olarak qRT-PCR ile kuantifikasyonu.	79
Şekil 3. 41. qRT-PCR ile parental suşa kıyasla <i>ccaR</i> mutant suşunda sefamisin C gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili..	80
Şekil 3. 42. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 suşlarında <i>ccaR</i> , <i>orf10</i> , <i>blp</i> , <i>lat</i> , <i>pcbAB</i> , <i>pcbC</i> ve <i>pcbR</i> gen ekspresyonlarının belirlenmeleri.....	82
Şekil 3. 43. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 suşlarında <i>cmcl</i> , <i>cmcJ</i> , <i>cefF</i> , ve <i>cmcH</i> gen ekspresyonlarının belirlenmeleri..	83
Şekil 3. 44. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 suşlarında <i>cefD</i> , <i>cefE</i> , <i>pcd</i> , <i>cmcT</i> , <i>pbpA</i> ve <i>bla</i> gen ekspresyonlarının belirlenmeleri.. .	84
Şekil 3. 45. qRT-PCR ile parental suşa kıyasla pGV ve C11 rekombinant suşlarında sefamisin C gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili.	85
Şekil 3. 46. <i>ccaR</i> genini taşıyan pG23 (a) ve pET28a+ (b) vektörlerinin <i>NotI</i> enzimi ile keilmeleri. (a) M: 100 bç DNA ladder plus, 1: <i>NotI</i> ile kesilmiş pG23. (b) M: λ <i>PstI</i> DNA markörü, 2: <i>NotI</i> ile kesilmiş pET28a+.	86
Şekil 3. 47. <i>ccaR</i> ' nin pET28a+ vektöre klonlanmasının PCR (a) ile doğrulanması ve <i>ccaR</i> ' nin pET28a+ vektörün MCS' indeki yönünün enzim kesimleri ile belirlenmesi (b)	86
Şekil 3. 48. <i>ccaR</i> geninin pET-C23' deki lokalizasyonu.....	87
Şekil 3. 49. IPTG ile indüklenmiş <i>E. coli</i> BL21 kültüründe CcaR proteininin ekspresyonu. M: Protein markörü, 1: Kontrol (indüklenmemiş örnek) 2: İndüklenmiş örnekteki ekspres olmuş CcaR proteini.	87
Şekil 3. 50. His Tag afinite kromatografisi ile CcaR proteininin kısmi olarak saflaştırılması. (a) 30 mM β -merkaptotanol (β -ME) ya da (b) % 1 oranında Triton X-100 içeren hücre lizatlarının belli oranlarda imidazol eklenen tamponlar kullanılarak saflaştırılması..	88
Şekil 3. 51. CcaR proteininin sefamisin C metabolik yolağındaki hedef promotor bölgelerinin belirlemek üzere yapılan EMSA analizleri.....	89
Şekil 3. 52. CcaR proteininin sefamisin C gen kümesinde yer alan farklı promotor bölgeleri ile olan etkileşimini göstermek üzere yapılan EMSA deneylerine ait sonuçları	90
Şekil 3. 53. Parental <i>S. clavuligerus</i> suşuna ait toplam hücre proteomu..	92
Şekil 3. 54. Rekombinant <i>S. clavuligerus</i> C11 suşuna ait toplam hücre proteomu.....	92

Şekil 3. 55. <i>p</i> :4-7 aralığında parental ve rekombinant C11 suşlarında aynı ve farklı ifade edilen (sırasıyla yeşil, kırmızı ve aynı olanlar sarı) proteinlerin Decodon Delta 2D analiz programı kullanılarak belirlenmeleri	93
Şekil A.1. 1. Plazmid ve recombinant vektörlerin yapıları (a) pGEM-T easy: <i>E. coli</i> klonlama vektörü, (b) pG23: <i>ccaR</i> yi taşıyan pGEM-Teasy vektörü, (c) pG15: <i>ccaR</i> genini kendi promotoru ile birlikte taşıyan (<i>pccaR</i>) pGEM-Teasy rekombinant vektörü.....	112
Şekil A.1. 2. Plazmid vektörlerin yapıları (d) pBluescriptIIKS+: <i>E. coli</i> klonlama vektörü, (e) pKS15: <i>pccaR</i> yi taşıyan rekombinant pGEM-T easy, (f) pSET152: <i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> çift-fonksiyonlu entegrasyon vektörü, (g) pSET-PC: <i>pccaR</i> taşıyan pSET152.	113
Şekil A.1. 3. Plazmid vektörlerin yapıları (h) pSPG: <i>Streptomyces</i> ekspresyon vektörü, (i) pAK23: <i>ccaR</i> taşıyan pSPG, (j) pET28a(+): <i>E. coli</i> His-Tag ekspresyon vektörü, (k) pET-C23: <i>ccaR</i> taşıyan pET28a.	113
Şekil B. 1. <i>ccaR</i> kendi promotoru ile nukleotit dizisi (GeneBank erişim numarası: AF073897) ve primerlerin lokasyonu.....	115

KISALTMALAR

ATTC	Amerikan Tip Kùltür Koleksiyonu
NRRL	Tarımsal Araştırma Servisi Kolleksiyonu
bp	Baz çifti
DepC	Dietilpirokarbonat
dH ₂ O	Distile su
dNTP	Deoksi nükleotit trifosfat
EtBr	Etidyum bromür
ORF	Open Reading Frame
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu
RT-PCR	Revers Transkripsiyon PCR
SEM	Ortalama Standart Hata
aa	Aminoasit
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
EMSA	Electroforetik Hareket Değişim Deneyi
tsp	Transkripsiyon başlangıç noktası

ÖZ

S. clavuligerus hücrelerinde pozitif regülatör gen *ccaR*' nin yokluğunda ve bu genin çoklu ifadesi durumunda parental suşa kıyasla sefamisin C biyosentetik gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili RT-PCR ve qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Sefamisin C gen kümesindeki genlerin RT-PCR analizleriyle, üç farklı polisistronik ve iki monosistronik transkript belirlenirken *cmcH* ve *ccaR* genlerinin birlikte transkribe oldukları ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. qRT-PCR analizleri yapıldığında, *ccaR*- mutant suşunda fermentasyon süresince ekspresyon seviyesi en ciddi düşüş gösteren gen *lat* olup, hücrede *ccaR* yokluğunda 2212- (T_{15}), 1718 (T_{24})- ve 1291(T_{36})- misli daha az oranda ifade edilmiştir ($p < 0.001$). Sefamisin C gen kümesinin CcaR tarafından kontrolü, örneğin fermentasyonun 15. saati temel alındığında, en çok *lat* (2212 misli az), *cmcI* (1081 misli az), *cefF* (248 misli az), *blp* (225 misli az) ve *cefD* (205 kat az) ($p < 0.001$) genlerinin ekspresyon seviyelerinde gözlenmiştir. Benzer şekilde, *ccaR* geninin çoklu ifade edildiği rekombinant C11 suşunda *ccaR*, *cmcI* ve *lat* genlerinin ekspresyonları sırasıyla T_{15} ' de 2.4, 3 ve 2.6 kat ($p < 0.001$), T_{24} ' de sırasıyla 4.9, 4.5 ve 4.3 kat ($p < 0.001$), T_{30} ' da ise sırasıyla 5, 5.1 ve 3.2 katlık ($p < 0.001$) artışları göstermişlerdir. Ayrıca, bu rekombinantta, *lat* geni 4.3-, *cefD* geni 2.7- ve *blp* geni 4.3-katlık ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) artış göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, *pcbR* geninin ekspresyonu rekombinant suşda T_{15} ' de 3.2-kat daha yüksektir. qRT-PCR verileri CcaR aktivatörünün *lat*, *cefD-cmcI*, *blp*, *cefF* ve *ccaR* promotor bölgelerine bağlandığının gösterildiği EMSA deneyleri ile desteklenmiştir. Karşılaştırmalı proteom çalışmaları ile rekombinant C11 suşunda protein profilinin parental suşunkine kıyasla farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Biyoassay ve HPLC analizleri ışığında, *ccaR* geninin hücrede çoklu ifadesi her iki sekonder metabolitin üretiminde önemli bir artış sağlayarak biyoteknolojik açıdan etkin bir üretici suş geliştirilmesini sağlamıştır (sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinde sırasıyla 3.1 ve 3.59 katlık artış). Bu çalışmanın sonuçları, CcaR aktivatörünün sefamisin C kümesindeki genlerin ekspresyonları üzerindeki zamana bağlı etkisini ortaya koyan ilk raporu oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces clavuligerus*, sefamisin C gen kümesi, *ccaR* geni, regülasyon, qRT-PCR, EMSA, karşılaştırmalı proteom

ABSTRACT

Time-dependent expression profile of cephamycin C gene cluster in a *ccaR*-disrupted mutant and *ccaR*-overexpressed recombinant strain of *S. clavuligerus* as compared to those in the wild strain were analysed by RT-PCR and qRT-PCR. RT-PCR indicated three polycistronic and two monocistronic transcriptional units in the cephamycin C gene cluster and co-transcription of *cmcH* and *ccaR* genes identified for the first time in this work. The most drastic decline in the expression profile among cephamycin C genes of *ccaR*-mutant was detected in *lat* gene with a 2212-, 1718- and 1291-fold lower level of expression ($p < 0.001$) throughout the time course, it was followed by *cmcI*, *cefF*, *blp* and *cefD* genes that displayed as much as 1081-, 248-, 225-, 205-fold less expression ($p < 0.001$) in *ccaR*-minus strain at the 15th h of fermentation. Similarly, in C11 strain, *ccaR* and *cmcI* were the only genes that possess the highest expression levels with 5- and 5.1-fold increments ($p < 0.001$), respectively, at T₃₀. At T₁₅, *ccaR*, *cmcI* and *lat* genes expressed at 2.4, 3 and 2.6-fold higher levels in C11 strain ($p < 0.001$), respectively. The significant expression levels at T₂₄ were maintained by those genes with 4.9, 4.5 ve 4.3-fold relative increases ($p < 0.001$), respectively. Intriguingly, *pcbR* expression increased up to 3.2-fold at T₁₅ in the recombinant strain. qRT-PCR data was further confirmed by EMSA in which binding of CcaR to *lat*, *cefD*–*cmcI*, *blp* and *ccaR* promoter regions were shown. The differences in the protein profiles of the recombinant C11 and the parental *S. clavuligerus* cells were determined by comparative proteomics. Bioassay and HPLC analyses showed that *ccaR* overexpression from multicopy recombinant plasmid resulted in significant increases in cephamycin C (3.1-fold) and clavulanic acid (3.59-fold) yields, by making the respective recombinant strain as an attractive industrial strain. qRT-PCR data presented herein constitute the first report that reveal the effect of CcaR activator on the expression of cephamycin C genes of *S. clavuligerus* in a time-dependent manner.

Key words : *Streptomyces clavuligerus*, cephamycin C gene cluster, *ccaR* gene, regulation, qRT-PCR, EMSA, comparative proteomics.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. *Streptomyces* cinsi

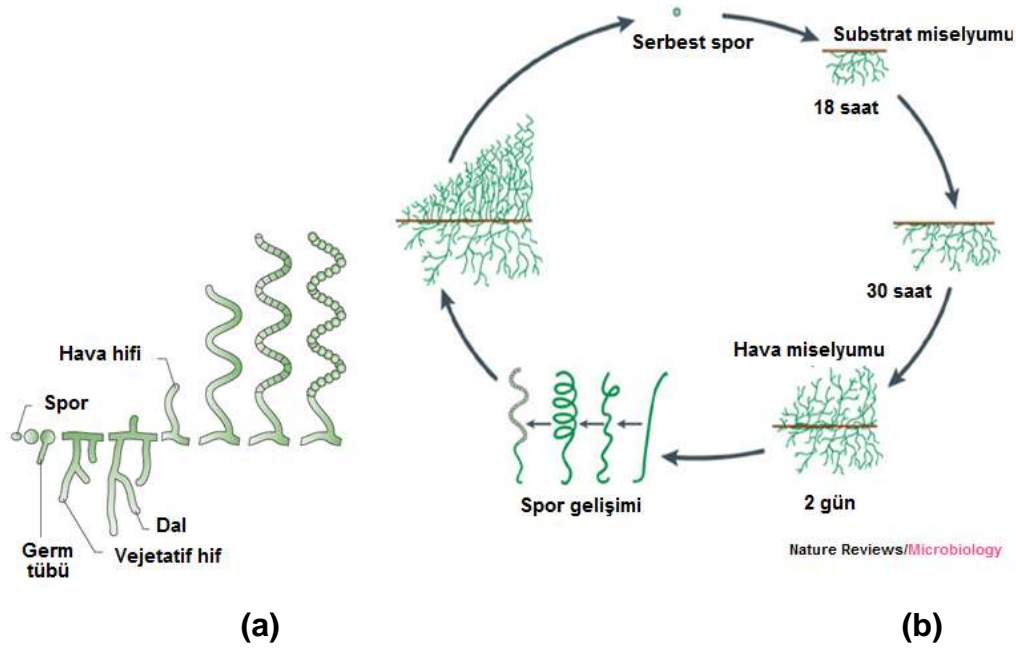
Streptomyces, Aktinomisetes üyesi olan göz alıcı bir cinstir. Gram-pozitif, filamentli, spor oluşturan ve zorunlu aerobik olan bu bakteriler yüksek G-C oranına sahip (%70-74) lineer kromozom taşırlar. Birçok streptomiset toprakta yaşayan saprofitik mikroorganizmalar olmakla birlikte, deniz ve tatlı su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

Tablo 1. 1. Bergey'in "Sistematik Biyoloji" el kitabına göre *Streptomyces* cinsinin sınıflandırılması

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

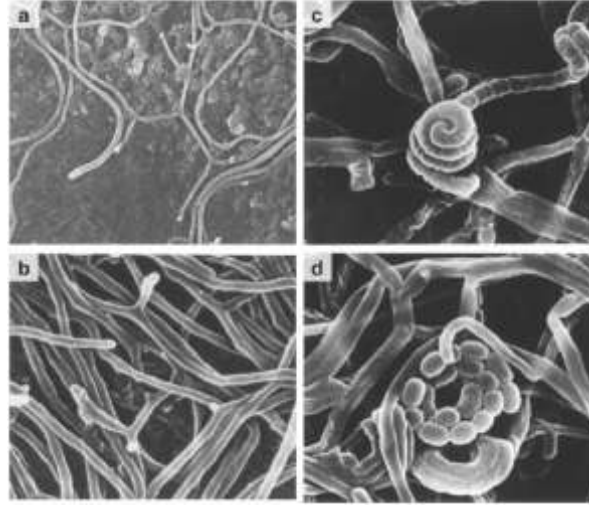
Streptomyces cinsi, diğer bakterilere kıyasla üreme ve gelişim biyolojisi bakımından oldukça farklıdır. Apikal büyüme, dallanma ve morfogenezleri filamentli funguslara benzemektedir. Kompleks yaşam döngüsü dört basamağa ayrılır: (i) serbest sporun çimlenmesi, (ii) vejetatif misel üretimi, (iii), areal misellerinin gelişimi-çok çeşitli sekonder

metabolitleri üretme yeteneğinin kazanılması ve (iv) spor morfogenezi (Flärdh 2003; Goriely ve Tabor, 2003; Chater, 2006) (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. *S. coelicolor'* ait yaşam döngüsü. (a) Flärdh ve Buttner, 2009. (b) <http://twistedbacteria.blogspot.com/2007/08/streptomyces-theyre-twisted.html>

Sporlar uç uzantılarıyla çimlenerek uzun filamentli hifleri oluştururlar. Bu hifler besin içinde ve yüzeyinde büyüyerek dallanırlar ve substrat miselyumunu meydana getirirler (vejetatif üreme fazı). Bu fazı areal misellerinin gelişimi takip eder. Ardından, mikroorganizma bu gelişim basamağında besin yokluğu ve diğer sinyallere bağlı olarak katı besiyerinde sekonder metabolitleri üretir. Sıvı kültürlerde, sekonder metabolitlerin üretimi genellikle üremenin durgunluk fazıyla sınırlıdır ve bu durum çoğu kez besin sınırlanmasının bir göstergesi olarak kabul edilir. Yaşam döngüsü, areal hiflerinin hücre bölünmesi ve serbest sporları oluşturması ile sonlanır (Goriely and Tabor, 2003; Bibb, 2005; Flärdh ve Buttner, 2009; Chater ve ark., 2010) (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2. *S. lividans*' a ait koloni gelişim safhalarının taramalı mikroskop altında görünümü (a) Genç vejetatif misel, (b) areal dalları oluşturan olgun vejetatif miseller (c) prespor formunu veren areal hifleri, (d) olgun spor zincirleri (Hopwood, 2006).

Streptomyces spp., antibakteriyel ve antifungal özellikteki antibiyotikleri, sideroforları, antitumor ajanlarını, bitki büyümesini uyarıcı faktörleri, herbisitleri ve immunosupresörleri içeren biyolojik açıdan aktif sekonder metabolitleri, ve ayrıca, enzim ve enzim inhibitörlerini üretebilme yeteneğinden dolayı çok iyi bilinen bir cinstir. Bu zamana dek keşfedilmiş olan tüm sekonder metabolitlerin % 66' sı aktinomisetler ve bunların % 70 ila 80' i *Streptomyces* cinsi tarafından üretilmektedir (Challis ve Hopwood, 2003). Streptomisetlerin karakteristik misel gelişimi, endüstriyel amaçlı sekonder metabolit üretimi sırasında yapılan fermentasyon çalışmalarında verimliliği önemli derecede etkilemektedir (Fladth, 2003).

Aktinomiset genomu 5 ila 10 megabaz (Mb) büyüklüğünde olup DNA larının % 5 ila 10' u sekonder metabolitlerin üretiminde rol oynamaktadır (Baltz, 2008). Büyük lineer kromozomlarının varlığı streptomisetlerin bir diğer dikkat çekici özelliklerindedir. Bu kromozomlar yapısal genlerden oluşan bir "öz" kısmı ve horizontal gen transferi ile kazanılmış genlerin bulunduğu iki "kol" kısmından meydana gelmiştir. Ayrıca, *Streptomyces*' te 12 kb' dan yüzlerce kilobaz (kb) büyüklüğünde olabilen dairesel ve lineer plazmidler bulunmaktadır, ve lineer plazmidler sekonder metabolit üretiminde rol almaktadırlar (Chater ve Hopwood, 1993; Chang ve Cohen, 1994; Kieser ve ark., 2000). *Streptomyces*' te replikasyon *oriC* adı verilen tipik bir merkezi orijinden iki yönlü olarak gerçekleşir. Lineer plazmid ve kromozomların replikasyonu sırasında kesintili zincirdeki ikileşme olayını bu zincirin 5' ucunda bulunan terminal proteinin varlığı devam ettirmektedir. Buna ilaveten, lineer kromozom ve plazmidlerin her iki ucunda, büyüklüğü 1 ila 550 kb arasında değişen ve

palindromik dizilerden meydana gelmiş terminal tekrarlar (terminal inverted repeats-TIRs) bulunmaktadır (Huang ve ark., 1998; Hopwood, 2006). *Streptomyces* lineer kromozumunda, TIR' ler yardımıyla uç bölgelerindeki nükleotid dizilerinde gerçekleşen rekombinasyonun ardından devingen düzenlenmeler sonucunda dairesel kromozomların meydana geldiği ve ayrıca oransız (farklı) crossing over yoluyla büyük terminal kopmalar ve çoğalmalar gerçekleştiği belirlenmiştir (Volf ve Altenbuchmer, 1998).

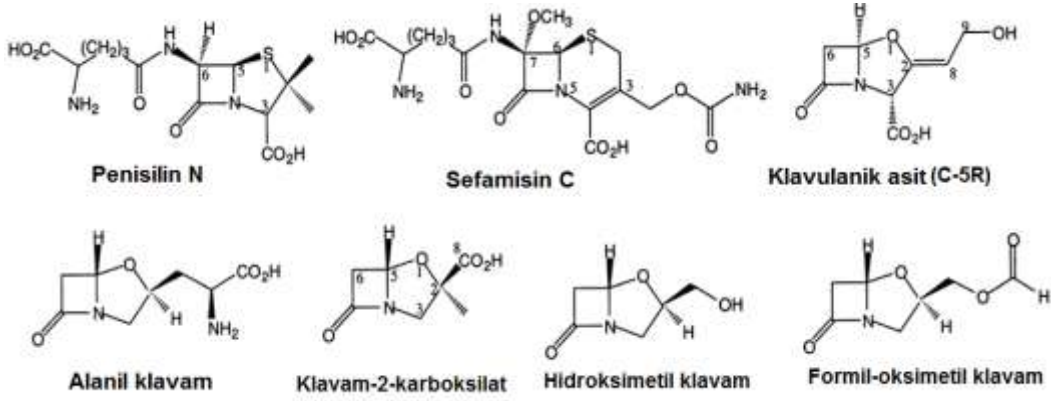
Streptomyces spp. çok güçlü restriksiyon bariyerlerinin varlığı nedeniyle transformasyonu oldukça güç olan bir cinstir. Bu restriksiyon modifikasyon sistemi farklı bakterilere ait DNA' nın *Streptomyces* konakçısına transferini zorlaştırır (Matsushima ve ark., 1987).

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

1.2. Biyoteknolojik açıdan önemli bir β -laktam üreticisi olan *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*)

S. clavuligerus ilk olarak Güney Amerika' da izole edilmiştir. Kulup şeklindeki yan zincirlerinin varlığından dolayı "küçük kuluplar taşıyan" anlamını taşıyan "*clavuligerus*" adını almıştır. Bu tür; Tarımsal Araştırma Servisi Koleksiyonu tarafından NRRL3585 ve Amerikan Tip Kültür Koleksiyonunda ise ATCC27064 olarak kayıt altına alınmıştır. Tip suş NRRL3585 (=27064)' dir (Higgins ve Kastley, 1971).

30 yıldır antibiyotikler üzerinde devam etmekte olan araştırmalar sonucunda, *S. clavuligerus* türünün sayısı 20' yi aşan oldukça değerli sekonder metabolitleri (örneğin, β -laktam antibiyotikleri, antitümör ajanları, antifungaller and β -laktamaz- inhibitörleri) üretebilme yeteneği nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar açısından yaşamsal öneme sahip bir mikroorganizmadır. *S. clavuligerus*, sülfür taşıyan β -laktam antibiyotiklerinden sefamisin C, deasetoksisephalosporin C, sefamisin C yolağında bir ara ürün olan penisilin N ve oksijen içeren β -laktamaz inhibitörü olan klavulanik asidi, ve diğer birçok klavamları üretir (Thai ve ark., 2001) (Şekil 1.3).



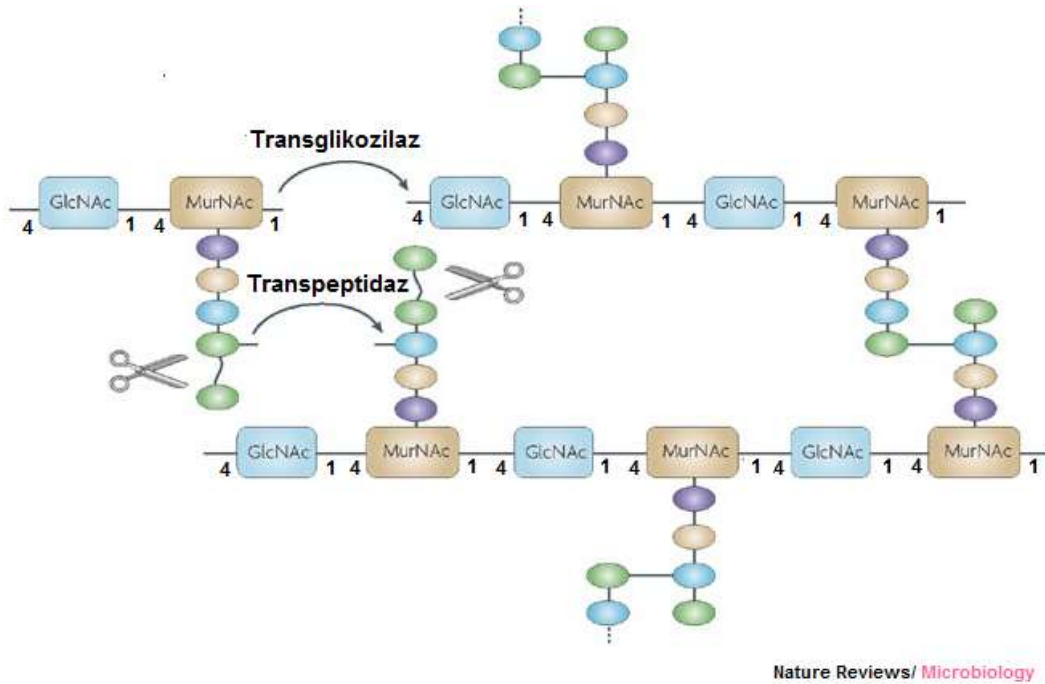
Şekil 1. 3. *S. clavuligerus* tarafından üretilen β -laktam bileşikleri (Thai ve ark., 2001).

Bir diğer β -laktamaz-inhibitör proteini (BLIP) ve BLIP-homolog proteini (BLP) *S. clavuligerus* tarafından üretilen sekonder metabolit listesinde yer almaktadırlar (Pérez-Llarena ve ark., 1997b; Thai ve ark., 2001; Santamarta ve ark., 2002). Bu tür bileşiklerin üretimi, bakterilerin doğal ortamlarındaki zor koşullara karşı hayatta kalmalarını sağlayan bir avantajdır (Demain, 1989). Klavam-2-karboksilat, 2-formilmetilklavam, 2-hidroksimetilklavam, hidroksimetilklavam ve alanilklavam gibi 5S klavam bileşikleri β -laktamaz-inhibitör aktivitesinden yoksundurlar ancak, antifungal ve antibakteriyel aktiviteler gösterirler. Ayrıca, *S. clavuligerus* pirotin yapısında bir antitümör ajanı olan holomisin ile glükozamin içeren bir antibiyotik olan tunikamisin üretilmektedir (Fuente ve ark., 2002; Liras ve ark., 2008; Huang ve ark., 2011).

1.3. β -laktamlar; biyoteknolojik açıdan ilgi çekici antibiyotikler

Antibiyotikler küçük molekül ağırlıklı sekonder metabolitler olup bakteriler, filamentli funguslar ve bitkiler tarafından üretilmektedirler (Fabbretti ve ark., 2011). Bilinen tüm antibiyotikler arasında β -laktamlar, yüksek antibakteriyel kapasiteleri ve düşük orandaki toksisiteleri dolayısıyla insan sağlığı için oldukça büyük önem taşırlar. Başlıca dört ana kategoriye ayrılırlar (i) penisilin türevleri (penamlar), (ii) sefalosporinler (sefemler), (iii) monobaktamlar and (iv) karbapenemler. 2003 yılında Elander, β -laktam antibiyotiklerinin, bilhassa penisilin ve sefalosporinlerin, dünyanın antibiyotik marketinin yaklaşık % 65' ini oluşturan büyük bir endüstrinin sahibi olarak biyoteknolojinin altın değerinde ürünleri olduğunu belirtmektedir. Penisilin sentezi funguslara (*Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus nidulans*) özgü iken sefalosporin üretimi fungus (*Acremonium chrysogenum*) ve bakteriler (*S. clavuligerus*) için ortak bir prosestir.

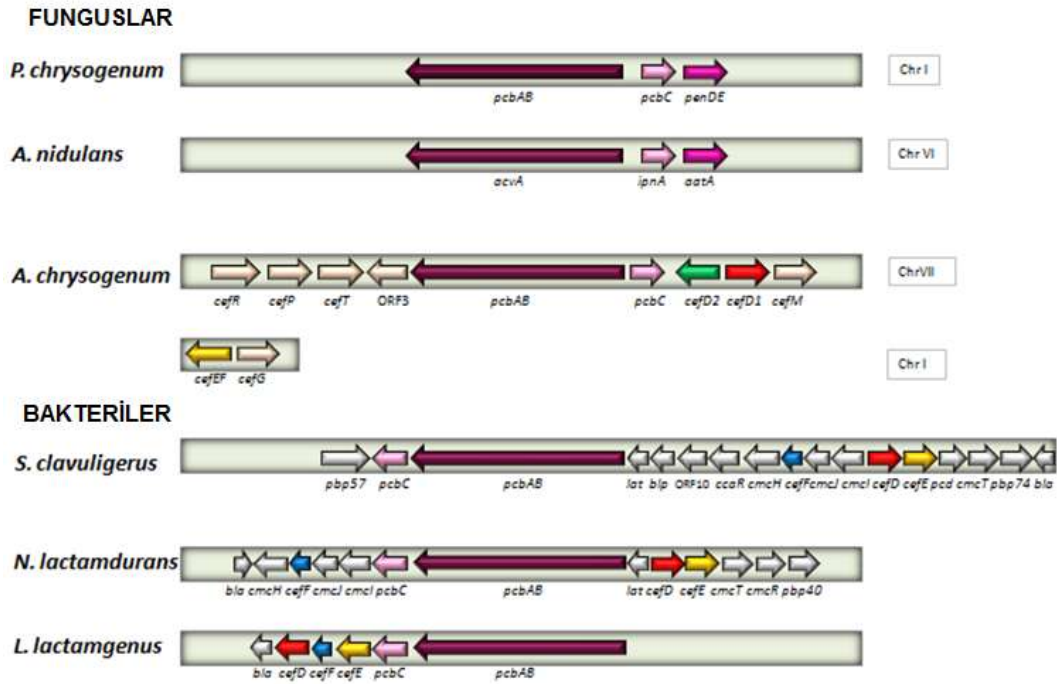
Bakteri hücre duvarı peptidoglikan tabakasından meydana gelmektedir. Yanyana olan peptidler arasındaki çapraz bağlar transpeptidaz enziminin aktivitesi ile sağlanır. Bunun yanında, yeni oluşan peptidoglikan tabakasına N-asetilglukozamin β -1,4-N-asetilmuramil-pentapeptit- pirofosforil- undekaprenol birimleri transglikozilasyon reaksiyonu ile eklenir. β -laktam antibiyotikleri yalancı substrat olarak rol oynayarak transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin substratını hedef alırlar, böylelikle, enzimin aktif bölgelerini açillerler ve normal kroslink reaksiyonunu engellerler. Sonuç olarak, hücre duvarının yapısal bütünlüğü bozularak bakterinin ozmotik lizisi gerçekleşir (Walsh, 2000) (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4. Hücre duvarı yapısı (Thanbichler ve Lucy Shapiro, 2008).

β -laktam biyosentezinde rol oynayan genler üretici organizmada kümeler halinde organize olmuşlardır. Genel olarak, β -laktam biyosentezine ait genler ve enzimler prokaryotik ve ökaryotik üreticilerde dikkat çekici bir şekilde iyi korunmuşlardır. Şaşırtıcı olan, β -laktam biyosentezinde yer alan enzimlerin yüzde olarak amino asit özdeşliği primer metabolizmada yer alan enzimler arasındaki aminoasit özdeşliğinden daha yüksektir. Son yıllarda, birçok araştırmacı şu soruya odaklanmıştır: β -laktam gen kümelerinin atası fungus mu yoksa bakteri orjinli midir? Genom dizilemeyle elde edilen yeni bilgilerin devamında iki hipotez gelişmiştir: (i) yatay gen transferi (HGT) (ii) genlerin dikey transferi. Buna bağlı olarak, antibiyotik biyosentezinde rol oynayan genlerin kümeler halinde genomda lokalize olmaları ve bazı biyosentetik genlerde intronların olmayışı bakteriden fungusa yatay gen transferi seçeneğini desteklemektedir. Bununla birlikte, bakteri genomunda bulunan küme-özümlenir regülatörlerin

aksine, funguslarda regülatörlerin küme-özgü olmayışı, genlerin ökaryotik sistemde ekspresyonunu mümkün kılmaktadır. Ayrıca, gen duplikasyonu yoluyla penisilin üretmeyen filamentli fungusların genomunda *penDE* (penisilin biyosentezinde rol alan biyosentetik bir gen) gibi bazı genlerin paraloglarının keşfedilmesi β -laktam kümelerindeki biyosentetik genlerin regülatör genleri olmadan funguslara aktarılabilecek olması hipotezi desteklemektedir (Brakhage ve ark., 2005; Brakhage ve ark., 2009; Garcia-Estrada ve ark., 2010). Funguslarda ve bakterilerdeki β -laktam gen kümeleri Şekil 1.5’ de gösterilmektedir.



Şekil 1. 5. Fungus ve bakterilerde β -laktam gen kümeleri ve lokasyonları

Uzun süreli ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı, yeni β -laktamazların üretilmesi ya da mevcut olanların modifiye edilmesi sonucunda penisiline dirençli suşların doğuşunu beraberinde getirmektedir. Bundan dolayı, yeni keşfedilen antibiyotiklerin sayısının piyasada düşmesine rağmen, orjinal antibiyotiklerin keşfine ve aynı zamanda yeni nesil sentetik ya da semisentetik antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik yatırımlar dünya çapına devam etmektedir (Baltz, 2008; Gomez-Escribano ve Bibb, 2011). Bu arada, β -laktamlar halen daha enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdir. Çünkü ökaryotik hücreleri etkilemeden spesifik olarak prokaryotların peptidoglikan sentezini hedef alırlar (Brakhage, 1998; Glazer ve Nikaido, 1998).

β -laktama dirençli bakteriler tüm β -laktam antibiyotiklerin yapısında bulunan β -laktam halkasının amid bağıını hidrolize eden β -laktamaz enzimlerinin sentezleme yeteneğine sahiptirler (Matagne ve ark., 1999; Öster ve ark., 2006). Sefamisin C ekstraselüler ve ikinci-nasil bir 7-metoksi-sefalosporin' dir. Sefalosporin çekirdeğinin 7. pozisyonunda bulunan metoksil grubu sayesinde hücre duvarı sentezinde rol alan transpeptidazlar üzerindeki inhibitör etkisini arttırarak β -laktamazlar tarafından inhibisyonlarını güçleştirirler. Bu sayede gram negatif ve anaerobik patojenlere karşı aktivitelerini arttırırlar. Bu durum, sefamisin C' yi klinik açıdan önemli bir antibiyotik yapmaktadır. Sefamisin C, penisilin ve sefalosporine dirençli birçok bakteri üzerinde etkindir (Stapley ve ark., 1979; Glazer ve Nikaido, 1998). Diğer taraftan, klavulanik asit, *S. clavuligerus* tarafından üretilen zayıf antibakteriyel etkili ancak oldukça güçlü bir β -laktamaz inhibitörüdür. İlaç bileşiminde β -laktam antibiyotiklerinin ve β -laktamaz inhibitörlerinin birlikte kullanımı enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde üstün bir etki sağlar. Doğada, sadece sefamisin üretebilen başka aktinomiset grubu bakteriler bulunmakla birlikte (örneğin, *Nocardia lactamdurans* ve *S. griseus* NRRL 3581), literatürde sadece klavulanik üreticisi bir bakteri kaydı yoktur. Nitekim, *S. clavuligerus* tarafından sefamisin C ve klavulanik asidin birlikte üretilmesi aynı ekolojik nişi paylaşan β -laktama dirençli bakterilere karşı rekabetinde başarılı olmasını sağlar (Challis ve Hopwood, 2003). Klavulanik asit serin tipi (veya A, C ve D sınıfı) β -laktamaz ailesinin bir üyesidir. Potasyum klavulanat formu amoksisilin ile birlikte Augmentin™ ve tikarsilin ile birlikte Timentin™ formülasyonunda yer alır (Watve ve ark., 2000).

1.4. Sefamisin C Biyosentezi

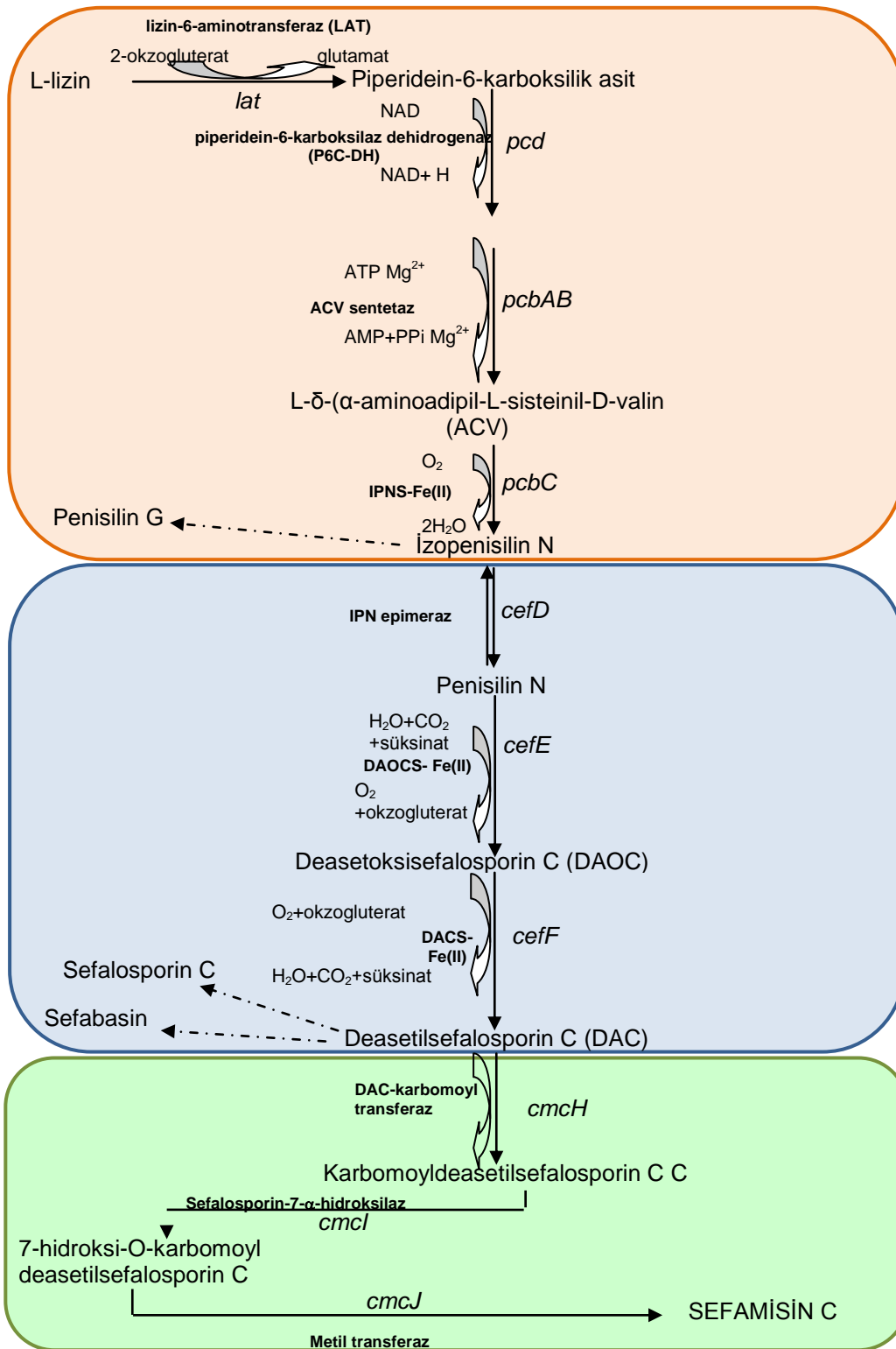
Sefamisin C biyosentezi penisilin ve sefalosporin biyosentezleri ile ortak ve ayrıca kendine özgü basamaklardan meydana gelen bir metabolik yolla gerçekleşir (Aharonowitz ve ark., 1992; Liras, 1999) (Şekil 1.6). Bu metabolik yolun ilk basamağında gerekli olan öncül amino asit L- α -aminoadipik asit, diğer iki öncül aminoasitler olan L-valin ve L-sistein' den farklı olarak aspartat metabolik yolu ile sentezlenen lizinin iki aşamalı modifikasyonu ile oluşur: *lat* geni tarafından kodlanan lizin-6-aminotransferaz tarafından katalizlenen deaminasyon ile lizinden oluşan 1-piperidein-6-karboksilik asit (P6C) (Madduri ve ark., 1989, 1991; Tobin ve ark. 1991, Coque ve ark., 1991) *pcd* geninin kodladığı piperidein-6-karboksilat dehidrojenaz (P6C-DH) enzimi tarafından L- α -aminoadipik aside dönüştürülür (Perez-Llarena ve ark. 1997; Alexander ve Jensen, 1998). Bu nedenle LAT ve PCD aktiviteleri sefamisin biyosentezindeki ilk iki basamak olarak ele alınmaktadır (Alexander ve ark., 2007). LAT enzimi ve onu kodlayan *lat* geni β -laktam üreten aktinomisetlere özgü olduğundan, yeni β -laktam üreticilerinin tespitinde önemli indikatörlerden biri olabilirler (Liras ve Martin, 2006). *lat* geninin *S. clavuligerus* kromozomuna entegrasyonu sonucunda elde

edilen rekombinant suşun sefamisin C üretiminde 2- ile 5-katlık bir artış sağlanmıştır, bu artış, LAT enziminin sekonder metabolit üretimindeki hız-sınırlayıcı özelliğini sergilemektedir (Malmberg ve ark., 1993; Khetan ve ark., 1999).

Ardından, *pcbAB* geni tarafından kodlanan δ -(L- α -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin (ACV) sentetaz enzimi, L- α -aminoadipik asit, L-sistein ve L-valin amino asitlerinin ATP varlığında kondenzasyonu ile L- α -aminoadipil-L-sisteinil-D-valin (LLD-ACV) tripeptidini meydana getirir (Tobin ve ark., 1991; Coque ve ark., 1991; Coque ve ark., 1996). Devamında, β -laktam ve tiazolidin halkaları *pcbC* geni tarafından kodlanan ACV siklaz (ya da izopenisilin N sentaz) enzim aktivitesi ile oluşmakta ve zayıf antibiyotik aktiviteli ilk ara ürün olan izopenisilin N (IPN) meydana gelmektedir (Jensen ve ark. 1986; Leskiw ve ark. 1988; Coque ve ark. 1991).

Metabolik yolun devamındaki üç basamak sefalosporin C üreten *Cephalosporium acremonium*'daki basamaklarla aynıdır. İlk olarak *cefD* geninin kodladığı izopenisilin N epimeraz (IPN epimeraz) (Usui ve Yu, 1989; Laiz ve ark. 1990) enzimi ile IPN'nin L- α -aminoadipil lateral zincirinin D konfigürasyonuna rasemasyonu sonucunda penisilin N oluşur. Penisilin N'nin tiazolidin halkası penisilin ekspandaz ya da diğer adıyla deasetoksisefalosporin C sentetaz (DAOCS) (Jensen ve ark. 1985) tarafından altı-üyelik dihidrotiazin halkasına genişler ve sefalosporinin ilk ara ürünü olan deasetoksisefalosporin C (DAOC) meydana gelir. DAOC, *cefE* geni tarafından kodlanmaktadır (Kovacevic ve ark. 1989, 1990; Coque ve ark., 1991). Sefalosporin ve sefamisin biyosentezinde ortak olan son basamak, DAOC'nin C-3' grubunun DAOC hidroksilaz tarafından hidroksillenmesi ve deasetilsefalosporin (DAC)'nin oluşmasıdır. Bu fonksiyonda rol alan enzimi kodlayan gen *cefF*'dir (Kovacevic ve Miller, 1991).

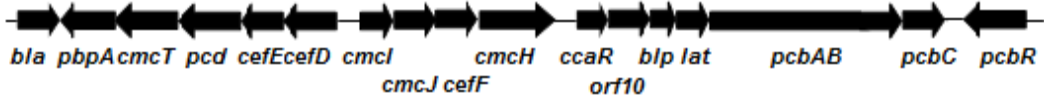
Sefamisin C biyosentezinin kendine özgü basamakları karbomilasyon ve metoksilasyon reaksiyonlarını içerir. *cmcH* geni tarafından kodlanan DAC karbamoil transferaz enzimi bir karbamoil grubunun deasetilsefalosporin C'nin C-3 hidroksil grubuna transferini katalizleyerek O-karbamoil-deasetil-sefalosporin C (OCDAC) (Brewer ve ark., 1980; Coque ve ark., 1995b; Alexander ve Jensen, 1998) ürününün oluşumunu sağlar. Ardından, OCDAC'ye metoksil grubunun eklenmesi için öncelikle bu ürünün β -laktam halkasının C-7 pozisyonunun *cmcI* geninin kodladığı sefalosporin-7- α -hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesi gerekmektedir. Son olarak, *cmcJ* nin kodladığı enzimle yeni hidroksil grubu eklenen C-7'ye metil grubu transfer edilir (Xiao ve ark., 1993; Coque ark., 1995a; Enguita ark., 1996; Alexander ve Jensen, 1998).



Şekil 1. 6. *S. clavuligerus*' ta sefamisin C biyosentez yolu (Tyker ve Nielsen, 2003; Öster, 2006).

1.5. Sefamisin Gen Kümesi

Sefamisin C gen kümesi yaklaşık 38 kb büyüklüğündedir (Şekil 1.7) ve kromozomda klavulanik asit gen kümesinden 1.4 Mb uzaklıktadır. Her iki gen kümesi 60 kb'lık "β-laktam süperkümesi" ni oluşturmaktadırlar. Sefamisin C gen kümesi farklı görevlere sahip enzimleri kodlayan onaltı genden meydana gelmiştir. Bu gen kümesi, biyosentetik enzimleri kodlayan genlere ilaveten metabolitin toksik etkisine karşı hücreyi koruyucu ve de bu metabolitin hücre dışına salınımı için gerekli proteinleri kodlayan genleri içermektedir (Tablo 1.2) (Ward ve Hodgson, 1993).



Şekil 1. 7. *S. clavuligerus*' ta sefamisin C gen kümesi (Liras, 1999).

Tablo 1. 2. Sefamisin C kümesindeki genler ve fonksiyonları

İsim	İşlev	Referans/NCBI'da erişim nol (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
<i>bla</i>	β-laktamaz sınıf A	Perez-Llarena ve ark., 1997/ Z54190; Alexander&Jensen1998/ AF073895
<i>pbpA</i> (<i>pbp74</i>) <i>/pbp2</i>	Penisilin bağlanma proteini	Perez-Llarena ve ark., 1997/AJ001743
<i>cmcT</i>	Varsayılan sefamisin C transportörü	Perez-Llarena ve ark., 1997/AJ001743
<i>pcd</i>	Piperidin 6-karboksilaz dehidrojenaz	Alexander&Jensen 1998/AF073895 Perez-Llarena ve ark., 1997/AJ001743
<i>cefE</i>	Penisilin N ekspandaz	Alexander&Jensen 1998/AF073895 Perez-Llarena ve ark., 1997/AJ001743
<i>cefD</i>	Izopenisilin N epimeraz	Kovacevic ve ark., 1990/M32324
<i>cmcI</i>	OCDAC hidroksilaz	Alexander&Jensen,1998/AF073896 Alexander&Jensen,1998/AF073896
<i>cmcJ</i>	OCDAC metil transferaz	Kovacevic ve Miller,1991/M63809
<i>cefF</i>	DAOC hidroksilaz	Alexander&Jensen, 1998/AF73897
<i>cmcH</i>	DAC karbomoyl transferaz	Perez-Llarena ve ark.,

<i>ccaR</i>	Sefamisin C-klavulanik asit gen kümelerinin aktivatörü	1997/Z81324; Alexander&Jensen, 1998/AF73897 Perez-Llarena ve ark., 1997/Z81324; Alexander&Jensen, 1998/AF73897
<i>orf10</i>	Bilinmiyor	Perez-Llarena ve ark., 1997/Z81324
<i>blp</i>	β -laktamaz inhibitör proteini	Wu ve ark., 2004/AY742798; Tobin ve ark., 1991/M64834; Yu ve ark., 1994/U12015
<i>lat</i>	Lizin 6 $\epsilon\alpha$ aminotransferaz	Tobin ve ark., 1991/M64834; Yu ve ark., 1994/U12015
<i>pcbAB</i>	ACVS [δ -(L- α -Aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin- sentetaz]	Yu ve ark., 1994/U12015; Tobin ve ark., 1991/M64834
<i>pcbC</i>	İzopenisilin N sentetaz	Leskiw ve ark., 1998/A01132
<i>pcbR(pbp57)</i>	Penisilin bağlanma proteini	Jensen ve ark., 2000/ U87786

S. clavuligerus kromozomunda sefamisin C gen kümesi *bla* geni ile başlamaktadır. *bla* geni 332 amino asitlik ve 35 kDa büyüklüğünde olan A sınıfı bir β -laktamaz enzimini kodlar (Perez-Llarena ve ark. 1997a; Liras, 1999). *bla* geninin *S. clavuligerus* kromozomunda yok edilmesi, katı besiyerinde penisilin G ve sefalosporine dirençte ve de sefamisin ve klavulanik asit üretiminde herhangi bir değişikliğe neden olmazken sporlanmanın erken başlamasına ve morfolojide ufak değişikliklere yol açmaktadır. Penisiline bağlanabilme yeteneği ve de zayıf aktivitesi nedeni ile bu enzimin penisilin-bağlama proteinine (PBP) benzer bir şekilde hücre duvar morfogenezinde rol aldığı ileri sürülmektedir (Thai ve ark., 2001).

Diğer taraftan, sefamisin C gen kümesinin en sonunda ve klavulanik asit gen kümesine dahil olan *ceaS2* geninden hemen önce yer alan *pcbR* geni (*pbp57*) β -laktam dirençliliği için gerekli ve yüksek molekül ağırlıklı (57.3 kDa) B grubu bir PBP' yi kodlar (Paradkar ve ark., 1996). *pcbR* geninin kodladığı PBP, N-terminal bölgesinde bulunan 26 amino asitlik bölgeden membrana bağlanır. Aynı zamanda, yüksek molekül ağırlıklı PBP' lere özgü penisilin-bağlama motifininin de içinde yer aldığı dokuz korunmuş sekans bölgesine sahiptir. Bu nedenle, *pcbR* geninin varlığı bakterinin penisilin G ve sefalotine karşı direnci açısından önemlidir. Parental *S. clavuligerus*' ta *pcbR* geninin tahrip edilmesi öldürücüyken, sefamisin C üretemeyen *S. clavuligerus* mutantlarında penisilin G ve sefalotine karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) iki misli arttığı tespit edilmiştir (Liras, 1999). *S. clavuligerus*' ta *bla* geninin ardında yer alan ve zıt yönde transkript olan *pbpA* (*pbp74*) geni *pcbR*' in kodladığı PBP' ye benzer ve de tamamlayıcı fonksiyona sahip 696 amino asitten oluşan 74 kDa' lık ikinci bir PBP' yi kodlayan gendir. *pbpA* ve *pcbR* genleri sefamisin C gen kümesinin her iki ucunda bulunmaktadırlar. Muhtemelen, *pcbR* ve *pbpA* tarafından kodlanan

enzimler β -laktam antibiyotiklerine karşı bakterinin direncinde tamamlayıcı fonksiyona sahiptirler (Alexander ve Jensen, 1998).

