

***Streptomyces coelicolor*'daki METABOLİK
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Recep LİMAN
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos – 2007

**Bu tez çalışması TÜBİTAK BİDEB 2214-Yurtdışı Araştırma Burs
Programı tarafından desteklenmiştir.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Recep LİMAN'ın "*Streptomyces coelicolor*'daki Metabolik Değişiklikler Üzerine Bir Araştırma" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 23.07.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. H. MEHTAP KUTLU

Üye : Prof. Dr. AHMET ÖZATA

Üye : Prof. Dr. MUHSİN KONUK

Üye : Prof. Dr. FEVZİ BARDAKÇI

Üye : Yard. Doç. Dr. HÜSEYİN BERBER

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Streptomyces coelicolor'daki METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Recep LİMAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2007, 107 sayfa

Streptomisetler antibiyotikleri de içeren sekonder metabolitleri üretme yeteneğine sahip olmalarıyla bilinen başlıca toprak bakterileridir. Bu grubun üyeleri aynı zamanda sporulasyon olarak bilinen düzenli bölünme işlemi geçiren havasal hiflerin ereksiyonunu içeren çok kompleks morfolojik farklılıklar göstermektedirler. *Streptomyces coelicolor* Streptomiset genetik çalışmaları için model organizmadır ve genom dizisi belirlenmiştir.

SCO2836 ve SCO2837'nin açık okuma çerçeveleri *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomunun temel hücresel fonksiyonlar için gerekli genleri içeren korunmuş merkez çekirdek bölge içerisinde bulunmaktadır. SCO2836 ve SCO2837 genleri sırasıyla glikozil transferaz ve galaktoz oksidaz domaini içerdiği sanılan proteinleri kodlar. Bu çalışmada SCO2836 ve SCO2837 genleri *in vitro* olarak Tn5062 transpozonu ile mutasyona uğratıldı ve bu mutasyonların fenotipik etkileri farklı ortamlarda araştırıldı. Her iki mutantta da ortam koşullarına bağlı olarak havasal gelişmede gecikme gösterdi. Bu mutasyonlar Southern Blot ile doğrulandı. Ayrıca bu iki genin promotor bölgesinin olduğu kısım pRLux87 plazmitine aktarılarak farklı besiyerlerinde lusiferaz aktivitesine de bakıldı.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces*, mutant, transpozon, glikozil transferaz, galaktoz oksidaz

ABSTRACT

PhD Dissertation

AN INVESTIGATION ON METABOLIC CHANGES IN *Streptomyces coelicolor*

Recep LIMAN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2007, 107 pages

Streptomyces are soil bacteria mainly known by their ability to produce secondary metabolites including antibiotics. The members of this genus also display a very complex morphological differentiation, involving the erection of aerial hyphae that undergo a coordinated septation process known as sporulation. *Streptomyces coelicolor* is a model organism for *Streptomyces* genetics studies and its genome sequence has been determined.

The SCO2836 and SCO2837 open-reading frames are located within the conserved central core region of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome, which contain genes required for essential cellular functions. The SCO2836 and SCO2837 genes encode for putative proteins containing glycosyl transferase and galactose oxidase domains, respectively. In this study, SCO2836 and SCO2837 were mutagenised *in vitro* by Tn5062 transposon and phenotypic effects of these mutations were investigated in different media. Both mutants showed delayed aerial development in a medium-dependent manner. These mutations were confirmed by Southern Blot. Additionally, promoter region of these two genes was transferred to pRlux87 plasmid and looked at luciferase activity in different media.

Keywords: *Streptomyces*, mutant, transposon, glycosyl transferase, galactose oxidase

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TEŞEKKÜR.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Aktinomisetler	1
1.2. Streptomisetler.....	1
1.2.1. Streptomisetlerin ekolojik nişleri	3
1.2.2. Streptomisetlerin hayat döngüsü	3
1.2.3. Streptomiset genetiği	4
1.2.3.1. <i>Streptomyces coelicolor</i> A(3).....	5
1.2.4. Streptomisetlerin genom yapısı	7
1.3. Morfolojik Farklılıkların Fizyolojisi ve Moleküler Genetiği.....	9
1.3.1. <i>Bld</i> mutantlar	9
1.3.1.1. Ekstraselüler komplemantasyon.....	14
1.3.2. SapB.....	16
1.4. Rodlet Tabakası	19
1.5. <i>Whi</i> Mutantlar	22
1.6. <i>in vitro</i> Transpozon Mutajenezisi	25
1.7. SCO2836	27
1.8. SCO2837	31
2. MATERYAL METOT	37
2.1. Bakteri Türleri	37
2.2. Deneyleerde Kullanılan Kozmit ve Plazmitler	38

2.3. Kimyasallar ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması	38
2.3.1. Çözeltiler	38
2.3.2. Besiyerleri	41
2.4. Kullanılan Antibiyotikler	45
2.5. Mavi-beyaz Tarama	45
2.6. Kültür Koşulları	46
2.6.1. <i>E. coli</i> suşlarının üretilmesi ve saklanması	46
2.6.2. Streptomiset türlerinin üretilmesi ve saklanması	46
2.7. Transformasyon	47
2.7.1. Elektrokompotent <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin hazırlanması	47
2.7.2. Elektrokompotent <i>E. coli</i> JM109 hücreleri yardımıyla transformasyon	47
2.7.3. Elektrokompotent <i>E. coli</i> ET12567 hücrelerinin hazırlanması	48
2.7.4. Elektrokompotent <i>E. coli</i> ET12567 hücreleri yardımıyla transformasyon	48
2.8. İntergenerik Konjugasyon	48
2.9. DNA Manipülasyonları ve Görüntüleme	49
2.9.1. Plazmitlerin izolasyonu	49
2.9.2. Streptomiset genomik DNA'sının izolasyonu	50
2.9.3. Enzimatik reaksiyonlar	51
2.9.4. Ligasyonlar	51
2.9.5. Agaroz jel elektroforezi	51
2.9.6. DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri kazanılması	52
2.10. Southern Blot	52
2.10.1. Digoksjenin işaretli problemlerin hazırlanması	52
2.10.2. Blotlama	53
2.10.3. Hibridizasyon	54
2.10.4. İmmünolojik Tespit	54
2.11. Genetik Komplemantasyon	55
2.12. Mutant Türlerin Fenotipik Analizleri	60
2.13. Ekstraselüler Komplemantasyon	60

2.14. <i>Streptomyces coelicolor</i> SCO2836 ve SCO2837 Genlerinin Ekspresyon (İfade) Çalışmaları	60
3. BULGULAR	63
3.1. Elektrokompotent Hücrelerinin Hazırlanması, Saklanması ve Transformasyon	63
3.2. Streptomiset Türlerinin Üretilme ve Saklanması	63
3.3. Kozmit ve Plazmitlerin Elde Edilmesi.....	63
3.4. Southern Blot Analizleri	64
3.5. Genetik Komplementasyon	66
3.6. Mutant Türlerin Fenotipik Analizleri	67
3.7. Ekstraselüler Komplementasyon	78
3.8. <i>Streptomyces coelicolor</i> SCO2836 ve SCO2837 Genlerinin Ekspresyon (İfade) Çalışmaları	79
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	82
KAYNAKLAR.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Streptomisetlerin hayat döngüsü.....	4
1.2.	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) tarafından üretilen antibiyotikler	6
1.3.	<i>S. coelicolor</i> A3(2) kromozomunun dairesel gösterimi	8
1.4.	<i>S. coelicolor</i> 'da havasal büyüme ile ilgili yüzey proteinlerin oluşumuna yol açan <i>bld</i> genlere bağlı alan ekstraselüler sinyal akışı.....	15
1.5.	<i>Ram</i> gen kümesi.....	17
1.6.	<i>a-RamS</i> 'nin SapB'ye dönüşmesi b-Olgun SapB.....	18
1.7.	<i>S. coelicolor</i> 'da havasal hif oluşumun bütünleştirilmiş modeli.....	20
1.8.	<i>S. coelicolor</i> erken <i>whi</i> mutantlarının taramalı elektron mikroskop resimleri.....	23
1.9.	Tn5062'nin organizasyonu	26
1.10.	<i>S. coelicolor</i> SCO2836, SCO2837 ve komşu genlerin şematik gösterimi	27
1.11.	SCO2836 proteinin tahmin edilen domainleri.....	28
1.12.	SCO2837 proteinin tahmin edilen domainleri.....	32
1.13.	Galaktoz oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon	33
1.14.	Olgun GO'nun yapısı	34
2.1.	Genetik komplemantasyonun şematik gösterimi	57
2.2.	pREC3'ün şematik oluşumu	62
3.1.	SCO2836, SCO2837 ve komşu genlerin a- <i>S. coelicolor</i> M145 b- SCE20.2.DO1 ve c- SCE20.2.H04'te şematik gösterimi	65
3.2.	Southern Blot sonuçları	66
3.3.	SFM plaklarında fenotipik çalışmalar	69
3.4.	Glukoz içeren MM plaklarında fenotipik çalışmalar	70
3.5.	Mannitol içeren MM plaklarında fenotipik çalışmalar	71
3.6.	NMMP plaklarında fenotipik çalışmalar.....	72
3.7.	R2YE plaklarında fenotipik çalışmalar	73
3.8.	R5 plaklarında fenotipik çalışmalar	74
3.9.	Sükrozsuz R2YE plaklarında fenotipik çalışmalar	75
3.10.	Sükrozsuz R5 plaklarında fenotipik çalışmalar	76

3.11.	DK2836 ve DK2837 mutantlarının karşılaştırılması	77
3.12.	Ekstrakomplementasyon çalışması	79
3.13.	<i>Streptomyces coelicolor</i> SCO2836 ve SCO2837 genleri promotor bölgesi ekspresyon çalışmaları	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Aktinomisetales takımının taksonomik sınıflandırılması.....	2
1.2.	<i>Streptomyces coelicolor</i> 'da mutasyona uğratıldığı zaman <i>bld</i> fenotiple sonuçlanan genler	10
1.3.	<i>S. coelicolor</i> kozmit kütüphanesinde Tn5062 insersiyon analizleri	27
1.4.	SCO2836'nin aminoasit dizisi	28
1.5.	SCO2837'nin aminoasit dizisi	32
2.1.	Çalışmada kullanılan bakteri türleri.....	37
2.2.	Çalışmada kullanılan kozmit, plazmit ve içerdikleri genler	38
2.3.	Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları	45
2.4.	IPTG ve X-Gal'in stok ve çalışma konsantrasyonları.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Di	: Dirençli
Du	: Duyarlı
β	: Beta
γ	: Gamma
ε	: Epsilon
σ	: Sigma
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
<i>Amf</i>	: Havasal misel oluşumu
Amp	: Ampisilin
Aprm	: Apramisin
ATP	: Adenozin trifosfat
C	: Sitozin
CDA	: Kalsiyum bağlı lipopeptit antibiyotik
Chp	: Çaplin
CIP	: Dana bağırsak alkalın fosfataz
Cys	: Sistein
DHA	: Dihidroalanin
Da	: Dalton
DK	: Duple kros-over
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E</i>	: <i>Escherchia</i>
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Egfp	: Artırılmış yeşil floresan protein
G	: Guanin
GO	: Galaktoz oksidaz
GT	: Glikozil transferaz
Hgr	: Higromisin
IPTG	: İsopropil- β -D-tiyogalaktopiranosid
Klf	: Kloramfenikol
Km	: Kanamisin

LB	: Luria Bertani
M	: Molar
MA	: Moleküler ağırlık
Mb	: Megabaz
MM	: Minimal medium
Na	: Nalidiksik asit
NMMP	: Minimal sıvı ortam
OD	: Optik yoğunluk
ORF	: Açık okuma çerçevesi
<i>S</i>	: <i>Streptomyces</i>
SapB	: Spor-ilişkili proteinler
SCO	: <i>Streptomyces coelicolor</i>
SFM	: Soya unu mannitol
TCA	: Trikloroasetik asit
Tn	: Transpozon
Tyr	: Tirozin
X-Gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
μ l	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
<i>bld</i>	: Kel
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cm	: Santimetre
ddH ₂ O	: Duple distile su
dH ₂ O	: Distile su
<i>dnrQS</i>	: daunoribosinQS
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kV	: Kilovolt
l	: Litre
mg	: Miligram
mJ	: MiliJul
ml	: Mililitre

m^2	: Metrekare
mM	: Milimolar
mmHg	: Milimetre Civa
msn	: Milisaniye
<i>oriC</i>	: Replikasyon orijini
<i>ram</i>	: Hızlı havasal misel
rdl	: Rodlin
rpm	: Dakikadaki dönüş
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
v	: Hacim
w	: Ağırlık
<i>whi</i>	: Beyaz

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardımını, bilgisini, güler yüzünü ve ilgisini esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU'ya,

Çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana çok şey kattığına inandığım ve pek çok konuda örnek aldığım çok değerli hocam Prof. Dr. Muhsin KONUK'a,

Güler yüzünü ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya,

Laboratuar çalışmaları sırasında her türlü imkanı sağlayan, bilgi ve engin tecrübelerinden faydalandığım ve en önemlisi bana katlanabilen saygıdeğer hocalarım; Dr. Paul DYSON, Dr. Ricardo del SOL ve her aşamada yardımcı olan değerli arkadaşım Bhavesh V. MISTRY'ye,

Tezin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım; Arş. Grv. Yasin EREN, Arş. Grv. Dilek AKYIL, Arş. Grv. S. Feyza KUŞ ve Arş. Grv. Arzu ÖZKARA'ya,

Maddi ve manevi her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve varlıkları ile bana güç veren aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Recep LİMAN

Ağustos 2007

1. GİRİŞ

1.1. Aktinomisetler

Aktinomiset terimi *aktis* (ışın demeti) ve *mykes* (mantar) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur ve bu terim organizmaların morfofilileri dikkate alınarak verilmiştir. Aktinomisetler Gram pozitif toprak bakterileri olup topraktaki popülasyonları toprak tipine göre değişmektedir. G+C oranı oldukça yüksek olup (> %55), selülaz, kitinaz ve lignin peroksidaz gibi ekstraselüler enzimlere sahip olduklarından dolayı dekompozisyon ve mineralizasyon döngülerinde çok önemli rol oynarlar. 16S rRNA'ları dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada 10 alt takıma ayrılmıştır ve hala bu grubun büyük bir çoğunluğu sınıflandırılmayı beklemektedir (Çizelge 1.1). Aktinomisetlerin bazı üyeleri (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ve *Corynebacterium diphtherae* gibi) insan patojenleridir (Embley ve Stackebrandt 1994).

1.2. Streptomisetler

Streptomisetler, Aktinomiset familyasının en çok çalışılan ve en iyi bilinen cinsini oluşturmaktadır. Streptomisetler yüksek oranda G+C (%70-74) içeriğine sahiptirler ve hayat döngüleri çok komplekstir. Streptomisetler; Gram-pozitif miselli toprak bakterileri olup, çok miktarda sekonder metabolit üretirler. Bunlar tıp ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Miyadoh 1993).

Streptomiset cinsi hem kemotaksonomik olarak hem de fenotipik karakterler bakımından belirlenmiştir. Ana özellikleri 16S rRNA dizileri, hücre duvar analizleri, yağ asit ve lipit bileşimleridir (Williams ve ark. 1989; Wellington ve Saunders 1992). Streptomiset cinsi üzerinde son 30 yıl boyunca çok sayıda sistematik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen izole edilen türler çevrede bulunan türlerin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır. 1964 yılında yapılan Uluslararası Streptomiset Projesi'nden itibaren, standart fenotipik kriterleri kullanarak geçerli tür tanımları yapılmaya başlanmıştır. Buna rağmen bu kriterler

Çizelge 1.1. Aktinomisetales takımının taksonomik sınıflandırılması¹

Altakım	Aile	Cins
Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Catellatospora</i> , <i>Couchioplanes</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Pilimelia</i> <i>Dactylosporangium</i>
Frankineae	Frankiaceae Sporichthyaceae Geodermatophilaceae Microsphaeraceae Acidothermaceae	<i>Frankia</i> <i>Sporichthya</i> <i>Geothermatophills</i> , <i>Blastococcus</i> <i>Microsphaera</i> <i>Acidohermus</i>
Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kibdelosporium</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Saccarothrix</i> , <i>Streptoalloteichus</i> , <i>Thermocrispum</i> .
Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
Corynebacterium	Nocardiaceae Gordoniaceae Mycobacteriaceae Dietziaceae Tsukamurellaceae Corynebacteriaceae	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> . <i>Gordonia</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Dietzia</i> <i>Tsukamurella</i> <i>Corynebacterium</i> , <i>Turicella</i>
Micrococcineae	Micrococcaceae Brevibacteriaceae Cellulomonadaceae Dermabacteraceae Intrasporangiaceae Jonesiaceae Microbacteriaceae Promicromonosporaceae	<i>Micrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Rorhia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Stomatococcus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Cellulomonas</i> , <i>Oeskovia</i> , <i>Rarobacter</i> <i>Dermabacter</i> , <i>Brachybacterium</i> <i>Intrasporangium</i> , <i>Sanguibacter</i> , <i>Terrabacter</i> <i>Jonesia</i> <i>Microbacterium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Rathaybacter</i> <i>Promicromonospora</i>
Actinomyineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Arcanobacterium</i>
Propionibacterianeae	Propionibacteraceae	<i>Propionibacterium</i> , <i>Luteococcus</i> , <i>Microlunatus</i> , <i>Propioniferax</i>
Streptosporangineae	Streptosporangiaceae Thermomonosporaceae Nocardiopsaceae	<i>Streptosporangium</i> , <i>Herbidospira</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspota</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> <i>Thermomonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i> <i>Nocardiopsis</i>
Glycomycineae	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih./> 2006

oldukça düşük çıkmıştır. Çünkü bir türü diğer bütün türlerle karşılaştırmadan türlerin üremesi devam etmektedir (Williams ve ark. 1983).

1.2.1. Streptomisetlerin ekolojik nişleri

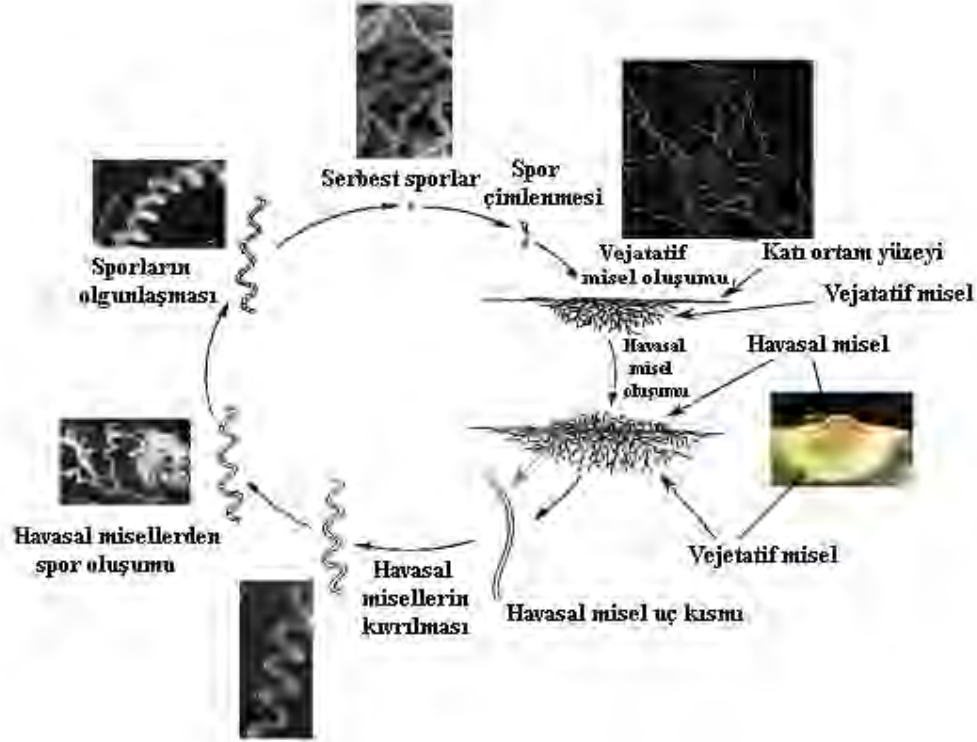
Streptomisetler toprak bakterileri arasında en çok ve her yerde bulunan grubu teşkil ederler (Hodgson 2000). Sahip oldukları çok çeşitli metabolik işlem ve biyotransformasyon yeteneklerinden dolayı çok önemli olayların gerçekleşmelerini sağlarlar. Ölü bitki, hayvan ve mantar polimerlerini bileşenlerine ayırmak suretiyle toprak biyodegradasyonunda önemli rol oynarlar (McCarthy ve Williams 1992; Wang ve ark. 1989). Asidik toprağa kitin ilavesi asidofilik Streptomisetlerin kitinolitik aktivite kazanmasına yol açarak toprağın amonifikasyonuna sebep olur ve neticede nütrofiller tarafından kolonizasyon gerçekleşir (Williams ve Robinson 1981).

Streptomisetler besin varlığında toprakta çok uzun süre varlıklarını sürdürürler. Ancak topraktaki besin miktarı süresiz olduğu için Streptomisetler besin durumuna göre sporulasyon ve çimlenme periyodunu izlerler. Sıcaklık, pH, CO₂, O₂ ve nem gibi diğer çevresel faktörler de topraktaki Streptomisetlerin aktivitesini etkiler (Vionis ve ark. 1998).

1.2.2. Streptomisetlerin hayat döngüsü

Streptomisetlerin hayat döngüsü Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Streptomisetler hücre farklılaşması, antibiyotik oluşumu, sporulasyon ve programlanmış hücre ölüm mekanizmasını içeren belirli bir hayat döngüsüne sahiptir. Hayat döngüsü sporların çimlenme tüpünü oluşturmasıyla başlar ve buradan substrat misel olarak da adlandırılan vejetatif misellerin yayılması gerçekleşir. Birçok bakteri türünden farklı olarak dallanarak büyüyen vejetatif hifleri filamentlidir ve hifler substrat içerisinde genişleyerek yoğun miselyumları oluştururlar. Bu hücreler hareketli olmadıkları için ortamdaki besin miktarı azaldığı zaman açlık tehlikesi ile karşı karşıya kalırlar. Besin miktarının azalması ve diğer fizyolojik stresler vejetatif misellerin morfolojik ve fiziksel olarak

değişmesine yol açar. Bu duruma karşı Streptomiset kolonileri ikincil filament hücre tipi olan havasal miselleri ve antibiyotik gibi birçok sekonder metabolitleri oluştururlar. Koloni yüzeyinde büyüyen havasal hifler bulanık ve beyaz renklidir. Oluşan havasal hifler ise gri renkli sporları oluşturur (Chater 2001; Miguélez ve ark. 2000; Flardh 2003; Willey ve ark. 2006; Challis ve Hopwood 2003).



Şekil 1.1. Streptomisetlerin hayat döngüsü²

1.2.3. Streptomiset genetiği

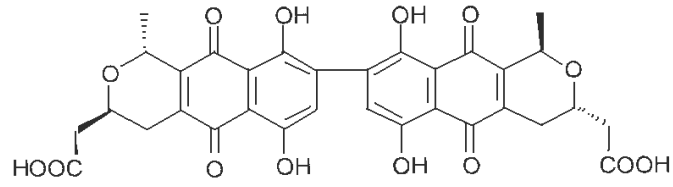
Streptomiset genetik çalışmaları 1954 yılında David Hopwood'un doktora çalışmasıyla birlikte başlamıştır. Model organizma olarak mavi renkli sekonder metabolit ürettiği için *S. coelicolor* A3(2) seçilmiştir ve bu tür günümüze kadar Streptomiset genetik çalışmalarının temelini oluşturmuştur. 1980 yılına kadar *in vivo* çalışmalarda 100'den fazla genin detaylı genetik çalışmaları yapılmış ayrıca

² http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html 2006

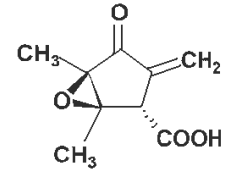
plazmit ve bakteriyofajların izolasyonları gerçekleştirilmiştir. 1990 yılına kadar olan *in vitro* çalışmalarda ise ilk gen klonlanması, promotor dizilerinin izolasyonu, antibiyotik sentez yollarının araştırılması ve ilk transpozonun keşfi yapılmış, 1990 yılından sonraki bölüm olan *in silico* çalışmalarda ise *S. coelicolor* A(3) ve *S. avermitilis*'in genom dizilişleri çıkartılmıştır (Hopwood 1999).

1.2.3.1. *Streptomyces coelicolor* A3(2)

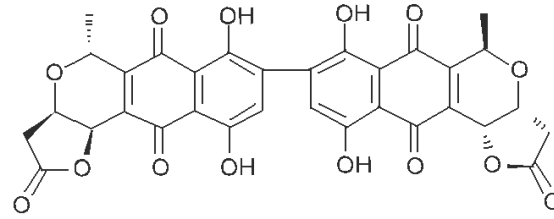
Streptomyces coelicolor A3(2) terimi ilk defa Hopwood (1999) tarafından mavi pigmentli ve agarı eriten tür olarak tanımlanmıştır. *Streptomyces coelicolor* diğer Streptomisetlere benzer şekilde, kimyasal yönden farklı çeşitli antibiyotiklere sahiptir (Şekil 1.2). Aktinorhodin ilk defa Almanya'nın Göttingen şehrinde Brockman ve Hieronimus (1955) tarafından *Streptomyces coelicolor*'dan izole edilmiş ve genetik olarak Wright ve Hopwood (1976a) tarafından çalışılmıştır. Bu bileşik pH 8.5'in altında kırmızı renkli iken üstünde mavi renklidir. Andösilprodigiosin kırmızı renkli bir pigmenttir ve ilk olarak diğer türlerden izole edilmiştir. *Streptomyces coelicolor*'da ise ilk defa Rudd ve Hopwood (1980) tarafından tanımlanmıştır. Kalsiyum bağlı lipopeptit antibiyotik (CDA) *Streptomyces coelicolor* A3(2)'de Lakey ve ark. (1983) tarafından tanımlanmış ve 1997 yılında da kimyasal olarak karakterize edilmiştir (Kempster ve ark. 1997). Metilenomisin ilk olarak *S. violaceoruber*'de Haneishi ve ark. (1974) tarafından tanımlanmıştır. Wright ve Hopwood (1976b) *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin SCP1 plazmiti taşıyanlarda bu antibiyotiğin oluştuğunu göstermişlerdir.



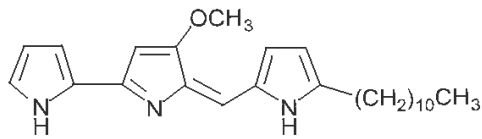
Aktinorhodin



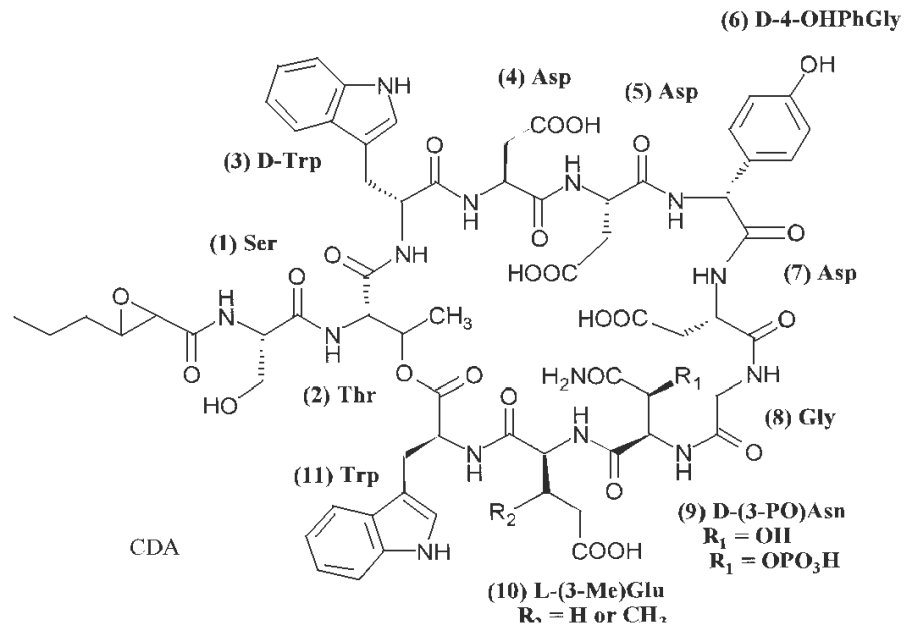
Metilenomisin



γ -Aktinorhodin



Andösilprodigiosin



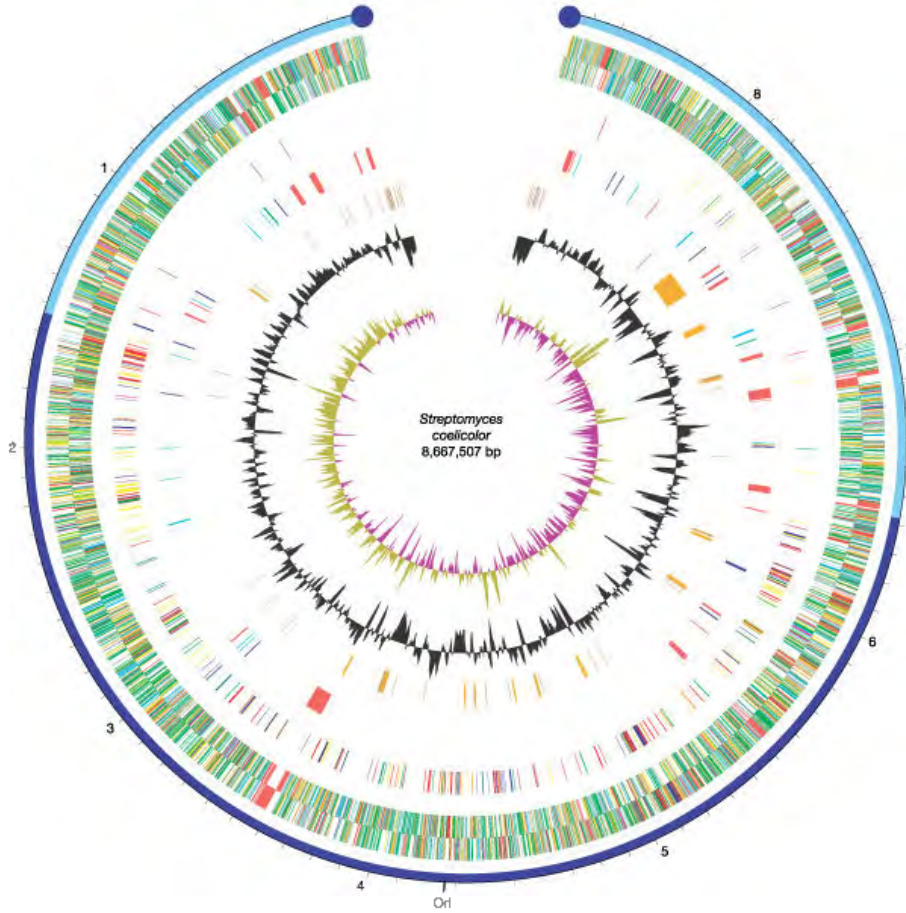
Şekil 1.2. *Streptomyces coelicolor* A3(2) tarafından üretilen antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000)

1.2.4. Streptomisetlerin genom yapısı

Streptomisetlerin kromozomları diğer bakterilerden farklı olarak düzdür. Streptomiset kromozomları hakkındaki bilgilerin çoğu *S. coelicolor* A3(2) (Bentley ve ark. 2002) ve *S. avermitilis*'in (Ikeda ve ark. 2003) genom dizilişlerinin belirlenmesiyle elde edilmiştir.

