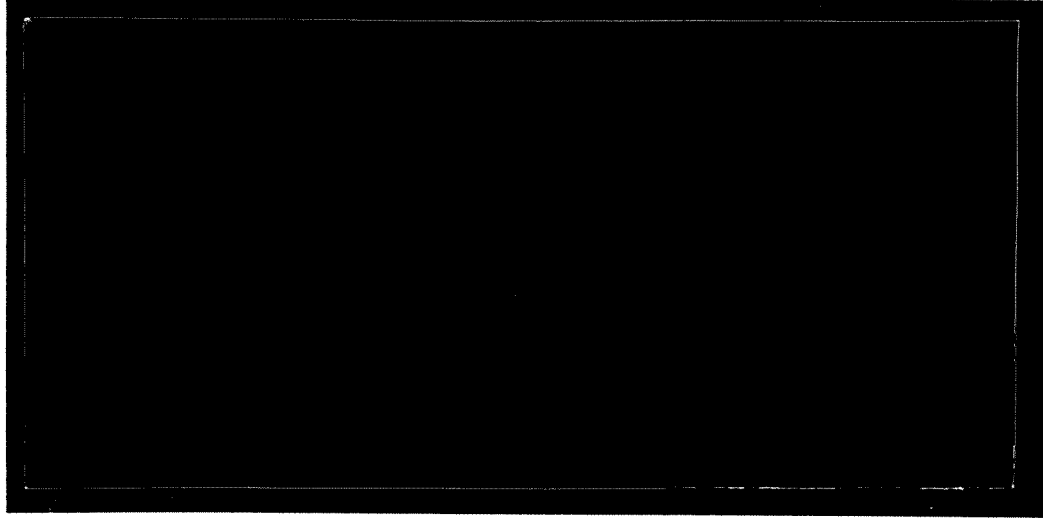


2003-12



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

**HÜCRE YOĞUNLUĞU SİNYALİ VE BACİLYSİN
BİYOSENTEZİ ARASINDAKİ BAĞLANTININ
MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI**

PROJE NO : TBAG-1975 (100T098)

**Prof.Dr. GÜLAY ÖZCENGİZ
Araş.Gör. AYTEN (YAZGAN) KARATAŞ
Araş.Gör. SEÇİL ÇETİN**

**ŞUBAT 2002
ANKARA**

ÖNSÖZ

Bu rapor, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TBAG-1975 sayılı projenin yürütülmesi sürecinde elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Çalışmamızda kaset mutajenezi yöntemiyle *Bacillus subtilis*'de hem hücre yoğunluğu sinyali algılama yolu kontrolünde, hem de bacilysin biyosentezinde rolü olan genler belirlenip birbirleriyle ilişkili fonksiyonları tartışılmıştır.

Raporda verilen araştırmalar, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmüş olup ağırlıklı olarak Ar. Gör. Seçil Çetin'in Y. Lisans tez çalışmasını oluşturmaktadır. Bu çalışmaların bulguları, Dr. Ayten Yazgan Karataş'ın yine TÜBİTAK-TBAG tarafından desteklenen (TBAG-1645) doktora tez projesinin devamı niteliğinde olup *Biochemica et Biophysica Acta-Gene Structure and Regulation*'da yayınlanmak üzere olan bir makalemizi oluşturmuştur.

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

Seçil Çetin için sağlanan proje asistanlığı için de O.D.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'ne de içten teşekkürlerimizi iletiriz.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	ii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	v
ÖZ.....	vi
ABSTRACT.....	viii
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II GELİŞME.....	10
II.1. Materyal ve Metod.....	10
II.1.1. Kullanılan Suşlar.....	10
II.1.2. Kimyasallar.....	10
II.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	10
II.1.4. Agaroz Jel Elektroforez Uygulaması.....	11
II.1.5. Kompetent PY79 Hücrelerinin Hazırlanması ve Kromozomal DNA ile Transforme Edilmeleri.....	11
II.1.6. Bacilysin Biyoassayı.....	12
II.2. Bulgular.....	12
II.2.1. <i>phrC</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	13
II.2.2. <i>phrA</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	14
II.2.3. <i>comA</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	15
II.2.4. <i>comQ</i> Geninin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	16
II.2.5. <i>comP</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	17
II.2.6. <i>srfA</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	18
II.2.7. <i>abrB</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	18
II.2.8. <i>spo0A</i> Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	19

II.2.9. <i>spo0H</i> Gen Bölgesinin Bacilyisin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	20
II.2.10. <i>comS</i> Gen Bölgesinin Bacilyisin Üretimi Üzerine Olan Etkisi.....	2
BÖLÜM III SONUÇ.....	23
III.1. Tartışma.....	23
III.2. Öneriler.....	26
KAYNAKLAR.....	27
EK-1 Besi Ortamlarının Kompozisyonu.....	30
EK-2 Kullanılan Solüsyonların Kompozisyonu.....	34
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ.....	35

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa

Şekil I.1. A. Bacilyisin yapısı. B. <i>B.subtilis</i> 'de aromatik amino biyosentezi ve antikapsin oluşumu.....	2
Şekil I.2. <i>B. subtilis</i> 'de hücre dışı sinyal peptidler aracılığı ile gerçekleşen regülasyon modelleri. (A) CSF ve ComX tarafından yüksek hücre yoğunluğunun algılanması ve buna göre kompetans gelişiminin başlatılması. (B) Hücre dışı peptidler, CSF ve PhrA tarafından gerçekleştirilen sporlanma regülasyonu.....	7
Şekil II.2.1. Bloke mutantların kromozomal DNAlarının agaroz jel fotoğrafları.....	13
Şekil II.2.2. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>phrC</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	14
Şekil II.2.3. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>phrA</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	14
Şekil II.2.4. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>comA</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	15
Şekil II.2.5. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>comQ</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	16
Şekil II.2.6. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>comP</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	17
Şekil II.2.7. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>srfa</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	18
Şekil II.2.8. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>abrB</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	19
Şekil II.2.9. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>spo0A</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	20
Şekil II.2.10. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>spo0H</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	21
Şekil II.2.11. <i>B. subtilis</i> PY79 <i>comS</i> bloke-mutantlarının bioassay sonuçları.....	22

ÖZ

Bacillus subtilis'te kompetans gelişimi, lipopeptid antibiyotik sürfaktin biyosentezi ve sporulasyonun indüklenmesi “quorum-sensing” (hücre yoğunluğunun algılanması) global regülasyon mekanizması ile kontrol edilmektedir. *B. subtilis*'in belirli suşları tarafından sentezlenen ve bir dipeptid antibiyotik olan bacilysin biyosentezinin de yine aynı mekanizmanın kontrolü altında olabileceği kısa süre önce laboratuvarımız tarafından rapor edilmişti. *B. subtilis*'te iki hücre dışı sinyal peptidi, ComX feromonu ve CSF (Kompetans ve Sporulasyon Faktörü) ComA transkripsiyon faktörünü kontrol ederek kompetans gelişimi ve sürfaktin biyosentezini sağlamaktadır. Önceki çalışmamızda *opp* operonunun bloke edildiği mutantlar oluşturulmuş ve dipeptid antibiyotik basilisin biyosentezinin Spo0K (Opp) kontrolü altında gerçekleştiği gösterilmişti. Şimdiki çalışma, bahsedilen regülasyon mekanizmasında var olan diğer genetik belirleyicilerin basilisin biyosenteziyle olan muhtemel ilişkilerini aydınlatmayı amaçlamıştır. Bu amaç çerçevesinde, öncelikli olarak *srfa* operonu ve *comp*, *comA*, *phrC*(CSF), *phrA*, *comQ*, *abrB*, *spo0A*, *spo0H*, *comS* ve *srfB* genlerinin insersiyonel inaktivasyonları (kaset mutajenezleri) yapılmış, bunun için basilisin üreticisi suş *B. subtilis* PY79 ilgili genlerin bloke mutantlarının kromozomal DNA'larıyla transforme edilmiştir. Daha sonra seçilen transformantlarda basilisin üretimindeki değişiklikler “kağıt diski-agar difüzyon” metodu ile incelenmiştir. PhrC(CSF), ComQ-ComX ve ComA-Comp'nin bacilysin biyosentezi için gerekli olduğu bulunmuştur. *srfa* operonunun inaktivasyonu basilisin üretme kabiliyetinin yok olmasına neden olmuş, bu da sürfaktin operonunun basilisin biyosentezinde doğrudan fonksiyonu olduğunu kanıtlamıştır. *abrB* geninin *spo0A* mutantlarında bloke edilmesi *spo0A* mutasyonunun neden olduğu basilisin-negatif fenotipi suprese etmiş,

aynı genin basilisin üreticisi suş PY79'da bloke edilmesi ise basilisin üretimini yaklaşık iki kat arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: *B. subtilis*, basilisin, hücre yoğunluğu algılama sinyali, sporulasyon, kompetans.

ABSTRACT

In *Bacillus subtilis*, competence development, lipopeptide antibiotic surfactin biosynthesis and sporulation initiation are controlled by “quorum-sensing” (cell density signaling) global regulation mechanism. Biosynthesis of dipeptide antibiotic bacilysin produced by certain strains of *B. subtilis* was recently reported by our laboratory to be under the control of the same mechanism. In *B. subtilis*, two extracellular signaling peptides, ComX pheromone and CSF (Competence and Sporulation Factor) stimulate the development of genetic competence and surfactin biosynthesis in response to high cell density (quorum-sensing) by regulating the activity of transcription factor ComA. In our previous study, we have shown that biosynthesis of dipeptide antibiotic bacilysin is linked to Spo0K (Opp)-dependent manner by constructing *oppA*-disrupted mutants of *B. subtilis*. The objective of the present research is to elucidate the possible relationships between the other genetic determinants involved in this control system and bacilysin biosynthesis. In view of this objective, insertional inactivations via cassette mutagenesis of certain genetic components of quorum-sensing global regulation, namely *srfA* operon, *phrC* (CSF), *phrA*, *comA-comP*, *comQ*, *abrB*, *spo0A*, *spo0H*, *comS* and *srfB* genes were made by transforming bacilysin producer strain *B. subtilis* PY79 with chromosomal DNAs from the blocked mutants of corresponding genes. After blocking these genes, paper-disc agar diffusion assay was performed to determine as to whether bacilysin production is affected. PhrC (CSF), ComQ, ComX and ComA and ComP were found to be essential for bacilysin biosynthesis. On the other hand, the disruption of *srfA* operon in the bacilysin producer resulted in a bacilysin-negative phenotype, thus our study verified that *srfA* operon functions directly in the production of bacilysin. The disruption of *abrB* gene in *spo0A*-deleted mutants suppressed the

bacilysin-negative phenotype whereas the disruption of the same gene in the wild type strain resulted in about a two-fold increase in the production of bacilysin.