Kromozomda *pbpA*'nın öncesinde yer alan gen *cmcT* geni, proton gradientine bağlı transportörlerin 14 büyük yardımcı süperfamilyasına ait olan putative eksport proteinini kodlar. 53 kDa ağırlığında ve 523 aminoasitten oluşan CmcT proteini dışa atma (efflux) pompası proteinlerine homoloji gösterir. Bu proteinleri kodlayan genlerin çoklu kopyaları direnç mekanizmasına katkıda bulunuyor olsa da CmcT' nin esas fonksiyonu, sefamisin hücre dışına transferinde rol almasıdır (Coque ve ark., 1993; Alexander ve Jensen, 1998). *cmcT* geni sefamisin C üreticisi diğer aktinomisetlerin DNA' sı ile hibridizasyon sinyalin vermediğinden sefamisin C' nin eksportunda görev alan genlerin β -laktam üreticileri arasında korunmuş olduğunu göstermektedir (Liras, 1999).

pcd tarafından kodlanan 56.2 kDa' lık P6C dehidrojenaz enzimi *cmcT* geninin üst kısmında yer alır. Daha önce ifade edildiği gibi, bu enzim LAT' ın aktivitesi ile lizinden türeyen bir ara ürün olan 1-piperidein-6-karboksilat (P6C)' den α -AAA oluşumunda rol alır (Alexander ve Jensen, 1998). Bu açıdan bakıldığında, semialdehid dehidrojenazlara büyük bir homoloji gösteren PCD proteinini kodlayan *pcd* geninin sefamisin C üretiminde rol oynayan temel genlerden biri olması beklenmektedir. Ancak, Alexander ve grubunun 2007 yılında *S. calvuligerus*' a ait *pcd* genini tahrip ederek yaptıkları çalışmada, *pcd::apr* mutant suşlarında sefamisin C üretiminin parental suş tarafından üretilen miktarın ancak %30-70' isine karşılık geldiğini göstermişlerdir. *pcd* mutanı, komplemantasyon sonrasında normal sefamisin üretimini geri kazanmıştır. Yapılan Southern analizleri bakteride *pcd* geninin bir tane olduğunu kanıtlamıştır. Bu sonuçlar şu şekilde yorumlanabilir; (i) *pcd* geni en azından kısmen sefamisin C üretiminde α -amino adipat oluşumunda görev alır, (ii) *pcd* mutasyonunun diğer genler üzerindeki olumsuz etkisi antibiyotik üretiminde azalmaya neden olabilir, (iii) P6C kendiliğinden ve düşük oranda α -amino adipata dönüşürken PCD sadece α -amino adipat oluşumunun verimliliğini artırıyor olabilir (Alexander ve ark., 2007).

pcd nin üst kısmında bulunan biyosentez genleri, *cefE*, *cefD*, *cmcI*, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* olup diğer biyosentetik genler olan, *lat*, *pcbAB* ve *pcbC*, gen kümesinde *cmcH* ve *pcbR* genleri arasında lokalize olmaktadır.

cefE ve *cefF* genleri tarafından kodlanan penisilin N ekpandaz ve deasetilsefalosporin S hidroksilaz enzimleri kofaktör olarak moleküler oksijen, Fe (II) iyonları, DTT ve α -ketoglutarata gereksinim duyan dioksigenazlardır. *cefE* ve *cefF* genleri birbirine oldukça benzer baz dizisine sahip olup daha önceki yıllarda farklı gruplar tarafından klonlanmışlar

(Kovacevic ve ark., 1989; Kovacevic ve Miller, 1991; Coque ve ark., 1993, 1996), *E. coli* ve diğer *Streptomyces* türlerinde gen ifadelerine bakılmış ve kodladıkları enzimler kısmen saflaştırılmıştır (Jensen ve ark., 1985; Baker ve ark., 1991). IPN epimerazı kodlayan *cefD* geni klonlanmış (Kovacevic ve ark., 1990; Coque ve ark., 1993a; Kimura ve ark., 1996) ve *E.coli* ve *S. lividans*' da gen ifadelerine bakılmıştır (Liras, 1999). Modifikasyon reaksiyonu ile daha kararlı ve endüstriyel açıdan önemli bir antibiyotik olan penisilin G halka oluşumunun gerçekleşmesini sağlayan *cefE* geninin (Cho ve ark., 1998) aktivitesinin artırmak için random mutajenez çalışmaları yürütülmüştür (Wei ve ark., 2003; Wei ve ark., 2005).

cmcl, *cmcJ* ve *cmcH* genleri sefamisin C biyosentezinde son basamaklarda rol oynamaktadırlar. *cmcH* tarafından kodlanan 57 kDa' lık DAC karbomil transferaz enzimi, sefamisin C biyosentezinde karbomoylasyon reaksiyonunu katalizlemeden sorumludur. Bu reaksiyon sırasında deasetilsefalosporin C' nin C-3 hidroksil grubuna karbomoyl grubunun transferi gerçekleşmektedir (Coque ve ark., 1995b; Alexander ve Jensen, 1998). *cmcl* ve *cmcJ* genleri sırasıyla 28 kDa ve 32 kDa' lık proteinleri kodlamakta olup, 7 α -sefemetoksilasyon oluşumunda görev alırlar. Metoksilasyon kompleksi, Cmcl proteininin üzerindedir. *cmcl* tarafından kodlanan sefalosporin-7- α -hidroksilaz enzimi OCDAC'nin β -laktam halkasının 7. pozisyonunu hidroksiller ve *cmcJ* tarafından kodlanan metiltransferaz enzimi 7-hidroksi-O-karbomoyl deasetilsefalosporin C' nin C-7 pozisyonuna metoksil grubu ekleyerek sefamisin C' nin oluşumunu sağlar (Enguita ve ark., 1996; Öster ve ark., 2006). Coque ve ark., (1995) tarafından her iki geni içeren DNA fragmenti klonlanmış, *S. lividans*' da gen ifadelerine bakılmış ve oluşan transformantların sefalosporin C' yi sefamisin C' ye dönüştürebildikleri gösterilmiştir.

S. clavuligerus' a ait sefamisin C gen kümesinde sefalosporin-spesifik ve penisilin biyosentez genleri arasında *ccaR*, *orf10* ve *blp* genleri bulunmaktadır (Pérez-Llarena ve ark., 1997b). *ccaR* (*dclX*) 28 kDa' lık ActII-ORF4-benzeri SARP regülatör proteinini (**S**treptomyces-**A**ktivator **R**egülatör **P**roteini) kodlamaktadır (Liras, 1999; Liras ve ark., 2008). *blp*, 546 bç uzunluğunda ve *bli* geni tarafından kodlanan β -laktamaz-inhibitör proteini BLIP' ye benzer 33 kDa' lık BLP (**B**LIP **l**ike **p**rotein)' yi kodlamaktadır (Doran ve ark., 1990; Perez-Llarena ve ark., 1997b). Ancak, *bli* geni yok edilen *S. clavuligerus* mutantlarında β -laktamaz inhibitör aktivitesinin bulunamayışı, BLP' nin β -laktamaz-inhibitör aktivitesinin olmadığını ve sefamisin C kümesinde farklı bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (Thai ve ark., 2001). Bu gen tarafından kodlanan proteinin fonksiyonu henüz belirlenememiştir. Ayrıca, *blp* ve *orf10* genlerinin yok edildiği mutantların β -laktam üretimlerinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (Alexander ve Jensen, 1998).

lat geni ve ürettiği LAT enzimi sadece β -laktam üreten mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Bu açıdan, LAT aktivitesinin varlığı veya *lat* geni ile pozitif hibridizasyon, yeni β -laktam üreticilerini tespit etmede kullanılabilecek önemli indikatörler arasında yer alır (Liras ve Martin, 2006). *lat* geninin kodladığı LAT, sefamisin C metabolik yolunda hız sınırlayıcı bir enzimdir (Malmberg ve ark., 1993; Khetan ve ark., 1999). L-lizin, LAT için hem substrat hem de indükleyici olarak rol alarak antibiyotik üretimini iki yönde etkilemektedir (Rius ve ark., 1996). 1997 yılında Romero ve arkadaşları tarafından kısmen saflaştırılıp karakterize edilen LAT enzimi 51.3 kDa ağırlığında olup kodlandığı *lat* geni 1374 bç (M64834; AY742798; U12015) uzunluğundadır. *lat* geninin çoklu kopyasının *S. clavuligerus* kromozomuna aktarılması sefamisin üretimini 2-4 misli artırırken, *lat* geninde spesifik bir delesyon klavulanik asit üretiminde 2-2.5 katlık artışa yol açmıştır (Malmber ve ark., 1993; Paradkar ve ark., 2001). Bunun yanı sıra, *lat::apr* mutantına ait kültürlerde α -AAA ilavesi, düşük miktarda sefamisin C üretimini sağlamıştır (Alexander ve ark., 2000). LAT ekspresyonunun üremenin substrat miselyum fazında en yüksek seviyede olduğu, buna karşın areal misellerinin oluşum fazında hiç bulunmadığı tespit edilerek sefamisin C biyosentezinde öncül enzimlerden olduğu belirlenmiştir (Khetan ve ark., 2000). Yeşil flöresan protein (GFP) ile LAT füzyon protein sistemi sıvı ve katı besiyerlerinde üreyen *S. clavuligerus* misellerinde LAT aktivitesinin temporal ve spatial karakterini belirlemede hücre markörü olarak kullanılmıştır (Kyung ve ark., 2001).

S. clavuligerus' a ait *pcbAB* geninin kodladığı ACV sentetaz enzimi kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Jensen ve ark., 1990; Scwecke ve ark., 1992). *N. lactamdurans*' a ait *pcbAB* geni 11 kb büyüklüğünde olup 3' ucunda *pcbC* genine ait promotor dizisini içermektedir (X57310). Coque ve ark. (1996) *N. lactamdurans*' in *pcbAB* genini *S. lividans*' a aktarıp ACV sentetaz enzimini tam olarak saflaştırmışlardır. ACV sentetaz 3 fosfopanteteinlere kovalent olarak bağlanarak LLD-ACV' yi sentezlemektedir (Liras, 1999).

Jensen ve ark. (1986) tarafından saflaştırılan *pcbC* geninin kodladığı 329 aa' ten oluşan 37 kDa' lık ACV siklaz enzimi, aktivite gösterebilmek için moleküler oksijen ve demire ihtiyaç duymaktadır. IPNS moleküler oksijenden suyun oluşumuyla beraber peptidin dört hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile ACV' yi halalaştırıran olağandışı bir oksijenazdır (Liras, 1999). *ccaR* geni tahrip edilmiş *S. clavuligerus* mutantlarında ACV sentetaz ve ACV siklaz aktiviteleri yoktur (Alexander ve Jensen, 1998). Paradkar ve ark. (2001) içine apramisin dirençlilik geni sokmak sureti ile tahrip ettikleri *lat* mutantının LAT ve sefamisin C üretmediğini, buna karşın polar etkiden dolayı düşük seviyede ACVS ve IPNS aktivitelerinin mevcut olduğunu rapor etmişlerdir. Dışarıdan α -AAA ilavesi ile *lat::apr* mutantında düşük seviyede antibiyotik üretimi sağlanabilmiştir (Alexander ve ark., 2000).

Literatürde yayımlanan ve sefamisin C gen kümesindeki genlere ait sekans farklılıklarınının sekanslama hataları, allelik farklılıklar ya da iki farklı tip suş (NRRL 3585 ve ATCC 27064) oluşlarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Alexander ve Jensen, 1998) (Tablo 1.3 ve 1.4). Sözgelimi, *ccaR* ve *blp* genleri arasında yer alan ve iki araştırma grubu tarafından baz dizisi belirlenen *orf10* geni 1017 bp uzunluğundadır ve sadece 55. bazda (G/C) farklılık gösterir (Perez-Llarena ve ark., 1997b; Alexander ve Jensen, 1998). Yine, *pcbAB* genine ait N-terminal bölgesinin baz dizisi farklı araştırmacı gruplar tarafından farklı rapor edilmiştir (Tobin ve ark., 1991_879 bp_M64834; Yu ve ark., 1994_2415 bp_U12015). Literatürde *cmcT* genine ait farklı baz dizisi rapor edilmektedir. Alexander ve Jensen (1998) grubunun rapor ettiği sekans 1471 bp uzunluğunda olup Perez-Llarena grubunun (1997b) rapor ettiği sekansın (1572 bp) 110. bazından itibaren başlamaktadır. Baz dizileri arasında ilk 109 bazlık farklılığın yanısıra dokuz farklı pozisyonda değişik bazlar bulunmaktadır. Perez-Llarena (1997b) ve Alexander ve Jensen (1998) tarafından bildirilen *pcd* sekansları ise 5' kısmında özdeş olup karboksi terminal kısmındaki amino asit dizilimi tamamen birbirinden farklıdır (AJ001743; AF073895).

Tablo 1. 3. *ccaR*, *blp* ve *orf10* genlerinin *S. clavuligerus* NRRL3585 and ATCC27064 suşlarında sekanslarının karşılaştırılması

Sekans	Lokasyon	Karşılaştırma	
		Perez-Llarena ve ark. (1997) Erişim # Z81324	Alexander ve Jensen (1998) Erişim # AF73897
		ATCC27064	NRRL3585
<i>ccaR</i> üst kısmı	2278–2280	cc	ccc
	2356–2358	cc	ccc
	2450–2451	a	aa
<i>orf10</i> üst kısmı	3502-3503	c	cc
	3513	gg	g
	3643-3645	ccg	cgc
	3729-3730	gg	gc
<i>blp</i> aşağı kısmı	5754-5756	cc	ccc
	5761-5764	ggg	gggg
	5790-5791	g	gg
	5803-5804	c	cc

pbpA geni iki ayrı araştırma grubu tarafından sekanslanmış ve ATG başlangıç kodonu olarak iki farklı bölge gösterilmiştir. Buna göre, Perez-Llarena ve arkadaşları 1997 yılında *pbpA* geni *pbp2* adı ile 2091 bp' lik bir gen olarak sunarken Alexander ve Jensen ekibi 1998 yılında *pbpA* genini 1230 bp uzunluğunda olduğunu ve ATG başlangıç kodonunun *pbp2*' nin

862. bazından itibaren başladığını rapor etmişlerdir. Bu nedenle de, *cmcT* ve *pbpA* genleri arasındaki intergenik bölge sırası ile 332 bp ve 1537 bp uzunluğunda verilmiştir.

Tablo 1. 4. *S. clavuligerus* NRRL3585 ve ATCC27064'da sefamisin C kümesinin genler arası bölgelerindeki uzunluk farkları

Ara bölge	Uzunluk (bp)	Referans
<i>cmcH-ccaR</i>	915	Santamarta ve ark., 2002
<i>ccaR-orf10</i>	321	Alexander ve Jensen, 1998; Perez-Llarena ve ark., 1997
<i>orf10-blp</i>	346	Alexander ve Jensen, 1998; Perez-Llarena ve ark., 1997
<i>blp-lat</i>	~612	Alexander ve Jensen, 1998
<i>lat-pcbAB</i>	152-153	Tobin ve ark., 1991; Yu ve ark., 1994
<i>pcbAB-pcbC</i>	17-32-116	Petrich ve ark., 1992
<i>cefD-cmcl</i>		
<i>cmcl-cmcJ</i>	48	Alexander ve Jensen, 1998
<i>cmcJ-cefF</i>	96	Alexander ve Jensen, 1998
<i>cefF-cmcH</i>	~84	Alexander ve Jensen, 1998
<i>cefD-cefE</i>	78	Kovacevic ve ark., 1989
<i>cefE-pcd</i>	15	Perez-Llarena ve ark., 1997
<i>pcd-cmcT</i>	69-429	Perez-Llarena ve ark., 1997; Alexander ve Jensen, 1998
<i>cmcT-pbpA(2)</i>	332-1205	Perez-Llarena ve ark., 1997; Alexander ve Jensen, 1998

1.7. Sefamisin C kümesinin transkripsiyonel analizi

Northern ve Western blot analizleri, 5' prime ekstensiyon ve S1 nükleaz haritalama çalışmalarının temelinde, sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel organizasyonunu belirlemeye yönelik birçok çalışma yürütülmüştür (Petrich ve ark., 1994; Perez-Llarena ve ark., 1997b; Alexander ve Jensen, 1998; Liras, 1999; Alexander ve ark., 2000). *S. clavuligerus*' un sefamisin C gen kümesinde ardışık genler arasındaki geniş aralıklar promotörlerin yerleşmelerini sağlayacak büyüklüktedir. Bununla birlikte, sefamisin C biyosentezinin diğer bazı genler arası bölgeleri kısa olduğundan bu genlerin koordineli transkripsiyonunu mümkün kılmaktadır.

lat geni, translasyonun başlangıç kodununun 88 nükleotit yukarısında transkripsiyon başlangıç noktasına (tsp) sahiptir (Petrich, 1994). *lat* ve *pcbAB* genleri arasındaki 155 nükleotitlik bölgede promotör ya da tsp olmayıp ancak bir stem loop yapısı tespit edilmiştir. *lat* ve *pcbAB* genlerinin arasında yer alan bu yapı, transkripsiyonu RNaz aktivitesinden korumaya yönelik ya da normal üreme koşullarında antitümör regülasyonu rolüne sahip

olabilir (Alexander ve Jensen, 1998; Alexander ve ark., 2000). Sefamisin C biyosentezinin erken safhalarında görev alan *lat*, *pcbAB* ve *pcbC* genlerinin ayrı promotorlarla birbirlerinden bağımsız olarak transkript olduğuna dair olasılık, *lat* promotorundan yoksun ve gen içerisinde transkripsiyon terminatörü olan bir mutantın ($\Delta lat::tsr/term$) oluşturulup, TSBS besiyerinde üretilerek (72 saat), Western analizi ile proteinlerin ekspresyonlarının incelendiği bir çalışma sonucunda geçerliliğini yitirmiştir. Bu mutasyonun LAT ve ACVS üretimlerini engellediği ve *pcbC* geninin kodladığı ISPN üretimini büyük oranda azalttığı kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, *lat* promotorundan başlayan transkript 14 kb'lık *lat-pcbAB-pcbC* polisistronik transkriptini meydana getirmektedir. Aynı zamanda, *pcbC* geni kendi promotorundan monosistronik olarak da transkript olabilmektedir (Alexander ve ark., 2000). *pcbC* geninin transkripsiyon başlangıç noktası genin başlangıç kodonundan 91 nükleotit yukarıda, *pcbAB* geninin 3' ucunda 60. nükleotide karşılık gelen G bazıdır ve Northern analizinde 1.2 kb'lık mRNA sinyalini vermektedir (Liras, 1999; Petrich ve ark., 1992).

cefD ve *cefE* genleri 81 bç'lik intergenik bölge ile birbirlerinden ayrılırlar (Liras, 1999). TSB' de üreyen hücrelerden ekstrakte edilen mRNA' lar kullanılarak yapılan primer ekstensiyon analizleri, transkripsiyonun *cefD*' nin translasyon başlangıç noktasından 130 bç yukarisından başladığını göstermiştir (Kovacevic ve ark., 1990). Sefamisin C biyosentezinin ilk basamaklarında bulunan *pcd* geni metabolik yolun orta safhalarında yer alan enzimleri kodlayan *cefD* ve *cefE* genleri ile birlikte transkripte olmaktadır. TSB besiyerinde üretilen hücrelerle yapılan Northern blot analizinde 4.1 ve 2.1 kb'lık iki hibridizasyon sinyali alınmıştır. 4.1 kb'lık mRNA *cefD*, *cefE*, ve *pcd* genlerine ait iken, 2.6 kb'lık fragment sadece *cefD* ve *cefE* nin transkripsiyonunu ifade etmektedir (Perez-Llarena ve ark., 1997b). *cefD-cefE-pcd-cmcT* ve muhtemelen *pbpA* genlerinin polisistronik transkripsiyonu *cefD-cmcI* promotorunun kontrolündedir (Alexander ve Jensen, 1998). Sefamisin C' ye özgü genlerin transkripsiyonu iki ayrı polisistronik mRNA' dan gerçekleşir. *cmcI* ve *cmcJ* genleri 1.6 kb'lık mRNA transkripti olarak ortak transcript olarak, *cefF* ve *cmcH* genleri ise 2.8 kb'lık ve 4.1 kb'lık transkriptler olarak ekspres olurlar (Liras, 1999).

Monosistronik olarak transkribe edilen *ccaR* ve *blp* genleri Northern analizinde 0.9 ve 1.2 kb'lık hibridizasyon sinyalleri vermektedirler (Pérez-Llarena ve ark., 1997b). Bignell ve arkadaşları (2005), TSB kullanarak misellerden ve soy besiyeri kullanarak sporlardan ürettikleri kültürlerden izole ettikleri mRNA' larla Northern blot analizi yapmışlar, *ccaR*' in inkübasyonun geç saatlerine doğru sinyal gücü azalan ~1 kb'lık ve ~1.4 kb'lık transkriptler halinde ifade edildiğini göstermişlerdir. Wang ve arkadaşları (2004) tarafından *ccaR*' in gerçek başlangıç kodonunun ATG olduğu (GTG' den 18 nükleotit yukarıda) ve ayrıca bu genin ATG kodonunun 74 ve 173 bç yukarisında iki *tsp*' nin varlığı tespit edilmiştir.

Monosistronik olarak transkript olan *ccaR* tarafından kodlanan CcaR proteini hem kendi promotor bölgesine, hem de *cefD-cmcl* iki yönlü promotor bölgesine bağlanır. Bu şekilde CcaR, hem otoregülatör etkisi ile, hem de *cefD-cmcl* promotoru üzerindeki regülatör etkisi ile sefamisin C biyosentez yolunun erken (*pcd*), orta (*cefD*) ve ileri (*cmcl*) safhalarını pozitif biçimde kontrol eder.

Kullanılan besiyerinin içeriği, oluşan transkriptlerin miktarını ve büyüklüğünü etkilemektedir. Sözelimi, kimyasal içeriği belirli olan GSPG besiyerinde üreyen hücrelerden elde edilen mRNA' ların miktarları ve belirli bir gene ait transkript sayısı, çoğu kez zengin bir besiyeri olan TSB' de üreyen hücrelerdekinden daha azdır (Perez-Rodondo ve ark., 1998). Elde edilen deneysel veriler, TSB besiyerinde sefamisin C biyosentetik genlerinin tamamının esas olarak inkübasyonun 24-48. saatleri arasında ekspres olduklarını, en yüksek sefamisin C üretiminin ise inkübasyonun 50-60. saatleri arasında gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte, sırasıyla 1.9 ve 3.4 kb' lık fragmentler halinde transkribe olan *bla* ya da *cmcT* ve *pbpA* gibi genler 96 saatlik kültürlerde bile ifade edilebilmektedirler (Perez-Llarena ve ark., 1997b).

1.8. *S. clavuligerus*'da antibiyotik üretiminin regülasyonu: Global pleiotropik faktörler ve yolak-özü regülatörler

S. clavuligerus' ta antibiyotik üretiminin regülasyonuna dair gerek global seviyede gerekse metabolik yola özgün bilgiler elde edilmiştir. Sekonder metabolizmayı ve morfolojik farklılaşmayı kontrol eden pleiotropik regülatörleri kodlayan genler antibiyotik biyosentezinin aktivasyonunun en temel seviyesini oluşturmaktadırlar (Şekil 4) (Liras ve ark., 2008). *bld* genlerinin *S. coelicolor*' da sporulasyonu ve antibiyotik üretimini kontrol ettikleri bilinmektedir. ***bldA*** geni, nadir bulunan UUA kodonunun translasyonu için tRNA^{Leu} ni kodlamaktadır (Lawlor ve ark., 1987). *bldA* geni yok edilmiş mutantlarda tRNA^{Leu} üretilmemesi, undesikloprodigosin ve aktinorhidin üretimlerinin gerçekleşmemesine ve fenotipin değişmesine neden olmaktadır (Champness, 1988; White ve Bibb, 1997). *ccaR* regülatör geni TTA kodonu içerdiğinden *bldA*-bağımlı olması beklenmektedir. Ancak, *S. clavuligerus*' ta *bldA* geninin yok edilmesi, *ccaR* geninin transkripsiyonunu ve translasyonunu etkilemeyip, sefamisin C-klavulanik asit üretimlerinde de herhangi bir değişikliğe neden olmazken sadece sporlanmadan yoksun bir fenotip meydana getirmiştir (Trepainer ve ark., 2002).

S. clavuligerus' ta sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerini etkilediği rapor edilen ilk *bld*, ***bldG*** geni olup bir anti-anti sigma faktörünü kodlamaktadır. *ccaR* geninin ekspresyonu *bldG*' ye bağımlıdır (Bignell ve ark., 2000; 2005). Anti-anti sigma faktörlerinin görevleri hakkında bilinen, hedef sigma faktörünün aktivitesini düzenleyen bir anti-sigma faktörüne

yakın bir role sahip olduklarıdır (Duncan ve Losick, 1993). Anti-anti-sigma faktörü serin amino asitinin fosforlanması ile regüle edilir ve proteinin sadece fosforlanmamış formu anti-sigma faktörüne bağlanabilmektedir (Diederich ve ark., 1994).

Bir diğer *bld* geni olan ve TTA kodonu içeren *adpA*, *S. clavuligerus*' ta antibiyotik üretiminin pozitif modülatörü olan **AdpA** yi verir. qRT-PCR analizleri, $\Delta adpA$ mutant suşunda, *ccaR* ve *clavR* genlerinin ekspresyonlarının sırasıyla 6- ile 4- kat azaldığını ve sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinde düşüşe, ayrıca, besiyerine bağlı olarak seyrek oranda areal misellerinin oluşmasına ve de sporulasyonun gerçekleşmemesine yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, *adpA* geninin *S. clavuligerus* hücrelerinde çok kopyalı ekspresyonu antibiyotik üretimini arttırmıştır. AdpA' in regülatör etkisini, *cmcH-ccaR* ara bölgesinde ve de ARE kutusu ile *ccaR* geninin *tsp'* si arasındaki korunmalı bölgeler üzerinde gösterdiği düşünülmektedir (Lopez ve ark., 2010).

Antibiyotik biyosentez yolları çoğu kez biyosentetik gen kümelerine bağlı spesifik regülatör proteinler tarafından kontrol edilmektedirler (Liras, 1999). **S**treptomyces **A**ntibiyotik **R**egülatör **P**roteini (SARP) familyasına dahil regülatör proteinlere örnek olarak *S. coelicolor*' e ait aktinorhodin (Fernandez-Monero ve ark., 1991) ve undesikloprodigosin (Narva ve ark., 1990) biyosentez genlerinin transkripsiyonel aktivatörü olan *actII-ORF4* ile *S. hygroscopicus*' da bialofos biyosentez genlerinin transkripsiyonel aktivatörü olan *brpA* (Chater ve ark., 1993) örnek verilebilir. *ccaR* (**C**ephamycin C ve **C**lavulanik **A**cid **R**egülatör), SARP ailesinden pozitif *actII-ORF4*-benzeri transkripsiyonel aktivatörü kodlayan genidir. Ancak, rapor edilen diğer kros-komplementasyonlardan farklı olarak (Stutzman-Engwall ve ark., 1992) *ccaR*, *S. coelicolor*' ın *actII-ORF4* mutantını komplement etmez (Perez-Llarena ve ark., 1997b). CcaR, helix-turn-helix DNA bağlanma motifini içeren bilinen diğer regülatör proteinlerden farklı olarak OmpR-familyasından proteinlerin C-terminal uçlarındakine benzer bir N-terminal DNA bağlanma kısmına sahiptir. SARP familyasına dahil faktörlerin bazen yapısal genlerin -35 bölgeleriyle çakışan spesifik heptamerik sekanslarını tanımakta oldukları ileri sürülmektedir (Wietzorrek ve Bibb, 1997). Nitekim, *cefD* ve *cmcI*' nin ATG başlangıç kodonları arasındaki iki-yönlü bölgede ActII-ORF4 ve Dnrl tarafından kontrol edilen genlerde bulunana benzer SARP kutuları (bölgeleri) tespit edilmiştir (Santamarta ve ark., 2002). *ccaR* geninin tahrip edilmesi, sefamisin C üretimini ve aynı zamanda klavulanik asit ve diğer klavamların üretimlerini engellerken, *ccaR* geninin amplifikasyonu sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinde 2-3 katlık artışa neden olmaktadır (Pérez-Llarena ve ark., 1997b; Alexander ve Jensen, 1998).

LysR familyasından transkripsiyonel aktivatörlere benzerlik gösteren ve bir diğer regülatör gen olan *clbR* geninin kodladığı 47 kDa'lık ClbR proteini sadece klavulanik asit üretimi için gereklidir. *S. clavuligerus'* ta *clbR* geninin tahrip edilmesi sefamisin C biyosentezini etkilemezken, klavulanik asit üretimi son bulur. Bu mutant suşta klavulanik asit biyosentezinin son basamaklarındaki genlerin ekspresyonlarının gerçekleşmediği, ancak *ccaR* ekspresyonunun arttığı, qRT-PCR deneyleri ile ortaya konulmuştur (Martin ve Liras, 2010).

Farklı tip otoindükleyici regülatörlerin varlığına ilişkin literatürün yanısıra (Recio ve ark., 2004) aktinomisetlerde yaygın olduğu bilinen regülatörler, "mikrobiyal hormonlar" adı verilen ve antibiyotik üretiminin başlangıcında etkin olan γ -bütirolakton-tip otheregülatörlerdir (Folcher ve ark., 2001; Horinouchi, 2007). *S. clavuligerus'* tan klonlanan bütirolakton reseptörünü kodlayan ORF, önce *scaR* (Kim ve ark., 2004) ve ardından ***brp*** (Santamarta ve ark., 2005) olarak adlandırılmıştır. *S. clavuligerus* Δ *brp* mutantında sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinde artış görülen çalışmada sonuçlar *S. clavuligerus'* a ait *brp* geninin repressör rolü olduğuna işaret etmiştir (Santamarta ve ark., 2005). Bütirolakton reseptörlerinin bağlanması için spesifik olan sekansların ARE (**A**uto**R**egulatory **E**lement) kutuları adında palindromik dizilerden meydana geldikleri birçok *Streptomyces* türünde tanımlanmakla birlikte literatürde reseptörlerin bu dizilere bağlandıkları gösteren çok az sayıda çalışma mevcuttur (Horinouchi 2002; 2007). *S. clavuligerus'* ta Brp' nin hedefi olan iki ARE sekansı belirlenmiştir: buna göre Brp ya, (i) doğrudan kendi promotöründe bulunan ARE sekansına bağlanır (*S. coelicolor'* daki ScbR, *S. virginiae'* de BarA ve *S. lavendulae'* de FarA' da rapor edilen otheregülasyon), ya da (ii) *ccaR* transkripsiyon başlangıç noktasından 815 nükleotit yukarıda bulunan ARE sekansına bağlanır (Wang ve ark., 2004; Santamarta ve ark., 2005). Bir diğer ARE kutusu ise *adpA* geninin üst kısmında belirlenmiştir. *S. clavuligerus* Brp proteininin bu ARE kutusuna bağlanması EMSA analizi ile gösterilmiştir. Benzer şekilde, Brp' nin bağlanması *adpA* geninin transkripsiyonunu baskılar. Δ *brp* mutantında *adpA* ekspresyonunun 2.5 kata kadar arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *ccaR* ekspresyonu direkt olarak Brp tarafından ya da dolaylı olarak Brp-bağımlı AdpA regülatörü yoluyla kontrol edilmektedir (Lopez ve ark., 2010).

IcIR ailesine üye regülatör proteinlerden biri olan AreB (Molina-Heranes ve ark., 2006)' yi kodlayan *areB* geni lösin biyosentez yolunda *leuCD* kümesine zıt yönde farklı bir promotor bölgesinden ekspres olmaktadır. Hem kendi ekspresyonunda, hem de *leuCD* gen kümesinin transkripsiyonel regülasyonunda regülatör rolü üstlenir. Bununla birlikte, AreB, *S. clavuligerus'* ta lösin asimilasyonu, biyosentezi ve aynı zamanda yağ asidi asimilasyonunda

karbon kaynağı olarak gereklidir (Liras ve ark., 2008). *S. clavuligerus'* a ait $\Delta areB$ mutantında, sefamisin C ve klavulanik asit üretimleri ile *ccaR* geninin transkripsiyonunda küçük bir artış, ve fakat *brp* ekspresyonunda net bir azalma tespit edilmiştir. Bu geri düzenleme, AreB' nin *brp* yoluyla dolaylı modülasyon rolüne sahip olması şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, $\Delta areB$ mutantının karakterizasyonu, AreB' nin primer ve sekonder metabolizmayı birbirine bağlayan bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Nitekim, $\Delta areB$ mutantında, lösin biyosentetik genlerin ekspresyonlarının düşük seviyede oluşu, sefamisin C biyosentezi için gerekli olan valin öncülünün miktarında artışa neden olmaktadır. AreB proteinin sekonder metabolizmadaki rolü hakkındaki en dikkat çekici bulgu ise bu proteinin ARE sekansına bağlanmak üzere küçük bir moleküle gereksinimi olmasıdır. Bu küçük molekül kritik bir değere ulaştığında AreB' nin antibiyotik üretiminin modülasyonunda farklı bir etki gösterdiği öne sürülmektedir (Liras ve ark., 2008).

Hemen hemen tüm sekonder metabolit üreticilerinde "stringent response" adı verilen global kontrol ve bu kontrolün başlamasıyla artan ppGpp ve pppGp sinyal seviyeleri metabolit üretimini tetiklemektedir. RelA proteini tarafından yönetilen bu global kontrolü başlatan en önemli faktör olan besin açlığı koşullarına ve dolayısıyla artan ppGpp ve pppGpp seviyelerine üremenin durağan fazında ulaşılmaktadır. Ancak, *S. clavuligerus'* ta ppGpp seviyeleri ile antibiyotik üretimi arasında bir korelayon eksikliği olduğu bir çok çalışmada ortaya konulmuştur (Bascaran ve ark., 1991; Jones ve ark., 1996; Gomez-Escribano ve ark., 2006). Bu konuda gerçekleştirilen en yeni çalışmada, Gomez-Escribano ve arkadaşları (2008) elde ettikleri çeşitli *S. clavuligerus* $\Delta relA$ mutantlarında *cefD* ve *ceaS2* transkriptlerinin ana suştakinden oldukça yüksek miktarda olduğunu ve bu mutantlarda klavulanik asit üretiminin parental suşa göre 3 ila 4, sefamisin C üretiminin ise 2.5 misli fazla olduğunu göstererek bu organizmada (p)ppGpp'nin sekonder metabolizmayı negatif yönde regüle ettiğini kanıtlamışlardır.

1.9. *S. clavuligerus'*da sefamisin C biyosentezinin besinsel regülasyonu

S. clavuligerus' da besinsel regülasyon diğer aktinomisetler ya da funguslardaki kadar güçlü değildir. *S. clavuligerus* glukoz ve diğer hekzozlar olan pentoz, disakkaritler, şekeralkoller gibi basit şekerleri kullanamaz (Garcia-Dominguez ve ark., 1989). Çünkü, hücre içine glukoz alınımını sağlayan aktif transport sistemine sahip değildir. Bunun yanında, sukrozu kullandığı da tespit edilmemiştir. Kusurlu bir glukoz permeaz geninin oluşu bu fenotipin nedeni olabilir ve glukoz permeazın bu bakteride çalışır durumda olmaması onun glukozdan yoksun ortam koşullarına adaptasyonunun bir neticesi olabilir (Perez-Redondo ve

ark., 2010). Diğer taraftan, nişasta ve gliserol *S. clavuligerus* için uygun karbon kaynaklarıdır ve gerek sefamisin C gerekse de klavulanik asit biyosentezinde farklı etkiler gösterirler (Efthitoimu ve ark., 2008). Yüksek gliserol konsantrasyonu sefamisin C üretimi üzerinde inhibitör etkisi gösterir, ancak, düşük konsantrasyonları sefamisin üretimini stimüle edebilir (Romero ve ark., 1984). Nişasta, α -ketoglutarat ve suksinat, hücrede sefamisin C üretimini uyarıcı etki göstermektedirler (Aharonowitz ve Demain, 1978).

Besiyerinde yüksek konsantrasyonda inorganik fosfatın bulunması sefamisin C' ye kıyasla, klavulanik asit üretimi üzerinde daha güçlü bir represör etkiye sahiptir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda olmayan sülfat, sefamisin C üretimi için gerekli ve aynı zamanda klavulanik asit üretimi için de stimüle edicidir (Aharonowitz ve Demain, 1977; Romero ve ark., 1984). Nitrojen kaynağı olarak amino asitler, özellikle asparajin, hem üremeyi hem de antibiyotik üretimini desteklerken, amonyum sporlanma da dahil olmak üzere sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerini ciddi oranda baskılamaktadır (Aharonowitz ve Demain, 1979; Romero ve ark., 1984; Braña ve ark., 1985, 1986). İnkübasyon sırasında areallandırmanın düşük olması fosfat ve amonyumun neden olduğu negatif regülasyonu kısmen azaltabilir (Fang ve Demain, 1995).

1.10. *S. clavuligerus*'a ait genom dizisi

Song ve ark. 2010 yılında parental suş *S. clavuligerus* NRRL3585 ' a ait genom dizisini yayımlamıştır. Bu genomik veriler, Sanger dizileme, Roche/454 pirodizileme, optik haritalama ve kısmi sonlandırma (partial finishing) gibi ileri seviyedeki tekniklerin kombinasyonu ile elde edilmiştir. Analizlerin sonucunda, NRRL3585 suşunun 6,736,475 bç büyüklüğünde ve % 72.69' lık bir G/C içeriğine sahip olan lineer kromozoma ve de dört lineer plazmidde sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu lineer plazmidler; pSCL1 (büyüklüğü 10,266 bç ve G/C içeriği % 71.96), pSCL2 (büyüklüğü 149,326 bç ve G/C içeriği % 70.07), pSCL3 (büyüklüğü 442,792 bç ve G/C içeriği % 70.77) ve pSCL4 (büyüklüğü 1,796,117 bç ve G/C içeriği % 71.85)' dir. Ayrıca, genomda, 7898 adet protein kodlayan gen olduğu bildirilmiştir. Sonrasında, *S. clavuligerus* ATCC 27064' e ait genomik veri bir başka grup tarafından yayımlanmıştır (Medema ve ark., 2010). Bu grup, ATCC27064 genomunu random shotgun dizileme ile elde etmiştir. Her iki grup da lineer kromozoma ve pSCL4' e ait oldukça benzer gen dizileri rapor etmiş olup diğer üç plasmid sadece Song ve ark. (2010) tarafından bulunmuştur. pSCL4, bu zamana kadar belirlenen ve sekanslanan en büyük plazmidlerden biri olarak oldukça ilgi çekici bir megaplazmidir. Bu plasmid, sekonder metabolitlerin, özellikle de staurosporin, moenomisin, β -laktamlar ve enedi gibi antibiyotiklerin

biyosentezinden sorumlu olan 25 putatif gen kümesine sahiptir. Sefamisin C- klavulanik asit gen kümeleri ana kromozomda bulunur, ancak klavulanik asidin paralog kümesi olan alanil klavam kümesi pSCL4' te yer almaktadır. Sefamisin C ve klavulanik ait gen kümeleri arasındaki mesafe yaklaşık 1.4 Mb' dir. Bu plazmidin genomu toplam 48 adet sekonder metabolitlere (örneğin; terpenler, pentalenler, fitoenler, sideroforlar, antitümör bileşikler ve lantibiyotikler) ait gen kümelerinden meydana gelmiştir (Medema ve ark., 2010; Song ve ark., 2010).

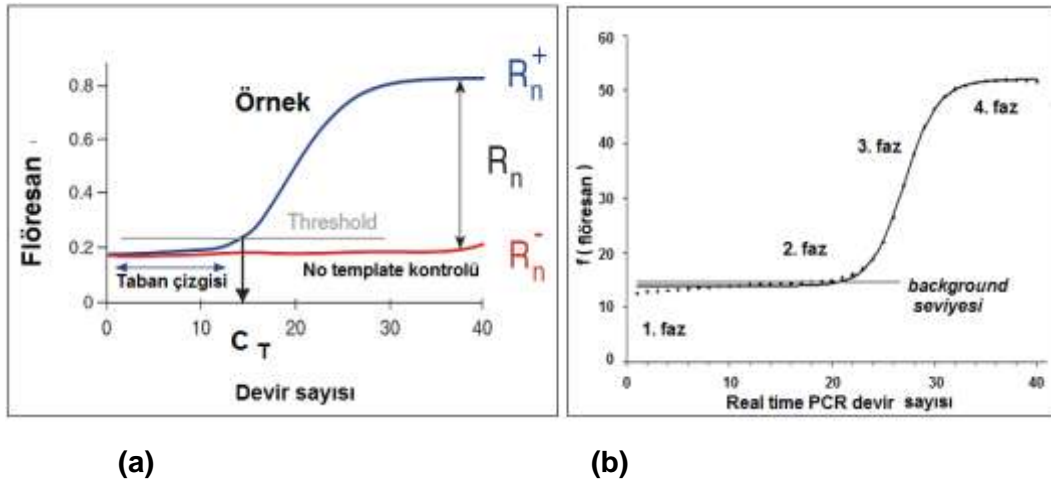
1.12. Kantitatif RT-PCR

Kantitatif RT PCR (Q-RT-PCR) kalıp DNA' nın başlangıç konsantrasyonunu belirleyen oldukça spesifik ve hassas bir metoddur. Normal PCR' la ancak en son noktada amplifiye olan ürünün miktarı belirlenirken Q-PCR' da her PCR siklusunda ampikon üretiminin indikatörü olarak floresan sinyali alınır. Reaksiyonun logaritmik fazında PCR ürününün ilk tespit edildiği siklus belirlenerek kalıp DNA'nın başlangıç miktarı elde edilir.

qRT-PCR diagnostik, klinik çalışmalar, patojen belirleme, gıda teknolojisi, kanser tanısı ve fonksiyonel genom gibi birçok bilimde uygulama alanına sahiptir (Bustin, 2005, Yuan ve ark., 2008). qRT-PCR, gen ekspresyonlarının kantitatif analizinde geleneksel tekniklere (Northern blot, nukleaz koruma deneyleri) kıyasla basitliği, oldukça hassas ve hızlı oluşu nedeni ile daha avantajlıdır. Ayrıca, çok düşük miktarda başlangıç DNA' sına gereksinimi ile daha önce kullanılan tekniklerden üstündür. Olumsuz tarafı; oldukça pahalı cihazlara ve kitlere ihtiyaç duyulmasıdır. qRT-PCR'dan elde edilen verilerin doğruluğu ve güvenilirliği şu faktörlere bağlıdır: (i) RNA kalitesi ve miktarı, (ii) RT-PCR verim oranı, (iii) kullanılan tespit kimyası, (iv) kuantifikasyon stratejisi, (v) amplifikasyon verimliliğinin değerlendirilmesi , (vi) data normalizasyonu (vii) istatistiksel karşılaştırma (Bustin, 2000; Pfaffl ve Hageleit, 2001; Pfaffl, 2005; Derveaux, 2010).

DNA ve protein kontaminasyonundan uzak, yüksek kalite ve miktarda RNA izolasyonunun optimizasyonu qRT-PCR çalışmalarının ilk prensibini oluşturmaktadır (Swift ve ark., 2000; Mannhalter ve ark., 2000). cDNA sentezinde kullanılan RNA ve primerlerin kalitesi RT verimliliğini etkileyen önemli faktörlerdir. cDNA sentezi için primer olarak, hedef-özümlü primerler, ya da random heksamerler gibi hedef gene özümlü olmayan primerler ve poli-T oligonükleotidleri kullanılabilir. Bununla birlikte, en yüksek RT verimliliği; random heksaprimerler, daha sonra poli-dT primerleri, ve en son ise gene özümlü primerler kullanıldığında elde edilir (Pfaffl, 2004).

qRT-PCR dört ana faza sahiptir; ilk 3-15 devir ilk faz (lineer zemin fazı) olup flöresandaki artış taban çizgisinin (baseline) üzerindedir ve biriken PCR ürününün işaret eder (Pfaffl, 2004) (Şekil 1.8). Orjinal DNA kalıbındaki başlangıç kopya sayısı ve de deney sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan devir sayısı ekspansiyal fazla belirlenir. Arka plan (background)' in üzerinde flöresan emisyonundaki görülen ilk önemli artış eşik değeri deviri "Ct" (ABI Prism® literature, Applied Biyosistemleri, Foster City, CA, USA) ya da geçiş noktası deviri "Cp" (LightCycler® literatür, Roche Uygulamalı Bilimleri, Indianapolis, IN, USA) olarak isimlendirilir. PCR ürününün miktarındaki bu ilk önemli artış, hedef kalıp DNA' nın başlangıç miktarıyla orantılıdır. Eğer hedef DNA' nın başlangıç sayısı yüksekse flöresan emisyonunda dikkate değer bir artışın elde edilebilmesi için gereken zaman daha kısadır. Optimum koşullarda, verimlilik % 100 ise PCR ürününün her bir devirde iki kat artması beklenir. Amplifikasyon verimliliği primer ve kalıp DNA' nın kalitesine ve ayrıca uygun PCR koşullarına ve ampikon uzunluğuna bağlıdır (Valesek ve Repa, 2005; Dorak, 2006; Yuan ve ark., 2006). qRT-PCR' in üçüncü fazında lineer flöresan emisyonu meydana gelir. Son faz olan plato fazında ise reaksiyon bileşikleri artık tükenmiştir ve veri hesaplamaları için flöresan elde edilemez (Wong ve Medrano, 2005).



Şekil 1. 8. qRT-PCR' a ait tipik bir amplifikasyon eğrisinin http://www.nursa.org/qpcr_tutorials/qPCR_A&E_08.pdf (a) ve qRT-PCR' a ait dört karakteristik fazın gösterimi (Kain, 2000) (b).

Real time PCR' da deteksiyon kimyası için SYBR green I, Taqman-hidroliz probları, hibridizasyon probları, moleküler fenerler, gündoğumu ve akrep primerleri, LUX primerleri ve peptid nukleik asit (PNA) ışık probları gibi farklı şekilde flöresan veren teknikler kullanılmaktadır. Herbiri farklı özellikte olup, farklı stratejilerle uygulanırlar, fakat, DNA

amplifikasyonu ile ilişkili olarak flöresanda değişime yol açarlar. Taqman and SYBR green I kimyaları dinamizmi ve hassasiyeti ile diğerlerine kıyasla daha çok tercih edilirler. SYBR Green I, hidroliz probuna göre daha net (precise) olarak artışı belirler ve daha lineer bir bozulma grafiği üretir (Schmittgen ve ark., 2000). Bununla beraber, bu flöresan boyanın dezavantajı, spesifik olmayan PCR ürünlerine ve primer dimerlerine bağlanması sebebiyle yapay floresan sinyallerinin oluşumuna yol açmasıdır. Bu nedenle, SYBR Green I yüksek oranda PCR spesifitesine gereksinim duymaktadır. Bu dezavantaj çok yoğun optimizasyon çalışmalarıyla ve amplikon tespitinde erime noktası eğrisinin kontrolü ile ortadan kaldırılır. SYBR green I DNA' nın küçük oyuğuna bağlanır ve çift zincirli DNA'da flöresan miktarı çok fazla artış gösterir. SYBR Green I için maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 494 ve 521 nm' dir (Pfaffl, 2004).

qRT-PCR; tek-basamak veya iki basamaklı reaksiyon şeklinde gerçekleşmektedir. Tek basamak qRT-PCR' da, cDNA sentezi ve PCR amplifikasyonu tek bir tüpte olur ve bu şekilde deneysel varyasyonların önüne geçilir. Diğer taraftan, iki basamaklı qRT-PCR' da geri transkripsiyon ve PCR amplifikasyonu ayrı ayrı gerçekleştirilir. SYBR Green I' in flöresan tesbiti için kullanıldığı qRT-PCR' da primer dimer oluşumunun önüne geçmek ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek açısından iki basamaklı reaksiyon tercih edilir (Wong ve Medrano, 2005).

Kantitatif gen ekspresyonunun için iki yöntem bulunmaktadır: gen ekspresyonunun rölatif ve mutlak kuantifikasyonu. Her iki yöntem de kuantifikasyon için Ct değerini kullanır. Mutlak kuantifikasyon stratejisinde, tüm standartlar ve örneklerin oldukça yakın amplifikasyon verimliliklerine sahip oldukları varsayılarak miktarı bilinen bir örneğin standart eğrisi temel alınıp bilinmeyen bir örneğin miktar tayini yapılır. (Souzae ve ark., 1996). Rölatif kuantifikasyon yaklaşımının prensibi ilgili genin, ekspresyonu her koşulda aynı olan bir kontrol genine (eksternal standart, referans geni- kalibratör/endojen kontrol/normalizör) göre ekspresyon durumundaki (kararlı hal seviyesindeki) değişmelerin belirlenmesidir (Livak ve Schmittgen, 2001). Genel olarak, bu referans geni sürekli ifade edilen bir yapısal gendir ve elde edilen sonuçlar hedef gen/referans gen oranı olarak verilir. Bu yöntem zaman alıcı ve uğraştırıcı olan kalibrasyon eğrisi oluşturulmasına gerek olmadan hesaplama yaptığı için diğerine göre daha sık kullanılır. Gen ekspresyonu seviyelerindeki fizyolojik değişmeler rölatif kuantifikasyon stratejisi ile ölçülür. Bu metotta, internal standardın kesin miktarı bilinmemekle birlikte sekansı bilinmektedir. Hedef genin ortalama ve normalize olmuş ekspresyon seviyesi (target/referans oranı) farklı matematik modelleri kullanılarak hesaplanır. Karşılaştırmalı Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu ve Pfaffl' a ait verimlilik-düzeltili Ct modeli çok sıklıkla tercih edilen matematik modelleri olup basitlik ve verimlilik düzeltmeleri bakımında birbirinden ayrılır

(Fleige ve ark., 2006). Karşılaştırmalı Ct metodu gen ekspresyonlarındaki değişmeyi, hedef gen ve referans genlerin amplifikasyon verimliliklerinin eşit olduğunu varsayarak deney örneği ve kalibratör arasındaki rölatif kat farkı olarak hesaplar (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu durumda, kontrol ve örneğin Ct değerleri arasındaki ekspresyon farklılıkları şu şekilde formüle edilir:

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

$(\Delta\Delta Ct) = (\Delta Ct_{\text{hedef}} - \Delta Ct_{\text{referans}})_{\text{örnek}} - (\Delta Ct_{\text{hedef}} - \Delta Ct_{\text{referans}})_{\text{kontrol}}$

$\Delta Ct = Ct_{\text{(hedef)}} - Ct_{\text{(normalizör/kalibratör/referans)}}$

Bununla birlikte, çoğu kez, hedef ve kontrol örneklerinin amplifikasyon verimlilikleri eşit değildir. Bu koşullarda, verimlilik-düzeltili Ct modeli kullanılmaktadır. Burada, hem hedef hem de referans genin amplifikasyon verimlilikleri formüle dahil edilmiştir (Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta C_T^{\text{hedef}} (\text{ORTALAMA}_{\text{kontrol}} - \text{MEAN}_{\text{örnek}})}}{(E_{\text{referans}})^{\Delta C_T^{\text{reference}} (\text{ORTALAMA}_{\text{kontrol}} - \text{ORTALAMA}_{\text{örnek}})}}$$

Standart eğrinin eğiminden elde edilen amplifikasyon verimliliği Ct- log nükleik asit konsantrasyonu şeklinde grafikte gösterilir ve aşağıda verilen formüle uygun olarak hesaplanır (Wong ve Medrano; 2005).

$$\text{Ekspansiyon} = 10^{(-1/\text{eğim})}$$

$$\text{Verimlilik} = [10^{(-1/\text{eğim})}]^{-1}$$

qRT-PCR' da veri değerlendirilmesi ve istatistiksel karşılaştırma; anlamlı ve güvenilir çıkarımlar yapmak için gerekli ve önemli parametrelerdir. Bağımsız biyolojik replikaların ve yeterli sayıda teknik replikaların kullanılması ve ayrıca doğru referans genin seçilmesi deney içi ve deneyler arası varyasyonları azaltarak sonuçları güçlendirir. Rölatif kuantifikasyon sonuçlarını elde etmek için REST, Q-Gen, SoFAR, DART-PCR gibi çeşitli otomat data analizi yazılımları geliştirilmiştir (Pfaffl, 2002; Wong ve Medrano, 2005).