S. coelicolor A3(2) kromozomunun yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiş olup büyüklüğü 8667507 bp'dir. G+C içeriği oldukça yüksektir (%72.12) ve kodlandığı tahmin edilen 7825 geni vardır. Kromozomun ortasına yerleşmiş olan replikasyon orijini (*oriC*), uç kısımlarda ise ters çevrilmiş tekrarlardan oluşur ve bu kısımların 5' uçlarına terminal proteinler kovalent olarak bağlanır. Ters çevrilmiş tekrarların uzunluğu *S. avermitilis*'de 174 bp iken, *S. griseus*'da 24 kb, *S. coelicolor*'da 21.6 kb, *S. rimosus*'da ise 550 kb'dir (Volf ve Altenbucher 1998). *oriC* merkezin 61 kb solundadır. Kromozomun merkez çekirdek bölgesi 1.5-6.4 Mb arasında bulunur ve bu kısım yaşam için gerekli olan temel genleri (hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon gibi) kapsar. Diğer iki kol ise (1.5 Mb sol kol, 2.3 Mb sağ kol) temel olmayan genleri (sekonder metabolit, hidrolitik ekzoenzimler ve gaz vezikül proteinleri gibi) kapsar.

Kromozomun %12.3'lük bölümü protein kodlayan genleri (sigma faktörleri, iki-bileşimli düzenleyici sistemleri, DNA'ya bağlı olduğu düşünülen proteinler ve birçok serin/threonin protein kinazlar), %7.3'lük bölümü transport proteinlerini (ABC transport, ABC permeaz, ATP bağlı proteinler ve akıntı protenleri) ve %10.5'lik bölümü ise salgı proteinlerini (proteaz/peptidaz, kitinaz/kitizonazaz, selülaz/endoglukanasaz, amilaz ve pektat lizas) kodlar. Ayrıca kromozomun bir kısmı sekonder metabolizma (antibiyotik, siderofor, lipit ve diğer moleküller) için gerekli olan genleri kodlar. *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin gen dizilişi ve muhtemel ürünleri hakkındaki daha geniş bilgilere <http://streptomyces.org.uk/S.coelicolor/index.html> adresinden ulaşılabilir.



Şekil 1.3. *S. coelicolor* A3(2) kromozomunun dairesel gösterimi (Bentley ve ark. 2002). Dıştaki ölçek saat yönünün tersinde Mb şeklinde numaralandırılmış olup kromozomun çekirdek kısmı koyu mavi ile kolları ise açık mavi ile gösterilmiştir. Dışdan içeri doğru; 1. ve 2. daireler sırasıyla arkadaki ve lider iplikleri işaret eder ve siyah enerji metabolizmasını, kırmızı transfer bilgi ve sekonder metabolizmasını, koyu yeşil yüzeyde bulunan genleri, cam göbeği büyük moleküllerin degradasyonunu, mor küçük moleküllerin degradasyonunu, sarı merkez yada aracı metabolizmaları, soluk mavi düzenleyicileri, turuncu korunmuş hipoetikleri, kahverengi psödogenleri, soluk yeşil bilinmeyen genleri, yeşil ise çok yönlü genleri işaret eder.

3. daire temel genleri (hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon ve amino asit sentezi)

4. daire olasılık genlerini (kırmızı sekonder metabolizma, soluk mavi ekzoenzimleri, koyu mavi konservonları, yeşil gaz vezikül proteinleri)

5. daire hareketli elementleri (kahverengi transpozonları, turuncu lateral olarak elde edildiği düşünülen genleri)

6. daire G+C içeriğini

7. daire GC sapmasını [(G-C/G+C), haki renk >1 değerleri, pembe <1 değerleri] gösterir. Replikasyon orijini (Ori) ve terminal proteinler de (mavi daireler) gösterilmiştir.

1.3. Morfolojik Farklılıkların Fizyolojisi ve Moleküler Genetiği

Streptomisetler çok kompleks bir hayat döngüsüne sahiptir. Substrat (vejetatif) miseller oluşuktan sonra havasal miseller oluşur ve bunlarda sporları, sporlar ise vejetatif miselleri meydana getirirler. Böylece hayat devri tamamlanmış olur (Chater 1993). Streptomiset hayat döngüsünün morfolojik olayları için gerekli olan genler iki sınıfta (*bld* ve *whi* mutantlar) toplanmıştır. *Bld* (bald = kel) mutantlar havasal misel oluşmadan önce hayat döngüsünü bloke ederken (Nodwell ve Rosick 1998; Willey ve ark 1993; Champness 1988; Nodwell ve ark. 1999), *whi* (white = beyaz) mutantlar havasal hiflerde hücre bölünmesi ve sporların olgunlaşması için gereklidir (Kelemen ve ark. 1998; Chater 1993).

1.3.1. *Bld* mutantlar

Mutasyona uğratıldığı zaman *bld* fenotiple sonuçlanan genler Çizelge 1.2'de gösterilmiştir. *Bld* mutantlar havasal hiflerin oluşmasını engelleyerek yabani tipte görülen karakteristik bulanık morfolojik oluşumun görülmesini engellerler (Chater ve Horinouchi 2003; Elliot ve Talbot 2004; Wösten ve Willey 2000). Ayrıca *bld* mutantların bazıları antibiyotik üretimi (Champness 1988), katabolit represyon (Pope ve ark. 1996) ve hücre-hücre haberleşmesi (Willey ve ark. 1993) üzerinde de etkilidir. *Bld* mutantlarının diğer bir önemli bir özelliği de birçoğunun kültür ortamına bağlı olmasıdır. Zengin ortamlarda *bld* olarak tanımlanan birçok *bld* gen, zayıf karbon kaynaklarında (mannitol gibi) yabani tipte aynı özellik göstermektedir (Champness 1988).

BldA, nadir bir kodon olan UUA'nın translasyonu için gerekli olan lösil tRNA'yı kodlar (Lawlor ve ark. 1987; Leskiw ve ark. 1991). *BldA* geni şimdiye kadar 4 Streptomiset türü (*S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. griseus* ve *S. clavuligerus*) üzerinde çalışılmış ve bu gendeki mutasyon sırasıyla ilk üç Streptomiset türünde hem havasal hif oluşumunu hem de sekonder metabolit üretimini etkilerken, *S. clavuligerus*'da sadece havasal hif oluşumunu etkilemektedir. Çünkü *S. clavuligerus* sephamisin C, klavulanik asit gibi birçok sekonder metabolit üretir

fakat bu sekonder metabolitler; TTA kodonu taşıyan ve spesifik bir düzenleyici olan *ccaR* yoluyla sentezlenirler (Kwak ve ark.1996; Lawlor ve ark. 1987; Leskiw ve ark. 1991; Trepanier ve ark. 2002).

Çizelge 1.2. *Streptomyces coelicolor*'da mutasyona uğratıldığı zaman *bld* fenotiple sonuçlanan genler (Claessen ve ark. 2006)

Gen	Gen ürünü(leri)	Referans
Klasik <i>bld</i> mutantlar		
<i>bldA</i>	UUA kodonu için lösil tRNA	Lawlor ve ark. 1987, Leskiw ve ark. 1991
<i>bldB</i>	Muhtemelen homodimer oluşturan heliks-cevirme-heliks motifi içeren DNA-bağlanıcı protein	Pope ve ark. 1998; Champness 1988
<i>bldC</i>	MerR familyasının muhtemel transkripsiyonal aktivatörü	Hunt ve ark. 2005; Merrick 1976
<i>bldD</i>	<i>whiG</i> , <i>bldN</i> ve <i>sigH</i> promotorlarına bağlanan küçük DNA-bağlı protein	Elliot ve ark. 1998; Elliot ve ark. 2001
<i>bldG</i>	Muhtemelen anti-anti-sigma faktör	Champness 1998; Bignell ve ark. 2000
<i>bldH</i>	TTA kodonu içeren AdpA homoloğu	Champness 1998
<i>bldI</i>	Bilinmiyor	Leskiw ve Mah 1995
<i>bldJ</i>	Bilinmiyor	Nodwell ve ark. 1996
<i>bldK</i>	İndirekt olarak <i>bldJ</i> geni tarafından kodlanan 655 Dalton'luk signal peptini içeri alan oligopeptit permeaz	Nodwell ve ark. 1996; Nodwell ve Losick 1998
<i>bldL</i>	Bilinmiyor	Nodwell ve ark. 1999
<i>bldM</i>	Gelişmenin muhtemelen önceki ve geç safhalarında aktif olan cevap düzenleyici	Molle ve Buttner 2000
<i>bldN</i>	Gelişmenin muhtemelen önceki ve geç safhalarında aktif olan <i>bldM</i> promotor bölgesini tanıyan ECF sigma faktörü	Elliot ve ark. 2001; Yamazaki ve ark. 2000

Çizelge 1.2. (Devam) *Streptomyces coelicolor*'da mutasyona uğratıldığı zaman *bld* fenotiple sonuçlanan genler (Claessen ve ark. 2006)

Gen	Gen ürünü(leri)	Referans
Havasal hif oluşumunu aksatan diğer mutantlar		
<i>citA</i>	Sitrat sentaz. Kültür ortamının geri dönüşümsüz asidifikasyonundan dolayı havasal hif oluşumunda aksama olur.	Viollier ve ark. 2001a
<i>cya</i>	Adenilat siklaz. Kültür ortamının geri dönüşümsüz asidifikasyonundan dolayı havasal hif oluşumunda aksama olur.	Süsstrunk ve ark. 1998
<i>acoA</i>	Akonitat sitraz. Kültür ortamının asidifikasyonundan dolayı fenotipte kısmen bozulma	Viollier ve ark 2001b
<i>catB</i>	Katalaz. Mutantlar osmotik strese aşırı duyarlılık gösterirler.	Cho ve ark. 2000
<i>sigB</i>	<i>catB</i> 'nin ifade edilmesinin kontrolünden sorumlu RNA polimeraz sigma faktörü (σ^B)	Cho ve ark. 2001
<i>ChpA-H</i>	Çaplin familyası proteinlerini kodlayan genler	Claessen ve ark. 2003; Claessen ve ark. 2004; Elliot ve ark. 2003
<i>ramCSABR</i>	RamS öncüsü SapB'nin sentezi, modifikasyonu ve muhtemelen taşınmasıyla ilgili gen kümesi	Kodani ve ark. 2004; Keijser ve ark. 2002, Ma ve Kendall 1994
<i>brgA</i>	Bilinmiyor	Shima ve ark. 1996
<i>rsuA</i>	Anti-sigma faktör	Gehring ve ark. 2001
<i>anfC</i>	Bilinmiyor, Havasal gelişmeyi azaltır ve geciktirir.	Yonekawa ve ark. 1999
<i>clpPI</i>	ATP-bağımlı proteazın alt ünitesi	de Crecy-Lagard 1999
<i>relA</i>	(p)ppGpp sentetaz, havasal büyümesi geciktirir	Sun ve ark. 2001a

Bld mutantları arasında en pleiotropik olanı *bldB*'dir. *BldB*, 99 aminoasitlik küçük bir protein kodlar. *BldB* mutantları ayrıca antibiyotik üretimi ve katabolit represyonunu da etkiler (Champness 1988). Diğer *bld* genlerinden farklı olarak *bldB*'nin fenotipi karbon kaynağına bağlı değildir (Pope ve ark. 1996). Ayrıca *bldB*, Willey ve ark. (1993) hiyerarşik sinyal akışına da uymamaktadır.

BldC, *S. coelicolor*'da *bld* mutantlar arasında genetik olarak incelenen ilk 4 genden birisi olmasına rağmen karakterizasyonu ancak 2005 yılında yapılmıştır (Hunt ve ark. 2005). *BldC*'nin fenotipik karakterizasyonu, diğer *bld* mutantlarda olduğu gibi havasal misel oluşumu kültür ortamına bağlıdır. Havasal hif ve spor oluşumu mannitol, galaktoz ya da maltoz içeren minimal ortamda geri kazanılır (Merrick 1976). Hunt ve ark. (2005) *bldC*'nin MerR familyasının transkripsiyonal aktivatörü olarak bulunan DNA bağlanıcı domaini ile ilgili küçük DNA bağlanıcı proteinleri (68 aminoasit uzunluğunda) kodladıklarını bulmuşlardır. Ayrıca *bldC*'nin farklılaşma sırasında aktinorhodin ve andösilprodigosin aktivitesi üzerine de etkili olduklarını belirtmişlerdir.

BldD hem antibiyotik üretimi hem de morfolojik farklılaşma için gerekli olan bir genidir. *BldD* 167 aminoasitlik DNA-bağlanıcı protein kodlar ve bu protein dimer oluşturarak kendi promotörüne bağlanarak ifade edilmesi bu şekilde düzenlenir. *BldD* repressör protein üreterek bazı genlerin (*bldN*, *whiG* ve *sigH*) ifade edilmesini engeller (Elliot ve ark. 1998; Elliot ve ark. 2001).

BldN ekstrasitoplazmik fonksiyon (ECF) σ faktörünü kodlar ve σ^{bldN} diğer σ faktörlerinde bulunmayan N-terminal bölgesinde 86 aminoasitlik bir kısım (pro- σ^{bldN}) bulundurur. Meydana gelen bu proprotein σ^{bldN} daha sonra 86 aminoasitlik kısmı uzaklaştırarak olgun σ^{bldN} haline dönüşür. *BldN* transkripti vejetatif büyüme süresince görülmezken, havasal misel oluşumu sırasında şaşırtıcı derecede artar. *BldN* transkripsiyonunun aktivasyonu direkt ya da indirekt olarak *bldG* ve *bldH*'a bağlıdır. *BldD*, *bldN* promotörüne iki bölgeden bağlanmak suretiyle *bldN* transkripsiyonunu direkt olarak baskılamaktadır. σ^{bldN} havasal misel oluşumu için gerekli olan diğer bir genin (*bldM*) transkripsiyonunu da direkt olarak etkilemektedir (Elliot ve ark. 2001; Maureen ve ark. 2003). *Streptomyces griseus*'da *bldN* benzeri *adsA*'da havasal misel oluşumu gereklidir ve AdpA (A faktör bağımlı protein A) tarafından direkt olarak aktive edilmektedir (Yamazaki ve ark. 2000).

WhiG, sporulasyonun başlaması için kritik bir rol oynar ve yabancı tipte vejetatif büyüme süresince *bldD* tarafından baskılanmaktadır. *sigH*, strese cevap sigma faktörü, iki tane promotora (*sigHp1* ve *SigHp2*) sahiptir. *BldD* *sigHp2*'ye

vegetatif büyüme süresince bağlanarak *sigH*'ı baskılamaktadır (Kelemen ve ark. 2001, Elliot ve ark. 2001).

BldG, spesifik sigma faktörlerin aktivitesi ile düzenlenen anti-anti-sigma faktörünü kodlar ve *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* anti-anti-sigma faktör/anti-sigma faktörleri ile benzerlik gösterir. *S. clavuligerus bldG*'si, *S. coelicolor bldG*'si ile %92 özdeşlik %94 benzerlik gösterirken *S. avermitilis bldG*'si ile %91 özdeşlik %94 benzerlik gösterir. *S. coelicolor* ve *S. clavuligerus bldG*'sinin ifade edilmesi üç ayrı promotor tarafından gerçekleştirilir. *S. clavuligerus bldG*'si sephamisin C ve klavulanik asit üretimi için gerekli olan *ccaR* ve *claraR*'nin ifade edilmesini de kontrol ettiğinden *bldG* hem morfolojik farklılaşma için hem de sekonder metabolit üretimi için gereklidir (Dawn ve ark. 2005; Bignell ve ark. 2000).

BldK oligopeptitlerin hücre içerisine transferi için gerekli olan ABC (ATP-binding cassette = ATP-bağlanıcı kaseti) taşıyıcılarını kodlar. *BldK*, *bldJ* tarafından üretilen 655 Da'lık sinyalin kontrolü altındadır. *BldJ* tarafından uyarılan *bldK* ikinci bir ekstraselüler sinyal oluşturarak *bldA* ve *bldH*'ı uyarır (Nodwell ve ark. 1996; Nodwell ve Losick 1998).

Önceden *whiK* olarak adlandırılan *bldM*, C-terminal heliks-dönüş-heliks DNA-bağlı grubu ve tipik N-terminal fosforilasyon cebi ile cevap düzenleyicileri FixJ altfamilyasının üyelerini (203 aminoasit uzunluğunda) kodlar. *BldM*, *bldD* ekstraselüler komplemantasyon grubunun bir üyesidir. Bazı cevap düzenleyicileri *in vitro* olarak asetil fosfat ya da karbamoil fosfatla fosforlanabilirken *bldM* fosforlanamaz. Ayrıca *bldM*'nin farklı alelleri *S. coelicolor*'un gelişmesini farklı şekillerde etkilemektedir. Örneğin *bldM* sessiz mutasyonu havasal hif oluşumunu engellerken, diğer bazı mutasyonlarda havasal hif oluşmasına rağmen sporulasyon gerçekleşmemektedir (Molle ve Buttner 2000).

Gelişmenin erken döneminde meydana gelen ve glukoz içeren minimal ortamların asidifikasyonunu nötral hale çeviren cAMP-bağımlı metabolik olaylar izler ve bu sayede farklılaşma ile antibiyotik biyosentezi gerçekleşir. Birçok *bld* mutantları glukoz içeren besiyerlerinde asidogenik etki gösterirken, bazıları mannitol içeren nötral ortamlarda farklılaşma gösterebilmektedirler. Bu durum katabolit represyondaki bozukluklardan ve organik asitlerin birikmesinden

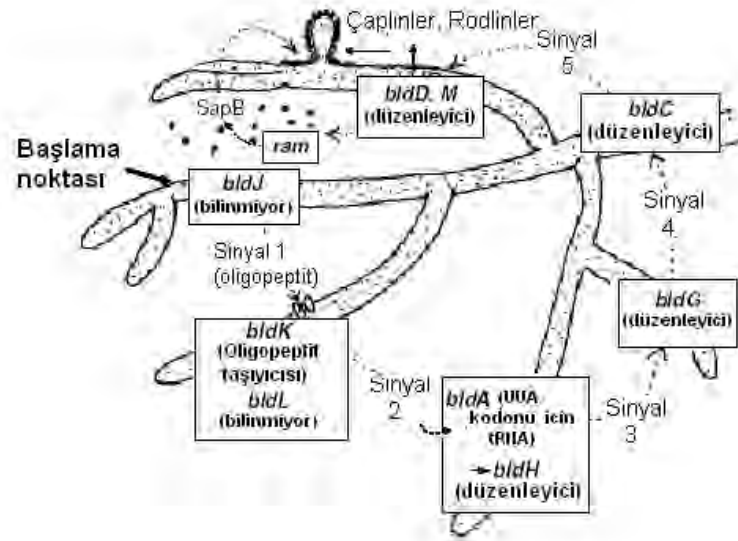
kaynaklanabilir. Dolayısıyla karbon kaynağı ve trikarboksilik asit metabolizması (TCA) büyüme ve farklılaşmada merkez rolü oynayabilir. Sitrik asit sentataz enzimi TCA'da asetil-CoA ile oksalaasetik asitin sitrik asite dönüşmesini sağlar. Bu enzimdeki mutasyon (*citA*), hem havasal hif oluşumunu hem de andösilprodigosin ve aktinorhodin sentezini koşullu olarak etkilemektedir. Diğer asidogenik *bld* mutantlarından farklı olarak, *citA* ve *bldJ* mutantları ortam nötralleştiği zaman havasal misel ve pigmentleri yeniden üretebilmektedirler. Ayrıca ekstraselüler komplemantasyon çalışmaları *citA*'nın *bldJ* ve *bldK* arasında yeni bir grup oluşturduğunu göstermektedir (Viollier ve ark. 2001a). TCA döngüsü sadece ATP oluşumu ve bileşiklerin yıkımına yol açmaz aynı zamanda glutamat biyosentezi için ketoglutarik asitin oluşumunu da sağlar. Sitrik asitin izositrik asite dönüşmesini sağlayan akonitaz enzimidaki mutasyon (*acoA*), havasal hif ve antibiyotik üretiminde bozukluklara yol açar. Dolayısıyla *acoA* mutanı hem sitrik asitin artmasına hem de glutamat oksokrofosine yol açar. Glukoz yerine mannitol kullanıldığı zaman *citA* mutanı normal bir şekilde büyür ve gelişirken *acoA* mutanında büyümede kusur vardır fakat uzun inkübasyon süresinden sonra farklılaşma gerçekleşmektedir. *AcoA* mutanının etkileri pH, sitrik asit birikimi ya da akonitaz enziminin diğer fonksiyonlarından kaynaklanabilir (Viollier ve ark 2001b). cAMP sentezinden sorumlu olan adenilat siklaz enzimidaki mutasyon (*cya*), ortamın asidik hale gelmesinden dolayı havasal misel ve pigment oluşumu gerçekleşmez, fakat dışarıdan cAMP verildiği zaman aktinorhodin biyosentezi artmaktadır (Süsstrunk ve ark. 1998).

1.3.1.1. Ekstraselüler komplemantasyon

Bld mutantlarda havasal hif oluşumu, R2YE gibi zengin besiyerlerinde mutant yabancı tipe ya da diğer *bld* mutantlara çok yakın olduğu zaman restore edilebilir. Bu durum ekstraselüler komplemantasyon olarak adlandırılır (Willey ve ark. 1991; Willey ve ark. 1993, Claessen ve ark. 2006).

Mutantlar arasındaki ilişki tek yönlüdür. Bir mutant verici olarak görev yaparken diğer mutant alıcı olarak görev yapar ve ekstraselüler molekül(ler) sadece alıcı tarafından alınır ve bu sayede havasal hif oluşumu restore edilir.

Ekstraselüler komplemantasyon bir hiyerarşi içerisinde yapılır (Şekil 1.4). *Bld* mutantları arasındaki bu hiyerarşi $bld261(bldJ) < bldK < bldA/H < bldG < bldC < bldD, bldM$ şeklindedir. *BldD* mutanlığı, diğer mutantların hepsiyle verici olarak ekstraselüler komplemantasyon gerçekleştirip alıcı olarak hiçbir mutantla ekstraselüler komplemantasyon gerçekleştirilmemesine karşın, *bldJ* mutanlığı verici olarak hiçbir mutantla ekstraselüler komplemantasyon göstermezken diğer bütün mutantlarla alıcı olarak ekstraselüler komplemantasyonu gerçekleştirebilmektedir. Bu hiyerarşi havasal misel hif oluşumunu düzenleyen interselüler sinyaller akışı ile açıklanmıştır. *BldJ* mutanlığı sinyal akışının başlaması için gereken 1. sinyali bloke ederken *bldD* mutanlığı en son sinyali bloke eder ve SapB proteini oluşmaz (Nodwell ve ark. 1996; Willey ve ark. 1993). Havasal misel oluşumu için gereken ilk interselüler sinyal *bldJ* ve *bldK* arasında oluşur. *BldK* oligopeptitlerin hücre içerisine transferi için gerekli olan ABC taşıyıcılarını kodlar. Hiyerarşideki yerine bakıldığı zaman *bldK* mutantları muhtemelen *bldJ*'nin kontrolünde olan 655 Da'lık 1. sinyali alamadığı için 2. sinyali de oluşturamaz (Nodwell ve Losick 1998; Nodwell ve ark. 1999).



Şekil 1.4. *S. coelicolor*'da havasal büyüme ile ilgili yüzey proteinlerinin oluşumuna yol açan *bld* genlerine bağlı alan ekstraselüler sinyal akışı (Chater ve Chandra 2006)

Bld mutantları yabancı tipe çok yakın oldukları zaman, yabancı tip tarafından üretilen SapB, büyüme ortamı vasıtasıyla *bld* mutanlığına geçebilir ve bu sayede

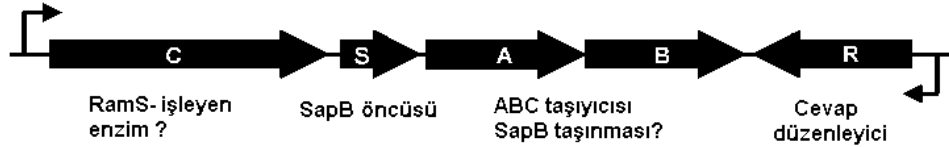
havasal hif oluşumunu uyarabilir. Ayrıca saflaştırılmış SapB, *bld* mutantlara ilave edildiği zamanda havasal hifler açık olarak görülmektedir. Ancak bu etki havasal hiflerin farklılaşması için değil sadece vejetatif hiflerin sertleşmesi şeklindedir. SapB su yüzey gerilimini 72 mJm^{-2} 'den 36 mJm^{-2} 'ye düşürerek fiziksel bariyeri kaldırmakta ve bu sayede havasal hif oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Tillotson ve ark. 1998a).

Bununla birlikte bazı *bld* mutantlar (*bldB* ve *bldI* gibi) ekstraselüler komplemantasyon hiyerarşisine uymazlar. Bu durumda hiyerarşinin eksik, havasal hif oluşumuna başka etkenlerin de (λ -butirolaktonlar) etkili olduğu ya da bilinmeyen diğer bazı faktörlerin de olabileceğini göstermektedir (Nodwell ve ark. 1999).

1.3.2. SapB

SapB (Spor-associated proteins = Spor-ilişkili proteinler) ilk defa 1988 yılında spor ilişkili beş proteinden birisi olarak Guijarro ve ark. (1988) tarafından belirlenmiştir. SapB molekülü zengin besiyerlerinde üretilip salgılanırken mannitol gibi zayıf karbon kaynaklarında üretilmemektedir. SapB zengin besiyerlerinde morfolojik farklılaşmada önemli roller oynamaktadır. Bu gözleme en iyi kanıt saflaştırılmış SapB peptidi *bld* mutantlara verildiği zaman, *bld* mutantların havasal hif oluşumunu restore etmesidir (Willey ve ark. 1991). SapB proteini uzun yıllar önce bulunmasına rağmen, moleküler yapısı ancak 2004 yılında açıklanabilmiştir (Kodani ve ark. 2004). SapB proteinin oluşumu ile ilgili ilk görüş, SapB'nin non-ribozomal olarak üretebileceği şeklindeydi (Willey ve ark.1993). Ancak bu görüş 2002 yılında *Streptomyces coelicolor*'un genom dizilişinin ortaya çıkarılmasıyla sona ermiştir. Çünkü *S. coelicolor* genomu SapB biyosentezi ile ilgili peptid sentetaz gen kümesini içermemektedir. Çok geçmeden, bilinmeden de olsa Ma ve Kendall tarafından (1994) SapB oluşumu ile ilgili *ram* (rapid aerial mycelium = hızlı havasal misel) gen kümesi bulunmuş ve 2002 yılında da *ram* gen kümesinin detaylı incelenmesi yapılmıştır (Keijser ve ark. 2002; O'Connor ve ark. 2002).

Ram gen kümesi, *ramC*, *ramS*, *ramA*, *ramB* ve monosistronik *ramR* genlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.5). *RamR*, NarL/FixJ subgrubu içerisinde cevap düzenleyicisini kodlar. *RamAB*, heterodimerik ABC taşıyıcısının bileşenlerini kodlar (Ma ve Kendall 1994). *RamC* 904 aminoasit uzunluğunda olup, serin/treonin kinaza benzeyen 440 amino asitlik N-terminal domain ve merkez dimerizasyon domain bulunmaktadır. Diğer iki alt domainden bağımsız olarak bulunan C-terminal domaini, CinM (sinnamisin antibiyotiğinin oluşumu ile ilgilidir) ve MrsM (mersasidin antibiyotiğinin oluşumu ile ilgilidir) lantibiyotik modifikasyon enzimlerine benzerdir. *RamC*, Lan köprülerinin oluşumunu katalize eder. *RamS*, 42 aminoasitlik peptidi kodlar ve SapB'nin öncüsü olarak görev yapar. *RamC*'nin 42 aminoasitlik *RamS* peptidini modifiye ettiği ve *RamS*'nin post-translasyonel olarak SapB'ye dönüştüğü öne sürülmektedir (Willey ve ark. 2006)



Şekil 1.5. *Ram* gen kümesi (Willey ve ark. 2006)

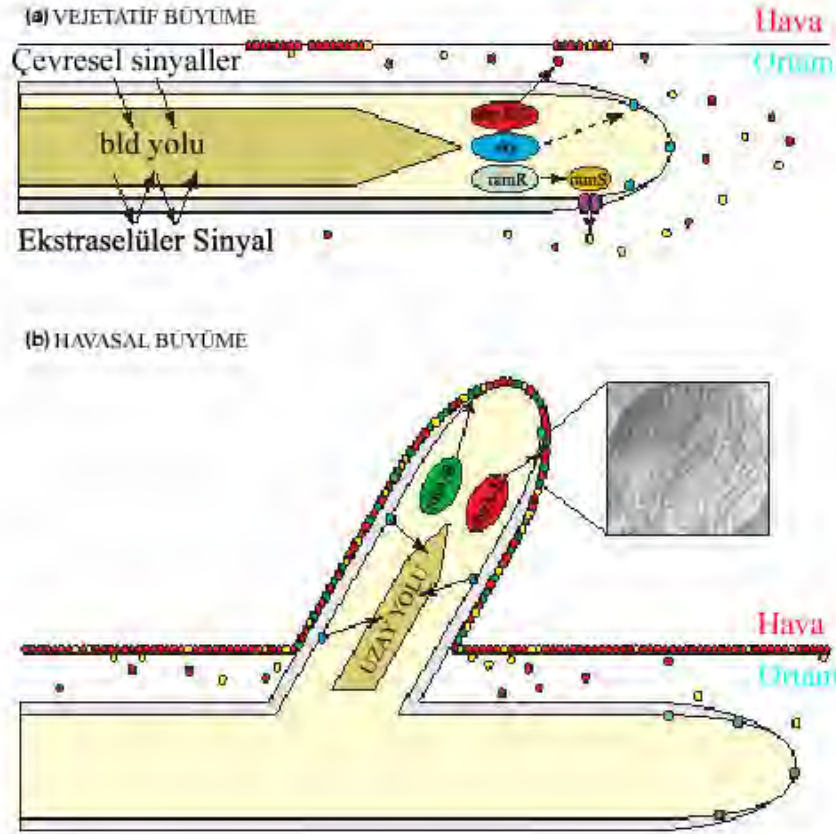
RamS'nin SapB'ye dönüşmesi 3 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1.6). 1. aşamada bazı serin aminoasitleri 2,3 dihidroalanine (DHA) dönüşür. İkinci aşamada 31. ve 41. sıradaki sistein içerisindeki sülfidril grupları ile 24. ve 34. sıradaki DHA arasında intramoleküler Lan köprülerinin oluşumuna yol açan nükleofilik saldırılar gerçekleşir. Lan köprüleri yapısal sıkılık ve proteazlara karşı dayanıklılık sağlar. Olgun sapB'de 3-10. ve 13-20. alanin arasındaki Lan köprülerinin oluşumunu *RamC*'nin C terminal domaini sağlar. Son aşamada ise peptit dışarıya salınır ve öncül kısım uzaklaştırılır. Ancak öncül kısmın dışarıya salındıktan sonra mı yoksa salınmadan önce mi öncül peptitaz tarafından uzaklaştırıldığı şu an için bilinmemektedir (Willey ve ark. 2006). SapB proteinin düzenlemesi *ramS* tarafından gerçekleştirilmektedir. *RamR*'nin kodladığı cevap düzenleyicisi *ramCSAB* promotoruna bağlanarak *ramCSAB*'yi aktive etmektedir

SapB ilavesi sadece vejetatif hifin sertleşmesini sağlar. Sporların ya da havasal hiflerin oluşmasında herhangi bir görevleri yoktur. SapB'ye benzer şekilde *S. tendae*'da streptofaktin surfaktantı (Richter ve ark. 1998), *Schizophyllum commune*'de SC3 hidrofobinleri (Wösten ve ark. 1999) sırasıyla yüzey gerilimini 39 mJm^{-2} ve 24 mJm^{-2} 'ye düşürmekte ve havasal hif büyümesini kolaylaştırmaktadırlar (Tillotson ve ark. 1998b). Fakat *Bacillus* surfaktantları olan surfaktin ve fengisin, ayrıca *Pseudomonas* surfaktantı olan viskosin yüzey gerilimini düşürmelerine rağmen havasal büyümeyi indüklememektedirler (Richter ve ark. 1998). *Streptomyces sp.* TP-A0584 tarafından üretilen goadsporin *S. lividans* ve diğer Streptomisetlerde farklılaşmayı indüklemektedir fakat SapB'den farklı olarak aynı zamanda antibiyotik üretimini de indüklemektedir (Onaka ve ark. 2001). Lan-içeren SapT, Kodani ve ark. (2005) tarafından *S. tendae*'dan izole edilmiştir. Yapısı SapB'den farklı olmasına rağmen her ikisi de *RamS* mutasyonlarında farklılaşmayı restore edebilmektedir.

