

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARASAL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *STREPTOMYCES*
TÜRLERİNİN SEKONDER METABOLİT BİYOSENTEZ
GENLERİNİN TARANMASI**

Bülent BALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
Haziran 2011**

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARASAL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *STREPTOMYCES*
TÜRLERİNİN SEKONDER METABOLİT BİYOSENTEZ
GENLERİNİN TARANMASI**

Bülent BALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
Haziran 2011**

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Bülent BALI tarafından yapılan “Karasal Ortamlardan İzole Edilen *Streptomyces* Türlerinin Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin Taranması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.


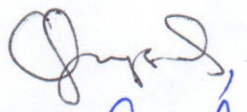

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Veysel TOLAN

Üye : Doç. Dr. Göksel KIZIL

Üye : Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, hiçbir zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında laboratuvar desteği için her zaman yardımcı olan Doç. Dr. Murat KIZIL'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım Süleyman ÖZAKIN, İsmail ACER ve İlknur PORSUK'a teşekkür ederim.

Biyolojik Araştırma Laboratuvarı ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgmeden her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP) 11-FF-118 no'lu projeye desteklerinden dolayı ve TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna 109T843 no'lu projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
KISALTMALAR ve SİMGELER	XII
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Genel Bilgiler	5
2.1.1. Aktinomisetler	5
2.1.1.1. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması	5
2.1.1.2. Aktinomisetlerin Morfolojik Özellikleri	7
2.1.1.3. Aktinomiset Ekolojisi	7
2.1.1.4. Aktinomisetlerin Endüstriyel Önemi	8
2.1.1.5. Aktinomiset Genomu	10
2.1.2. <i>Streptomyces</i> Türlerinin Genel Özellikleri	10
2.1.2.1. <i>Streptomyces</i> 'ların Hayat Döngüsü	10
2.1.2.2. <i>Streptomyces</i> 'ların Ekolojisi	12
2.1.2.3. <i>Streptomyces</i> 'larca Sentezlenen Doğal Ürünler	13
2.1.2.4. <i>Streptomyces</i> Genomu ve Özellikleri	15
2.1.3. Sekonder Metabolitler	18
2.1.4. Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Peptidler (NRP)	19
2.1.4.1. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)	20
2.1.5. Poliketidler (PK)	22
2.1.5.1. Poliketid Sentetazlar (PKS)	24
2.2. Önceki Çalışmalar	28
3. MATERYAL ve METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Biyolojik Materyal	33
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33

3.1.3.	Kullanılan Çözeltiler	33
3.1.4.	Kullanılan Besiyerleri	34
3.1.5.	Kullanılan Enzimler	35
3.1.6.	Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
3.1.7.	DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	35
3.1.8.	PCR Ürünlerinin Klonlanması	35
3.1.9.	Plazmit İzolasyonu	35
3.1.10.	Kullanılan Cihazlar	36
3.2.	Metod	37
3.2.1.	Kromozomal DNA İzolasyonu	37
3.2.2.	PCR	37
3.2.2.1.	NRPS Geninin Adenilasyon (A) Domainin PCR ile Çoğaltılması	37
3.2.2.2.	PKS-I Geninin Ketosentaz Domainin (KS) PCR İle Çoğaltılması	38
3.2.3.	Agaroz Jel Elektroforezi	39
3.2.4.	Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması	39
3.2.5.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	39
3.2.6.	Klonlama	39
3.2.6.1.	Ligasyon	39
3.2.6.2.	Transformasyon	40
3.2.6.3.	Mavi Beyaz Koloni Seçimi	40
3.2.6.4.	Bakterilerden Plazmit DNA'nın İzolasyonu	40
3.2.7.	DNA Dizilieme	40
3.2.8.	Biyoinformatik İncelemeler	40
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1.	Bulgular	41
4.1.1.	Organizmaların Üretilmesi	41
4.1.2.	Kromozomal DNA İzolasyonu	43
4.1.3.	NRPS ve PKS-I Genlerinin İzolatların Genomlarında Taranması	43
4.1.3.1.	NRPS Genlerinin Taranması	43
4.1.3.2.	PKS-I Genlerinin Taranması	47
4.1.3.3.	PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması	51
4.1.4.	PCR ile Elde Edilen Ürünlerin Klonlanması	51
4.1.4.1.	NRPS Gen Kümesinin Adenilasyon Domaininin Klonlanması	51
4.1.4.2.	PKS-I Gen Kümesinin Ketosentaz Domaininin Klonlanması	52
4.1.5.	Biyoinformatik İncelemeler	53