1.13. Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi (EMSA)

EMSA bir transkripsiyon faktörünün DNA' ya bağlanma özelliğini tespit etmek için kullanılan hızlı ve hassas bir tekniktir, böylece, gen ekspresyonunun transkripsiyonel

düzenlenmesini belirlemek ve karakterize etmek mümkün hale gelir. EMSA deneyinde, bir transkripsiyon faktörünün spesifik bir nükleotit dizisine (radyoaktif olarak işaretlenmiş ya da flöresan işaretli bir prob) olan afinitesi protein-nükleik asit kompleksinin oluşmasına yol açar ve bu kompleks native poliakrilamid jelde serbest DNA' dan daha yavaş hareket ederek jel üzerinde yavaş yürüyen bir bandın oluşumunu sağlar (Hellman ve Fried, 2007).

Bağlanma stokiyometresi, afinitesi, termodinamiği ve kinetiğini belirlemek üzere DNA bağlanma deneyi uygun şartlarda nitel ve nicel anlamda kullanılabilir. Ayrıca, EMSA deneyinde ham hücre ekstraktlarının kullanılabilirliği büyük bir avantajdır. Radyoizotopla işaretli problemler deneyin hassasiyetini artırır ve düşük konsantrasyonlu (≤ 0.1 nM) protein ve nükleik asitlerle çalışma olanağı sunarlar. Diğer taraftan, tarama basamağı uzun ve zahmetlidir, dahası, radyoaktif işaretli problemler sağlığa zararlı ve oldukça da kararsızdır. Bu tip kısıtlamalardan dolayı, flöresan, kemiluminesan, immünohistokimyasal tarama gibi yeni tarama tipleri geliştirilmiştir. Bu teknikler sağlığa zararsız ve kullanılan maddeler oldukça uzun bir süre kararlı olup bir hayli hızlı sonuçlar alınır (Jason ve ark., 2000; Steiner ve Pfannschmidt, 2009).

Nitroselüloz filtre-bağlanma ve footprint deneyleri protein-nükleik asit etkileşimini belirleme ve karakterize etmede EMSA' ya alternatif teknikler olmakla birlikte her birinin diğerine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Oehler ve ark., 1999). DNA footprint, diğer ikisine kıyasla daha zorlu bir tekniktir. Ancak, DNA footprinting and jel gecikme deneyleri birlikte kullanıldığında, araştırmacıya, transkripsiyon faktörleri ve DNA arasındaki fiziksel etkileşim hakkında tamamlayıcı bilgi sağlar (Ralston, 2008).

1.14. Karşılaştırmalı proteom

Proteom, belirli bir koşulda bir hücrede ifade edilen tüm proteinleri tanımlamada kullanılan bir terimdir. Her bir protein pI değerine ve molekül ağırlığına göre ayrılmaktadır. Proteomik çalışmalar; biyolojik örneklerin belli bir fizyolojik durumdaki protein ekspresyon profilini ve onların karakterizasyonunu (yapısal proteom) ve ayrıca iki ya da daha fazla fizyolojik durumda protein ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasını (karşılaştırmalı proteom) içermektedir. Belli koşullarda bir genoma ait protein ekspresyonunun global analizi en iyi proteomla özetlenebilir (Gygi ve ark., 1999). Alternatif splicing, poliadenilasyon, RNA editing gibi posttranskripsiyonel modifikasyonlar nedeni ile mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon oldukça zayıf olabileceğinden transkriptomla elde edilen bulguların proteom çalışmaları ile desteklenmesi sonuçların gücünü belirlemektedir.

1.14. Mecut çalışma

Sefamisin C klinik açıdan önemli bir β -laktam antibiyotiği olup penisiline dirençli bakteriler üzerinde akiftir. Klavulanik asit ise bakteri nedenli enfeksiyonları tedavisinde kullanılmak üzere β -laktam antibiyotikleri ile birlikte ilaç formülasyonunda yer alır. İlaç endüstrisindeki öneminden dolayı, sefamisin C biyosentez yolağı, *S. clavuligerus* tarafından antibiyotik biyosentezinin regülasyonunun anlaşılmasında önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Sefamisin C biyosentezi üzerindeki gerek global gerekse de yolak-özü regülasyon farklı gruplarca rapor edilmiştir. Bu çalışmada, sefamisin C gen kümesindeki genlerin zamana bağıli ekspresyonu, tip suşa kıyasla, *ccaR* geni tahrip olmuş bir *S. clavuligerus* mutant suşunda ve *ccaR'* nin çok kopya halinde ekspres olduğu rekombinant *S. clavuligerus'* da qRT-PCR tekniğı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Böylelikle, yolak-özü CcaR aktivatörünün sefamisin C biyosentezindeki etkisi incelenmiştir. CcaR' nin sefamisin C genlerinin promotor bölgelerindeki muhtemel bağlanma bölgeleri EMSA analizleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca, karşılaştırmalı proteom çalışmaları ile rekombinant C11 suşu ile parental suşa ait protein profillerindeki farklılıklar belirlenmiştir. Biyoassay ve HPLC analizleri ile ise *ccaR* geninin sefamisin C ve klavulanik asit üretimi üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Tüm bulgular, üretici organizmada sefamisin C biyosentezini artırma stratejisine katkıda bulunmak adına hücre içerisinde sefamisin C üretiminin yolak-özü CcaR aktivatörü tarafından düzenlenmesinin moleküler mekanizmalarını ortaya koymaktadır.

BÖLÜM 2

GELİŞME

2.1. Bakteri suşları, plazmidleri, besiyerleri ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmid vektörler Tablo 2.1' de verilmektedir. *Escherichia coli* (*E. coli*) Luria broth (LB) ya da agar plaklarda (LA) (Ek C) 37 °C' de 200 rpm' de çalkalanarak üretilmiştir. Uzun süreli muhafaza için, 16 saatlik kültürden 3 ml alınıp santrifüj edilerek supernatant atılmış ve pellet % 25 gliserolde çözülerek -80 °C' de saklanmıştır. *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) Triptikaz soya broth (TSB) (Ek C) içerisinde 28 °C' de çentikli erlenlerde 220 rpm' lik bir çalkalama ile üretilmiştir. Triptikaz soya agar (TSA) (Ek C) ise sıvı kültürlerdeki kontaminasyonu kontrol etmek için kullanılmıştır. *S. clavuligerus*' a ait misel stokları OD₆₀₀ değeri 5 ile 7 arasında olan kültürlerden 800 µl alınıp % 87' lik 800 µl hacimdeki gliserol ile karıştırılarak elde edilmiş ve -80 °C' de muhafaza edilmiştir.

TSB and Nişasta-asparajin (SA) besiyerleri *S. clavuligerus*' da antibiyotik üretim çalışmalarında kullanılmıştır (TSB; sefamisin C ve SA besiyeri klavulanik asit üretiminin belirlenmesi için kullanıldı). Fermentasyon çalışmaları için *S. clavuligerus*' a ait ön kültürler hazırlanmıştır. 100 ml'lik TSB besiyeri bu bakteriye ait 500-750 µl' lik gliserol stoklarından ekim yapılmış ve 28 °C' de 220 rpm' de OD₆₀₀ değeri 5 olana dek inkübe edilmiştir. Ardından, bu ön kültürün 5 ml' si 3500 rpm' de 10 dak. santrifüj edilmiş ve amaca uygun olarak, pellet 100 ml' lik TSB ya da SA besiyerine ekilmiştir.

E. coli vektörleri pGEM-T easy (Promega) ve pBluescript II KS (+) (Stratagene)' dir. *E. coli*/*Streptomyces* shuttle vektörü pSET152, ve güçlü bir gliserol promotörü taşıyan pSPG ekspresyon vektörü *S. clavuligerus* suşunun genetik manipülasyonu için kullanılmıştır. pET28a(+) ise His-Tag ekspresyon vektörü olup CcaR proteininin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Şekil A.1, Ek A).

Tablo 2. 1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmidler

Mikroorganizma ve plazmidler	Tanımlama	Kaynak ve Referans
Mikroorganizmalar		
<i>S. clavuligerus</i>		
NRRL3585	Prototrof,sefamisin C ve klavulanik asit üreticisi	Prof. J. Piret, Northeastern Üniversitesi, ABD
ATTC27064	Prototrof, sefamisin C ve klavulanik asit üreticisi	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
<i>ccaR::aphII</i>	<i>ccaR</i> geni kanamisin dirençlilik kaseti ile tahrip edilmiş suş	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA Perez Llarena ve ark., 1997
pGV	pSPG vektörünü taşıyan suş	Bu çalışma
C11	pAK23 vektörünü taşıyan suş	Bu çalışma
pTV	Kromozomuna pSET152 vektörü entegre olmuş <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
PC	Kromozomuna pSET-PC vektörü entegre olmuş <i>S. clavuligerus</i>	Bu çalışma
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
ATCC 29665	İndikatör organizma	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F' /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</i> <i>lacYI / oriT</i> plazmid	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1</i>	Novagen, Merck (Almanya)

	ind1 sam7 nin5])	
ESS	İndikatör organizma	Prof. J. Piret, Northeastern Üniversitesi, USA
Plazmidler		
pGEM-T-easy	Amp ^R , lacZ	Promega (Madison Inc.)
pG23	ccaR içeren pGEM-T easy	Bu çalışma
pBluescript II KS (+)	Phagemid, Amp ^R , lacZ	Stratagene
pG15	pccaR içeren pGEM-T easy	Bu çalışma
pKS15	pccaR içeren pBluescript II KS (+)	Bu çalışma
pSPG	Amp ^R , Ap ^R , Pglp	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA
pSET152	lacZ, rep ^{duc} , att ^{ΦC31} , oriT	Prof. P. Liras, Leon Üniversitesi, İSPANYA (Bierman ve ark., 1992)
pAK23	ccaR taşıyan pSPG	Bu çalışma
pSET-PC	pccaR taşıyan pSET152	Bu çalışma
pET28a(+)	T7 Promotoru, His Tag, lacI	Novagen
pET-C23	ccaR taşıyan pET28a(+)	Bu çalışma

2.2. Kültür besiyerleri

Besiyerlerinin kompozisyonları ve hazırlanışları EK C' de verilmiştir.

2.3. Tamponlar ve çözeltiler

Kullanılan tampon ve çözeltilerin kompozisyonları ve hazırlanışları EK D' de verilmiştir.

2.4. Kimyasallar ve enzimler

Kullanılan kimyasallar ve enzimler kaynaklarıyla beraber EK E' de listelenmiştir.

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

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

2.6. *S. clavuligerus* ve *E. coli*' den plasmid DNA izolasyonu

Plazmidler *E. coli* ve *S. clavuligerus*' den Qiagen plazmid izolasyon kitleriyle (Qiagen Inc., Valencia, CA) ya da Sambrook ve ark.'a (1989) göre izole edilmiştir.

Ayrıca, her iki bakteri için küçük ölçekte plasmid DNA izolasyonu (Hopwood ve ark., 1985) da yapılmıştır. Agar kültürlerden 1 cm² lik alan kazınıp 50- 100 ml STE tamponunda (Ek D) çözülmüştür. *S. clavuligerus* hücreleri için 2 mg/ml lizozim (Ek E) ilave edilmiş ve çözelti at 37 °C' de 30 dak. inkübe edilmiştir. *E. coli* tüpleri ise buz içerisinde 20 dak. tutulmuştur. Ardından, 3/5 hacimde lizis çözeltisi (Ek D) karışıma ilave edilmiş ve hemen vorteks ile karıştırılmıştır. Hücrelerin lizis olması için karışımlar oda sıcaklığında 10 dak. inkübe edilmiş ve sonra DNA' nın denatürasyonu için 70 °C' de 10 dak. bekletilmiştir. Tüpler soğuk su altında hemen soğutulmuş ve eşit miktarda fenol-kloroform solusyonu (suyla doyurulmuş, Ek D) ilave edilen çözeltiler vortekslenerek süt beyazı renginde bir karışım elde edilmiş ve bu karışım 13000 rpm' de 5 dak. santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanmıştır. 10 µl hacmindeki süpernatant agaroz jelde yürütülmüştür.

2.7. *E. coli* kompetan hücrelerinin hazırlanması

E. coli kompetan hücrelerin hazırlanması için Hanahan ve ark. (1982) tarafından tanımlanan RbCl₂ yöntemi kullanılmıştır. 16 saatlik *E. coli* kültüründen 3 ml alınıp 200 ml LB besiyerine ekim yapılmış ve OD₆₀₀ değeri 0.4 ile 0.7' ye ulaşıncaya dek 37 °C' de 200 rpm'

de inkübe edilmiştir. Ardından, kültür 15 dak. buz içerisinde bekletilip 3500 rpm' de, 4 °C' de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, pellet 20 ml soğuk tampon 1 (Ek D)' de çözülmüş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet bu kez 8 ml soğuk tampon 2 (Ek D)' de çözülmüş bu çözelti 100 µl' lik hacimlere bölünmüş ve 15 ile 30 dak. buzda inkübe edilmişlerdir. Son olarak, tüpler sıvı nitrojende dondurularak -80 °C' de saklanmışlardır.

2.8. *E. coli* kompetan hücrelerinin transformasyonu

E. coli kompetan hücrelerinin transformasyonu için Sambrook ve ark. (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. -80 °C' de tutulan 100 µl' lik *E. coli* kompetan hücreleri buz içerisinde çözülmüş ve içine 1-10 µl hacimde plazmid DNA (1- 50 ng) ya da ligasyon ürünü ilave edilip nazikçe pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. Tüpler 30 dak. buzda inkübe edilmiş ardından hücre-DNA karışımı 42 °C' de 1 dak. ısı şokuna maruz bırakılmışlardır. Ardından, tüpler hemen buza koyulmuş ve 5 dak. inkübe edilmiştir. Üzerine 0.9 ml LB besiyeri eklenen karışım 37 °C' de 1 saat 100 rpm' de inkübe edilmiştir. 3400 rpm' de 10 dak. santrifüj sonrasında pellet 100 µl LB' de çözülmüş ve hücre çözeltisi seçici antibiyotik içeren LA besiyerine yayılmış, 37 °C' de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir.

2.9. Konjugasyon metodu ile *E. coli* ve *S. clavuligerus* arasında plazmid DNA transferi

Streptomyces ve *E. coli* arasındaki konjugasyon olayı Flett ve ark., (1997) tarafından tanımlanan procedure uygun olarak gerçekleştirilmiştir. *E. coli* ET12567/pUZ8002' e ait kompetan hücreler pUZ8002 ve *dam* mutasyonunun devamı için kanamisin (Km) (25 µg/ml) ve kloramfenikol (Cm) (25 µg/ml) (Ek D) içeren besiyerinde üretilmiştir. Kompetan hücrelere *oriT*-içeren vektörler aktarılmış ve uygun antibiyotiklerle seçim yapılmıştır. İstenilen vektörü taşıyan recombinant *E.coli* ET12567/pUZ8002 10 ml' lik uygun antibiyotiği içeren LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C ve 200 rpm' de 16 saatlik inkübasyon sonrasında 1 ml' si 100 ml LB besiyerine (antibiyotik içeren) eklenmiştir. Aynı koşullarda 0.4 ile 0.6'lık bir OD₆₀₀ değerine ulaşmaya kadar inkübe edilmiştir. Ardından iki kere eşit hacimde antibiyotik içermeyen taze LB besiyeri ile yıkandıktan sonra 0.1 hacim LB' de çözülmüştür. TSA besiyerinde üreyen 24 saatlik *S. clavuligerus* kültürü 5 ml' lik % 20 gliserolde çözülmüş ve homojen bir karışım elde edilmiştir. Bu karışımın 0.5 ml' si 500 µl *E. coli* hücreleri ile karıştırılmış ve bu karışım 3000 rpm' de 10 dak. santrifüj edildikten sonra çökelti 200 µl LB de çözülmüş ve son olarak 10 mM MgCl₂ içeren Mannitol-Soya unu (MS) agar üzerine yayılmıştır. 30 °C' de 16-20 saatlik inkübasyon sonrasında MS agar plaklar üzerine 0.5

mg/ml nalidiksik asit (Ek D) ve 1 mg/ml apramisin (Ek D) içeren 1 ml distile su yayılmıştır. İnkübasyon 30 °C' de 4 gün boyunca devam etmiştir.

2.10 DNA' nın manipülasyonu

2.10.1. Restriksiyon endonukleaz kesimleri

Restriksiyon endonukleazlar (Roche ve Fermentas marka) klonlama çalışmalarında kullanılmışlardır. Restriksiyon enzimi ile kesimler üretici firmaların önerdiği koşullarda yapılmıştır.

2.10.2. Agaroz jel elektroforezi

DNA ve RNA örnekleri 1 saat süresince 90 V akım uygulanarak % 1 konsantrasyonunda hazırlanmış agaroz jelde yürütülmüşlerdir. Elektroforez tamponu 1X TAE (Ek D)' dir. 100-200 bç büyüklüğündeki RT-PCR ürünleri için % 1.5' luk agaroz jel kullanılmıştır. Elektroforez sonrası jeller 1 mg/ ml final konsantrasyonunda etidyum bromür (Ek D) içeren 1 X TAE tampon içinde 15 dak. bekletilerek boyanmış ve jeldeki DNA bantları UV transilluminatörde (UVP) incelendikten sonra Vilber Lourmat Jel Görüntüleme Sistemi yardımıyla fotoğraflanmıştır. 1 kb DNA Ladder (Invitrogen), Lambda (λ)/PstI DNA (Fermentas), O'GeneRuler 100 bç DNA ladder plus (Fermentas) (Ek A) markör olarak kullanılmıştır.

2.10.3. DNA parçalarının agaroz jelden ekstraksiyonu

Elektroforez sonrasında, gerekli DNA bantları jelden kesilerek Eppendorf tüplere konulmuştur. Genemark marka jel ekstraksiyon kiti (<http://www.genemark.com.tv>) kullanılarak DNA jelden pürifiye edilmiştir. Elde edilen DNA konsantrasyonu NanoDrop® ND-2000 (ThermoScientific) cihazıyla ölçülmüştür.

2.10.4. Ligasyonlar

PCR ürünlerinin pGEM-T easy vektörüne ligasyon reaksiyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 1 μ l T4 ligaz (Promega), 5 μ l 2X ligasyon tamponu, 1 μ l (55 ng/ μ l) pGEM-T easy vektörü, 3 μ l PCR ürünü DNA karıştırılmıştır ve reaksiyon 4°C' de 16 saat sürmüştür. Diğer ligasyon reaksiyonlarında, yapışkan uçla olan ligasyon reaksiyonlarında 3:1 ve küt uçla olan ligasyon reaksiyonlarında 5:1 hedef gen: vektör molar oranı tercih edilmiştir. 1 μ l T4 ligaz ve 1 μ l hacimde 10x ligasyon tampon ilave edilen reaksiyon hacmi distile su ile 10 μ l' a tamamlanmış ve karışım 4 °C' de 16 saat inkübe edilmiştir.

2.11. Primer dizaynı

ccaR geni (Şekil 1B, Ek B) *S. clavuligerus* NRRL3585' in genomik DNA 'sı kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Kullanılan primerler Tablo B.1' de verilmektedir (Ek B). *bla*, *pbpA*, *cmcT*, *pcd*, *cefD*, *cmcl*, *cmcJ*, *ccaR*, *orf10*, *blp*, *lat*, *pcbAB*, *pcbC*, *pcbR*, *cefE*, *cefF*, *cmcH* ve *hrdB* genleri NCBI' in internet sayfasında kayıtlı GenBank erişim numaralarından ulaşılan dizilerine göre primerler dizayn edilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ayrıca, genler arası bölgeler için de gerekli primerler dizayn edilmiştir. DNASTar yazılımının PrimerSelect programı RT-PCR deneylerinde kullanılacak primerlerin tasarlanmasında kullanılmıştır (Tablo B.2 ve B.3, Ek B). qRT-PCR deneyleri için primer dizaynı, PrimerSelect ve Primer3 plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo B.2 ve Ek B). Bunların yanı sıra, EMSA deneylerinde kullanılmak üzere dizayn edilen primer dizileri Tablo B.4 (Ek B)' te verilmektedir. Dizayn edilen tüm primerler Alpha DNA (Montreal, Kanada)' ya sentezletirilmiştir.

2.12. Polimeraz zincir reaksiyonu

2.12.1. Standart PCR

Standart bir PCR reaksiyonunun içeriği ve optimize edilen PCR koşulları Tablo 2.2' de verilmektedir.

Tablo 2. 2. Standart bir PCR reaksiyonu ve uygulanan koşullar

İçerik	Son konsantrasyon	Hacim (µl)	PCR koşulları	Sıcaklık/Zaman °C/dak. ya da sn
Go-Taq Tamponu (5X)	1X	5	Başlangıç	94 °C 5-10 dak
dNTP karışımı (10 mM)	200 nM	1	denatürasyonu	
İleri primer (10 µM)	0.2 µM	1.25	Denatürasyon	95 °C 30-40 sn
Geri primer (10 µM)	0.2 µM	1.25	Yapışma	(Tm -10) 30 sn
Kalıp DNA	50 ng	2	Uzama	72 °C 1 dak/kb
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2	Cycle #	30-35
DMSO 100%	5 %	1.25	Son uzama	72 °C 10 dak
GoTaq DNA Pol (5 u/µl)	2.5 u	11		
dH ₂ O				

2.12.2. Koloni PCR

Tek bir koloniye ait küçük bir parça 50 µl dH₂O içinde çözülür ve 94 °C' de 15 dak. inkübe edilir. Bu çözeltinin 2-3 µl'si standart PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılır.

2.13. Dizileme reaksiyonu

DNA dizileme hizmeti, Applied Biosystems' e ait BigDye Cycle Sekanslama Kit V3.1 (Applied Biosystems)' i ile zincir sonlandırma metodunu kullanan RefGen Biyoteknoloji Şirketi (Ankara, Türkiye) tarafından verilmiştir.

2.14. Fermentasyon çalışmaları: Bioassay ve HPLC analizleri

2.14.1. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi

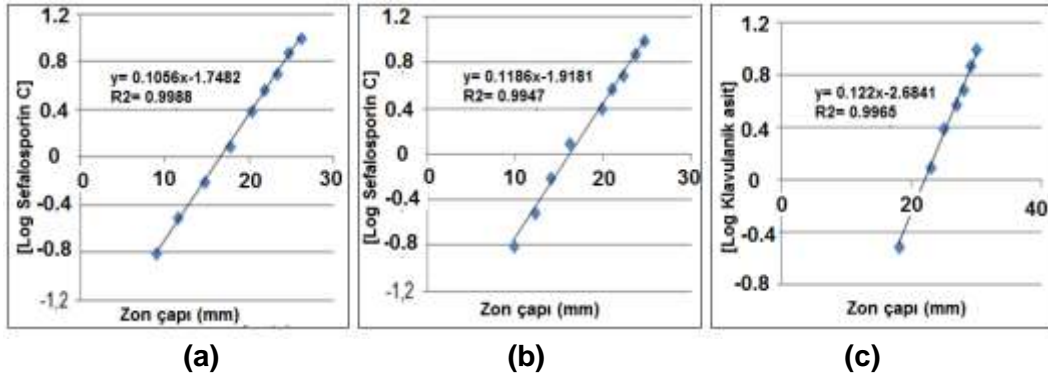
DNA kuantifikasyonu yardımıyla farklı besiyerlerinde bakterilerin üreme profillerinin belirlenmesi Burton (1968) tarafından tanımlanan metotla gerçekleştirilmiştir. Hücre çöktürmeleri 1 ml % 0.85' lik NaCl çözeltisinde çözülüp vorteksenerek homojen hale getirilmiştir. Standart olarak 5 mM NaOH içinde çözülmüş 0.3 mg/ ml stok konsantrasyonlu Herring Sperm DNA (Sigma)' sı kullanılmıştır: 6, 10, 20, 30, 50, 60 75 ve 100 µg/ml' lik standart konsantrasyonları hazırlanmıştır. 400 µl hacimde 5 mM NaOH (blank örnek için), standartlar ve seyreltilmiş örnekler 2 ml'lik Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 1 N HClO₄' den 400 µl ilave edilmiştir. Ters çevrilerek karıştırılan tüpler 70 °C' de ve 20 dak. boyunca inkübe edilmiştir. Her bir tüpteki karışıma bu kez de 800 µl difenilamin belirteci (Ek D) eklenmiş, ters çevrilerek karıştırılan solusyonlar 30 °C' de ve 15-17 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında tüplerdeki örnekler yeniden karıştırılmış ve miseller santrifüjle (13200 rpm ve 10 dak.) çöktürülmüştür. Süpernatanın absorbanansı 600 nm' de ölçülmüş ve DNA miktarı. standart eğriye göre hesaplanmış ve µg DNA/ml kültür olarak ifade edilmiştir.

2.14.2. Kültürlerdeki sefamisin C ve klavulanik asit miktarlarının biyoassay deneyleri ile belirlenmesi

E. coli ESS 22-35 sefamisin C biyoassayinde (Aharonowitz ve Demain, 1978), *K. pneumoniae* ATCC 29665 ise klavulanik asit biyoassayinde indikatör organizmalar olarak kullanılmıştır. *E. coli* ESS 22-35 tüm β-laktam antibiyotiklerine karşı duyarlıdır. Öte yandan, örneklerdeki klavulanik asit *K. pneumoniae* tarafından üretilen β-laktamazı inhibe ederken TSA' daki penisilin G' nin inhibisyon zonu oluşturmasına imkan tanır (Foulstone ve Reading, 1982; Romero ve ark., 1984). Fermentasyonda 24 saat aralıklarla toplanan 1 ml kültürden

elde edilen supernatan biyoassay deneylerinde kullanılır. Sefamisin C oldukça kararlı bir antibiyotik olduğundan süpernatantlar -80°C' de bir hafta saklanabilir. Bununla birlikte klavulanik asit oldukça kararsız olduğundan ve çabuk bozunduğundan örneğin alındığı gün biyoassay deneyini yapmak gerekmektedir. Potasyum klavulanat ve sefalosporin C biyoassaylerde kullanılan standartlardır.

E. coli ESS ve *K. pneumoniae* hücreleri TSB besiyerinde OD₆₀₀ değeri 1' e ulaşıncaya dek üretilir. % 2 agar içeren 100 ml TSA 45 °C-47 °C' lik sıcaklık aralığına soğutulur ve ardından *K. pneumoniae* kültürü eklenecek olan agar içine son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde penisilin G ilave edilir. 3.3 ml hacimdeki bakteri kültürleri 100 ml TSA içerisine eklenir ve hızlıca karıştırıldıktan sonra steril cam petri kaplarına dökülerek TSA-kültür karışımlarının donması beklenir. Donan agarların üzerinde 5 mm çapında delikler açılır ve içerisine 60 µl örnek süpernatanı [1M MOPS (Ek D) içinde seyreltilmiş] ve standartlar (sefalosporin C ve potasyum klavulanat standartlarından 1 M MOPS (pH: 6.8) içinde gerekli seyreltmeler yapılarak (10-7.5-5-3.5-2.5-1.25-0.625-0.3125 ve 0.156 µg/ml konsantrasyonlarında dilüsyonlar) yüklenir. Her örnekten iki teknik replika farklı petri kaplarına yüklenirler. Petri kapları önce 4 °C' de 2 saat, ardından 30 °C' de 12-15 saat inkübe edilir. Sefalosporin C ve potasyum klavulanat' a ait standart eğrilerinden (Şekil 2.1) elde edilen lineer regresyona göre örneklerdeki sefamisin C ve klavulanik asit konsantrasyonları hesaplanır.



Şekil 2. 1. Biyoassay deneylerinde kullanılmak üzere SA (b,c) ve TSB (a) besiyerlerinde üreyen kültürlerden elde edilen sefalosporin C ve klavulanik asit kalibrasyon eğrileri.

2.14.3. HPLC ile örneklerdeki klavulanik asit miktarının belirlenmesi

Fermentasyon çalışmasında her bir suş için üç erlenle çalışılmıştır. 0.5 ml' lik kültür 1/5 ila 1/25 oranında seyreltmeler yapılarak klavulanik asit üretiminin belirlenmesi amacıyla HPLC' de analiz edilmiştir.

2.14.4. Örnek toplama ve HPLC koşulları

24 saat aralıklarla kültürlerden alınan 0.5 ml' lik örnekler içinde 25 ml sodium asetat tampon (Ek D) olan 50 ml' lik falkon tüplerine karıştırılmışlardır ve karışımlar misel yığınlarını ortadan kaldırmak için iyice vortekslenmiştir. Karışımlar Millipore membranından (por çapı 0.4 µm) geçirilerek çözünmeyen parçacıklardan arındırılmıştır. Filtre edilen örnekler HPLC viallerine aktarılmıştır, vialler ise analiz için HPLC karosellerine yerleştirilmiştir.

HPLC Waters: Alliance 2695 separasyon modülü ve Bondapak C18 (300×3.9 mm, 5-10 µm) kolonu ile 1.0 ml/dak.'lık akış oranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 95:5 oranında sodyum dihidrojen fosfat tamponu pH: 4 (Ek D): metanol içeren bir mobil faz ile ayrıştırılmıştır. Kolondaki örnekler, Waters 2487 Dual λ Absorbans detektörü ile 220 nm' de görüntülenmiştir. Klavulanik asit standardının alıkonma süresi akışın 4-6. dakikalarına denk geldiğinden, her bir enjeksiyon için 7 dakikalık bir akış süresi seçilmiştir. Tüm enjeksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Waters Empower™ yazılımı ile analiz edilmiştir.

2.15. RNA örneklerinin hazırlanması

OD₆₀₀ değeri 8 olan gliserol stoklarından 50 µl hacminde hücre 500 ml' lik çentikli erlenlerde 100 ml hacimdeki TSB besiyerine ekilerek 220 rpm' de 28 °C' de 30 saat inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ 5 değerine ulaştığında kültürlerden alınan 5 ml' lik örnekler taze hazırlanmış 100 ml' lik TSB besiyerine aktararak fermentasyon başlatılmıştır. İnkübasyonun 15., 24. ve 30. saatlerinde kültürlerden 600 µl' lik örnek alınıp içinde 1.2 ml Qiagen marka RNA protect solusyonu bulunan 2 ml' lik Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. 5 sn. hafif güçte vorteksledikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler 3000 rpm' de ve 5 dak. santrifüj edilmiş ve süpernatant tamamen çökeltiden uzaklaştırılmıştır, bu örnekler RNA izolasyonu için -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Kültürlerden aynı saatlerde 1 ml alınarak 13 000 rpm' de 10 dakika santrifüj sonrasında elde edilen çökelek DNA ölçüm deneylerinde kullanılmıştır. RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy mini izolasyon kiti kullanılmıştır. Standart prosedür üzerine bazı modifikasyonlar ilave edilmiştir: (i) RLT tamponuna 30 mg/ml lik lizozimden 100 µl ilave edilmesi, (ii) örneklerin orta güçte 20 saniye süresince ve 2 dak. aralıklarla 7 kez sonike edilmeleri, (iii) fenol-kloroform muamelesi ve fenol ekstraksiyonu sırasında örnek kaybını azaltmak amacı ile "Phase lock gel heavy" (Eppendorf) kolonlarının kullanılması, (iv) DNA kontaminasyonunu engellemek amacı ile RW1 tamponu ile yıkanan kolona bağlı örneklerin DNaz (10 µl) içeren RDD (Qiagen) tamponunda iki kez 30 °C' de 30 dakika inkübe edilmesi (v) Distile su ile kolondan indirilen RNA örneklerindeki muhtemel DNA kalıntılarını yok etmek üzere DNA-free™ kit (Ambion)'inin kullanılması. RNA örnekleri -80 °C'

de küçük hacimlerde (10 µl) muhafaza edilmiştir. NanoDrop® ND-2000 Spektrofotometrede (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 1/10 oranında seyreltilmiş RNA örneklerinin miktarı ve sağlamlığı ($A_{260}/A_{230}>1.8-2.2$) ve temizliği ($A_{260}/A_{280}>2$) analiz edilmiştir. RNA örneklerinin miktarı ng/µl konsantrasyonlarında verilmiştir ve stok RNA örnekleri -80 °C' de muhafaza edilmiştir.

2.16. Revers Transripsiyon PCR (RT-PCR)

RT-PCR için "Invitrogen Superscript™ One-Step" kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde Reaction mixture (2X) tamponu (0.4 mM dNTP karışımı, 2.4 mM MgSO₄) ve RT/Platinum® Taq mix polimerazı bulunmaktadır. Yüksek G-C içeriği nedeni ile reaksiyona % 5 oranında DMSO (Sigma) eklenmiştir. RNA içindeki muhtemel DNA kontaminasyonunu görmek için negatif kontrol olarak Platinum® Taq polimerazının (Invitrogen) kullanıldığı negatif kontrol deneyleri de yürütülmüştür (RT- deneyleri). 20 µl hacimdeki reaksiyon aşağıdaki komponentlerden oluşmaktadır (Tablo 2.3):

Tablo 2. 3. Standart RT-PCR reaksiyon koşulları

İçerik	Hacim (µl)	Final konsantrasyon
2X reaksiyon karışımı	10	1X (0.2 mM dNTP+1.2 mM MgSO ₄)
Total RNA (100 ng/µl)	2	10 ng
ileri primer (10 µM)	0.5	250 nM
Geri primer (10 µM)	0.5	250 nM
DMSO	1	5 %
MgSO ₄	gerektiğinde	-
dH ₂ O	to 20 µl	-
RT/Platinum® Taq mix (RT+)	0.3	
Platinum® Taq (RT-) (5 u/µl)	0.16	0.04 u/µl
RT-PCR koşulları		
cDNA sentezi	50 °C	30 dak. 1 devir
ön denatürasyon	94 °C	2 dak. 1 devir
PCR amplifikasyonu	I- Denaturasyon	94 °C 30 sn.
	II- Yapışma	Tm-10 °C 30 sn. 15-30 devir
	III- Uzama	72 °C 1 dak./kb
Son uzama	72 °C	10 dak. 1 devir

2.17. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR)

Kalıp cDNA sentezi için emsallerine kıyasla daha hassas ve spesifik sonuçlar veren SuperScript™ III Reverse Transcriptaz kiti kullanılmıştır. 20 µl' lik reaksiyon hacmi kitteki prosedüre uygun olarak 250 ng random primerleri, 100 ng total RNA, 2 mM dNTP bileşimi ve 14 µl dH₂O' yu içeren karışım 70 °C' de 5 dak., ardından > 1 dk. buzda inkübe edilmiştir. Kısa bir santrifüjden sonra 4 µl 5X first strand tamponu, 1 µl 0.1 M DTT ve 1 µl SuperScript™ III RT (200 u/µl) eklenen solüsyon pipetle karıştırılıp 25 °C 'de ve 5 dak. ardından 55 °C' de ve 60 dak. inkübe edilmiştir. Reaksiyon 70 °C' de 15 dak. bekletilerek inaktif hale getirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar Rnaz-içermeyen dH₂O ile ½ oranında seyreltilerek 2 µl' si real time PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. Deneyde flöresan boya olarak SYBR Green I (Takara) kullanılmıştır. Standart bir kinetik PCR reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir: 2X SYBR mix, 10 µl; ileri primer (10 µM), 0.3 µl; geri primer (10 µM), 0.3 µl; cDNA, 2 µl; dH₂O, 5.4 µl. Roche LightCycler 1.5 robotiği bu PCR deneylerinde kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları Tablo 2.4' te verilmektedir.

Tablo 2. 4. LightCycler 1.5 cihazında Real time PCR koşulları

Denatürasyon-bekleme evresi	95 °C	30 sn.
Amplifikasyon-Devir evresi	95 °C	10 sn.
	60 °C	1 dak.
Devir #	40	
Melting curve evresi	95 °C	15 sn.
	60 °C	1 dak.
	95 °C	15 sn.
Soğutma evresi	40 °C	30 sn.

Her bir örnek için iki biyolojik kopya ve üç deneysel kopya içeren birbirinden bağımsız iki ayrı qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kalıp olarak cDNA yerine dH₂O' nun kullanıldığı "no template control (NTC)" ve RNA' nın kullanıldığı RT (-) kontrolleri ilave edilmiştir. NTC, kalıp DNA dışında amplifikasyon reaksiyonunun diğer elemanlarının olduğu kontrol reaksiyonudur ve kontaminasyonun belirlenmesini sağlar. RT (-) ise geri reaksiyonun olmadığı, sadece PCR aşamasında kullanılan ve genomik DNA kontaminasyonunu belirlemeye yarayan bir kontrol reaksiyonudur.

SYBR Green I temelli amplikon tesbitinde Ergime eğri analizi (çözünme eğri analizi) oldukça önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu analizle primer dimerleri, kontamine DNA, yanlış

eşleşmiş primerlerden kaynaklanan PCR ürünleri gibi tüm çift-zincirli DNA' nın tesbiti mümkündür. Bu eğriler qRT-PCR reaksiyonlarında melting curve evresinde elde edilirler.

2.17.1. qRT-PCR verilerinin verimlilik-düzeltilmiş rölatif kuantifikasyonu

Belirli bir koşulda gen ekspresyon seviyesinde normal durumdakine göre meydana gelen fizyolojik değişimleri analiz etmede en çok kullanılan yöntem rölatif kuantifikasyondur.

Hedef ve kontrol örneklerin verimlilikleri her zaman eşit olmadığından, rölatif ekspresyon oranını hesaplamak için verimlilik-düzeltilmiş kuantifikasyon modeli kullanılmaktadır. Hedef genin rölatif ekspresyonu en azından bir referans genin ekspresyonu ile normalize edilir (Bustin, 2000; Vandesompele ve ark., 2002; Pfaffl ve ark., 2005). C_T (C_p) değerleri LightCycler yazılımı 4.01 (Roche Diagnostik)' nın 'Second Derivative Maximum Method' u ile belirlenir (Pfaffl ve ark., 2002).

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_T \text{ hedef(ORTALAMA kontrol - ORTALAMA örnek)}}}{(E_{\text{referans}})^{\Delta C_T \text{ referans(ORTALAMA kontrol - ORTALAMA örnek)}}$$

2.17.2. qRT-PCR verilerinin istatistiksel analizi

ccaR geni tahrip edilmiş mutant suşta parental suşa kıyasla T_{15} , T_{24} ve T_{30} ' da gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı qRT-PCR verileri tek-yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Diğer yandan, rekombinant C11 ve pGV suşları ile parental suşta zamana bağlı olarak gen ekspresyonlarındaki farklılıkların analizi tekrarlı ölçümler ANOVA analizi ile birlikte Bonferroni post hoc testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Veri analizi, SPSS v. 17 ve Graphpad Prism programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grafikleride istatistiksel önem değeri * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) ve *** ($p < 0.001$) şeklinde ifade edilmiştir.

2.18. CcaR proteininin saflaştırılması

E. coli DH5 α hücrelerindeki *ccaR* genini taşıyan pET-CCAR rekombinant vektörü transformasyon ile *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmıştır. Bu vektörü taşıyan rekombinant *E.coli* [pET-CCAR] kültüründen 16 saatlik inkübasyon sonrasında 2 ml alınıp iki farklı erlendeki 100 ml' lik LB besiyerlerine ekilmiş ve 37 °C ve 200 rpm' de inkübe edilmişlerdir. Kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.6' ya ulaştığında, 1 mM IPTG erlenlerden birine ekilmiş diğeri ise kontrol olarak bırakılmıştır. 37 °C, 200 rpm' de 5 saat daha inkübe edilen kültürler 4 °C' de ve 6000 X g' de 15 dak. santrifüj edilmişlerdir. Ardından, elde edilen çökelekler -80 °C' de 30

dak.bekletilmiş ve sonrasında oda sıcaklığında çözünmüştür. 5 ml hacimdeki LEW tamponunda (Ek D) pipetleme ya da vorteksleme ile homojen hale getirilen karışım 5 sn. aralıklarla 6 X 10 sn. şeklinde ve 8' lik bir güç uygulanarak sonikasyona tabi tutulmuşlardır. Sonike edilen örneklerden 4 °C' de 15000 rpm' de 15 dak. santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant -80 °C' de muhafaza edilmiş veya IPTG ile indüklenen örneğe ait olan sıvıya % 1 oranında triton X100 eklendikten sonra His Tag kolonundan geçirilerek saflaştırılmıştır. Kolon (Protino® Ni-TED 2000) 4 ml hacimdeki LEW tamponu (artı 10 mM imidazol, pH: 8) ile dengelendikten sonra supernatant kademeli olarak kolondan geçirilmiştir. Eld edilen flow-through örneği -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Kolonun üç kez 20 mM imidazol içeren LEW tampon ile yıkanmasından sonra (ilk yıkama solusyonu da -80 °C' de tutulmuştur), proteinler 3 ml' lik elusion tamponu (Ek D) ile kolondan ayrıştırılmaya çalışılmıştır. Eluant ve -80 °C' de muhafaza edilmiş olan flow-through ve yıkama örneklerinden 10 µl alınıp SDS-PAGE analizi ile saflaştırmanın olup olmadığı kontrol edilmiştir. Protein solüsyonu (5 ml) 4 °C' de düşük konsantrasyonlu üre içeren diyaliz tamponunda (Ek D) (1 l, protein çözeltilisinin 200 katı hacimde) diyaliz edilerek proteinin yeniden doğal formunu alması sağlanmıştır. Bu proteinler -80°C' de küçük hacimlerde saklanmıştır.

2.19. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Protein konsantrasyonlarını belirlemek için Bradford kuantifikasyon metodu (1976) uygulanmıştır. Bu metodun prensibi, proteine bağlandığında Coomassie Brilliant Blue G-250 asidik solusyonunun 465' ten 595 nm' ye absonbans değişiminden dolayı fark edilir bir renk değişiminin gözlenmesidir. Bovine serum albumini (BSA) protein kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde standart olarak kullanılmıştır. 1 mg/ml konsantrasyonlu BSA çözeltilisinden 2, 4, 6, 8 10 µl alınıp tüplere konulmuş ve üzerleri distile su ile 100 µl' ye tamamlanmıştır. Blank reaksiyonu için sadece 100 µl dH₂O tüpe konmuştur. 900 µl hacimdeki deney belirteci (Ek D) her bir tüpe eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dak. inkübasyon sonrasında, her bir tüpün spektrofotometrede OD₅₉₅ değeri okunmuş ve protein konsantrasyonları OD₅₉₅ vs µg protein standart eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır.

2.20. Elektroforetik hareket değişim deneyi (EMSA)

Sefamisin C gen kümesindeki uzunluğu 109 ila 1209 bç arasında değişen genler arası bölgeler ve promotor kısımları PCR ile çoğaltılmıştır. *S. clavuligerus* NRRL 3585' in genomik DNA' sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonlarında her bir hedef bölge için spesifik primer setleri kullanılmıştır.

75-100 ng DNA kısmen saflaştırılmış CcaR proteini ile bağlanma tamponu içinde ve oda sıcaklığında 30 dak. boyunca inkübe edilmiştir. Bağlanma tamponu 80 mM HEPES, 200 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, % 40 gliserol, 16 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 µg poly[dl-dC], ya da Salmon Sperm DNA (1µg/µl) içermektedir. İnkübasyon sonrasında örnekler daha önce 4°C' de, 80 V akımla 30 dak. yürütülen % 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) ve 4 °C' de 90 V akım alacak şekilde 1 saat süresince yürütülmüştür. Bio-Rad' a ait Mini-PROTEAN® 3 Hücre sistemi bu işlem için kullanılmıştır. PAGE' in ardından, proteinle kompleks yapan ve de herhangi bir reaksiyona girmeyen DNA fragmentlerini görebilmek için SYBR Green I Nükleik asit jel boyasında (Invitrogen) (1/10000, v/v) 30 dak. boyunca ve oda sıcaklığında düşük seviyeli bir çalkalamayla inkübe edilmiştir. Son olarak UV-transilluminatörde bantlar görüntülenmiştir.

2.21. Proteom çalışmaları

2.21.1. Total protein izolasyonu

100 ml TSB' de 28°C' de ve 220 rpm' de inkübe edilen ve C11 ile parental suş *S. clavuligerus*'a ait 24 saatlik kültürlerin 10 ml' si oda sıcaklığında ve 6000 rpm' de 6 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler (çökelekler) sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Protein izolasyonu için dondurulan örnekler doğrudan sıvı nitrojende dövülerek toz haline getirilmiş ve ardından 5 ml hacimdeki TE tamponunda (20 mM- Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH. 7.4) çözülmüş ve 6000 rpm' de 6 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrar edilmiştir. Sonrasında, pellet 1 ml lizis tamponunda çözülmüş (proteaz inhibitör karışımı içeren TE) ve sonikasyonla hücreler patlatılmıştır. Buz içerisinde bekletilen örnekler 1 dakika aralıklarla 10 sn süresince 4-5 gücünde ses dalgaları gönderilmiş ve bu işlem 10 kez tekrarlanmıştır. Sonikasyonun ardından, 13000 rpm' de ve 30 dk. ve 4 °C' de sentrifügasyon sonrasında elde edilen süpernatant 40 ml' lik santrifüj tüplerine transfer edilmiş ve proteinlerin çökmeleri için 1 ml örnek üzerine 4 misli hacimde soğuk aseton ilave edilmiştir. -20 °C' de 16 saat boyunca inkübe edildikten sonra karışım 13000 rpm' de ve 30 dk. ve 4 °C' de tekrar santrifüj edilmiştir. Aseton içeren süpernatant atıldıktan sonra çöken proteinler 5 ml % 80 oranındaki soğuk aseton: dH₂O karışımı ile yıkanmış ve 13000 rpm' de ve 10 dk. ve 4 °C' de sentrifügasyon sonrasında çöken proteinler iz miktarda bile aseton kalmayınca kadar oda sıcaklığında vakumla kurutulmuştur. Kuruyan çökelek 500 µl rehidrasyon tamponunda [8 M üre, 0.5 M thioüre, 2% (w/v) CHAPS, 50mM DTT, % 0.5 amfolit (pl. 4-7 veya 3-10), % 0.05 bromofenol mavisini (8 µl/ml)] çözümlenerek protein miktarı

Bradford metodu (Bradford, 1976) ile Bovine Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanılmak suretiyle belirlenmiştir.

2.21.2. İzoelektrik fokuslama ve proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları

400 µg protein BioRad marka pI:4-7 aralığındaki hazır jel "strip" lere 12 saat oda sıcaklığında ve üzeri mineral yağ ile örtülmek suretiyle pasif olarak transfer edilmiştir. İzoelektrik fokuslama çalışması BioRad sistemi kullanılarak yapılmıştır. İzoelektrik fokuslama koşulları şu şekildedir: 5 saat 50 V, 5 saat 70 V, 1.5 saat 100 V, 1 saat 300 V, 1 saat 600 V, 1 saat 1000 V, 2 saat lineer 3000 V, 2 saat lineer 5000 V, 1.5 saat lineer 8000 V ve son stepte 8000 V uygulanarak strip' in 50000 volt/saat akım alması sağlanmıştır. İzoelektrik olarak fokuslanmış stripler ikinci boyut uygulaması için sırası ile 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M üre, 30% (v/v) gliserol, 1% SDS ve 0.25% DTT içeren eşitleme tamponu içerisinde 15 dak, 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M üre, 30% (v/v) gliserol, 1% SDS, 4.5% iodoasetik asit ve 3.5 µM bromfenol mavisi içeren eşitleme tamponu içerisinde 15 dak. dengelenmiştir. Dengelenmiş stripler SDS-PAGE üzerine yatay olarak yerleştirilmiş ve 35 mA' lik akım uygulanarak proteinler ikinci boyutta yürütülmüştür. Jeller, % 45 etanol/% 10 asetik asit solusyonunda fikse edildikten sonra kolloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyanmışlardır.

2.21.3. Protein spotlarının analizi

Tarayıcılar yardımıyla bilgisayar ortamına kaydedilen jel görüntüleri 2-DE jel görüntü analizi programı (Delta 2D; Decodon) ile nitel ve nicel olarak incelenmiştir. Rekombinant şuşlar ve parental şuşun protein profilleri arasındaki farklılıklar belirlenmiştir.

2.22. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

2.22.1. Native PAGE

CcaR proteini doğal koşullarda % 6' lık poliakrilamid jellerde yürütülmüştür (Tablo 2.5).

Tablo 2. 5. Native poliakrilamid jellerin hazırlanışı

	Gel kompozisyonu
Monomer konsantrasyonu	% 6
Akrilamid/bis (30:1)	1.670 ml
dH ₂ O	5.13 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
% 43 Gliserol	600 µl
% 10 Amonyum persülfat	90 µl
TEMED	5 µl

Total monomer	10 ml
---------------	-------

Jeldeki kuyucuklardan birine % 0.1' lik bromofenol içeren blue yükleme tamponu yüklenerek elektroforezin ilerleyişi gözlenebilir.

2.22.2. SDS-PAGE

Proteinler 16 mA' de Mini-Protean jel aparatı kullanılarak ayrılmıştır. SDS-PAGE aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Laemmli, 1970) (Tablo 2.6):

Tablo 2. 6. SDS-poliakrilamid jellerin hazırlanışı

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

2.23. Poliakrilamid jellerin boyanması

2.23.1. Doğal-Poliakrilamid jellerin SYBR Green I nükleik asit boyası ile boyanması

EMSA deneyinde, DNA-protein kompleksleri 0.5X TBE tamponunda 1/100000 oranında seyreltilen SYBR Green I nükleik asit jel boyası ile boyanmıştır.

2.23.2. Coomassie Blue R-250 ile SDS-Poliakrilamid jellerin boyanması

Protein bantlarının gözlenmesi için jeller önce fiksasyon çözeltisinde (Ek D) 1 saat bekletilmiş, ardından taze hazırlanmış 50 ml Coomassie Blue R-250 (Ek D)' de 1 saat hafifçe sallamayla inkübe edilmiş ve sonrasında 2-3 saat boyunca boya temizleme çözeltisinde (Ek D) tutularak fazla boyadan arındırılmıştır.

2.23.3. Coomassie Blue G-250 ile SDS-Poliakrilamid jellerin boyanması

Protein spotlarının gözlenmesi için jeller önce fiksasyon çözeltisinde (Ek D) 1 saat bekletilmiş, dH₂O ile 45 dk. boyunca yıkanarak metanol ve aseton kokularından

arındırılmıştır. Ardından, taze hazırlanmış 150 ml Coomassie Blue G-250 (Ek D) ve 50 ml metanol içerisinde 16 saat boyunca hafifçe sallayarak inkübe edilmiş ve sonrasında 2-3 saat boyunca dH₂O içerisinde tutulmuştur.