Keywords: *Bacillus subtilis*, bacilysin, quorum sensing, sporulation, competence

BÖLÜM I

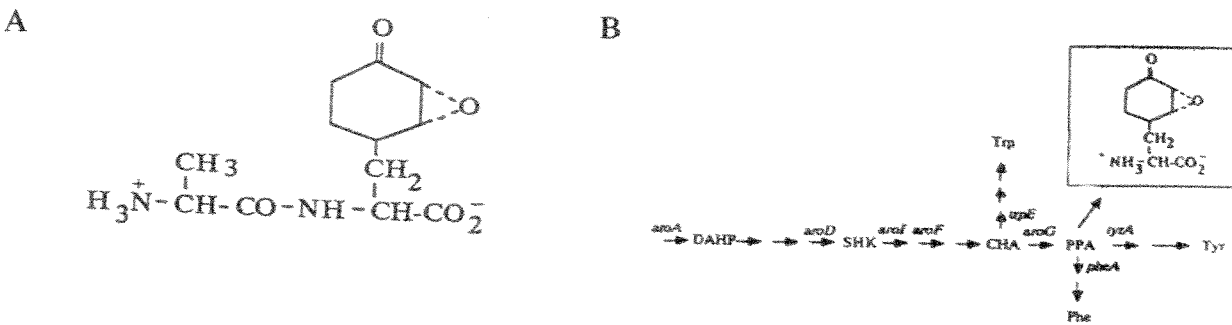
GİRİŞ

Mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerden peptid yapısında olanları, çok önemli bir kimyasal yapı ve biyolojik aktivite çeşitliliği gösterirler. Bu tip metabolitler; antibiyotikleri, enzim inhibitörlerini, bitki ve hayvan toksinlerini, antitümör ajanları, immün sistemi baskılayıcı ajanları ve hormon işlevi gören bileşikleri içermekte olup tıp, ziraat ve biyolojik araştırma alanlarında çok geniş bir kullanıma sahiptirler. (Katz ve Demain, 1977; Demain, 1980; Nakano ve Zuber, 1990; Boman, 1995; Pichard ve ark., 1995; Boman, 1996; Gill ve ark., 1996). Lineer, halkasal ve dallanmış halkasal peptidler, peptidolaktonlar, depsi-peptidler vb. gruplara ayrılan bu peptidlerden bugüne dek yaklaşık 500 farklı yapı tanımlanmış olup kaynak organizmalar olarak sadece *Bacillus* türleri, *Actinomycetes* grubuna giren bazı bakteriler ve β -laktamları üreten funguslar gösterilmiştir. Genler tarafından kodlanan peptid öncülerinden ribozomlar üzerinde sentezlenen birkaç “çoklu halkasal antibiyotik” dışında, tüm peptidler ribozomal olmayan bir mekanizma ile, protein kalıpları üzerinde sentezlenir (Kleinkauf ve vonDohren, 1990; Marahiel, 1992; Stein ve Vatez, 1996; Kleinkauf ve vonDohren, 1996). Protein tiyokalıp mekanizması olarak adlandırılan bu enzimatik sentezde, birden çok fonksiyonu olan enzimler üzerindeki belirli amino asit dizileri metabolitin önceden bilinen peptid dizileri için kalıp işlevi görürler. Enzim (sentetaz); spesifik amino asit aktivasyonu (adenilasyon + tiyoester formasyonu), modifikasyon ve peptid bağı oluşumundan sorumludur. Bu düzenleme, uygun sayıda ve nitelikte aktivasyon birimlerini doğru bir dizilimle içeren bir sentetazın bu dizilimin tarif ettiği peptidi sentezleyebileceğini göstermektedir ki, bu da her türlü peptidin spesifik bir sentetaz aracılığı ile yapımının pratik olarak mümkün olduğuna işaret eder.

Bacillus subtilis 168 tarafından üretilen ve nonribozomal olarak sentezlenen dipeptid antibiyotik bacilyisin (Şekil I.1.A), bilinen en basit yapıya sahip peptid antibiyotik olup N-terminal

L-alanin ve C-terminal epoksi amino asit antikapsinden ibarettir (Rogers ve ark., 1965a; 1965b; Walker ve Abraham, 1970). Modifiye bir amino asit olan antikapsin biyosentezinin aromatik amino asitlerin genel biyosentetik yolunda şikimik asitten sonraki bir stepten dallandığı Roscoe ve Abraham (1966) tarafından gösterilmiştir. Pek çok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin yanısıra *Candida albicans*'ı da inhibe eden bacilyisin, hücre duvarı biyosentezini engellemekte olup bu etkinin bir glutamin analogu olarak davranan antikapsinin glukozamin sentetaz enzimini inhibe etmesine bağlı olduğu belirlenmiştir (Kenig ve Abraham, 1976). Bu aşamadan sonra, bacilyisini konu alan diğer çalışmalar, Prof. A. Demain (M.I.T. Biology Dept.) laboratuvarında sürdürülmüştür. ATP ve Mg^{2+} varlığında, öncü amino asitlerin ilavesi ile hücre özütlerinde *in vitro* bacilyisin biyosentezi ilk kez Sakajoh ve ark. (1987) tarafından rapor edilmiştir. Aromatik amino asit biyosentez yolundaki çeşitli oksotrofik mutantlarla (*aro*⁻) yapılan araştırmada antikapsin biyosentezinin prefenik asit molekülünden ayrıldığı doğrulanmıştır (Hilton ve ark., 1988a) (Şekil I.1.B).

Bacilyisin sentezlemeyen (*bac*⁻) bir mutant şuşun (NG79) izolasyonu, *bac* lokusunun dolaylı yoldan haritalanmasını sağlamıştır (Hilton ve ark., 1988b). Transpozon Tn917'nin *bac* lezyonuna yakın bir bölgeye bağlanması sağlanmış ve elde edilen suş PBS-1 transdüksiyon haritalanması deneylerinde kullanılmış, *bac* locusunun standard *B. subtilis* 168 kromozomu üzerinde *ctrA* ve *sacA* lokusları arasında yer aldığı rapor edilmiştir.



Şekil I.1. A. Bacilyisin yapısı. B. *B.subtilis*'de aromatik amino biyosentezi ve antikapsin oluşumu.

Prof. Demain laboratuvarı ile laboratuvarımızın 1986-1990 yılları arasında yürütülmüş olduğu kollaboratif araştırma projesi çevresinde bacilysin biyosentezini düzenleyen fizyolojik regülasyon mekanizmaları araştırılmış, karbon, nitrojen, fosfat ve eser metallere ve öncü/öncü olmayan metabolit bileşiklerin etkileri belirlenmiştir (Özcengiz ve ark.,1990). Bacilysin biyosentezinin üretici organizmanın sporlanması ile olan ilişkisi ve yaşlı kültürlerde bacilysinin yine organizmanın bir ürünü olan alkalik serin proteaz ile hidrolize olduğu rapor edilmiştir (Özcengiz ve Alaeddinoğlu, 1991a; Başalp ve ark., 1992). Hücre ekstraktlarının ¹⁴C-alaninin bacilysin yapısına alınma kinetikleri belirlenmiş; radyoaktif işaretli alaninin bacilysin'in yanı sıra henüz tanımlanmayan ve aynı enzimle sentezlendiği sanılan iki ayrı peptidin yapısına da girdiği gösterilmiştir (Özcengiz ve Alaeddinoğlu,1990, 1991b).

1997 yılında başlayan NATO-Scientific Exchange Program projesi, TÜBİTAK destekli (TBAG-1645) projemiz kapsamında ve araştırmacı Dr. Ayten Karataş'ın doktora tezini oluşturan bacilysin biyosentezi üzerine moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kısmen saflaştırılmış bir enzim fraksiyonu kullanılarak biyosentetik mekanizmaya ilişkin araştırmalar yapılmıştır. Yüksek basınçlı jel filtrasyon kromatografisi (Superdex 200 kolonu) ile büyüklüğü yaklaşık 125 kDA olarak belirlenen enzim, DEAE-Sepharose kolonu kullanılarak gerçekleştirilen yüksek basınçlı anyon kromatografisi ile daha ileri saflaştırılmıştır. Enzimatik bacilysin biyosentezinin ATP yada 2'-deoxy ATP'ye ve yapısını oluşturan amino asitlerin varlığına gereksinim gösterdiği gösterilmiştir. Amino asit aktivasyonu mekanizmasının belirlenmesi için, yapısındaki amino asitlerle, L- alanin ve L-anticapsin ile ATP-PPi ve ATP-Pi değişim reaksiyonları yapılmıştır. Enzim, L-alanine bağlı ATP-PPi değişim reaksiyonunu katalizlemiş, ancak diğer substratı L-anticapsini aynı yolla aktive etmemiştir. Bir modifiye amino asit olan anticapsinin "amino asit fosfat" formunda aktive edildiğine dair de herhangi bir delile rastlanmamıştır. Pantotenik asitin biyosentetik enzimde yer aldığı gösterilmiş, L-alaninin tiyoester formunda enzime bağlandığının kanıtlanması pantotenik asit varlığına ilişkin

sonucu desteklemiştir. Tüm bu bulgular, bacilyisin biyosentezi mekanizmasının peptid sentetazlar için önerilen “çoklutaşıcı tiyokalıp modeli” ile tüm olarak örtüşmediğini göstermiş olup peptid biyosentezinde alternatif model(ler)in varlığına işaret etmiştir. Bu çalışmada, bacilyisinin hızlı ve hassas teşhisi için HPLC-ESI kütle analizi yöntemi geliştirilmiş ve ilgili moleküler çalışmalarda etkin bir biçimde kullanılmıştır.

Yine bu çalışma kapsamında, *B. subtilis* PY79’da (standard 168 suşunun prototrofik türevi) dipeptid antibiyotik bacilyisin biyosentezinden sorumlu genlerin izolasyonu için transpozon mutajenezi yaklaşımı kullanılmıştır. Bloke olmuş mutantlar transpozon kütüphanesinden bioassay yoluyla fenotipik olarak seçilmişler, daha sonra ESI-kütle spektrometri analizleri ile biyosentetik kapasiteyi tamamen kaybeden mutantlar belirlenmiştir. Transpozon kütüphanesinden 4 farklı bacilyisin üretemeyen mutant [AK1, AK2, AK3, and AK4] izole edilmiş, bu mutantlarda bloke olan genler klonlanmış, nükleotid dizileri analiz edilerek ilgili genler karakterize edilmiştir. Bu genler, sırasıyla, *thyA* (timidilaz sentetaz), *ybgG* (hipotetik protein ya da homoserin methyl transferaz) ve *oppA* (oligopeptid permeaz) olarak belirlenmiştir. Opp proteinin bacilyisin biyosentezi ile ilgisinin kanıtlanması, biyosentezin “hücre yoğunluğunun algılandığı” ve sporlanmanın (farklılaşmanın) başlamasından, kompetans oluşmasından ve bazı *B. subtilis* suşlarında surfaktin biyosentezinin gerçekleşmesinden sorumlu global kontrol (fosforelay sistemi) zincirinde esasiyel bir yer oluşturduğunu açığa çıkarması bakımından çok önemli bir bulgudur.

Pek çok bakteri “feromon” adı verilen hücre dışı faktörler sayesinde birbirleriyle iletişim kurabilmekte ve grup halinde hareket edebilmektedirler. Bu grup hareketi ya da diğer deyişle yüksek hücre yoğunluğu, büyüme, bioluminesens oluşumu, antibiyotik üretimi, virulans faktor ekspresyonu, kompetans gelişimi, hücrel farklılaşma (sporlanma) gibi pekçok değişik hücrel prosesi kontrol etmektedir (Basler, 1999; Fuqua ve Greenberg, 1998; Davies, 1998; Fuqua ve ark., 1996; Solomon ve Grossman, 1996).