4.1.5.1.	<i>Streptomyces</i> sp. BSH50'nin NRPS Genlerinin İncelenmesi	53
4.1.5.2.	<i>Streptomyces</i> sp. AS29'un PKS-I Genlerinin İncelenmesi	55
4.2.	Tartışma	59
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	63
6.	KAYNAKLAR	65
	ÖZGEÇMİŞ	77

ÖZET

KARASAL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN SEKONDER METABOLİT BİYOSENTEZ GENLERİNİN TARANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bülent BALI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Mikrobiyal sekonder bileşikler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin kaynaklarından birini teşkil ederler. *Actinomycetales* takımına dahil olan *Streptomyces* türleri, çoğu biyolojik olarak aktif olan sekonder metabolitleri üretme yeteneğine sahip olan organizma grubudurlar. Bu sekonder metabolitlerden başlıcaları; antibakteriyel, antifungal ve antitümör ajanlardır. Yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için temel strateji *Streptomyces* gibi iyi bilinen ve yetenekli organizmalarda yeni bileşiklerin taranmasıdır. Yeni antimikrobiyal ajanların bulunması için bunların sentezinde görevli olan biyosentetik genlerin, üretici bakterilerin genomlarında taranması yaklaşımı, farklı taksonomik gruplarda ve aktinomisetlerde uygulanmıştır. Bu yaklaşım, yüksek metabolik potansiyele sahip yabancı tip izolatların metabolik potansiyellerinin ortaya çıkarılmasında önemli bir strateji olarak görünmektedir. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS) ve Poliketid Sentazlar (PKS), mikroorganizmalar tarafından üretilen önemli biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının sentezinde gerekli biyosentetik sistemlerdir.

Bu çalışmada; endemik bitki rizosferlerinden izolasyonları ve moleküler teşhisleri yapılmış 15 farklı *Streptomyces* izolatının, PCR ile NRPS ve PKS-I genlerinin taranması amaçlanmıştır. Yapılan PCR taraması sonucunda izolatların tümünde NRPS ve PKS-I genleri tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatına ait NRPS genlerinin adenilasyon domainleri ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatına ait PKS-I genlerinin ketosentaz domainleri klonlanarak mini gen kütüphaneleri kurulmuştur. *Streptomyces* sp. BSH50 ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatlarının mini gen kütüphanelerinden seçilen klonların DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen sekanslar NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi) web sitesindeki BLAST programı kullanılarak analiz edilmiştir. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatının, NRPS

genlerine ait 11 farklı A domaini içerdiği ve bu domainlerin şimdiye kadar rapor edilmiş olanlar ile % 45 - 94 oranında değişen homolojilere sahip olduğu görülmüştür. *Streptomyces* sp. AS29 izolatının, PKS-I mini gen kütüphanesinin analizlerine göre ise, bu izolatın PKS-I genlerine ait 3 farklı KS domainine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu domainlerin Genbankasında şimdiye kadar bulunan PKS-I genleri ile % 61 - 72 oranında homolojisi tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda; şimdiye kadar rapor edilmiş biyosentez genleri ile düşük seviyede akrabalığı olan domainler, homolog prob olarak kullanılarak yapılacak hibridizasyon deneylerinde, ilgili izolatın genomunda, domainlerin ait olduğu gen kümelerine ulaşılmaya çalışılacaktır.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, NRPS, PKS-I, Sekonder metabolitler.

ABSTRACT

SCREENING OF SECONDARY METABOLITE BIOSYNTHESIS GENES FROM TERRESTRIAL *STREPTOMYCES* STRAINS

MSc THESIS

Bülent BALI

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2011

Microbial secondary metabolites represent a large source of compounds endowed with ingenious structures and potent biological activities. *Streptomyces* strains which are belonging to the order *Actinomycetales* are superior to other actinomycete strains in their ability to produce large numbers and varieties of bioactive metabolites. The main compounds of these secondary metabolites are antibacterial, antifungal and antitumour agents. To explore new bioactive secondary metabolites, the main strategy is to search for new compounds from well known and talented microorganisms such as *Streptomyces*. The detection of gene sequences involved in the synthesis of secondary metabolites to evaluate the biosynthetic potential has already been described in different taxonomic groups and actinomycetes. This approach may represent an alternative way to focus the screening on wild-type isolates with the highest metabolic potential. Nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) are biosynthetic systems involved in the synthesis of large number of important biologically active compounds produced by actinomycetes .