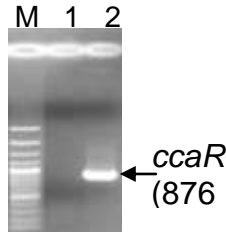
BÖLÜM 3

BULGULAR

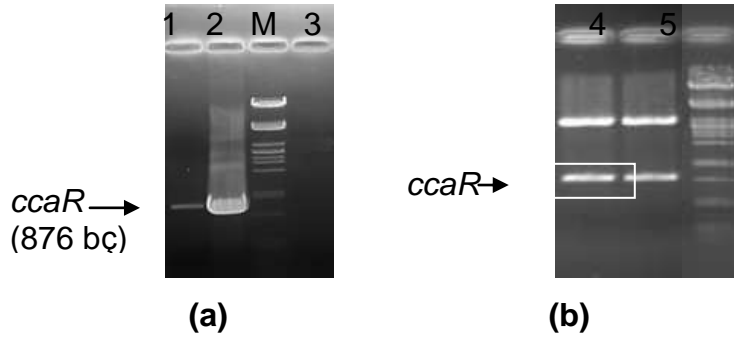
3.1. *ccaR* geninin güçlü bir gliserol promotörü taşıyan pSPG ekspresyon vektöründe ifade edilmesi ya da kendi promotörü ile birlikte pSET152 vektörüyle integrative ekspresyonu

3.1.1. *ccaR* geninin güçlü bir gliserol promotörü (PgIP) taşıyan pSPG ekspresyon vektörüne klonlanması

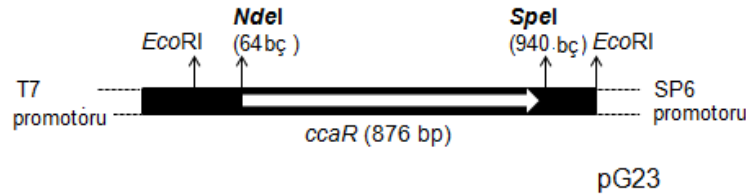
ccaR geninin GenBank ulaşım numarası olan AF073897' daki dizisi ileri ve geri primer dizaynında kullanılmıştır. *S. clavuligerus* genomik DNA' sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu ile *ccaR* geni amplifiye edilmiştir (Şekil 3.1). Jelden ayrılan *ccaR* geni pGEM-T® easy vektörüne ligasyonla yapıştırılmış ve rekombinant vektör transformasyonla *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Ampisilin (100 µg/ml), X-Gal (20 µg/µl) ve 0.5 mM IPTG varlığında üreyen beyaz renkli kolonilerden biri seçilerek taşıdığı recombinant plazmid izole edilmiş ve rekombinasyon olayı sekanslama, PCR ve kesimlerle doğrulanmıştır (Şekil 3.2). Vektöre istenilen yönde girdiği restriksiyon enzim kesimi ile tespit edilen rekombinant vektörü taşıyan bakteri *E. coli* pG23 olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 1. *ccaR* geninin PCR amplifikasyonu. M: λ *Pst*I DNA ladder, 1: Kalıp DNA' nın kullanılmadığı negatif kontrol reaksiyonu, 2: *ccaR* PCR ürünü.

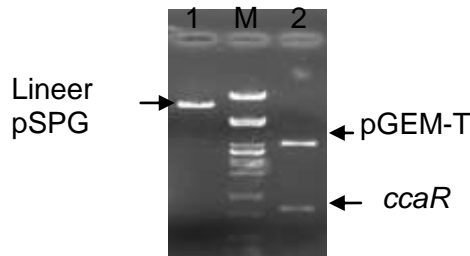


Şekil 3. 2. Rekombinasyonun PCR **(a)** ve ikili enzim kesimi **(b)** ile doğrulanması. M: λ *PstI* DNA ladder, 1: pG23' ün kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR' da amplifiye olan *ccaR*, 2: PCR' in pozitif kontrolü (kalıp DNA olarak *S. clavuligerus*' un genomik DNA' sı kullanıldı), 3: PCR' in negative kontrolü, 4: pG23' deki *ccaR* genin *EcoRI* ile serbest kalması, 5: pG23' ün *NdeI-SpeI* kesimi ile *ccaR* geninin elde edilişi.

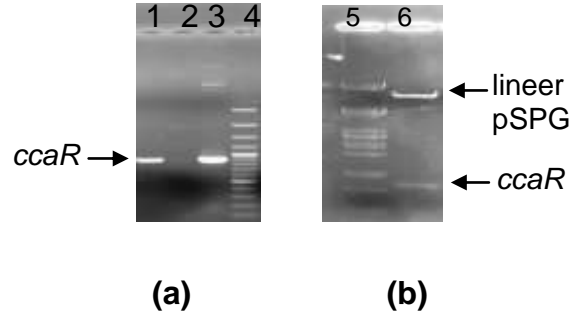


Şekil 3. 3. *ccaR* geninin pG23 plazmidinin MCS bölgesindeki yerleşim yönü.

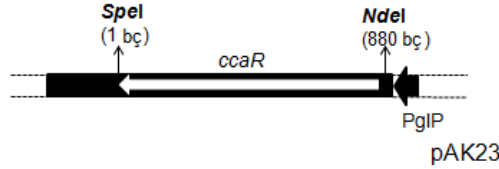
Ardından, *ccaR* geni *NdeI-SpeI* ikili enzim kesimi ile pG23' den ayrılmış ve pSPG vektöründe Pglp' nin hemen ardındaki aynı enzimlerden ibaret kesim bölgesine yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Ligasyon ürünü transformasyon ile *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmış ve 50 μ g/ml apramisin içeren seçici besiyerinde üreyen rekombinant kolonilerden biri seçilerek PCR ve restriksiyon enzimi kesimleri ile rekombinasyon doğrulanmıştır (Şekil 3.5). Bu rekombinant pAK23 olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3. 4. pSPG ve pG23 vektörlerinin *SpeI* ve *NdeI* enzimleri ile kesimleri. 1: Lineer hale gelen pSPG, M: λ *PstI* DNA ladder, 2: Lineer pGEM-T easy vektörü ve *ccaR* geni.



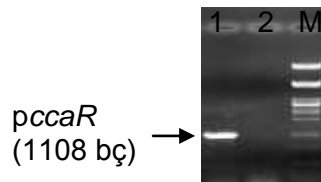
Şekil 3. 5. PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile *ccaR* geninin pSPG vektörüne klonlanmasının doğrulanması 1: Pozitif kontrol (*S. clavuligerus*' un genomik DNA 'sı kalıp olarak kullanıldı), 2: Negatif kontrol (kalıp DNA kullanılmadı), 3: *ccaR*' ye ait PCR ürünü (pAK23 kalıp DNA olarak kullanıldı), 4: 100 bp DNA ladder plus, 5: λ *PstI* DNA ladder, 6: *NdeI* ve *SpeI* ile kesilmiş rekombinant pSPG.



Şekil 3. 6. *ccaR* geninin pAK23 vektöründeki yerleşim yönü.

3.1.2. *ccaR* geninin kendi promotoru (*pccaR*) ile birlikte *S. clavuligerus* kromozomuna entegrasyonu

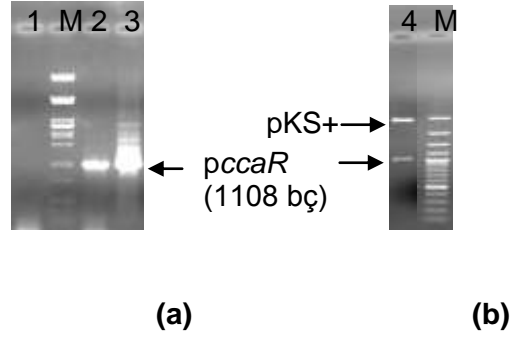
S. clavuligerus' un genomik DNA' sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu ile *ccaR* geni kendi promotoru (*pccaR*) ile birlikte amplifiye edilmiştir (Şekil 3. 7). Jelden izole edilen *pccaR*' ye ait PCR ürünü pGEM-T easy vektör sistemine yerleştirilmiş ve oluşan rekombinant vektör transformasyonla *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinasyon PCR, enzim kesimi ve dizileme ile doğrulanmıştır (Şekil 3.8).



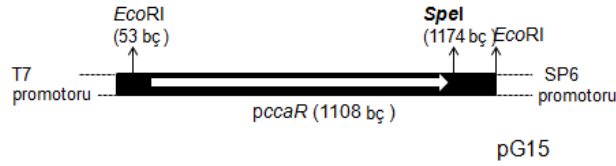
Şekil 3. 7. *S. clavuligerus*' un genomik DNA' sı kalıp olarak kullanılarak *ccaR* geninin kendi promotoru (*pccaR*) ile birlikte PCR reaksiyonu ile amplifiye edilmesi. 1: *pccaR* PCR ürünü (*S.*

clavuligerus' un genomik DNA' sı kalıp olarak kullanıldı), 2: Negatif kontrol (kalıp DNA reaksiyona katılmadı), M: λ *Pst*I DNA ladder.

Elde edilen rekombinant pG15 olarak adlandırılmıştır ve *pccaR*' nin rekombinant plazmidin MCS' indeki yerleşim yönünün şematik gösterimi Şekil 3.9' da verilmektedir.



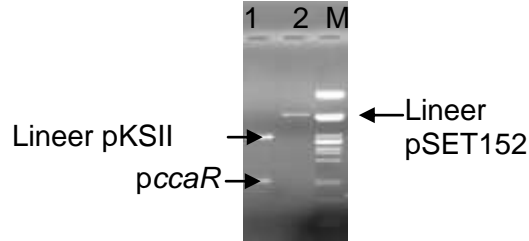
Şekil 3. 8. *pccaR* geninin pGEM-T easy vektöre klonlanmasının PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile doğrulanması. (a) 1: Negatif kontrol (kalıp DNA kullanılmadı), M: λ *Pst*I DNA ladder, 2: *pccaR* PCR ürünü (pG15 kalıp DNA olarak kullanıldı), 3: *pccaR* PCR ürünü (parental suşun genomik DNA' sı kalıp olarak kullanıldı), (b) 4: *Eco*RI-*Xba*I ile kesilmiş pG15, M: 100 bp DNA ladder.



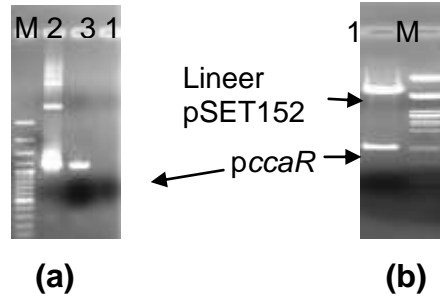
Şekil 3. 9. *pccaR* geninin pG15 vektöründeki yerleşim yönü.

pccaR geninin pG15 vektöründen *Eco*RI enzimi ile kesip yine aynı enzimle lineer hale getirilmiş pSET152 entegrasyon vektörüne klonlamak için yapılan girişimler sonuçsuz kalmış, bu nedenle, *pccaR* geni ikinci bir ara vektöre klonlanarak entegrasyon vektörüne klonlanmasını kolaylaştıracak yeni enzim kesim bölgeleri oluşturulması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla, *pccaR* geni bir başka *E. coli* klonlama vektörü olan ve MCS' inde çok çeşitli enzim kesim bölgeleri taşıyan pBluescriptIIKS+ (pKS+)' e klonlanmıştır. *pccaR* geni pKS+ vektörünün *Eco*RI-*Spe*I enzim kesim bölgeleri arasına klonlanmış ve elde edilen rekombinant vektör pKS15 olarak adlandırılmıştır. Sonrasında, *Eco*RI ve *Xba*I restriksiyon enzimleri ile pKS15' den kesilen gen aynı enzimlerle lineer hale getirilen pSET152 vektörüne klonlanmıştır (Şekil 3.10). Rekombinant pSET152 vektörü transformasyonla *E. coli* DH5 α

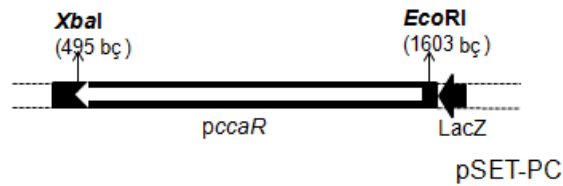
hücrelerine aktarılmış, apramisin içeren seçici besiyerinde üreyen koloniler taranmış ve rekombinasyon olayı PCR ve enzim kesimleri ile doğrulanmıştır (Şekil 3.11). Rekombinant kolonilerden biri seçilerek pSETPC olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3. 10. pG15 ve pSET152 vektörlerinin *EcoRI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmeleri. 1: *EcoRI-XbaI* ile kesilmiş pG15, 2: *EcoRI-XbaI* ile kesilmiş pSET152, M: λ *PstI* DNA ladder.



Şekil 3. 11. *pccaR* geninin pSET152 entegrasyon vektörüne klonlanmasının PCR (a) ve ikili enzim kesimi (b) ile doğrulanması. **(a)** M: 100 bp DNA ladder plus, 1: Negatif kontrol (Kalıp DNA yok), 2: *pccaR* PCR ürünü (pSET-PC kalıp DNA olarak kullanıldı), 3: *pccaR* PCR ürünü (parental suşun genomik DNA' sı kalıp olarak kullanıldı), **(b)** 1: *EcoRI-XbaI* ile kesilmiş pSET-PC, M: λ *PstI* DNA ladder.

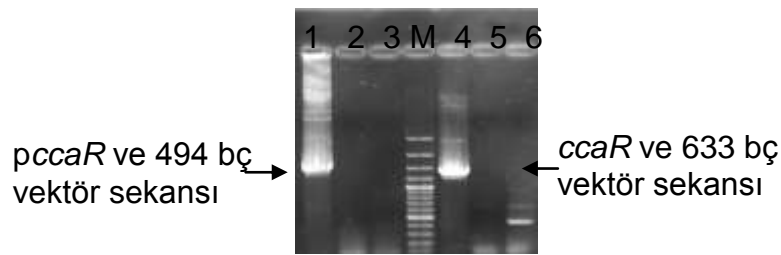


Şekil 3. 12. *pccaR* geninin pSET-PC vektörünün MCS'indeki yerleşim yönü.

3.1.3. Rekombinant *E.coli* hücreleri ve *S. clavuligerus* arasında konjugasyon

S. clavuligerus hücrelerinin restriksiyon bariyerlerinden kurtulmak önemli bir aşama olup konjugasyon öncesinde rekombinant pAK23 ve pSET-PC plazmidleri ile pSPG ve pSET152 vektörleri metilasyondan yoksun bir suş olan *E. coli* ET12567/ pUZ8002' ye transformasyonla aktarılmışlardır. pUZ8002; RK2 türevi bir transfer plazmid olup, konjugasyon sırasında rekombinant plazmidin mobilizasyonunu sağlar. *oriT* bölgesinde taşıdığı bir mutasyona rağmen, düşük orandaki kendini transfer edebilme yeteneği ile pUZ8002 vektörü *E. coli* ET12567 hücrelerine kendi aktarımını sağlayabilir (Bierman ve ark., 1992; Paget ve ark., 1999; Paranthaman ve Dharmalingam, 2003). Transformasyon sonrasında, dört farklı rekombinant *E. coli* ET12567/pUZ8002 suşunun ilgili vektörü taşıyıp taşımadığı PCR ile doğrulanmıştır (data gösterilmedi). Ardından, konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Flett ve ark., 1997). Elde edilen ekskonjugantlar apramisin içeren TSA plaklarında seçilmişlerdir. pSET-PC ve pAK23 vektörlerini içeren rekombinant *S. clavuligerus* hücreleri PCR ile doğrulanmıştır (Şekil 3.13). Primer olarak; klonlanan genlerin geri primeri ve vektörde bulunan apramisin geninin içinden dizayn edilen ileri primer kullanılmıştır.

pAK23 taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* suşu *S. clavuligerus* C11 olarak, pSET-PC vektörünün kromozomuna entegre olduğu diğer rekombinant *S. clavuligerus* suşu ise *S. clavuligerus* PC olarak adlandırılmıştır. Diğer taraftan, vektör kontrolleri ise *S. clavuligerus* pGV (pSPG taşıyan *S. clavuligerus*) ve *S. clavuligerus* pTV (kromozomunun *attB* bölgesinde pSET152 vektörü bulunan *S. clavuligerus*) olarak adlandırılmışlardır.

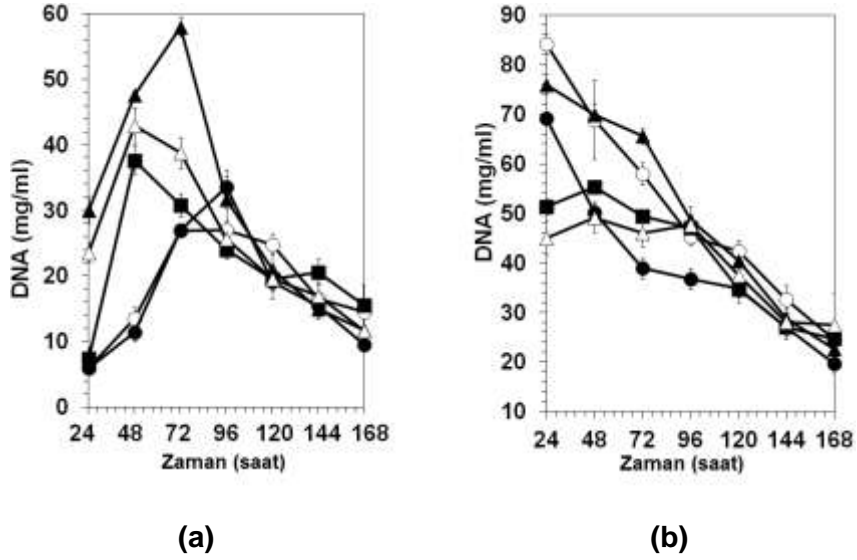


Şekil 3. 13. Rekombinant *S. clavuligerus* C11 ve PC suşlarının PCR ile doğrulanmaları. 1: Tüm *pccaR* genini ve 494 bp' lik vektör sekansını içeren PCR ürünü (Kalıp olarak *S. clavuligerus* PC' nin total DNA' sı kullanılmıştır), 2: Negatif kontrol (kalıp DNA kullanılmadı), 3: Negatif kontrol (parental suşun genomik DNA' sı kalıp olarak kullanıldı), M: 100 bp DNA ladder plus, 4: : Tüm *ccaR* genini ve 633 bp' lik vektör sekansını içeren PCR ürünü (Kalıp olarak *S. clavuligerus* C11' in total DNA' sı kullanılmıştır), 2: Negatif kontrol (kalıp DNA kullanılmadı), 3: Negatif kontrol (parental suşun genomik DNA' sı kalıp olarak kullanıldı).

3.1.4. TSB ve SA besiyerlerinde üreyen rekombinant *S. clavuligerus* suşlarının sefamisin C ve klavulanik asit üretim kapasitelerinin biyoassay ve HPLC analizleri ile karşılaştırılması

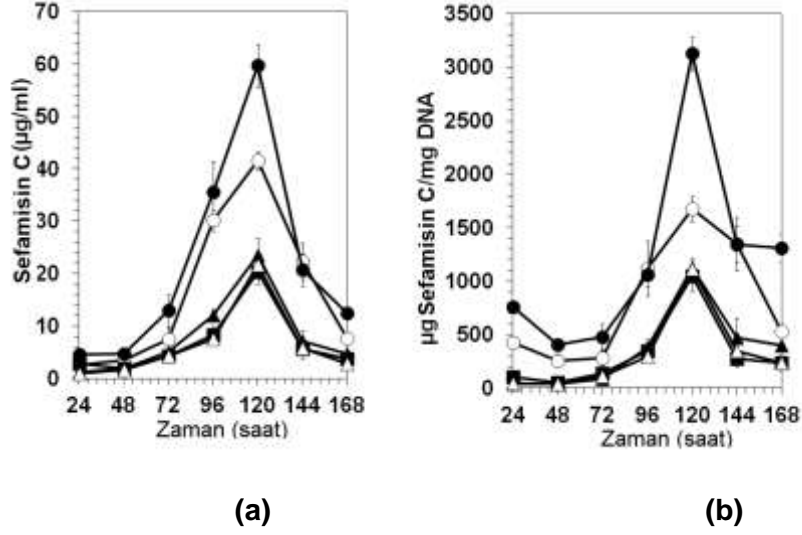
CcaR proteininin sefamisin C ve klavulanik asit üretimleri üzerindeki düzenleyici etkisi parental *S. clavuligerus* suşu ve rekombinant *S. clavuligerus* C11, pGV, PC ve pTV suşlarının 168 saat boyunca SA ve TSB besiyerlerinde üretildiği fermentasyon çalışmalarda gözlenmiştir. Her suş için üç biyolojik replika fermentasyonda kullanılmıştır ve bu süreçte 24 saat aralıklarla alınan örnekler biyoassay, HPLC ve üreme eğrisinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır. Elimizde hali hazırda bir sefamisin C standardı olmadığından HPLC analizi sadece DEPA İlaç Firmasından temin edilen potasyum klavulanat tuzunun standart olarak kullanılmasıyla rekombinant suşlarda parental suşa kıyasla üretilen klavulanik asit miktarını belirlemek üzere HPLC çalışmaları yapılmıştır. Diğer taraftan biyoassay çalışmalarında sefalosporin C standart olarak kullanılmış ve parental suşunkine kıyasla rekombinantlar tarafından üretilen sefamisin C miktarındaki artış tespit edilmiştir.

Rekombinant PC suşunun her iki besiyerinde parental suşa göre daha fazla ürettiği tespit edilmiştir ve onun vektör kontrolü pTV, özellikle 24 ila 72. saatler arasında parental suşa göre SA besiyerinde daha yüksek bir üreme profile sergilerken fermentasyonun devam eden saatlerinde parental suşla aynı oranda ürettiği belirlenmiştir (Şekil 3.14a). C11 suşunu üremesi TSB besiyerinde fermentasyon süresince ciddi oranda azalan bir profil göstermiştir, bununla birlikte, SA besiyerinde C11' in üremesi, fermentasyonun 72. saatine kadar parental suştan daha az olmuş ve 96. saatten sonra da parental suşla aynı üreme profilini göstermiştir. Dikkat çekici olan, TSB besiyerinde tüm suşlarının üremelerinin fermentasyonun 48. saatinden sonra kademeli olarak düşmesidir (Şekil 3.14b).



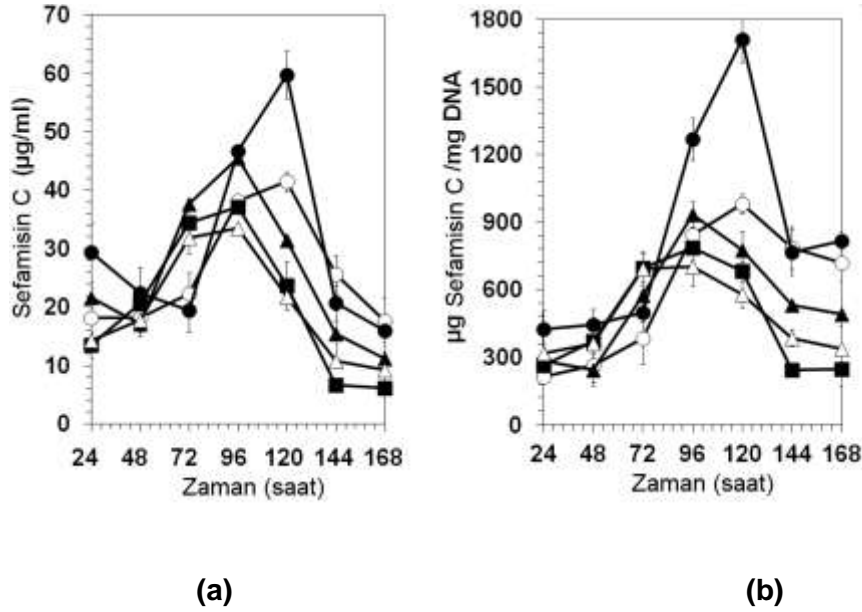
Şekil 3. 14. Parental suş *S. clavuligerus* NRRL3585 (■) ve rekombinant suşlar olan, C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△)' nin SA (a) ve TSB (b) besiyerlerinde zamana bağlı üreme profilleri.

pGV ve C11 rekombinant suşlarının SA besiyerinde parental suşa kıyasla volumetrik sefamisin C üretimleri sırasıyla yaklaşık 2 ve 3 misli daha yüksektir. Bununla birlikte, PC ve pTV suşlarının ki bunlardan PC' nin kromozomuna *pccaR* yi taşıyan pSET-PC vektörü entegre olmuştur, volumetrik sefamisin C miktarları parental suşun ürettiği miktarla aynıdır (Şekil 3.15a). Hücrelerin antibiyotik üretim kapasiteleri mg DNA başına düşen µg sefamisin C miktarını veren spesifik sefamisin C üretimini belirleyerek daha iyi ayırt edilebilir. Elde edilen spesifik sefamisin C miktarlarına göre, çok kopyalı plazmidinde bulunan güçlü bir gliserol promotorunun arkasına klonlanmış *ccaR'* yi taşıyan C11 suşu parental suşla kıyaslandığında fermentasyonun 120. saatinde 3 kat daha fazla sefamisin C üretmektedir. Bunun yanısıra, pGV' nin spesifik sefamisin C üretimi aynı saatte parental suşa kıyasla 1.5 misli daha fazladır. Spesifik sefamisin C üretimi bakımından PC suşunda parental suşa kıyasla önemli oranda bir artış görülmemektedir (Şekil 3.15b).



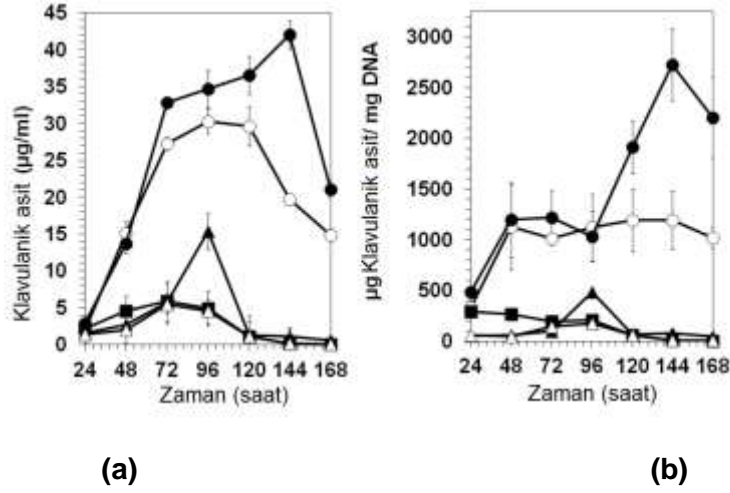
Şekil 3. 15. SA besiyerinde parental suşa (■) kıyasla C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının fermentasyon süresince volumetrik (a) ve spesifik (b) sefamisin C üretimlerinin biyoassay çalışmalarıyla karşılaştırılmaları.

TSB besiyerinde, suşların volumetrik sefamisin C üretim kapasiteleri SA besiyerinde ürediklerinde elde edilen değerlerden farklıdır. Karşılaştırılan suşlardan C11, 120. saatte parental suşa göre 2.3 katlık spesifik sefamisin C üretim kapasitesi ile en yüksek sefamisin C verimini sağlayan suştur (Şekil 3.16a ve b). Kromozomunun *attB* bölgesinde ekstra *pccaR* genini taşıyan PC suşu da 1.2 ila 2.1' lik bir artış göstermiştir (Şekil 3.16a ve b).

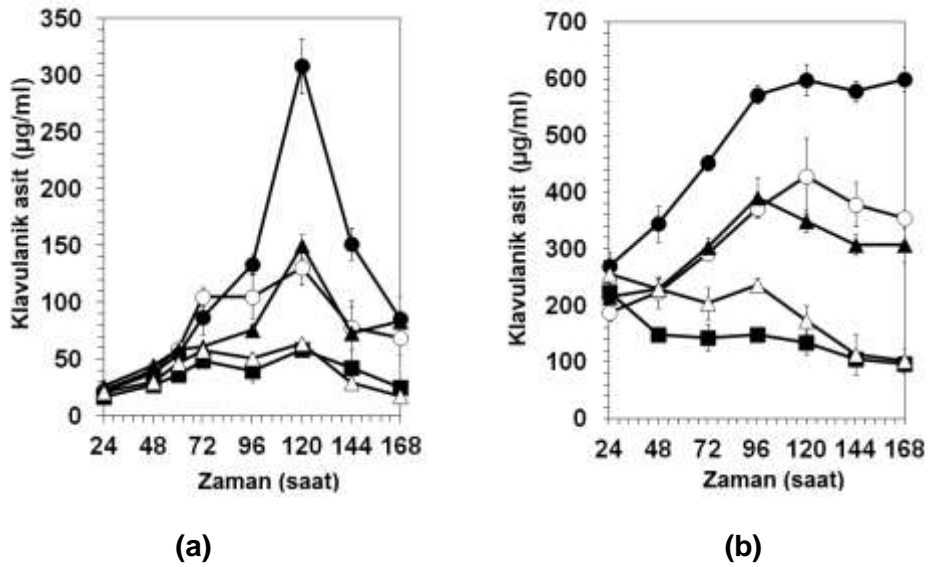


Şekil 3. 16. TSB besiyerinde üreyen rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının fermentasyon süresinde parental suşa (■) kıyasla ürettikleri volumetrik (a) ve spesifik (b) sefamisin C miktarlarının biyoassay çalışmalarıyla karşılaştırılmaları.

Daha sonra, biyoassay (Şekil 3.17) ve HPLC (Şekil 3.18) analizleri ile SA ve TSB besiyerlerinde fermente edilen rekombinantlar tarafından üretilen klavulanik asit miktarları karşılaştırılmıştır. Her iki besiyerinde de, T_{120} ' de rekombinant C11 suşunun klavulanik asit titresi parental suşunkinden 6 kat daha fazladır. Parental suşa kıyasla, rekombinant PC suşu inkübasyonun 96. ve 120. saatlerinde TSB besiyerinde 2 ve SA besiyerinde 3 misli oranda daha fazla klavulanik asit üretebilme yeteneğindedir.



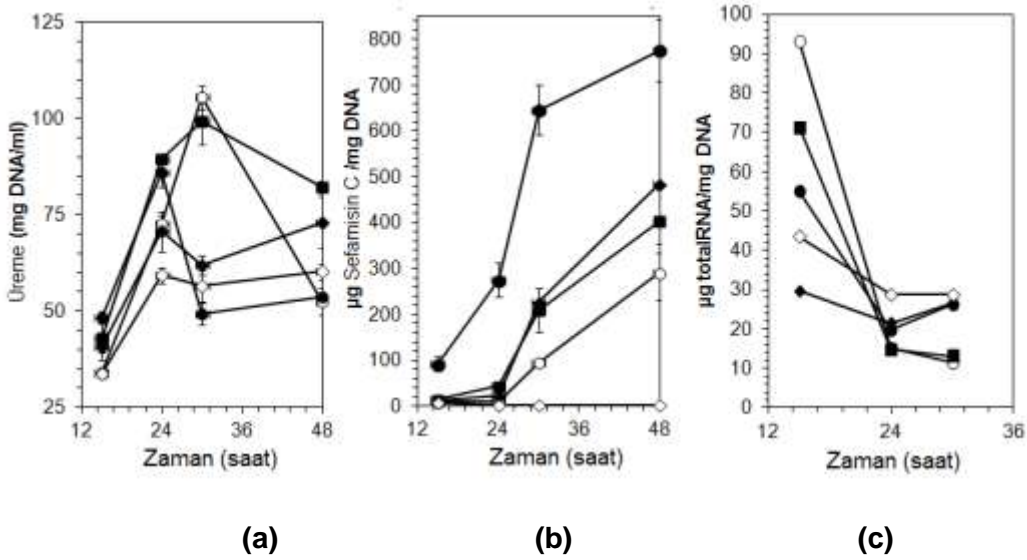
Şekil 3. 17. Fermentasyon boyunca, SA besiyerinde üreyen rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının parental suşunkine (■) göre volumetrik (a) ve spesifik (b) klavulanik asit titrelerinin karşılaştırılmaları.



Şekil 3. 18. Fermentasyon süresince rekombinant C11 (●), PC (▲), pGV (○) ve pTV (△) suşlarının parental suşa (■) kıyasla, SA (a) ve TSB (b) besiyerlerinde klavulanik asit üretimlerinin HPLC ile belirlenmesi.

3.2. Revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) ve qRT-PCR deneylerinde kullanılacak RNAların izolasyonu

RT-PCR ve qRT-PCR analizlerinde kullanılacak RNA' nın izolasyon zamanının belirlenmesi için suşların fermentasyonun erken saatlerindeki üreme ve spesifik sefamisin C üretimleri belirlenmiştir (Şekil 3.19a,b). mg DNA başına µg RNA miktarı da belirlenmiş ve Şekil 3.19c' de gösterilmiştir. Fermentasyonun erken saatlerinde, C11' in spesifik sefamisin C üretimi parental suşa kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, bu rekombinant suşun üremesi 24 saatin sonunda keskin bir düşüş sergilemektedir. Elde edilen verilere göre, fermentasyonun 15, 24 ve 30. saatleri ileriki çalışmalar için örneklem zamanı olarak seçilmiştir.



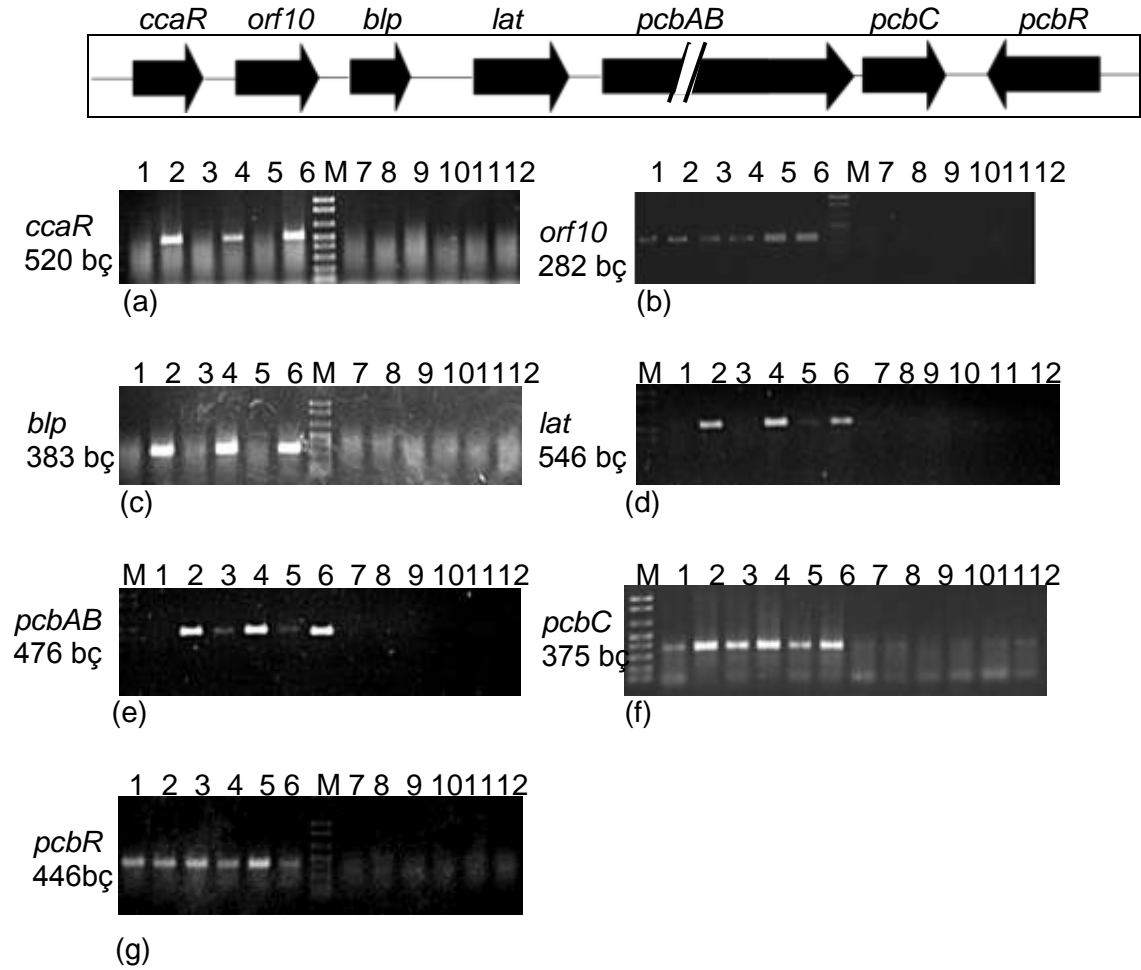
Şekil 3. 19. Parental *S. clavuligerus* (ATCC27064 (◆) ve NRRL3585 (■)) suşları, C11 (●), pGV(○) rekombinantları ve *ccaR* geni tahrip *S. clavuligerus* suşu (◇)' na ait üreme (a), spesifik sefamisin C titresi (b) ve mg DNA başına düşen µg RNA miktarı (c).

3.3. RT-PCR ile *ccaR* geninin sefamisin C gen kümesi üzerindeki regülatör etkisinin transkripsiyonle analizi

ccaR geninin sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel regülasyonu üzerindeki etkisi parental *S. clavuligerus* NRRL3585 ve ATCC27064 suşları, *ccaR::aphII* mutant suşu, ve rekombinant C11 suşundan izole edilen total RNA' ların kalıp olarak ullanıldığı RT-PCR deneyleri ile belirlenmiştir.

3.3.1. *S. clavuligerus* ATCC27064' a ait *ccaR::aphII* mutantında sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel profili

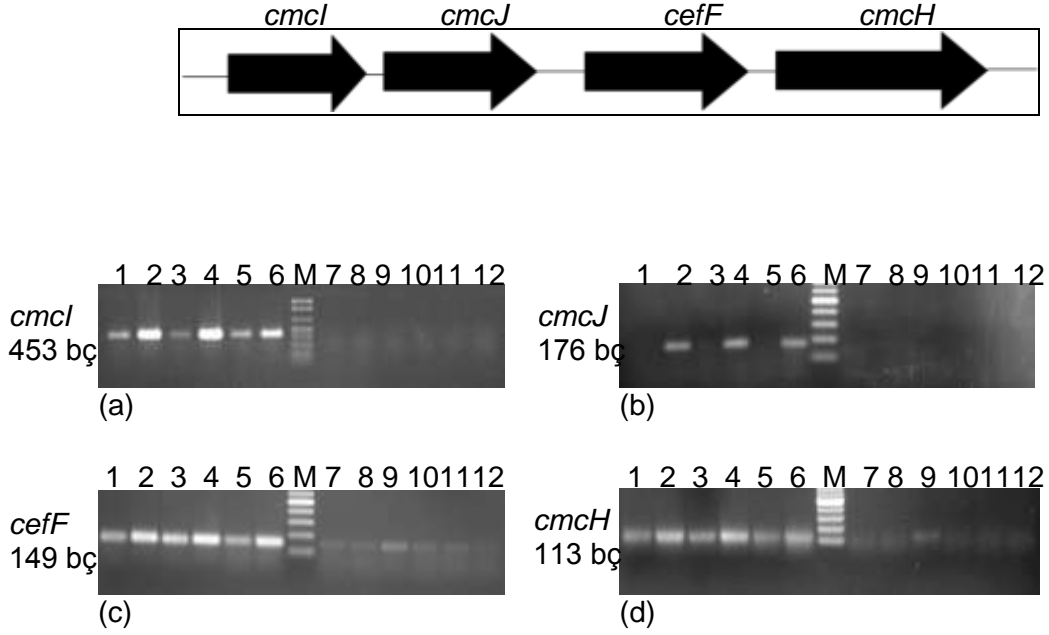
Sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel profili üç bölümde incelenmiştir: (i) *ccaR* geni ile başlayıp *pcbR* ile sona eren bölge (ii) *cmcl*, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* genlerinin yer aldığı gen kümesinin orta bölümü, (iii) *cefD*, *cefE*, *pcd*, *cmcT*, *pbpA* ve *bla* genlerinin bulunduğu üçüncü kısım. RT-PCR sonuçlarına bakıldığında, hücrede sağlam bir *ccaR* geninin olmadığı durumda *ccaR* ve *blp* genlerinin ekspresyonu yok denecek kadar azdır. Mutant *S. clavuligerus* suşunda *lat* ve *pcbAB* genlerinin transkripsiyonu da oldukça azalmış gözükürken, *pcbC* genine ait transkript mutant suştakine kıyasla parental suшта çok az miktarda daha fazla gözükmektedir. Bununla beraber, test edilen tüm saatlerde *orf10* genine ait benzer ekspresyon profili gözlenmiştir. *pcbR* geni 15. saatte mutant ve parental suşlarda yaklaşık aynı oranda transkript verirken, devam eden saatlerde, *ccaR*-geni tahrip edilmiş suшта daha çok transkript oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3. 20. Zamana bağlı olarak, *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *ccaR* geni tahrip edilmiş suşta sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. Kuyucuklar, *ccaR::aphII* mutantında (1, 3, 5) ve parental suşta (2, 4, 6) ilgili

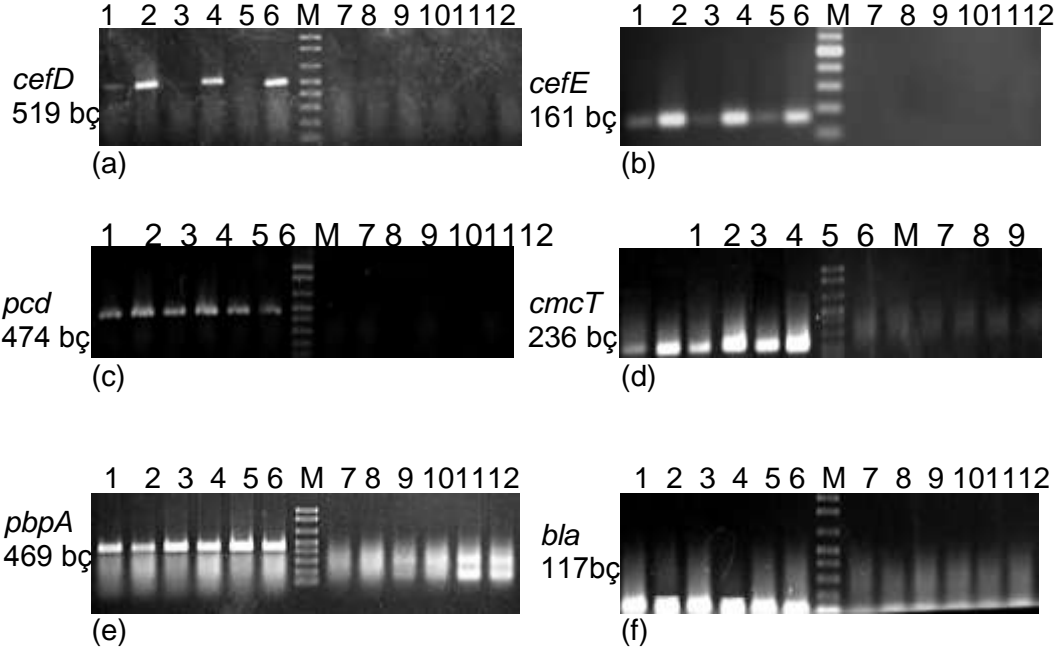
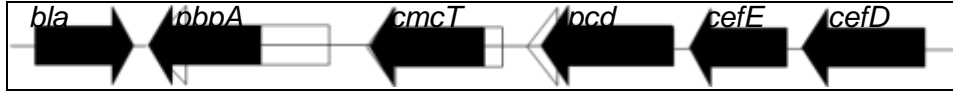
genlerin T_{15} , T_{24} ve T_{30} 'daki ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3 ve 5 numaralı kuyucuklardaki örneklerin RT minus kontrolleri (RNA örneklerindeki muhtemel DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır). 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *ccaR*, (b) *orf10*, (c) *blp*, (d) *lat*, (e) *pcbAB*, (f) *pcbC*, (g) *pcbR*.

Şekil 3.21' de gösterildiği gibi, *cmcl*, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* genlerinin ekspresyonlarının mutant suşta azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 3. 21. Zamana bağlı olarak, *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *ccaR* geni tahrip edilmiş suşta sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. Kuyucuklar, *ccaR::aphII* mutantında (1, 3, 5) ve parental suşta (2, 4, 6) ilgili genlerin T_{15} , T_{24} ve T_{30} 'daki ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3 ve 5 numaralı kuyucuklardaki örneklerin RT minus kontrolleri (RNA örneklerindeki muhtemel DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır). 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *cmcl*, (b) *cmcJ*, (c) *cefF*, (d) *cmcH*.

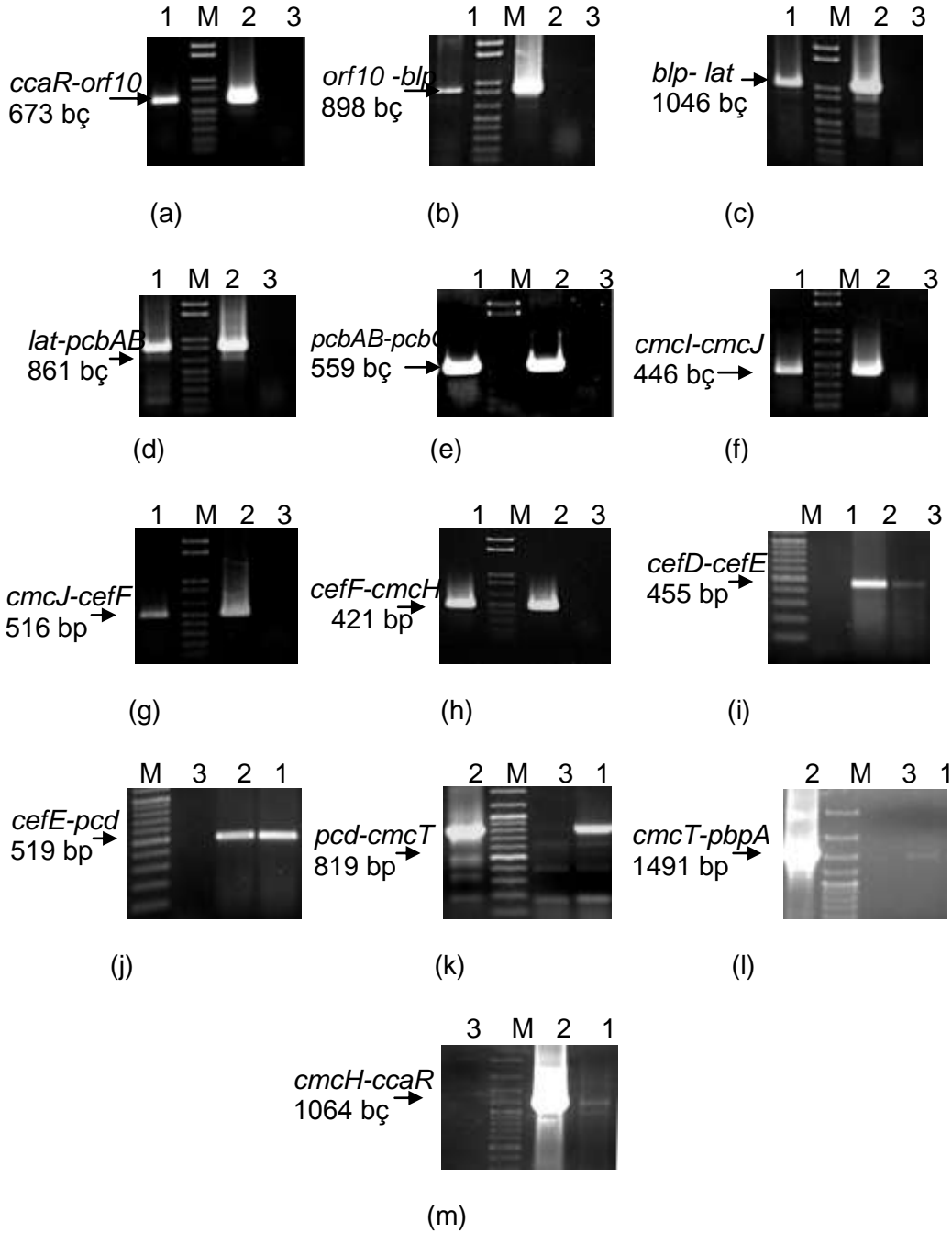
Fermentasyonun tüm saatlerinde *cefD* ve *cefE* genlerinin ekspresyonlarının *ccaR* geni tahrip edilmiş mutant suşta önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, *cmcT* geninin ekspresyonunun mutant suşta parental suşa göre bir miktar daha az olduğu görülmektedir. Hücrede CcaR proteininin yokluğunun *pcd*, *pbpA* ve *bla* genlerinin transkripsiyonları üzerinde olumsuz bir etki göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3. 22. Zamana bağlı olarak, *S. clavuligerus* ATCC27064 ve *ccaR* geni tahrip edilmiş suşta sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile karşılaştırılması. Kuyucuklar, *ccaR::aphII* mutantında (1, 3, 5) ve parental suşta (2, 4, 6) ilgili genlerin T₁₅, T₂₄ ve T₃₀'daki ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3 ve 5 numaralı kuyucuklardaki örneklerin RT minus kontrolleri (RNA örneklerindeki muhtemel DNA kontaminasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır). 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *cefD*, (b) *cefE*, (c) *pcd*, (d) *cmcT*, (e) *pbpA*, (f) *bla*.

3.3.2. *S. clavuligerus* ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonel profili

Sefamisin C gen kümesinde bazı genler birbirine çok yakın lokalize olduklarından bu genlere özgü promotorların bulunmasına yetecek alan söz konusu değildir. Ancak, birçok gen arasındaki ara bölge ilgili promotorları kapsayacak genişliktedir (Tablo 1.4). Bu metabolik yolaktaki genler arasındaki bölgelerin amplifikasyonunu belirlemek üzere RT-PCR deneyleri yürütülmüştür (Şekil 3.23). Bu deneylerde *S. clavuligerus* ATCC27064' a ait 24 saatlik kültürlerden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılmıştır.



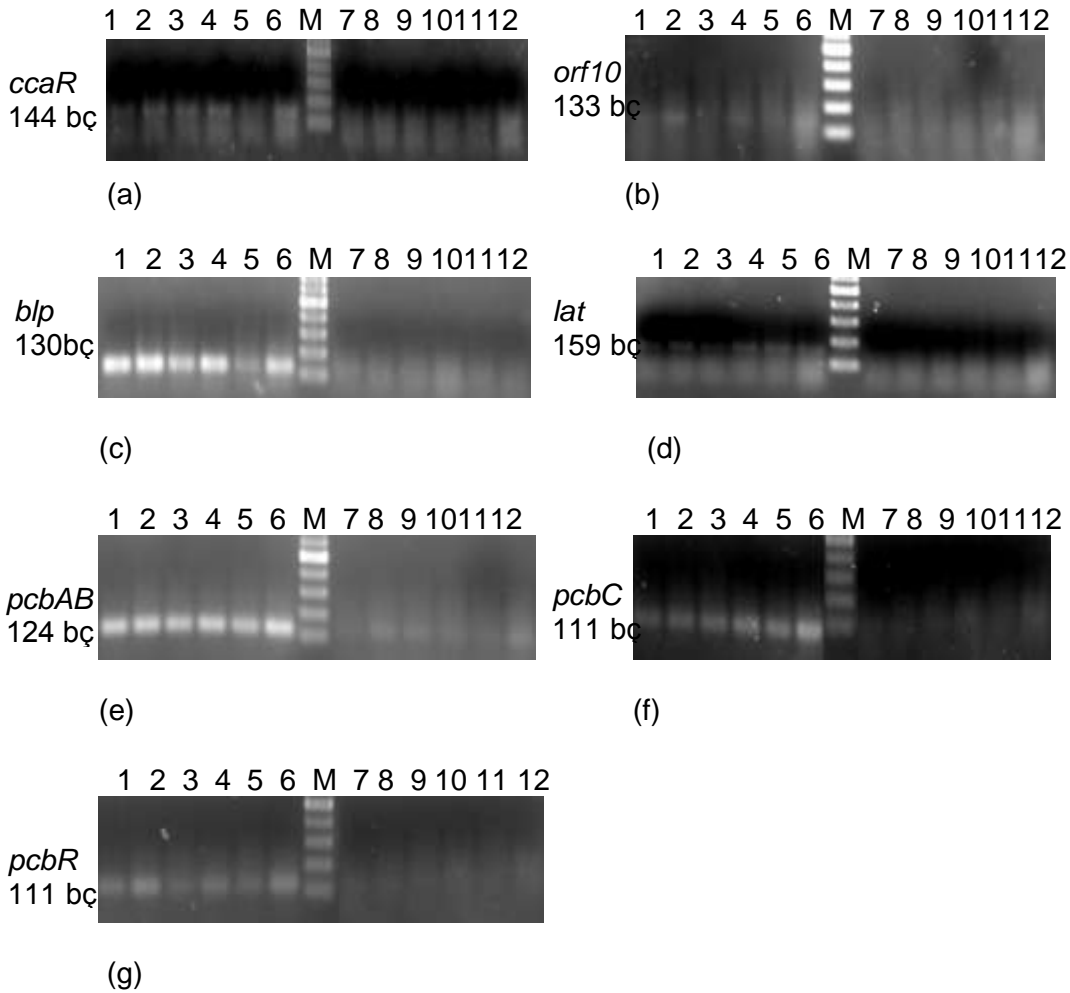
Şekil 3. 23. T_{24} ' de *S. clavuligerus* ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonla profilinin RT-PCR ile gösterilmesi. 1: Parental suşa ait 24. saatteki kültürden izole edilen RNA'nın kalıp olarak kullanılması ile ilgili genler arası bölgenin ekspresyonu, 2: RT-PCR' da parental suşun genomic DNA' sının kalıp olarak kullanılması ile elde edilen ilgili genler arası bölgeye ait ekspresyon, 3: 1 numaranın RT minus kontrolü. (a) *ccaR-orf10*, (b) *orf10-blp*, (c) *blp-lat*, (d) *lat-pcbAB*, (e) *pcbAB-pcbC*, (f) *cmcI-cmcJ*, (g) *cmcJ-cefF*, (h) *cefF-cmcH*, (i) *cefD-cefE*, (j) *cefE-pcd*, (k) *pcd-cmcT*, (l) *cmcT-pbpA*, (m) *cmcH-ccaR*.