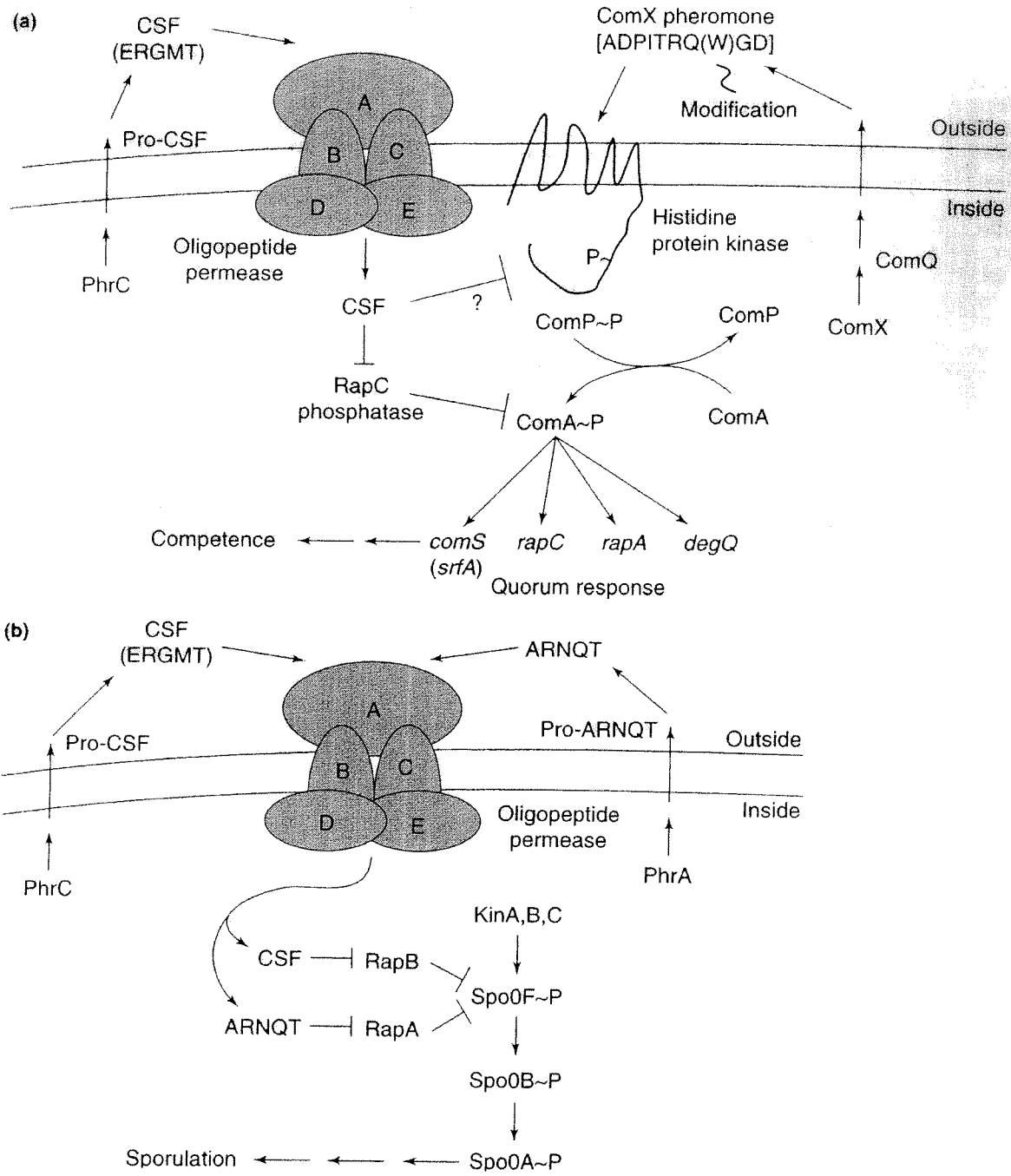
Bakteriler hücre-hücre sinyalizasyonunu, hücre yoğunluğunu takip etmek ve aktivitelerini koordine etmek için kullanılmaktadırlar (Lazazzera 1999; Bassler, 1999). Pekçok farklı sinyal molekülü mevcut olmakla birlikte bunlardan en az iki tanesi, Gram-negatif bakteriler tarafından kullanılan N-asil homoserin laktonlar (AHL) ve Gram-pozitif bakteriler tarafından kullanılan peptid yapıdaki feromonlar, en yaygın biçimde kullanılanlarıdır. N-asil homoserin laktonların pekçoğu hücre içi faaliyet gösterirken, peptid feromonlar hem hücre içi hem de hücre dışı faaliyet gösterebilir, hücre zarı üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak hücre dışında etkili olmaktadır. Bununla birlikte, aktif olarak hücre içine taşınan ve hücre içi reseptörlere bağlanarak etkili olan bir peptid sınıfı bulunmaktadır.

B. subtilis'te kompetans gelişimi, lipopeptid antibiyotik olan surfaktin biyosentezi, ve sporulasyon indüklenmesi, hücre yoğunluğuna bağlı olarak ortak regüle edilmektedirler. *B. subtilis* 'de, iki peptid feromonu ComX ve CSF (Kompetans ve Sporulasyon Faktörü) eksponensiyel büyüme sırasında hücre dışında birikerek kompetans gelişimi başta olmak üzere diğer hücresel proseslerle ilgili olan pek çok genin ekspresyonunu sağlamaktadırlar. Hücre yoğunluğuna göre sporulasyonun indüklenmesi ise çok daha karmaşık görülmektedir ve halen tam anlamıyla karakterize edilmiş değildir (Lazazzera ve ark., 1997; Perego, 1997).

Yüksek hücre yoğunluğuna göre, pek çok fizyolojik prosesin indüklenmesini ve kompetans gelişimini sağlayan başlıca sinyal peptid faktörü, triptofan üyesinde hidrofobik bir modifikasyon içeren ve 10 amino asitten oluşan ComX feromonudur (Magnuson ve ark., 1994; Solomon ve ark., 1995; Solomon ve ark., 1996). ComX' in hücre dışı akümüülasyonuna karşılık verilebilmesi, hücre zarına bağlı bir histidin protein kinaz olan ComP' ye ve bir transkripsiyon faktörü ve aynı zamanda response regulator proteini olan ComA' ya bağlıdır (Solomon ve ark., 1995; Solomon ve ark., 1996). Sekiz kez membranı geçen bir heliks yapısına sahip olan ComP, direk ComX reseptörü olarak belirmektedir. ComX' in ComP' ye bağlanmasına karşılık olarak, ComP doğrudan transkripsiyon faktörü ComA' yı fosfatlayarak

aktif hale getirmektedir. Fosfatlanmış aktif formdaki ComA~P, surfaktin biyosentezinden sorumlu sentetaz enzimini kodlayan genlerin yanısıra kompetans gelişimini sağlayan küçük bir regülatör peptid olan *comS* genini içeren *srfa* operonunun yanı sıra degradatif enzim üretimini regüle eden regülatör protein DeqQ'yu kodlayan gen (*deqQ*), iki aspartil-fosfat fosfatazları (biri ComA'yı inhibe eden RapC, diğeri sporulasyonu inhibe eden RapA) kodlayan genlerin (*rapC* ve *rapA*) ekspresyonunu sağlamaktadır (Şekil 1.2.A). ComX-ComP-ComA tarafından kontrol edilen genler arasında sadece *comS* doğrudan kompetans gelişimiyle ilgilidir (Homeon, 1995). ComS bir transkripsiyon faktörü olan ComK' yı doğrudan aktive ederek transformasyon için gerekli olan proteinlerin ekspresyonunu sağlamaktadır (van Sinderen ve ark., 1995)

ComX feromonu, 55-amino asitten oluşan *comX* gen ürününün 10 amino asitlik karboksil ucuna aittir (Magnuson ve ark., 1994). Operon olarak, *comX* geninin aşağısında kinaz ve yanıt regülatör proteinlerini kodlayan *comP* ve *comA* genleri yer alırken yukarısında aktif haldeki ComX feromonunun üretilmesi için gerekli *comQ* geni bulunmaktadır (Magnuson ve ark., 1994). ComQ isoprenyl transferazlar ile büyük oranda amino asit bezerliği göstermektedir ve bu nedenle ComX'in modifikasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bütün bu genler birlikte (*comQ*, *X*, *P*, *A*) bir peptid sinyalizasyon kaseti oluşturmaktadır. Bu çeşit peptid sinyalizasyon kaseti diğere Gram-pozitif bakterilerde de bulunmaktadır.



Şekil 1.2. *B. subtilis*'de hücre dışı sinyal peptidler aracılığı ile gerçekleşen regülasyon modelleri. (A) CSF ve ComX tarafından yüksek hücre yoğunluğunun algılanması ve buna göre kompetans gelişiminin başlatılması. (B) Hücre dışı peptidler, CSF ve PhrA tarafından gerçekleştirilen sporlanma regülasyonu.

Beş amino asitten oluşan CSF, yüksek hücre yoğunluğuna erişildiği zaman hücre dışında birikmekte ve daha sonra hücre içine taşınarak burada gen ekspresyonunu etkilemektedir. Hücre içerisinde, düşük konsantrasyonlarda (0.2-5 nM) *comS* başta olmak üzere ekspresyonu ComA~P' ye bağlı genleri pozitif yönde uyarırken, yüksek konsantrasyonlarda (>20 nM) bu etki negatif yöne kaymaktadır. Bu konsantrasyonda aynı zamanda sporulasyonu uyardığı bilinmektedir (Lazazzera ve ark., 1997; Solomon ve ark., 1996). Diğer yandan CSF' in, *comS*' in ekspresyonunun sağlanması ve sporulasyonun uyarılması gibi etkileri, bir oligopeptid permeaz olan ve Spo0K olarak da bilinen Opp'ye bağlıdır (Lazazzera ve ark., 1997; Solomon ve ark., 1995; Solomon ve ark., 1996). Bunun nedeni, CSF' in hücre içine taşınmasının Opp tarafından yapılmasıdır. Opp, ATP-bağlanma kaseti (ABC) taşıyıcı olarak bilinen büyük aileye aittir ve 3 ila 5 amino asit uzunluğundaki peptidlerin hücre içine taşınmasını sağlamaktadır.

5 amino asitlik, CSF, 40 amino asitten oluşan *phrC* gen ürününün carboxyl sonuna denk gelmektedir. 40 amino-asitlik peptid zincirinin, transportasyon için gerekli sinyal amino asit dizisi ayrıldıktan sonra, sadece 11-25 amino-asitlik kısmı dışarıya salgılanmakta, hücre dışında bilinmeyen bir mekanizma ile 5 amino asitlik aktif haline dönüştürülmektedir. *phrC* geni ise aspartil fosfataz kodlayan *rapC* geni ile birlikte bir operon oluşturmaktadır. Bu operonun ekspresyonu comA~P ye bağlı olmakla birlikte rapC ve phrC genleri arasında δ^H ye bağlı ikinci bir promotor bölgesi bulunmakta, bu nedenle *phrC* nin yüksek oranda üretilmesi *spo0H* gen ürünü olan transkripsiyon faktörü δ^H ye bağlı gözükmektedir (Lazazzera ve ark., 1999)

CSF en az üç hücre içi reseptörle etkileşmektedir. CSF, düşük konsantrasyonlarda bir aspartil fosfataz olan RapC proteinini inhibe ederek, ComA~P' ye bağlı genlerin ekspresyonunu pozitif yönde etkilerken, yüksek konsantrasyonlarda, henüz kesinlik kazanmamakla birlikte, büyük ihtimalle ComP ile etkileşerek ComA'nın fosforile olmasını

engellenmek suretiyle bu genler üzerindeki etkisini negatif yöne kaydırmaktadır. Yine bu yüksek konsantrasyonda, sporulasyon üzerindeki pozitif etkisini, diğer bir aspartil fosfataz olan RapB proteinini doğrudan inhibe ederek sağlamaktadır (Şekil 1.2.B). RapB fosfataz sporulasyonun başlaması için gerekli bir regülâtör proteini olan Spo0F~P defosforile ederek sporlanmayı inhibe etmektedir. Sporulasyonun başlamasını sağlayan transkripsiyonel regülasyon, “multicomponent phosphorelay mechanism” olarak adlandırılmaktadır (Burbuly ve ark., 1991; Errington, 1993). Özetle, çeşitli iç ve dış uyarılar sonucu en az iki histidin protein kinaz enzimi (Kin A ve Kin B), Spo0F proteinini fosforile etmekte ve fosforil grubu daha sonra SpoOB ve SpoOA transkripsiyon faktörüne transfer edilmektedir. Fosforik olmuş SpoOA ise pek çok sayıda ve anahtar rolü oynayan erken sporulasyon-spesifik genlerin (*spoIIA*, *spoIIIE*, *spoIIIG* gibi) ekspresyonunda pozitif regülâtör protein görevi yapmaktadır. SpoOA-P, diğer yandan, bazı durağan faz regülâtörlerinin ekspresyonunu negatif olarak etkilemektedir; bu regülâtörler *abrB*, *hpr*, *spoOJ* ve *sin* gibi genlerin ürünleri olan sporulasyon inhibitörleridirler.