In our study, it was used that 15 *Streptomyces* strain which were previously isolated rhizospheric soils of some Turkish endemic plants and characterized by molecular methods. Our aim was to screen the NRPS and PKS-I genes in the genome of these local strains by PCR approach. It was determined that all 15 strain have NRPS and PKS-I genes. PCR amplicons of NRPS genes from *Streptomyces* sp BSH50 and PKS-I genes from *Streptomyces* sp AS29 were cloned to constitute mini libraries. Sequence analysis of selected clones from the libraries were compared to the published sequences by using BLAST software in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank. According to our results, *Streptomyces* sp BSH50 has 11 different A domains those are belong to NRPS genes. These domains have homology between 45 - 95 % with the other genes published in GenBank. It was found that *Streptomyces* sp AS29 has 3 different KS domains for PKS-I genes. The PKS-I genes of this isolate have homology between 61 - 72 % when compared to other published PKS-I genes. In future work, putative new domains will be used as homolog probes in hybridization experiments to reach new biosynthetic gene clusters in the genome of isolates.

Keywords : *Streptomyces*, NRPS, PKS-I, Secondary metabolites.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	<i>Streptomyces</i> kökenli bazı antibiyotiklerin keşfedildiği yıllar ve kaynakları.	2
Çizelge 2.1.	<i>Actinomycetales</i> takımının taksonomik sınıflandırılması.	5
Çizelge 2.2.	Aktinomiset türlerinin ürettiği biyolojik olarak aktif olan bileşik sayıları.	8
Çizelge 2.3.	<i>Streptomyces</i> kökenli bazı antibiyotikler ve biyolojik aktiviteleri.	14
Çizelge 4.1.	Organizmaların morfolojik özellikleri	41
Çizelge 4.2.	<i>Streptomyces</i> sp. BSH50 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları.	57
Çizelge 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. BSH50 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları.	57
Çizelge 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. AS29 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları.	58
Çizelge 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. AS29 izolatının PKS-I gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları.	58

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	<i>S. lividans</i> 'ın dört aşamadan oluşan koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.	12
Şekil 2.2.	Klinik uygulamalarda kullanılan NRP'ler.	20
Şekil 2.3.	Gen-Modül, Modül-Domain ilişkisi.	21
Şekil 2.4.	NRPS enzim sisteminin mekanizmasının gösterimi.	22
Şekil 2.5.	Klinik uygulamalarda kullanılan poliketidler.	23
Şekil 2.6.	Bakteriyel poliketidlerin yapısı ve mekanizması.	27
Şekil 3.1.	pGEM-T plazmit haritası.	36
Şekil 4.1.	16S rRNA genleri baz alınarak neighbor-joining yöntemiyle çizilen filogenetik ağaç.	42
Şekil 4.2.	<i>Streptomyces</i> sp. AA59'un M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH67'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. AR4'ün M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. AR17'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.6.	<i>Streptomyces</i> sp. AS29'un M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.7.	<i>Streptomyces</i> sp. AS37'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	43
Şekil 4.8.	<i>Streptomyces</i> sp. BA1'in M2 katı besiyerindeki görünümü.	44
Şekil 4.9.	<i>Streptomyces</i> sp. BA12'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	44
Şekil 4.10.	<i>Streptomyces</i> sp. BAH28'in M2 katı besiyerindeki görünümü.	44

Şekil 4.11.	<i>Streptomyces</i> sp. BS32'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	44
Şekil 4.12.	<i>Streptomyces</i> sp. BSH50'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	44
Şekil 4.13.	<i>Streptomyces</i> sp. CA13'ün M2 katı besiyerindeki görünümü.	44
Şekil 4.14.	<i>Streptomyces</i> sp. CA18'in M2 katı besiyerindeki görünümü.	45
Şekil 4.15.	<i>Streptomyces</i> sp. CA28'in M2 katı besiyerindeki görünümü.	45
Şekil 4.16.	<i>Streptomyces</i> sp. CS42'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.	45
Şekil 4.17.	İzole edilen kromozomal DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri.	46
Şekil 4.18.	<i>Streptomyces</i> sp. BS32 ve <i>Streptomyces</i> sp. CA18 izolatlarından elde edilen NRPS geninin PCR ürünleri.	47
Şekil 4.19.	<i>Streptomyces</i> sp. CA13 izolatından elde edilen NRPS geninin PCR ürünü.	47
Şekil 4.20.	<i>Streptomyces</i> sp. CA28 ve <i>Streptomyces</i> sp. AS29 izolatlarından elde edilen NRPS geninin PCR ürünleri.	48
Şekil 4.21.	<i>Streptomyces</i> sp. BA1 izolatından elde edilen NRPS geninin PCR ürünü.	48
Şekil 4.22.	<i>Streptomyces</i> sp. AR17 izolatından elde edilen NRPS geninin PCR ürünü.	49
Şekil 4.23.	<i>Streptomyces</i> sp. CS42 izolatından elde edilen NRPS geninin PCR ürünü.	49
Şekil 4.24.	<i>Streptomyces</i> sp. AA59 <i>Streptomyces</i> sp. AR4, <i>Streptomyces</i> sp. BAH28, <i>Streptomyces</i> sp. BSH50, <i>Streptomyces</i> sp. BA12, <i>Streptomyces</i> sp. AAH67 <i>Streptomyces</i> sp. AS37 izolatlarından elde edilen NRPS geninin PCR ürünleri.	50
Şekil 4.25.	<i>Streptomyces</i> sp. CA13 <i>Streptomyces</i> sp. CA18 ve <i>Streptomyces</i> sp.	51