1.4. Rodlet Tabakası

Havasal hifler sulu çevreden kurtulur kurtulmaz etrafları rodlet tabakası olarak adlandırılan ince fibröz tabaka ile kaplanır (Hopwood ve Glauert 1961; Wildermuth ve ark. 1971). Bu tabaka 8-12 nm genişliğinde ve 450 nm uzunluğunda çiftler halinde bulunan çubuklardan oluşmaktadır. Tabaka, çaplinler (Chp), rodlinler (rdl) ve SapB'den oluşmaktadır (Şekil 1.7).

Çaplinler (Chp = coelicolor hidrofobik havasal proteinler) *S. coelicolor*'da havasal hif oluşumuyla ilgili hidrofobik proteinler olarak tanımlanmıştır. Çaplinlerin ChpABCDEFGH olmak üzere sekiz çeşidi bulunmaktadır. ChpA-C, ~210–230 amino asitten oluşur ve iki domaini vardır. ChpA-C sortaz enzimleri sayesinde hücre duvarına bağlanmaktadır. ChpD-H ~50-60 aminoasitten oluşur ve tek bir domaini vardır. Çaplinler ~%60-65 hidrofobik amino asit taşıdıklarından dolayı oldukça hidrofobiktirler. ChpA-C trifloroasetik ile hücre duvarından saflaştırılmazken, ChpD-H saflaştırılabilmektedir.



Şekil 1.7. *S. coelicolor*'da havasal hif oluşumun bütünleştirilmiş modeli (Claessen ve ark. 2006). a- Ekstraselüler sinyalleşme ve çevresel sinyaller *bld* yolu ile etkilerini gösterirler. Bu yol ramR, ChpE ve ChpH'ı (kırmızı halkalar) ve uzay yolunu bileşimlerini (mavi) aktive eder. RamR, ramS'yi aktive eder oda SapB'yi oluşturur (sarı halkalar) ve oluşan SapB, ramAB tarafından salınır (mor halkalar). SapB, ChpE ve ChpH ile birlikte yüzey su gerilimini azaltarak havasal büyümeyi başlatır. b- Bu andan itibaren uzay yolu gelişmenin düzenlenmesini üstlenir. Bu yol havasal büyüme sensörlerini içerebilir (mavi halka). Bunun sonucunda rdl, Chp ve muhtemelen diğer genler aktive edilir. Rodlinler (yeşil halkalar) ve çaplinler (kırmızı halkalar) havasal hifin dış yüzeyinde hidrofobik rodlet tabakasını oluşturur.

Çaplinlerin yüzey su gerilimini 72 mJm^{-2} den 26 mJm^{-2} ye düşürerek fiziksel bariyeri kaldırdığı ve havasal hif büyümesini kolaylaştırdığı ve bu yönü ile de SapB'ye benzediği yukarıda belirtilmiştir. Ayrıca ChpE ve ChpH, SapB gibi kültür ortamında da bulunmaktadır. Ancak SapB yalnızca zengin besiyerlerinde gözlenirken çaplinler hem zengin hem de fakir besiyerlerinde

görülmektedir. Ayrıca *bld* mutantlara dışarıdan SapB ilavesi havasal hif oluşumunu restore ederken, çaplin ilave edilmesi bir değişiklik yapmamaktadır. Chp genlerinin tahribi havasal hif oluşumunu ve sporulasyonu etkilemektedir. ChpABCDH delesyonu, morfolojik oluşumun gecikmesine neden olmaktadır. ChpABCDEFGH delesyonu sonucunda havasal hif oluşumu tamamen durmaktadır. Birçok *bld* mutantından farklı olarak çaplinlerin delesyonu sonucu oluşan fenotipler kültür ortamına bağlı değildir (Claessen ve ark. 2003; Elliot ve ark. 2003; Claessen ve ark. 2006). Chp genleri *S. coelicolor*, *S. avermitilis* ve *Thermobifida fusca* gibi sporlaşan aktinomisetlerde bulunurken, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Corynebacterium diphtheriae* gibi spor oluşturmayan aktinomisetlerde bulunmamaktadır. Çaplin genlerinin sayıları organizmalarda farklılık göstermesine karşın kısa ve uzun çaplinlerin varlığı kesindir (Elliot ve Talbot 2004).

Claessen ve ark. (2002) rodlet tabakasının yapısına katılan iki homolog proteini rodlinA (rdIA) ve rodlinB'yi (rdIB) *S. lividans* ve *S. coelicolor*'da göstermişlerdir. RIdA ve rIdB havasal hif ve sporların dış yüzeyine yerleşmişlerdir. RIdA ve rIdB genleri havasal hif büyümesinde ifade edilirken sporlarda ifade edilmemektedir. RId genlerinin delesyonu havasal hif yapılarını ve spor oluşumunu etkilememektedir ancak bu durumda her iki yapıda da rodlet tabakası oluşmamaktadır.

Havasal büyüme ile ilgili düzenleyici diğer bir yolda uzay yoludur (Claessen ve ark. 2006). RIdA ve Chp genlerinin ifadesinin *bld* mutantlarda görülmemesi *bld* dizisinin rdl ve Chp genlerinin ifadelerinin başlamasında önemli kontrol noktaları olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte rdl genlerinin aktivasyonu farklı düzenlemeleri de gerektirmektedir. RIdA ve rdIB genlerinin ifadesi ChpABCDEH mutasyonlarında azalırken ChpABCDEFGH mutasyonlarından neredeyse tamamen yok olmaktadır. Fakat ChpABCDEH mutantlarında oluşan rdIA'nın yabancı tipe benzemesi rdl ifadesinin hifin sulu ortamdan ayrıldıktan sonra başladığını göstermektedir. Uzay yolu *bld* ve *whi* yolu arasında bulunur. *Bld* dizisinin uzay yolunu kodlayan genleri aktive ettiği sanılmaktadır. Havasal büyümenin algılanması ve sinyal moleküllerinin hücre duvarında birikmesi uzay yolunu başlatan etmenler olabilir. Fonksiyonel olmayan

bld yolu uzay yolunun fonksiyonel olmamasına yol açar ki bu durum surfaktantların *bld* mutantlarda neden tüm gelişmeyi indüklediğini açıklar. Buna karşın *ramS* mutanı uzay yolunu etkilememektedir. Bu durumda surfaktantların niçin tüm gelişmeyi indükleyebileceğini açıklamaktadır.

Mantarlarda bulunan hidrofobinler küçük hidrofobik proteinlerdir. Hidrofobinler havasal hif oluşumunda, spor üretimi ve dağılımında, vücut yapısının stabilizasyonunda ve bazı patojenik mantarların zehirlenmesine karşı korumada görev almaktadırlar (Wösten 2001). Hidrofobinler, SapB gibi yüzey su gerilimini düşürürler. Rodlinler gibi hidrofobik yüzey ile hif arasında bağlantı kurarlar ve rodlet çiftlerinin oluşmasını sağlarlar. Çaplinler gibi ise havasal hifin büyümesi için gereklidirler ve yüzey su gerilimini düşürürler (Elliot ve ark. 2003).

1.5. *Whi* Mutantlar

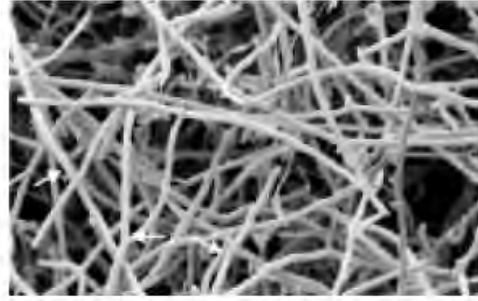
Havasal misel oluşumundan sonra, hif çok sayıda ve düzenli bölmelere ayrılır. Bu bölmeler de unigenomik spor zincirlerini oluşturur. Oluşan sporların hücre duvarları kalınlaşır ve pigmentleşerek ortama bırakılır. Spor oluşumu ile ilgili birçok *S. coelicolor* mutanı yabancı tipte tipik olarak gözüken gri renkli havasal misel oluşumundan yoksundurlar. Bu tür mutantlar *whi* olarak adlandırılırlar. *Whi* mutantlarda kendi aralarında erken ve geç *whi* mutantlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Erken *whi* mutantlarda genel olarak unigenomik kompartmanların oluşumu engellenirken, geç *whi* mutantlarda spor kompartmanları oluşur fakat oluşan sporlarda pigmentleşmede kusurlar vardır ya da DNA miktarlarında yabancı tipe göre farklılıklar bulunur. *Whi* genler sporların olgunlaşması için gerekirken havasal hiflerin oluşması için gerekli değildirler (Chater 2001; Flard ve ark. 1999; Chater ve ark. 1989).

Şimdiye kadar *S. coelicolor*'da en az 6 tane erken *whi* mutanı (*whiA*, *B*, *G*, *H*, *I* ve *J*) tanımlanmıştır (Şekil 1.8). *WhiG* havasal büyümenin sporulasyona dönüşmesini sağlayan RNA polimeraz σ faktörünü kodlamaktadır. *WhiG* mutantlarının düz havasal hifleri vardır ve yabancı tipe benzeyen çok az septaları vardır. *WhiG*; *whiA*, *B*, *H* ve *I* genlerine epistatiktir. σ^{WhiG} , *whiH* ve *whiI* genlerinin promotorlarını aktive etmektedir. *S. coelicolor*'da *whiG* vejetatif misel

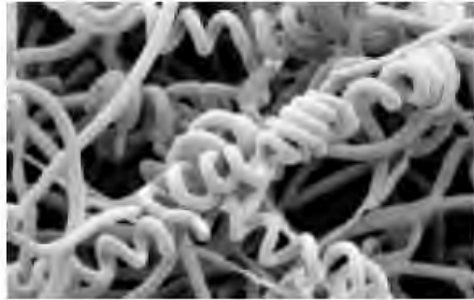
gelişimi boyunca transkrip edilmesine rağmen σ^{WhiG} sadece sporulasyon oluşumunun başlangıcında aktif olmaktadır ve bu aktivasyonun nedeni şu ana kadar bilinmemektedir. *Bld* ve *whi* genleri arasındaki ilk ilişki *whiG* ekspresyonunun *bldD* tarafından engellenmesidir (Kelemen ve ark. 1996; Chater ve ark. 1989; Catakli ve ark. 2005; Flardh ve ark. 1999).



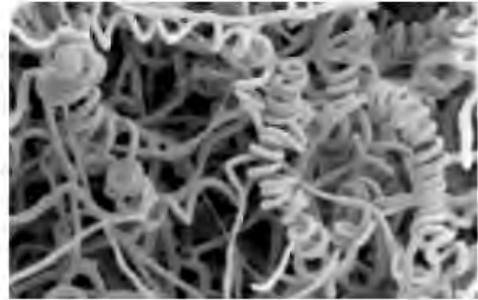
Yabani tip



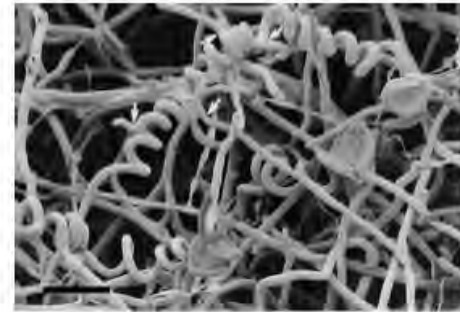
WhiG



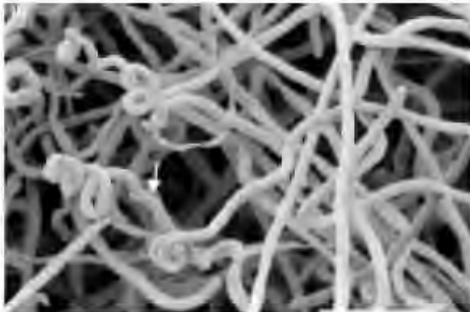
WhiA



WhiB



WhiI



WhiH

Şekil 1.8. *S. coelicolor* erken *whi* mutantlarının taramalı elektron mikroskop resimleri. Septumları gösteren girintiler oklar ile belirtilmiştir (Flardh ve ark. 1999).

WhiA ve *whiB* mutantları havasal büyümenin durdurulmasını sağlarlar. *WhiA* ve *whiB* mutantlarının yabani tipten çok farklı olarak uzun ve kıvrımlı havasal hifleri vardır ve sporulasyon septumları yoktur. *WhiA* dizisi bilinen hiç bir proteine benzememektedir ve Gram-pozitif bakteriler arasında korunmuştur (Ainsa ve ark. 2000). *WhiB* sadece aktinomisetlerde bulunan Fe-S kümelerini içeren muhtemelen küçük transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Davis ve Chater 1992; Jakimowicz ve ark. 2005). Hem *whiA* hem de *whiB* iki promotora sahip olup bir tanesi düşük seviyede sürekli olarak bulunurken diğeri sadece havasal hif büyümesi süresince transkribe edilmektedir. *S. coelicolor* genomunda 10 tane *whiB* benzeri protein vardır ve bunlardan bir tanesi olan *whiD*, *whiB*'den farklı olarak sporulasyonun geç evresi ile ilgilidir (Soliveri ve ark. 1992).

WhiH, GntR benzeri düzenleyici proteini kodlamaktadır. *WhiH* mutantları normal uzunlukta havasal hif oluşturmalarına rağmen düzensiz oluşmuş septumları ve DNA yoğunlaşmaları vardır (Ryding ve ark. 1998). *WhiH* sporulasyon septumlaşmasına neden olan *ftsZp2* promotorunu uyarmaktadır (Flardh ve ark. 2000).

WhiI, normal fosforilasyon cebinde çok güçlü bir şekilde korunmuş en az iki bölümü eksik olan cevap düzenleyici proteinlerinin tipik olmayan üyesini kodlamaktadır. *WhiI* mutantlarının fenotipi *whiH*'e benzemekle birlikte DNA yoğunlaşması *whiI*'de daha fazladır. *WhiI* ve *WhiH* birbirlerini baskılamaktadır ve her ikisi de σ^{whiG} tarafından kontrol edilmektedirler (Ainsa ve ark. 1999).

Sporulasyonun erken evreleri için iki gen daha vardır. *ssgA* sadece aktinomisetlerde bulunan küçük asidik proteini kodlamakta olup *S. griseus* ve *S. coelicolor*'da sporlaşma için gereklidir. *S. coelicolor*'da *ssgA* mutantlarında havasal hif oluşumu gerçekleşir fakat sporlaşma ve antibiyotik üretimde aksaklıklar meydana gelmektedir. *ssgA* ifadesinin artması sıvı kültürde *S. coelicolor*'da dallanmayı engelleyerek septum oluşumunu indüklemektedir (Van Wezel ve ark. 2000). *S. coelicolor*'un 6 tane *ssgA* paraloğu vardır ve bunlardan *ssgB* sporulasyon oluşumunda görev yapmaktadır. *ssgB* mutantları beyaz renkli ve septum oluşumunda bozukluklar vardır (Keijser ve ark. 2003).

Sporulasyonun geç evreleri sporulasyon septumunun oluşumu ve spor pigmentinin sentezi ile ilgilidir. *S. coelicolor* A3(2) tek bir *ftsZ* genine sahip olup

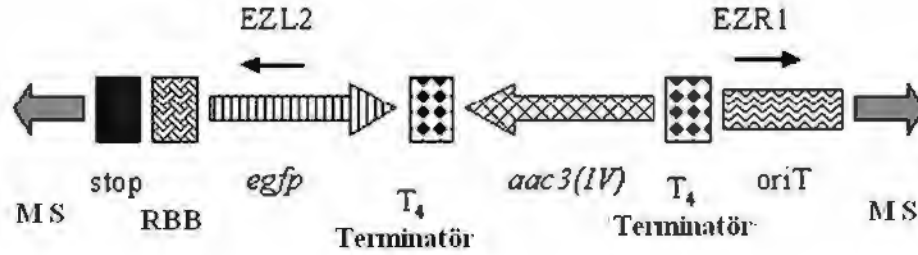
bu gen diğer bakterilerden farklı olarak yaşama ve büyüme için gerekli değildir. Septum oluşumu *ftsZ*'ye bağlıdır. *FtsZ* mutantlarında havasal miseller sertleşir fakat sporlaşma gerçekleşmez. Ayrıca aktinorhodin üretimi de yabani tipe göre fazladır (McCormick ve ark. 1994). Bakteri hücre bölünmesinin ilk adımı Z halkasında *ftsZ*'nin toplanmasıdır. Z halkası dinamik bir yapıya sahip olup *ftsZ*'nin polimerizasyonu ve depolimerizasyonundan oldukça etkilenmektedir (Grantcharova ve ark. 2005). *FtsZ* en az üç promotor tarafından transkribe edilir ve bunlardan biri olan *ftsZ2p* promotorunun düzenlenmesi sadece havasal hifin sporlaşması esnasında olmaktadır ve sporulasyon septumunun oluşması için gereklidir. *FtsZ* promotorunun sporlaşma esnasında düzenlenmesi altı erken *whi* lokusuna (*whiA,B,G,H,I*, ve *J*) bağlıdır. *FtsZ* ve *whiH* mutantlarındaki fenotipik benzerlikler *whiH*'in *ftsZ*'yi aktive edebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Flardh ve ark 2000).

WhiE, sporların pigmentleşmesi için gerekli olan tip II poliketit sentetaz bileşimlerine benzeyen proteinleri kodlar ve 7 açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşur. *WhiE*'nin *whiEP1* ve *whiEP2* olmak üzere iki tane promotoru vardır ve promotorların transkripsiyonları sporulasyon septum oluşumu için gerekli olan altı erken *whi* lokusuna (*whiA,B,G,H,I*, ve *J*) bağlıdır. *WhiEP2* *whiEP1*'den farklı olarak *sigF*'ye bağlıdır (Kelemen ve ark. 1998). *WhiE* genlerindeki mutasyonlar spor pigmentlerinin kaybolmasına ya da spor renginin değişmesine yol açmaktadır (Moore ve Piel 2000).

1.6. *in vitro* Transpozon Mutajenezisi

Genetik dizisi çıkarılmış organizmaların genom analizleri için kritik yöntemlerden birisi, çok amaçlı mutant kütüphanelerin kullanılmasıdır. Transpozon mutajenezisi bu kütüphaneleri oluşturmak için en etkili yöntemlerden bir tanesidir. Bishop ve ark. (2004) Gram-pozitif *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin gen fonksiyonlarını araştırmak için Tn5 transpozonunu kullanarak Tn5062 transpozonunu geliştirmişlerdir (Şekil 1.9). Bu transpozon üç önemli element içermektedir. Egfp (Enhanced green fluorescent protein = Artırılmış yeşil floresan protein) raportör geninin promotor bölgesi çıkartılmış olduğundan tahirip

edilen genin promotoru bu geni aktive etmektedir. Apramisin dirençlilik geni seleksiyonu gerçekleştirmek için kullanılır. RK2 plazmitinden elde edilen *oriT* ise intergenerik konjugasyon yoluyla mutasyona uğratılan kozmitin transferine olanak sağlamaktadır (Herron ve ark. 2004).



Şekil 1.9. Tn5062'nin organizasyonu (Herron ve ark. 2004). Tn5062 transpozunu iki MS (Mozaik Son) tekrarından oluşur. Bu iki yapının arasında üç ORF içinde translasyonel stop kodonu bulunur. RBB (Ribozom Bağlanma Bölgesi); *egfp*, Apramisin resistans geni, *aac3(IV)*, iki tane T4 transkripsiyonal terminatör ile sonlandırılmıştır. EZL2 ve EZR1 primerlerinin yerleri okla gösterilmiştir.

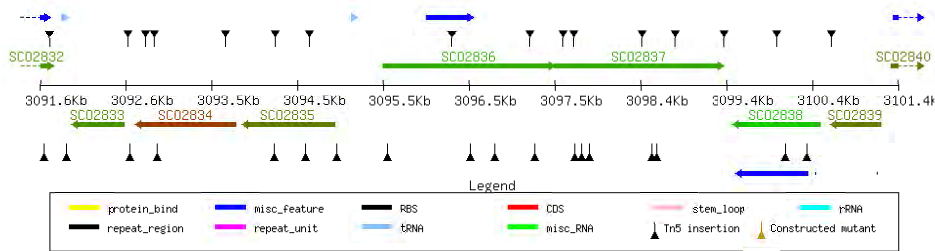
Bu transpozon *S. coelicolor* kozmit kütüphanesinin *in vitro* transpozon mutajenezisi için kullanılmıştır. Her bir bağımsız transpozon insersiyonu mutasyona uğratılmış kozmitin *Escherichia coli*'de amplifikasyonundan sonra dizi analizinin yapılmasıyla belirlenmektedir. Okuma çerçevesi bozulmuş genin etkisi, bu genin *S. coelicolor*'a intergenerik konjugasyon yoluyla transfer edilmesinden sonra belirlenmektedir. *S. coelicolor* kozmit kütüphanesinde Tn5062 insersiyon analizleri Çizelge 1.3'de verilmiştir. Bu yöntem yüksek verimlilik ve kullanılabilirlik sağlamaktadır. *S. coelicolor*'a konjugasyondan sonra bozulmuş gendeki insersiyonun oryantasyonu ve yeri bilgisayar yazılım programı ile belirlenir. Tn5 transpozunu moleküler düzeyde bütün transpozisyon sistemleri arasında en iyi karakterize edilen sistemlerden birisidir (Reznikoff ve ark. 1999). Tn5062 ile oluşturulan kozmit kütüphanesi *S.coelicolor*'daki mutant oluşumunu ve değerlendirmesini kolaylaştırmıştır. Bir gende birçok insersiyon oluşturularak sadece genlerin tahrip edilmesi sağlanmayıp aynı zamanda çok domainli proteinlerin bağımsız her bir domainide çalıştırılmaktadır.

Çizelge 1.3. *S. coelicolor* kozmit kütüphanesinde Tn5062 insersiyon analizleri (Herron ve ark. 2004)

Özellik	Toplam	Oran %
<i>S. coelicolor</i> kodlanan dizi bölgesindeki insersiyonlar	1926 (2167)	88.88
<i>S. coelicolor</i> kodlanmayan dizi bölgesindeki insersiyonlar	241 (2167)	11.12
<i>S. coelicolor</i> kodlanan dizi bölgesindeki bozulma	795 (1092)	89.60
<i>S. coelicolor</i> DNA mutasyonu	1.18 Mb (8.67 Mb)	13.63
<i>S. coelicolor</i> DNA'daki insersiyonlar	2167 (2333)	92.88
<i>Supercos</i> DNA'daki insersiyonlar	166 (2333)	7.12
<i>S. coelicolor</i> DNA insersiyonları arasındaki ortalama uzaklık \pm standart hata	554 \pm 112 bp	—
<i>Supercos</i> DNA insersiyonları arasındaki ortalama uzaklık \pm standart hata	997 \pm 316 bp	—

1.7. SCO2836

S. coelicolor SCO2836, SCO2837 ve komşu genlerin şematik gösterimi Şekil 1.10'da gösterilmiştir. SCO2836 geni, *S. coelicolor* genomunun 3095506-3097467 bazları arasında bulunan 1961 bazlık gendir. Moleküler ağırlığı 73159'dir. Bu genin aminoasit dizisi Çizelge 1.4'de gösterilmiştir. SCO2836 geninin tahmin edilen 6 tane transmembran domaini (79-101, 111-133, 430-452, 462-481, 546-565 ve 570-589), 2 tane düşük karmaşıklık bölgesi (594-617, 627-638) ve 1 tane de glikozil transfer domaini (166-342) bulunmaktadır (Şekil 1.11).



Şekil 1.10. *S. coelicolor* SCO2836, SCO2837 ve komşu genlerin şematik gösterimi³

³http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/sco_frameset.pl?script=gene_search.pl&string=2836 2007

Çizelge 1.4. SCO2836'nin aminoasit dizisi⁴

MTSTPTGAGP	DHDPSQTTQL	RVPGHRNWNT	GSFRRIKKTLL	PKYDYEHYSR
LAGPLTQDPD	NKPYRVQYRS	LISQEPHRLR	VALMLAAAPL	LSVLLVWLL
QPEHWTERDY	VAFDWLPALD	IVMLVAIGLI	ELFRCLNVLS	NAHATLVARD
PVPVVPETGT	KVAFLTSFVP	GKEPLEMVTK	TLEAAVRIRH	RGLMHVWLLD
EGDDPEVKEV	CARLGVHHS	RKGVAKWNRK	KGPHRAKTKH	GNYNWLDLDAH
GDDYDFASV	DTDHVPLPNY	LERMLGFFRD	PDVGFVIGPQ	VYGNYNPIT
KAAESQQFLF	HALIQRAGNR	YGGPMFVGTS	NAVRIRALKQ	IGGLYDSITE
DMATGFEMHR	HKNPATGRKW	RSVYTPDVLA	VGEGPNAWTD	FFTQQMRWSR
GTYETILKQY	WKGWYSLPPS	KLFNYTMMII	FYPMSALNWI	LAALSCCLFL
GLGASGVNID	PAVWLMLYGN	ASALQIGLYV	WNRHNVSPH	EPEGSGGVAG
MIMSALSAPL	YAKALIDSVL	RRKSKFVVT	KGDSASPTL	FGTFRYHWYF
IVIFGGSIAA	GFVYGHSHPA	MIIWATFALL	ITASPMFAWR	HELKAKKQP
PVAAAEPAPR	VPPQQAPYGR	HTPQHRPDWA	APADGGDDQT	MQIALGGLGG
RKE				



Şekil 1.11. SCO2836 proteinin tahmin edilen domainleri⁵

Glikozil transfer reaksiyonları nicel anlamda canlı kütlenin hidrolizi ve biyosentezini sağladıklarından dolayı dünyadaki en önemli biyotransformasyon olaylarıdır. Polissakkaritlerin ve kompleks karbonhidratların biyosentezi de oldukça önemlidir. Çünkü bu moleküller yapısal, depo ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli reaksiyonlarda görev almaktadırlar. Dissakkaritler, oligosakkaritler ve polissakkaritlerin biyosentezinde glikozil transferaz enzimleri (EC 2.4.x.y) görev almaktadır. Bu enzimler aktive edilmiş verici moleküllerden spesifik alıcı moleküllere glikozidik bağ oluşturmak suretiyle şeker gruplarının transferini gerçekleştirirler (Campbell ve ark.1998).

⁴ http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/get_aa 2007

⁵ http://smart.embl-heidelberg.de/smart/job_status.pl?jobid=819620654321541176748552LkmWYjSwax 2007

Genel şeker vericileri nükleotit monofosfo şekerleri, nükleotit difosfo şekerleri ve dolikhol-bağlı şekerleri içermektedir. Hem sakkaritler hemde protein ve lipitler gibi sakkarit olmayan moleküller de alıcı moleküllerdir. Bu enzimler hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunurlar ve genel olarak çok özel bir biçimde spesifiklik göstermektedirler. Ökaryotlarda birçok glikolizasyon reaksiyonları genellikle endoplazmik retikulum-golgi yolunda gerçekleşmektedir. Golgide bulunan glikoziltransferazlar kısa N-terminal sitoplazmik domaini, membran-genişletici domaini, gövde bölgesi ve globüler C-terminal luminal domainini içerirler (Klutts ve ark. 2006).

Bir molekülden diğerine şeker transferi alıkoyma ya da dönüşme mekanizması ile gerçekleşmektedir. Dönüşme reaksiyonlarında alıcı molekülün yeniden protonlanmış hidroksil grubu şeker vericisinin C1 anomerik karbon grubuna bağlanarak glikozidik bağ oluşur. Bu durumda da C1'in konfigürasyonu değişir. Alıkoyma mekanizmasında ise C1 konfigürasyonu değişmez. Bu mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Glikotransferazlar tipik olarak kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bağlanması sonucunda proteinde konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Bu enzimlerin büyük bir çoğunluğu verici moleküle bağlanarak akseptör-bağlanma bölgesini oluşturacak bir veya daha fazla esnek döngü bölgesine sahiptirler. Glikozil birimi verici molekülden alıcı moleküle aktırılır aktarılmaz şeker ürünü serbest bırakılır ve döngü bölgesi doğal haline dönüşür (Qasba ve ark. 2005).

Geleneksel olarak glikoziltransferazlar alıcı, verici ve ürün spesifikliğine göre sınıflandırılmış ve Enzim Komisyon (EC) numaraları verilmiştir (Sinnott 1990). Daha sonraki genom çalışmalarından bu enzimlerin dizisi çıkartılmış ve amino asit dizi benzerliklerine göre ilk olarak Campbell ve ark. (1998) tarafından sınıflandırma yapılmış, Coutinho ve ark. (2003) ise bu sınıflandırmayı geliştirmişlerdir. Bu sınıflandırmaya http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html adresinden ulaşılabilir.