Spo0F~P yanıt-regülâtör proteinini defosforilize ederek, sporlamayı negatif yönde regüle eden diğer bir aspartil fosfataz olan RapA proteinin aktivitesi, diğer bir sinyal peptid, PhrA' nın kontrolü altındadır (Peregö ve Hock 1996; Peregö, 1997; Hock, 2000). *phrA* ve *rapA* geninin aşağısında bulunmakta ve birlikte operon oluşturmaktadırlar. Bu operonun ekspresyonu yukarıda da belirttiğimiz gibi ComA~P'ye bağlıdır. Aynen PhrC' de olduğu gibi, 44 amino asitlik *phrA* gen ürünü transportasyon için gerekli sinyal amino asit dizisi çıktıktan sonra, sadece 11-25 amino-asitlik kısmı içerecek şekilde dışarıya salgılanmakta, bu peptidin karboksil sonuna ait 5 amino asitlik kısmı aktif PhrA olarak hücre içine gene Opp ile taşınmakta ve hücre içinde doğrudan RapA aspartil fosfatazı inhibe ederek sporlanmayı indüklemektedir (Şekil 1.2.B). Anlaşılacağı üzere, *phrA* ya karşı gerekli yanıtın oluşması, CSF' de olduğu gibi, Opp'ye bağlıdır.

BÖLÜM II

GELİŞME

II.1 MATERYAL VE METOD

II.1.1. Kullanılan Suşlar

Bacilysin üretici suş *Bacillus subtilis* PY79, kromozomal DNA eldesi için *Bacillus subtilis* bloke mutant suşlar KE10 (*srfA::erm*, Erm^r), JMS372 (*comP::spc*, Spc^r), LAB590 (*comP::Tn917*, MLS^r), JMS315 (*comQ::spc*, Spc^r), AG518 (*abrB::Tn917*, MLS^r), AG504 (*spo0A::CAT*, Cm^r), AG665 (*spo0H::CAT*, Cm^r), Lab844 (*srf::phl*, ΔComS, Phl^r), JMS751 (*phrC::erm*, Erm^r), JH12954 (*phrA::cat*, Cm^r), JRL192 (*comA::cat*, Cm^r) , bacilysin aktivitesini belirlemek için ise *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 test suş olarak biyoassay çalışmalarında kullanılmıştır.

II.1.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, Merck, Amersham ve Boehringer Mannheim Chem Co.'dan temin edilmiştir.

II.1.3. Kromozomal DNA İzolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu için Cutting ve Horn (1990)'dan adapte edilen method kullanılmıştır. Bir gece büyütülen 5 mL' lik kültür 5000 rpm 15 dak sentrifüj edilerek toplanmış ve 567 µL TE tamponu içinde yeniden süspende edilmiştir. 30 µL 10% SDS solüsyonu, 3 µL Proteinase K (20mg/mL) ve toplam konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde RNase eklenerek karıştırılmış ve 37°C' de 1 saat inkübe edilmiştir. 100 µL 5M NaCl, 80 µL CTAB/NaCl solusyonundan eklenip karıştırıldıktan sonra 65°C' de 10 dak inkübe

edilmiştir. Daha sonra kloroform/isoamyalkol (1:0.04) karışımından konularak karıştırılmış, 13000rpm' de 5 dak sentrifüj edilerek ayrılan dökelti kısmı temiz bir tüpe aktarılmıştır. bu step Phenol/kloroform/isoamilalkol (1:1:0.04) karışımından eşit hacimde eklenerek aynı şekilde tekrar edilmiştir. Sentrifüj sonucunda ayrılan dökelti temiz bir tüpde toplanmış ve toplam hacme göre 0.7 hacimde isopropil alkol eklenerek kromozomal DNA çöktürülmüş ve 13000 rpm' de 15 dak sentrifüj edilerek toplanmıştır. 1 mL 70% etanol ile aynı rpm' de 5 dak sentrifüj edilerek yıkanmış, 37°C' de 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 100 µL TE tamponunda çözülmüş ve 4°C' de saklanmıştır.

II.1.4. Agaroz Jel Elektroforez Uygulaması

Elektroforez için yatay submarine elektroforez aparatüsü kullanılmıştır. Amaca göre 0.8% yada %1 lik agarose gel, TBE tamponu içinde hazırlanmış, ve erimiş agaroz jelin içine final konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde ethidium bromide eklenmiştir. Elektroforez, 100 mA' de 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. DNA bantları doğrudan UV-transillüminator üzerinde görüntülenmiştir.

II.1.5. Kompetent PY79 Hücrelerinin Hazırlanması ve Kromozomal DNA ile Transforme Edilmeleri

PY79 LB katı besi yerinde bir gece büyümüşdür. Kültürden tek koloni alınarak 3 ml HS sıvı besi yerine aktarılmış 37°C' de 250 rpm' de karıştırılmalı olarak bir gece büyütülmüştür. Bu kültürden 0.5 mL alınarak 20 mL LS içeren 250 mL' lik steril flaska transfer edilmiş ve 30°C' de 100 rpm' de OD₆₀₀ 0.55 olana kadar inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ 0.55'e ulaşıncaya bu kültürden 1 mL alınarak steril 2 mL' lik eppendorf tüplerine transfer edilmiş, derhal kromozomal DNA'dan 1µL eklenmiş, karıştırılmış ve 37°C' de 250 rpm' de 2 saat inkübe edilmiştir. Hücreler 13000 rpm' de 1 dakika sentrifüj edilerek toplanmış ve 100 µL 0.85% lik

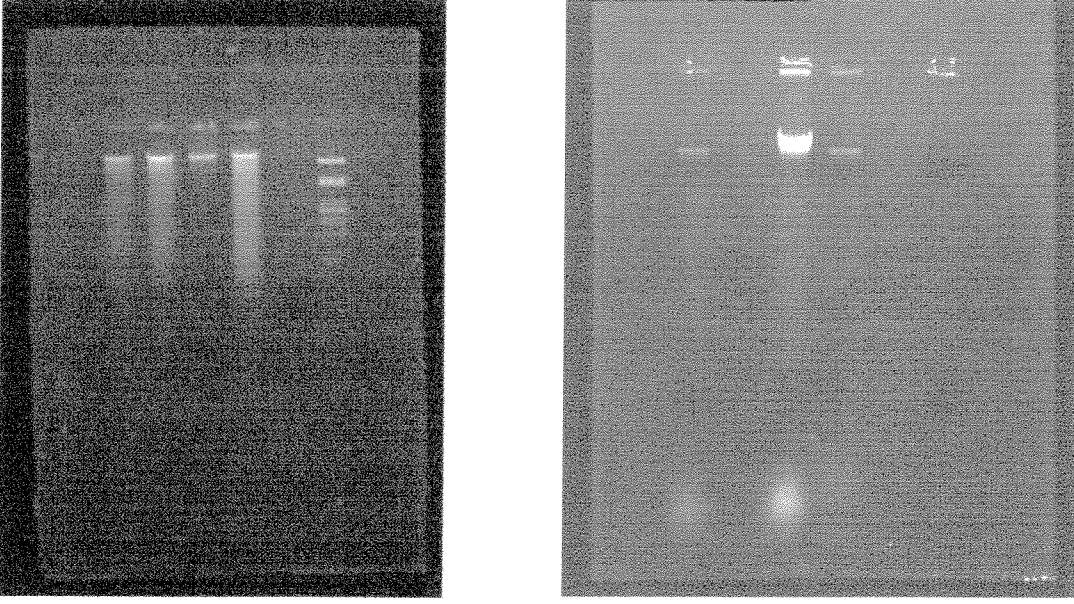
NaCl solüsyonunda süspende edilerek, antibiyotik içeren LB agar plakları üzerine ekilmiş ve 37°C de bir gece inkübe edilerek antibiyotik direnç kasedini içeren transformantlar seçilmiştir.

II.1.6. Bacilysin Biyoassayı

Test edilecek *B.subtilis* suşları öncelikle LB agar besi yerinden tek koloni alınıp antibiyotik içeren Perry ve Abraham (PA) besi yerinde bir gece büyütülerek aşı kültürleri oluşturulmuş, daha sonra bunlar fresh PA besi yerine 1/100 oranında dilue edilerek 37°C' de, 250 rpm' lik çalkalama ile 15-16 saat (pH 6.7-6.9) büyütülmüştür. Kültür sıvısında bulunan bacilysin, "filter paper disc-agar diffusion assay method" ile, indikatör suş olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 kullanılarak belirlenmiştir. 10 µL hacminde kültür sıvıları, 0.5 cm çapındaki filter diskleri üzerine emdirilmiş, daha sonra biyoassay plakları üzerine yerleştirilerek 37°C' de bir gece inkübasyon sonucunda filter disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonuna göre bacilysin aktivitesi belirlenmiştir

II.2 BULGULAR

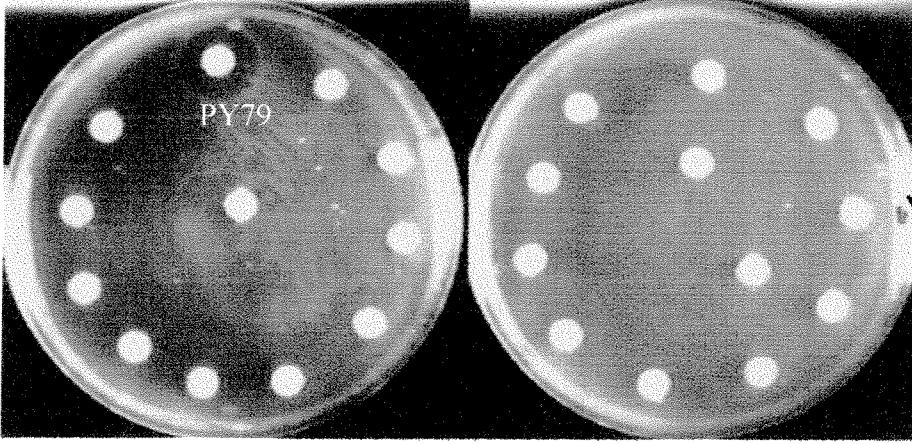
Quorum-sensing regülasyon sisteminde görev yapan faktörlerden (genlerden) bacilysin biyosentezi için gerekli olanları ortaya çıkarma ve buna göre bacilysin biyosentezinin regülasyon mekanizmasını netleştirme amacı çerçevesinde sözü geçen regülasyon mekanizmasındaki genler teker teker ele alınarak kaset mutajenezi yöntemi ile incelenmiştir.