Sefamisin C gen kümesindeki tüm genlerin 24. saatte bisistronik olarak transkribe oldukları RT-PCR ile gösterilmiştir. *cmcT-pbpA* ve *cmcH-ccaR* ara bölgelerini amplifiye etmek

için tasarlanan primerlerin verdiği amplikon uzunluğu 1 kb' de büyük olduğu için tek basamak RT-PCR ile bant elde etmekte güçlük yaşanmıştır. Alternatif olarak, random primerlerle cDNA sentezlenmiş ve ardından Taq polimeraz (Fermentas) kullanılarak rutin PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, *cmcH-ccaR* ve *cmcT-pbpA* ara bölgelerini temsil eden silik bantlar elde edilmiştir.

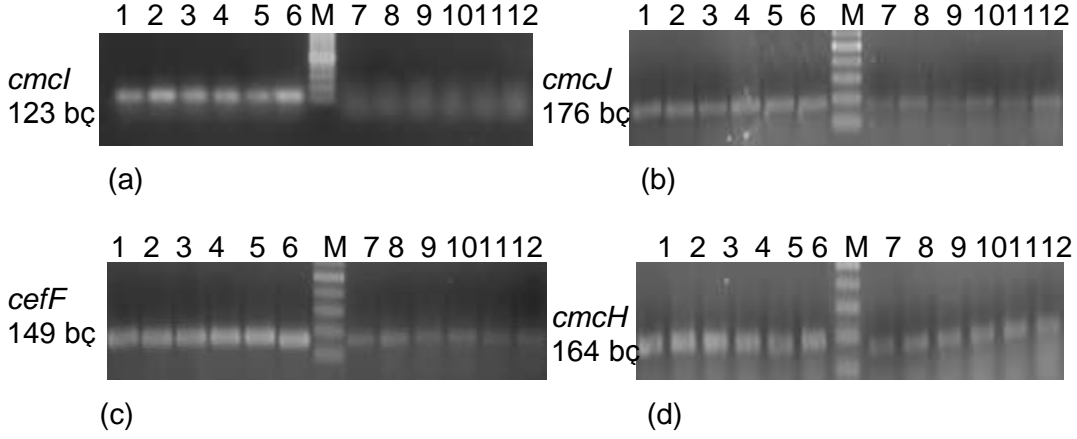
3.3.3. *S. clavuligerus* C11' sefamisin C gen kümesine ait genlerin transkripsiyonel analizi

Çok kopyalı bir plazmidde ekstra *ccaR* genini taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşunda RT-PCR sonucunda sefamisin C genlerinin ekspresyonlarında gözle görülür değişimler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.24, 3.25 ve 3.26). Rekombinant suşda *blp* ekspresyonundaki artış incelenen tüm saatlerde belirgindir (Şekil 3.24).

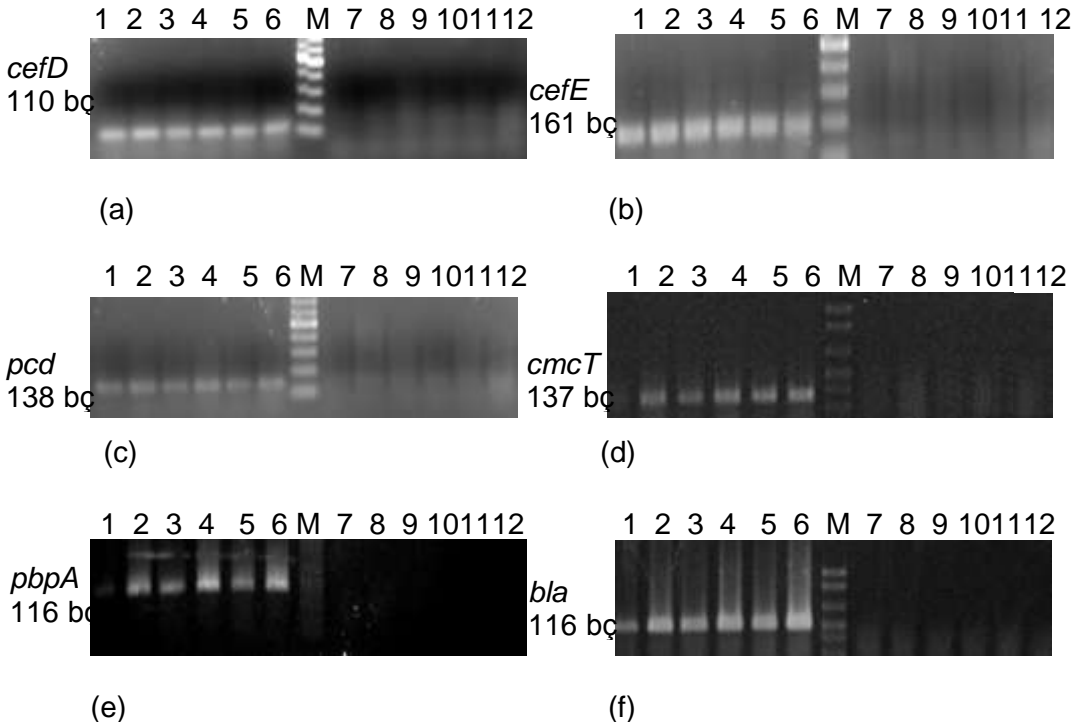


Şekil 3. 24. Zamana bağlı olarak rekombinant *S. clavuligerus* C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. Kuyucuklar, ilgili genlerin T₁₅, T₂₄ and T₃₀' da rekombinant (1, 3, 5) ve parental suşdaki (2, 4, 6) ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3, 5 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *ccaR*, (b) *orf10*, (c) *blp*, (d) *lat*, (e) *pcbAB*, (f) *pcbC*, (g) *pcbR*.

Rekombinant C11 suşunda parental suşa kıyasla, *cmcI* transkripsiyonunda artış görülürken, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* genlerinin ekspresyon profillerinde gözle görülür bir artış kaydedilmemiştir.



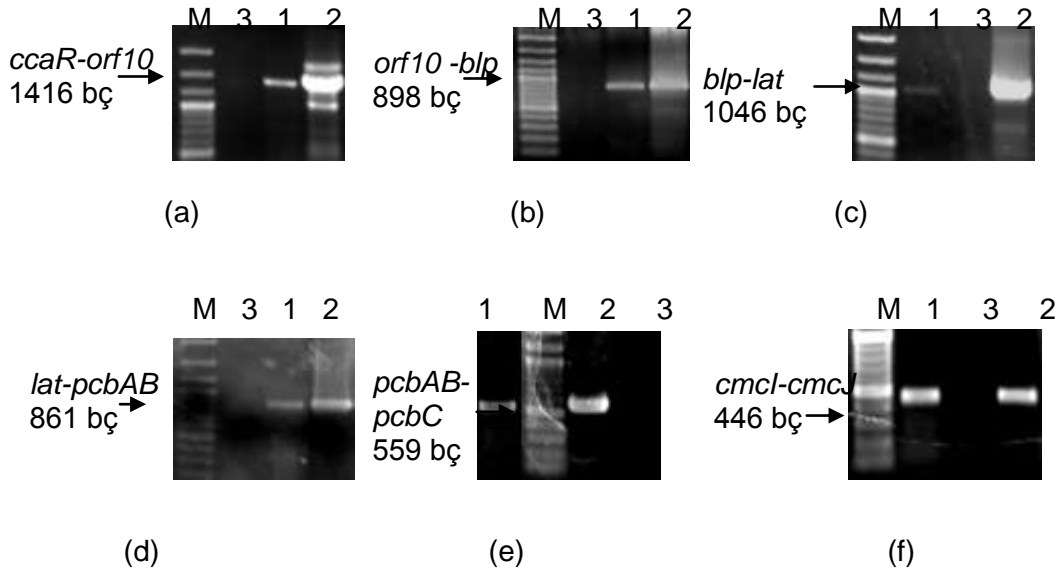
Şekil 3. 25. Zamana bağlı olarak rekombinant *S. clavuligerus* C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. Kuyucuklar, ilgili genlerin T₁₅, T₂₄ and T₃₀' da rekombinant (1, 3, 5) ve parental suşdaki (2, 4, 6) ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3, 5 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *cmcI*, (b) *cmcJ*, (c) *cefF*, (d) *cmcH*.



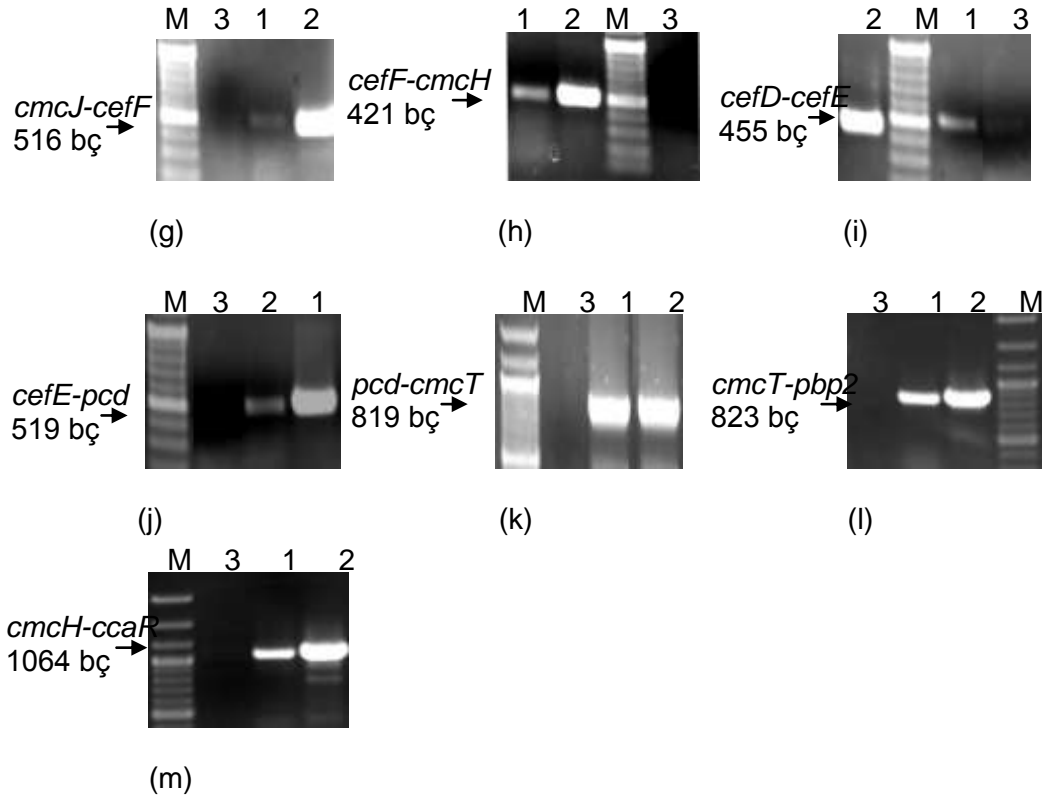
Şekil 3. 26. Zamana bağlı olarak rekombinant *S. clavuligerus* C11 ve onun parental suşunda gen ekspresyonlarının karşılaştırılmaları. Kuyucuklar, ilgili genlerin T₁₅, T₂₄ and T₃₀' da rekombinant (1, 3, 5) ve parental suşdaki (2, 4, 6) ekspresyonlarını göstermektedir. 7, 9, 11: 1, 3, 5 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. 8, 10, 12: 2, 4 ve 6 numaralı örneklerin RT minus kontrolleri. (a) *cefD*, (b) *cefE*, (c) *pcd*, (d) *cmcT*, (e) *pbpA*, (f) *bla*.

3.3.4. *S. clavuligerus* NRRL3585' de sefamisin C gen kümesindeki genlerin o-transkripsiyonel profili

Parental suş *S. clavuligerus* NRRL3585' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonel profilini analiz etmek için 24 saatlik kültürlerden izole edilen RNA örnekleri reaksiyonlarda kalıp olarak kullanılmışlardır (Şekil 3.27 ve 3.28). Pozitif kontrol olarak parental suşun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol reaksiyonunda kalıp olarak RNA ve sadece platinum Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır.



Şekil 3. 27. T₂₄' de *S. clavuligerus* NRRL3585' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonle profilinin RT-PCR ile gösterilmesi. 1: Parental suşa ait 24. saatteki kültürden izole edilen RNA'nın kalıp olarak kullanılması ile ilgili genler arası bölgenin ekspresyonu, 2: RT-PCR' da parental suşun genomik DNA' sının kalıp olarak kullanılması ile elde edilen ilgili genler arası bölgeye ait ekspresyon, 3: 1 numaranın RT minus kontrolü. (a) *ccaR-orf10*, (b) *orf10-blp*, (c) *blp-lat*, (d) *lat-pcbAB*, (e) *pcbAB-pcbC*, (f) *cmcI-cmcJ*.



Şekil 3. 28. T_{24} ' de *S. clavuligerus* ATCC27064' da sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonle profilinin RT-PCR ile gösterilmesi. 1: Parental suşa ait 24. saatteki kültürden izole edilen RNA' nın kalıp olarak kullanılması ile ilgili genler arası bölgenin ekspresyonu, 2: RT-PCR' da parental suşun genomic DNA' sının kalıp olarak kullanılması ile elde edilen ilgili genler arası bölgeye ait ekspresyon, 3: 1 numaranın RT minus kontrolü. (g) *cmcJ-cefF*, (h) *cefF-cmcH*, (i) *cefD-cefE*, (j) *cefE-pcd*, (k) *pcd-cmcT*, (l) *cmcT-pbp2*, (m) *cmcH-ccaR* intergenic regions.

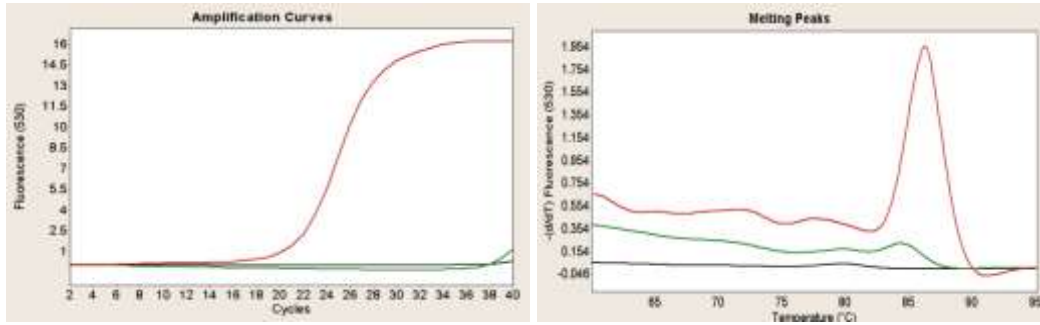
RT-PCR ile sefamisin C gen kümesinin ko-transkripsiyonel analizi sonucunda parental suşda tüm ardışık genlerin birlikte transkribe olduklarını görülmüştür. Jel üzerindeki bantların yoğunlukları yapılan PCR reaksiyonunun verimliliği ile ilişkilidir.

Sefamisin C gen kümesi üzerindeki CcaR regülasyonu genel şekli ile RT-PCR analizleri ile gösterilmiştir (Şekil 3.29).

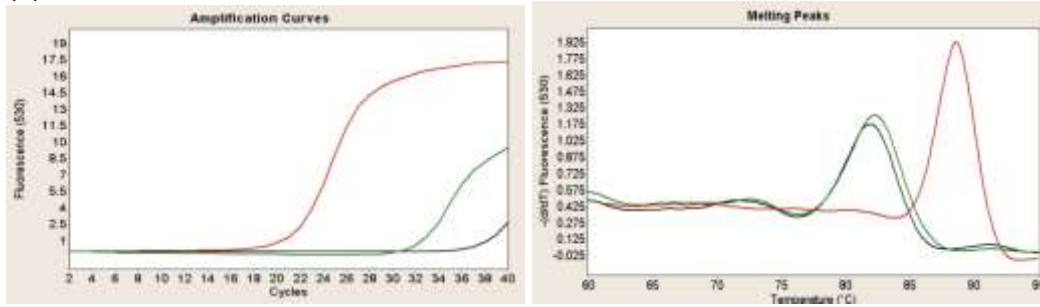
3.4. *ccaR* geninin sefamisin C gen kümesi üzerinde regülatör etkisinin qRT-PCR ile analizi

3.4.1. qRT-PCR koşullarının optimizasyonu

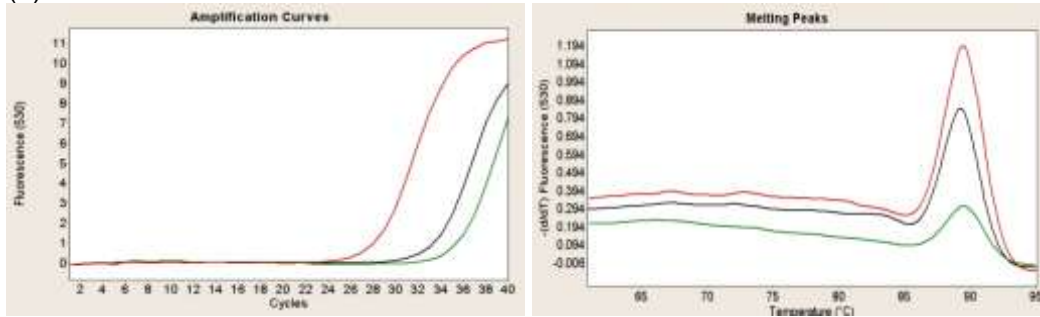
RNA kalitesi, primer-prob konsantrasyonları devir koşulları, and kullanılan malzemelerin kompozisyonları ve MgCl₂ konsantrasyonu optimizasyon sürecinde dikkat edilmesi gereken parametrelerdir (Edwards ve Logan, 2009). RNA izolasyonu esnasında fenol-kloroform ekstraksiyonu ve Dnaz uygulamaları bu çalışmada elde edilen RNA ların kalitesini ve miktarını olumlu yönde etkilemiştir. Aynı zamanda, iki aşamalı qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta, cDNA sentezlenmiştir ve reaksiyonda 250 ng random primer ve 2 µg total RNA kullanılmıştır. SYBR premix tamponu 2 mM MgCl₂ içerdiğinden ayrıca bu divalentin konsantrasyonu ile ilgili optimizasyon çalışmasına gerek duyulmamıştır. Bununla birlikte, herbir gen için farklı primer konsantrasyonları (25 nM, 150 nM, 250 nM and 350 nM) denenmiştir. *cmcT* geninin amplifikasyonu için 350 nM, *orf10* için 250 nM ve diğer tüm genler için 150 nM primer konsantrasyonları en iyi sonuçları vermiştir. Diğer taraftan, qRT-PCR deneylerinde uygulanan parametrelerden annealing sıcaklığı 60 °C ve devir sayısı 40 olarak seçilmiştir. Referans genin doğru seçimi, dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Şekil 3.30-3.34' de optimize edilen koşullarda elde edilmiş, her bir gene ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri verilmektedir. Bu eğrilerdeki Ct ve Tm değerleri Tablo 3.1' de gösterilmektedir. Literatürde, 23S-16S rRNA ve/veya önemli bir sigma faktörü kodlayan *hrdB* genleri qRT-PCR ilgili genlerin rölatif ekspresyonlarını belirlemek üzere en yaygın kullanılan kontrollerdir (Huang ve ark., 2005; Rintala ve Nevalainen, 2006; Nazari ve ark., 2011). Bu çalışmadaki ön deneyler sonucunda, qRT-PCR deneyleri için en uygun genin *hrdB* olduğu tespit edilmiş ve devam eden çalışmalarda referans gen olarak deneylerde kullanılmıştır.



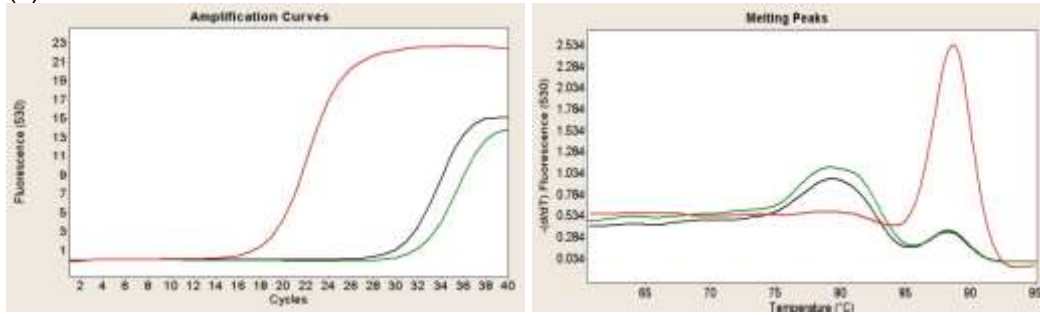
(a) *hrdB*



(b) *ccaR*

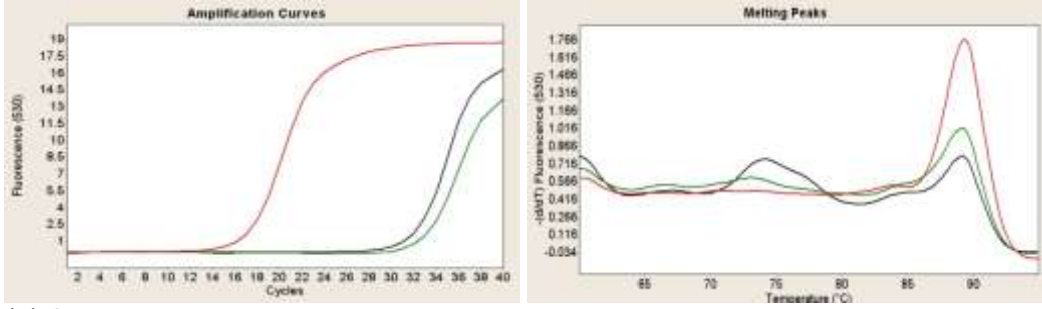


(c) *orf10*

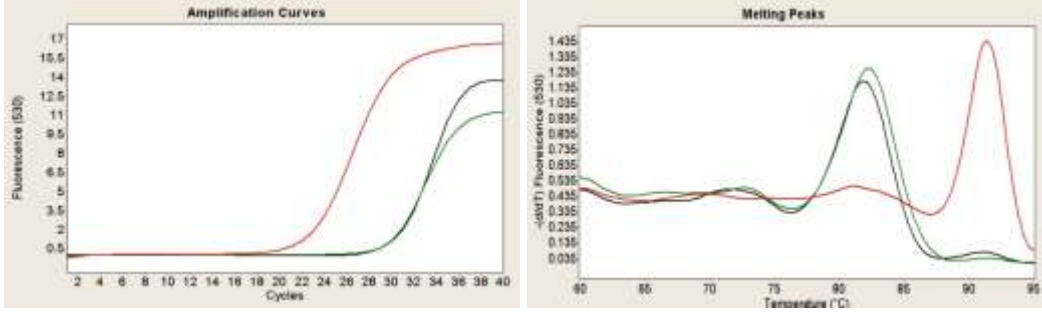


(d) *blp*

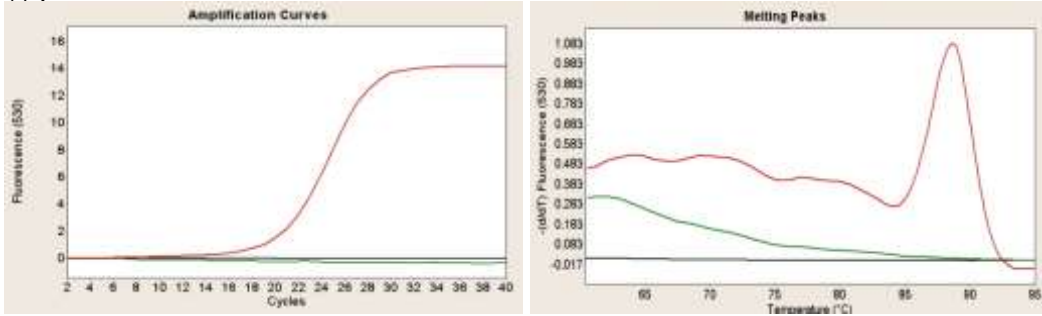
Şekil 3. 30. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (a) *hrdB*, (b) *ccaR*, (c) *orf10*, (d) *blp*.



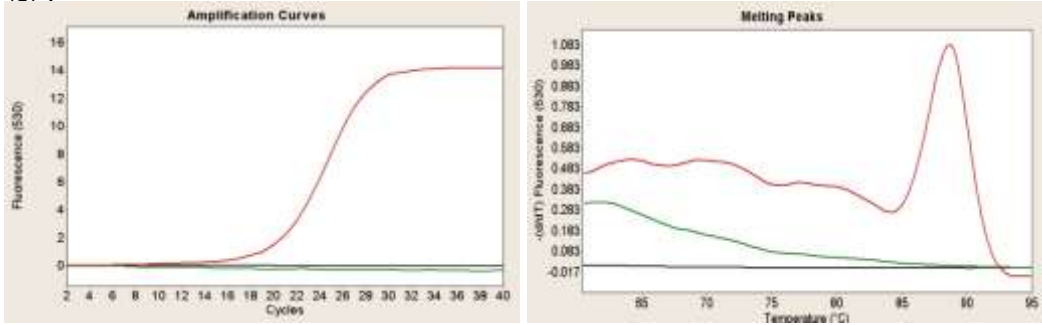
(e) *lat*



(f) *pcbAB*

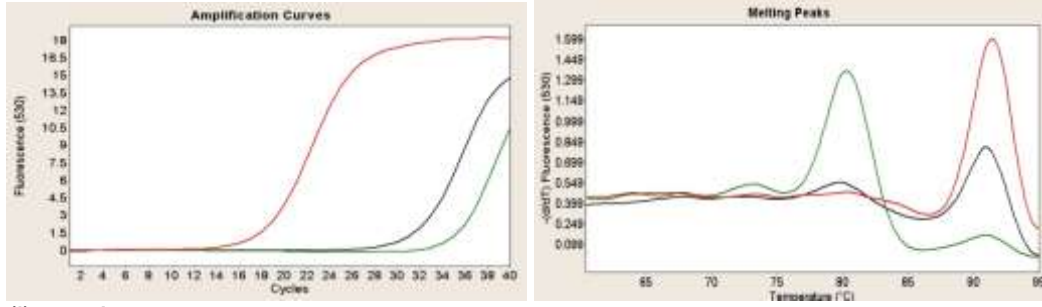


(g) *pcbC*

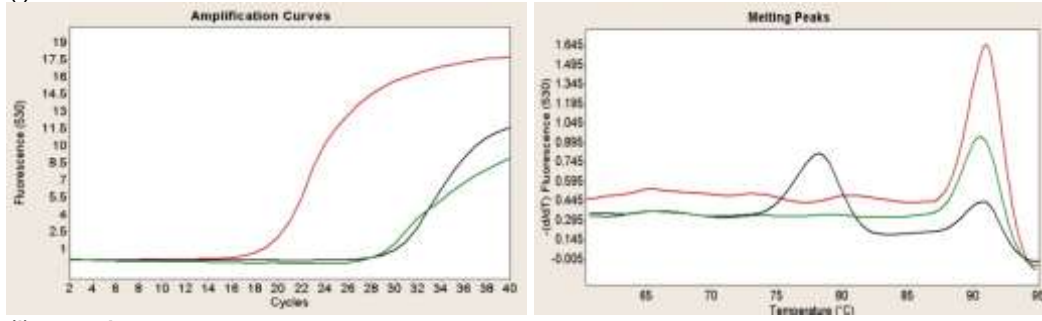


(h) *pcbR*

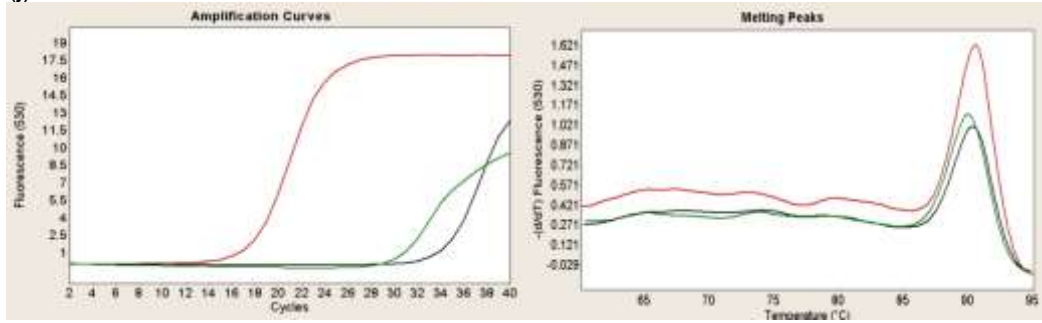
Şekil 3. 31. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (e) *lat*, (f) *pcbAB*, (g) *pcbC*, (h) *pcbR*.



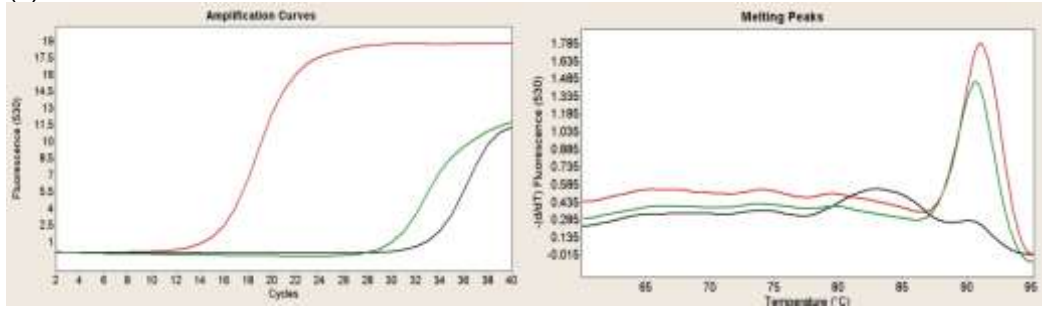
(i) *cmcI*



(j) *cmcJ*

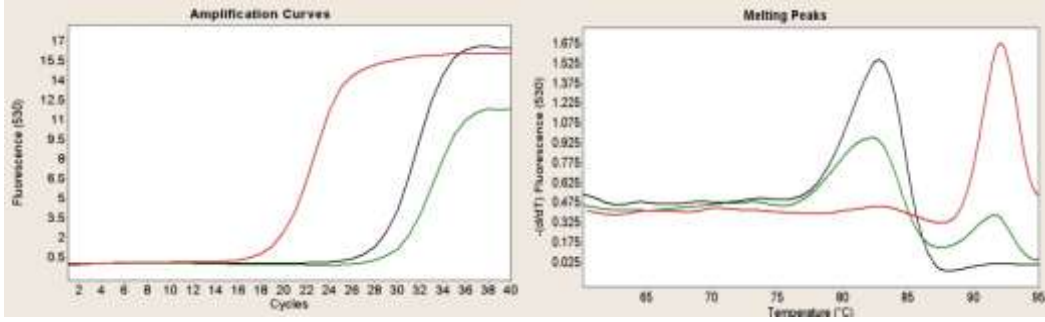


(k) *cefF*

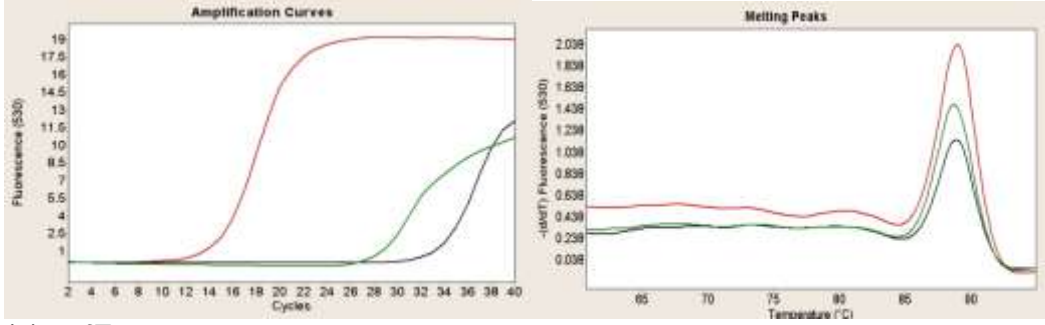


(l) *cmcH*

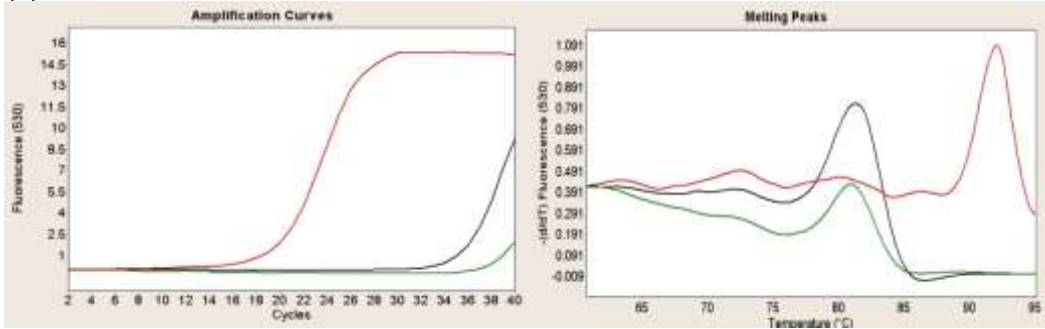
Şekil 3. 32. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (i) *cmcI*, (j) *cmcJ*, (k) *cefF*, (l) *cmcH*.



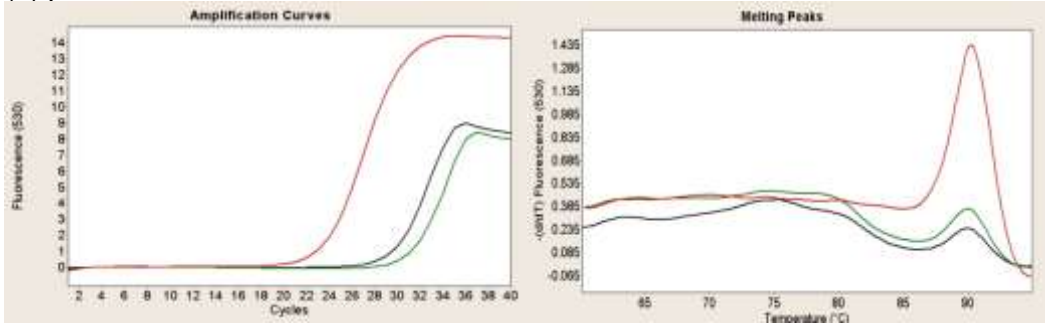
(m) *cefD*



(n) *cefE*

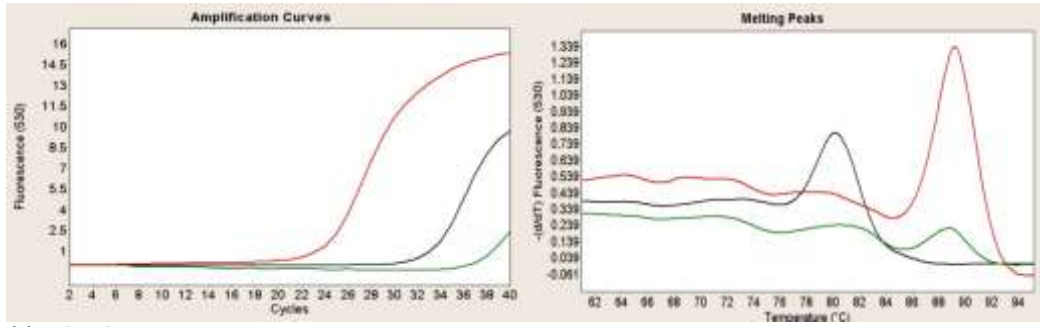


(o) *pcd*

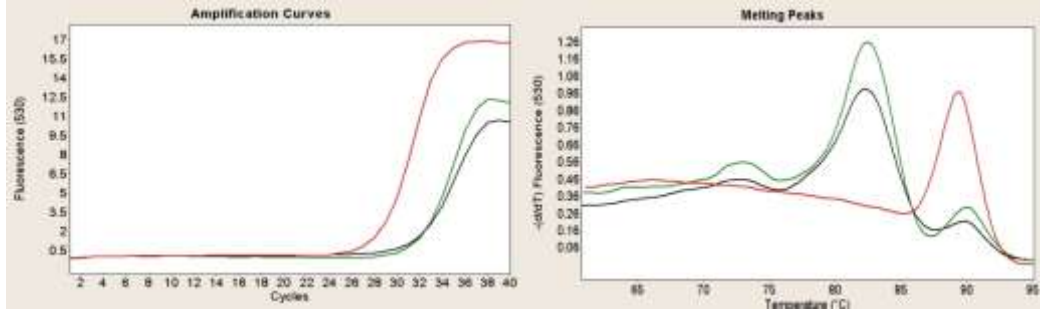


(p) *cmcT*

Şekil 3. 33. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (m) *cefD*, (n) *cefE*, (o) *pcd*, (p) *cmcT*.



(r) *pbpA*



(s) *bla*

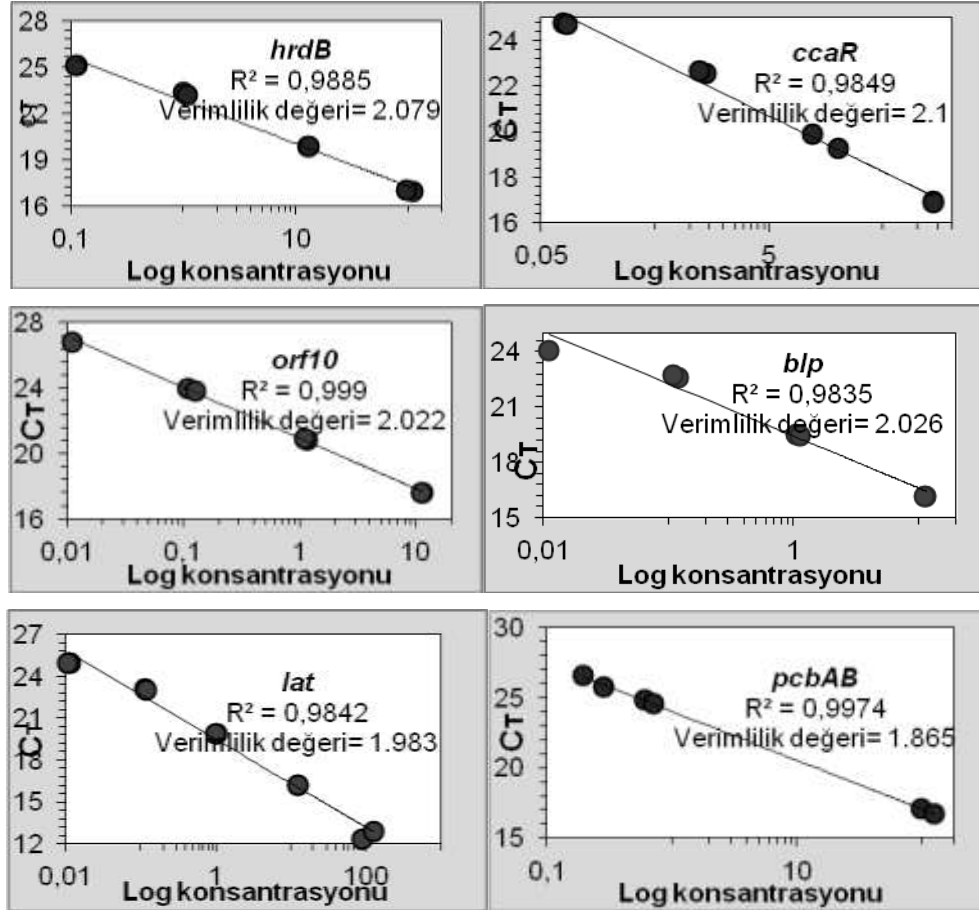
Şekil 3. 34. Optimize edilmiş koşullarda, referans geni ve sehamisin C genlerine ait amplifikasyon ve dissosiyasyon eğrileri. Siyah çizgiler NTC (kalıp içermeyen kontrol reaksiyonu), yeşil çizgiler RTC (RNA'nın kalıp olduğu reaksiyon kontrolünü) ve kırmızı çizgiler hedef genleri ifade etmektedirler. (r) *pbpA*, (s) *bla*.

Tablo 3. 1. Amplifikasyon eğrileri ve melting peaklerin Ct ve Tm değerleri

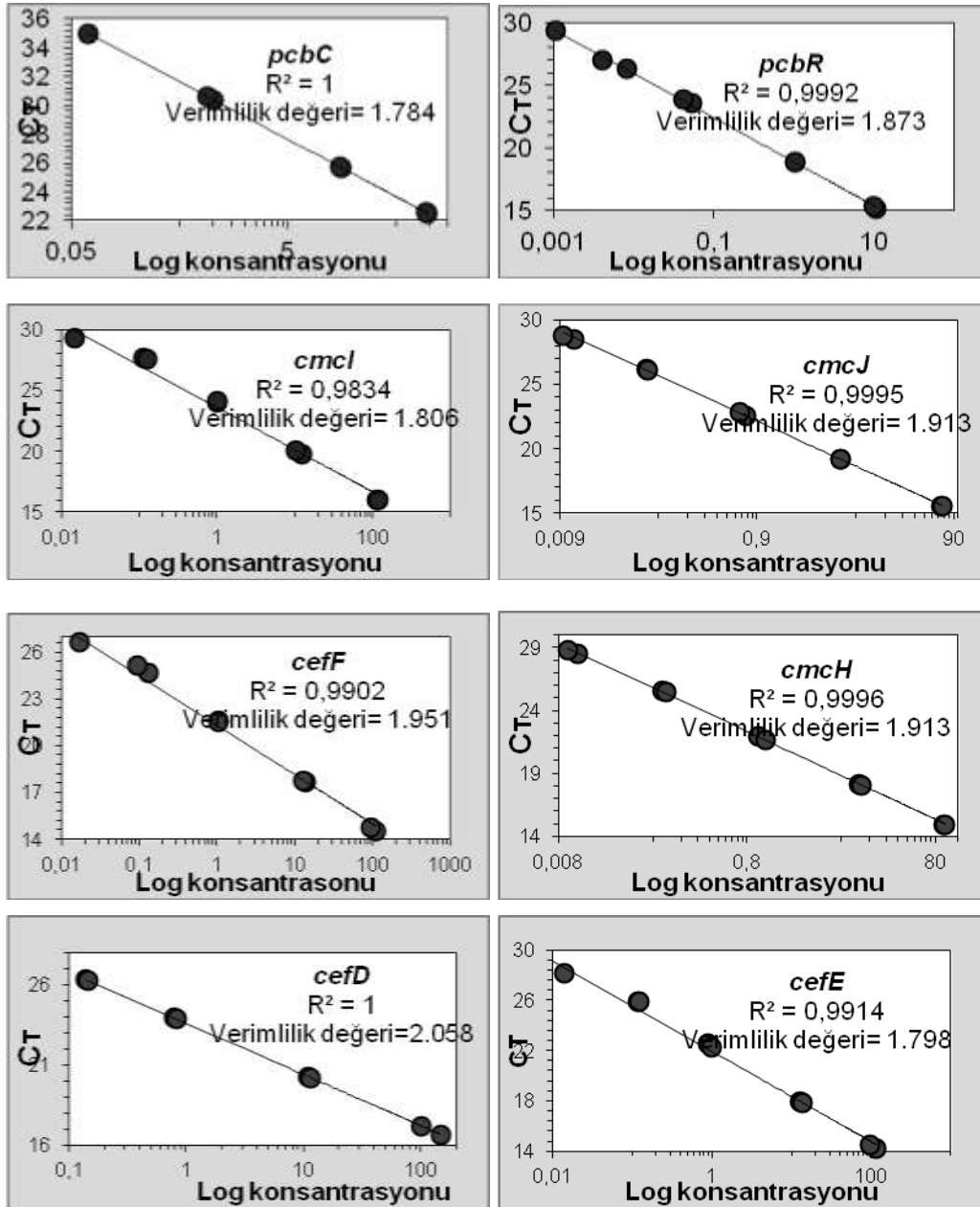
	Ct			Tm		
	Hedef	NTC	RTC	Hedef	NTC	RTC
<i>hrdB</i>	20.61	35.00	35.00	86.35	79.82	84.34
<i>ccaR</i>	23.61	35.00	35.00	89.67	89.11/79.79	89.04/79.65
<i>orf10</i>	27.32	32.39	35.00	89.40	89.22	89.35
<i>blp</i>	17.52	29.61	30.96	88.42	88.25/79.24	88.33/79.40
<i>lat</i>	16.03	30.73	31.44	89.31	89.01/74.16	89.23
<i>pcbAB</i>	20.70	29.45	28.80	91.52	81.90	82.13
<i>pcbC</i>	19.97	35.00	35.00	88.74	70.08	70.52
<i>pcbR</i>	20.74	31.38	32.71	88.97	79.86	79.71
<i>cmcI</i>	17.76	31.03	35.00	91.40	91.02/79.66	80.27
<i>cmcJ</i>	18.35	29.20	27.17	90.93	90.62/78.13	90.52
<i>cefF</i>	16.71	34.34	28.97	90.60	90.45	90.06
<i>cmcH</i>	14.56	31.92	28.68	91.14	82.72	90.69
<i>cefD</i>	18.27	27.51	28.93	92.11	83.06	91.60/82.17
<i>cefE</i>	13.77	32.41	26.89	89.02	88.93	88.59
<i>pcd</i>	19.16	35.00	35.00	91.94	81.28	81.03
<i>cmcT</i>	22.62	28.45	29.75	90.28	90.07/75.09	90.06/77.58
<i>pbpA</i>	23.10	31.86	35.00	89.26	80.13	88.69
<i>bla</i>	27.21	29.56	30.56	89.66	89.97/82.11	90.01/82.45

3.4.2. Standard eğri oluşturularak amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması

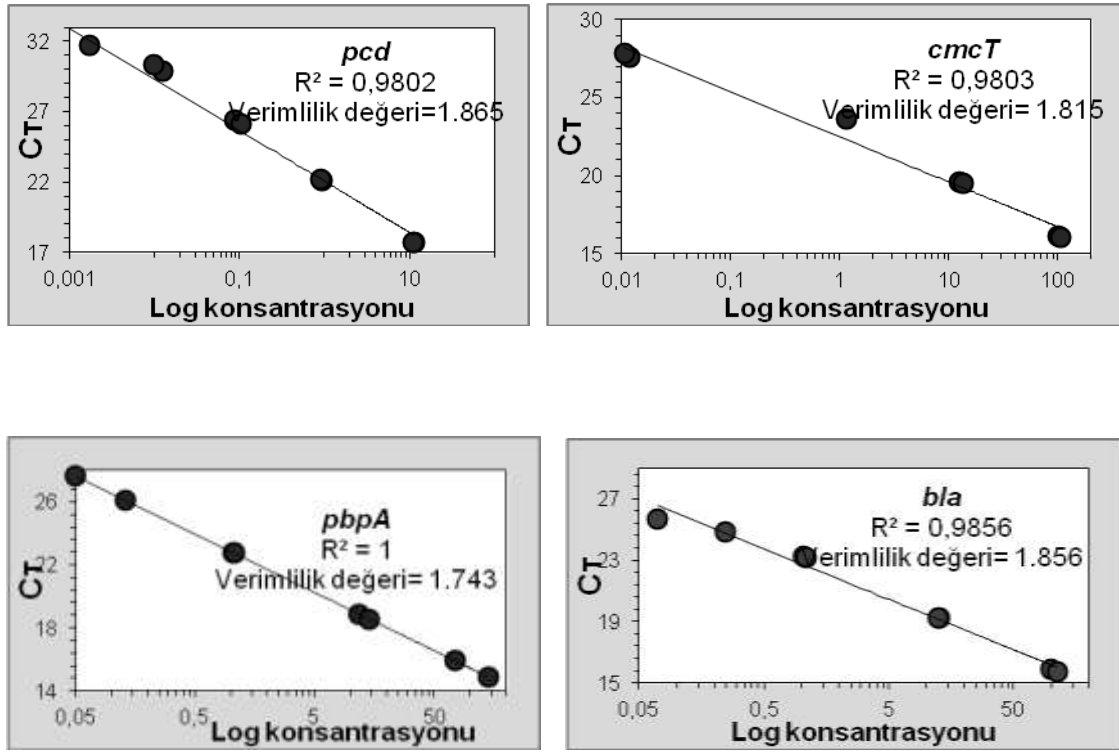
Mevcut çalışmada, qRT-PCR verilerinin değerlendirilmesinde verimlilik-düzeltili kuantifikasyon modeli (Pfaffl, 2001) tercih edilmiştir. Hedef ve kontrol genlerinin amplifikasyon verimlilikleri çoğu kez birbirinden farklı olabilmekte ve aralarındaki çok küçük farklılıklar bile Ct değerlerinde önemli değişimlere yol açabilmektedir (Platts ve ark., 2008). Amplifikasyon verimliliği $E = 10^{[-1/\text{eğim}]}$ (Pfaffl, 2001) formülü ile hesaplanır ve belirli oranlarda seyreltilmiş DNA örneklerinden elde edilen standart eğrinin eğimi bu formüle kullanılmaktadır. Bu yüzden *S. clavuligerus*' un genomik DNA' sı kalıp olarak kullanılarak ilgili genlerin primer çiftleri ile standart eğriler çizilmiştir (Lopez-Garcia ve ark., 2010) (Şekil 3.35-3.37).



Şekil 3. 35. Referans gen (*hrdB*) ve sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (*ccaR*, *orf10*, *blp*, *lat*, *pcbAB*) standart eğrileri ve her bir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.



Şekil 3. 36. Sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (*pcbC*, *pcbR*, *cmcI*, *cmcJ*, *cefF*, *cmcH*, *cefD*, *cefE*) standard eğrileri ve herbir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.