Glikoziltransferazlar GT-A ve GT-B olmak üzere iki süperfamilaya ayrılırlar. GT-A grubu enzimleri herbiri α -heliks ile çevrilmiş birçok β -ipliklerinden oluşan N-terminal şeker verici-bağlanma domaini ve birçok β -tabakalı C-terminal alıcı-bağlanma domaininden oluşur. GT-A enzimlerinin

büyük bir çoğunluğu metal iyonlarının bağlandığı (çoğunlukla Mg ya da Mn) DXD, EXD ya da eşdeğer motiflere sahip olmakla birlikte bu grubun bazı temsilcilerinde bu motiflere rastlanmamaktadır. GT-B süperfamilyası enzimleri tipik olarak iki Rossmann-benzeri katlanmalara sahiptirler. N-terminal kısımlarına alıcı moleküller bağlanırken C-terminal kısımlarına şeker vericileri bağlanmaktadır. Bazı GT-B enzimleri kofaktör olarak metal iyonlarını kullanırlarken büyük bir çoğunluğu kullanmamaktadır (Qasba ve ark. 2005). Bununla birlikte glikoziltransferaz enzimlerinin bazıları bu iki kategoriye de uymamaktadır (Breton ve ark. 2006).

DesVII proteini *in vitro* makrolid glikoziltransferaz olarak karakterize edilen ilk enzimdir. Bu protein *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439'da TDP-D-desoaminin grubunun transferine yardımcı olarak neometimisin, metimisin ve pikromisin antibiyotiklerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Hong ve ark. (2007) *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439'da bu geni mutasyona uğratarak homologları olan eritromisin üreten *Saccharopolyspora erythraea*'dan eryCII, oleandomisin üreten *S. antibioticus*'dan oleP1, doksorubisin üreten *Streptomyces peucetius*'dan dnrQ ve tilosin üreten *Streptomyces fradiae*'dan tylMIII genleri arasında komplementasyon çalışmaları yapmışlardır. Antibiyotik üretimini eryCII, oleP1 ve dnrQ genleri yaklaşık olarak sırasıyla %66, %26 ve %26 restore ederken tylMIII geninin restore etmediğini bildirmişlerdir.

Miyamoto ve ark. (2002) *Streptomyces violaceus*'da glikoziltransferaz geninin, rhoG, L-rodosinin sentezinde O-rodosininon'un glikozilasyonunu sağladıklarını belirtmişlerdir.

S. fradiae Tu2717 tarafından üretilen urdamisin A antibiyotiğinde *urdGT2*, *urdGT1a*, *urdGT1b* ve *urdGT1c* genleri glikoziltransferaz enzimini kodlayan genlerdir. *urdGT2* geninin inaktivasyonu sonucunda urdamisin I, J ve K olarak adlandırılan üç yeni bileşik elde edilmiştir (Faust ve ark. 2000).

Landomisin A, *S. cyanogenus* S136 tarafından üretilen heksasakkarit içeren bir bileşiktir. Bu bileşik özellikle prostat kanser hücrelerine karşı çok güçlü antitümör aktiviteye sahiptir. Ayrıca kemiricilerin düz kas hücrelerinde ve hücre sikluslarında timidin alımını inhibe etmektedirler (Crow ve ark. 1999). Landomisin biyosentetik yolunda dört glikoziltransferaz (LanGT1, LanGT2,

LanGT3 ve LanGT4) tanımlanmıştır. *S. fradiae* mutantında yapılan çalışmalarda bu dört genin hekzasakkarit zincirinin oluşumu ve bağlanması ile ilgili olduğu belirtilmiştir (von Mulert ve ark. 2004). *S. cyanogenus* S136 üzerinde yapılan detaylı çalışmalarda landomisin A biyosentezinde LanGT2 ve LanGT3'ün tek bir şekerin bağlanmasını katalize ederken LanGT1 ve LanGT4'ün iki şekerin bağlanmasını katalize ettiği bulunmuştur (Luzhetskyy ve ark. 2005).

Otten ve ark. (1995) *Streptomyces peucetius*'da *dnrQS* (daunoribosinQS) genlerini karakterize etmişler, *dnrQ* geninin daunosamin biyosentezi için gerekli olduğunu, *dnrS*'nin ise glikoziltransferaz enzimini kodlayarak daunoribosinin aglikon kısmına daunosamin ilavesini gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir.

Ebosin bir ekzopolissakkarit olup galaktoz, mannoz, glukoz, arabinoz, fukoz, sikloz ve ramnoz birimlerinin tekrar edilmesiyle oluşur. *Streptomyces sp.* 139 tarafından üretilen ebosinin ORF'sinde *ste1-ste22* olarak adlandırılan 22 gen vardır. *Ste22* geni ebosin için gerekli glikoziltransferaz genini kodlamaktadır. Zhang ve ark. (2006). *Streptomyces sp.* 139'da bu geni mutasyona uğratmışlar ve bu mutant türün farklı monosakkarit kompozisyonu gösterdiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca yeni oluşan ebosinin, normal ebosine göre *in vitro* interlökin-I reseptörüne karşı antagonist etkisini gösterirken *in vivo* anti-iltihap ve ağrı dindirici özelliğini kaybettiğini ifade etmişlerdir.

1.8. SCO2837

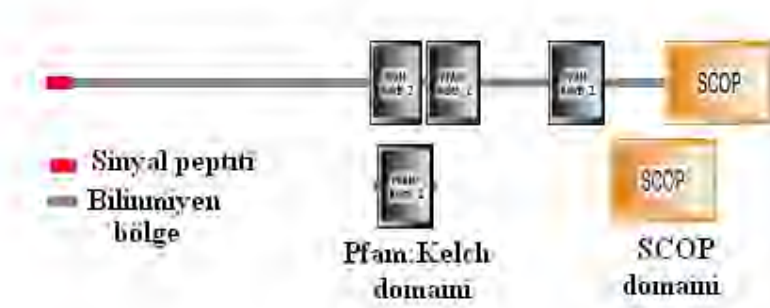
SCO2837 geni *S. coelicolor* genomunun 3097464-3099401 bazları arasında bulunan 1937 bazlık gendir. Moleküler ağırlığı 70835'dir. Bu genin aminoasit dizisi Çizelge 1.5'de gösterilmiştir. SCO2837 geninin tahmin edilen sinyal peptid domaini (1-24), Pfam:Kelch domaini (287-334, 337-385 ve 446-496) ve SCOP domaini (549-644) bulunmaktadır (Şekil 1.12).

SCO2837 proteinin tahmin edilen amino asit dizilişinde N terminal kısmı arjinin amino asiti bakımından zengindir ve RRFAI dizisi ikiz-arjinin bağımlı salgı sinyalini tanır (Bendtsen ve ark., 2005). Prokaryotlardaki ikiz-arjinin bağımlı salgı metabolizması genellikle hücre zarına yerleşen katlanmış olgun proteinlerin translasyonunu sağlamaktadır (Sargent ve ark. 2006; Palmer ve ark. 2005). İkiz

arjinin bağımlı yolu birçok metalloproteinlerin ya da kofaktör içeren proteinlerin ekstraselüler aralığına bırakılmasını sağlar. *S. coelicolor* genomunun yaklaşık %2'si ikiz-arjinin bağımlı salgı sinyallerini içermektedir (Li ve ark. 2005).

Çizelge 1.5. SCO2837'nin aminoasit dizisi⁶

MKDRAGRRRA	RRFAIGTAVV	VALAGMNGPW	LYRFSTEKYH	QYKINQPEYK
AANGKWEIIE	FPEKYRQNTI	HAALLRTGKV	LMVAGSGNNQ	DNSDDKQYDT
RIWDPVKGTI	KKVPTPSDLF	CTGHTQLANG	NLLIAGGTKR	YEKLGDVTK
AGGLMVVHNE	NPDKPITLPA	GTKFTGKENG	KTFVSKDPVL	VPRAEKVFDP
ATGAFVRNDP	GLGRIYVEAQ	KSGSAYETGT	EDNYRIQGLS	GADARNTYGI
AQKLALDKKD	FQGIRDAFEF	DPVAEKYIKV	DPMHEARWYP	TLTTLGDGKI
LSVSGLDDIG	QLVPGKNEVY	DPKTKAWTYT	DKVRQFPTYP	ALFLMQNGKI
FYSGANAGYG	PDDVGRTPGI	WDVETNKFTK	VPGMSDADML	ETANTVLLPP
AQDEKYMVIG	GGGVGESKLS	SEKTRIALDK	ADAPKFVDGP	SLEKGTRYPQ
ASILPDDSVL	VSGGSEYDRG	RGDSNILQAR	LYHPDTNEFE	QVADPLVGRN
YHSGSILLPD	GRLMFFGSDS	LYADKANTKP	GKFEQRIEY	TPPYLYRDSR
PDLSGGPQTI	ARGSGTFTS	RAASTVKKVR	LIRPSASTHV	TDVDQRSIAL
DFTADGDKLT	VTVPTGKNLV	QSGWYMMFVT	DGEGTSPKAE	WVRVP



Şekil 1.12. SCO2837 proteinin tahmin edilen domainleri⁷

Whittaker ve Whittaker (2006) SCO2837 proteinini karakterize etmişlerdir. SCO2837 protein miktarını *S. coelicolor*'da glikoz minimal ortamında karbon kaynağına bağlı olarak 50-100 µg/l olarak bulmuşlardır. *S. coelicolor*'daki en düşük protein miktarına karbon kaynağı olarak gliserol kullandıkları zaman rastlamışlardır. SCO2837 genini *Pichia pastoris*'e aktararak galaktoz oksidaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin soluk mavi-gri renkli olduğunu belirtmişler ve bakır miktarını da 0.75-0.85 Cu/mol olarak ölçmüşlerdir. Salgılanan proteinin

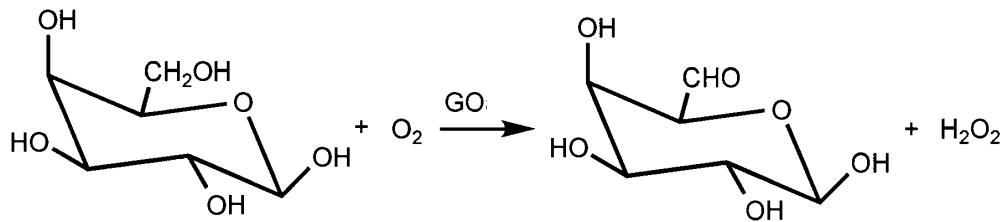
⁶ http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/get_aa 2007

⁷ http://smart.embl-eidelberg.de/smart/job_status.pl?jobid=819620654321541176748552LkmWYjSwax 2007

çevreden daha ziyade hücre yüzeyine bağlı kaldığını ve bu bağlanmanında peptidoglikan tabakasına sortaz enzimleri ile gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir. En iyi karakterize edilmiş olan sortaz A LPXTG pentapeptit motifini tanıyarak peptidoglikan tabakası ile kovalent bağ oluşturur. Bu motif *S. coelicolor* genomunun 17 gen ürününde bulunmuştur ve bunlar muhtemelen vejetatif ve havasal misellerin gelişmesiyle ilgilidir (Boekhorst ve ark. 2005). Oluşan H₂O₂ aktinomisetlerde sinyalleşmede, antimikrobiyal ajan olarak ve ekstraselüler peroksidazların substratı olarak görev yapmaktadır (Whittaker 2002; Ramachandran ve ark. 2000; Hahn ve ark. 2002).

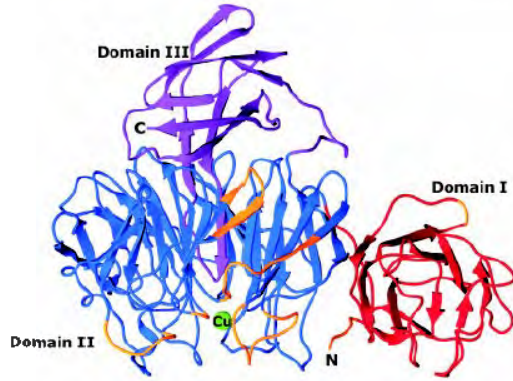
Galaktoz oksidaz (D-galaktoz:oksijen 6-oksidoredüktaz EC 1.1.3.9) *Fusarium spp.* (Avigad ve ark. 1962), *Gibberella fujikurio* (Aisaka ve ark. 1982) ve *Fusarium graminearum* (Koroleva ve ark. 1983) mantarlarından elde edilmiş ekstraselüler bir enzim olup primer alkollerin oksidasyonunu katalizler ve sonuçta H₂O₂ oluşur (Whittaker ve Whittaker 1990; Amaral ve ark. 1996). Bu enzimin katalizlediği reaksiyon Şekil 1.13’de gösterilmiştir.

Galaktoz oksidaz (GO) aktif bölgesinde O₂’nin redüksiyonu ve organik substratın oksidasyonunu sağlayan iki elektron redoks birimi içeren serbest bakır içerir. GO üzerinde yapılan X ışınları kristalografik çalışmaları GO’nun ender görülen reaktivitesinin yapısal temellerini açıklamıştır. Protein, tirozin (Tyr) ve sistein (Cys) zincirleri arasında çapraz bağlantı Tyr-Cys dimerik amino asit oluşumunu sağlayan posttranslasyonel kovalent modifikasyonu içerir (İto ve ark. 1991). Spektroskopik ve biyokimyasal çalışmalar Tyr-Cys bölgesinin proteinin redoks aktif bölgesi içerisinde bulunduğunu ve oksidasyon için sabit radikali oluşturduğunu göstermiştir (Whittaker ve Whittaker 1990; Babcock 1992; Gerfen ve ark. 1996).



Şekil 1.13. Galaktoz oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon

Olgun enzim ağırlıklı olarak 3 tane β -yaprak domaininden oluşur (Şekil 1.14). Domain I, sekiz tane β -ipliği ile 3 iplikli antiparalel β -yaprağı çevreleyen beş iplikli antiparalel β -yaprağından oluşmuştur. Domain II en büyük domain olup merkezi boşluğun etrafında yedi yapraklı β -propelden oluşur. Olgun proteinin aktif bölgesi bakır iyonu ile birlikte bu domainin yüzeyine yerleşmiştir. Bakır iyonuna bağlanan dört protein ligandından üçü (Tyr-272, Tyr-495 ve His-496) domain II tarafından sağlanmaktadır. Domain III hidrofobik merkezi çevreleyen çoğunluğu antiparalel yedi β -ipliğinden oluşur. Bakır iyonuna bağlanan 4. ligandı (His-581) domain III sağlar (Firbank ve ark. 2001).



Şekil 1.14. Olgun GO'nun yapısı (Firbank ve ark. 2001)

GO'nun aktif bölgesi bakır atomuna bağlı iki tirozin (Tyr272 ve Tyr495) ve iki histidin (His496 ve His581) olmak üzere dört amino asit zinciri içerir. Tyr272 C ϵ karbon atomu ile Cys228 S γ sülfür atomu arasında Tyr-Cys arasında tioeter bağı vardır. Bu iki yapı arasındaki tioeter bağı proteinin hem yapısını hem de reaktivitesini etkilemektedir. Yapısal olarak bu çapraz bağlantı diğer proteinlerdeki disülfid bağına benzer şekilde aktif bölgenin sertliğini sağlar. Fakat disülfid bağından farklı olarak tioeter bağı geri dönüşümsüz oluşmuştur ve ayrılmaya karşı da duyarlı değildir. Proteindeki bu çapraz bağlantı indirgenmiş bakır (Cu⁺¹) ve dioksijenin varlığında gerçekleşir (Whittaker ve Whittaker 2003; Whittaker 2005). Fenilalaninin Tyr495 ile yerdeğiştirmesi ile yapılan mutajenezis çalışmaları proton alınımının azalmasına yol açmıştır. Bu sonuçta Tyr495'in proton alınımını gerçekleştirdiğini desteklemektedir (Rogers ve ark.1998).

GO birçok alanda biyosensör, kimyasal maddelerin sentezinde ve kontrol amaçlı olarak kullanılmaktadır. Sensör uygulamalarında D-galaktoz, laktoz ve diğer GO substrat konsantrasyonlarını ölçmek (Vega ve ark. 1998; Tkac ve ark. 1999), kan örneklerinde (Vrbova ve ark. 1992) ve süt endütrisinde kalite kontrol markırı (Adanyi ve ark. 1999; Mannino ve ark. 1999) olarak kullanılmıştır. Ayrıca kolon kanserinde ve prekanserde dissakkarit tümör markırını keşfetmek içinde kullanılmıştır (Yang ve Shamsuddin 1996; Said ve ark. 1999) .

Sun ve ark. (2001b) GO'yu *E. coli*'ye aktararak çeşitli mutasyonlar oluşturmuşlardır. Bu işlem sonucunda enzimin aktivitesini ve substrat spesifikliğini kaybetmediğini fakat oluşan mutant türün sıcaklığa karşı daha dayanıklı olduğunu ve enzim miktarının arttığını belirtmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kelch dizi motif ve korunmuş metal gruplarına dayanarak birçok bitki ve mikrobiyal genomunda GO homologları tanımlanmıştır. Bir miksobakter olan *Stigmatella aurantiaca*'daki *fbfB* geni GO homologlarına ilk örneklerden bir tanesidir ve meyve olgunlaşmasında görev aldığı belirtilmiştir (Silakowski ve ark. 1998). İnsan patojeni olan *Burkholderia pseudomallei* genomunda en az 4 tane (Holden ve ark. 2004), *S. coelicolor*'da ise 1 tane GO homologu vardır (Bentley ve ark. 2002).

Streptomisetleri de içeren toprak aktinomisetleri şimdiye kadar çalışan prokaryot canlılar arasında en fazla gene sahip canlı grubunu oluşturmaktadır. Bu kadar fazla gene sahip olmaları onların çok çeşitli biyotransformasyon olaylarını gerçekleştirmelerine imkan tanımaktadır. Streptomisetler doğadaki antibiyotiklerin büyük çoğunluğunun kaynağını oluştururlar ayrıca lignin ve kitin gibi birçok birçok biyomolekülün geri kazanılmasında da çok önemli rol oynarlar. *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin genom dizilişi Bentley ve ark. (2002) tarafından çıkartılmıştır. *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin tahmin edilen 7825 geni vardır ve bu sayı ökaryot *Saccharomyces cerevisiae*'den bile daha fazladır (Goffeau ve ark. 1996). Birçok bilim adamı bu genlerin fonksiyonlarını çeşitli yöntemlerle araştırmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi de genleri transpozon aracılığı ile mutasyona uğratmak ve bu mutasyonun etkilerini incelemektir (Herron ve ark. 2004). Bu çalışmanın amacını da SCO2837 ve SCO2836

genlerinin mutasyona uğratılarak, bu mutasyonların fenotip üzerindeki etkilerinin araştırılmasını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL METOT

2.1. Bakteri Türleri

Deneyleerde kullanılan bakteri türleri Dr. Paul Dyson'dan temin edilmiş olup, Çizelge 2.1'de gösterildi. *E. coli* JM109 genetik manipülasyonları gerçekleştirmek için kullanıldı. İntergenerik konjugasyon yoluyla *S. coelicolor* M145'e kozmit ve plazmitlerin aktarımı ise elektrokompentent *E. coli* ET 12567/pUZ8002 hücreleri vasıtasıyla gerçekleştirildi.

Çizelge2.1. Çalışmada kullanılan bakteri türleri

Bakteri Türü	Genotip
<i>S. coelicolor</i> M145	Prototrofik SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Pgl ⁺
<i>E. coli</i> JM109	F ⁺ <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^qΔ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>
<i>E. coli</i> ET 12567 (pUZ8002)	<i>Dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143 16 zjj201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtli glnV44</i> , nontransmissible <i>oriT</i> mobilize plazmiti, pUZ8002, içerir.

2.2. DeneYlerde Kullanılan Kozmit ve Plazmitler

Çalışmada kullanılan kozmit ve plazmitler Çizelge 2.2’de gösterildi. Bunlarla ilgili daha detaylı açıklamalar sonraki bölümlerde verildi.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kozmit, plazmit ve içerdikleri genler

Kozmit/Plazmit	İlgili özellik	Kaynak
SCE20.2.D01	SCO2836 geninde Tn5062 transpozonu	P. Dyson
SCE20.1.A11	SCO2836 geninde Tn5062 transpozonu	P. Dyson
SCE20.2.HO4	SCO2837 geninde Tn5062 transpozonu	P. Dyson
SCE20.1.D02	SCO2838 geninde Tn5062 transpozonu	P. Dyson
pIJ2925	Amp ^{D_r} , mavi-beyaz koloni taraması	P. Dyson
pSH152	pSET152’nin Hgr ^{D_r} türevi	R. del Sol
pRLux87	<i>luxAB</i> geni içerir, Aprm ^{D_r}	P. Dyson
pREC1	SCE20.1.D02’nin <i>Xba</i> I fragmentini içeren pIJ2925	Bu çalışma
pREC2	pREC1’in <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> CIRI fragmentini içeren pSH152	Bu çalışma
pREC3	SCO2836 ve SCO2837 genlerinin promotor bölgesini içeren pRLux87	Bu çalışma

Amp= Ampisilin, Hgr= Higromisin, Aprm= Apramisin, ^{D_r}= Dirençli

2.3. Kimyasallar ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan malzemelerin çoğu SIGMA, BDH, DIFCO, Oxoid, Gibco BRL, Melford ve Fisher Scientific’ten temin edildi.

2.3.1. Çözeltiler

10x TBE

	<u>1 l için</u>
Tris (MA= 121.1)	108 g
Borik asit (MA= 61.83)	55 g
0.5 M EDTA (pH 8)	5 g
Distile su	900 ml

Solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.

20x SSC

	<u>1 l için</u>
NaCl (MA= 58.5)	175.3 g
Tri-Sodyum sitrat (MA= 258.07)	10 g
Distile su	800 ml

10 N NaOH ile pH 7'ye ayarlandıktan sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı.

Antibadi solüsyonu

	<u>15 ml için</u>
Antidigooksijenin AP	3 µl
Tampon I	15 ml

DNA Yükleme Tamponu

	<u>100 ml için</u>
Sükroz (MA=380)	40 g
Bromofenol mavi	60 mg (%0.06)
1x TBE	10 ml
Distile su	90 ml

Prehibridizasyon Solüsyonu

	<u>20 ml için</u>
20x SSC	5 ml
%10 N-Lauril sarkosin (w/v)	200 µl
%10 SDS (w/v)	40 µl
Bloklama tozu	1 g (%5)
Distile su	4.8 ml
Formamid	10 ml (%50)

Nötralizasyon Tamponu

1 l için

Tris (MA= 121.1)	121 g
NaCl (MA= 58.5)	88 g
Distile su	800 ml

Çözeltinin pH'ı konsantre HCl ile 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 l'ye tamamlandı.

Denatürasyon Tamponu

1 l için

NaOH (MA= 40)	20 g
NaCl (MA= 58.5)	88 g
Distile su	1 l'ye tamamlandı

Yıkama solüsyonu I

240 ml için

20x SSC	24 ml
%10 SDS (w/v)	2.4 ml
Distile su	213.6 ml

Yıkama solüsyonu II

240 ml için

20x SSC	1.2 ml
%10 SDS (w/v)	2.4 ml
Distile su	236.4 ml

Tampon I solüsyonu

1 l için

Tris (MA= 121.1)	12.10 g
NaCl (MA= 58.5)	8.8 g
Distile su	1 l'ye tamamlandı

Tampon II solüsyonu

	<u>120 ml için</u>
Bloklama tozu	0.6 g (%0.5)
Tampon I solüsyonu	120 ml

2.3.2. Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar

Kieser ve ark. (2000) göre hazırlanmış olup modifiye edildikten sonra kullanıldı.

	<u>1 l için</u>
NaCl (MA= 58.5)	5 g
Tripton	5 g (%0.5)
Yeast Ekstrat	5 g (%0.5)
Distile su	950 ml

Bütün maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. 5 N NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı. Katı ortam için ise 20 g agar ilave edildi. 121 °C'de 20 dakika steril edildi.

2xYT Broth

Kieser ve ark. (2000) göre hazırlandı.

	<u>1 l için</u>
Tripton	16 g (%1.6)
Yeast ekstrat	10 g (%1)
NaCl (MA= 58.5)	5 g
Distile su	900 ml

Bütün maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. 5 N NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı. 121 °C'de 20 dakika steril edildi.

Mannitol Soya Unu Ortamı (MS) ya da Soya Unu Mannitol Ortamı (SFM)

Hobbs ve ark. (1989) göre hazırlandı.

1 l için

Agar	20 g (%2)
Mannitol (MA= 182.17)	20 g
Soya unu	20 g (%2)
Çesme suyu	850 ml

Agar hariç diğer maddeler sırasıyla çeşme suyuna eklenip çözüldü. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı. Agar ilave edilerek 121 °C'de 20 dakika iki kez steril edildi.

SOC

Sambrook ve ark. (1989) göre hazırlandı.

1 l için

Distile su	950 ml
Tripton	20 g (%2)
Yeast ekstrat	5 g (%0.5)
NaCl (MA= 58.5)	0.5 g

Bütün maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldükten sonra steril 10 ml 250 mM KCl çözeltisi ilave edildi. 5 N NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı. 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Solüsyon 60 °C'ye kadar soğuttuktan sonra steril 5 ml 2 M MgCl₂ ve 20 ml 1M glikoz çözeltisi ilave edilip karıştırıldı.

Minimal Sıvı Ortamı (NMMP)

Hodgson'a (1982) göre hazırlanmış olup modifiye edildikten sonra kullanıldı.

1 l için

(NH ₄) ₂ SO ₄ (MA= 132.14)	2 g
Casamino asitler	5 g (%0.5)
MgSO ₄ .7H ₂ O (MA= 246.5)	0.6 g
*Minor element solüsyonu	1 ml

Distile su	900 ml
Agar	20 g (%2)

Agar hariç diğ er maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlandı. Agar ilave edilerek 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Kullanılacağı zaman bu karışımdan 85 ml alınarak steril 0.1 M 7.5 ml H₂PO₄ ve 0.1 M 7.5 ml K₂HPO₄ eklendi.

***Minor element solüsyonu**

	<u>1 l için</u>
ZnSO ₄ .7H ₂ O (MA= 287.56)	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (MA= 278.02)	1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O (MA= 197.9)	1 g
CaCl ₂ (MA= 111)	1 g
Distile su	950 ml

Yukarıdaki maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. Daha sonra solüsyonun hacmi 1 l'ye tamamlanarak 121 °C'de 20 dakika steril edildi.

R2YE

Thompson ve ark. (1980) göre hazırlandı.

	<u>1 l için</u>
Sükroz (MA= 380)	103 g
K ₂ SO ₄ (MA= 614.78)	0.25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (MA= 203.3)	10.12 g
Glukoz (MA= 180.16)	10 g
Casamino asitler	0.1 g (%0.01)
Agar	22 g (%2.2)
Distile su	800 ml'ye tamamlandı.

Yukarıdaki maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. Daha sonra solüsyonun hacmi 800 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Bu karışımdan 80 ml alınarak,

K ₂ SO ₄ (%0.5)	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (%3.68)	8 ml

L-Prolin (%20)	1.5 ml
TES tamponu (%5.73, pH 7.2)	10 ml
İz element solüsyonu	200 µl
NaOH (1N)	500 µl
Yeast ekstrat (%10)	5 ml

Maddeleri sırası ile ilave edildi.

R5

Kieser ve ark. (2000) göre hazırlandı.

1 l için

Sükroz (MA= 380)	103 g
K ₂ SO ₄ (MA= 614.78)	0.25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (MA= 203.3)	10.12 g
Glukoz (MA= 180.16)	10 g
Casamino asitler	0.1 g (%0.01)
Agar	22 g (%2.2)
Distile su	800 ml'ye tamamlandı.

Yukarıdaki maddeler sırasıyla distile suya eklenip çözüldü. Daha sonra solüsyonun hacmi 800 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Bu karışımdan 100 ml alınarak,

K ₂ SO ₄ (%0.5)	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (5 M)	0.4 ml
L-Prolin (%20)	1.5 ml
NaOH (1N)	750 µl

Maddeleri sırası ile ilave edildi.

Minimal Ortam (MM)

Hopwood'a (1967) göre hazırlandı.

1 l için

(NH ₄) ₂ SO ₄ (MA= 132.14)	1 g
K ₂ HPO ₄ (MA= 174)	0.5 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O (MA= 246.50)	0.2 g

Glukoz (MA= 180.16)	10 g
Agar	10 g (%1)
Distile su	1 l'ye tamamlandı.

Agar ve glukoz hariç diğer maddeler distile su içerisinde çözüldü ve pH 7-7.2'ye ayarlandı. 250 ml'lik erlenlere 2 g agar koyulduktan sonra 200 ml bu solüsyondan eklendi ve 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Kullanılacağı zaman eritilerek 4 ml %50'lik glukoz ya da 2 ml %50'lik mannitol solüsyonu ilave edildi.

2.4. Kullanılan Antibiyotikler

Bütün antibiyotiklerin stok konsantrasyonları hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Aşağıda farklı ifade edilmedikçe bütün antibiyotikler ddH₂O içinde çözülerek hazırlandı ve 0.22 µm çapında filtre kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan antibiyotikler ve kullanım şekilleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Stok konsantrasyon (mg/ml)	<i>E.coli</i> 'de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)	<i>Streptomyces</i> 'de kullanılan konsantrasyonu (µg/ml)
Apramisin (Aprm)	100	100	25
Ampisilin (Amp)	100	100	-
Kanamisin (Km)	25	25	25
Kloramfenikol ¹ (Klf)	30	30	-
Nalidiksik asit ² (Na)	20	20	-
Higromisin (Hgr)	100	100	100

¹%100 Etanol, ²0.15 M NaOH

2.5. Mavi-beyaz Tarama

Antibiyotik seleksiyonuna ilaveten, *LacZ* geni içerisinde çoklu klonlama bölgesi içeren plazmitler mavi-beyaz tarama ile analiz edildi. IPTG (İsopropil-β-D-tiyogalaktopiranosid) ile indüklenen rekombinant hücreler, X-Gal (5-bromo-4-

kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid) substratının dönüşümünü sağlayan β -galaktozidazı üretmezler ve böyle hücreler beyaz renkli olurlar. IPTG ve X-Gal'in stok ve çalışma konsantrasyonları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. IPTG ve X-Gal'in stok ve çalışma konsantrasyonları

Bileşik	Stok konsantrasyonu (mg/ml)	Çalışılan konsantrasyon (μ g/ml)
IPTG ¹	20	20
X-Gal ²	20	20

¹ Dimetilformamid, ² Distile su

2.6. Kültür Koşulları

2.6.1. *E. coli* suşlarının üretilmesi ve saklanması

E. coli suşları LB plaklarında, sıvı LB Broth'da ve SOC ortamında kültür edildi ve 37 °C'deki etüvde inkübasyona bırakıldı. Kısa süreli depolamak için ise 4 °C'de saklandı.