Şekil II.2.1. Bloke mutantların kromozomal DNAlarının agaroz jel fotoğrafları

II.2.1. *phrC* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

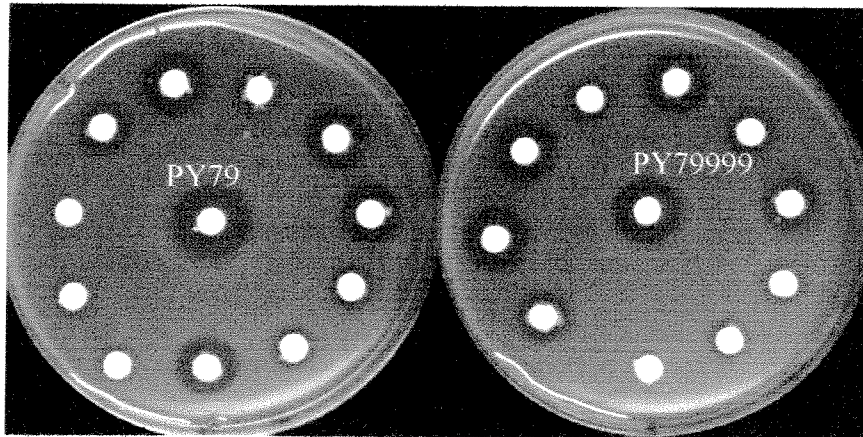
phrC geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *phrC* gen bölgesi erythromycin direnç geniyle bloke edilmiş olan JMS751 (*phrC::erm*, Erm^r) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Bunu takiben, erythromycin dirençli 50 transformant PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi diğer bir deyişle bacilysin üretip üretmediği "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. 50 transformantın 41 inde bacilysin üretimi tamamen dururken 9unda, büyük ihtimalle PA besi yerinde antibiyotik etkisinin kaldırılmasıyla, açığa çıkan back transformantlar yüzünden, çok az bacilysin aktivitesi tespit edildi. (Şekil II.2.2).



Şekil II.2.2. *B. subtilis* PY79 *phrC* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

II.2.2. *phrA* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

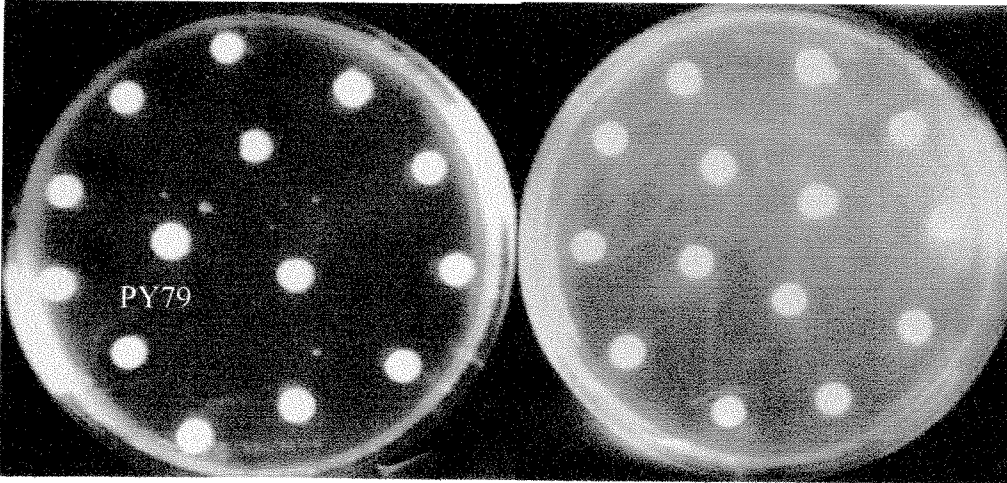
phrA bölgesi chloramphenicol direnç geniyle bloke edilmiş olan JH12954 (*phrA::cat*, Cm^r) suşunun kromozomal DNA sı izole edilerek competent PY79 hücrelerine verildi. Chloramphenicol içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bunu takiben, chloramphenicol dirençli 50 transformant PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi “filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu” ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. *phrA* gen bölgesinin blokasyonunun bacilysin biyosentezi üzerine bir etkisi olmadığı tespit edildi. (Şekil II.2.3).



Şekil II.2.3. *B. subtilis* PY79 *phrA* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

II.2.3. *comA* Gen Bölgesinin Bacilyisin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

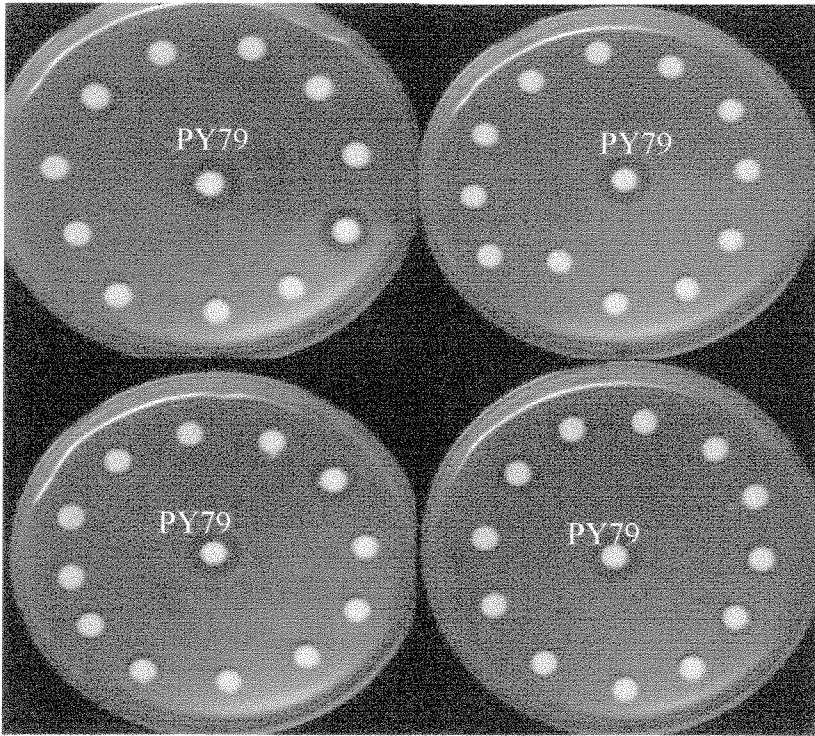
comA geninin bacilyisin üretici suş PY79 da blokasyonu, *comA* gen bölgesi chloramphenicol direnç geniyle bloke edilmiş olan JRL192 (*comA::cat*, Cm^r)suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Chloramphenicol içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromozomal bölgede chloramphenicol dirençlilik gen insersiyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilyisin analizi (bacilyisin üretiminin üretmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. 50 transformanttan 43 ünde bacilyisin üretimi tamamen dururken geri kalan 7 sinde, büyük ihtimalle PA besi yerinde antibiyotik etkisinin kaldırılmasıyla, açığa çıkan back transformantlar yüzünden, çok az şekilde bacilyisin aktivitesi tespit edildi (Şekil II.2.4).



Şekil II.2.4. *B. subtilis* PY79 *comA* bloke-mutantlarının biyoassay sonuçları

II.2.4. *comQ* Geninin Bacilyisin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

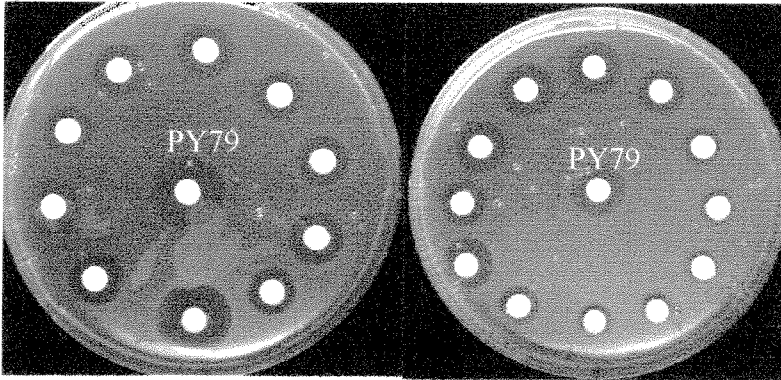
comQ geninin bacilyisin üretici suş PY79 da blokasyonu, *comQ* gen bölgesi spectinomycin direnç geniyle bloke edilmiş olan JMS315 (*comQ::spe*) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Spectinomycin içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromozomal bölgede spectinomycin dirençlilik gen inserasyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilyisin analizi (bacilyisin üretip üretmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hepsinde bacilyisin üretiminin etkilendiği, %84 ünde bacilyisin üretimi tamamen durduğu geri kalan %16 sında ise, büyük ihtimalle PA besi yerinde antibiyotik etkisinin kaldırılmasıyla, açığa çıkan back transformantlar yüzünden, çok az miktarda bacilyisin aktivitesi tespit edildi, (Şekil II.2.5).



Şekil II.2.5. *B. subtilis* PY79 *comQ* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

II.2.5. *comP* Gen Bölgesinin Bacilyisin Üretimi Üzerine Olan Etkisi

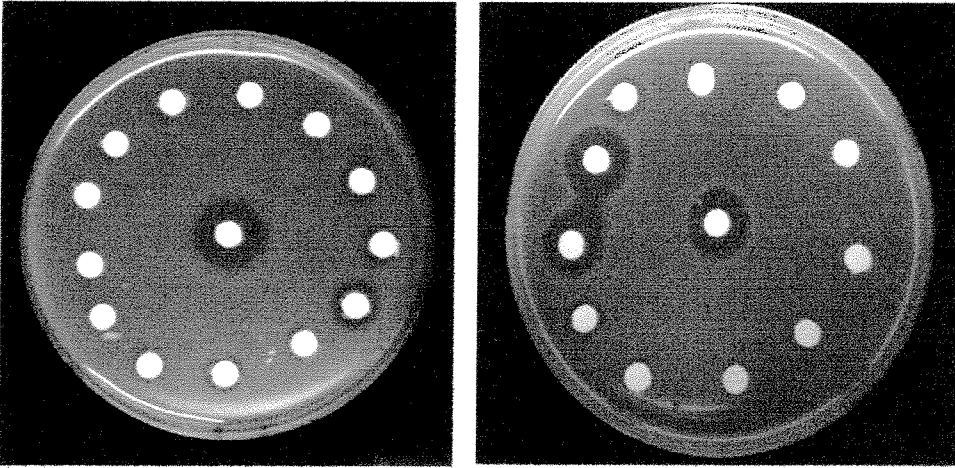
comP geninin bacilyisin üretici suş PY79 da blokasyonu, *comP* gen bölgesi spectinomycin direnç geniyle bloke edilmiş olan JMS372 (*comP*::*spc*) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Spectinomycin içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromosomal bölgede spectinomycin dirençlilik gen inserasyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilyisin analizi (bacilyisin üretip üretmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların çoğunda bacilyisin üretimini etkilenmediği görüldü (Şekil II.2.6). Fakat kullanılan JMS372 (*comP*::*spc*) suşunun ayrıca *comP* geni taşıyan plasmid içeriyor olması yüzünden bu mutasyonun bir başka *comP* mutant suş LAB590(*comP*::*Tn917*, *MLS*^r) kullanılarak tekrarlanmasına karar verildi.



Şekil II.2.6. *B. subtilis* PY79 *comP* bloke-mutantlarının biyoassay sonuçları

II.2.6. *srfA* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

srfA geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *srfA* gen bölgesi erythromycin direnç geniyle bloke edilmiş olan KE10 (*srfA::erm*, Erm^r) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Erythromycin içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromozomal bölgede erythromycin dirençlilik gen inserasyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi (bacilysin üreten üretenmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hemen hepsinde bacilysin üretiminin durduğu tespit edildi (Şekil II.2.7).