Şekil 3. 37. Sefamisin C gen kümesindeki ilgili genlerin (*pcd*, *cmcT*, *pbpA* and *bla*) standard eğrileri ve her bir primer çiftine ait amplifikasyon verimlilikleri.

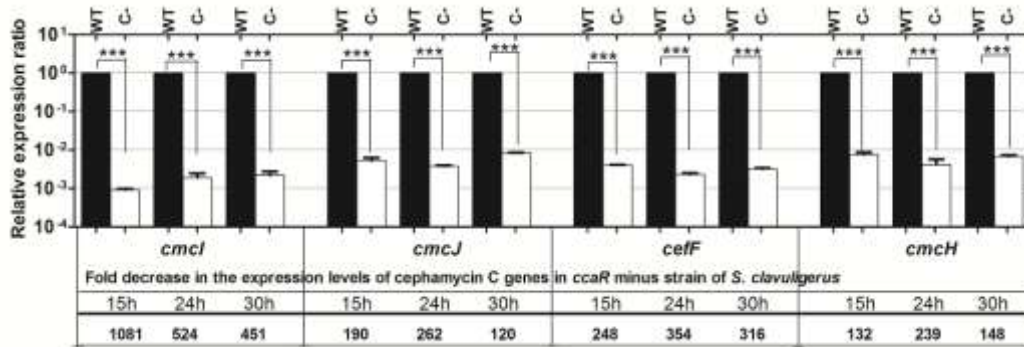
R²; belirleme katsayısıdır ve bir standart eğrinin doğrusallığını gösterir. PCR verimliliğinin değerlendirilmesinde dikkate alınan parametrelerden biridir. Amplifikasyon verimliliğinin iyi olarak değerlendirilmesi için R² >0.98 değerinin elde edilmesi gerekmektedir (Meijerink ve ark., 2001). Tablo 3.2' de gösterildiği gibi, eğrilerin eğimleri kullanılarak elde edilen tüm amplifikasyon verimliliği değerleri daha önce belirlenmiş olan 1.6 ila 2.1' lik kabul edilebilir sınırlar içerisinde yer almaktadırlar (Pfaffl, 2004).

Tablo 3. 2. Sefamisin C gen kümesinde her bir gene ait amplifikasyon verimlilikleri

Gen ismi	Amplifikasyon verimliliği	Gen ismi	Amplifikasyon verimliliği
<i>bla</i>	1.856	<i>cmcH</i>	1.913
<i>pbpA</i>	1.865	<i>ccaR</i>	2.1
<i>cmcT</i>	1.815	<i>orf10</i>	2.022
<i>pcd</i>	1.865	<i>blp</i>	2.026
<i>cefE</i>	1.798	<i>lat</i>	1.983
<i>cefD</i>	2.058	<i>pcbAB</i>	1.865
<i>cmcI</i>	1.806	<i>pcbC</i>	1.784
<i>cmcJ</i>	1.913	<i>pcbR</i>	1.873
<i>cefF</i>	1.951	<i>hrdB</i>	2.079

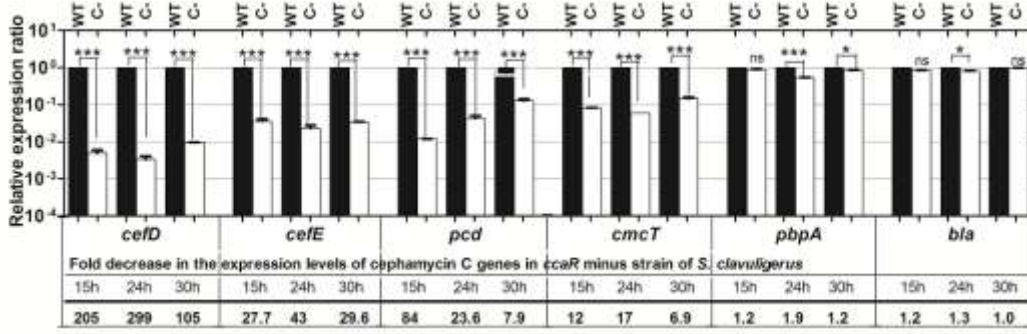
orf10 fonksiyonu bilinmeyen bir protein kodlamaktadır. T₁₅' de bu genin ekspresyonu mutant suşta parental suşa kıyasla 25-kat daha düşük tespit edilmiştir. Mutant suşta *orf10* geninin ekspresyonundaki düşüş miktarı T₂₄' de 10-kat ve T₃₀' da 9-kattır. *orf10* ekspresyonunun aksine, mutant suşta qRT-PCR ile *blp* geninin ekspresyonunda 224 katlık ve fermentasyon süresince sabit bir düşüş saptanmıştır. qRT-PCR ile sefamisin C biyosentezinin ilk basamağında görev alan enzimleri kodlayan *pcbAB* ve *pcbC* genlerinin ekspresyonlarında mutant suşta azalma tespit edilmiştir. *pcbAB* geninin ekspresyonundaki azalma T₁₅' de 269, T₂₄' de 289 ve T₃₀' da 55.8 kattır. *pcbC* geninin ekspresyonunda da benzer oranda düşüş söz konusudur (T₁₅' de 248, T₂₄' de 244 ve T₃₀' da 85.5 kat azalma). Hücrenin kendi sefamisin C antibiyotikine karşı direncini sağlayan ve membrana bağlı bir proteini kodlayan *pcbR* geni, fermentasyon sürecinde *ccaR* mutantında 2 ila 3 kat oranında daha düşük seviyede ifade edilmiştir.

Sefamisin C gen kümesinde, *cmcl*' nin ardında bulunan *cmcJ* geni, *ccaR* mutantında *cmcl* ekspresyonu ile kıyaslandığında nispeten daha yüksek seviyede ifade edilmektedir. Bu genin *ccaR* mutantındaki ekspresyon miktarındaki azalışı 120 ila 260 kat arasında değişmektedir (Şekil 3.39). *cefF* ve *cmcH* genleri sefamisin C biyosentezinde ardışık görevleri olan enzimleri kodlayan genlerdir. T₂₄' de *cefF* gen ekspresyonunda dikkate değer bir azalma söz konusudur (354 kat azalma). İlginç bir şekilde, bu düşüş T₃₀' da da ekspresyonundaki 316 katlık azalma ile devam etmektedir. Ayrıca, *cmcH* ekspresyonu, *ccaR* mutantında T₁₅' de 132 kat T₂₄' de 239 kat ve T₃₀' da 148 kat azalmıştır.



Şekil 3. 39. Parental suş ve *ccaR* mutant suşunda, *cmcl*, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* gen ekspresyonlarının zamana bağlı olarak qRT-PCR ile kuantifikasyonu. Her bir gen için ayrı zamanlarda iki farklı qRT-PCR reaksiyonu yürütülmüştür ve her deney setinde her bir gen için iki biyolojik ve üç teknik replika kullanılmıştır. *S. clavuligerus* suşu ve *ccaR* mutant suşunda gen ekspresyonlarında görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için verilere Tek yönlü ANOVA analizi ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır (***= p < 0.001).

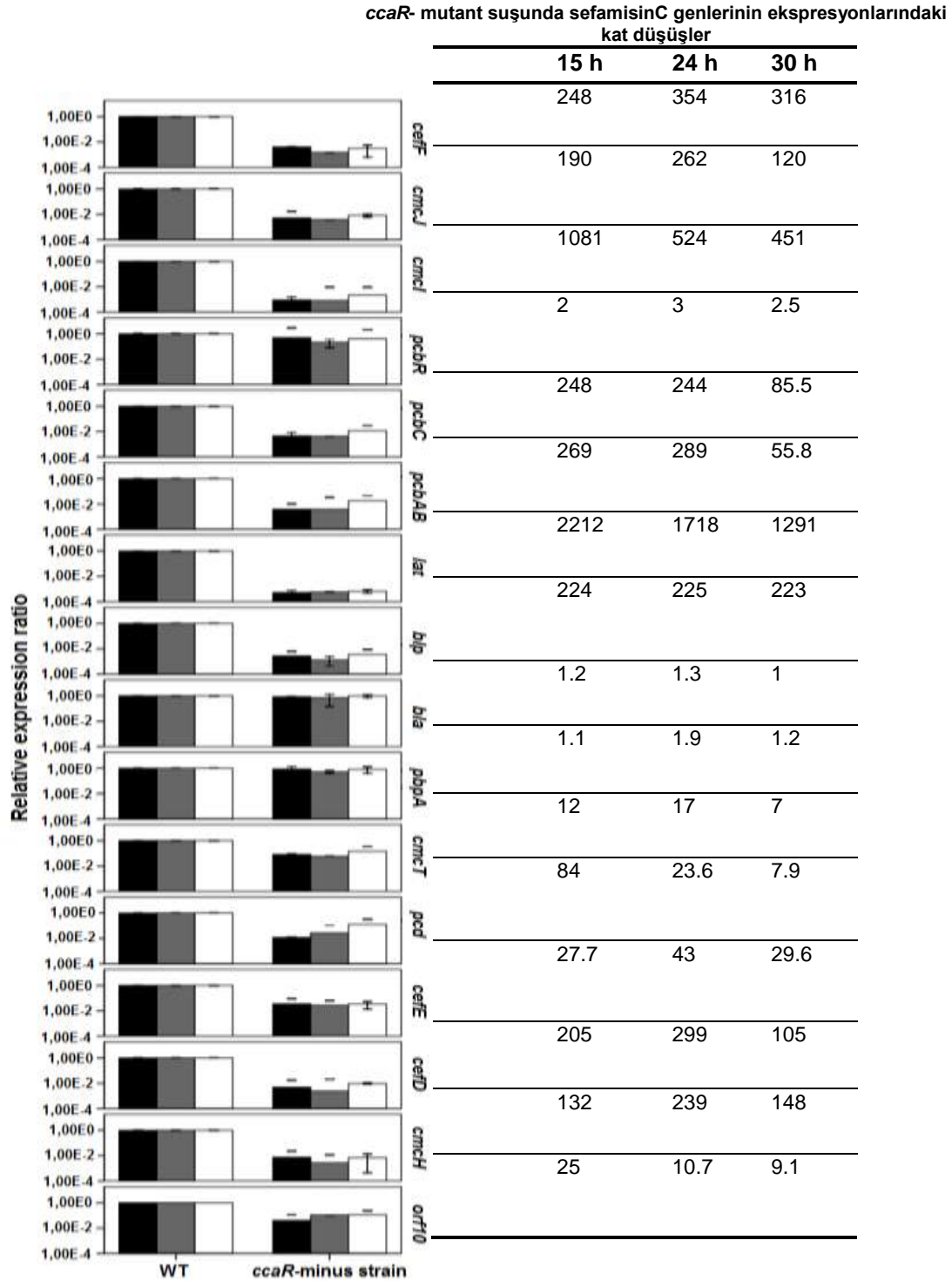
T₁₅' de *cmcI* geninin ekspresyonu mutant suşda 1081-kat azalarak oldukça ciddi oranda bir düşüş sergilemiştir. Bununla birlikte, bu ciddi azalma diğer saatlerde devam etmemiştir. *cmcI* geninin rölatif ekspresyon seviyesi mutant suşda parental suşa kıyasla T₂₄' de 524 kat ve T₃₀' da 451 kat daha düşüktür (Şekil 3.39). Parental suşa kıyasla *ccaR* mutantında *cefD* geninin ekspresyon seviyesinde T₁₅, T₂₄ ve T₃₀' da sırasıyla 205-, 299- ve 105-katlık azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.40).



Şekil 3. 40. Parental suş ve *ccaR* mutant suşunda, *cefD*, *cefE*, *pcd*, *cmcT*, *pbpA* ve *bla* gen ekspresyonlarının zamana bağlı olarak qRT-PCR ile kuantifikasyonu. Her bir gen için ayrı zamanlarda iki farklı qRT-PCR reaksiyonu yürütülmüştür ve her deney setinde her bir gen için iki biyolojik ve üç teknik replika kullanılmıştır. *S. clavuligerus* suşu ve *ccaR* mutant suşunda gen ekspresyonlarında görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için verilere Tek yönlü ANOVA analizi ve Tukey post hoc testi uygulanmıştır (***= p < 0.001, *= p < 0.05, ns= p > 0.05).

Diğer taraftan, fermentasyon boyunca ekspresyon profillerinde RT-PCR deneyleri sonucunda önemli bir fark gözlenmeyen *cefE*, *pcd*, *cmcT* ve *bla* genlerine ait qRT-PCR verileri de RT-PCR ile elde edilen bulguları desteklemektedir. Buna göre, *cefE* ekspresyonu incelenen üç fermentasyon saatinde 27.7 ila 43 kat arasında azalarak hücrede sağlam bir *ccaR* geninin olmayışından nispeten az oranda etkilenmiştir. *ccaR* mutantında qRT-PCR deneyleri ile elde edilen *pcd* ekspresyonu beklenildiği gibi çok ciddi oranda azalmayıp parental suştakine kıyasla T₁₅' de 84-kat, T₂₄' de 23.6-kat ve T₃₀' da 7 kat azalış göstermiştir. Antibiyotik transport proteinini kodlayan *cmcT* geninin ekspresyonu mutant suşda parental suşa kıyasla T₁₅ ve T₂₄' de sırasıyla 12 ve 17 kat daha düşüktür. Bu düşük ekspresyon seviyesi T₃₀' da devam etmekte, yalnızca *ccaR* geninin olmayışı bu genin ekspresyonunu daha az oranda etkilemektedir (7.9 kat azalış). *pbpA* ve *bla* genleri, ki bunlar sırasıyla β-laktamlara karşı direnci sağlayan ve hücre morfolojisinde rol oynayan enzimleri kodlamaktadırlar, *ccaR* mutasyonunun varlığında, ekspresyon profillerinde sadece 1.3 ila 1.9-katlık bir azalma tespit edilmiştir.

ccaR nin tahrip edilmesinin sefamisin C genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisini gösteren genel şablon Şekil 3.41' de verilmektedir.



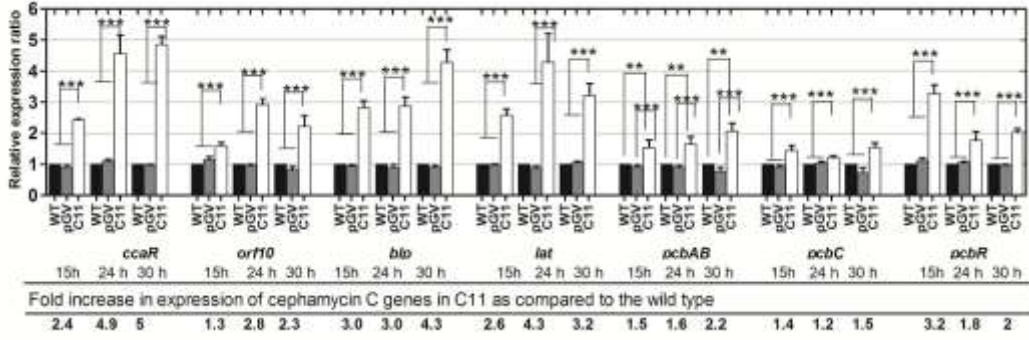
Şekil 3. 41. qRT-PCR ile parental suşa kıyasla *ccaR* mutant suşunda sefamisin C gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili. Hata çubukları % 95 güven aralığını

belirtmektedir. Siyah sütunlar T_{15} , beyaz sütunlar T_{24} and beyaz sütunlar T_{30} 'u ifade etmektedirler.

3.4.4. qRT-PCR ile parental suşda ve rekombinant C11 suşunda sefamisin C biyosentetik gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon modelinin belirlenmesi

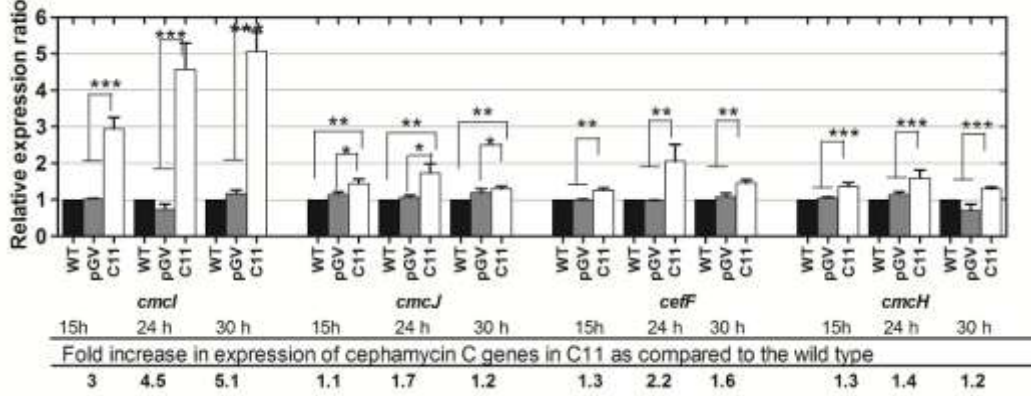
Biyoassay sonuçlarına göre, rekombinant C11 hücrelerinde özellikle fermentasyonun erken saatlerinde sefamisin C üretimi önemli oranda desteklenmiştir (Şekil 3.19). Sözelimi, DNA miktarları aynı olmasına rağmen, ilk örneklem saatin olan T_{15} ' de, C11 fermentasyon sıvılarında spesifik sefamisin C üretiminin 6.5-kat daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. C11 suşu fermentasyonun 24. saatinden sonra durgunluk fazına girmiş bu arada parental suş altı saatlik gecikme ile aynı faza T_{30} ' da geçmiştir. Bu suşların üreme modellerindeki bir diğer dikkat çekici farklılık ise rekombinant suşun T_{24} and T_{30} saatleri arasında üremesinde sert bir düşüşün olmasıdır. Rekombinant bakterinin fermentasyon sürecinde çok kısa bir zaman içerisinde üremesinde yaşanan bu sert düşüş spesifik sefamisin C titresinde 3 katlık bir artış beraberinde getirmektedir. Bu yüzden, *ccaR*' nin çok kopyalı olarak ekspresyonunun antibiyotik üretimi üzerindeki pozitif etkisinin CcaR aktivatörünün sefamisin C gen kümesi üzerindeki düzenleyici etkisi itibari ile transkripsiyonel seviyede de ortaya koyulması beklenmektedir.

S. clavuligerus parental suşuna kıyasla rekombinant C11 suşunda sefamisin C genlerinin zamana bağlı olarak ekspresyon profillerindeki değişimleri qRT-PCR deneyleri ile belirlenmiştir. Boş pSPG vektörünün *S. clavuligerus* hücrelerine aktarılması (pGV) sefamisin C biyosentez genlerinin ekspresyonlarında dikkate değer bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 3.42 - 3.45). C11 suşunun T_{15} ' de sefamisin titresinde görülen artışa paralel olarak qRT-PCR deneyleri ile rekombinant suşda *pcbR* geninin ekspresyon seviyesinde 3.2 katlık bir artış kaydedilmiştir (Şekil 3.42). *pcbR* geninin ekspresyonu T_{24} ve T_{30} ' da sırasıyla 1.8 ve 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu rölatif ekspresyon değerleri tekrarlı ölçümler ANOVA analizi istatistiksel anlamda ($p < 0.001$) da önemli bir artış değeri olarak tespit edilmiştir. Hücrede *ccaR* geninin çoklu ifadesi *pcbR*' in özellikle de T_{15} ' de daha yüksek seviyede ekspresyonuna neden olmuştur.



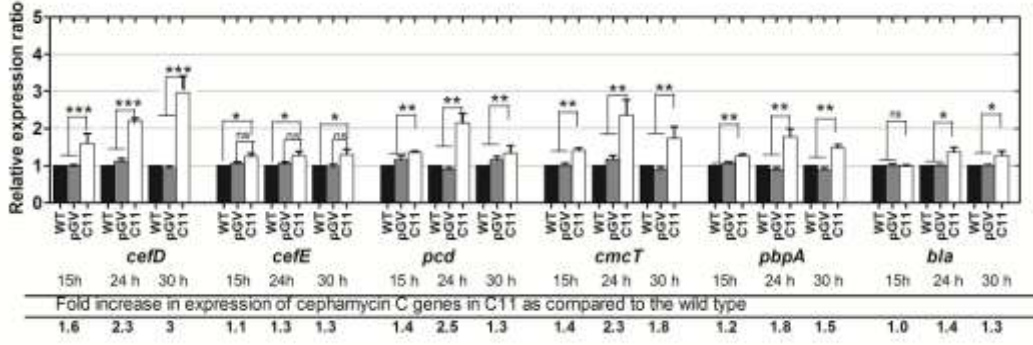
Şekil 3. 42. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 şuşlarında *ccaR*, *orf10*, *blp*, *lat*, *pcbAB*, *pcbC* ve *pcbR* gen ekspresyonlarının belirlenmeleri. Her bir gen için ayrı zamanlarda iki farklı qRT-PCR reaksiyonu yürütülmüştür ve her deney setinde her bir gen için iki biyolojik ve üç teknik replika kullanılmıştır. *S. clavuligerus* suşu ve rekombinant suşlarda gen ekspresyonlarında görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için verilere iki yönlü tekrarlı ANOVA analizi ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Rekombinant C11 suşunda *ccaR*, *lat*, *cmcl*, *cefD* ve *blp* genlerinin zamana bağlı ekspresyon analizlerinden elde edilen veriler aynı genlerin *ccaR* mutant suşundaki ekspresyon profilleri ile tutarlılık göstermektedir. C11 suşunda, *ccaR* ekspresyonu T_{24} ve T_{30} 'da sırasıyla 4.9- ve 5-kat daha yüksek bir değere ulaşırken, T_{15} 'de de 2.4 kat gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. T_{24} ve T_{30} 'daki yüksek seviyeli ekspresyon değerleri *lat*, *cmcl*, *cefD* ve *blp* genlerinin ekspresyonlarında sırasıyla T_{24} 'de 4.3-, 4.5-, 2.3- ve 3-kat, ve T_{30} 'da 3.2-, 5.1-, 3-, 4.3- kat olmak üzere devam etmiştir (Şekil 3.42-3.45). C11 suşundaki *orf10* genine ait ekspresyon profili 1.3 ila 2.8-kat daha yüksek seviyede bulunmuştur. *pcbAB* geni, C11 suşunda yaklaşık 1.5- ila 2.2-kat artan bir ekspresyon profili çizmiştir.



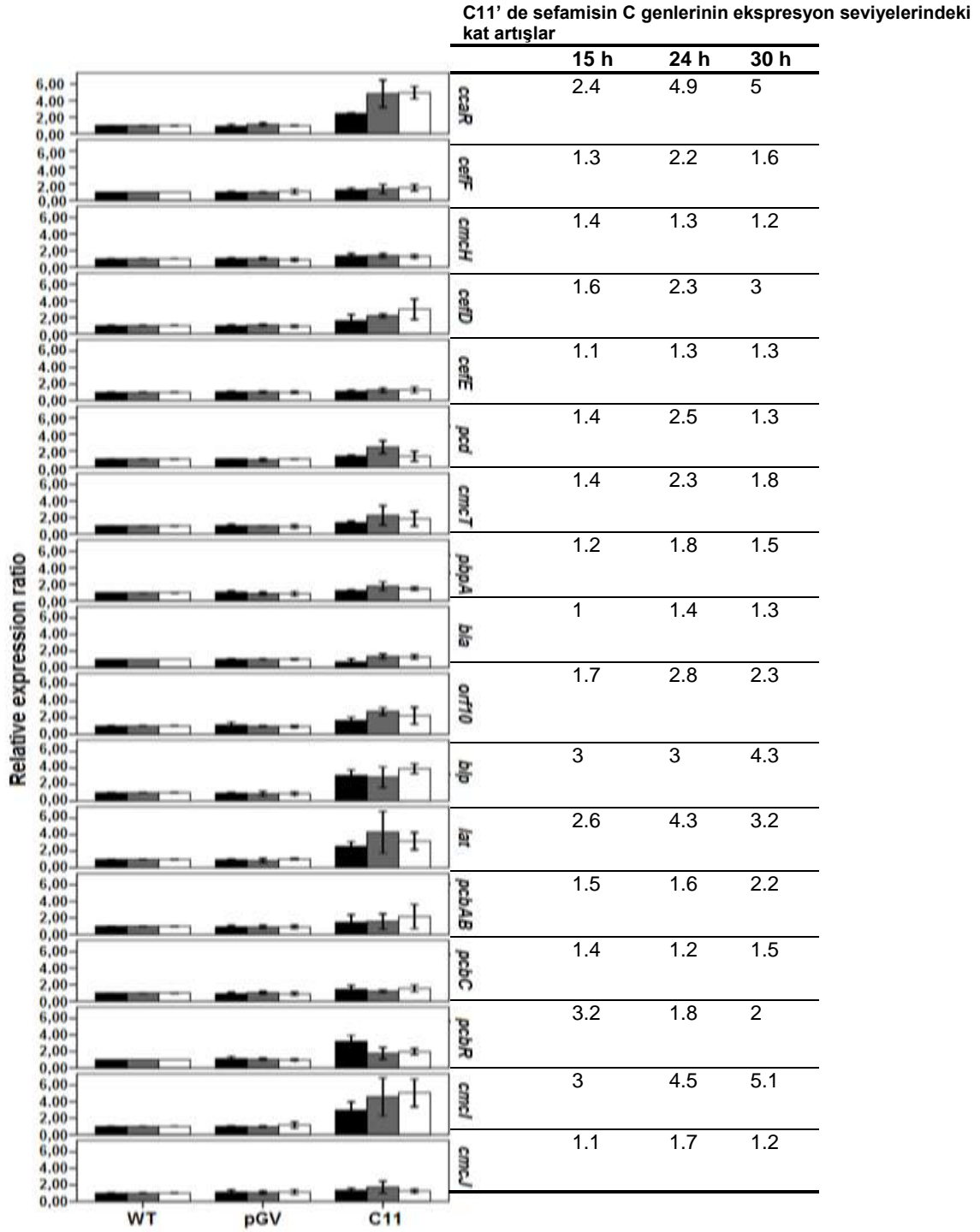
Şekil 3. 43. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 şuşlarında *cmcl*, *cmcJ*, *cefF*, ve *cmcH* gen ekspresyonlarının belirlenmeleri. Her bir gen için ayrı zamanlarda iki farklı qRT-PCR reaksiyonu yürütülmüştür ve her deney setinde her bir gen için iki biyolojik ve üç teknik replika kullanılmıştır. *S. clavuligerus* suşu ve rekombinant suşlarda gen ekspresyonlarında görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için verilere iki yönlü tekrarlı ANOVA analizi ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Sefamisin C gen kümesinde *cmcl* geninden sonra lokalize olan *cmcJ* ve *cefF* genleri rekombinant suşda daha yüksek seviyelerde ekspres edilmektedir (sırasıyla 1.7- ve 2.2-kat). Sefamisin C biyosentezinin son basamaklarında DAC' ye karbomil grubu aktaran enzimi kodlayan *cmcH* geninin ekspresyonunda qRT-PCR analizleri ile zamana bağlı olarak 1.2 ila 1.4 katlık nispeten az bir artış görülmüştür. *cefD* geninin ardından lokalize olan *cefE* geni rekombinant C11 hücrelerinde ekspresyonunu az bir miktarda arttırmış olmakla birlikte bu artış istatistiksel anlamda anlamlı bir değerdir ($p < 0.05$). Gerçi, *pcd*, *cmcT*, *pbpA* ve *bla* genleri fermentasyon süresince rekombinant suşda parental suşa göre sırasıyla 2.5, 2.3, 1.8 and 1.4-misli daha yüksek seviyelerde ifade edilmekte olup bu artış tekrarlı ölçümler ANOVA' ya dayalı olarak da istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. CmcT, sefamisin C antibiyotikinin hücre dışına salınımında işlev yapan önemli bir enzim olup, C11' de *cmcT* ekspresyonu 2.3 misli daha yüksektir.



Şekil 3. 44. Zamana bağlı olarak, qRT-PCR ile parental suşa kıyasla rekombinant pGV ve C11 şuşlarında *cefD*, *cefE*, *pcd*, *cmcT*, *pbpA* ve *bla* gen ekspresyonlarının belirlenmeleri. Her bir gen için ayrı zamanlarda iki farklı qRT-PCR reaksiyonu yürütülmüştür ve her deney setinde her bir gen için iki biyolojik ve üç teknik replika kullanılmıştır. *S. clavuligerus* suşu ve rekombinant suşlarda gen ekspresyonlarında görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için verilere iki yönlü tekrarlı ANOVA analizi ve Bonferroni post hoc testi uygulanmıştır (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns = $p > 0.05$).

Şekil 3.45' de, rekombinant C11 suşunda sefamisin C gen kümesinin qRT-PCR ile zamana bağlı olarak ekspresyon analizi sonucunda elde edilen rölatif ekspresyon değerlerini gösteren genel şablon verilmektedir. Özetle, *ccaR*, *orf10*, *lat*, *cmcI*, *cefD*, *blp* ve *pcbR* genlerinin ekspresyonları parental suşdaki ifadeleri ile karşılaştırıldığında C11 rekombinant suşunda sırasıyla, en çok 5, 2.8, 4.3, 5.1, 3, 4.3 ve 3.2 misli oranında ve istatistiksel olarak anlamlı artışlar göstermiştir.

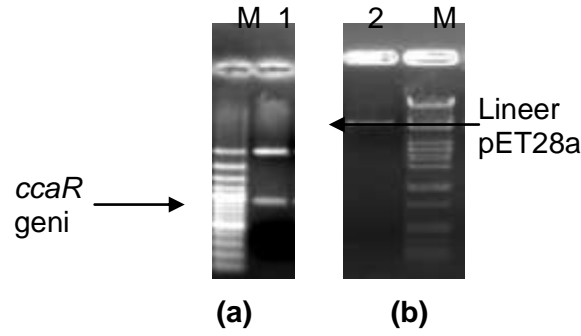


Şekil 3. 45. qRT-PCR ile parental suşa kıyasla pGV ve C11 rekombinant suşlarında sefamisin C gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili. Hata çubukları % 95 güven aralığını belirtmektedir. Siyah sütunlar T₁₅, beyaz sütunlar T₂₄ and beyaz sütunlar T₃₀'u ifade etmektedirler.

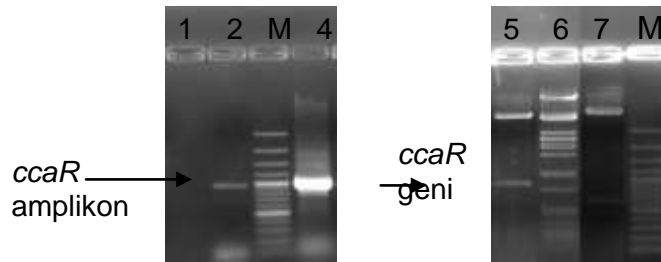
3.5. CcaR regülatörünün sefamisin C gen kümesindeki DNA-bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu

3.5.1. *ccaR* geninin pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanması

ccaR geni *NotI* kesimi ile pG23 vektöründen kurtarılıp (Şekil 3.46) aynı enzimle lineer hale getirilmiş pET28a vektörüne ligasyonla yapıştırılmış ve ligasyon ürünleri transformasyonla *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Seçici katı besiyerinde oluşan koloniler taranmış ve rekombinasyon PCR ile doğrulanmıştır (Şekil 3.47). *ccaR* geninin pET28a+ ekspresyon vektörünün MCS'indeki yönü His Tag pürifikasyonu için önemli olduğundan kesim reaksiyonları ile doğru klon bulunmuştur (Şekil 3.47).

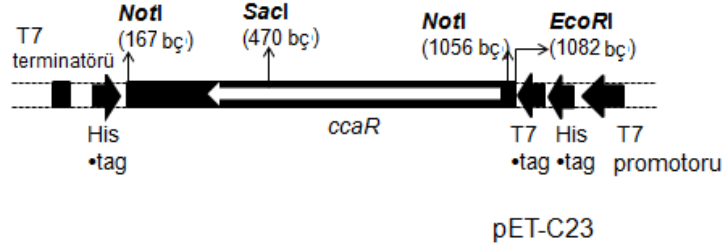


Şekil 3. 46. *ccaR* genini taşıyan pG23 (a) ve pET28a+ (b) vektörlerinin *NotI* enzimi ile keilmeleri. (a) M: 100 bç DNA ladder plus, 1: *NotI* ile kesilmiş pG23. (b) M: λ *PstI* DNA markörü, 2: *NotI* ile kesilmiş pET28a+.



Şekil 3. 47. *ccaR*' nin pET28a+ vektöüne klonlanmasının PCR (a) ile doğrulanması ve *ccaR*' nin pET28a+ vektörün MCS' indeki yönünün enzim kesimleri ile belirlenmesi (b) 1: Kalıp DNA' nın olmadığı negatif kontrol reaksiyon, 2: *ccaR*' yi taşıyan rekombinant pET28a+' nın kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu, M: 100 bç DNA ladder plus, 4: *S. clavuligerus*' a ait genomik DNA' nın kalıp olarak kulanıldığı PCR reaksiyonu, 5: *EcoRI* ile kesilmiş rekombinant pET28a+, 6: λ *PstI* DNA markörü, 7: *SacI* ile kesilmiş rekombinant pET28a+, M: 100 bç DNA ladder plus.

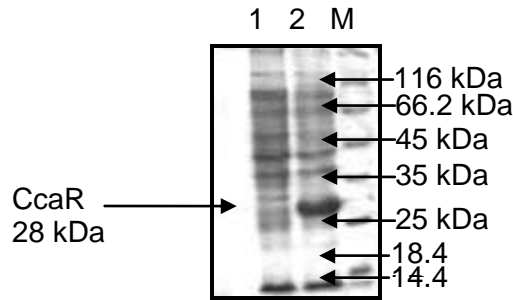
Rekombinant suş pET-C23 olarak adlandırılmış (Şekil 3.48) ve rekombinant vektör CcaR proteininin ekspresyonu ve pürifikasyonu için proteazdan yoksun bir suş olan *E. coli* BL21 hücrelerine transformasyonla aktarılmıştır.



Şekil 3. 48. *ccaR* geninin pET-C23' deki lokalizasyonu.

3.5.2. CcaR' nin *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerindeki ekspresyonu ve His Tag Afinité Kromotografisi ile saflaştırılması

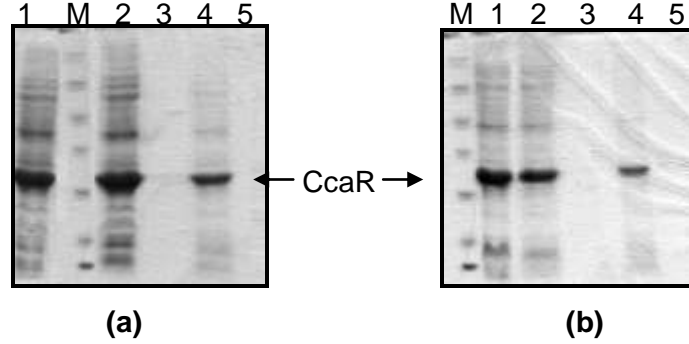
CcaR proteininin *E. coli* BL21 hücrelerindeki ekspresyonu OD₆₀₀ değeri 0.6' ya ulaşan kültürün 5 saat boyunca 37 °C ve 200 rpm' de 1 mM IPTG ile indüklenmesinin ardından SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3.49, IPTG ile indüklenmiş kültürlerdeki CcaR proteininin ekspresyonunu göstermektedir.



Şekil 3. 49. IPTG ile indüklenmiş *E. coli* BL21 kültüründe CcaR proteininin ekspresyonu. M: Protein markörü, 1: Kontrol (indüklenmemiş örnek) 2: İndüklenmiş örnekteki ekspres olmuş CcaR proteini.

CcaR protein Protino® Ni-TED 2000 pürifikasyon kolonları kullanılarak kısmen saflaştırılmıştır. Saflaştırma denatüre koşullarda gerçekleştirilmiştir. IPTG ile indüklenmiş kültürlerin santrifüjü sonrasında elde edilne çökeleklerin çözülmesi için kullanılan LEW tamponu 8 M üre, 300 mM NaCl ve 50 mM Na₂HPO₄, pH: 8. içermektedir. Elüsyon tamponu

LEW tamponuna 250 mM imidazol eklenerek hazırlanmıştır. Bununla birlikte CcaR proteinin standart rotokolle kolondan saflaştırılmadığından optimizasyon çalışmaları yapılmış ve kısmen saflaştırılmış CcaR proteinin elde edilmiştir (Şekil 3.50).

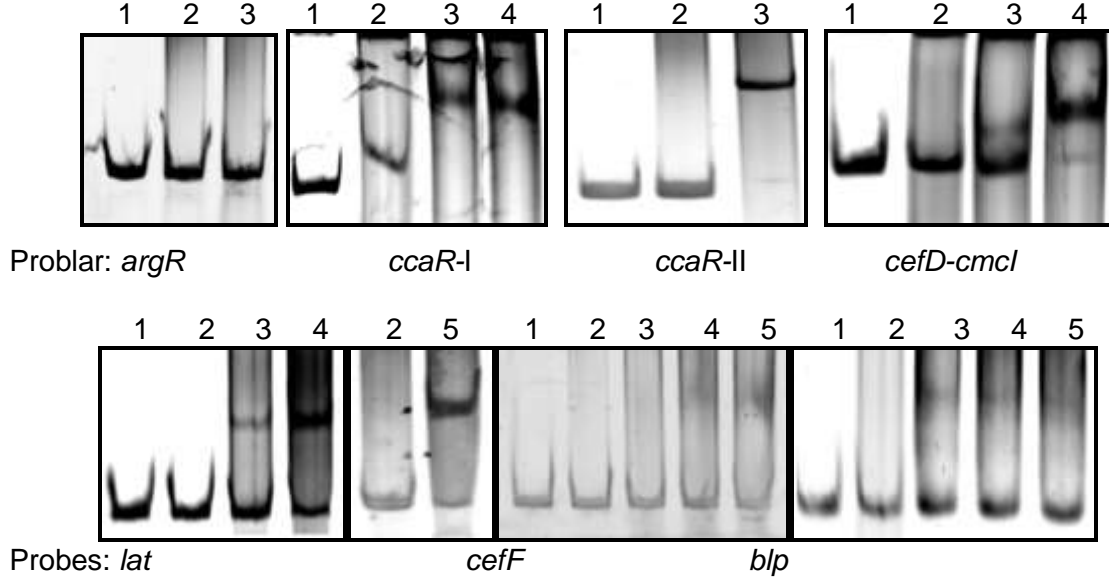


Şekil 3. 50. His Tag afinite kromatografisi ile CcaR proteininin kısmi olarak saflaştırılması. **(a)** 30 mM β -merkaptotanol (β -ME) ya da **(b)** % 1 oranında Triton X-100 içeren hücre lizatlarının belli oranlarda imidazol eklenen tamponlar kullanılarak saflaştırılması. M: Protein markörü, 1: İndüklenmiş örnek, 2: Akış örneği, 3: Eluat (sağım), 4: 1. yıkama sonrası alınan örnek, 6: 2. yıkama sonrası alınan örnek.

3.5.3. Sefamisin C gen kümesi üzerindeki CcaR' ye ait DNA'ya-bağlanma bölgelerinin Elektroforetik Hareket Değişim Deneyi-EMSA ile belirlenmeleri

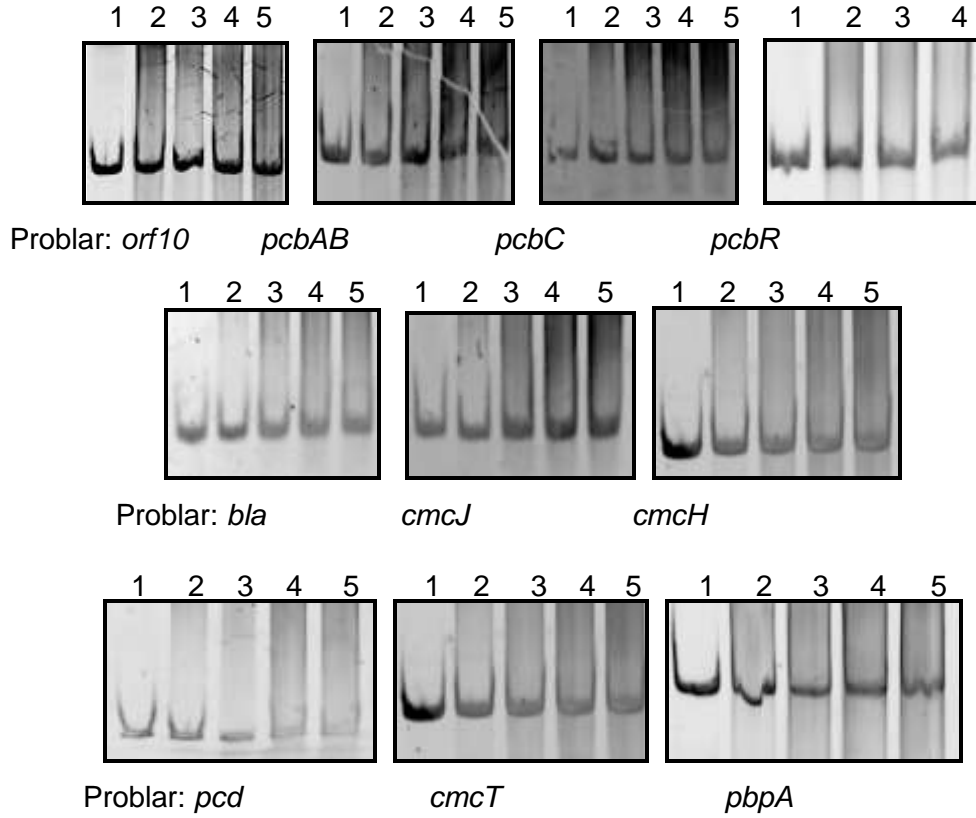
qRT-PCR analizlerinden elde edilen verileri desteklemek ve CcaR' nin sefamisin C gen kümesi üzerindeki düzenleyici etkisini açıklamak üzere EMSA deneyleri yürütülmüştür. CcaR proteininin sefamisin C metabolik yolağındaki genlerin promotor bölgelerine bağlanabilme özelliği bu deneylerle tespit edilmiştir. İlgili genlerin 5' kısımlarındaki nükleotit dizilerine özgü oligonükleotitler tasarlanmış ve proof-reading PCR reaksiyonlarında kullanılmışlardır. *S. clavuligerus* NRRL3585' a ait genomik DNA bu reaksiyonlarda kalıp olarak kullanılmıştır. Ek D' de içeriği verilen reaksiyon tamponuna kompetitif DNA olarak poly [d(I-C)] (1 μ g/ μ l), BSA (1 mg/ml) ve 75 ng of promotor DNA' sı ile 1 ila 2.5 μ g arasında değişen konsantrasyonlarda kısmen saflaştırılmış CcaR proteini eklenmiştir. Yapılan EMSA deneylerinin negatif kontrolü olarak CcaR ile reaksiyona girmediği bilinen *argR* probunun (Santamarta ve ark., 2011) kullanıldığı ayrı bir jel geciktirme deneyi yapılmıştır. Verilen EMSA sonuçlarına göre, sefamisin C gen kümesinde, *ccaR*, *lat* promotorları ve *cefD-cmcl* çift-yönlü promotorunun CcaR' nin hedef bağlanma bölgeleri olduğu belirlenmiş (Şekil 3.51) ve bu şekilde daha önce rapor edilmiş olan bulgular doğrulanmıştır (Kyung ve ark., 2001; Santamarta ve ark., 2002 ve Santamarta ve ark., 2011). Daha önce rapor edilen *cefF*-CcaR bağlanmasını gösteren EMSA sonucuna karşın (Santamarta ve ark., 2011), bizim deney koşullarımızda, *cefF* geninin kendi promotoru ile CcaR tarafından regüle edildiğini gösteren

bir EMSA sonucu elde etmekle birlikte diğer sonuçlara kıyasla daha hafif bir reaksiyon tespit edilebilmiştir. *cefF* promotorundan elde edilen bu sonucuna karşılık, EMSA sonuçlarımızda, rekCcaR ile *blp* promotorunun etkileşimini gösteren silik bir bant elde edilmiştir (Şekil 3.51).



Şekil 3. 51. CcaR proteininin sefamisin C metabolik yolağındaki hedef promotor bölgelerinin belirlemek üzere yapılan EMSA analizleri. 1: Serbest prob, 2: Probun BSA (1 µg) ile reaksiyonu, 3: Probun CcaR (1 µg) ile reaksiyonu, 4: Probun CcaR (1.5 µg) ile reaksiyonu, 5: Probun CcaR (2.5 µg) ile reaksiyonu.

Çalışmanın devamında, EMSA deneyleri ile sefamisin C gen kümesindeki genlere ait alternatif promotor bölgeleri ile CcaR' nin etkileşimi incelenmiş, ancak olumlu herhangi bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 3.52).



Şekil 3. 52. CcaR proteininin sefamisin C gen kümesinde yer alan farklı promotor bölgeleri ile olan etkileşimini göstermek üzere yapılan EMSA deneylerine ait sonuçlar 1: Serbest prob, 2: Probun BSA (1 µg) ile olan reaksiyonu, 3: Probun CcaR (1 µg) ile olan reaksiyonu, 4: Probun CcaR (1.5 µg) ile olan reaksiyonu, 5: Probun CcaR (2.5 µg) ile olan reaksiyonu.

3.6. Parental *S. clavuligerus* suşu ile rekombinant C11 suşlarının karşılaştırmalı proteomu

3.6.1. Protein izolasyonu metodunun optimizasyonu

Proteom çalışmalarında tekrarlanabilir sonuçların alınabilmesi verilerin güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. *S. clavuligerus* suşunun miselli yapıda oluşu nedeni ile öncelikli olarak misel yapısının parçalanması gerekmektedir. Ardından, hücre duvarının yok edilmelidir. Bu amaçla farklı protein izolasyonu deneylerinde sadece lizozimle veya sonikasyonla, ya da her ikisinin birlikte uygulanmasıyla, ve ayrıca sıvı nitrojenle dövülerek parçalama denemeleri yürütülmüştür. Ancak, bu dört denemede başarılı bir sonuç elde edilememiştir. Bir sonraki optimizasyon çalışmasında kültürlerden alınan örnekler

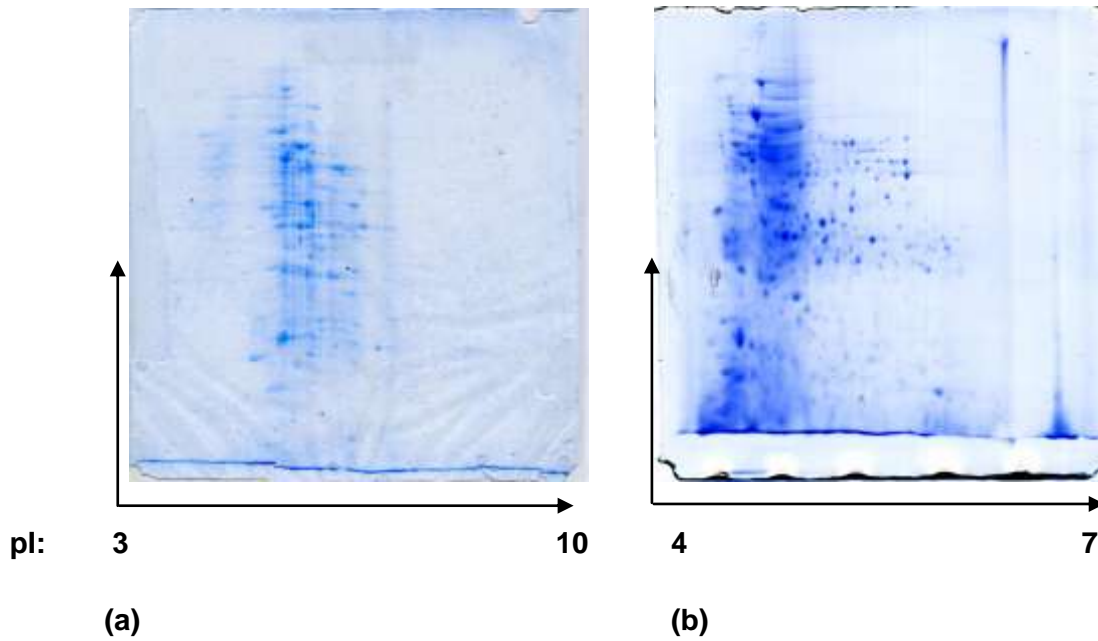
çöktürülmüş ve süpernatant atıldıktan sonra kalan çökelek sıvı nitrojende dondurulup -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Protein izolasyonu öncesinde -80 °C' den alınan örnekler sıvı nitrojende dövülerek toz haline getirilmiş ve ardından sonikasyonla tamamen parçalanmışlardır. Bu işlem sonrasında elde edilen çözelti mikroskop altında incelenerek herhangi bir hücre formunun kalıp kalmadığı tespit edilmiştir. TCA-aseton ile muamele sonrasında TCA' nin örneklerden tamamen uzaklaştırılamaması izoelektrik fokuslamada problemlere yol açtığından streaklerin görülmesine yol açmış bu nedenle proteinler sadece asetonla çöktürülmüştür. Tamamen kuruyan protein örnekleri rehidrasyon tamponunda çözülerek birinci boyutta yürütme işlemi için hazır bekletilmişlerdir.

3.6.2. İzoelektrik fokuslamada yapılan optimizasyonlar

İzoelektrik fokuslamada 50 V ve 70 V' luk düşük akımlarla 10 saat boyunca striplere yüklenen proteinlerin tuz ve diğer yabancı maddelerden arındırılması sağlanmış ve proteinlerin düzgün bir şekilde odaklanabilmesi için maksimum 8000 V' luk akım uygulanmıştır. toplamda jellerin 72000-80000 Vh alması sağlanmıştır.

3.6.3. Parental *S. clavuligerus* suşuna ait toplam hücre proteomu

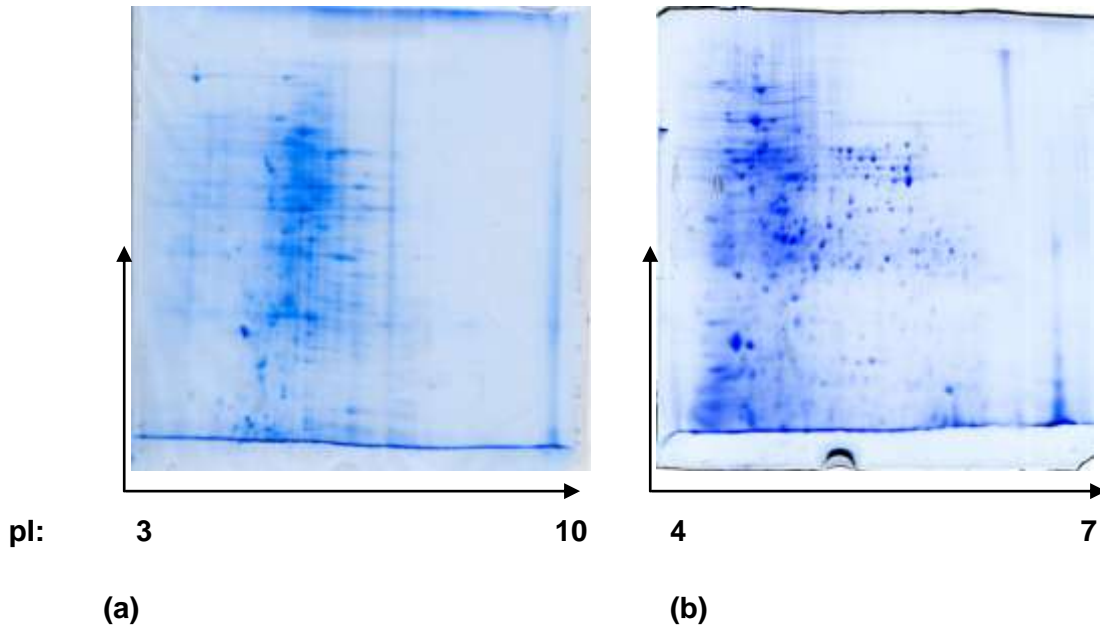
Şekil 3.53' de parental *S. clavuligerus* suşuna ait ve 24 saatlik TSB kültüründen elde edilen pI: 3-10 ve pI: 4-7 aralığındaki protein profili görülmektedir. 4-7 aralığındaki jelin asidik kısmında bir miktarda olsa bazı proteinlerin odaklanmasında problemler bulunmaktadır ve ayrıca bir miktar kirlilik söz konusudur.