2.6.2. Streptomiset türlerinin üretilmesi ve saklanması

Streptomiset türlerini üretmek için katı ortam olarak SFM kullanıldı. Uygun antibiyotiklerin varlığında Streptomisetler SFM plaklarına ekim yapılarak 30 °C'deki etüvde 4-7 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda SFM plaklarının üzerine soğuk %20'lik gliserolden 1-2 ml eklendi. Öze yardımıyla kahverengi olan sporlar gliserolun sporlar üzerine yayılmasıyla çıkartıldı. Daha sonra 1 ml kadar daha soğuk %20'lik gliserol eklenerek sporlar ependorf tüplerine yerleştirildi ve -20 °C'de saklandı. Katı Streptomiset kültürleri kısa süreli olarak 4 °C'de saklandı.

Streptomisetlerin sıvı kültürleri ise 250 ml'lik erlenlerde 25 ml sıvı ortam ya da 3-5 ml sıvı ortam içeren 50 ml'lik tüplerde gerçekleştirildi. Her iki durumda

da miselleri dağıtmak için paslanmaz çelik teller kullanıldı ve deney durumuna bağlı olarak 37 °C 225 rpm'de inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

2.7. Transformasyon

2.7.1. Elektrokompentent *E. coli* JM109 hücrelerinin hazırlanması

Elektrokompentent *E. coli* JM109 hücrelerinin hazırlanması Sambrook ve ark. (1989) göre yapıldı. LB plaklarında büyütülen *E. coli* JM109 hücrelerinden tek bir koloni alınarak 50 ml'lik falkon tüplerinin içerisindeki 5 ml LB Broth'a inoküle edilerek 37 °C 225 rpm'de bir gece inkübe edildi. Bu kültürden 100 µl alınarak 10 ml LB Broth'a ekim yapıldı ve 37 °C 225 rpm'de OD₆₀₀ 0.4-0.6 oluncaya kadar inkübe edildi. Daha sonra 50 ml'lik falkon tüplerine aktararak kuru buz içerisinde 10 dakika bekletildi. Hücreler S4180 rotoru kullanılarak (Berckman GS-15R) 4 °C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Pelet iki kez soğuk steril 5 ml dH₂O içerisinde resüspanse edilerek 4 °C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Geriye kalan pelete 4 ml steril soğuk %10'luk gliserol çözeltisi ilave edilerek 4 °C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak peletle aynı miktarda steril soğuk %10'luk gliserol çözeltisi ilave edildi. Soğuk ependorf tüplerine 40-50 µl miktarında dağıtılarak -70 °C'de saklandı.

2.7.2. Elektrokompentent *E. coli* JM109 hücreleri yardımıyla transformasyon

Elektrokompentent *E. coli* JM109 hücreleri yardımıyla transformasyon Sambrook ve ark (1989) göre yapıldı. 40-50 µl'lik elektrokompentent hücreler (*E. coli* JM109) kuru buz içerisinde 5-10 dakika erimeye bırakıldı. 1-2 µl DNA eklenip hafifçe karıştırıldı. 1-2 dakikalık buz içerisindeki inkübasyondan sonra karışım soğuk 0.1 cm'lik elektroporasyon küvetinin içerisine transfer edildi. Daha sonra MicroPulser™ (Bio-Rad) marka cihazdaki Ec1 programı (1.8 kV, 5 msn) kullanılarak elektroporasyon gerçekleştirildi. Hemen 1 ml LB ya da SOC ilave

edilerek hücreler resüspanse edilip üniversal tüplere aktarılarak 37 °C 225 rpm’de 60-90 dakika inkübasyona bırakıldı. Transformasyon karışımı uygun antibiyotikler ilave edilmiş LB plaklarına ekilerek 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.7.3. Elektrokompentent *E. coli* ET12567 hücrelerinin hazırlanması

Elektrokompentent *E. coli* ET12567 hücrelerinin hazırlanması 2.7.1’deki gibi yapıldı. Farklılık olarak sadece besiyerlerine Km ve Klf antibiyotikleri de ilave edildi.

2.7.4. Elektrokompentent *E. coli* ET12567 hücreleri yardımıyla transformasyon

Elektrokompentent *E. coli* ET12567 hücreleri yardımıyla transformasyon 2.7.2’deki gibi yapıldı. Farklılık olarak sadece besiyerlerine Km ve Klf antibiyotikleri de ilave edildi.

2.8. İntergenerik Konjugasyon

İntergenerik konjugasyon Kieser ve ark. (2000) göre yapıldı. Elektrokompentent *E.coli* ET12567/pUZ8002 hücrelerinin kullanılmasıyla yapılan transformasyondan sonra oluşan kolonilerden bir tanesi alınarak uygun antibiyotik, Km ve Klf içeren 5 ml LB Broth’a inoküle edildi ve 37 °C 225 rpm’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu gecelik kültürden 200 µl alınarak uygun antibiyotik, Km ve Klf içeren taze 5 ml LB Broth’a inoküle edildi ve OD₆₀₀ 0.4-0.6 oluncaya kadar 37 °C 225 rpm’de inkübasyona bırakıldı (~ 4-6 saat). Kültür oda sıcaklığında 13000 rpm’de 4 dakika santrifüj edildikten sonra iki kez LB Broth ile yıkandı. 1/10 oranındaki LB Broth ile hücreler resüspanse edildi. *E. coli* hücreleri yıkanırken her bir konjugasyon için yaklaşık olarak 10⁸ Streptomiset sporu 500 µl 2xYT süspansiyon ortamına ilave edilerek nazikçe karıştırıldı ve 50 °C’deki su banyosuna 10 dakika bırakılarak ısı şoku sağlandıktan sonra oda

sıcaklığında 5-15 dakika soğumaya bırakıldı. Sporlara 500 µl yıkanmış *E. coli* hücreleri ilave edilerek nazikçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın büyük bir kısmı atıldı ve geriye kalan süpernatant ile yeniden resüspanse edildi. Konjugasyon karışımı 10 mM MgCl₂ içeren SFM Agar plaklarına ekim yapıldı. 30 °C'deki bir gecelik inkübasyondan sonra plaklar 50 µl Na ve uygun antibiyotik içeren 1 ml ddH₂O ilave edilerek *E. coli* hücrelerinin büyümesi engellenerek, Streptomiset ekskonjugatları seçildi. 30 °C'deki 3-5 günlük inkübasyondan sonra büyüyen koloniler uygun antibiyotik(leri) içeren SFM plaklarına ekilerek double kros-over içeren koloniler tespit edildi.

2.9. DNA Manipülasyonları ve Görüntüleme

2.9.1. Plazmitlerin izolasyonu

Plazmitlerin izolasyonu Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) kullanılarak yapıldı. Plazmit seleksiyonu için uygun antibiyotikleri de içeren taze hazırlanmış LB plaklarından tek bir koloni alınarak yine aynı antibiyotikleri içeren 5 ml LB Broth'a inoküle edilerek 37 °C 225 rpm'de bir gece inkübe edildi. *E. coli* hücreleri oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Hücre Resüspanسیون solüsyonundan 250 µl ilave edilerek hücre pelleti yüksek hızdaki vorteks yardımıyla tamamen resüspanse edildi. Hücre Lizis solüsyonundan 250 µl eklenerek tüpler 4 kez tersyüz edilerek oda sıcaklığında 1-5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 350 µl Nötralizasyon solüsyonu ilave edildi. Tüpler 4 kez tersyüz edildikten sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı spin kolonu içeren 2 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Spin kolonu yeni bir toplama tüpünün üzerine yerleştirildi ve sırasıyla 750 µl ve 250 µl Kolon Yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 13000 rpm'de sırasıyla 1 ve 2 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Spin kolonu yeni bir ependorf tüpüne aktarılarak üzerine 100 µl ddH₂O eklenerek oda

sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra spin kolonu atıldı ve elude edilen DNA’lar yeni ependorf tüplerine aktarılarak -20 °C’de saklandı. İzole edilen DNA’lar agaroz jelde yürütülerek kontrolleri yapıldı.

2.9.2. Streptomiset genomik DNA’sının izolasyonu

İzolasyonu yapılacak Streptomiset bakterileri önce LB agara ekim yapıldı ve 30 °C’deki 2-3 günlük inkübasyondan sonra genomik DNA’ları FastDNA® SPIN Toprak Kiti (MP Biomedicals) kullanılarak elde edildi. Seramik ve silika parçacıkları içeren Lizis Matriks E tüplerine önce 978 µl Sodyum Fosfat Tamponu ve 122 µl MT Tamponu ilave edildikten sonra bu tüplerin 7/8 hacmine kadar Streptomiset miselleri ilave edildi. Tüpler FastPrep® Cihazı ile 5.5 hızında 30 saniye işleme tutuldu. Bu işlemden sonra tüpler oda sıcaklığında 13000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak 250 µl PPS ayırıcı ilave edilerek tüpler 10 kez tersyüz edildi. Tüpler oda sıcaklığında 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı 15 ml’lik temiz tüplere aktarılarak 1 ml Bağlanma Matriks solüsyonu ilave edilerek 2 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra silika matriksinin çökmesi için 3 dakika beklenildi. 500 µl’lik süpernatant kısmı atılarak geriye kalan süpernatantla bağlanma matriksi ile karıştırıldı. Bu karışımdan 600 µl alınarak SPIN™ filtrelerine aktarılarak oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Geriye kalan karışım içinde aynı işlem uygulandı. Filtrelere 500 µl SEWS-M solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika yıkandı ve süpernatant kısmı atıldı. Geride kalan SEWS-M solüsyonun uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Filtre temiz bir tüpe aktarılarak oda sıcaklığında 5 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra 70 µl ddH₂O ilave edildi ve oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA’lar elde edildi ve kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

2.9.3. Enzimatik reaksiyonlar

Restriksiyon enzimleri, T₄ DNA Ligaz, Dana Bağırsak Alkalın Fosfataz (CIP) New England Biolabs (NEB) ve Fermentas'dan temin edildi. Bütün enzimler üretici firmaların talimatlarına göre kullanıldı.

2.9.4. Ligasyonlar

Gerektiği yerde, restriksiyon ya da modifikasyon reaksiyonları sonucu elde edilen DNA, QIAquick[®] PCR Pürifikasyon Kiti (Qiagen) ile temizlendi. Buna göre 1 hacimlik örneğe 5 hacim PBI tamponu ilave edilerek karışım renginin sarı olması sağlandı. Karışım 2 ml'lik QIAquick spin kolonuna aktarılarak oda sıcaklığında 1300 rpm'de 30-60 saniye santrifüj edilerek DNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Süpernatant kısmı atılarak QIAquick spin kolonu tekrar aynı tüpe konuldu. Oda sıcaklığında 1300 rpm'de 30-60 saniye PE tamponu ile yıkandı. Süpernatant kısmı atılarak QIAquick spin kolonu tekrar aynı tüpe konuldu ve 1 dakika santrifüj edildikten sonra QIAquick spin kolonu temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi. DNA'yı elude etmek için 50 µl saf su ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1300 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Elude edilen DNA steril ependorf tüpüne aktarılarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. DNA ligasyon işlemleri 14 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyon reaksiyonu 1:3 vektör/ insert oranı dikkate alınarak yapıldı.

2.9.5. Agaroz jel elektroforezi

Nükleik asitler elektroforez yoluyla agaroz jelde büyüklüklerine bağlı olarak ayrılırlar. Standart 100 ml %1'lik agaroz jeli, 1x TBE tamponu kullanılarak hazırlandı ve 1.5-2 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) ilave edildi. 1x TBE aynı zamanda yürütme tamponu olarak da kullanıldı. Örnekler DNA yükleme tamponu ilave edildikten sonra Bio-Rad marka elektroforez tankı ve güç kaynağı kullanılarak 100 Volt'ta 45-60 dakika yürümeye bırakıldı. Elektroforezden sonra Etidyum Bromür ile boyanan DNA 254 nm'de Bio-Rad transiluminatörü

kullanılarak görüntüledi ve Bio-Rad jel dökümantasyon sistemi ile de analizleri yapıldı. Markır olarak ise *HinDIII* ile kesilmiş λ DNA'sı kullanıldı.

2.9.6. DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri kazanılması

DNA fragmentlerinin agaroz jelden geri elde edilmesi Illustra GFX[®] PCR ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) kullanılarak yapıldı. Buna göre boş bir ependorf tüpünün ağırlığı tartıldı. Temiz bir jilet ile pürifiye edilecek DNA fragmenti UV transilminatörü kullanılarak kesildi. Jel küçük parçalara kesildikten sonra boş olan ependorf tüpüne transfer edilerek ağırlıkları hesaplandı. Her 10 mg jel parçası için 10 μ l Yakalama tamponu ilave edildikten sonra yüksek hızdaki vorteksle karıştırıldı. Agaroz tamamen çözülünceye kadar 60 °C'deki su banyosunda bekletildi (5-15 dakika). Agaroz tamamen çözüldükten sonra karışım GFX kolonuna aktararak oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 1300 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak GFX kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. 500 μ l Yıkama tamponu ilave edildikten sonra 1300 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. GFX kolonu temiz bir ependorf tüpüne aktararak 40 μ l distile su ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. 1300 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen DNA fragmenti temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı ve kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

2.10. Southern Blot

2.10.1. Digoksjenin işaretli problemlerin hazırlanması

Spesifik transpozon prob ve λ *HinDIII* probu Boehringer Mannheim dig DNA İşaretleme Kiti (Roche) kullanılarak hazırlandı. 5-10 μ g Tn5062 DNA'sı *PvuII* enzimi ile kesildi ve jelde yürütülen DNA'nın pürifikasyonu QIAquick[®] Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) ile yapıldı. İşaretle Tn5062 DNA'sını çoğaltmak için rastgele primer kullanıldı. DNA 95 °C'de 10 dakika boyunca denatüre edilerek hemen buza aktarıldı ve standart reaksiyon karışımı hazırlanarak 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. λ *HinDIII* probu rastgele primer işaretlenmesi için sentez

edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra 5 µl 0.2 M EDTA kullanılarak reaksiyon durduruldu. DNA çöktürülerek %70'lik etanol ile yıkandı ve daha sonra pelet kurumaya bırakıldı. Daha sonra 50 µl TE ilave edilerek DNA resüspanse edildi ve 5 ml Prehibridasyon solüsyonu eklendi. Oluşturulan solüsyon kullanmadan hemen önce 10 dakika boyunca kaynatılarak hemen buza aktarıldı.

Standart Reaksiyon Karışımı aşağıdaki miktarlardan oluşan bileşenlerden oluşmuştur:

39 µl Denatüre DNA
5 µl Hekzanükleotit karışımı
5 µl dig-dNTP işaretleme karışımı
1 µl Klenow polimeraz
47.5 µl distile su

2.10.2. Blotlama

Kromozomal DNA ve kozmit DNA (üzerinde çalışılan) uygun restriksiyon enzimleri ile kesildi. Agaroz jel elektroforezinden sonra, DNA depürinasyona uğratıldı ve daha sonra ise denatürasyonu yapıldı. İlk olarak jel 10 dakika boyunca 0.25 M HCl ile hafifçe çalkalandı. dH₂O ile iki kez yıkandıktan sonra jel iki kez 15 dakika boyunca denatürasyon tamponunda hafifçe çalkalandı ve daha sonra tekrar iki kez dH₂O ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra iki kez jel Nötralizasyon tamponunda çalkalandı. Nötralizasyon işlemi yapılırken naylon membran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) 20 dakika dH₂O ile daha sonra 10 dakika 10x SSC çözeltisi ile, 3 MM Whatman kağıdı ve sünger ise 10 dakika 10x SSC çözeltisi ile ıslatıldı.

DNA'nın jelden naylon membrana transferi Stragene Posiblot Basınç aleti ile gerçekleştirildi. Sırasıyla jelden 4-5 cm daha büyük 3 MM Whatman kağıdı, jelden 1 cm daha büyük naylon membran, jelden 0.5 cm daha küçük maske, jel ve sünger yerleştirildikten sonra alet kapatıldı ve DNA'nın naylon membrana transferini gerçekleştirmek için 1 saat boyunca 75 mmHg basıncı uygulandı. Transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra naylon membran iki 3 MM Whatman

kağıdı arasına yerleştirilerek 80 °C'deki hibridizasyon fırınında 1 saat boyunca pişirildi.

2.10.3. Hibridizasyon

Naylon membran dH₂O ile çalkalanıp naylon tülbent vasıtası ile rulo haline getirildi ve hibridizasyon tüpüne (Appligene) yerleştirildikten sonra 2x SSC ile yıkandı. 20 ml Prehibridazyon çözeltisi ile hibridizasyon fırınında 42 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra Prehibridizasyon çözeltisi döküldü. 20 ml prob 10 dakika sıcak suda bekletilerek hemen buza kaldırıldı. Buzda 1 dakika bekletildikten sonra hibridizasyon tüpüne aktarılıp hibridizasyon fırınında 42 °C'de bir gece hibridizasyona bırakıldı. Ertesi gün prob tekrar toplandı ve iki kez 42 °C'deki hibridizasyon fırınında 5 dakika naylon membran Yıkama solüsyonu I ile yıkandıktan sonra 68 °C'deki hibridizasyon fırınında iki kez 15 dakika Yıkama solüsyonu II ile yıkandı.

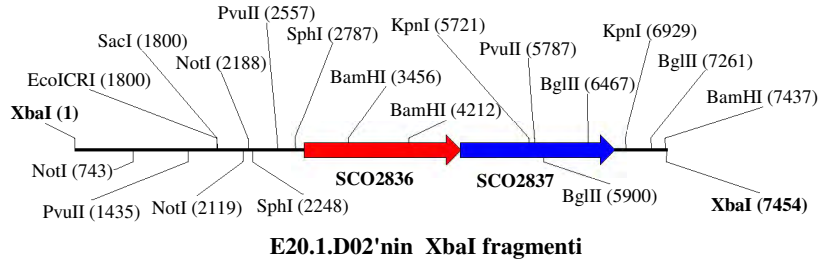
2.10.4. İmmünolojik tespit

Hibridizasyon fırının kapağı açılarak naylon membran oda sıcaklığında 1 dakika Tampon I solüsyonu ile yıkandıktan sonra 30 dakika Prehibridizasyon solüsyonu ile yıkandı. Sonra tekrar 1 dakika Tampon I solüsyonu ile yıkandı. 15 ml Tampon I solüsyonuna 3 µl Antidioksijenin AP (antibadi konjugatı) eklenerek hibridizasyon tüpüne ilave edilerek 30 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan antibadileri uzaklaştırmak için naylon membran iki kez Tampon I solüsyonu ile yeniden yıkandı. Daha sonra naylon membran plastik bir kaba aktarılıp NBT/BCIP solüsyonu (1 blotlama için 1 NBT/BCIP tablet + dH₂O = 10 ml) eklendi ve karanlıkta 37 °C'de 1-3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra bantlar belirginleştğinde reaksiyonu durdurmak için naylon membran iki kez dH₂O ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı.

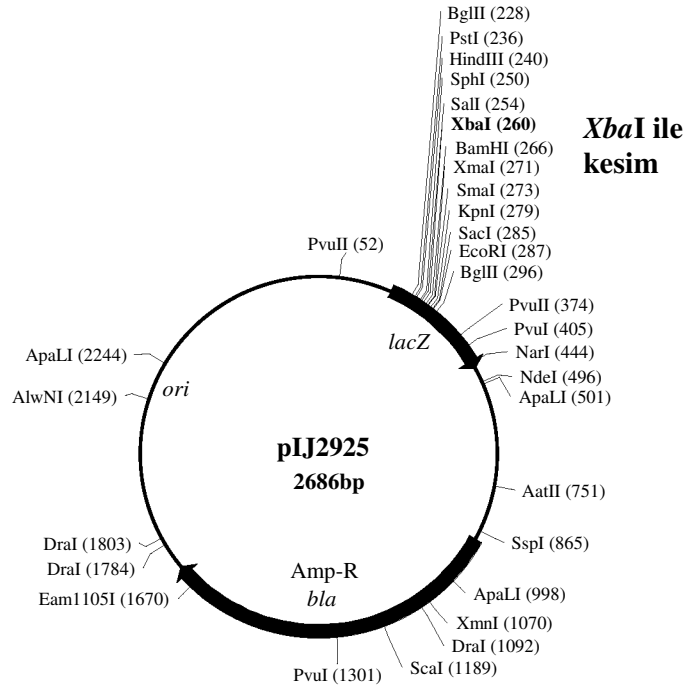
2.11. Genetik Komplementasyon

SCE20.1.D02 kozmiti Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile izole edildikten sonra *XbaI* ile kesildi. SCO2836 ve SCO2837 genlerini içeren kısım jelden Illustra GFX[®] PCR DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) ile geri kazanıldı. Aynı şekilde pIJ2925 plazmiti de *XbaI* ile kesildikten sonra jelden elde edilen kısım ile *XbaI* ile kesilen pIJ2925 plazmiti T₄ DNA ligaz ile birleştirildi. Ligasyon karışımı pREC1 olarak adlandırıldı. pREC1'in elektroporasyonu *E. coli* JM109 elektrokompent hücreleri ile yapılarak LB/Amp/Xgal/IPTG plaklarına ekim yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra beyaz kolonilerden birkaç tane alınarak 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı. Plazmit izolasyonları Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) kullanılarak yapıldı. İnsertin yeri ve oryantasyonu çeşitli enzimler kullanılarak belirlendi. Daha sonra pREC1 *EcoICRI* ve *XbaI* ile kesilerek SCO2836 ve SCO2837 genlerini içeren kısım jelden Illustra GFX[®] PCR DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) ile elde edildi. pSH152 plazmiti de *XbaI* ve *EcoRV* ile kesildikten sonra jelden elde edilen insert ile plazmitin ligasyonu T₄ DNA ligaz ile gerçekleştirildi ve yeni oluşan plazmit pREC2 olarak adlandırıldı. pREC2'in elektroporasyonu *E. coli* JM109 elektrokompent hücreleri ile yapıldı ve LB/Amp/Xgal/IPTG plaklarına ekim yapıldı. Mavi-beyaz taramadan sonra beyaz koloniler alınarak 37 °C 225 rpm'deki bir gecelik inkübasyondan sonra plazmit izolasyonları Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile yapıldı. İnsertin yeri ve oryantasyonu çeşitli enzimler kullanılarak belirlendi. Daha sonra pREC2'nin elektroporasyonu elektrokompent *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi ve LB/Hgr/Km/Klf plaklarına ekim yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra bir koloni alınarak pREC2'nin DK2836 ve DK2837 sporlarıyla intergenerik konjugasyonları yapıldı. Konjugasyondan sonra oluşan sporlar sırasıyla pREC22836 ve pREC22837 olarak adlandırıldı ve bunların spor süspansiyonları SFM/Hgr/AprM plaklarına ekilerek hazırlandı. Genetik komplementasyonun nasıl yapıldığı şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Ayrıca pSH152 plazmitinin elektroporasyonu

elektrokompetent *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi ve LB/Hgr/Km/Klf plaklarına ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Buradan bir koloni alınarak DK2836 ve DK2837 sporlarıyla intergenerik konjugasyonları yapılarak spor süspansiyonları hazırlandı. Oluşan yeni sporlar sırasıyla pSH152/DK2836 ve pSH152/DK2837 olarak adlandırıldı.

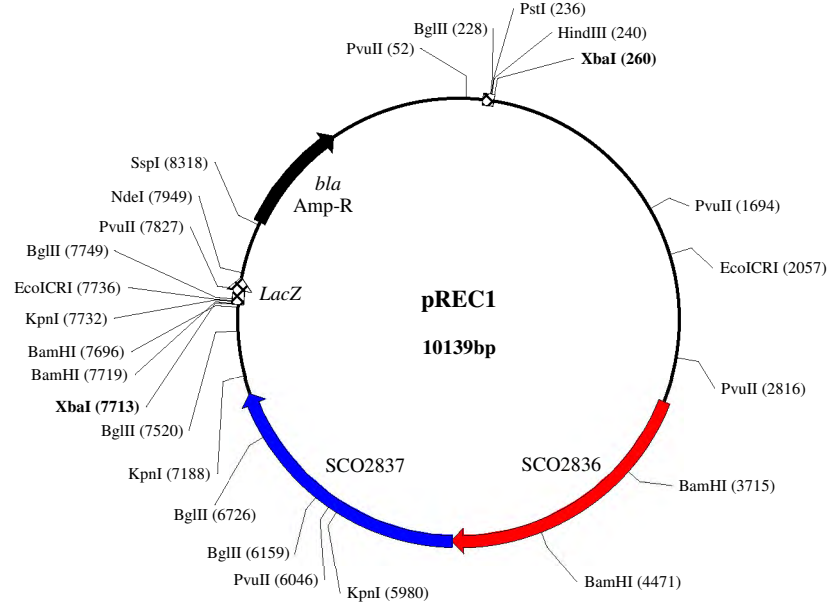


+

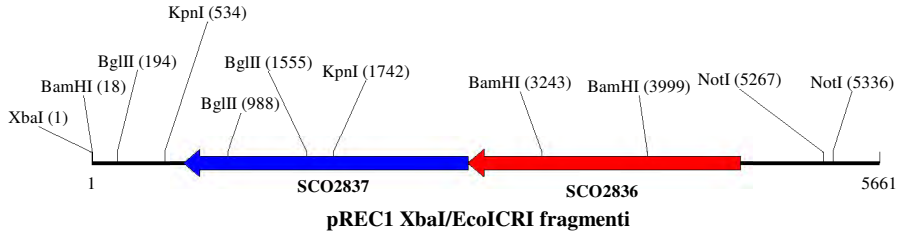


↓
Ligasyon

Şekil 2.1. Genetik komplementasyonun şematik gösterimi

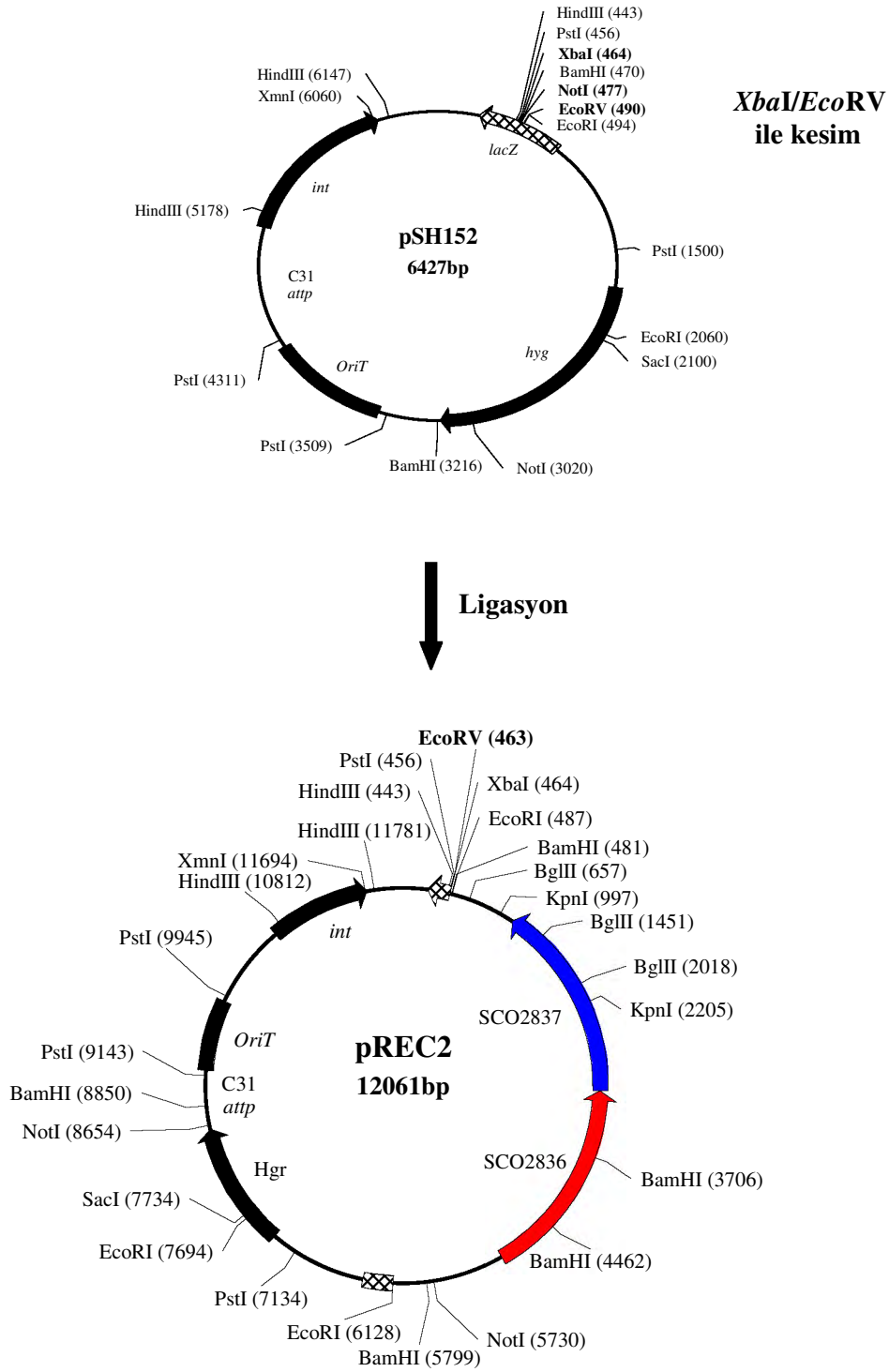


↓
**XbaI/EcoICRI
ile kesim**



+

Şekil 2.1. (Devam) Genetik komplemantasyonun şematik gösterimi



Şekil 2.1. (Devam) Genetik komplementasyonun şematik gösterimi

2.12. Mutant Türlerin Fenotipik Analizleri

S. coelicolor DK3836 ve *S. coelicolor* DK3837 mutantları R5±250 mM KCl, sükrözsüz R5±250 mM KCl, R2YE±250 mM KCl, sükrözsüz R2YE±250 mM KCl, mannitol içeren MM±250 mM KCl, glukoz içeren MM±250 mM KCl, NMMP±250 mM KCl ve SFM±250 mM KCl plaklarına ekilip yabancı tipe karşılaştırılarak morfolojik farklılıkları tespit edildi. Bu işlem için daha önceden hazırlanmış olan *S. coelicolor* DK3836, DK3837, pREC22836, pREC22837, pSH152/DK2836, pSH152/DK2837 ve yabancı tip sporları steril şartlarda öze ile önce SFM plaklarına ekildi. 30 °C'deki 3-5 günlük inkübasyon süresinden sonra yukarıda belirtilen besiyerlerine ekilerek fenotipik analizleri yapıldı.