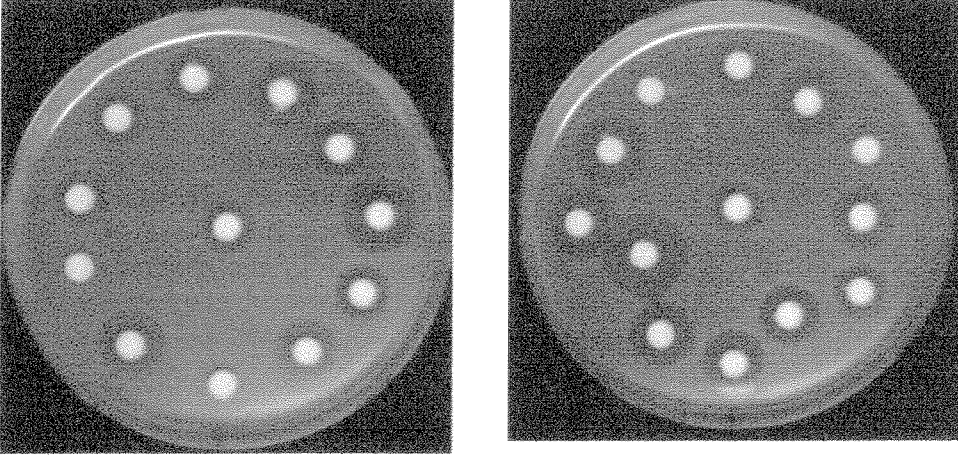


Şekil II.2.7. *B. subtilis* PY79 *srfA* bloke-mutantlarının biyoassay sonuçları

II.2.7. *abrB* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

abrB geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *abrB* gen bölgesi spectinomycin direnç geniyle bloke edilmiş olan AG518(*abrB::Tn917*) suşunun kromozomal

DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rikombinasyon ile sağlandı. Erythromycin ve lincomycin içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromosomal bölgede dirençlilik gen insersiyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi (bacilysin üretip üretmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hepsinde bacilysin üretiminin etkilendiği, hemen hepsinde bacilysin aktivitesinin arttığı tespit edildi (Şekil II.2.8).

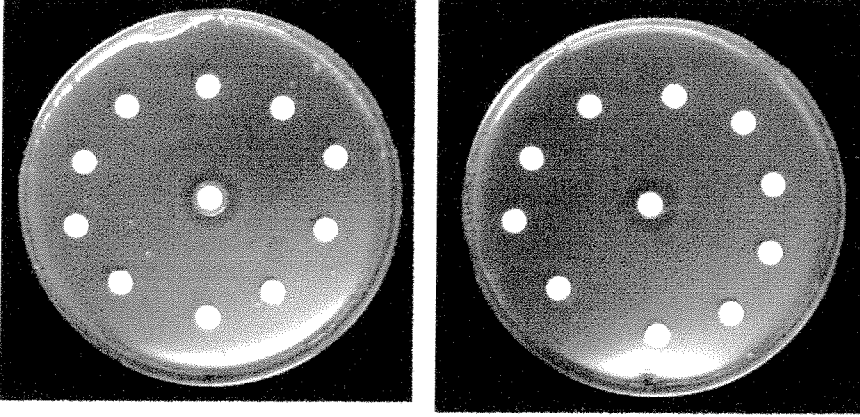


Şekil II.2.8. *B. subtilis* PY79 *abrB* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

II.2.8. *spo0A* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

spo0A geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *spo0A* gen bölgesi chloramphenicol direnç geniyle bloke edilmiş olan AG504(*spo0A::CAT*, Cm^r) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Chloramphenicol içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromosomal bölgede chloramphenicol dirençlilik gen insersiyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek

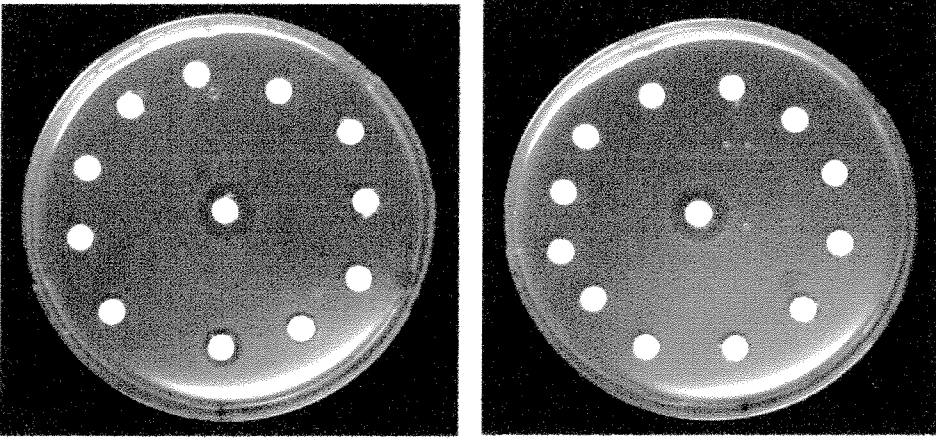
kültür sıvılarında bacilysin analizi (bacilysin üreten üretenmediği) “filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu” ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hepsinde bacilysin üretiminin durduğu tespit edildi (Şekil II.2.9).



Şekil II.2.9. *B. subtilis* PY79 *spo0A* bloke-mutantlarının biyoassay sonuçları

II.2.9. *spo0H* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

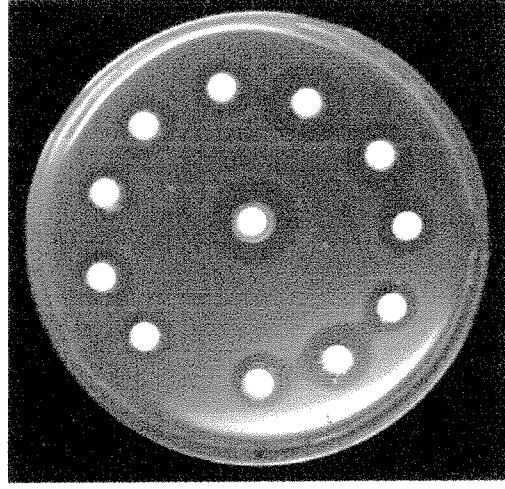
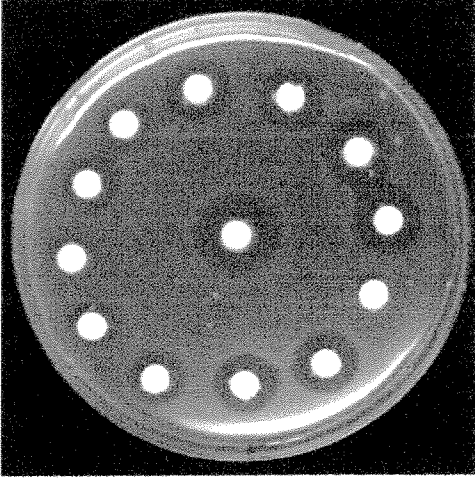
spo0H geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *spo0H* gen bölgesi chloramphenicol direnç geniyle bloke edilmiş olan AG665(*spo0H*:: *CAT*, *Cm*^r) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Chloramphenicol içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromozomal bölgede chloramphenicol dirençlilik gen insersiyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi (bacilysin üreten üretenmediği) “filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu” ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hepsinde bacilysin üretiminin durduğu tespit edildi (Şekil II.2.10).



Şekil II.2.10. *B. subtilis* PY79 *spo0H* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

II.2.10. *comS* Gen Bölgesinin Bacilysin Üretimi Üzerine Olan Etkisi:

comS geninin bacilysin üretici suş PY79 da blokasyonu, *srf* operonunda bulunan *comS* gen bölgesi phleomycin direnç geniyle bloke edilmiş olan Lab844(*srf::phl*, Δ ComS, Phl^I) suşunun kromozomal DNA'sı ile kompetant PY79 hücrelerine transferi, dolayısıyla da homolog rekombinasyon ile sağlandı. Phleomycin içeren seçici besi yerinde transformantlar seçildi. Bu transformantlarda gerçekten kromozomal bölgede phleomycin dirençlilik gen insersiyonu olduğu doğrulandı. Bunu takiben, 50 transformant, PA besi yerinde büyütülerek kültür sıvılarında bacilysin analizi (bacilysin üretip üretmediği) "filtre kağıdı-disk agar diffüzyon metodu" ile, *Staphylococcus aureus* içeren biyoassay plakları üzerinde yapıldı. Bu transformantların hepsinde bacilysin üretiminin etkilendiği ve bacilysin aktivitesinin azaldığı tespit edildi (Şekil II.2.11).



Şekil II.2.11. *B. subtilis* PY79 *comS* bloke-mutantlarının bioassay sonuçları

BÖLÜM III

SONUÇ

III.1. TARTIŞMA

Mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitlerden, çok önemli bir kimyasal yapı ve biyolojik aktivite çeşitliliği gösteren peptid antibiyotik biyosentezi taşıdıkları ekonomik nedenden dolayı hem temel bilimler, hem de uygulama açısından çok güncel çalışma alanlarını oluşturmaktadır.

Mikrobiyal kökenli peptidler/peptid biyosentezi konusundaki araştırma-geliştirme etkinlikleri, A.B.D., Almanya ve Japonya başta olmak üzere çeşitli ülkelerde son yıllarda büyük bir yoğunluk kazanmıştır. Ülkemizde ise ilgili konuda büyük bir boşluk olduğu görülmektedir.

Laboratuvarımızda daha önce Dr. Ayten Yazgan (Karataş) tarafından yürütülen çalışmalarda Turgay ve Marahiel (1984) tarafından geliştirilen nonribosomal peptid sentezinden sorumlu multifunctional peptid sentetaz enzim genlerinin belirlenmesi ve klonlanmasında çok etkin ve yaygın olarak kullanılan PCR yöntemi uygulanmış, fakat bulgular yeni bir sentetaz genine işaret etmemiştir. Bu arada *B.subtilis* 168 genome projesi çerçevesinde pek çok ülkeden bilim adamının birarada yürüttüğü çalışmalar neticesinde bu organizmanın genomunda mevcut bütün genler belirlenmiştir (SubtiList Data base). Ancak, lipopeptid antibiyotiklerden surfactin sentezinden sorumlu *surfA* operonu, ve fengicine sentezinden sorumlu olduğu düşünülen *pps* operonu ve poliketid antibiyotik sentezinden sorumlu *pks* operonundan başka yeni bir peptid sentetaz geni bulunmamıştır. Bu sonuç, çalışmamızda peptid sentetazların korunmuş dizilerini içeren primerlere dayanan PCR

yaklaşımının niçin bilinen sentetazlar dışında yeni bir sentetaz vermediğini gayet net açıklamaktadır. Bu yüzden giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi, *Bacillus subtilis* 168 tarafından nonribosomal olarak sentezlenen, bilinen en basit yapılı peptid antibiyotik olan bacilyosinin biyosentezinden sorumlu gen ve gen kümelerini belirlemek ve karakterize edebilmek için kaset mutajenezi yöntemiyle sözü geçen regülasyon mekanizmasındaki genler teker teker incelenmiştir.

Competence Sporulation Factor (CSF) olarak adlandırılan peptid faktörü düşük konsantrasyonda olduğu zaman, surfaktin biyosentezinden sorumlu *surfA* operonunun ekspresyonunun başlamasını sağlayan regülatör proteinleri (ComA ve ComP) uyarmaktadır (Solomon ve ark., 1995, Solomon ve ark., 1996) *surfA* operonu, surfaktin biyosentezinden sorumlu sentetaz enziminin kodlayan genler dışında kompetans için gerekli küçük bir regülatör peptid olan comS' i kodlamaktadır (Hamoen ve ark., 1995) Aynı peptid faktörü (CSF) yüksek konsantrasyona eriştiği zaman sporulasyonun başlamasını sağlayan regülatör proteinlerini dolaylı olarak pozitif yönde uyarmaktadır ComX feromonu daha çok hücre içine girmeden yüzeyde gerekli reseptörlerle etkileşirken CSF'in aktif olarak oligopeptid permease Opp (spoOK) ile hücre içine taşındığı ve hücre içi reseptörlerle ilişkiye geçtiği bilinmektedir (Lazzazera ve ark. 1997).