Şekil 3. 53. Parental *S. clavuligerus* suşuna ait toplam hücre proteomu. (a) Parental *S. clavuligerus* suşuna ait pI:3-10 aralığındaki proteinleri gösteren 2D jeli, (b) Parental *S. clavuligerus* suşuna ait pI: 4-7 aralığındaki proteinleri gösteren 2D jeli.

3.6.4. *S. clavuligerus* C11 suşuna ait toplam hücre proteomu

Şekil 3.54' de rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşuna ait ve 24 saatlik TSB kültüründen elde edilen pI: 3-10 ve pI: 4-7 aralığındaki protein profili görülmektedir. Şekil 3.53b' deki gibi 4-7 aralığındaki jelin asidik kısmında bir miktarda olsa bazı proteinlerin odaklanmasında problemler bulunmaktadır ve ayrıca bir miktar kirlilik söz konusudur. Bununla birlikte proteinlerin düzgün bir şekilde odaklandığı söylenebilir.

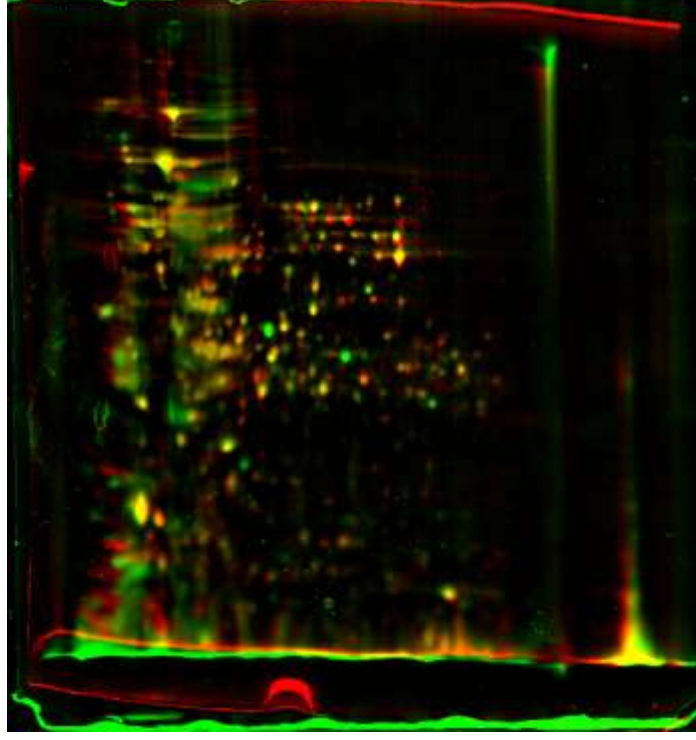


Şekil 3. 54. Rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşuna ait toplam hücre proteomu. (a) Rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşuna ait pI:3-10 aralığındaki proteinleri gösteren 2D jeli, (b) Rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşuna ait pI: 4-7 aralığındaki proteinleri gösteren 2D jeli.

3.6.5. Parental ve rekombinant suşda pI:4-7 aralığındaki protein profilinin karşılaştırılması

Parental ve rekombinant suşlarda pI:4-7 aralığındaki protein profillerini gösteren jeller Decodon Delta 2D analiz programı kullanılarak bilgisayar ortamında üstüste getirilmiştir. Şekil 3.55' de kırmızı renkte görülen spotlar rekombinant C11 suşunda görülen proteinleri, yeşil renkli olanlar parental *S. clavuligerus* suşunda görülen ve fakat rekombinantta

görülmeyen protein spotlarını, sarı renkte görülenler ise her iki suşta da ifade edilen protein spotlarını temsil etmektedir.



Şekil 3. 55. *p/4-7* aralığında parental ve rekombinant C11 suşlarında aynı ve farklı ifade edilen proteinlerin (sırasıyla yeşil ve kırmızı ve aynı olanlar sarı) Decodon Delta 2D analiz programı kullanılarak belirlenmeleri.

BÖLÜM 4

I. TARTIŞMA

Parental *S. clavuligerus* suşu, *ccaR* mutanlığı ve rekombinant C11, pGV, pTV ve PC suşlarının SA ve TSB besiyerlerindeki fermentasyonunda dikkat çekici olan, TSB besiyerinde tüm suşlarının üremelerinin fermentasyonun 48. saatinden sonra kademeli olarak düşmesidir. TSB besiyerinde suşların daha iyi bir üreme profile sergilemeleri büyük olasılıkla kullanılan besiyerinin besin içeriğinin zengin olmasıdır. Bilindiği üzere, rekombinant bir genin çok kopyalı bir plazmidde overekspresyonu genellikle hücre fizyolojisine ekstra yük getirmektedir ve bu durum “metabolik yük” olarak adlandırılmaktadır. Metabolik yükün neticesinde, konak hücrede çok kopyalı plazmidin bulunması ve replikasyonu sekonder metabolit yollarını ciddi oranda etkilemektedir (Baltz, 1998; Williams ve ark., 2009; Balderas-Hernandez ve ark., 2009; Özcengiz ve ark., 2010). *pccaR*'nın *S. clavuligerus* kromozomuna entegrasyonu SA besiyerinde antibiyotik üretiminde dikkate değer bir artışa yol açmamıştır, bu durum Perez-Llarena ve ark. (1997) tarafından belirtildiği gibi SA besiyerinin hücrelerin sefamisin C üretimlerini desteklemediğini doğrulamaktadır (Şekil 3.15b). pSET152 *Streptomyces*'te kendi kendini replike edemeyen bir entegrasyon vektörüdür. Kromozomunda ϕ C31 *attP-int* lokusunun bulunması sayesinde kendini *Streptomyces* kromozomundaki *attB* bağlanma bölgesine entegre edebilir. *S. coelicolor* ve *S. lividans* gibi birçok *Streptomyces* spp. genomu çok çeşitli sekonder ve pseudo-*attB* bölgelerine sahiptir (Combes ve ark., 2002). İlgili genin tek kopyasının entegrasyon vektörü kullanarak bakteri kromozomuna sokulması oldukça kararlı rekombinant suşların oluşmasını sağlarken bir yandan da konak hücrede çok kopyalı plazmidlerin varlığında karşılaşılan problemleri ortadan kaldırır (Bierman ve ark., 1992). Bu zamana kadar belirli bir antibiyotik biyosentez yoluna ait bir genin pSET152 vektörüne klonlanarak bakteri kromozomuna sokulduğu ve bu rekombinasyon olayının hücreye zarar vermeden ilgili antibiyotik üretimi pozitif olarak etkilediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Luzhetskii

ve ark., 2001; Paranthaman ve Dharmalingam, 2003; Liao ve ark., 2010). *pccaR*' nin klonlandığı rekombinant pSET-PC vektörünün *S. clavuligerus* kromozomuna entegrasyonu TSB besiyerinde sefamisin C üretiminde 1.2 ile 2.1 katlık bir artış sağlamıştır. Bununla beraber, SA besiyerinde üreyen rekombinant PC suşu tarafından üretilen klavulanik asit miktarının HPLC ile belirlenmesiyle parental suşa kıyasla rekombinant bakterinin bu β -laktamaz inhibitörünü 3 kat daha fazla ürettiği gösterilmiştir. C11 ise, her iki besiyerinde de parental suşla karşılaştırıldığında, sefamisin C' yi 2 ile 3 kat, klavulanik asidi ise 6 kat daha yüksek seviyede üretmektedir. Biyoassay ve HPLC' den elde edilen veriler, *ccaR* geninin ekstra kopyası ya da kopyalarının *S. clavuligerus*' un kromozomuna entegrasyonu ya da bu genin hücrede çoklu ifadesinin hem klavulanik asit hem de sefamisin C üretimini olumlu etkilediğini göstermektedir.

Sefamisin C gen kümesi üzerindeki CcaR regülasyonu genel şekli ile RT-PCR analizleri ile gösterilmiştir. Hücrede CcaR proteinin yokluğunda, *ccaR* geni ile beraber *blp*, *lat*, *pcbAB*, *cefD*, *cefE*, *cmcl*, *cmcJ*, *cefF* ve *cmcH* genlerinin ekspresyonlarında ciddi oranda düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu genler sefamisin C biyosentez yolunun ilk (*lat*, *pcbAB*), orta (*cefD*, *cefE*, *cefF*) ve son (*cmcl*, *cmcJ*, *cmcH*) basamaklarında rol alan enzimleri kodlayan genlerdir. Dahası, mutant suşda *pcbC* biyosentetik geni ve *cmcT* tranportör geninin transkripsiyonlarında gözlenebilir düşüşler tespit edilmiştir. Bununla beraber, parental ve mutant suşlarda, sefamisin C gen kümesinin diğer genlerinin (*pcd*, *pbpA*, *bla*, *pcbR*) ekspresyon profillerindeki muhtemel farklılıklar RT-PCR ile belirlenebilecek netlikte değildir. Çok kopyalı *ccaR* geninin içeren rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşunda *ccaR*, *lat*, *blp*, *cmcl*, *cefD*, *pcbR* genlerinin RT-PCR çalışmalarından elde edilen bantların yoğunluğu parental suştan elde edilenlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, RT-PCR ile elde edilen bu veriler reaksiyonun son aşamasındaki ürünü temsil etmekte olup sefamisin C biyosentezinin gen ekspresyon seviyesinin kantitatif olarak değerlendirilmesi mümkün değildir. Bu nedenle, *ccaR*' nin sefamisin C genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisi flöresan emilimine dayalı olarak kalıp DNA amplifikasyonunun eşzamanlı tesbitini sağlayan qRT-PCR deneyleri ile analiz edilmiştir (Wong ve Medrano, 2005).

ccaR geni tahrip edilmiş suşla yapılan qRT-PCR deneylerinden elde edilen ekspresyon verilerinde en dramatik düşüş seviyesi *lat* ekspresyonunda kaydedilmiştir. Neticede, hız sınırlayıcı enzim olan LAT' in hücrede olmayışı nedeni ile sefamisin C sentezi gerçekleşmemiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, *lat* geninin tahrip edilmesi sefamisin C biyosentezinin durmasına yol açmış ve mutant suş tarafından üretilen klavulanik asit miktarının normaldekine kıyasla 2 ile 2.5 kat arttırdığı rapor edilmiştir (Paradkar ve ark., 2001). Bu açıdan, qRT-PCR ile *ccaR* mutant suşundaki *lat* ekspresyonu ile ilgili bulgumuz bu

çalışmalarla uyumludur. qRT-PCR ile sefamisin C gen kümesinde *ccaR* geninden hemen sonra yer alan *orf10* geninin ekspresyonunda 9-10 katlık azalma tespit edilmiştir. RT-PCR deneylerinden elde edilen amplikonların yürütüldüğü jellere bakıldığında belirgin olmayan bantların görülmesi bu gene ait mRNA ekspresyonunun oldukça kararsız olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca, *ccaR* ve *orf10* genleri arasındaki ara bölgede muhtemel bir terminatör nükleotit dizisinin varlığı *ccaR* geninin tahrip edilmesi sonucunda *orf10* ekspresyonu üzerinde beklenen olumsuz etkinin elimine edildiğini de gösterebilir. *blp* sekansı BLIP (β -laktamaz inhibitör proteini)' ye benzer olan fakat herhangi bir β -laktamaz inhibitör aktivitesine sahip olmayan bir proteinin kodlamaktadır. Ne *blp* ne de *orf10* genlerinin tahrip edilmeleri hücrede sefamisin C üretiminde herhangi bir zarar verici etkiye neden olmamıştır (Alexander ve Jensen, 1998). *orf10* ekspresyonunun aksine, mutant suşta qRT-PCR ile *blp* geninin ekspresyonunda 224 katlık ve fermentasyon süresince sabit bir düşüş saptanmıştır. Sefamisin C gen kümesindeki *orf10* ve *blp* genleri arasındaki 346 bç uzunluğundaki geniş bir ara bölgenin varlığı (Perez-Llarena *et al.*, 1997; Alexander and Jensen, 1998), *blp* geninden önce ve mutemelen CcaR kontrolünde bir promotorun bulunduğu işaret etmektedir. *pcbAB* ve *pcbC* genlerine ait qRT-PCR verileri, her iki gen için de mutant suşta RT-PCR ile elde edilen sonuçları doğrulamaktadır. qRT-PCR elde edilen verilere göre, her iki genin ekspresyonu CcaR aktivatörünün kontrolü altındadır ve bu kontrol büyük olasılıkla *lat* promotoru yardımıyla gerçekleştirilmektedir. *pcbAB* geninin yaklaşık 11 kb büyüklüğünde oluşu ve *pcbC* geni ile arasında kalan ara bölgenin oldukça kısa olması, *pcbC* ekspresyonunun etkin kontrolü için *pcbAB* geni içerisinde bir promotor bölgesine sahip olma olasılığını kuvvetlendirmektedir (Petrich, 1992). *cefE*, sefamisin C biyosentez yolunun orta basamağında görev yapan ve penisilin N' den deasetoksisefalosporin C (DAOCS)' in oluşumunda rol oynayan penisilin N ekspandaz enzimini kodlar. *ccaR* mutantlarında DAOCS' ye ait bir sinyalin elde edilmediği Western blot analiz sonucuna karşın, elde ettiğimiz qRT-PCR verileri *ccaR*' nin tahrip edilmesi durumunda *cefE* nin ekspresyon seviyesinde önemli değişim gerçekleşmediğini ortaya koymaktadır (27.7 ila 43 katlık azalma). *cefF* ve *cmcH* genleri sefamisin C biyosentezinde ardışık görevleri olan enzimleri kodlayan genlerdir. Her iki genin ekspresyonunda da mutant suşta belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı düşüşler kaydedilmiştir. Bilindiği gibi *pcd* geninin hücrede bulunmayışı sefamisin C biyosentezinin % 30 ila % 70 arasında azalmasına yol açmaktadır (Alexander ve ark., 2007). Bu gen L-lizinden α AAA oluşumunda rol oynayan bir enzim kodlar ve böylelikle sefamisin C biyosentezinin öncül basamaklarında işlev görür. Ancak, hücrede *ccaR* geninin olmayışı bu genin ekspresyonunda sadece 7.9 ila 84 kat arasında düşüşe neden olmaktadır. CcaR' nin *cefD*-*cmcI* iki yönlü promotoruna bağlandığı daha önceki çalışmalarda gösterilmişti (Santamarta ve ark., 2002). Buna bağlı olarak, *ccaR* mutant suşunda *cefD* ve *cmcI* genleri düşük oranda ifade edilmişlerdir. Sefamisin C biyosentezinin önemli bir enzimini kodlayan (izopenisilin N'

nin penisilin N' ye dönüşümünde rol oynayan IPN epimerazı kodlamaktadır (Usui ve Yu, 1989)) gen olarak *cefD'* nin ekspresyonu CcaR' nin kontrolü altındadır (Alexander ve Jensen, 1998). *cmcl* β-laktam halkasının C-7' pozisyonunun hidrosillenmesini sağlayan sefalosporin-7-α-hidroksilaz enzimini kodlamaktadır (Enguita ve ark., 1996). Ardından, *cmcJ* tarafından kodlanan metiltransferaz ürünün C-7' pozisyonuna metoksil grubu ekleyerek sefamisin C oluşumunu sağlamaktadır. Metoksilasyon aşaması sefamisin C üreticisi bakteriye β-laktamaz direncini sağlaması bakımından önemlidir. Bu noktada *cmcl*' nin görevi CmcI üzerinde metoksilasyon kompleksinin varlığıdır (Öster ve ark., 2006). Bu nedenle, *ccaR* mutant suşunda *cmcl* ekspresyonu ile ilgili elde edilen qRT-PCR verileri oldukça makul ve önceki bulguları doğrular niteliktedir ki bu çalışmalarda Western blot analizi ile farklı şekillerde *ccaR* geni tahrip edilmiş suşlarda IPN epimeraza ait sinyal elde edilememiştir (Alexander ve Jensen, 1998).

Anlaşılabacağı üzere, sefamisin C gen kümesindeki tüm genlerin ekspresyonları mutant suşda, sözkonusu tüm saatlerde baskılanmıştır. Sadece, *pbpA* (T₁₅' de) ve *bla* (T₁₅ ve T₃₀' da) genlerinde belirtilen zaman dilimlerinde önemli bir azalma saptanmamıştır. *cmcT*, *pbpA*, *bla* ve *pcbR* genlerinin CcaR proteinin yokluğunda ekspresyonlarında iz miktarda azalmaların olması bu genlerin kodladığı enzimlerin metabolik yolaktaki yardımcı rollerinden kaynaklanıyor olabilir. Aksine, sefamisin C gen kümesindeki biyosentez genlerinin ekspresyonları için hücrede CcaR' nin bulunması son derece önemlidir. Literatürde qRT-PCR tekniğinin antibiyotik biyosentezinden sorumlu gen kümelerindeki gerçek transkript miktarını belirlemede tercih edildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Sözelimi, Dangel ve ark., (2011) qRT-PCR deneyleri ile ilgili regülatör genden yoksun suşlarda novobiyosin biyosentetik gen kümesinin transkripsiyonel regülasyonunu çalışmıştır. Ayrıca, Lopez-Garcia ve ark., (2010) *adpA* geninin hücrede ortadan kaldırılmasının *S. clavuligerus*' da morfolojik farklılaşma ve klavulanik asit biyosentezi üzerindeki etkisini yine qRT-PCR ile incelemiştir. Diğer yandan, Ostash ve ark., (2011) çalışmalarında GntR-benzeri regülatörü kodlayan *IndYR* genini tahrip ederek bunun sporlanma ve antibiyotik üretimi üzerine olan zararlı etkilerini araştırmıştır. Du ve ark., (2011) ise qRT-PCR teknolojisini kullandıkları çalışmalarında, yolak özgü aktivatör genleri tahrip yoluyla, *S. chattanoogensis*' de natamisin biyosentetik gen kümesinin tamamını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, qRT-PCR çalışmalarından elde edilen veriler aktivatör proteinlerin ilgili gen kümelerindeki DNA-bağlama bölgelerindeki nükleotit dizilerinin karakterizasyonu ile desteklendiğinde daha anlamlı çıkarımlar elde edilmektedir. Bu yüzden *ccaR* mutantından elde edilen qRT-PCR verileri ve aynı zamanda sefamisin C gen kümesinde CcaR aktivatör proteininin DNA-bağlanma bölgelerinin belirlenmesi ile bu proteinin sefamisin C gen kümesin üzerindeki düzenleyici etkisi daha iyi anlaşılacaktır.

lat, *cmcl* ve *cefD* biyosentez genleri sefamisin C metabolik yolunun ilk, orta ve son basamaklarında rol alan enzimleri kodlayan genlerdir. Bu açıdan, *ccaR* geninin çoklu kopya olarak bulunduğu rekombinant C11 suşunda çok fazla ifade edilmeleri beklenen bir sonuçtur. LAT ve PCD enzimlerini kodlayan *lat* ve *pcd* genleri sefamisin C biyosentezinin ilk iki basamağında (lizinin iki aşamalı olarak α -AAA' e dönüşümü), *ccaR*' in çok kopyalı ekspresyonunun *pcd* genine ait ekspresyonu aynı şekilde etkilememesi qRT-PCR ile *ccaR* mutant suşundaki aynı gene ait verilerle uyumludur. *pcbC* geni le ilgili olarak söylenebilecek bulgu, C11 suşunda bu ekspresyonunda meydana gelen 1.2- ile 1.5-katlık artışın muhtemelen *pcbAB*' nin 3' bölgesinde bulunan bir promotörünün varlığını destekliyor olmasıdır. Sekonder metabolit gen kümelerine ait yolak-özü pozitif regülatörlerin fonksiyonel rolünü ortaya koyan birçok çalışma literatürde mevcuttur. Jung ve ark. (2008) *pikD* regülatör geninin çoklu ifadesi ile (pSET152 entegrasyon vektörü ile kormozoma entegrasyonu sonucunda) *S. venezuelae*' da dezozaminil makrolitleri ve bunların hidrosillenmiş türevlerinin ekspresyonlarının arttığını göstermiştir. Park ve ark. (2009) ait bir çalışmada, *Streptomyces* sp. CK44122 de yolak-özü regülatör geninin çoklu ifadesi yoluyla (entegrasyon vektöründe yer alan *ermE** promotörünü kullanarak), *afsR2* pozitif regülatörü tarafından tautomisetin üretiminin stimüle edildiği gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada (Kitani ve ark., 2009), bir LAL ailesi regülatörü olan *aveR* geninin avermektin üretimi üzerindeki pozitif etkisi gösterilmiştir (*aveR*- konstitutif ekspresyon plazmidi bu amaçla kullanılmıştır). Diğer bir çalışmada, Guo ve ark., (2010) *aveR*' nin avermektin ve oligomisin gen kümeleri üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Bunun yanısıra, Malla ve ark., (2010) *S. peucetius*' da regülatör genlerin çoklu ifadelerinin (ekspresyon plazmidine klonlanmış) doksorubisin verimliliğinde artışa yol açtığını rapor etmişlerdir. Yukarıda bahsedilen tüm çalışmalarda, sekonder metabolitlere ait gen kümelerinin aktivitelerini görüntülemek amacıyla tercih edilen RT-PCR ve qRT-PCR yöntemleridir.

2001 yılında, *CcaR*' nin *lat* promototu ile olan etkileşimi His-taglı *CcaR* proteinini kapsayan işlenmemiş hücre özütünün DNA bağlanma reaksiyonunda kullanıldığı bir çalışmada Kyung ve ark. tarafından ortaya koyulmuştur. Bununla birlikte, Santamarta ve ark., (2002) DNA-bağlanma deneylerinde doğal *CcaR* proteinini kullandıkları deney koşullarında bu proteinin *lat* promotörüne bağlanma kabiliyetini gösterememişlerdir. Ancak, aynı çalışmada, *CcaR*' nin *cefD-cmcl* çift-yönlü promotörüne ve kendi promotörüne bağlandığını göstermişlerdir. Yakın zamanda, Santamarta ve ark., (2011) EMSA deneylerinde doğal *CcaR* proteini yerine *recCcaR* kullanarak *CcaR*' nin *lat* promotörüne bağlandığını belirleyebilmişlerdir. Ayrıca, *CcaR* proteininin *cefF* promotörü ile olan etkileşimini de tespit

etmişlerdir. Bizim deney koşullarımızda, *cefF* geninin kendi promotörü ile CcaR tarafından regüle edildiğini gösteren bir EMSA sonucu olmakla birlikte diğer sonuçlara kıyasla daha zayıf bir reaksiyon tespit edilebilmiştir. Muhtemelen, denatüre olan rekombinant CcaR' yi tekrar doğal yapısına döndürmek amacıyla yapılan diyaliz işlemi sonrasında rekCcaR *cefF* promotörüne iyi bir şekilde bağlanması için gerekli konformasyonunu kazanamamış olabilir. *cefF* promotöründen elde edilen bu sonucuna karşılık, EMSA sonuçlarımızda, rekCcaR ile *blp* promotörünün etkileşimini gösteren silik bir bant elde edilmiştir. Bu sonuç *ccaR* mutant suşunda *blp* ekspresyonunun ciddi oranda baskılandığının gösterildiği qRT-PCR verileri ile uyumludur.

II. ÖNERİLER

Çalışmada, *ccaR* geninin çoklu kopyasını içeren rekombinant C11 suşundaki değişen protein profili proteom çalışmaları ile gözlenmiştir. Ancak, hangi proteinlerin farklı ekspres oldukları hangi yeni proteinlerin ifade edildiği ve hangilerinin muhtemelen ekspresyonunun sona erdiğini belirlemek için MS analizleri ile protein identifikasyonuna gereksinim vardır. Bu nedenle yeni bir çalışma ile proteom çalışmaları tekrarlanıp farklı protein spotları MS analizi ile tespit edilebilir.

BÖLÜM 5

DEĞERLENDİRME

- *S. clavuligerus* NRRL3585' da *ccaR* geni ya pSPG ekspresyon vektöründe güçlü bir promotörün altında ya da entegratif ekspresyon vektörü pSET152' de kendi promotörü ile birlikte ifade edilmiştir. Rekombinant suşlar sırasıyla *S. clavuligerus* C11 ve PC olarak isimlendirilmişlerdir. Boş vektörleri taşıyan rekombinant suşlar ise sırasıyla pGV ve pTV olarak adlandırılmışlardır. Ardından, TSB ve SA besiyerlerinde üretilen rekombinant *S. clavuligerus* suşlarının ve parental suşun fermentasyon süresince ürettikleri sefamisin C ve klavulanik asit titreleri biyoassay ve HPLC analizleri ile karşılaştırılmıştır. Biyoassay sonrasında elde edilen spesifik sefamisin C titrelerine göre, rekombinant C11 suşu T₁₂₀' de TSB ve SA besiyerlerinde sırasıyla 2- ve 3-misli daha fazla antibiyotik üretmiştir. *pccaR'* nin ekstra kopyasının *S. clavuligerus* kromozomuna entegrasyonu, rekombinant bakteriye ait TSB kültürlerinde üretilen sefamisin C miktarında 1.2 ila 2.1-kat artış sağlamıştır. C11' in klavulanik asit titresi her iki besiyerinde de T₁₂₀' de parental suşa kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksek bulunmuştur. PC ise parental suşla karşılaştırıldığında SA besiyerinde 120. saatte 3 misli daha fazla klavulanik asit üretebilme yeteneğindedir.
- *ccaR* geninin sefamisin C gen kümesinin transkripsiyonel regülasyonu üzerindeki etkisi *S. clavuligerus ccaR::aphII*, *S. clavuligerus* C11, parental suşlar *S. clavuligerus* NRRL3585 ve ATCC27064' e ait kültürlerden 15, 24 ve 30. saatte alınan kültürlerden izole edilen total RNA' ların kalıp olarak kullanıldığı RT-PCR deneyleri ile incelenmiştir. Hücrede CcaR proteininin yokluğunda, *ccaR*, *blp*, *lat*, *pcbAB*, *cefD*, *cefE*, *cmcl*, *cmcJ*, *cefF*, *cmcH* transkriptlere ait oldukça düşük seviyeli ekspresyon profilleri gözlenmiştir. Ayrıca, *pcbC* (biyosentetik gen) ve *cmcT* (transportör gen)' nin transkripsiyon profillerinde de gözle görülür miktarda azalmalar tespit edilmiştir. Bununla birlikte, sefamisin C gen kümesinde yer alan diğer genler olan *pcd*, *pbpA*, *bla*, ve *pcbR'* in ekspresyon düzenininin parental suş ve *ccaR* mutant suşundaki

değişimi RT-PCR ile belirlebilecek netlikte değildir. Çok kopyalı *ccaR* geninin taşıyan rekombinant *S. clavuligerus* C11 suşunda *ccaR*, *lat*, *blp*, *cmcl*, *cefD* ve *pcbR* genlerine ait RT-PCR deneyleri sonucunda elde edilen bantların yoğunluğu parental suştakinden daha yüksek gözükmektedir.

- RT-PCR deneyleri ile sefamisin C gen kümesinde yanyana bulunan genlere ait bisistronik transkriptler elde edilmiştir. Northern blot analizine dayalı daha önceki literatüre karşın (Perez-Llarena ve ark., 1997), *ccaR* geninin *orf10* ile birlikte transkribe olduğu ve ayrıca, *blp*' nin *orf10* ve *lat* genleriyle bisistronik transkriptler verdiği belirlenmiştir. Sadece, *bla* ve *pcbR* genleri monosistronik transkriptler oluşturmaktadırlar. *cmcH* ve *ccaR* genlerinin birlikte transkribe oldukları ilk defa ortaya konmuştur.
- CcaR aktivatörünün sefamisin C gen kümesinin zamana bağlı transkripsiyonel regülasyonundaki rolü qRT-PCR deneyleri ile ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. *ccaR* mutanti ve rekombinant C11 suşlarında sefamisin C genlerinin ekspresyon seviyeleri parental suştakine kıyasla rölatif olarak belirlenmiştir. *ccaR* mutantında inkübasyon süresince (30 saat) sefamisin C gen kümesindeki genlerin tümünün ekspresyonu baskılanmıştır. Ekspresyon profilinde en vahim düşüşün tespit edildiği gen *lat* olup, fermentasyondaki zaman akışında 2212-, 1718- ve 1291 misli daha az ifade edildiği bulunmuştur. Bu geni, mutant suşdaki 1081-, 299-, 225-, 354 kat daha düşük ekspresyon değerleri ile sırasıyla *cmcl*, *cefD*, *blp* ve *cefF* genleri izlemektedir.
- Rekombinant C11 suşunda *ccaR*, *lat*, *cmcl*, *cefD* ve *blp* genlerinin qRT-PCR ile zamana bağlı ekspresyon analizlerinden elde edilen veriler *ccaR* mutant suşundan elde edilenlerle uyum göstermektedir. C11 suşunda, *ccaR* ekspresyonu T₂₄' de 4.8- ve T₃₀' da 5-kat artış göstermiştir ve bu değerler istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. T₂₄ ve T₃₀' da önemli orandaki ekspresyon artışları *lat*, *cmcl*, *cefD* ve *blp* genleri tarafından parental suştakine kıyasla, sırasıyla 4.3-, 5.1-, 2.7- ve 4.3-misli olmak üzere devam ettirilmiştir. İlginç bir şekilde, *pcbR* ekspresyonu T₁₅' de 3.2-kat artış göstermiştir.
- Sefamisin C gen kümesinin CcaR aktivatörü tarafından regülasyonu ile ilgili yapılan qRT-PCR analizlerinden elde edilen verileri destelemek için EMSA deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerin sonucunda, sefamisin C gen kümesindeki *ccaR* ve *lat* promotorları ile *cefD-cmcl* çift-yönlü promotorunun CcaR için hedef bölgeler olduğu bulunmuş ve bu veriler daha önceki çalışmaları doğrulamıştır (Santamarta ve ark., 2011). Diğer taraftan, *cefF* geninin CcaR tarafından doğrudan kendi promotoru üzerinden regülasyonunu gösteren bir kuvvetli bir EMSA sonucu, bizim deney koşullarımızda elde edilememiştir. CcaR' nin muhtemel bağlanma bölgelerini bulmak üzere sefamisin C gen kümesindeki geri kalan genlerin 5' kısımlarına ait problemler da

EMSA deneylerinde analiz edilmiş, sadece *blp* promoter bölgesi CcaR ile etkileşimi sonucunda silik bir bant elde edilmiştir.

- Decodon Delta 2D analiz programı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı proteom çalışmalarında *pI*:4-7 aralığında parental ve rekombinant C11 suşlarına ait protein profillerinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- AHARONOWITZ Y., Demain A.L., Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*, *Arch. Microbiol.*, 115(2), 169-173, (1977).
- AHARONOWITZ Y., Demain A.L., Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14(2), 159-164, (1978).
- AHARONOWITZ Y., Demain A.L., Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*, *Can. J. Microbiol.*, 25(1), 61-67, (1979).
- AHARONOWITZ Y., Cohen G., Martín J.F., (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution, *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 461-495.
- ALEXANDER D.C., Jensen S.E., Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein, *J. Bacteriol.*, 180, 4068-4079, (1998).
- ALEXANDER D.C., Brumlik M.J., Lee L., Jensen S.E., Early cephamycin biosynthetic genes are expressed from a polycistronic transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.*, 182, 348-356, (2000).
- ALEXANDER D.C., Anders C.L., Lee L., Jensen S.E., *pcd* mutants of *Streptomyces clavuligerus* still produce cephamycin C, *J. Bacteriol.*, 189(6), 5867-5874, (2007).
- BAKER B.J., Dotzlaw J.E., Yeh W.K., Deacetoxycephalosporin C hydroxylase of *Streptomyces clavuligerus*. Purification, characterization, bifunctionality, and evolutionary implication, *J. Biol. Chem.*, 266, 5087-5093, (1991).
- BALTZ R.H., Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*, *Trends Microbiol.*, 6, 76-82. (1998).
- BALTZ R.H., Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8, 1-7, (2008).
- BALTZ R.H., *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 759-772, (2010).
- BALDERAS-ERNAÑDEZ V.E., Sabido-Ramos A., Silva P., Cabrera-Valladares N., Hernández-Chávez G., Báez-Viveros J.L., Martínez A., Bolívar F., Gosset G., Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.*, 8,19 doi:10.1186/1475-2859-8-19, (2009).
- BASCARAN V., Sánchez L., Hardisson C., Braña A.F. Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1625-1634, (1991).
- BENTLEY S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H. et al., Hopwood D.A., Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*, 417 (6885), 141-147, (2002).
- BIBB M.J., Regulation of secondary metabolism in streptomycetes, *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 208-215, (2005).
- BIERMAN M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., Schoner B.E., Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116, 43-49, (1992).
- BIGNELL D.R., Tahlan K., Colvin K.R., Jensen S.E., Leskiw B.K., Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bld*., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 1529-1541, (2005).
- BRADFORD M.M., 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, (1976).
- BRAKHAGE A.A., Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 547-585, (1998).
- BRAKHAGE A.A., Al-Abdallah Q., Tuncher A., Sprote P., Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors, *Phytochemistry*, 66 (11), 1200-1210, (2005).
- BRAKHAGE A.A., Thön M., Spröte P., Scharf D.H., Al-Abdallah Q., Wolke S.M., Hortschansky P., Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters, *Phytochemistry*, 70, 1801-1811, (2009).

BREWER S.J., Taylor P.M., Turner M.K., An adenosine triphosphate-dependent carbamoylphosphate-3-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase from *Streptomyces clavuligerus*, *Biochem. J.*, 185, 555-564, (1980).

BURTON K., Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods Enzymol.*, 12, 163-166 (1968).

BUSTIN S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J. Mol. Endocrinol.*, 25, 169-193 (2000).

BUSTIN S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W., Quantitative real time RT-PCR – a perspective, *J. Mol. Endocrinol.*, 34, 597-601, (2005).

CHALLIS G.L., Hopwood D.A., Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 14555-14561, (2003).

CHANG P.C., Cohen S.N., Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid, *Science*, 265 (5174),: 952-954 (1994).

CHATER K.F., Hopwood D.A., *Streptomyces*, in 'Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics'. Sonenshein AL, Hoch JA & Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC, (1993) pp. 83-99.

CHATER K.F., *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics, *Phil Trans R Soc Lond*, 361, 761-768, (2006).

CHATER K.F., Biro S., Lee K.J., Palmer T., Schremph H., The complex extracellular biology of *Streptomyces*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 171-198, (2010).

CHO H., Adrio J.L., Luengo J.M., Wolfe S., Ocran S., Hintermann G., Piret J.M., Demain A.L., Elucidation of conditions allowing conversion of penicillin G and other penicillins to deacetoxycephalosporins by resting cells and extracts of *Streptomyces clavuligerus* NP1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1998) 95,11544-11548.

COMBES P., Till R., Bee S., Smith M.C.M., The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the ϕ C31-encoded site-specific recombination system, *J. Bacteriol.*, 184, 5746-5752, (2002).

COQUE J.J., Martín J.F., Calzada J.G., Liras P., The cephamycin biosynthetic genes *pcbAB*, encoding a large multidomain peptide synthetase, and *pcbC* of *Nocardia lactamdurans* are clustered together in an organization different from the same genes in *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*, *Mol. Microbiol.*, 5, 1125-1133, (1991).

COQUE J.J., Martín J.F., Liras P., Characterization and expression in *Streptomyces lividans* of *cefD* and *cefE* genes from *Nocardia lactamdurans*: the organization of the cephamycin gene cluster differs from that in *Streptomyces clavuligerus*, *Mol. Gen. Genet.*, 236, 453-458 (1993).

COQUE J.J., Enguita F.J., Martín J.F., Liras P., A two-protein component 7 alpha-cephem-methoxylase encoded by two genes of the cephamycin C cluster converts cephalosporin C to 7-methoxycephalosporin C, *J. Bacteriol.*, 177, 2230-2235, (1995a).

COQUE J.J., Pérez-Llarena F.J., Enguita F.J., Fuente J.L., Martín J.F., Liras P., Characterization of the *cmcH* genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis, *Gene*, 162, 21-27, (1995b).

COQUE J.J., de la Fuente J.L., Liras P., Martín J.F., Overexpression of the *Nocardia lactamdurans* alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase in *Streptomyces lividans*, *Eur. J. Biochem.* 242, 264-270, (1996).

DANGEL V., Harle J., Goerke C., Wolz C., Gust B., Pernodet J.L., Heide L., Transcriptional regulation of the novobiocin biosynthetic gene cluster, *Microbiol.*, 155, 4025-4035, (2009).

DEMAIN A.L., Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes, Shapiro, S. Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes, Boca Raton, FL, CRC Press (1989) p.127-134.

DERVEAUX S., Vandesompele J., Hellemans J., How to do successful gene expression analysis using Real Time PCR, *Methods*, 50, 227-230, (2010).

DORAK T.M., Real-time PCR. (<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>) (2006).

DORAN J.L., Leskiw B.K., Aippersbach S., Jensen S.E., Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene, *J. Bacteriol.*, 172 (9), 4909-4918, (1990).

DU Y.L., Li S.Z., Zhou Z., Chen S.F., Fan W.M., Li Y.Q., The pleiotropic regulator AdpA_{ch} is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*, *Microbiol.*, 157, 1300-1311, (2011).

EDWARDS K., Logan J., Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders. *Applied and Functional Genomics*, Health Protection Agency, London. ISBN: 978-1-904455-39-4 (2009).

EFTHIMIOU G., Thumser A.A., Avignone-Rossa C.A., A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source, *J. Appl. Microbiol.*, 105 (6), 2058-2064, (2008).

ELANDER R.P., Industrial production of β -lactam antibiotics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 385-392, (2003).

ENGUITA, F.J., Liras P., Leitao A.L., Martin J.F., Interaction of the two proteins of the methoxylation system involved in Cephameycin C biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 271, 33225-33230, (1996).

FABBRETTI A., Gualerzi C.O., Brandi L., How to cope with the quest for new antibiotics, *FEBS Lett.*, 585 (11), 1673-1681, (2011).

FERNANDEZ-MORENO, M.A., Caballero J.L., Hopwood D.A., Malpartida F., The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bltA* tRNA gene of *Streptomyces*, *Cell*, 66, 769-780, (1991).

FLARDH K., Growth polarity and cell division in *Streptomyces*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 564-571, (2003).

FLARDH K., Buttner M.J., *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium, *Nat. Rev. Microbiol.*, 7, 36-49, (2009).

FLEIGE S., Pfaffl M.W., RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Mol. Aspects Med.*, 27, 126-139, (2006).

FLETT F., Mersinias V., Smith C.P., High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes, *FEMS Microbiol. Lett.*, 155, 223-229, (1997).

FOULSTONE M., Reading C., Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22 (5), 753-762, (1982).

FUENTE A., Lorenzana L.M., Martín J.F., Liras P., Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways, *J. Bacteriol.*, 184, 6559-6565, (2002).

FUENTE J.L., Rumbero A., Martín J.F., Liras P., Delta-1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-aminoacidate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes, *Biochem. J.*, 327 (1), 59-64, (1997).

GARCIA-DOMINGUEZ M., Martín J.F., Liras P., Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant, *J. Bacteriol.*, 171 (12), 6808-6814, (1989).

GARCIA-ESTRADA C., Fierro F., Martín J.F., Evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters. Current research, technology, education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, A. Mendes-Vilas (Ed.) FORMATEX (2010) pp. 577-588.

GARRITY G., Bell J., Lilburn T., Taxonomic Outline of the Prokaryotes', in 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Bergey's Manual Trust, Springer-Verlag, New York (2004).

GLAZER A.N., Nikaido H., Biomass. In: *Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*, W.H. Freeman and Company, New York, USA. (1998) pp. 431-51.

GOMEZ-ESCRIBANO J.P., Liras P., Pisabarro A., Martín J.F., An *rplK* ^{Δ 29-PALG-32} mutation leads to reduced expression of the regulatory genes *ccaR* and *claR* and very low transcription of the *ceaS2* gene for clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Mol. Microbiol.*, 61, 758-770, (2006).

GOMEZ-ESCRIBANO J.P., Martin J.F., Hesketh A., Bibb M.J., Liras P., *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp, *Microbiology*, 154, 744-755, (2008).

GOMEZ-ESCRIBANO J.P., Bibb M.J., Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters, *Microb. Biotechnol.*, 4(2), 207-215, (2011).

GORIELY A., Tabor M., Biochemical models of hyphal growth in actinomycetes, *J. Theor. Biol.*, 222, 211-218, (2003).

GUO J., Zhao J., Li L., Chen Z., Wen Y., Li J., The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Mol. Genet. Genomics* 283, 123-133, (2010).

GYGI S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1720-1730, (1999).

HANAHAN D.J., Studies on transformation of *E. coli* with plasmid, *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580, (1982).

HELLEMANS J., Mortier G., Paepe A., Speleman F., Vandesompele J., qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *Genome Biol.*, 8, R19, (2007).

HELLMAN L.M., Fried M.G., Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat. Protoc.*, 2(8), 1849-1861, (2007).

HIGGINS C.E., Kastner R.E., *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21 (4), 326-331, (1971).

HINTERMANN G., Cramer R., Kieser T., Hutter R., Restriction analysis of the *Streptomyces glaucescens* genome by agarose gel electrophoresis, *Arch. Microbiol.*, 130, 218-222, (1981).

HOBBS G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A., Oliver S.G., Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 272-277, (1989).

HOPWOOD D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Keiser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Scrempf H., Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation, (1985).

HOPWOOD D.A., Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome, *Annu. Rev. Genet.*, 40,1-23, (2006).

HOPWOOD D.A., *Streptomyces in Nature and Medicine* (Oxford Univ. Press, New York). An excellent account of the history of *Streptomyces* research by the founder of *S. coelicolor* genetics (2007).

HORINOUCI S., Kito M., Nishiyama M., Furuya K., Hong S.K., Miyake K., Beppu T., Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Gene*, 95, 49-56, (1990).

HORINOUCI S., Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 71, 283-299, (2007).

HUANG C., Lin Y.S., Yang Y.L., Huang S.W., Chen C.W., The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures, *Mol. Microbiol.*, 28, 905-16, (1998).

HUANG J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J., Cohen S.N., Crossregulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*, *Mol. Microbiol.*, 58, 1276-1287, (2005).

HUANG S., Zhao Y., Qin Z., Wang X., Onega M., Chen L., He J., Yu Y., Deng H., Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*, *Process Biochem.*, 46, 811-816 (2011).

HUNG T.V., Malla S., Park B.C., Liou K., Lee H.C., Sohng J.K., Enhancement of clavulanic acid by replicative and integrative expression of *ccaR* and *cas2* in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(9), 1538-1545, (2007).

IKEDA H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S., Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nat. Biotechnol.*, 21(5), 526-531, (2003).

JASON K., Artero R., Baylies M.K., Non-radioactive electrophoretic mobility shift assay using digoxigenin-ddUTP labeled probes. *Dros. Inf. Serv.* 83, 185-188, (2000).

JENSEN S.E., Westlake D.W., Wolfe S., Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Antibiot.*, 38(2), 263-265, (1985).

JENSEN S.E., Leskiw B.K., Vining L.C., Aharonowitz Y., Westlake D.W., Wolfe S., Purification of isopenicillin N synthetase from *Streptomyces clavuligerus*, *Can. J. Microbiol.*, 32, 953-958, (1986).

JENSEN S.E., Wong A., Rollins M.J., Westlake D.W.S., Purification and partial characterization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 172: 7269-7271 (1990).

JENSEN S.E., Elder K.J., Aidoo K.A., Paradkar A.S., Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 720-726, (2000).

JANWALI H.N., Lee H.C., Sohng J.K., Enhancement of clavulanic acid production by expressing regulatory genes in *gap* gene deletion mutant of *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20,146-152, (2010).

JONES D., Thompson A., England R., Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), guanosine 5'-diphosphate 3'-monophosphate (ppGp) and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, 142, 1789-1795, (1996).

KAIN P., The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations, *Biochim. Biophys. Acta.* 1494, 23-27, (2000).

KERN B.A., Hendlin D., Inamine E.E., L-lysine α - δ -aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17, 676-685, (1980).

KHETAN A., Malmberg L.H., Kyung Y.S., Sherman D.H., Hu W.S., Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnol. Prog.*, 15 (6), 1020-1027, (1999).

KHETAN A., Hu W.S., Sherman D.H., Heterogeneous distribution of lysine 6-aminotransferase during cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus* demonstrated using green fluorescent protein as a reporter, *Microbiology*, 146, 1869-1880, (2000).

KIESER T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D., Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom (2000).

KIM H.S., Lee Y.J., Lee C.K., Choi S.U., Yeo S., Hwang Y.I., Yu T.S., Kinoshita H., Nihira T., Cloning and characterization of a gene encoding the gamma-butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces clavuligerus*, *Arch. Microbiol.*, 182:44-50, (2004).

KIMURA H., Miyashita H., Sumino Y., Organization and expression in *Pseudomonas putida* of the gene cluster involved in cephalosporin biosynthesis from *Lysobacter lactamgenus* YK90, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 490-501, (1996).

KITANI S., Ikeda H., Sakamoto T., Noguchi S., Nihira T., Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 1089-1096, (2009).

KOVACEVIC S., Weigel B.J., Tobin M.B., Ingolia T.D., Miller J.R., Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxycephalosporin C synthetase, *J. Bacteriol.*, 171(2), 754-760, (1989).

KOVACEVIC S., Tobin M.B., Miller J.R., The beta-lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 172, 3952-3958, (1990).

KOVACEVIC S., Miller J.R., Cloning and sequencing of the beta-lactam hydroxylase gene (*cefF*) from *Streptomyces clavuligerus*: gene duplication may have led to separate hydroxylase and expandase activities in the actinomycetes, *J. Bacteriol.*, 173 (1), 398-400 (1991).

KYUNG Y.S., Hu W.S., Sherman D.H., Analysis of temporal and spatial expression of the CcaR regulatory element in the cephamycin C biosynthetic pathway using green fluorescent protein, *Mol. Microbiol.*, 40, 530-541, (2001).

LAEMMLI U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, (1970).

LESKIW B.K., Aharonowitz Y., Mevarech M., Wolfe S., Vining L.C., Westlake D.W., Jensen S.E., Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*, *Gene*, 62(2), 187-196 (1988).

LI R., Townsend C.A., Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*, *Metab. Eng.*, 8 (3), 240-252, (2006).

LIAO G., Li J., Li L., Yang H., Tian Y., Tan H., Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochromogenes* lead to an improved nikkomycin production, *Microb. Cell Fact.*, 9, 6, (2010).

LIRAS P., Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes, *Anton. Van Leeuw.*, 75, 109-124, (1999).

LIRAS P., Martin J.F., Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Inter. Microbiol.*, 9, 9-19, (2006).

LIRAS P., Gomez-Escribano J.P., Santamarta I., Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 667-676, (2008).

LIVAK K.J., Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, 25:402-408, (2001).

LOPEZ-GARCIA M.T., Santamarta I., Liras P., Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus adpA*-deleted mutant, *Microbiology.*, 156, 2354-2365, (2010).

LUZHETSKII A.N., Ostash B.E., Fedorenko V.A., Intergeneric conjugation *Escherichia coli*-*Streptomyces globisporus* 1912 using integrative plasmid pSET152 and its derivatives, *Russ. J. Genet.*, 37(10), 1123-1129, (2001).

MADDURI K., Stuttard C., Vining L.C., Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. is primarily through cadaverine: beta-lactam producers also make alpha- amino adipate, *J. Bacteriol.*, 171(1), 299-302 (1989).

MADDURI K., Stuttard C., Vining L.C., Cloning and location of a gene governing lysine epsilonaminotransferase, an enzyme initiating beta-lactam biosynthesis in *Streptomyces* spp, *J. Bacteriol.*, 173(3), 985-988, (1991).

MALLA S., Niraula N.P., Liou K., Sohng J.K., Improvement in doxorubicin productivity by overexpression of regulatory genes in *Streptomyces peucetius*, *Res. Microbiol.*, 161, 109-117, (2010).

MALMBERG L.H., Hu W.S., Sherman D.H., Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine epsilonaminotransferase (*lat*) gene in cephamycin C biosynthesis, *J. Bacteriol.*, 175 (21), 6916-6924, (1993).

MANNHALTER C., Koizar D., Mitterbauer G., Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38, 171-177, (2000).

MARTIN J.F., Liras P., Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 13, 263-273, (2010).

MATAGNE A., Dubus A., Galleni M., Frere J.M., The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity, *Nature Prod. Rep.*, 16, 1-19, (1999).

MATSUSHIMA P., Cox K.L., Baltz R.H., Highly transformable mutants of *Streptomyces fradiae* defective in several restriction systems, *Mol. Gen. Genet.*, 206(3), 393-400, (1987).

MAZODIER P., Petter R., Thompson C., Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species, *J. Bacteriol.*, 171(6), 3583-3585 (1989).

MEDEMA M.H., Alam M.T., Heijne W.H.M., van den Berg M.A., Müller U., Trefzer A., Bovenberg R.A.L., Breitling R., Takano E., Genome-wide gene expression changes in an industrial clavulanic acid overproduction strain of *Streptomyces clavuligerus*, *Microb. Biotechnol.*, 4 (2), 300-305, (2011).

MEDEMA M.H., Trefzer A., Kovalchuk A., van den Berg M., Muller U., Heijne W., Wu L., Alam M.T., Ronning C.M., Nierman W.C., Bovenberg R.A.L., Breitling R., Takano E., The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways, *Genome Biol. Evol.*, 2, 212-224, (2010).

MEIJERINK J., Mandigers C., Locht L., Tönnissen E., Goodsaid F., Raemaekers J., A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative Real-Time PCR, *J. Mol. Diagn.*, 3(2), 55-61, (2001).

NARVA K.E., Feitelson J.S., Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A(3)2, *J. Bacteriol.*, 172: 326-333, (1990).

NAZARI B., Saito, A., Kobayashi M., Miyashita K., Wang Y., Fujii T., High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77: 623-635, (2011).

OEHLER S., Alex R., Barker A., Is nitrocellulose filter binding really a universal assay for protein DNA interactions? *Anal. Biochem.*, 268: 330-336, (1999).

OSTASH B., Rebets Y., Myronovskyy M., Tsypik O., Ostash I., Kulachkovskyy O., Datsyuk Y., Tatsunosuke Nakamura T., Walker S., Fedorenko V., Identification and characterization of the *Streptomyces globisporus* 1912 regulatory gene *IndYR* that affects sporulation and antibiotic production, *Microbiol.*, 157, 1240-1249, (2011).

ÖSTER L.M., Lester D.M., van Scheltinga A.T., Svenda M., van Lun M., Genereux C., Andersson I., Insights into cephamycin biosynthesis: the crystal structure of Cmcl from *Streptomyces clavuligerus*. *J. Mol. Biol.*, 28:358(2), 546-558, (2006).