2.13. Ekstraselüler Komplemantasyon

Ekstraselüler komplemantasyon çalışmasında R5±250 mM besiyerlerine DK2837 ve DK2836 mutantları yabancı tipe çok yakın olacak şekilde ekimleri yapılarak 30 °C'deki etüve kaldırıldı. 5 gün boyunca inkübasyona bırakılarak zamana bağlı olarak mutantlar ile yabancı tip arasındaki ilişkiye bakıldı.

2.14. *Streptomyces coelicolor* SCO2836 ve SCO2837 Genlerinin Ekspresyon (İfade) Çalışmaları

Streptomyces coelicolor SCO2836 ve SCO2837 genlerinin ekspresyon çalışmaları farklı besiyerleri (R5, NMMP ve SFM) ve zamanlarda (18, 24, 30, 42, 48, 54, 66, 72, 80, 86 ve 92 saat) ölçülerek karakterize edildi. SCO2836 ve SCO2837 genlerini kontrol ettiği düşünülen promotor bölgesi pRLux87 plazmitine aktarılarak bu promotorun aktivitesine bakıldı.

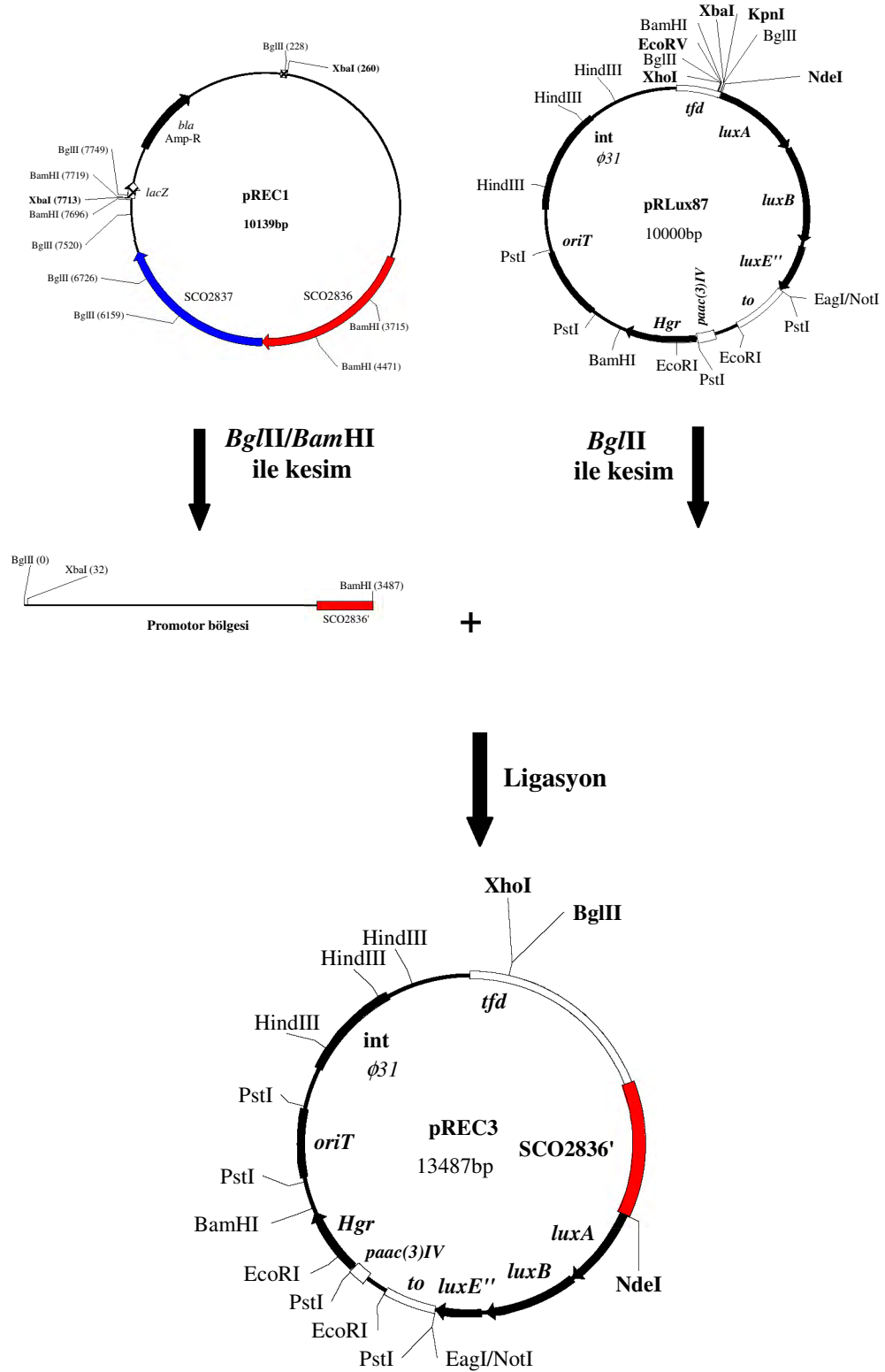
Klonlanma yöntemi Şekil 2.2'de gösterilmiştir. pREC1 plazmiti *BgIII* ve *BamHI* ile kesildi. Promotor bölgesinin olduğu düşünülen kısım agaroz jelden kesilerek Illustra GFX™ PCR DNA ve Jel Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) sayesinde geri kazanıldı. pRLux87 plazmiti ise *BgIII* ile kesildi ve 37 °C'deki su banyosunda yarım saat CIP'e maruz bırakıldıktan sonra QIAquick® Pürifikasyon

Kiti (Qiagen) ile temizlendi. Promotor bölgesi ve *Bgl*III ile kesilen pRLux87'nin ligasyonu T₄ DNA ligaz ile gerçekleştirildi ve oluşan yeni plazmit pREC3 olarak adlandırıldı. Ligasyon karışımının *E. coli* JM109 elektrokompent hücrelerine elektroporasyonu yapılarak LB/Hgr plaklarına ekim yapıldı. 37 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen kolonilerden bir tanesi alınarak 5 µl Hgr içeren LB Broth'a aktarıldı. 37 °C 225 rpm'deki bir gecelik inkübasyondan sonra plazmit izolasyonu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile yapıldı. Çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılarak insert içeren plazmitler tespit edilerek insertin yönü de belirlendi. Daha sonra pREC3 ve pRLux87'nin elektroporasyonu elektrokompent *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi ve LB/Hgr/Km/Klf plaklarına ekim yapıldı. 1 gecelik inkübasyondan sonra birer koloni alınarak pREC3 ve pRLux87 intergenerik konjugasyon yoluyla *S. coelicolor* M145 içerisine aktarıldı ve bunların spor süspansiyonları hazırlanarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Çalışmada türleri üretmek için 96 kuyucuklu siyah mikropalaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa 250 µl katı besiyeri ilave edildi. Her bir mutant ve yabancı tip spor süspansiyonlarından 60 µl alınarak 500 µl saf suda çözüldü. Hazırlanan bu çözeltiden her bir kuyucuğa 2 µl olacak şekilde katı besiyerinin üzerine ilave edildi ve 30 °C'deki etüvde istenilen zaman aralığına göre inkübasyona bırakıldı.

Lüsiferaz aktivitesi n-dekanal (Sigma) substratının ilave edilmesi ile ölçüldü. Substrat 3 MM Whatman kağıdına ilave edildi ve 3 MM Whatman kağıdı plak üzerine yerleştirilerek mikropalakın kapağı ile kapatıldı. 1.5-2 dakikalık oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra yayılan ışık miktarı Lucy 1 Microplate Lüminometre cihazı (LabTech) ile ölçüldü.

Lüsiferaz aktivitesi ATP tüketimine yol açtığından ve ayrıca büyüme oranını ve gelişimi etkilediğinden dolayı her bir zaman periyodu için her bir katı besiyerinden 4 tekrar yapılarak bu ölçümlerin ortalamaları ve standart sapmaları alındı.



Şekil 2.2. pREC3'ün şematik oluşumu

3. BULGULAR

3.1. Elektrokompotent Hücrelerinin Hazırlanması, Saklanması ve Transformasyon

Elektrokompotent hücreler (*E. coli* JM109 ve *E. coli* ET12567) materyal metottaki gibi hazırlandı ve kullanılmak üzere -70 °C'de saklandı. Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması ve bu hücrelerle yapılan transformasyon kimyasal yollarla yapılan transformasyona göre hem daha kolay hem de etkili bir metottur. Hazırlanan elektrokompotent hücreler hem direkt olarak kullanılabilir hem de -70 °C'de 6 ay boyunca etkisini kaybetmeden saklanabilir.

3.2. Streptomiset Türlerinin Üretilme ve Saklanması

Streptomiset türlerinin üretilme ve saklanması materyal metottaki gibi yapıldı ve kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.3. Kozmit ve Plazmitlerin Elde Edilmesi

SCE20.1.A11, SCE20.2.D01, SCE20.2.HO4 ve SCE20.1.D02 kozmitleri P. Dyson'dan temin edildi. İzalasyonları ise Wizard® Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) kullanılarak yapıldı. SCE20.1.A11, SCE20.2.D01 ve SCE20.2.HO4 kozmitlerinin daha sonra elektrokompotent *E. coli* ET12567 hücreleri yardımıyla transformasyonları gerçekleştirildi. Kozmitleri taşıyan *E. coli* ET12567 ile *S. coelicolor* M145 arasında intergenerik konjugasyon yapıldı. Konjugasyon sonucu oluşan tek koloniler SFM/Apr^m ve SFM/Km plaklarına ekilerek Apramisine dirençli (Apr^m^{Di}) fakat Kanamisine duyarlı (Km^{Du}) koloniler belirlendi. Apr^m^{Di} Km^{Du} koloniler (duble kros-over içeren koloniler) tekrar SFM/Apr^m ve SFM/Km plaklarına ekilerek duble kros-over içeren kolonilerin kontrolleri yapıldı. Duble kros-over (DK) içeren koloniler SFM/Apr^m plaklarına ekilerek spor süspansiyonları hazırlandı. Oluşan mutant

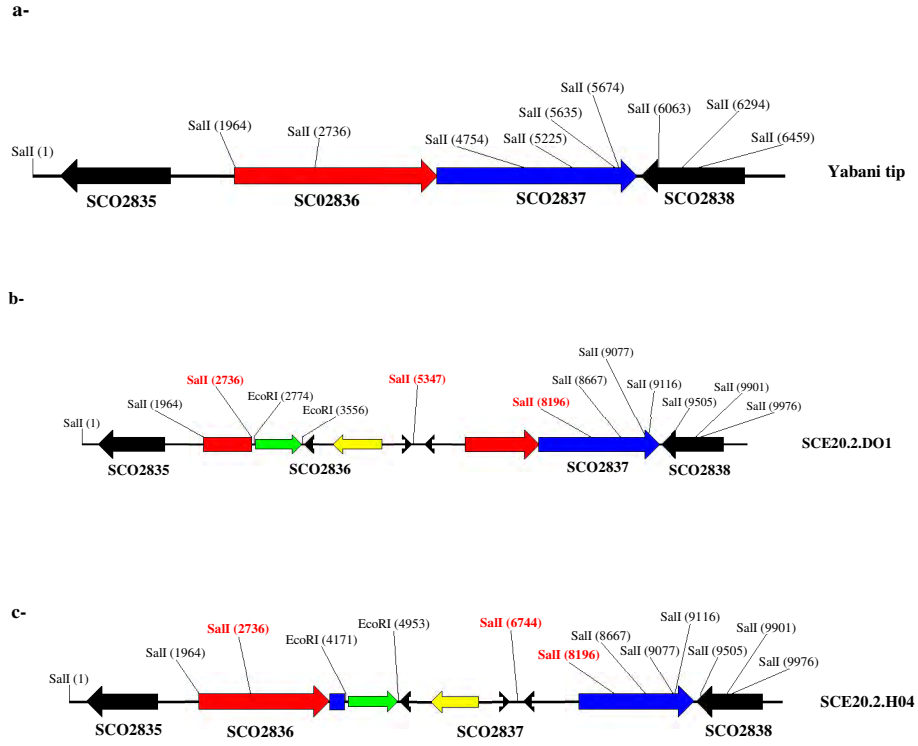
türler sırasıyla *S. coelicolor* DKE20.1.A11, *S. coelicolor* DK2836 ve *S. coelicolor* DK2837 olarak adlandırıldı.

Deneylerde kullanılan plazmitler ise R. Del Sol ve P. Dyson'dan temin edildi. pIJ2925, pSH152 ve pRLux87 plazmitlerinin *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonları yapıldıktan sonra sırasıyla LB/Amp, LB/Hgr ve LB/Hgr plaklarına ekimi yapılarak 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda iyi üremiş bir koloni seçilerek sırasıyla 5 µl Amp, Hgr ve Hgr içeren 5 ml LB Broth'a ekimi yapılarak 225 rpm'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda plazmitlerin izolasyonları Wizard® Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) kullanılarak yapıldı. Çeşitli restriksiyon enzimleri ile plazmitlerin kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

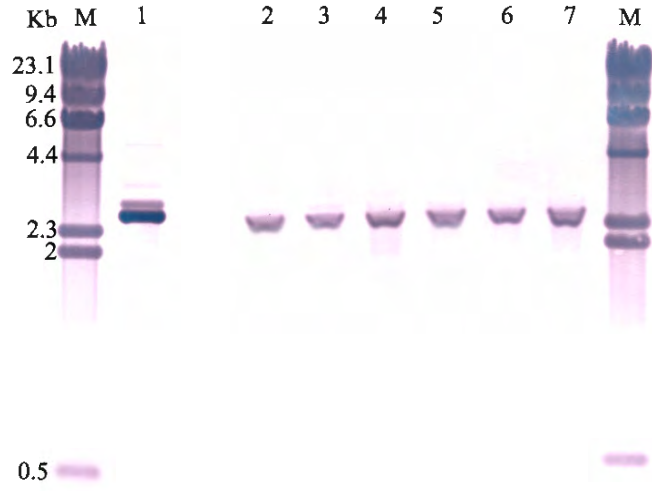
3.4. Southern Blot Analizleri

Southern Blot analizleri, oluşan mutantların doğruluğunu kanıtlamak için yapıldı. DK2836 ve DK2837 spor süspansiyonlarından LB plaklarına ekim yapılarak 30 °C'deki 2-3 günlük inkübasyondan sonra genomik DNA'ları FastDNA® SPIN Toprak Kiti (MP Biomedicals) kullanılarak elde edildi. DK2836, DK2837, SCE20.2.D01 ve SCE20.2.HO4 *SalI* enzimi ile kesilerek 37 °C'deki su banyosunda 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda her bir örnekten 5 µl alarak agaroz jelde kontrol edildi. Kontrol edilen örneklerin daha sonra Southern Blot analizleri yapıldı.

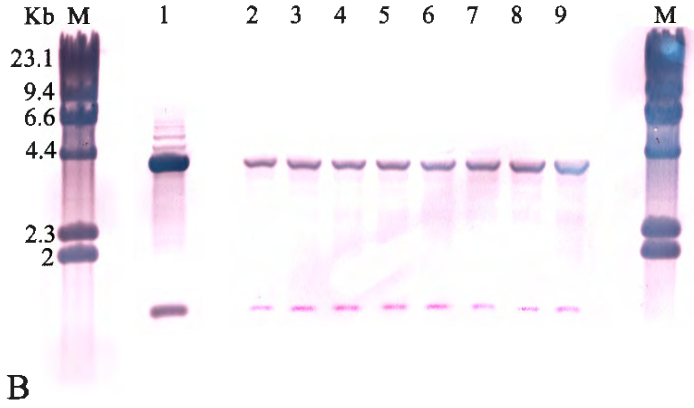
Southern Blot analizleri sonucunda Şekil 3.1'de gösterildiği gibi DK2836 ve SCE20.2.D0'in *SalI* enzimi ile kesimi sonucunda 2.849 ve 2.611 kb'lik bantlar, DK2837 ve SCE20.2.H04'ün *SalI* enzimi ile kesimi sonucunda ise 4.008 ve 1.452 kb'lik bantlar görüldü. Bu sonuçlarda bize mutasyonların sadece Tn5062 transpozunundan kaynaklandığını gösterdi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. SCO2836, SCO2837 ve komşu genlerin a- *S. coelicolor* M145 b- SCE20.2.DO1 ve c- SCE20.2.H04'te şematik gösterimi.



A



B

Şekil 3.2. Southern Blot sonuçları

A- M= λ HinDIII, 1- SCE20.1.DO2, 2-7 DK2836 mutantları

B- M= λ HinDIII, 1- SCE20.2.H04, 2-9 DK2837 mutantları

3.5. Genetik Komplemantasyon

SCE20.1.D02 kozmiti Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile izole edildikten sonra *Xba*I ile kesildi. SCO2836 ve SCO2837 genlerini içeren kısım jelden Illustra GFX[®] PCR DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) ile elde edildi. Aynı şekilde pIJ2925 plazmiti

de *XbaI* ile kesildikten sonra jelden edilen kısım ile *XbaI* ile kesilen pIJ2925 plazmiti T₄ DNA ligaz ile birleştirildi. Ligasyon karışımı pREC1 olarak adlandırıldı. pREC1'in elektroporasyonu *E. coli* JM109 elektrokompent hücreleri ile yapıldı ve LB/Amp/Xgal/IPTG plaklarına ekim yapıldı. Plaklarda üreyen beyaz kolonilerden alınarak 37 °C 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra plazmitlerin izolasyonu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile yapıldı. İnsert varlığı ve oryantasyonu çeşitli enzimler kullanılarak belirlendi. Daha sonra pREC1 *EcoICRI* ve *XbaI* ile kesilerek SCO2836 ve SCO2837 genlerini içeren kısım jelden Illustra GFX® PCR DNA ve Jel Bant Pürifikasyon Kiti (GE Healthcare) ile elde edildi. pSH152 plazmiti de *XbaI* ve *EcoRV* ile kesildikten sonra jelden elde edilen insert ile plazmitin ligasyonu T4 DNA ligaz ile gerçekleştirildi ve yeni oluşan plazmit pREC2 olarak adlandırıldı. pREC2'in elektroporasyonu *E. coli* JM109 elektrokompent hücreleri ile yapılarak LB/Amp/Xgal/IPTG plaklarına ekim yapıldı ve 37 °C'deki etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Mavi-beyaz taramadan sonra birkaç tane beyaz koloni alınarak 37 °C'de 225 rpm'deki çalkalayıcıda bir gecelik inkübasyona bırakıldıktan sonra plazmit izolasyonları Wizard® Plus SV Minipreps DNA Pürifikasyon Sistem Kiti (Promega) ile yapıldı. İnsert varlığı ve oryantasyonu çeşitli enzimler kullanılarak belirlendi. Daha sonra pREC2'nin elektroporasyonu elektrokompent *E. coli* ET12567 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi ve LB/Hgr/Km/Klf plaklarına ekim yapıldı. 37 °C'deki 1 gecelik inkübasyondan sonra üreyen kolonilerden bir tane alınarak pREC2'nin DK2836 ve DK2837 sporlarıyla intergenerik konjugasyonları yapıldı. Konjugasyondan sonra oluşan sporlar sırasıyla pREC22836 ve pREC22837 olarak adlandırıldı ve bunların spor süspansiyonları SFM/Hgr/AprM plaklarına ekilerek hazırlandı.

3.6. Mutant Türlerin Fenotipik Analizleri

S. coelicolor DK3836 ve *S. coelicolor* DK2837 mutantları çeşitli besiyerlerine ekilip yabancı tiplerle karşılaştırılarak morfolojik farklılıkları tespit edildi.

S. coelicolor DK3836 ve *S. coelicolor* DK2837 mutantları belkide havasal gelişme için en çok kullanılan SFM±KCl plaklarına ekildiğinde havasal gelişmede gecikme olduğu gözlemlendi. 2. günde bu gecikmeye rastlanılırken 3. ve daha sonraki günlerde yabani tipe benzer gelişme gösterdiği saptandı. Ancak her iki mutantta da antibiyotik üretiminin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.3). Glikoz ya da mannitol içeren MM±KCl plaklarında her iki mutantta da gelişme yabani tipe benzer şekilde gerçekleşti (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). NMMP±KCl plaklarında havasal misel oluşumunda gecikmeye rastlanıldı. 250 mM KCl ilave edilen NMPP plaklarında daha fazla antibiyotik üretimi gözlemlendi (Şekil 3.6). R2YE±KCl plaklarında DK2836'da antibiyotik üretimi DK2837'ye göre daha fazla gerçekleşirken her iki mutantta da havasal gelişmede gecikme olduğu gözlemlendi (Şekil 3.7). R5 plaklarında havasal misel oluşumunun DK2836'da DK2837'ye göre daha hızlı gerçekleştiği gözlemlendi. Ayrıca antibiyotik üretiminin DK2836'da DK2837'ye nazaran daha fazla gerçekleştiği görüldü (Şekil 3.8). Her iki mutantta da sükröz ilave edilmemiş R2YE±KCl ve R5±KCl plaklarında havasal gelişme R2YE±KCl ve R5±KCl plaklarına göre daha hızlı gerçekleşti (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Bu sonuçlarda bize fenotipik farklılığın kültür ortamına bağlı olarak değiştiğini ve osmolit uygulamasının mutantlarda gelişmeyi etkilediğini gösterdi.

Yabani tip kopyası taşıyan mutant türlerin (pREC22836 ve pREC22837) yabani tipe benzer fenotipik özellik göstermesi, fenotipik farklılığın sadece mutant genlerden kaynaklandığını ve bu genlerin polar etki göstermediğini gösterir. pSH152 taşıyan mutant türlerin, taşımayan mutant türlerle benzer fenotipik etki göstermesi ise vektörün fenotipteki restorasyonda bir etkisinin olmadığını gösterir. Ancak yapılan deneylerde pSH152 plazmitinin mutantların fenotipik görüntüsünü bir miktar etkilediği görülmesiyle birlikte bu farklılıklar kabul edilebilir sınırlar içerisinde olmuştur.

SFM



SFM+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

SFM



SFM+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. gün

Şekil 3.3. SFM plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

Glukoz içeren MM



Glukoz içeren MM+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

Glukoz içeren MM



Glukoz içeren MM+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

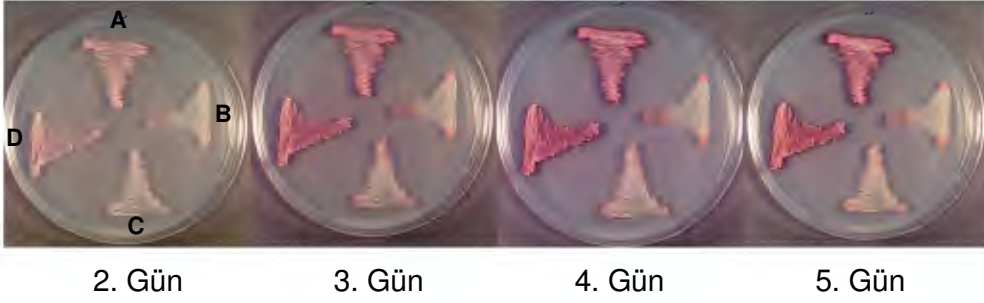
5. Gün

Şekil 3.4. Glukoz içeren MM plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

Mannitol içeren MM



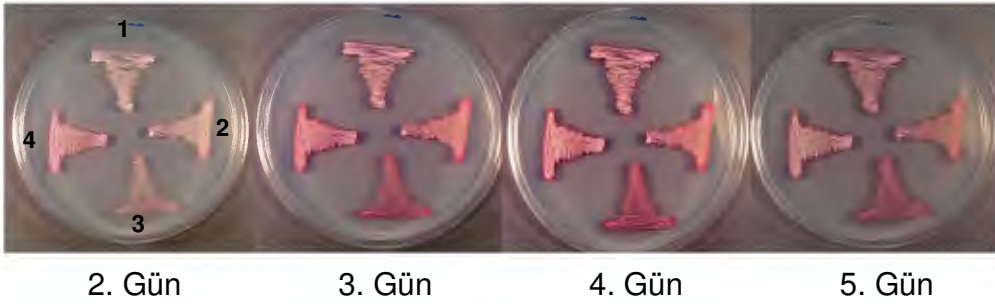
Mannitol içeren MM+KCl



Mannitol içeren MM



Mannitol içeren MM+KCl

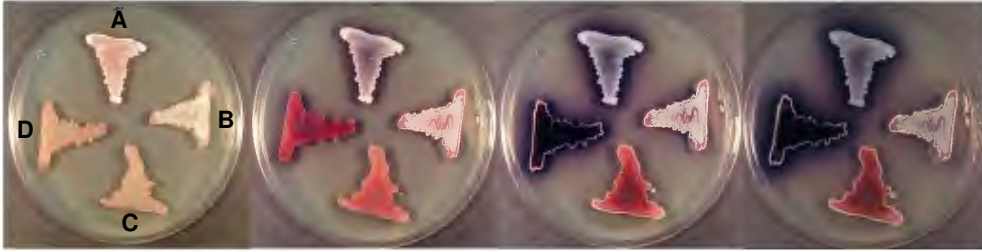


Şekil 3.5. Mannitol içeren MM plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

NMMP



NMMP+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

NMMP



NMMP+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5.

Şekil 3.6. NMMP plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

R2YE



R2YE+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

R2YE



R2YE+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

Şekil 3.7. R2YE plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

R5



R5+KCl



2. gün

3. gün

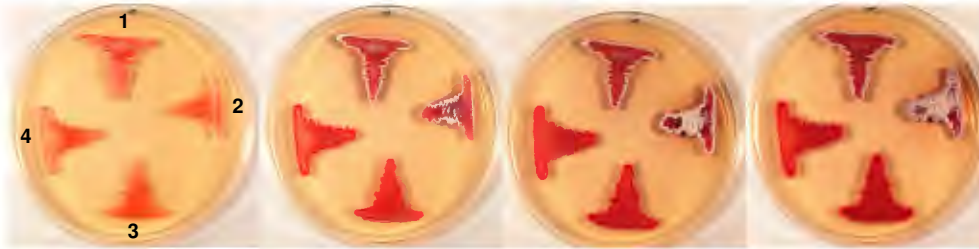
4. gün

5. gün

R5



R5+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

Şekil 3.8. R5 plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

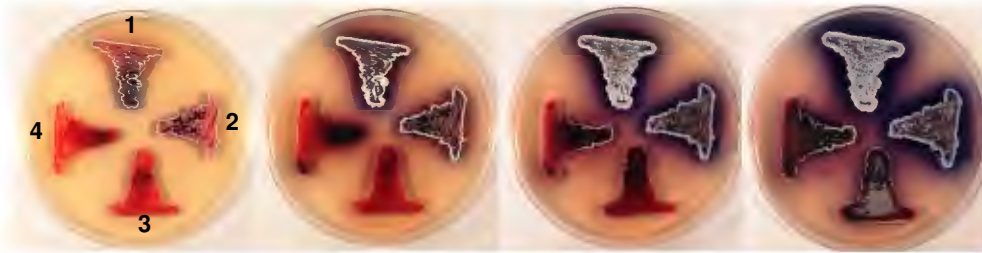
Sükrozsuz R2YE



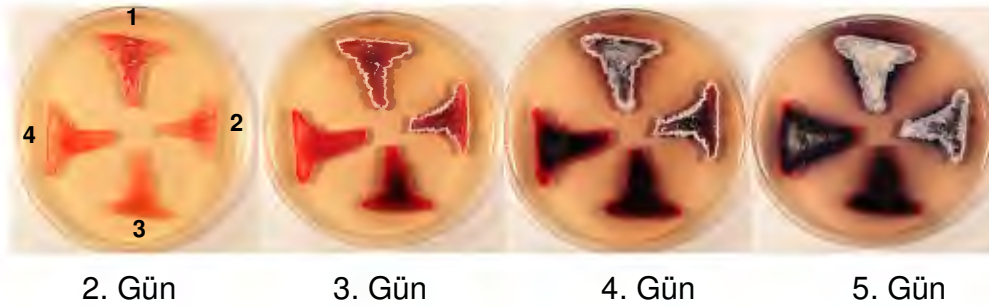
Sükrozsuz R2YE+KCl



Sükrozsuz R2YE

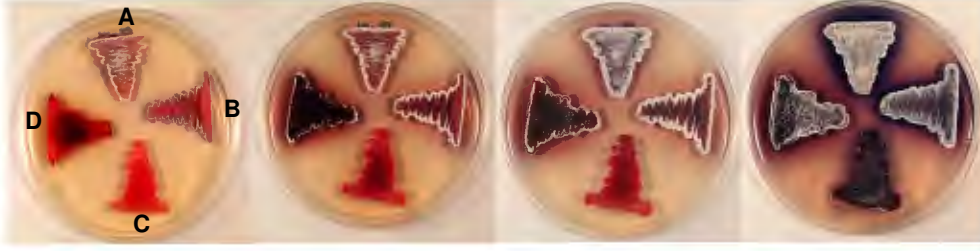


Sükrozsuz R2YE+KCl



Şekil 3.9. Sükrozsuz R2YE plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145 B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

Sükrozsuz R5



Sükrozsuz R5+KCl



2. Gün

3. Gün

4. Gün

5. Gün

Sükrozsuz R5



Sükrozsuz R5+KCl



2. Gün

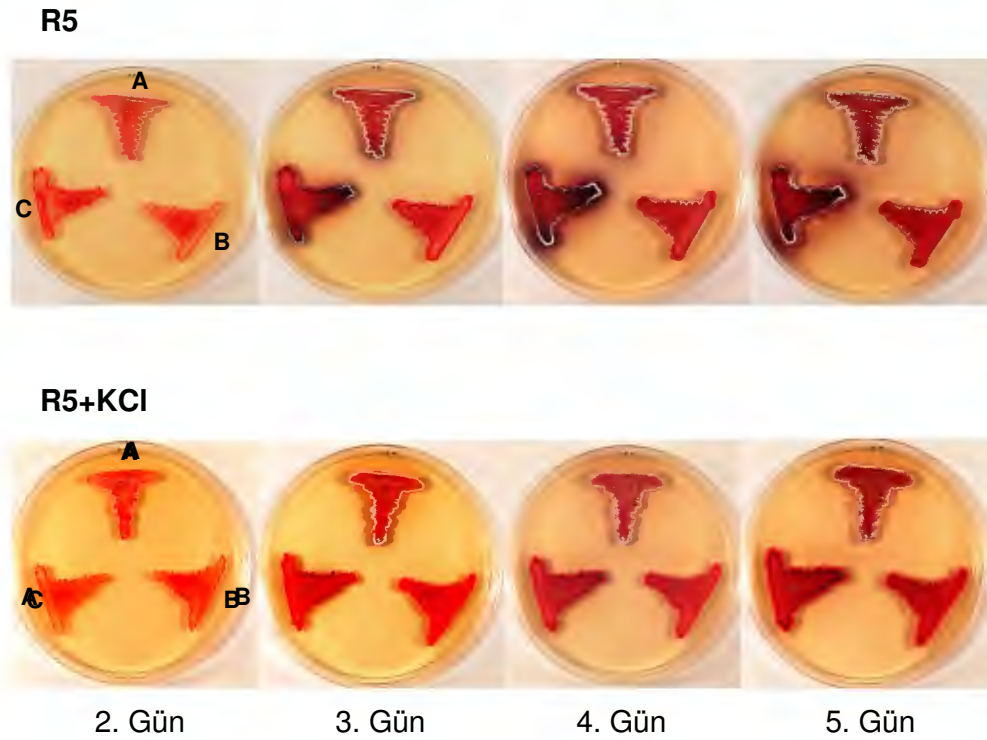
3. Gün

4. Gün

5. Gün

Şekil 3.10. Sükrozsuz R5 plaklarında fenotipik çalışmalar A- *S. coelicolor* M145, B- pREC22836, C- DK2836/pSH152, D- DK2836, 1- *S. coelicolor* M145, 2- pREC22837, 3- DK2837/pSH152, 4- DK2837

R5±KCl plakları üzerinde yapılan incelemelerde DK2836 mutantlarındaki havasal gelişmenin DK2836'ya göre daha hızlı olduğu gözlemlendi. Bu durumu kanıtlamak için DK2836 ve DK2837 mutantları R5±KCl plaklarına ekilerek karşılaştırıldı (Şekil 3.11). KCl ilave edilmiş besiyerinde gelişmenin daha yavaş gerçekleştiği görüldü. Bu durumun ya Tn5062 transpozonunun yerinden ve yönünden kaynaklanabileceği ya da transpozon veya SC02836 geninde ikinci bir promotor olabileceği fikrini ortaya çıkardı. Fenotipik farklılıkta transpozon yönü ve yerinin etkisini belirlemek için SC02836 genindeki diğer insersiyon (SCE20.1.A11 kozmiti) çalışıldı. Bu kozmit ile yapılan çalışmalarda da yine havasal misel oluşumunda gecikme olduğu gözlemlendi (veri gösterilmemiştir). Bu sonuçta bize transpozon yeri ve yönünün bu değişime etki etmediğini gösterdi.