5 amino asitlik CSF, 40 amino asitten oluşan *phrC* gen ürününün carboxyl sonuna denk gelmektedir. 40 amino-asitlik peptid zincirinin, transportasyon için gerekli sinyal amino asit dizisi ayrıldıktan sonra, sadece 11-25 amino-asitlik kısmı dışarıya salgılanmakta, hücre dışında bilinmeyen bir mekanizma ile 5 amino asitlik aktif haline dönüştürülmektedir. *phrC* geni ise aspartil fosfataz kodlayan *rapC* geni ile birlikte bir operon oluşturmaktadır. Bu operonun ekspresyonu comA~P ye bağlı olmakla birlikte rapC ve phrC genleri arasında δ^H ye bağlı ikinci bir promotor bölgesi bulunmakta, bu nedenle *phrC* nin yüksek oranda üretilmesi

spo0H gen ürünü olan transkripsiyon faktörü δ^H ye bağlı gözükmetedir (Lazeezeera ve ark., 1999)

CSF yüksek konsantrasyonda girişte belirtildiği üzere dolaylı olarak SpoOA transkripsiyon faktörünün fosforile olmasını sağlar. Fosforlanarak aktive olan SpoOA ise pek çok sayıda ve anahtar rolü oynayan erken sporulasyon-spesifik genlerin (*spoIIA*, *spoIIIE*, *spoIIG* gibi) ekspresyonunda pozitif regulator protein görevi yapmaktadır. SpoOA-P, diğer yandan, bazı durağan faz regulatorlerinin ekspresyonunu negatif olarak etkilemektedir; *abrB* bu sporulasyon inhibitörlerindedir.

B. subtilis ' de surfaktin biyosentezi, kompetans gelişimi ve sporulasyon ile birlikte ve ortak regule edilmektedir ve bu regülasyon doğrudan hücre dışı sinyal peptid faktörlerin akümülyasyonuna ve transportuna bağlı gözükmetedir (Perego, 1997). Daha önceki çalışmalarımızda CSFin hücre içine transportundan sorumlu *spoOK* operonunun bloke olmasıyla bacilysin sentezinin de durmuş olması, Opp proteininin bacilysin sentezi için mutlaka gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu proje çerçevesinde incelenen genler arasında *phrC*, *comA*, *comQ* genlerinin bloke edilmesi sonucunda bacilysin üretiminin durmuş olması göstermiştir ki bacilysin üretimi SpoOK/PhrC/ComA ve diğer yoldan comQ ve böylece ComX/ComP-ComA regülasyon faktörlerinin kontrolü altındadır. Diğer bir deyişle bu sonuçlar, surfaktin biyosentezinde olduğu gibi bacilysin üretiminin de aynı şekilde quorum-sensing global regülasyon mekanizmasının kontrolü altında olduğunu kesinleştirmiştir.

Bacilysin ve sürfaktin üretiminin aynı regülasyon mekanizması ile kontrol edilmesi surfaktin biyosentezi, kompetans gelişimi ve sporulasyondan sorumlu *srfA* operonunun bacilysin biyosentezinde rol alabileceği olasılığını açığa çıkarmıştır. *srfA* operonu, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* bölgelerini içine alacak şekilde, bacilysin üretici suş PY79 da bloke edildiği zaman bacilysin üretiminin tamamen durduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu operon içerisinde, yer alan sadece *srfAB* gen bölgesi, *comS* genini içine alacak şekilde bloke edildiği

zaman bacilysin üretimini azaldığı fakat tamamen durmadığı tespit edildi. srfAB blokasyonu direk olarak srfAC geninin bloke edilmesi anlamına gelmektedir. Bu durumda, surfactin biyosentezinden sorumlu peptid sentetaz'ın sadece SrfAA subunit'inin direk olarak bacilysin sentezinden sorumlu olma ihtimali oldukça kuvvetlidir.

Sporulasyonu indükleyen *spo0A-spo0H* genlerinin blokasyonu bacilysin üretimini durmasına sebep olmuştur. *spo0A* mutantlarında *abrB* geninin blokasyonu bu mutantlarda bacilysin üretimini tekrar başlatmış, *abrB*'nin tek başına blokasyonu ise bacilysin aktivitesinde artışla sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar ise, bacilysin üretiminde rol alan diğer bazı gen/genlerin (henüz bilinmeyen) transkripsiyonlarının, durağan faz regülatörlerinden AbrB nin direk negatif kontrolü altında olduğunu göstermiştir.

Bütün bu bulgular, bacilysin biyosentezinin quorum-sensing global signal transdüksiyon sistemiyle regüle edildiğini tam anlamıyla doğrulamıştır. Aynı zamanda, bu regülasyon sisteminde görev yapan faktörlerden, PhrA/RapA haricindeki tüm faktörlerin bacilysin biyosentezi için gerekli olduğunu ortaya çıkarmış ve bacilysin biyosentezi üzerindeki regülasyon mekanizmasını büyük ölçüde netleştirecek önemli bilgiler elde edilmiştir.

III.2. ÖNERİLER

-Bu çalışma, bacilysin üretimini "hücre yoğunluğu algılama sinyali" isimli global global regülasyon zinciri içerisinde yer aldığını kanıtlamıştır. Bacilysin biyosenteziyle ilgili olası diğer gen ve gen bölgelerinin belirlenmesi için kaset mutajenezi yöntemi ile yeni mutantların elde edilmesine devam edilebilir.

KAYNAKLAR

- Basalp A., Özcengiz G., Alaeddinoğlu N. G., Changes in patterns of alkaline serine protease and bacilysin formation caused by common effectors of sporulation in *Bacillus subtilis* 168, *Curr. Microbiol.*, 24, 129-135, (1992).
- Bassler B. L., How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 582-587, (1999).
- Boman H. G., Peptide antibiotics and their role in innate immunity, *Ann. Rev. Immunol.*, 13, 61-92, (1995).
- Boman H.G., Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity?, *Scand J Immunol.*, 43(5), 475-482, (1996).
- Burbulys D., Trach K. A., Hoch J. A., Initiation of Sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicompenet phosphorelay, *Cell.*, 64, 545-552, (1991).
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P., The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilms, *Science*, 280, 295-298, (1998).
- Demain A. L., Do antibiotics function in nature, *Search.*, 11, 148-151, (1980).
- Errington J., *Bacillus subtilis* Sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis, *Microbiol. Rev.*, 57, 1-33, (1993).
- Fuqua C., Winans S. C., Greenberg E. P., Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators, *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 727-751, (1996).
- Fuqua C., Greenberg E. P., Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 183-189, (1998).
- Gill I., Lopez-Fandino R., Jorba X., Vulfson EN., Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production, *Enzyme Microb Technol.*, 18, 163-183, (1996).
- Homoen L. W., Eshuis H., Jongbloed J., Venema G., van Sinderen D., A small gene, designated *comS*, located within the coding region of fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, 15, 55-63, (1995).
- Hilton M. D., Alaeddinoğlu N. G., Demain A. L., Synthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis* branches from prephenate of the aromatic amino acid pathway, *J. Bacteriol.*, 170, 482-484, (1988a).

- Hilton M. D., Alaeddinoğlu N. G., Demain A. L., *Bacillus subtilis* mutant deficient in the ability to produce the peptide antibiotic bacilysin: isolation and mapping of the mutation, *J. Bacteriol.*, 170, 1018-1020, (1988b).
- Hoch J. A., Two-component and phosphorelay signal transduction, *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 165-170, (2000).
- Katz E., Demain A. L., The Peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions, *Bacteriol. Rev.*, 41, 449-474, (1977).
- Kenig M., Abraham E. P., Antimicrobial Activities and Antagonists of Bacilysin and Anticapsin, *J. Gen. Microbiol.*, 94(1), 37-45, (1976).
- Kleinkauf H., vonDohren H., Non-ribosomal biosynthesis of peptide antibiotics, *Eur. J. Biochem.*, 192, 1-15, (1990).
- Kleinkauf H., vonDohren H., Nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Eur. J. Biochem.*, 286, 335-351, (1996).
- Lazazzera B. A., Solomon J. M., Grossman A. D., An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. Subtilis*, *Cell.*, 89, 917-925, (1997).
- Lazazzera B. A., Kurtser I. G., McQuade Y. S., Grossman A. D., An Autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 181, 5193-5200, (1999).
- Magnuson R., Solomon J., Grossman A. D., Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*, *Cell.*, 77, 207-216, (1994).
- Marahiel M. A., Nakano M. M., Zuber P., Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*, *Molecular Biol.*, 7, 631-636, (1992).
- Nakano M. M., Zuber P., Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 10, 223-240, (1990).
- Özcengiz G., Alaeddinoğlu N. G., Demain A. L., Regulation of biosynthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis*, *Ind. Microbiol.*, 6, 91-100, (1990).
- Özcengiz G., Alaeddinoğlu N. G., Bacilysin production and sporulation in *Bacillus subtilis*, *Curr. Microbiol.*, 23, 61-64, (1991a).
- Özcengiz G., Alaeddinoğlu N. G., Bacilysin production by *Bacillus subtilis*: effects of bacilysin, pH and temperature, *Folia Microbiol.*, 36, 522-526, (1991b).
- Perego M., Hoch J. A., Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 1549-1553, (1996).

- Perego M., A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 8612-8617, (1997).
- Pichard B., Larue J. P., Thouvenot D., Gavaserin and Saltavalin, New peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*, *FEMS Microbiol Lett.*, 133(3), 215-218, (1995).
- Rogers H. J., Newton G. G. F., Abraham E. P., Production and purification of bacilylsin, *Biochem. J.*, 97, 573-578, (1965a).
- Rogers H. J., Lomakina N., Abraham E. P., Observations on the structure of bacilylsin, *Biochem. J.*, 97, 579-586, (1965b).
- Roscoe J., Abraham E. P., Experiments relating to the biosynthesis of bacilylsin, *Biochem J.*, 99, 793-800, (1966).
- Sakajoh M., Solomon N. A., Demain A. L., Cell-free synthesis of the dipeptide antibiotic bacilylsin, *J. Ind. Microbiol.*, 2, 201-208, (1987).
- Solomon J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A. D., Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*, *Genes Dev.*, 9, 547-558, (1995).
- Solomon M., Grossman A. D., Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria, *Trends Genet.*, 12, 150-155, (1996).
- Solomon J. M., Lazezera B. A., Grossman A. D., Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*, *Genes Dev.*, 9, 547-558, (1996).
- Stein T., Vater J., Amino acid Activation and polymerization at modular multienzymes in nonribosomal peptide biosynthesis, *Amino Acids*, 10, 201-227, (1996).
- Turgay K., Marahiel M. A., A general approach for identifying and cloning peptide synthetase genes, *Pept. Res.*, 7, 133-140, (1984).
- van Sinderen D., Luttinger A., Kong L., Dubnau D., Venema G., Hamoen L., *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*, *Mol Microbiol.*, 15, 455-462, (1995).
- Walker J. E., Abraham E. P., The structure of bacilylsin and other products of *Bacillus subtilis*, *Biochem. J.*, 118, 563-570, (1970).