PARADKAR A.S., Petrich A.K., Leskiw B.K., Aidoo K.A., Jensen S.E., Transcriptional analysis and heterologous expression of the gene encoding beta-lactamase inhibitor protein (BLIP) from *Streptomyces clavuligerus*, *Gene.*, 24, 144(1), 31-6, (1994).

PARADKAR A.S., Jensen S.E., Functional analysis of the gene encoding the clavaminic synthase 2 isoenzyme involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 177, 1307-1314, (1995).

PARADKAR A.S., Aidoo K.A., Wong A., Jensen S.E., Molecular analysis of a beta-lactam resistance gene encoded within the cephamycin gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 178(21), 6266-6274, (1996).

PARADKAR A.S., Aidoo K.A., Jensen S.E., A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Mol. Microbiol.*, 27, 831-843, (1998).

PARADKAR A.S., Mosher R.H., Anders C., Griffin A., Griffin J., Hughes C., Greaves P., Barton B., Jensen S.E., Applications of gene replacement technology to *Streptomyces clavuligerus* strain development for clavulanic acid production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2292-2297 (2001).

PARK S.H., Choi S.S., Sherman D.H., Kim E.S., A global positive regulator *afsR2* stimulates tautomycin production via pathway-specific regulatory gene over-expression in *Streptomyces* sp. CK4412, *Process Biochem.*, 44: 1298-1301, (2009).

PEREZ-LLARENA F.J., Martín J.F., Coque J.J., Fuente J.L., Galleni M., Frère J.M., Liras P., The *bla* gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A β -lactamase of low enzymatic activity, *J. Bacteriol.*, 179, 6035-6040, (1997a).

PEREZ-LLARENA F.J., Liras P., Rodríguez-García A., Martín J.F., A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds, *J. Bacteriol.*, 179, 2053- 2059, (1997b).

PEREZ-LLARENA F.J., Rodríguez-García A., Enguita F.J., Martín J.F., Liras P., The *pcd* gene encoding piperideine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of alpha-amino adipic acid is located in the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 180, 4753-4756, (1998).

PEREZ-REDONDO R., Rodríguez-García A., Martín J.F., Liras P., The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene, *Gene*, 211, 311-321, (1998).

PEREZ-REDONDO R., Santamarta I., Bovenberg R., Martín J.F., Liras P., The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene, *Microbiology*, 156 (5), 1527-1537, (2010).

PETRICH A.K., Wu X., Roy K.L., Jensen S.E., Transcriptional analysis of the isopenicillin N synthase-encoding gene of *Streptomyces clavuligerus*, *Gene*, 111(1), 77-84, (1992).

PETRICH A.K., Leskiw B.K., Paradkar A.S., Jensen S.E., Transcriptional mapping of the genes encoding the early enzymes of the cephamycin biosynthetic pathway of *Streptomyces clavuligerus*. *Gene*, 142, 41-48, (1994).

PFAFFL M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29:e45, (2001).

PFAFFL M.W., Hageleit M., Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR, *Biotechnol. Lett.*, 23, 275–282, (2001).

PFAFFL M.W., Horgan G.W., Dimplfle L., Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real Time PCR, *Nuieic Acids Res*, 30, (2002).

PFAFFL M.V., Quantification strategies in Real Time PCR, Bustin S. A., A-Z of quantitative PCR, International University Line (IUL), (2004), pp. 87-112.

PFAFFL M.V., Relative quantification in Real-time PCR. Published by International University Line (Editor: T. Dorak), (2005), p 63-82.

PLATTS A.E., Johnson G.D., Linnemann A.K., Kraetz S.A., Real Time PCR quantification using a variable reaction efficiency model, *Anal. Biochem.*, 380, 315-322 (2008).

POSPIECH A., Neumann B., A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria, *Trends Genet.*, 11, 217-218, (1995).

RALSTON A., Do transcription factors actually bind DNA? DNA footprinting and gel shift assays. *Nature Education* 1(1), (2008).

RINTALA H., Nevalainen A., Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR, *J. Environ. Monit.*, 8, 745-749, (2006).

RIUS N., Maeda K., Demain A.L., Induction of L-lysine epsilon-aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins, *FEMS Microbiol. Lett.*, 144 (2-3), 207-11, (1996).

ROMERO J., Liras P., Martín J.F., Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 318-325, (1984).

ROMERO J., Martín J.F., Liras P., Demain A.L., Rius N., Partial purification, characterization and nitrogen regulation of the lysine ϵ -aminotransferase of *Streptomyces clavuligerus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 241-246, (1997).

SAMBROOK J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. (1989) Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

SANTAMARTA I., Rodríguez-García A., Pérez-Redondo R., Martín J.F., Liras P., 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, 3106-3113, (2002).

SANTAMARTA I., Pérez-Redondo R., Lorenzana L.M., Martín J.F., Liras P., Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, *Mol. Microbiol.*, 56, 824-835, (2005).

SANTAMARTA I., López-García M.T., Pérez-Redondo R., Koekman B., Martín J.F., Liras P., Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE*ccaR*

sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production, *Mol. Microbiol.*, 66, 511-524, (2007).

SANTAMARTA I., López-García M.T., Kurt A., Nárdiz N., Álvarez-Álvarez R., Pérez-Redondo R., Martín J.F., Liras P., Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*, *Mol. Microbiol.*, 81 (4), 968-981, (2011).

SCHMITTGEN T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singer M.J., Reed M.W., Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods, *Anal. Biochem.*, 285(2), 194-204,(2000).

SCHREMPF H., Koebsch I., Walter S., Engelhardt H., Meschke H., Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence, *Microbial Biotechnol.*, 4(2), 286-299, (2011).

SCHWECKE T., Aharonowitz Y., Palissa H., von Döhren H., Kleinkauf H., von Liempt H., Enzymatic characterization of the multifunctional enzyme δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*, *Eur. J. Biochem.*, 205, 687-694, (1992).

SONG J.Y., Jeong H., Yu D.S., Fischbach M.A., Park H.S., Kim J.J., Seo J.S., Jensen S.E., Oh T.K., Lee K.J., Kim J.F., Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites, *J. Bacteriol.*, 192 (23), 6317-6318, (2010).

SOUAZE F., Ntodou-Thome A., Tran C.Y., Rostene W., Forgez P., Quantitative RT-PCR: limits and accuracy, *BioTechniques*, 21, 280-285 (1996).

STAPLEY E.O., Birnbaum J., Miller A., Wallick H., Hendlin D., Woodruff H., Cefoxitin and cephamycins: microbiological studies, *Ref. Infect. Dis.*, 1, 73-87, (1979).

STEINER S., Pfannschmidt T., Fluorescence based electrophoretic mobility shift assay in the analysis of DNA-binding proteins. *Plant Signal Transduction*, (2009), 18(479), Humana press, DOI:10.1007/978-1-59745-289-2_18.

STUTZMAN-ENGWALL K.J., Otten S.L., Hutchinson C.R., Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*, *J. Bacteriol.*, 174: 144-154, (1992).

SWIFT G.H., Peyton M.J., MacDonald R.J., Assessment of RNA quality by semiquantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques*. 28(3), 524-531, (2000).

TAHLAN K., Anders C., Jensen S.E., The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Bacteriol.*, 186, 6286-6297, (2004).

THAI W., Paradkar A.S., Jensen S.E., Construction and analysis of ss-lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, 147, 325-335 (2001).

THANBICHLER M., Shapiro L., Getting organized - how bacterial cells move proteins and DNA, *Nature Reviews Microbiol.*, 6, 28-40, (2008).

THYKER J., Nielsen J., Metabolic engineering of β -lactam production, *Metab. Eng.*, 5, 56-59, (2002).

TOBIN M.B., Kovacevic S., Madduri K., Hoskins J.A., Skatrud P.L., Vining L.C., Stuttard C., Miller J.R., Localization of the lysine epsilon- aminotransferase (*lat*) and delta-(L-alpha-aminoadipyl)- L-cysteinyl-D-valine synthetase (*pcbAB*) genes from *Streptomyces clavuligerus* and production of lysine epsilon-aminotransferase activity in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 173(19), 6223-6229, (1991).

TREPANIER N.K., Jensen S.E., Alexander D.C., Leskiw B.K., The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant, *Microbiology*, 148, 643-656, (2002).

USUI S., Yu C.A., Purification and properties of isopenicillin N epimerase from *Streptomyces clavuligerus*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 999, 78-85, (1989).

VALASEK M.A., Repa J.J., The power of real time PCR, *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151-159, (2005).

VOLFF J.N., Altenbuchner J., Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome, *Mol. Microbiol.*, 27, 239-46, (1998).

WALSH C., Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature* 406, 775-781 (2000).

WANG L., Tahlan K., Kaziuk T.L., Alexander D.C., Jensen S.E., Transcriptional and translational analysis of the *ccaR* gene from *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, 150 (12), 4137-4145, (2004).

WARD J.M., Hodgson J.E., The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 110, 239-242, (1993).

WATVE M.G., Shejval V., Sonawane C., Rahalkar M., Matapurkar M., Shouche Y., Patole M., Phadnis N., Champhekar A., Damle K., Karandikar S., Kshiragar V., Jog M., The 'K' selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity, *Curr. Sci.*, 78, 1535-1542, (2000).

WEI C.L., Yang Y.B., Wang W.C., Liu W.C., Hsu J.S., Tsai Y.C., Engineering *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for optimal ring expansion activity toward penicillin G, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (4), 2306-2312, (2003).

WEI C.L., Yang Y.B., Deng C.H., Liu W.C., Hsu J.S., Lin Y.C., Liaw S.H., Tsai Y.C., Directed evolution of *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for enhancement of penicillin G expansion, *Appl. Environ Microbiol.*, 71 (12), 8873-8880, (2005).

WILLIAMS J.A., Luke J., Langtry S., Anderson S., Hodgson C.P., Carnes A.E., Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes, *Biotechnol. Bioeng.*, 103 (6), 1129-1143, (2009).

WONG M.L., Medrano J.F., Real Time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques*, 39, 75-85, (2005).

WOODBURY C.P., Jr, von Hippel P.H., On the determination of deoxyribonucleic acid-protein interactions parameters using the nitrocellulose filter-binding assay, *Biochemistry*, 22, 4730-4737, (1983).

XIAO X., Hintermann G., Häusler A., Barker P.J., Foor F., Demain A.L., Piret J., Cloning of a *Streptomyces clavuligerus* DNA fragment encoding the cephalosporin 7 alpha-hydroxylase and its expression in *Streptomyces lividans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 84-88, (1993).

YU H., Serpe E., Romero J., Coque J.J., Maeda K., Oelgeschläger M., Hintermann G., Liras P., Martín J.F., Demain A.L., Piret J., Possible involvement of the lysine α -aminotransferase gene (*lat*) in the expression of the genes encoding ACV synthetase (*pcbAB*) and isopenicillin N synthase (*pcbC*) in *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, 140, 3367-3377, (1994).

YUAN J.S., Reed A., Chen F., Stewart Jr C.N., Statistical analysis of Real Time PCR data, *BMC Bioinformatics*, 7, (2006).

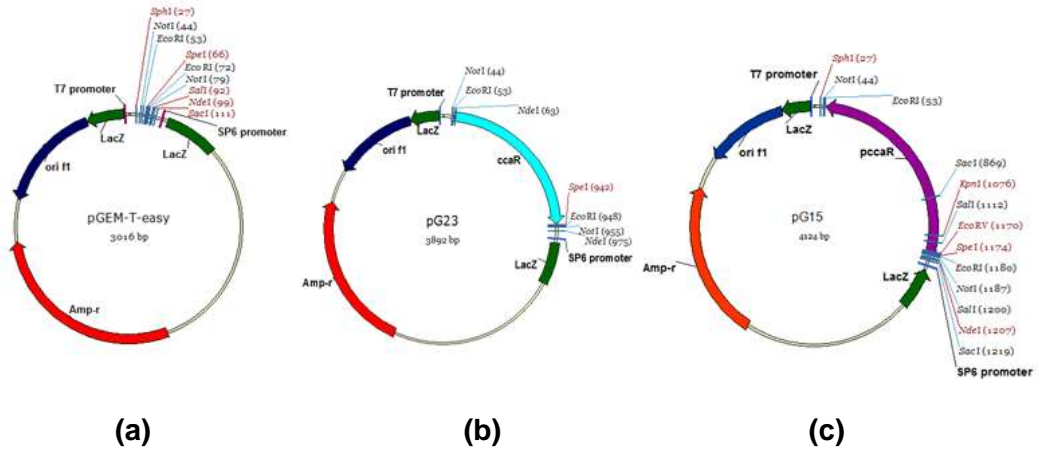
YUAN J.S., Wang D., Stewart Jr C.N., Statistical methods for efficiency adjusted Real Time PCR quantification, *Biotechnol. J.*, 3, 112-123, (2008).

ZERIKLY M., Challis G.L., Strategies for the discovery of new natural products by genome mining, *Chembiochem.*, 10, 625-633, (2009).

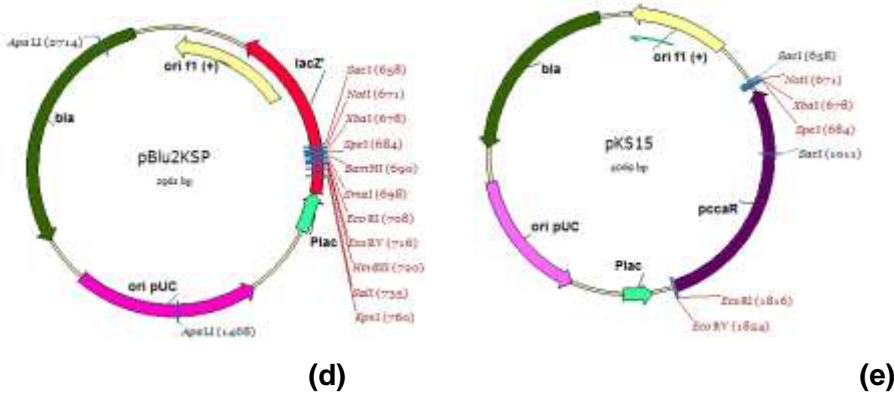
EK A

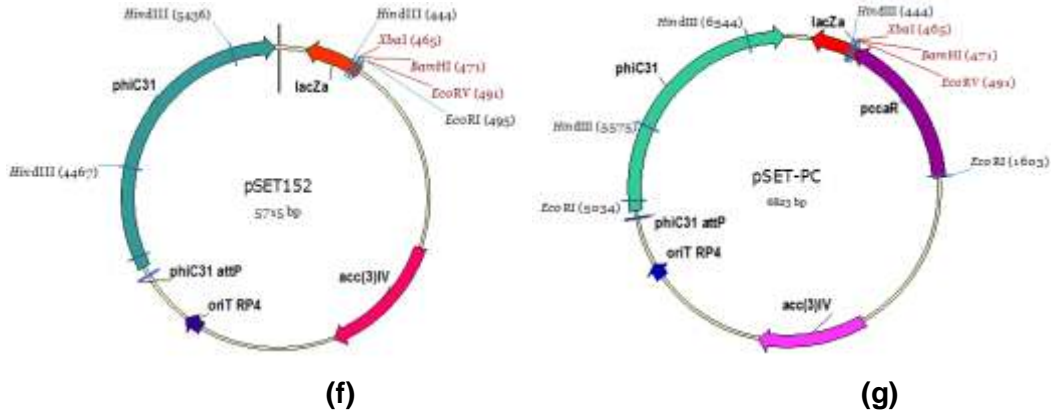
PLAZMİD VEKTÖRLERİN VE MARKÖRLERİN HARİTALARI

A.1. Plazmid vektörleri

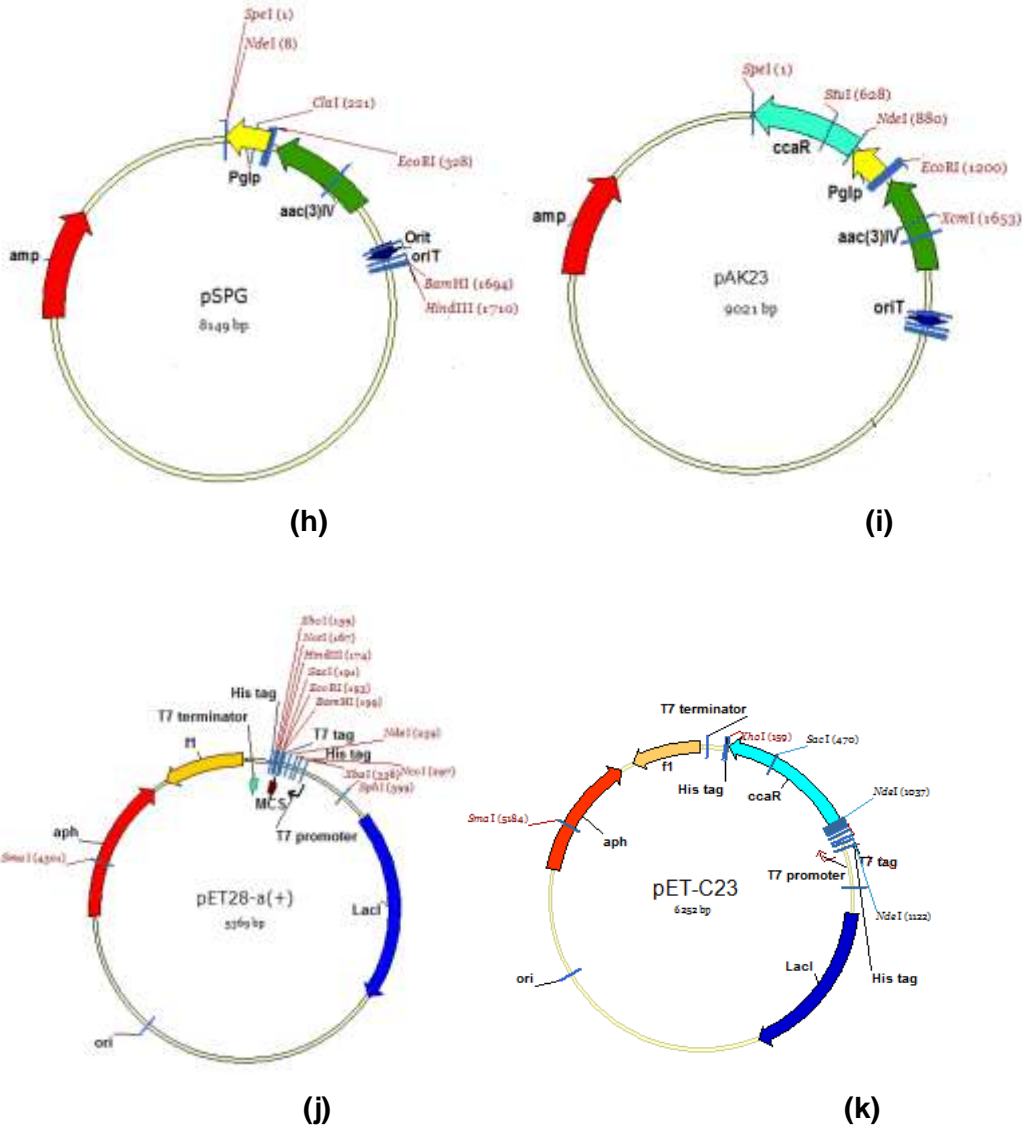


Şekil A.1. 1. Plazmid ve recombinant vektörlerin yapıları **(a)** pGEM-T easy: *E. coli* klonlama vektörü, **(b)** pG23: *ccaR'* yi taşıyan pGEM-Teasy vektörü, **(c)** pG15: *ccaR* genini kendi promotörü ile birlikte taşıyan (*pccaR*) pGEM-Teasy rekombinant vektörü.



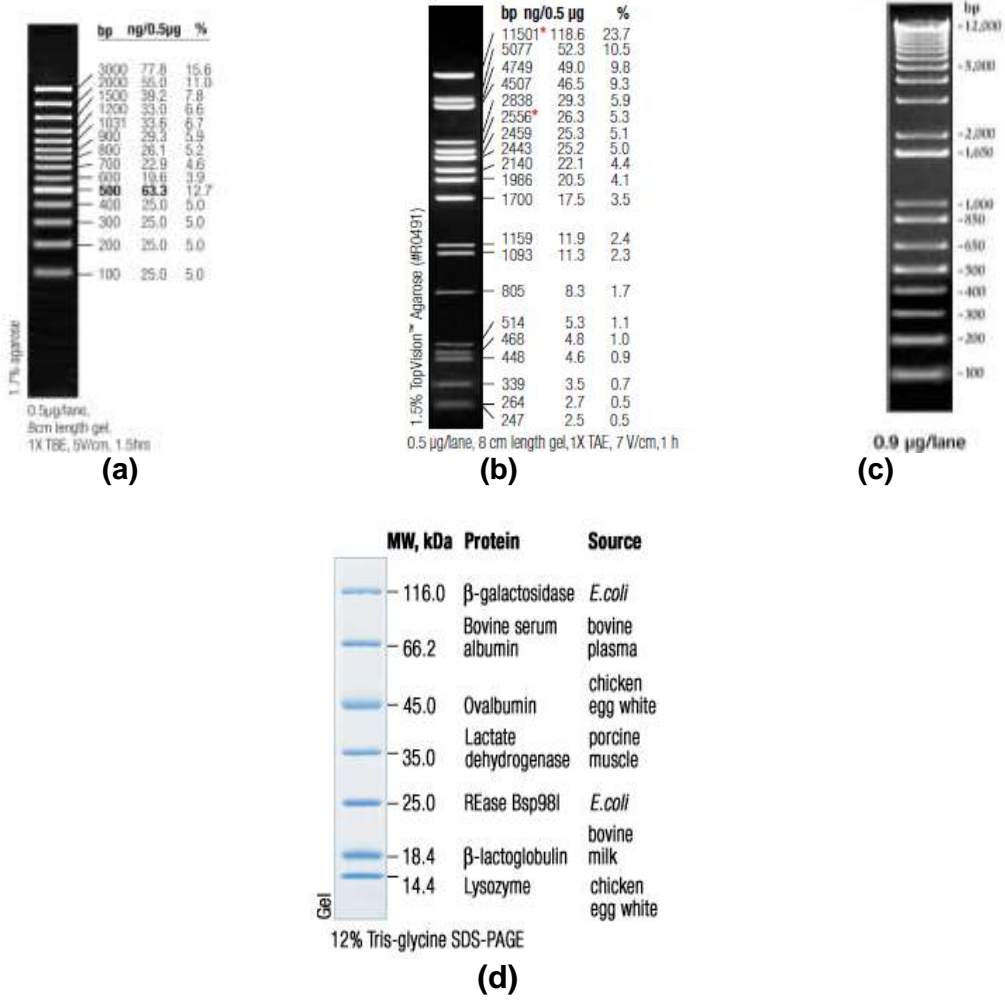


Şekil A.1. 2. Plazmid vektörlerin yapıları (d) pBlueskriptIIKS+: *E. coli* klonlama vektörü, (e) pKS15: *pccA* yi taşıyan rekombinant pGEM-T easy, (f) pSET152: *E. coli*/Streptomyces çift-fonksiyonlu entegrasyon vektörü, (g) pSET-PC: *pccA* taşıyan pSET152.



Şekil A.1. 3. Plazmid vektörlerin yapıları (h) pSPG: *Streptomyces* ekspresyon vektörü, (i) pAK23: *ccaR* taşıyan pSPG, (j) pET28a(+): *E. coli* His-Tag ekspresyon vektörü, (k) pET-C23: *ccaR* taşıyan pET28a.

A.2. Markörleri



Şekil A.2. 1. Bu çalışmada kullanılan markörleri. **(a)** GeneRuler 100 bp DNA ladder plus, **(b)** Lambda DNA/PstI markörü 24, **(c)** 1 kb plus DNA ladder, **(d)** Protein markörü.

EK B

CCAR GENİNİN NÜKLEOTİT DİZİSİ VE PRİMER LİSTELERİ

t tcccacagcc

ttcccacca cccgtcccga ctgcgcgatga agccccgggt tcttccgggt tcaccgaggc
tgtcccaaatt cgtccatgcc ttgaggggtcc cgctgcgtga tcgaaccgta acccttggaa
tttctgtgga ttaagcgtaa acatgggtgc cgacaccaag gattacgccg aagccatgtc
caccctctc ggcgagggcg tggttccttc acaaggggga ccgcc

ggagggagcatATGaa cacctggaat

gatgtgacga tccggctcct ggggcccgtg acactcgtga aaggttccgt accgataccc
atccgcgggc agcgacagcg gcgattcctc gctcattag cgctgcgacc gggccaggtc
atctccaagg aagcgatcat cgaagactcc tgggacgggg agccaccact gaccgtttcg
ggccagttgc agacgtcggc ctggatgatc cggaccgcgc tggcggaggc ggggctgccc
cgcgacgccc tcggctccca cgaccgcggc tacgaactgc gcgctcctgcc ggactccatc
gacctcttcg tcttccggga ggccgtgcgc gccgtgcggg acctgcacgc acgcggtcag
caccaggagg cgtccgaacg gctcgacacg gcgctcgcgc tgtggaaggg gcccgcttc
gcggatgtga cctccagtcg gctgcggctg cggggcgaga ccctggagga ggagcggacc
gccgcggctc agctgcgcgc cctgatcgat gtccgctcgc gctactacgg ggacgcgatc
acccggctgt cggagctcgt cgatcacgac ccgttccgtg aggacctgta tgtgagcctg
atgaaggcct actacgcgga gggccgccag gccgacgca tccaggtctt ccaccgcgcg
aaggacatcc tgcgggagca gatcggcatc agccccggcg agcggatgac aagggtcattg
caggccatcc tgcgtcagga cgagcaggtc ctgcgggtcg gtacccccgc **ctga**aaccgc
gcgcgatacg ggaatgtttg tcgacgtttc cctgaaccaa cgctgaagaa **acgttctctt**
tctcacaacg gcgggga

Şekil B. 1. *ccaR* kendi promotörü ile nükleotit dizisi (GeneBank erişim numarası: AF073897) ve primerlerin lokasyonu.

Tablo B. 1. *ccaR* geninin amplifikasyonu ve rekombinasyonunun doğrulanması için PCR' da kullanılan primerlere ait nükleotit dizileri

Primer ismi	Nükleotit dizisi	Tm	Amplicon büyüklüğü (bç)	Hedef bölgeye yapışma sıcaklığı
ccaR_F	5'_ggagggag catATG aacacctggaatgatgtg_3'	80.6	876	62
ccaR_R	5'_tccccgccgttgtagagaaga_3'	72.4		
pccaR_F	5'_ttcccacagcctcccacccacccgtcccgactcgc_3'	89.4	1108	63
ccaR_R	5'_tccccgccgttgtagagaaga_3'	68.4		
pSET_F_Alp	5'_tagtcctgtcgggttcgccac_3'	67.6	1602	57
ccaR_R	5'_tccccgccgttgtagagaaga_3'	68.4		
pSPG_R	5'_tgccttgctcggttgatcc_3'	65.6	1409	55
ccaR_R	5'_tccccgccgttgtagagaaga_3'	68.4		

Tablo B. 2. Sefamisin C gen kümesindeki genlerin parental suş ve manipüle suşlardaki ekspresyonlarının RT-PCR ve qRT-PCR analizler için tasarlanan primerler ve ilgili nükleotit dizileri

Gen ismi Erişim #	Primer ismi	Nükleotit dizisi	Tm	Büyükük (bp)	Konum
<i>cefE</i> M32324	CEFE-FORW CEFE_REV	5' ACCTCGCCCGTCCCCACCA 3' 5' GTCCAGATCCGCTCGAAGTCACCG 3'	65.3 67.8	161	393-414; 556-534
<i>cefF</i> AF073896	CEFF_FOR CEFF_REV	5' GGATGGCCCCGCACTACGACCTG 3' 5' CGCGCCGCACATCACGACG 3'	69.6 65.3	149	463-482; 638-617
<i>cmcH</i> AF073896	CMCH_FOR CMCH_REV	5' CGTGGGCGCGTTCTACCTCGTCG 3' 5' CCATCAGCTTGCCCGCGTCGTTT 3'	69.6 67.8	164	393-414; 556-534
<i>cmcJ</i> AF073896	CMCJ_FOR CMCJ_REV	5' CGTTCAGCCGGTTCAGAT 3' 5' CCATCAGCTTGCCCGCGTCGTTT 3'	61.4 62.1	176	463-482; 638-617
<i>ccaR</i> Z81324	CCAR_FQ2 CCAR_RQ2	5' CACCTGGAATGATGTGACGA 3' 5' GCTTCCTTGGAGATGACCTG 3'	60 62	144	6-25; 149-130
<i>pcbR</i> U877786	PCBR_FQ PCBR_RQ	5' GTGGGGCTCGGCTATTGGGGTTAC 3' 5' CCAGGCGCCGAGGAAGGTGT 3'	78 68	111	100-123; 210-191
<i>pbpA</i> AF001743	PBPA_FQ PBPA_RQ	5' GCGCTGCTGCTCGTCAT 3' 5' TGTCGCGCAGGGTGAGGA 3'	60 60	116	21-38; 137-120
<i>orf10</i> Z81324	ORF11_FQ ORF11_RQ	5' TGCCTGGTGGGGGTCTC 3' 5' CGCAGGGGCAGCCGTGAAT 3'	66 64	133	143-161; 275-257
<i>pcd</i> AF073895	PCD_FQ PCD_RQ	5' CAGCAATCAGTGGTACCGACGAGA 3' 5' CGCGCAGGCCGAACAGAT 3'	74 60	138	11-34; 148-131
<i>cmcT</i> AF073895	CMCT_FQ CMCT_RQ	5' GCGGGTCATGCTGCTGGTCT 3' 5' CGCTGTCGGGGTGATGG 3'	66 62	137	1035-1054; 1171-1154
<i>pcbC</i> U877786	PCBC_FQ PCBC_RQ	5' CGCGGCTCGGGCTTCTTCTAC 3' 5' GGATCGCCAGGTCGTGCTTCTC 3'	70 72	111	100-123; 210-191
<i>lat</i> M64834	LAT_QF LAT_QR	5' TCACCCAGAAGCGGTATCTC 3' 5' CGTACGGCACCGAATAAAGA 3'	62 60	159	161-180; 319-290
<i>cefD</i>	CEFD_QF CEFD_QR	5' GCTGTGGCAGGCGGGGAGAG 3' 5' GCAGTGACGACGCGACGAGGTTGA 3'	74 78	110	180-200; 289-266
<i>pcbAB</i> M64834	PCBAB_QF PCBAB_QR	5' CAGCCTCGGCATCTGGAAGG 3' 5' GTGGTGCCGGTTGGTGACGA 3'	66 66	124	987-1006; 1110-1090
<i>bla</i> Z54190	BLA_QF BLA_QR	5' CATCTGGAGCGGGCGGTCA 3' 5' CGGATGGCGGCGTCACAGA 3'	64 64	116	340-358; 455-437
<i>blp</i> Z81324	BLP_QF BLP_QR	5' CGCAGGGCCACTTCTTCAAC 3' 5' GCCTCCGTATGCCCGTCTG 3'	72 68	130	230-252; 359-340
<i>cmcI</i> AF0073896	CMCI_QF CMCI_QR	5' CTGTTCCGGGGTCTGGGTGAG 3' 5' GGAGAAAGTCCGAGTAGCCGAGGTC 3'	70 78	123	40-60; 123-100
<i>hrdB</i> M90411	HRDB_F HRDB_R	5' CGCGCATGCTTCTCT 3' 5' AGGTGGCGTACGTGGAGAAC 3'	57.6 61.4	109	1225-1241; 1343-1314

Tablo B. 3. Sefamisin C gen kümesindeki genlerin ko-transkripsiyonel profillerinin analizi için tasarlanan primerler

Gen ismi Erişim #	Primer ismi	Nükleotit dizisi	Tm	Amplikon büyüklüğü (bp)	Konum
cefF-cmcH AF073897	FH_F	5' CGTCGAGCGTCTTCTCTCTGCG 3'	74.2	421	788-809; 151-173
	FH_R	5' GGTTCCTGGGTGCCCTCGTATCC 3'	74.0		
cmcJ-cefF AF073897	JF_F	5' CTCAAGGACCGCGAGAACTACT 3'	65.7	516	604-625; 73-90
	JF_R	5' CATCCCGGTCACGCACTC 3'	68.1		
cmcT-pbpA AF073897 AJ001743	IJ_F	5' GGC GGTCGACCATCTCCTC 3'	69.5	446	513-531; 181-199
	IJ_R	5' CCATCTCGAAGCCCATCCC 3'	69.0		
cmcT-pbp2 AF073897 AJ001743	TPBPA_F	5' GCATCGCCAACGTC AACATC 3'	59.4	1491	1352-1371; 2842-2821
	TPBPA_R	5' GCATGGTCAGGGTGAGGAAGTA 3'	62.1		
cefD-cefE M32324	TPBP2_F	5' CTCGCCGTCGTTCTCACCTCAC 3'	67.8	823	1336-1358; 2158-2135
	TPBP2_R	5' GTCTCCGCCTCCTCAGCCTTTTCC 3'	67.8		
cefE-pcd AJ001743	CEFDE_FORW	5' GGGCCGCACGCTCCTCAC 3'	65.1	455	957-974; 1411-1389
	CEFDE_REV	5' ACTTCAGCTCGGTGTCGGTCAGA 3'	64.2		
pcd-cmcT AF073895	CEFEP_FORW	5' TCGGGGGCAACTACGTGAACATCC 3'	66.1	522	893-916; 1414-1394
	CEFEP_REV	5' CCAGCGGGTGCCAGGTCTCCA 3'	67.6		
ccaR-orf11 Z81324	PCDCTA_FOR	5' CCATCCGGCTGAACAACGA 3'	58.8	819	1247-1265; 2065-2048
	PCDCTA_REV	5' GCAGCGCCACGGTCATCA 3'	60.5		
cmcH-ccaR AF730897	CCARORF11F	5' CGGCGAGCGGATGACAAG 3'	71.3	1416	711-728; 2126-2108
	CCARORF11R	5' CAGGACAGTGC GGCGGTGA 3'	74.0		
pcbAB- pcbC lat-pcbAB M64834	CMCHCCAR_F	5' ACGGCGACGGGTTTCATCAA 3'	58.8	1064	1454-2472; 2517-2498
	CMCHCCAR_R	5' CAGGAGCCGGATCGTCACAT3'	61.4		
blp-lat M64834	PCBABC	5' GCTGTTCTCATCGACCCGTA 3'	68.4	559	317-297; 45-73
	PCBABC	5' CCGTGGTTCGTGGCGTAGA 3'	69.5		
orf11-blp AF730897	LATAB_F	5' GCGGGCGACAACCACCTCAG 3'	74.4	861	742-761; 56-76
	LATAB_R	5' GCAACGCTCGCTCGACTCC 3'	73.7		
ccaR-orf AF730897	BLPLAT_F	5' GCGGCTGGCCACCTACAACAAGAC 3'	74.9	672	315-338; 191-211
	BLPLAT_R	5' CGGCGCCGAGGCAAAGAAGG 3'	76.6		
CCA_O_F CCA_O_R	OBLP_F	5' TGCTGACGGCAACGGGAAATC3'	73.3	898	813-832; 424-447
	OBLP_R	5' CCGTCTGGGTCTTGTGTAGGTGG 3'	71.3		
		5' GCGGAGCGGATGACAAGGG 3'	70.5	673	
		5' CCGGACGGGCCAACAACTG 3'	69.2		

Tablo B. 4. EMSA deneylerinde kullanılan problemlerin amplifikasyonunda kullanılan primerlere ait nükleotit dizileri

Primer ismi	Nükleotit dizisi	Probe büyüklüğü (bp)	Tanım/ Erişim numarası
F1 R1	GAATAGCCGGTTCCTGAGC ATCATTCCAGGTGTTTCATGG	950	Intergenic region between <i>cmcH</i> and <i>ccaR</i> / AF730897
F2 R2	GGTAGGGAGGGGAGAGTCC TCGTACATCATTCCAGGTG	300	Upstream of <i>ccaR</i> gene/AF730897
F4 R4	GTGGTGAGAGCAGGTGACG ACGGCGGACGGGCGGACA	109	Upstream of <i>bla</i> gene/Z54190
F5 R5	GGCGATGACGAGCAGCAG GGCGTCTGAACCCAGGTG	1209	Upstream of <i>pbpA</i> gene/AJ001743/AF073895
F6 R6	GTCCTCGCAGCGGAACTC GCGTGGACTTCTCCAGTAG	496	Upstream of <i>cmcT</i> gene/ AJ001743/AF073895
F7 R7	CTGATTGCTGCTGTGACCAT CGCACCTCCAGTGTGTTCT	206	Upstream of <i>pcd</i> gene/ AJ001743
F8 R8	CCTGTCCCTCAGACACCTG TCTCGGCGAACTTCTACACC	243	Upstream of <i>cefE</i> gene/M32324
F9 R9	CGGTGTTGAGTTGACGAC TTGCCCTTCTTCTGAGTGT	859	Intergenic region between <i>cefD</i> and <i>cmcl</i> / AH006362/M32324
F10 R10	CACGGCCCCGAGGACGAC GAGGTAGAAGACCCCATCC	402	Upstream of <i>cefF</i> gene/ AH006362
F11 R11	GCACGTGAGCGTCTTCT GTCATGTCCCGGCTTGAAT	290	Upstream of <i>cmcH</i> gene/AF073897
F12 R12	GGATGACAAGGGTCATGCAG CAGGGCCCTTTGAGTACC	431	Upstream of <i>orf11</i> gene/Z81324/AF073897
F13 R13	ACCTGGGTGTGCTGGATCT CATGTGAAGGAACCCCTTGT	387	Upstream of <i>blp</i> gene/ Z81324/AF073897
F14 R14	CTGAGCAACAGCTCGTCA CCCATGGGTGAGAACTCCT	212	Upstream of <i>lat</i> gene/M64834
F15 R15	TCATGTACACGGAGCACCAG GACATCATTGTTGGGCTCTC	309	Upstream of <i>pcbAB</i> gene/ M64834/U12015
F17 R17	GCCATAGTTGTCGGAATGC CTACTCCAATCGGGTGAAC	228	Upstream of <i>pcbC</i> gene/Petrich <i>et al.</i> , 1992
F18 R18	GCTGTTCCATCGACCCGTA CCGTGGTTCGTGGCGTAGA	559	Upstream of <i>pcbR</i> gene/U87786

EK C

KÜLTÜR BESİYERLERİNİN İÇERİĞİ VE HAZIRLANIŞI

C.1. Sıvı Besiyerleri

Luria Broth (LB)	<u>g/l</u>
Luria Broth	25
121 °C' de ve 15 dak. otoklavlanır.	

Triptikaz Soya Broth (TSB)	<u>g/l</u>
Triptikaz Soya Broth	30
121 °C' de ve 15 dak. otoklavlanır.	

Nişasta-Asparajin (SA) Besiyeri (Aharonowitz ve Demain, 1979)

600 ml dH₂O kaynatılır ve aşağıda yazılı olan malzemeler karıştırıcıda karıştırılan suya eklenir:

	<u>g/l</u>
Nişasta	10
MOPS	21
K ₂ HPO ₄	4.4

Besiyeri içeriği tamamen çözüldükten sonra çözelti oda sıcaklığı derecesine kadar soğutulur ve pH' sı 6.8' e getirildikten sonra distile su ile 800 ml' ye tamamlanır. 121 °C' de ve 15 dak. otoklavlanır. Sterilizasyon sonrası aşağıdaki içerikleri besiyerine eklenir:

	<u>ml/l</u>
L-Asparajin (10 g/l)	200
MgSO ₄ . 7 H ₂ O (0.6 g/ml)	2
İz element çözeltisi*	1

*İz element çözeltisi	<u>g/l</u>
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
CaCl ₂ .3H ₂ O	1.3

C.2. Katı besiyeri

LB Agar	<u>g/l</u>
Luria Broth	25
Agar	15
121 °C' de ve 15 dak. otoklavlanır.	

TSA

Tryptik Soya Broth

Agar

121 °C' de ve 15 dak. otoklavlanır.

g/l

30

20

Mannitol Soya unu (MS) Agarı (Hobbs *ve ark.*, 1989)

Soya unu

Agar

Mannitol

ve 15 dak. olmak üzere iki kez otoklavlanır.

g/l

20

20

20

121 °C' de

EK D

TAMPON VE ÇÖZELTİLER

D.1. 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)	1mM

STE tamponu

Sucrose	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 le doyurulmuş) (Hintermann, 1981)

Fenol	500 g
Kloroform	500 ml
Distile su	400 ml

Çözelti oda sıcaklığında saklanır ve ışıktan korunur

D.2. Agaroz Jel Elektroforezi

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

Tris Bazı	242 g
Glasiyal Asetik asit	57.1 ml
EDTA (0.4 M, pH 8.0)	125 ml

Distile su ile hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

Yükleme tamponu (6X)

Bromofenol mavisi	0.25 %
Zaylan siyanol FF	0.25 %
Sukroz çözeltisi (su içinde)	40 %

Etidyum Bromür Çözeltisi

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

D.3. Rekombinant kolonilerin seçilmesi**X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)**

X-Gal	20 mg
Dimetilformamit	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.

D.4. 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.

D.5. Bakterilerin üremesinin DNA kuantifikasyonu ile belirlenmesi**Difenilamin Ayracı**

Difenilamin	1.5 g
Glasiyal asetik asit	100 ml

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile sarılır.

Kullanmadan önce üzerine aşağıdaki maddeler ilave edilir:

Konsantre H ₂ SO ₄	1.5 ml/100ml
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 HClO₄

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

D.6. Bioassay/HPLC Analizi

1 M MOPS

MOPS	g/l 20.9 g
dH ₂ O	1000 ml

NaOH ile çözeltinin pH' sı 6.8 değerine ayarlanır, filtre edildikten sonra ışıktan korunarak muhafaza edilir.

Sodyum asetat çözeltisi

Sodyum asetat	g/l 4.1
---------------	-------------------

Asetik asit ile çözeltinin pH' sı 6.0 değerine getirilir ve filtre edilir.

Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	g/l 15
--	------------------

% 50' lik fosforik asit ile çözeltinin pH' sı 4.0 değerine getirilir ve filtre edilir.

Mobil faz

Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (pH 4.0)	95 %
Metanol (HPLC dereceli)	5 %

D.7. Protein Pürifikasyonu

LEW Tamponu

Üre	8 M
NaH ₂ PO ₄	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
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
pH 8.0	

D.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Bradford Ayracı (Belirteci) (5X)

Coomassie Brillant mavisi G250 100 mg

50 ml % 95' lik etanolde (95 %) 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 kulnallarak süzülür ve etrafı aliminyum folyo ile sarılarak 4 °C' de saklanır.

Tris HCl (1.5 M)

Tris baz 54.45 g

dH₂O 150 ml

HCl ile 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 baz 6 g

dH₂O 60 ml

HCl ile 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-bis Akrilamid 4 g

dH₂O 500 ml

Süzülür ve 4 °C' de saklanır. Işıktan korunur.

Coomassie R-250 Boyama

Coomassie mavisi R-250 0.25 g

Metanol 125 ml

Glasiyal Asetik asit 25 ml

dH₂O 100 ml

Kolloidal Coomassie G-250 Boyama (CCB Boyama Çözeltisi)

Amonyum sülfat 100 g

% 85 ortofosforik asit 12 ml

CBB stok çözeltisi 20 ml

dH ₂ O	1000 ml
CBB stok çözeltisi	
Kolloidal Coomassie G-250	6 g
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
Running (Koşma) Tamponu (5X) (SDS-PAGE için)	
Tris baz	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-merkaptolanol	0.4 ml
Bromofenol blue (0.5%, w/v)	0.4 ml

D.9. EMSA

Bağlanma Tamponu

HEPES	80 mM
KCl	200 mM
MgCl ₂	20 mM
MnCl ₂	0.5 mM
Gliserol	40 %
Tris-HCl (pH 7.5)	16 mM
1 µg poly[dl-dC] ya da Salmon Sperm DNA (1µg/µl)	

Yükleme Tamponu

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

Tris-Borat Tamponu (TBE) (1 X) (Native PAGE için) (Sambrook ve ark., 1989)

Tris Baz	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.

D.10. PROTEOM

Rehidrasyon tamponu

Üre	8 M
Thioüre	0.5 M
Amfolit	% 0.5
DTT	28 mM
CHAPS	2% m/v
Bromofenol mavisi (% 0.05)	80 µl

dH₂O ile hacim 10 ml' ye tamamlanır.

Dengeleme tamponu 1

Tris-Cl	50 mM, pH 6.8
Üre	6 M
Gliserol	% 30
SDS	% 1
DTT	0.15 g/ 10 ml

Dengeleme tamponu 2

Tris-Cl	50 mM, pH 6.8
Üre	6 M
Gliserol	% 30
SDS	% 1
İodoasetik asit	0.25 g/10 ml
Bromofenol mavisi	3.5 µM

D.11. ANTİBİYOTİK STOKLARININ HAZIRLANIŞI

	<u>Stok Konsantrasyonu</u>	<u>Final Konsantrasyonu</u>
Ampisilin	100 mg/ ml dH ₂ O	100 µg/ml
Kanamisin	50 mg/ml dH ₂ O	25 ya da 50 µg/ml
Kloramfenikol	25 mg/ml ethanol	25 µg/ml
Penisilin G	10 mg/ml dH ₂ O	10 µg/ml
Apramisin	50 mg/ml dH ₂ O	50 µg/ml

EK E

KİMYASALLAR VE KAYNAKLARI

E.1. Kimyasallar

Asetaldehid	Sigma
Akrilamid	Sigma
Agar	Merck
Agaroz	Prona
Amfolit	BioRad
Ammonyum persulfat	AppliChem
Ampisilin	Sigma
Apramisin	Sigma
Borik asit	Merck
Bovine serum albumini	Sigma
Bromofenol mavisi	Sigma
β -merkaptotanol	Sigma
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Sefalosporin C	Sigma
Kloroform	AppliChem
Kloramfenikol	Sigma
Coomassie Brillant Mavisi G-250	Merck
Coomassie Brillant Mavisi R-250	Sigma
DEPC	AppliChem
Dimetilformamid	Merck
Difenylamin	Sigma
DMSO	Sigma
Ditiotreitol (DTT)	Merck
EDTA	Sigma
Etanol	Botafarma
Ethidyum bromür	Sigma
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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
İodoasetik asit	Merck
İPTG	Sigma
İzoamilalkol	AppliChem
İzopropanol	Merck
K-acetate	Merck
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Meck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-Asparajin	Sigma
Luria Broth	Sigma
Mannitol	Merck
Metanol (HPLC dereceli)	Sigma
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck
MOPS	Sigma
Na-asetat	Merck
NaCl	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Merck
Nalidiksik asit	Sigma
NaOH	Merck
NN' Metilen Bisakarilamid	Sigma
Orto-fosforik asit	Merck
Penisilin G	Sigma
Fenol	Amresco
Fenol (su ile doyurulmuş)	AppliChem
Fenol-kloroform	Amresco
Poly[d(I-c)]	Roche
Random primerleri	Invitrogen
RuCl ₂	Merck
Salmon Sperm DNA' sı	Sigma
SDS	Merck
Soya unu	Ticari
Nişasta	Merck
Sukroz	Merck
TEMED	AppliChem
Tris-HCl	Merck
Tryptik Soya Broth	Oxoid
Üre	Sigma
X-Gal	Fermentas
Zylen siyanol FF	Sigma
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck

E.2. Enzimler

Lizozim	Sigma
Proteinaz K	Sigma
T4 DNA Ligaz	Promega
<i>EcoRI</i>	Roche
<i>HindIII</i>	Roche
<i>XbaI</i>	Roche
<i>NotI</i>	Roche
<i>SacI</i>	Roche
<i>NdeI</i>	Fermentas
<i>SpeI</i>	Fermentas
Go Taq DNA polimeraz	Promega
Taq polimeraz	Fermentas
Phusion DNA polimeraz	NEB
T4 ligaz	Fermentas
pGEM-Teasy vektörünün T4 ligazı	Promega

E.3. Markörler

<i>PstI</i> ile kesilmiş /Lambda DNA ladder	Fermentas
O'GeneRuler 100 bp DNA ladder	Fermentas
1 kb DNA plus ladder	Invitrogen
Lambda DNA/ <i>EcoRI-HindIII</i>	Fermentas

E.4. Kitletler

Plazmid izolasyon Kiti (Midi)	Qiagen
Plazmid izolasyon Kiti (Mini)	Fermentas
Gel Elüsyon Kiti	GeneMark
RNeasy mini izolasyon kiti	Qiagen
RNA protect çözeltisi	Qiagen
RNAase Free DNAase seti	Qiagen
DNA-free™ kiti	Ambion
Phase lock gel heavy tüpleri	5-Prime
Superscript™ One-Step RT-PCR kiti	Invitrogen
SuperScript™ III Reverse Transcriptase kiti	Invitrogen
SYBR Green I Ex-Taq Mix	Takara
SYBR Green I Nükleik asit jel boyası	Invitrogen
LightCycler® kapillerleri	Roche
Protino® Ni-TED 2000 kolonları	Macherey-Nagel
İPG jel strip	BioRad

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109T962
Proje Başlığı: <i>STREPTOMYCES CLAVULIGERUS</i> 'TA <i>CCAR</i> REGÜLATOR GENİNİN SEFAMİSİN C BİYOSENTEZİNE OLAN ETKİSİNİN TRANSKRİPSİYONEL VE PROTEOM ÖLÇEKLİ ANALİZİ
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ Bursiyer: Arş. Gör. Dr. Aslıhan KURT Kısmi Bursiyerler: Aycan APAK, Mustafa DEMİR
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü, Çankaya 06800, ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TBAG, Atatürk Bulvarı No:221 Kavaklıdere 06100 ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.03.2010-15.03.2012
Öz (en çok 70 kelime) <p><i>S. clavuligerus</i> hücrelerinde pozitif regülatör gen <i>ccaR</i>' nin yokluğunda ve bu genin çoklu ifadesi durumunda parental suşa kıyasla sefamisin C biyosentetik gen kümesinin zamana bağlı ekspresyon profili RT-PCR ve qRT-PCR ile analiz edilmiş, protein profillerindeki değişim ise karşılaştırmalı proteom çalışmaları ile belirlenmiştir. Biyoassay ve HPLC analizleri ışığında, <i>ccaR</i> geninin hücrede çoklu ifadesi her iki sekonder metabolitin üretiminde önemli bir artış sağlayarak biyoteknolojik açıdan etkin bir üretici suş geliştirilmesini sağlamıştır (sefamisin C ve klavulanik asit üretimlerinde sırasıyla 3.1 ve 3.59 katlık artış). Bu çalışmanın sonuçları, CcaR aktivatörünün sefamisin C kümesindeki genlerin ekspresyonları üzerindeki zaman bağlı etkisini ortaya koyan ilk raporu oluşturmaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler: <i>Streptomyces clavuligerus</i> , sefamisin C gen kümesi, <i>ccaR</i> geni, regülasyon, qRT-PCR, EMSA, karşılaştırmalı proteom
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> X Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: MAKALE

Kurt A., Özcengiz G. Transcriptional regulation of cephamycin C gene cluster of *Streptomyces clavuligerus* as affected by pathway-specific CcaR activator (Hazırlık aşamasında).

TEBLİĞ

Poster Sunumu

Kurt A, Liras P, Özcengiz G. (2011) Monitoring the regulatory effect of *ccaR* gene on the cephamycin C gene cluster by qPCR analyses. Presented in "4th FEMS Congress of European Microbiologists" (Haziran 26-30, 2011, Cenevre, İsviçre). CD' de kayıtlı.