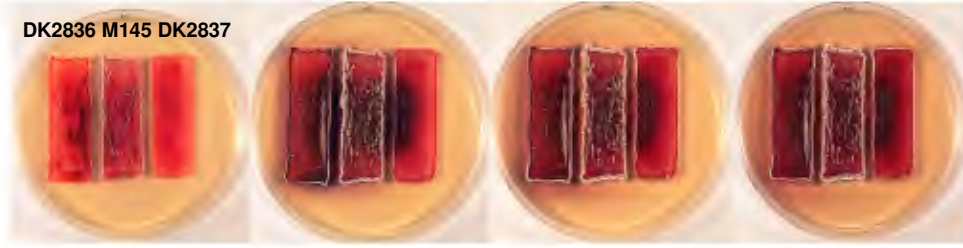
Şekil 3.11. DK2836 ve DK2837 mutantlarının karşılaştırılması A- *S. coelicolor* M145, B- DK2837, C- DK2836

3.7. Ekstraselüler Komplemantasyon

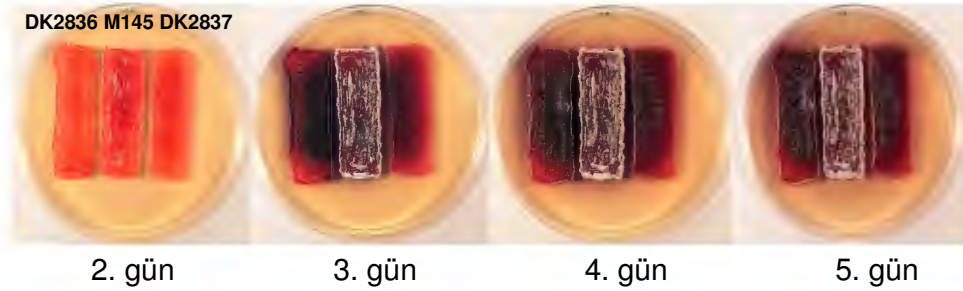
Bld mutantlarda havasal hif oluşumu, R2YE gibi zengin besiyerlerinde mutant yabani tipe ya da diğer *bld* mutantlara çok yakın olduğu zaman restore edilebilir. Bu durum ekstraselüler komplemantasyon olarak adlandırılır. Mutantlar arasındaki ilişki tek yönlüdür. Bir mutant verici olarak görev yaparken diğer mutant alıcı olarak görev yapar ve ekstraselüler molekül(ler) sadece alıcı tarafından alınır ve bu sayede havasal hif oluşumu restore edilir (Willey ve ark. 1991; Willey ve ark. 1993, Claessen ve ark. 2006).

Ekstraselüler komplemantasyon çalışması Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Bu çalışmada R5±250 mM KCl besiyerlerine DK2837 ve DK2836 mutantları yabani tipe çok yakın olacak şekilde ekimleri yapılarak 30 °C’deki etüve kaldırıldı. 2. gün sonunda sadece yabani tipe yakın olan bölgelerde havasal hif oluşumu gözlenirken 3. ve daha sonraki günlerde hem yabani tipe yakın olan kısımda hem de diğer kısımlarda havasal hif oluşumu gözlemdi. Ayrıca R5 plaklarındaki gelişmenin R5+KCl plaklarındaki gelişmeden daha hızlı olduğu gözlemdi. Bu sonuçlarda bize her iki mutantında *bld* olmadığını fakat yabani tipe göre havasal hif oluşumunda gecikme olduğunu gösterdi.

R5



R5+KCl



Şekil 3.12. Ekstraselüler komplemantasyon çalışması

3.8. *Streptomyces coelicolor* SCO2836 ve SCO2837 Genlerinin Ekspresyon (İfade) Çalışmaları

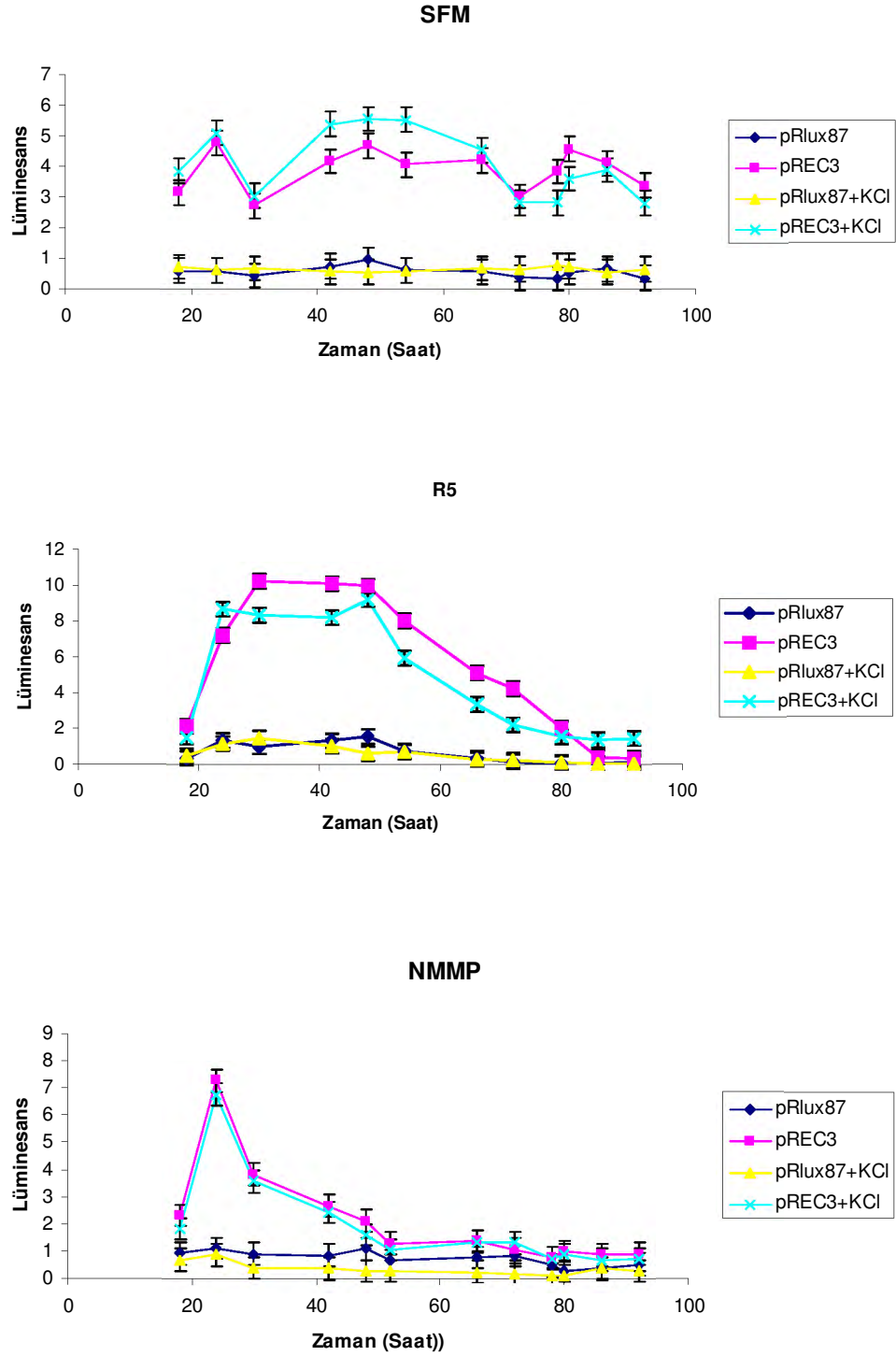
pRLux87 ve pREC3 içeren *S. coelicolor* A3(2) M145 spor süspansiyonları 96 kuyucuklu siyah mikropalaklar kullanılarak materyal metotta tarif edildiği gibi R5, NMMP ve SFM plaklarına ekildi. Bu besiyerleri mutantların fenotipik analiz sonuçlarına göre seçildi.

Lüminesans 18-92 saat arasındaki bir çok zaman periyodunda ölçüldü. Her bir zaman periyodunda her bir besiyeri için 4 ölçüm yapılarak bunların ortalamaları ve standart sapmaları alındı. İnkübasyon zamanı tek başına referans olarak kullanılamaz. Çünkü ilave edilen spor süspansiyonlarının yoğunluğu, miktarı ve yaşı elde edilen sonuçları etkiler. Ayrıca raportör genin yanında transkripsiyon sonlandırıcısı olmadığından dolayı pRLux87 içeren sporelerde da lüminesans görüldü.

Şekil 3.13'de görüldüğü gibi SCO2836 ve SCO2837 genlerinin promotor bölgesinin aktivitesi SFM plaklarında 24 saatlik uygulamanın sonunda azalmış

sonra tekrar artmıştır. Bu sonuçta bize SFM plaklarındaki gecikmenin nedenini açıklayabilir. SFM besiyerlerinde vejetatif faz ve havasal hif oluşumu zengin besiyerlerine göre çok hızlı gerçekleşmektedir. R5 besiyerinde 30. saate kadar promotor aktivitesi artarken 30-48 saatler arası sabit kalmış daha sonraki uygulamalarda ise azalmıştır. NMMP plaklarında ise 24 saatlik uygulamadan sonra promotor aktivitesi azalmıştır. 250 mM KCl içeren besiyerlerinde de promotor aktivitesi KCl içermeyen plaklarla benzerlik gösterdi.

Çalışılan besiyerlerinde en yüksek ekspresyon seviyesine R5'in 30 saatlik uygulamasında rastlanılmıştır. Genel olarak promotor bölgesi havasal gelişmenin erken fazlarında aktivite edilmektedir. Ekspresyon seviyesinin farklı besiyerlerinde farklılık göstermesi SCO2836 ve SCO2837 genleri promotor bölgesi ifadesinin koşullu olduğunu gösterdi.



Şekil 3.13. *Streptomyces coelicolor* SCO2836 ve SCO2837 genleri promotor bölgesi ekspresyon çalışmaları. Çubuklar standart sapmayı göstermektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aktinomisetler Gram-pozitif toprak bakterileri olup topraktaki populasyonları toprak tipine göre değişmektedir. G+C oranı oldukça yüksek olup (> %55), selülaz, kitinaz ve lignin peroksidaz gibi ekstraselüler enzimlere sahip olduklarından dolayı dekompozisyon ve mineralizasyon döngülerinde çok önemli rol oynarlar. 16 S rRNA'ları dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada 10 alt takıma ayrılmıştır ve hala bu grubun büyük bir çoğunluğu sınıflandırılmayı beklemektedir. Aktinomisetlerin bazı üyeleri (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* ve *Corynebacterium diphtherae* gibi) insan patojenleridir (Embley ve Stackebrandt 1994).

Streptomisetler aktinomiset familyasının en çok çalışılan ve en iyi bilinen cinsini oluşturmaktadır. Streptomisetler yüksek oranda G+C (%70-74) içeriğine sahiptirler ve çok kompleks bir hayat devrine sahiptirler. Streptomisetler Gram-pozitif miselli toprak bakterileri olup çok miktarda sekonder metabolitler üretilirler ve bunlar tıpta ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Miyadoh 1993).

Streptomisetler toprak bakterileri arasında en çok ve her yerde bulunan grubu teşkil ederler (Hodgson 2000). Sahip oldukları çok çeşitli metabolik işlemler ve biyotransformasyon olaylarından dolayı çok önemli olayların gerçekleşmelerini sağlarlar. Ölü bitki, hayvan ve mantar polimerlerini bileşenlerine ayırmak suretiyle toprak biyodegragasyonunda önemli rol oynarlar (McCarthy ve Williams 1992; Wang ve ark. 1989). Asidik toprağa kitin ilavesi asidofilik Streptomisetlerin kitinolitik aktivite kazanmasına yol açarak toprağın amonifikasyonuna sebep olur ve neticede nütrofiller tarafından kolonizasyon gerçekleşir (Williams ve Robinson 1981).

Streptomiset genetik çalışmaları 1954 yılında David Hopwood'un doktora çalışmasıyla birlikte başlamıştır. Model organizma olarak mavi renkli sekonder metabolit ürettiği için *S. coelicolor* A3(2) seçilmiştir ve bu tür günümüze kadar Streptomiset genetik çalışmalarının temelini oluşturmuştur. *Streptomyces coelicolor* A(3) terimi ilk defa Hopwood (1999) tarafından mavi pigmentli ve agarı eriten tür olarak tanımlanmıştır. *Streptomyces coelicolor* diğer

Streptomisetlere benzer şekilde kimyasal olarak farklı çeşitli antibiyotiklere sahiptir.

Streptomisetler hücre farklılaşması, antibiyotik oluşumu, sporulasyon ve programlanmış hücre ölüm mekanizmasını içeren belirli bir hayat döngüsüne sahiptir. Hayat döngüsü sporların çimlenme tüpünü oluşturmasıyla başlar ve buradan substrat misel olarak da adlandırılan vejetatif misellerin yayılması gerçekleşir. Birçok bakteri türünden farklı olarak dallanarak büyüyen vejetatif hifleri filamentlidir ve hifler substrat içerisinde genişleyerek yoğun miselyumları oluştururlar. Bu hücreler hareketli olmadıkları için ortamdaki besin miktarı azaldığı zaman açlık tehlikesi ile karşı karşıya kalırlar. Besin miktarının azalması ve diğer fizyolojik stresler vejetatif misellerin morfolojik ve fiziksel olarak değişmesine yol açar. Bu duruma karşı Streptomiset kolonileri ikinci filament hücre tipi olan havasal miselleri ve antibiyotik gibi birçok sekonder metabolitleri oluştururlar. Koloni yüzeyinde büyüyen havasal hifler bulanık ve beyaz renklidir. Oluşan havasal hifler ise gri renkli sporları oluşturur (Chater 2001; Miguélez ve ark. 2000; Flardh 2003; Willey ve ark. 2006; Challis ve Hopwood 2003).

Streptomiset hayat döngüsünün morfolojik olayları için gerekli olan genler iki sınıfta (*bld* ve *whi* mutantlar) toplanmıştır. *Bld* (bald = kel) mutantlar havasal misel oluşmadan önce hayat döngüsünü bloke ederken (Nodwell ve Rosick 1998; Willey ve ark 1993; Champness 1988; Nodwell ve ark. 1999), *whi* (white = beyaz) mutantlar havasal hiflerde hücre bölünmesi ve sporların olgunlaşması için gereklidir (Kelemen ve ark. 1998; Chater 1993). *Bld* mutantlar havasal hiflerin oluşmasını engelleyerek yabancı tipte görülen karakteristik bulanık morfolojik oluşumun görülmesini engellerler (Chater ve Horinouchi 2003; Elliot ve Talbot 2004; Wösten ve Willey 2000). Ayrıca *bld* mutantların bazıları antibiyotik üretimi (Champness 1988), katabolit represyon (Pope ve ark. 1996) ve hücre-hücre haberleşmesi (Willey ve ark. 1993) üzerinde de etkilidir. *Bld* mutantlarının diğer bir önemli bir özelliği de birçoğunun kültür ortamına bağlı olmasıdır. Zengin ortamlarda *bld* olarak tanımlanan birçok *bld* gen, zayıf karbon kaynaklarında (mannitol gibi) yabancı tipte aynı özellik göstermektedir (Champness 1988).

Havasal hifler sulu çevreden kurtulur kurtulmaz etrafları rodlet tabakası olarak adlandırılan ince fibröz tabaka ile kaplanır (Hopwood ve Glauert 1961;

Wildermuth ve ark. 1971). Bu tabaka 8-12 nm genişliğinde ve 450 nm uzunluğunda çiftler halinde bulunan çubuklardan oluşmaktadır. Tabaka, çaplinler (Chp), rodlinler (Rdl) ve SapB'den oluşmaktadır

Spor oluşumu ile ilgili birçok *S. coelicolor* mutanları yabancı tipte tipik olarak gözüken gri renkli havasal misel oluşumundan yoksundurlar. Bu tür mutantlar *whi* olarak adlandırılırlar. *Whi* mutantlarda kendi aralarında erken ve geç *whi* mutantlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Erken *whi* mutantlarda genel olarak unigenomik kompartmanların oluşumu engellenirken geç *whi* mutantlarda spor kompartmanları oluşur fakat oluşan sporlarda pigmentleşmede kusurlar vardır ya da DNA miktarlarında yabancı tipe göre farklılıklar bulunur. *Whi* genler sporların olgunlaşması için gerekirken havasal hiflerin oluşması için gerekli değildirler (Chater 2001; Flardh ve ark. 1999; Chater ve ark. 1989).

Streptomiset kromozomları hakkındaki bilgilerin çoğu *S. coelicolor* A(3) (Bentley ve ark. 2002) ve *S. avermitilis*'in (Ikeda ve ark. 2003) genom dizilişlerinin çıkartılmasıyla elde edilmiştir. Streptomisetler çok çeşitli metabolik işlemleri ve biyotransfarmasyon olaylarını gerçekleştirdiklerinden dolayı birçok bilim adamı tarafından çalışma konusu olmuştur.

SCO2836 geni, *S. coelicolor* genomunun 3095506-3097467 bazları arasında bulunan 1961 bazlık genidir. SCO2836 geninin tahmin edilen 6 tane transmembran domaini (79-101, 111-133, 430-452, 462-481, 546-565 ve 570-589), 2 tane düşük karmaşıklık bölgesi (594-617, 627-638) ve 1 tane de glikozil transfer domaini (166-342) bulunmaktadır.

Glikozil transfer reaksiyonları nicel anlamda canlı kütlenin hidrolizi ve biyosentezini sağladıklarından dolayı dünyadaki en önemli biyotransfarmasyon olaylarıdır. Polissakkaritlerin ve kompleks karbonhidratların biyosentezi de oldukça önemlidir. Çünkü bu moleküller; yapısal, depo ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli reaksiyonlarda görev almaktadırlar. Dissakkaritler, oligosakkaritler ve polissakkaritlerin biyosentezinde glikozil transferaz enzimleri (EC 2.4.x.y) görev almaktadır. Bu enzimler aktive edilmiş verici moleküllerden spesifik alıcı moleküllere glikozidik bağ oluşturmak suretiyle şeker gruplarının transferini gerçekleştirirler (Campbell ve ark.1998).

SCO2837 geni *S. coelicolor* genomunun 3097464-3099401 bazları arasında bulunan 1937 bazlık gendir. SCO2837 geninin tahmin edilen sinyal peptit domaini (1-24), Pfam:Kelch domaini (287-334, 337-385 ve 446-496) ve SCOP domaini (549-644) bulunmaktadır.

Galaktoz oksidaz (GO, EC 1.1.3.9 D-galaktoz:oksijen 6-oksidoredüktaz) *Fusarium spp.* (Avigad ve ark. 1962), *Gibberella fujikurio* (Aisaka ve ark. 1982) ve *Fusarium graminearum* (Koroleva ve ark. 1983) mantarlarından elde edilmiş ekstraselüler bir enzim olup primer alkollerin oksidasyonu katalizler ve sonuçta H₂O₂ oluşur (Whittaker ve Whittaker 1990; Amaral ve ark. 1996).

GO birçok alanda biyosensör, kimyasal maddelerin sentezinde ve kontrol amaçlı olarak kullanılmaktadır. Sensör uygulamalarında D-galaktoz, laktoz ve diğer GO substrat konsantrasyonlarını ölçmek (Vega ve ark. 1998; Tkac ve ark. 1999), kan örneklerinde (Vrbova ve ark. 1992) ve süt endüstrisinde kalite kontrol markırı (Adanyi ve ark. 1999; Mannino ve ark. 1999) olarak kullanılmıştır. Ayrıca kolon kanserinde ve prekanserde dissakarit tümör markırını keşfetmek içinde kullanılmıştır (Yang ve Shamsuddin 1996; Said ve ark. 1999) .

Streptomyces coelicolor A3(2)'nin tahmin edilen 7825 geni vardır ve bu sayı ökaryot *Saccharomyces cerevisiae*'den bile daha fazladır (Goffeau ve ark. 1996). Birçok bilim adamı bu genlerin fonksiyonlarını çeşitli yöntemlerle araştırmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi de genleri transpozon aracılığı ile mutasyona uğratmak ve bu mutasyonun etkilerini incelemektir (Herron ve ark. 2004). Bu çalışmanın amacını da SCO2837 ve SCO2836 genlerinin mutasyona uğratılarak, bu mutasyonların fenotip üzerindeki etkilerinin araştırılmasını oluşturmaktadır.

Yapılan mutasyonlar Southern Blot ile doğrulanarak mutasyonların sadece Tn5062'den kanaklandığı belirlenmiştir. Genetik dizisi çıkarılmış organizmaların genom analizleri için kritik yöntemlerden birisi çok amaçlı mutant kütüphanelerin kullanılmasıdır. Transpozon mutajenezisi, bu kütüphaneleri oluşturmak için en etkili yöntemlerden bir tanesidir. Bishop ve ark. (2004) Gram-pozitif *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin gen fonksiyonlarını araştırmak için Tn5 transpozonunu kullanarak Tn5062 transpozonunu geliştirmişlerdir. Bu transpozon *S. coelicolor* kozmit kütüphanesinin *in vitro* transpozon mutajenezisi için

kullanılmıştır Bu yöntem yüksek verimlilik ve kullanılabilirlik sağlamaktadır. Tn5 transpozonu moleküler düzeyde bütün transpozisyon sistemleri arasında en iyi karakterize edilen sistemlerden birisidir (Reznikoff ve ark. 1999). Tn5062 ile oluşturulan kozmit kütüphanesi *S. coelicolor*'daki mutant oluşumunu ve değerlendirmesini kolaylaştırmıştır. Bir gende birçok insersiyon oluşturularak sadece genlerin tahrip edilmesi sağlanmayıp aynı zamanda çok domainli proteinlerin bağımsız her bir domainide çalışabilmektedir. Bu çalışmada da SCO2836 genindeki iki insersiyonun (SCE20.2.D01 ve SCE20.1.A11) fenotip üzerindeki etkileri araştırılarak Tn5062 transpozonunun yeri ve yönünün etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

S. coelicolor DK3836 ve *S. coelicolor* DK3837 mutantları farklı besiyerlerine ekilip yabancı tipte karşılaştırılarak morfolojik farklılıkları tespit edilmiştir. Kullanılan R5±250 mM KCl, sükrözüz R5±250 mM KCl, R2YE±250 mM KCl, sükrözüz R2YE±250 mM KCl, NMMP±250 mM KCl ve SFM ± 250 mM KCl plaklarında mutantlarda havasal misel oluşumunda gecikmeye rastlanılırken mannitol içeren MM±250 mM KCl ve glukoz içeren MM±250 mM KCl plaklarında mutantlar yabancı tipe benzer gelişme göstermiştir. Bu sonuçlar da genlerde oluşturulan mutasyonların kullanılan besiyerlerine bağlı olarak koşullu etki yaptığını göstermiştir. Genel olarak 250 mM KCl ilave edilmiş plaklarda havasal gelişme KCl ilave edilmemiş plaklara göre daha yavaş gerçekleşti. Ayrıca sükröz ilave edilmemiş R2YE±KCl ve R5±KCl plaklarında havasal gelişme sükröz içeren R2YE±KCl ve R5±KCl plaklarına göre daha hızlı gerçekleşti. Bu sonuçlarda osmolit uygulmasının mutantlarda havasal misel oluşumu etkilediğini göstermiştir

R5±KCl plakları üzerinde yapılan incelemelerde DK2836 mutantlarındaki havasal gelişmenin DK2837'ye göre daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun ya *Tn5062* transpozonun yerinden ve yönünden kaynaklanabileceği ya da transpozon veya SCO2836 geninde ikinci bir promotor olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Transpozon yönünün ve yerinin etkisi tespit etmek için SCO2836 genindeki farklı bir insersiyon (SCE20.1.A11 kozmiti) ile çalışılmış ve elde edilen sonuçlarda yine havasal misel oluşumunda gecikmeye rastlanılmıştır.

Bu sonuçta bize SCO2836 genindeki farklı yer ve yönde bulunan iki farklı insersiyonun değişime aynı şekilde etki ettiğini göstermiştir.

SCO2836 ve SCO2837 genleri *S. coelicolor* A(3) kromozomunun merkez çekirdek bölgesi arasında bulunur ve bu kısım yaşam için gerekli olan temel genleri (hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon gibi) kapsar (Bentley ve ark. 2002). Her iki gendeki insersiyonda havasal misel oluşumunda gecikmeye neden olmuştur Bu durumda misel oluşturan genlerle, çalışılan genlerin birbiri ile etkileşimde bulunabileceğini işaret etmektedir.

SCO2982 genininde muhtemel gen ürünü glikozil transferazdır. Bu gendeki Tn5062'yi taşıyan SCE50.1.H06 kozmiti P. Dyson'dan temin edilmiş olup oluşan mutantlarda fenotipte herhangi bir farklılığa rastlanılmamıştır (veri gösterilmemiştir). Bu durum SCO2836 geninin transmembran domaini taşımamasından dolayı olabilir. *S. coelicolor* A(3) kromozomunda çok sayıda glikozil transferaz enzimini kodlayan genler bulunmaktadır ve bu genler çok özel reaksiyonların oluşmasını katalizlemektedirler.

Whittaker ve Whittaker (2006) SCO2837 proteinini karakterize etmişlerdir ve bu proteini karakterize edilen ilk prokaryotik bakır bağlı oksidaz olarak ifade etmişlerdir. SCO2837 protein miktarını *S. coelicolor*'da glikoz minimal ortamında karbon kaynağına bağlı olarak 50-100 µg/l olarak bulmuşlardır. *S. coelicolor*'daki en düşük protein miktarına karbon kaynağı olarak gliserol kullandıkları zaman rastlamışlardır. SCO2837 genini *Pichia pastoris*'e aktararak galaktoz oksidaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin soluk mavi-gri renkli olduğunu ve bakır miktarını 0.75-0.85 Cu/mol olarak belirtmişlerdir. Salgılanan proteinin çevreden daha ziyade hücre yüzeyine bağlı kaldığını ve bu peptidoglikan tabakasına bağlanmasında sortaz enzimleri ile gerçekleştirebileceğini belirtmişlerdir. En iyi karakterize edilmiş olan sortaz A LPXTG pentapeptit motifini tanıyarak peptidoglikan tabakası ile kovalent bağ oluşturur. Bu motif *S. coelicolor* genomunun 17 gen ürününde bulunmuştur ve bunlar muhtemelen vejetatif ve havasal misellerin gelişmesiyle ilgilidir (Boekhorst ve ark. 2005). Oluşan H₂O₂ aktinomisetlerde sinyalleşmede, antimikrobiyal ajan olarak ve ekstraselüler peroksidazların substratı olarak görev yapmaktadır (Whittaker 2002; Ramachandran ve ark. 2000; Hahn ve ark. 2002).

SCO2837 genindeki RRFAI dizisi ikiz-arjinin bağımlı salgı sinyalinin tanır (Bendtsen ve ark., 2005). İkiz arjinin bağımlı yolu birçok metalloproteinlerin ya da kofaktör içeren proteinlerin ekstraselüler aralığına bırakılmasını sağlar. *S. coelicolor* genomunun yaklaşık %2'si ikiz-arjinin bağımlı salgı sinyallerini içermektedir (Li ve ark. 2005).

SCO2836 geni en fazla *S. avermitilis* SAV5219 geni ile özdeşlik gösterirken, SCO2837 geni en fazla *S. avermitilis* SAV5218 geni ve *M. tuberculosis* Rv0120c fusA2 ile özdeşlik göstermektedir.

SCO2836 ve SCO2837 genlerinin bisistronik operon içerisinde bulunması, bu iki proteinin fonksiyonel bir birliktelik içinde çalıştığını akla getirmektedir.

Mutant türlerin yabancı tipe genetik komplemantasyonları sonucunda oluşan mutasyonların SCO2836 ve SCO2837'den kaynaklandığı gösterilmiştir.

Ekstraselüler komplemantasyon çalışmaları, oluşan mutanların *bld* değil sadece havasal misel oluşumunda gecikmeye neden olduğunu göstermiştir. Çünkü 3. ve daha sonraki günlerde hem yabancı tipe yakın olan kısımlarda hem de uzak kısımlarda havasal misel oluşumuna rastlanılmıştır.

Streptomyces coelicolor SCO2836 ve SCO2837 genlerinin ekspresyon çalışmaları, bu genlerin promotor bölge aktivitesinin kullanılan besiyerine bağlı olarak değiştiğini fakat genel olarak kullanılan besiyerlerin hepsinde gelişmenin erken dönemlerinde promotor aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumda çalışılan genlerin gelişmenin erken döneminde gerekli olabileceğini ya erken dönem promotor hızını artıran faktörlerin (değişik σ faktörleri gibi) aktif olabileceğini ya da bu faktörlerle ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Biyoluminesans normalde organizmalar tarafından kimyasal yollarla üretilen ışıktır. Biyoluminesansın oluşum nedeni organizmalara bağlı olarak (avcılara karşı, avlanmak için ya da haberleşme için) değişmektedir. Lusiferaz enzimi ve onun substratı olan lusiferin biyoluminesansın oluşumu için gereklidir (Hastings ve Morin 1991). Ayrıca bu iki genin promotor bölgesi *osaB* mutanları ile karşılaştırılarak aralarında önemli bir farklılığa rastlanılmamıştır (veri gösterilmemiştir).