EK-1
BESI ORTAMLARININ
KOMPOZISYONU

Perry and Abraham (PA) Medium

	<u>g/Lt</u>
KH ₂ PO ₄	1.0
KCL	0.2
MgSO ₄ .7H ₂ O*	0.5
Glutamate.Na.H ₂ O	4.0
Sucrose*	10
Ferric citrate**	0.15
Trace elements**:	1 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0001
Ammonium molybdate	0.0001
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.001
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00001

pH 7

* Autoclaved separately

** Filter sterilized

Bioassay medium

The defined medium of Mah *et al.* (1967) was modified by addition of sodium citrate and substitution of glutamate for NH_4Cl . Also a small amount of YE replaced the vitamins.

	g/Lt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3
KH_2PO_4	1.0
NaCl	1.0
Glucose*	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	0.7
$\text{Na}_3\text{.citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
Glutamic acid. $\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}^{**}$	2.4
12 amino acids***	0.025 (each)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^{**}$	0.01
Agar****	

pH 7.1

* Glucose and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ autoclaved together, separately

* Filter sterilized

*** Arginine, cystidine, glycine, histidine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophane, tyrosine, valine, alanine (all of L- forms)

**** Autoclaved separately

Luria Broth (LB)

	<u>g/L</u>
Peptone	10
NaCl	10
Yeast extract	5

pH 7.5

10 X-S-Base

	20 g	$(\text{NH}_4)_2.\text{SO}_4$
	140 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4.3\text{H}_2\text{O}$
	60 g	KH_2PO_4
	10 g	$\text{Na}_3\text{citrate}, 2\text{H}_2\text{O}$
	1 L	dH ₂ O

They were autoclaved together and allowed to cool to 50 °C and then supplemented with 1 mL of sterile 1 M MgSO_4 .

HS-Medium

10 mL	10X-S-Base
1 mL	Glucose, 50 % (w/v)
1 mL	Yeast extract, (10 %) (w/v)
1 mL	Casamino acid, 2 % (w/v)
10 mL	Arginine 8 %(w/v)+Histidine 0.4 % (w/v)
1 mL	Tryptophane 0.5 % (w/v)
1.5 mL	Phenylalanine 0.3 % (w/v)

Total volume was completed to 100 mL with sterile water

LS- Medium

2 mL	10X-S-Base
0.2 mL	Glucose, 50 % (w/v)
20 µL	Tryptophane 0.5 % (w/v)
30 µL	Phenylalanine 0.3 % (w/v)
0.1 mL	Casamino acid, 2 % (w/v)
0.2 mL	Yeast extract , (10%) (w/v)
0.2 mL	50 mM Spermidine
50 µL	1 M MgCl ₂

Total volume was made up to 20 mL with sterile water.

EK-2
KULLANILAN SOLÜSYONLARIN
KOMPOZİSYONU

TE Buffer (Maniatis, 1989)

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH: 8

TBE (Maniatis,1989)

0.089 M Tris base

0.89 boric acid

2 mM EDTA

pH8.0-8.3

CTAB/NaCl Solution (10% CTAB/0.7M NaCl)

4.1 g of NaCl is dissolved in 80 mL of dH₂O. Then, 10 g of CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) is added and dissolved with vigorously shaking and gentle heating up to 65 °C. Finally volume is made up to 100 mL with dH₂O.

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

1- Proje No : TBAG-1975 (100T098)
2- İlgili Araştırma Grubu : TBAG
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri : 01.02. 2001-01.02.2002
4- Projenin Adı : Hücre yoğunluğu sinyali ve bacilysin biyosentezi arasındaki bağlantının moleküler düzeyde tanımlanması
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü: Prof. Dr. Gülay Özcengiz Yardımcı araştırmacılar: Dr. Ayten (Yazgan)Karataş Seçil Çetin
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi : O.D.T.Ü. Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06531 Ankara
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TBAG Atatürk bulvarı No:221 Kavaklıdere, 06100 Ankara
8- Öz: <p><i>Bacillus subtilis</i>'te kompetans gelişimi, lipopeptid antibiyotik sürfaktin biyosentezi ve sporulasyonun indüklenmesi "quorum-sensing" (hücre yoğunluğunun algılanması) global regülasyon mekanizması ile kontrol edilmektedir. <i>B. subtilis</i>'in belirli suşları tarafından sentezlenen ve bir dipeptid antibiyotik olan bacilysin biyosentezinin de yine aynı mekanizmanın kontrolü altında olabileceği kısa süre önce laboratuvarımız tarafından rapor edilmişti. <i>B. subtilis</i>'te iki hücre dışı sinyal peptidi, ComX feromonu ve CSF (Kompetans ve Sporulasyon Faktörü) ComA transkripsiyon faktörünü kontrol ederek kompetans gelişimi ve sürfaktin biyosentezini sağlamaktadır. Önceki çalışmamızda <i>opp</i> operonunun bloke edildiği mutantlar oluşturulmuş ve dipeptid antibiyotik basilisin biyosentezinin Spo0K (Opp) kontrolü altında gerçekleştiği gösterilmişti. Şimdiki çalışma, bahsedilen regülasyon mekanizmasında var olan diğer genetik belirleyicilerin basilisin biyosenteziyle olan muhtemel ilişkilerini aydınlatmayı amaçlamıştır. Bu amaç çerçevesinde, öncelikli olarak <i>srfA</i> operonu ve <i>comP</i>, <i>comA</i>, <i>phrC</i>(CSF), <i>phrA</i>, <i>comQ</i>, <i>abrB</i>, <i>spo0A</i>, <i>spo0H</i>, <i>comS</i> ve <i>srfB</i> genlerinin insersiyonel inaktivasyonları (kaset mutajenezleri) yapılmış, bunun için basilisin üreticisi suş <i>B. subtilis</i> PY79 ilgili genlerin bloke mutantlarının kromozomal DNA'larıyla transforme edilmiştir. Daha sonra seçilen transformantlarda basilisin üretimindeki değişiklikler "kağıt diski-agar difüzyon" metodu ile incelenmiştir. PhrC(CSF), ComQ-ComX ve ComA-ComP'nin bacilysin biyosentezi için gerekli olduğu bulunmuştur. <i>srfA</i> operonunun inaktivasyonu bacilysin üretme kabiliyetinin yok olmasına neden olmuş, bu da sürfaktin operonunun basilisin biyosentezinde doğrudan fonksiyonu olduğunu kanıtlamıştır. <i>abrB</i> geninin <i>spo0A</i> mutantlarında bloke edilmesi <i>spo0A</i> mutasyonunun neden olduğu basilisin-negatif fenotipi suprese etmiş, aynı genin basilisin üreticisi suş PY79'da bloke edilmesi ise basilisin üretimini yaklaşık iki kat arttırmıştır.</p>

9- Anahtar Kelimeler :

B. subtilis, bacilyisin, hücre yoğunluğu algılama sinyali, sporulasyon, kompetans.

10- Projede Yapılan Çalışmaların Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ) :

Makale

- 1) “Karatas, A., Çetin S., Özcengiz, G. The effect of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilyisin biosynthesis in *Bacillus subtilis*”. *BBA-Gene Structure and Expression* isimli dergide basılmak üzere kabul edilmiştir.

Tebliğ

- 1) Çetin, S., Karataş, A. and Özcengiz G. *Bacillus subtilis*'te bacilyisin biyosentezi için gerekli olan hücre yoğunluğu sinyali genlerinin kaset mutajenezi ile belirlenmesi. “12. Biyoteknoloji Kongresi” (17-21 Eylül 2001, Ayvalık). **Poster Özetleri Kitabı** s.146.
- 2) Özcengiz, G. 2001 Quorum sensing and secondary metabolite production in industrial microorganisms. Presented in “1st Eurasian Congress on Molecular Biotechnology” (17-21 October, 2001, Trabzon, Turkey). **Abstracts Book**. p.24.
- 3) Özcengiz, G., Karataş, A., Çetin, S., 2003. Deletion mutations in *comQ*, *comP*, *srf A*, and *abrB* genes and their effects on bacilyisin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Lecture to be presented in “Vth International Symp. on Industrial Microbiol. Biotechnol.” 3-5 September, 2003, Ankara

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu :

Gizli

Gizli Değil

PROJECT SUMMARY INFORMATION FORM

1- Project number : TBAG-1975 (100T098)
2- Related research group: Research Group of Basic Sciences
3- Commencement and termination dates of the project: 01.02. 2001-01.02.2002
4- Title of the project: Characterization of Quorum Sensing Control on Bacilysin Biosynthesis at Molecular Level
5- Project co-ordinator (principal investigator): Prof. Dr. Gülay Özcengiz Co-investigators: Dr. Ayten (Yazgan) Karataş Seçil Çetin
6- The name and address of the host institution: M.E.T.U, Department of Biology, 06531 Ankara
7- The name and addresses of financial support (s): TÜBİTAK-TBAG Atatürk bulvarı No:221 Kavaklıdere, 06100 Ankara
8- Abstract: <p>In <i>Bacillus subtilis</i>, competence development, lipopeptide antibiotic surfactin biosynthesis and sporulation initiation are controlled by “quorum-sensing” (cell density signaling) global regulation mechanism. Biosynthesis of dipeptide antibiotic bacilysin produced by certain strains of <i>B. subtilis</i> was recently reported by our laboratory to be under the control of the same mechanism. In <i>B. subtilis</i>, two extracellular signaling peptides, ComX pheromone and CSF (Competence and Sporulation Factor) stimulate the development of genetic competence and surfactin biosynthesis in response to high cell density (quorum-sensing) by regulating the activity of transcription factor ComA. In our previous study, we have shown that biosynthesis of dipeptide antibiotic bacilysin is linked to Spo0K (Opp)-dependent manner by constructing <i>oppA</i>-disrupted mutants of <i>B. subtilis</i>. The objective of the present research is to elucidate the possible relationships between the other genetic determinants involved in this control system and bacilysin biosynthesis. In view of this objective, insertional inactivations via cassette mutagenesis of certain genetic components of quorum-sensing global regulation, namely <i>srfA</i> operon, <i>phrC</i> (CSF), <i>phrA</i>, <i>comA-comP</i>, <i>comQ</i>, <i>abrB</i>, <i>spo0A</i>, <i>spo0H</i>, <i>comS</i> and <i>srfB</i> genes were made by transforming bacilysin producer strain <i>B. subtilis</i> PY79 with chromosomal DNAs from the blocked mutants of corresponding genes. After blocking these genes, paper-disc agar diffusion assay was performed to determine as to whether bacilysin production is affected. PhrC (CSF), ComQ-ComX and ComA and ComP were found to be essential for bacilysin biosynthesis. On the other hand, the disruption of <i>srfA</i> operon in the bacilysin producer resulted in a bacilysin-negative phenotype, thus our study verified that <i>srfA</i> operon functions directly in the production of bacilysin. The disruption of <i>abrB</i> gene in <i>spo0A</i>-deleted mutants suppressed the bacilysin-negative phenotype whereas the disruption of the same gene in the wild type strain resulted in about a two-fold increase in the production of bacilysin.</p>

9- Key words : *Bacillus subtilis*, bacilysin, quorum sensing, sporulation, competence

10- Publications resulting from the project (papers, presentation):

Paper

- 1) "Karatas, A., Çetin S., Özcengiz, G. The effect of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*". *BBA-Gene Structure and Expression* isimli dergide basılmak üzere kabul edilmiştir.

Presentation

- 1) Çetin, S., Karataş, A. and Özcengiz G. *Bacillus subtilis*'te bacilysin biyosentezi için gerekli olan hücre yoğunluğu sinyali genlerinin kaset mutajenezi ile belirlenmesi. "12. Biyoteknoloji Kongresi" (17-21 Eylül 2001, Ayvalık). **Poster Özetleri Kitabı** s.146.
- 2) Özcengiz, G. 2001 Quorum sensing and secondary metabolite production in industrial microorganisms. Presented in "1st Eurasian Congress on Molecular Biotechnology" (17-21 October, 2001, Trabzon, Turkey). **Abstracts Book**. p.24.
- 3) Özcengiz, G., Karataş, A., Çetin, S., 2003. Deletion mutations in *comQ*, *comP*, *srf A*, and *abrB* genes and their effects on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Lecture to be presented in "Vth International Symp. on Industrial Microbiol. Biotechnol." 3-5 September, 2003, Ankara

11- Confidence of the project results :

Gizli

Gizli Değil