S. coelicolor'daki raportör genler gen ekspresyonlarının hem nicel olarak hem de nitel olarak analizlerine olanak vermektedir. *S. coelicolor*'da raportör

olarak kullanılan genler katekol dioksigenaz (*xyIE*), neomisin rezistans (*neo*), lusiferaz (*luxAB*) ve *egfp*'dir (Sohaskey ve ark. 1992).

Sonuç olarak bu çalışmada *S. coelicolor* M145 SCO2836 ve SCO2837 genleri karakterize edilmeye çalışılmış ve yukarıda tartışılan veriler elde edilmiştir. Kısaca, çalışılan genlerdeki insersiyonlar sonucunda kullanılan besiyerine bağlı olarak havasal misel oluşumunu geciktirdiği, promotor bölgesinin erken gelişim evresinde daha aktif olduğu ve oluşan mutasyonların da insersiyonlardan kaynaklandığı belirlenmiştir.

Bu çalışmanın daha iyi desteklenebilmesi ve genlerin bir bütün genom içindeki etkilerinin daha iyi belirlenebilmesi için; Western Blot ve over-ekspresyon çalışmaları yapılmalı, bu iki mutantın promotor bölgesi diğer *bld* mutantlarla karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilmeli, benzer domaini taşıyan canlı grupları arasında gen alış verişi yapılarak bu genlerin benzerlik düzeyleri karşılaştırılmalı ve her iki gene ait ürünler daha geniş bir biçimde araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adanyi, N., Szabo, E.E. ve Varadi, M. (1999), "Multi-enzyme biosensors with amperometric detection for determination of lactose in milk and dairy products," *Eur. Food Res. Technol.*, **209**, 220-226.
- Ainsa, J.A., Ryding, N.J., Hartley, N., Findlay, K.C., Bruton, C.J. ve Chater, K.F. (2000), "*WhiA*, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *J. Bacteriol.*, **182**, 5470-5478.
- Ainsa, J.A., Parry, H.D. ve Chater, K.F. (1999), "A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Mol. Microbiol.*, **34**, 607-619.
- Aisaka, K. ve Terada, O. (1982), "Purification and properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*," *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1191-1197.
- Amaral, D., Kelly-Falcoz, F. ve Horecker, B.L. (1966), "Galactose oxidase of *Polyporus circinatus* methods," *Enzymol.*, **9**, 87-92.
- Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C. ve Horecker, B.L. (1962), "The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*," *J. Biol. Chem.*, **237**, 2736-2743.
- Babcock, G.T., El-Deeb, M.K., Sandusky, P.O., Whittaker, M.M. ve Whittaker, J.W. (1992), "Electron-paramagnetic resonance and electron nuclear double-resonance spectroscopies of the radical site in galactose-oxidase and of thioether-substituted phenol model compounds," *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3727-3734.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. ve Brunak, S. (2005), "Prediction of twin-arginine signal peptides," *BMC Bioinformatics*, **6**, 167.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Haris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger,

- K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. ve Hopwood, D.A. (2002), "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Nature*, **417**, 141-147.
- Bignell, D.R.D., Warawa, J.L., Strap, J.L., Chater K.F. ve Leskiw, B.K. (2000), "Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation," *Microbiology*, **146**, 2161-2173.
- Bishop, A., Fielding S., Dyson P. ve Herron P. (2004), "Systematic insertional mutagenesis of a *Streptomyces* genome: a link between osmoadaptation antibiotic production," *Genome Res.*, **14**, 893-900.
- Boekhorst, J., de Been, M.W.H.J., Kleerebezem M. ve Siezen, R.J. (2005), "Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs," *J. Bacteriol.*, **187**, 4928-4934.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J. ve Imberty, A. (2006), "Structures and mechanisms of glycosyltransferases superfamily," *Glycobiology*, **16(2)**, 29R-37R.
- Brockman, H. ve Hieronimus, E. (1955), "Über *Actinomycetenfarbstoffe* 8. die constitution des Actinorhodins," III. Mitteil. Chem. Ber., **88**, 1379-1390.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V ve Henrissat, B. (1998), "A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities," *Biochem. J.*, **326**, 929-939.
- Catakli, S., Andrieux, A., Decaris, B. ve Dary, A. (2005), "Sigma factor *WhiG* and its regulation constitute a target of a mutational phenomenon occurring during aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877," *Res. Microbiol.*, **156**, 328-40.
- Challis, G.L. ve Hopwood, D.A. (2003), "Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14555-14561.
- Champness, W. (1988), "New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation," *J. Bacteriol.*, **170**, 1168-1174.

- Chater, K.F. ve Chandra, G. (2006), "The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons," *FEMS Microbiol. Rev.*, **30(5)**, 651-72.
- Chater, K.F. ve Horinouchi, S. (2003), "Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species," *Mol. Microbiol.*, **48**, 9-15.
- Chater, K.F. (2001), "Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) a checkpoint multiplex?," *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 667-673.
- Chater, K.F. (1993), "Genetics of differentiation in *Streptomyces*," *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 685-713.
- Chater, K.F., Bruton, C.J., Plaskitt, K.A., Buttner, M.J., Méndez, C. ve Helmann, J.D. (1989), "The developmental fate of *Streptomyces coelicolor* hyphae depends on a gene product homologous with the motility sigma factor of *Bacillus subtilis*," *Cell*, **59**, 133-143.
- Cho, Y.H., Lee, E.J., Ahn B.E. ve Roe, J.H. (2001), "SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*," *Mol. Microbiol.*, **42**, 205-214.
- Cho, Y.H., Lee, E.J. ve Roe, J.H. (2000), "A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*," *Mol. Microbiol.*, **35**, 150-160.
- Claessen, D., deJong, W., Dijkhuizen, L. ve Wösten, H.A.B. (2006), "Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!," *Trends in Microbiology*, **14(7)**, 313.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L. ve Wösten, H.A.B. (2004) "The formation of the rodlet layer of *Streptomyces* is the result of the interplay between rodlets and chaplins," *Mol. Microbiol.*, **53(2)**, 433-443.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., deVreugd, P., Boersma, F.G.H., Dijkhuizen, L. ve Wösten, H.A.B. (2003), "A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils," *Genes. Dev.*, **17**, 1714-1726.

- Claessen, D., Wösten, H.A.B., van Keulen, G., Faber, O.G., Alves, A.M.C.R., Meijer, W.G. ve Dijkhuizen, L. (2002), "Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface," *Mol. Microbiol.*, **44**, 1483-1492.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. ve Henrissat, B. (2003), "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases," *J. Mol. Biol.*, **328**, 307-317.
- Crow, T., Rosenbaum, B., Smith, R., Guo, Y., Ramos, K. ve Sulikowski, G. (1999), "Landomycin A inhibits DNA synthesis and G1/S cell cycle progression," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1663-1666.
- Davis, N.K. ve Chater, K.F. (1992), "The *Streptomyces coelicolor whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation," *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 351-358.
- Dawn, R., Bignell, D.R.D., Tahlan, K., Kimberley, R.C., Jensen, S.E. ve Leskiw, K.B. (2005), "Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is Dependent on *bldG*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49(4)**, 1529-1541.
- de Crecy-Lagard, V., Servant-Moisson, P., Viala, J., Grandvalet C. ve Mazodier P. (1999), "Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*," *Mol. Microbiol.*, **32**, 505-517 .
- Elliot, M.A. ve Talbot, N.J. (2004), "Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi," *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 594-601.
- Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M. ve Buttner, M.J. (2003), "The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*," *Genes Dev.*, **17**, 1727-1740.
- Elliot, M.A., Bibb, M.J., Buttner, M.J. ve Leskiw, B.K. (2001), "BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Mol. Microbiol.*, **40**, 257-269.

- Elliot, M., Damji, F., Passantino, R., Chater, K. ve Leskiw, B. (1998), "The *bldD* gene of *S. coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production," *Journal of Bacteriology*, **180**, 1549-1555.
- Embley, T.M. ve Stackebrandt, E. (1994), "The molecular phylogeny and systematics of the *Actinomycetes*," *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 257-289.
- Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G.L., Westrich, S., Haag, P., Schneider, H., Decker, E., Kunzel, Rohr, J. ve Bechthold, A. (2000), "Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü2717," *Microbiology*, **146**, 147-154.
- Firbank, S.J., Rogers, M.S., Wilmot, C.M., Dooley, D.M., Halcrow, M.A., Knowles, P.F., McPherson, M.J. ve Phillips, S.E.V. (2001), "Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: An unusual self-processing enzyme, PNAS," **98(23)**, 12932-12937.
- Flardh, K. (2003), "Growth polarity and cell division in *Streptomyces*," *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 564-571.
- Flardh, K., Leibovitz, E., Buttner, M.J. ve Chater, K. F. (2000), "Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter," *Mol. Microbiol.*, **38**, 737-749.
- Flardh, K., Findlay, K.C. ve Chater, K.F. (1999), "Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Microbiology*, **145**, 2229-2243.
- Gehring, A.M., Yoo, N.J. ve Losick, R. (2001), "RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by *Streptomyces coelicolor*," *J. Bacteriol.*, **183**, 5991-5996.
- Gerfen, G.A., Bellew, B., Grin, R., Singel, D., Ekberg, C.A. ve Whittaker, J.W. (1996), "High frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy of the apogalactose oxidase radical," *J. Phys. Chem.*, **100**, 16739-16748.
- Grantcharova, N., Lustig, U. ve Flardh, K. (2005), "Dynamics of *FtsZ* assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Journal of Bacteriology*, **187(9)**, 3227-3237.

- Guijarro, J., Santamaria, R., Schauer, A. ve Losick, R. (1988), "Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated protein," J. Bacteriol., **170**, 1895-1901.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. ve Oliver, S.G. (1996), "Life with 6000 genes," Science, **546**, 563-567.
- Hahn, J.S., Oh, S.Y., Roe, J.H. (2002), "Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," J. Bacteriol., **184**, 5214-5422.
- Haneishi, T., Terahara, A., Arai, M., Hata, T. ve Tamura, C. (1974), "New antibiotics, methylenomycins A&B. 2. structures of methylenomycins A&B," J. Antibiot., **27**, 393-399.i
- Hastings, J.W. ve Morin, J.G. (1991), "Bioluminescence. In Neural and integrative animal physiology, " Prosser, C.L. ed., Wiley-interscience, New York, 99-104
- Herron, P.R., Hughes, G., Chandra, G., Fielding, S., ve Dyson, P.J. (2004), "Transposon Express, a software application to report the identity of insertions obtained by comprehensive transposon mutagenesis of sequenced genomes: analysis of the preference for in vitro Tn5 transposition into GC-rich DNA," Nucleic Acids Res., **32(14)**, 113.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. ve Oliver, S.G. (1989), "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture," App. Microbiol. Biotechnol., **31**, 272-277.
- Hodgson, D.A. (2000), "Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria," Adv. Microb. Physiol., **42**, 47-238.
- Hodgson, D.A. (1982), "Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose," J. Gen. Microbiol., **128**, 2417-2430.
- Holden, M.T., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdeno-Tarraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S.D.,

Sebahia, M.N., Thomson, Bason, R.N., Beacham, I.R., Brooks, K., Brown, K.A., Brown, N.F., Challis, G.L., Cherevach, I., Chillingworth, T., Cronin, A., Crossett, B., Davis, P., DeShazer, D., Feltwell, T., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Keith, K.E., Maddison, M., Moule, S., Price, C., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Simmonds, M., Songsivilai, Stevens, S., Tumapa, K. S., Vesaratchavest, M., Whitehead, S., Yeats, C., Barrell, B.G., Oyston, P.C. ve Parkhill, J. (2004), "Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 14240-14245.

Hong, J.S.J., Park, S.J., Parajuli, N., Park, S.R., Koh, H.S., Jung, W.S., Choi, C.Y. ve Yoon, Y.J. (2007), "Functional analysis of DesVIII homologues involved in glycosylation of macrolide antibiotics by interspecies complementation," Gene, **386**, 123-130.

Hopwood, D.A. (1999), "Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*," Microbiology, **145**, 2183-2202.

Hopwood, D.A. (1967), "Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*," Bacteriol. Rev., **31**, 373-403.

Hopwood, D.A. ve Glauert, A.M. (1961), "Electron microscope observations on the surface structures of *Streptomyces violaceoruber*," J. Gen. Microbiol., **26**, 325-330.

http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html 2006

http://smart.embl-eidelberg.de/smart/job_status.pl?jobid=

819620654321541176748552LkmWYjSwax 2007

http://smart.embl-heidelberg.de/smart/job_status.pl?jobid=

819620654321541176748552LkmWYjSwax 2007

[http://streptomyces.org.uk/cgi-](http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/sco_frameset.pl?script=gene_search.pl&string=2836)

[bin/S.coelicolor/sco_frameset.pl?script=gene_search.pl&string=2836](http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/sco_frameset.pl?script=gene_search.pl&string=2836) 2007

http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/get_aa 2007

http://streptomyces.org.uk/cgi-bin/S.coelicolor/get_aa 2007

[http://www.ncbi.nlm.nih./](http://www.ncbi.nlm.nih/) 2006

- Hunt, A.C., González, L.S., Kelemen, G.H. ve Buttner, M.J. (2005) “The *bldC* developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family,” J. of Bacteriol., **187**(2), 716-728.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. ve Omura, S. (2003), “Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*,” Nat. Biotechnol., **21**, 526-531.
- Ito, N., Phillips, S.E.V., Stevens, C., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Keen, J.N., Yadav, K.D.S. ve Knowles, P.F. (1991) “Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase,” Nature, **350**, 87-90.
- Jakimowicz, P., Cheesman, M.R., Bishai, W.R., Chater, K.F., Thomson, A.J. ve Buttner, M.J. (2005), “Evidence that the *Streptomyces* developmental protein *WhiD*, a member of the *WhiB* family, binds a [4Fe-4S] cluster,” J. Biol. Chem., **280**, 8309-8315.
- Keijsers, B., Noens, E., Kral, B., Koerten, H. ve van Wezel, G. (2003), “The *Streptomyces coelicolor* *ssgB* gene is required for early stages of sporulation,” FEMS Microbiol. Lett., **225**, 59-67.
- Keijsers, B.J., van Wezel, G.P., Canters, G.W. ve Vijgenboom, E. (2002), “Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* *ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon,” J. Bacteriol., **184**, 4420-4429.
- Kelemen, G.H., Viollier, P.H., Tenor, J., Marri, L., Buttner, M.J. ve Thompson, C.J. (2001), “A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2),” Mol. Microbiol., **40**, 804-814.
- Kelemen, G.H., Brian, P., Flardh, K., Chamberlin, L., Chater, K.F. ve Buttner, M.J. (1998), “Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2),” J. Bacteriol., **180**, 2515-2521.
- Kelemen, G.H., Brown, G.L., Kormanec, J., Potuckova, L., Chater, K.F. ve Buttner, M.J. (1996), “The positions of the sigma factor genes, *whiG* and

sigF, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2),” Mol. Microbiol., **21**, 593-603.

- Kempton, C., Kaiser, D., Haag, S., Nicholson, G., Gnau, V., Walk, T., Gierling, K. H., Decker, H., Zahner H., Jung, G. ve Metzger, J.W. (1997), “CDA: calcium dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues,” Angewandte Chem. Int. English Edi., **36**, 498-501.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A. (2000), “Practical *Streptomyces* genetics,” The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Klutts, J.S., Yoneda, A., Reilly, M.C., Bose, I. ve Doering, T.L. (2006), “Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes,” FEMS Yeast Res., **6**, 499-512.
- Kodani, S., Lodato, M.A., Durrant, M.C., Picart, F. ve Willey, J.M. (2005), “SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *Streptomyces*,” Mol. Microbiol., **58**, 1368-1380.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R. ve Willey, J.M. (2004), “The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*,” Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **101**, 11448-11453.
- Koroleva, O.V., Rabinovich, M.L., Buglova, T.T. ve Yaropolov, A.I. (1983), “Properties of *Fusarium graminearum* galactose oxidase,” Prik. Biokhim. Mikrobiol., **19**, 632-637.
- Kwak, J., McCue, L.A. ve Kendrick, K.E. (1996), “Identification of *bldA* mutants of *Streptomyces griseus*,” Gene, **171**, 75-78.
- Lakey, J.H., Lea, E.J., Rudd, B.A., Wright, H.M. ve Hopwood, D.A. (1983), “A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity,” J Gen Microbiol., **129(12)**, 3565–3573
- Lawlor, E.J., Baylis, H.A. ve Chater, K.F. (1987), “Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2),” Genes Dev., **1**, 1305-1310.

- Leskiw, B.K. ve Mah, R. (1995), "The bldA-encoded tRNA is poorly expressed in the bldI mutant of *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Microbiology*, **141**, 1921-1926.
- Leskiw, B.K., Lawlor, E.J., Fernandez-Abalos, J.M. ve Chater, K.F. (1991), "TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2461-2465.
- Li, H., Jacques, P.E., Ghinet, M.G., Brzezinski, R. ve Morosoli, R. (2005), "Determining the functionality of putative Tat-dependent signal peptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using two different reporter proteins," *Microbiology*, **151**, 2189-2198.
- Luzhetskyy, A., Taguchi, T., Fedoryshyn, M., Duerr, C., Wolhert, S. E., Novikov, V. ve Bechthold, A. (2005), "Iteratively acting glycosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A," *Chemistry & Biology*, **12**, 725-729.
- Ma, H. ve Kendall, K. (1994), "Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*," *J. Bacteriol.*, **176**, 3800-3811.
- Mannino, S., Cosio, M. S. ve Buratti, S. (1999), "Simultaneous determination of glucose and galactose in dairy products by two parallel amperometric biosensors," *Ital. J. Food. Sci.*, **11**, 57-65.
- Maureen, J.B. ve Buttner, M.J. (2003), "The *Streptomyces coelicolor* developmental transcription factor σ^{BldN} is synthesized as a proprotein," *Journal of Bacteriology*, **185(7)**, 2338-2345.
- McCarthy, A.J. ve Williams, S.T., (1992), "*Actinomycetes* as agents of biodegradation in the environmental," *A Review, Gene*, **115**, 189-192.
- McCormick, J.R., Su, E.P., Driks, A. ve Losick, R. (1994), "Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene, *ftsZ*," *Mol. Microbiol.*, **14**, 243-254.
- Merrick, M.J. (1976), "A morphological and genetic mapping study of *bald* mutants of *Streptomyces coelicolor*," *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 299-315.

- Miguélez, E.M., Hardisson, C. ve Manzanal, M. B. (2000), “*Streptomyces*: a new model to study cell death,” *Int. Microbiol.*, **3**, 153-158.
- Miyadoh, S. (1993), “Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach,” *Actinomycetologica*, **7**, 100-106.
- Miyamoto, Y., Johdo, O., Nagamatsu, Y. ve Yoshimoto, A. (2002), “Cloning and characterization of a glycosyltransferase gene involved in the biosynthesis of anthracycline antibiotic L-rhodomyacin from *Streptomyces violaceus*,” *FEMS Microbiology Letters*, **206**, 163-168.
- Molle, V. ve Buttner, M.J. (2000), “Different alleles of the response regulator gene *bltM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages,” *Mol. Microbiol.*, **36**, 1265-1278.
- Moore, B.S. ve Piel, J. (2000), “Engineering biodiversity with type II polyketide synthase genes,” *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 391-398.
- Nguyen, K.T., Willey, J.M., Nguyen, L.D., Nguyen, L.T., Viollier, P.H. ve Thompson, C.J. (2002), “A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*,” *Mol. Microbiol.*, **46**, 1223-1238.
- Nodwell, J.R., Yang, M., Kuo, D. ve Losick, R. (1999), “Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*,” *Genetics*, **151**, 569-584.
- Nodwell, J.R. ve Losick, R. (1998), “Purification of an extracellular signalling molecule involved in formation of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*,” *J. Bacteriol.*, **180**, 1334-1337.
- Nodwell, J.R., McGovern, K. ve Losick, R. (1996), “An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*,” *Mol. Microbiol.*, **22**, 881-893.
- O'Connor, T.J., Kanellis, P. ve Nodwell, J.R. (2002), “The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-

- specific manner under the direct control of *RamR*,” *Mol. Microbiol.*, **45**, 45-57.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. ve Furumai, T. (2001), “Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*, I. Purification and characterization,” *J. Antibiot.*, **54**, 1036-1044.
- Otten, S.L., Liu, X., Ferguson, J. ve Hutchinson, C.R. (1995), “Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis,” *J. Bacteriol.*, **177**, 6688-6692.
- Palmer, T., Sargent, F. ve Berks, B.C. (2005), “Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway”, *Trends Microbiol.*, **13**, 175-180.
- Paolo, S.S., Huang, J., Cohen, S.N. ve Thompson, C.J. (2006), “*rag* genes: novel components of the *RamR* regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*,” *Molecular Microbiology*, **61(5)**, 1167-1186.
- Pope, M.K., Green, B. ve Westpheling, J. (1998), “The *bldb* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*,” *J. Bacteriol.*, **180(6)**, 1556–1562.
- Pope, M.K., Green, B.D. ve Westpheling, J. (1996), “The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling,” *Mol. Microbiol.*, **19**, 747-756.
- Qasba, P.K, Ramakrishnan, B. ve Boeggeman, E (2005), “Substrate induced conformational changes in glycosyltransferases,” *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 53-62.
- Ramachandran, S., Magnuson, T.S. ve Crawford, D.L. (2000), “Isolation and analysis of three peroxide sensor regulatory gene homologs *ahpC*, *ahpX* and *oxyR* in *Streptomyces viridosporus* T7A--a lignocellulose degrading *actinomycete* DNA Seq,” **11(1-2)**, 51-60.

- Reznikoff, W.S., Bhasin, A., Davies, D.R., Goryshin, I.Y., Mahnke, L.A., Naumann, T., Rayment, I., Steiniger-White, M. ve Twining, S.S. (1999), "Tn5: a molecular window on transposition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 729-734.
- Richter, M., Willey, J.M., Süßmuth, R., Jung, G. ve Fiedler, H.P. (1998), "Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae*," *FEMS Microbiol.*, **163**, 165-171.
- Rogers, M.S., Knowles, P.F., Baron, A.J., McPherson, M.J. ve Dooley, D.M. (1998), "Characterization of the active site of galactose oxidase and its active site mutational variants Y495F/H/K and W290H by circular dichroism spectroscopy," *Inorg. Chim. Acta.*, **276**, 175-181.
- Rudd, B.A.M. ve Hopwood, D.A. (1980), "A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster," *J. Gen. Microbiol.*, **119**, 333-340.
- Ryding, N.J., Kelemen, G.H., Whatling, C.A., Flardh, K., Buttner, M.J. ve Chater, K. F. (1998), "A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Mol. Microbiol.*, **29**, 343-357.
- Said, I.T., Shamsuddin, A.M., Sherief, M.A., Taleb, S.G., Aref, W.F. ve Kumar, D. (1999), "Comparison of different techniques for detection of Gal-GalNAc, an early marker of colonic neoplasi," *Histol. Histopathol.*, **14**, 351-357.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), "In molecular cloning: A laboratory manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1,2,3.
- Sargent, F., Berks, B.C. ve Palmer, T. (2006), "Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins," *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**, 198-207.
- Shima, J., Penyige, A. ve Ochi, K. (1996), "Changes in patterns of ADP-ribosylated proteins during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its development mutants," *J. Bacteriol.*, **178**, 3785-3790.
- Sohaskey, C., Im, H. ve Schauer, A.T. (1992), "Construction and application of plasmid- and transposon-based promoter-probe vectors for *Streptomyces*

- spp.* that employ a *Vibrio harveyi* luciferase reporter cassette,” J. Bacteriol., **174**(2), 367-376.
- Silakowski, B., Ehret, H. ve Schairer, U. (1998), “*fbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation,” J. Bacteriol., **180**, 1241-1247.
- Sinnott, M.L. (1990), “Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer,” Chem. Rev., **90**, 1171-1202.
- Soliveri, J., Brown, K.L., Buttner, M.J. ve Chater, K.F. (1992), “Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development,” J. Bacteriol., **174**, 6215-6220.
- Sun, J., Hesketh, A. ve Bibb M. (2001a), “Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2),” J. Bacteriol., **183**, 3488-3498.
- Sun, L.H., Petrounia, I.P., Yagasaki, M., Bandara, G. ve Arnold, F.H. (2001b), “Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution,” Protein Eng., **14**, 699-704.
- Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A. ve Thompson. C.J. (1998), “Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis, and morphological development in *Streptomyces coelicolor*,” Mol. Microbiol., **30**, 33-46.
- Thompson, C.J., Ward, J.M. ve Hopwood, D.A. (1980), “DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic producing species,” Nature, **286**, 525-527.
- Tillotson, R.D., Wösten, H.A. B., Richter, M. ve Willey, J.M. (1998a), “Surface active proteins capable of extracellular complementation in *Streptomyces coelicolor*,” Mol. Microbiol., **30**, 595-602.
- Tillotson, R.D., Wösten, H.A. B., Richter, M. ve Willey, J.M. (1998b), “A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophillum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures,” Mol. Microbiol., **30**, 595-602.

- Tkac, J., Gemeiner, P. ve Sturdik, E. (1999), "Rapid and sensitive galactose oxidase-peroxidase biosensor for galactose detection with prolonged stability," *Biotechnol. Tech.*, **13**, 931-936.
- Trepanier, N.K., Jensen, S.E., Alexander, D.C. ve Leskiw, B.K. (2002), "The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant," *Microbiology*, **148**, 643-656.
- Ueda, K., Miyake, K., Horinouchi, S. ve Beppu, T. (1993), "A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulator and membrane translocator," *J. Bacteriol.*, **175**, 2006-2016.
- Van Wezel, G.P., Van der Meulen, J., Kawamoto, S., Luiten, R.G.M., Koerten, H.K. ve Kral, B. (2000), "*ssgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation," *J. Bacteriol.*, **182**, 5653-5662.
- Vega, F.A., Nunez, C.G., Weigel, B., Hitzmann, B. ve Ricci, J.C.D. (1998), "On-line monitoring of galactoside conjugates and glycerol by flow injection analysis," *Anal. Chim. Acta.*, **373**, 57-62.
- Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M. ve Thompson, C.J. (2001a), "Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological development and antibiotic biosynthesis," *J. Bacteriol.*, **183**, 3184-3192.
- Viollier, P.H., Nguyen, K.T., Minas, W., Folcher, M., Dale, G.E. ve Thompson, C.J. (2001b), "Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*," *J. Of Bacteriology*, **183(10)**, 3193-3203.
- Vionis, A.P., Katsifas, E.A. ve Karagouni, A.D. (1998), "Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms," *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 103-115.
- Volff, J.N. ve Altenbucher, J. (1998), "Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome," *Mol. Microbiol.*, **27**, 239-246.

- von Mulert, U., Luzhetskyy, A., Hofmann, C., Mayer, A. ve Bechthold, A. (2004), "Expression of the landomycin biosynthetic gene cluster in a PKS mutant of *S. fradiae* is dependent on the coexpression of a putative transcriptional activator gene," FEMS Microbiol. Lett., **230**, 91-97.
- Vrbova, E., Peckova, J. ve Marek, M. (1992), "Preparation and utilization of a biosensor based on galactose-oxidase," Collect. Czech. Chem. Commun., **57**, 2287-2294.
- Wang, Z., Crawford, D.L., Pometto, III.A.L. ve Rafii, F. (1989), "Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem," Can. J. Microbiol., **35**, 535-543.
- Wellington, E.M.H. ve Saunders, V.A. (1992), "Gen transfer between *Streptomyces* in soil," Gene, **115**, 193-198.
- Whittaker, M.M. ve Whittaker, J.W. (2006), "*Streptomyces coelicolor* oxidase (SCO2837p): A new free radical metalloenzyme secreted by *Streptomyces coelicolor* A3(2)," Archives of Biochemistry and Biophysics, **452**, 108-118.
- Whittaker, J.W. (2005), "The radical chemistry of galactose oxidase," Archives of Biochemistry and Biophysics, **433**, 227-239.
- Whittaker, M.M. ve Whittaker, J.W. (2003), "Cu(I)-dependent biogenesis of the galactose oxidase redox cofactor," J. Biol. Chem., **278**, 22090-22101.
- Whittaker, J.W. (2002), "Galactose oxidase," Adv. Protein. Chem., **60**, 1-49.
- Whittaker, M. ve Whittaker, M. (1990), "A tyrosine-derived free radical in apogalactose oxidase" J.W.J. Biol. Chem., **265**, 9610-9613.
- Wildermuth, H., Wehrli, E. ve Horne, R.W. (1971), "The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*," J. Ultrastruct. Res., **35**, 168-180.
- Willey, J.M., Willems, A., Kodani, S. ve Nodwell, J.R. (2006), "Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*," Mol. Microbiol., **59**(3), 731-742.
- Willey, J.W., Schwedock J. ve Losick, R. (1993), "Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*," Genes Dev., **7**, 895-903.

- Willey, J.M., Santamaria, R., Guigarro, J., Geistlich, M. ve Losick, R. (1991), "Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*," *Cell*, **65**, 641-650.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E. ve Holt, J.G. (1989), "Bergey's manual of systematic bacteriology," Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington E.M.H., Sneath, P.H.A. ve Sakin, M.J. (1983), "Numerical classification of *Streptomyces* and related genera," *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1743-1813.
- Williams, S.T. ve Robinson, C.S. (1981), "The role of *Streptomyces* in decomposition of chitin in acidic soils," *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 55-63.
- Wösten, H.A.B. (2001), "Hydrophobins: multipurpose proteins," *Ann. Rev. Microbiol.*, **55**, 625-646.
- Wösten, H.A. ve Willey, J.M. (2000), "Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air," *Microbiology*, **146**, 767-773.
- Wösten, H.A.B., van Wetter, M.A., Lugion, L.G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. ve Wessels, J.G.H. (1999), "How a fungus escapes the water to grow into the air," *Curr. Biol.*, **9**, 85-88.
- Wright, L.F. ve Hopwood, D.A. (1976a), "Actinorhodin is a chromosomally determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *J. Gen. Microbiol.*, **96**(2), 289-297.
- Wright, L.F. ve Hopwood, D.A. (1976b), "Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *J. Gen. Microbiol.*, **95**, 96-106.
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y. ve Horinouchi, S. (2000), "An A-factor dependent extracytoplasmic function sigma factor (σ^{AdsA}) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*," *J. Bacteriol.*, **182**, 4596-4605.
- Yang, G.Y. ve Shamsuddin, A.M. (1996), "Gal-GalNAc: A biomarker of colon carcinogenesis," *Histol. Histopathol.*, **11**, 801-806.

- Yonekawa, T., Ohnishi, Y. ve Horinouchi, S. (1999), "Involvement of *amfC* in physiological and morphological development in *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Microbiology*, **145**, 2273-2280.
- Zhang, T., Wang, L., Xu, G., Chen, Y., Zhang, Y. ve Li, Y. (2006), "Disruption of the *ste22* gene encoding a glycosyltransferase and its function in biosynthesis of Ebosin in *Streptomyces sp.* 139," *Current Microbiology*, **52**, 55-59.