CA28 izolatlarından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünleri.

- Şekil 4.26.** *Streptomyces* sp. CS42 izolatından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünü. 51
- Şekil 4.27.** *Streptomyces* sp. BA12ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatlarından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünleri. 52
- Şekil 4.28.** *Streptomyces* sp. AA59 *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. AR17, *Streptomyces* sp. BSH50, *Streptomyces* sp. BS32, *Streptomyces* sp. AAH67 *Streptomyces* sp. AS37 izolatlarından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünleri. 52
- Şekil 4.29.** *Streptomyces* sp. BA1 izolatından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünü. 53
- Şekil 4.30.** *Streptomyces* sp. BAH28 izolatından elde edilen PKS-I geninin PCR ürünü. 54
- Şekil 4.31.** NRPS geninin PCR ürünlerinin ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüleri. 54
- Şekil 4.32.** PKS-I geninin PCR ürünlerinin ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüleri. 54
- Şekil 4.33.** *Streptomyces* sp. BSH50 izolatının adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler. 55
- Şekil 4.34.** *Streptomyces* sp. AS29 izolatının ketosentaz domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler. 56

KISALTMALAR ve SİMGELER

A: Adenilasyon

ACP: Açıl Taşıyıcı Protein

AT: Açıltransferaz

ATP: Adenozintrifosfat

BFB : Brom fenol blue

BLAST: Basic Lokal Alignment Search Tool

bç: Baz Çifti

C: Kondensasyon

°C: Santigrat Derece

DH: Dehidrataz

dk: Dakika

DMF: Dimetilformamid

DNA: Deoksiribonükleik asit

ER: Enoilredüktaz

EtOH : Etanol

EDTA : Etilendiamintetrasetik asit

EtBr : Etidyumbromür

FAS: Yağ asidi Sentaz

g : Gram

GC: Guanin/Sitozin Bazları

IPTG: İsopropil-β-D-Thiogalactoside

kDa: Kilo dalton

KR: Ketoredüktaz

KS: Ketosentaz

L : Litre

LB: Lurient Broth

mm : Milimetre

mM: Milimolar

M : Molarite

Mb: Megabaz

NCBI : (National Center for Biotechnology Information) Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi

NRP : Non-Ribozomal Peptid Sentetaz

NRPS: Non-Ribozomal Peptid Sentetaz
ng: Nanogram
O.D: Optik Dansite
PCP: Peptid Taşıyıcı Protein
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK: Poliketid
PKS: Poliketid sentaz
rpm : (Revolution Per minute) Dakikadaki devir sayısı
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
sn: Saniye
TAE: Tris-baz Asetik Asit EDTA
TE: Tiyoesteraz
TLC : (Thin Layer Chromatography) İnce Tabaka Kromatografisi
Tm: Erime Sıcaklığı
TSB : Tryptone Soya Broth
U: Ünite
UV : Ultraviyole
YEME: Maya Özütü-Malt Özütü
X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
 μ g : Mikrogram
 μ l : Mikrolitre
 μ m: Mikrometre
 μ M: Mikromolar

1.1. GİRİŞ

Biyoaktif doğal ürünler; antibiyotikler, antitümör ajanlar, toksinler ve sideroforları içeren, işlevsel olarak birbirinden oldukça farklı biyokimyasal sınıflara dahil olan bileşiklerdir. Biyoaktif doğal ürünlerin en önemli grubunu teşkil eden sekonder metabolitler kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı diğer makromoleküllerden ayrılırlar (Cannell 1998).

Bitkiler ve mikroorganizmalar önemli biyoaktif sekonder metabolit üreticisidirler. Her iki organizma grubunun sentezlemiş olduğu bileşikler karşılaştırıldığında mikroorganizmalarca sentezlenen sekonder metabolitler, kimyasal yapıları bakımından daha kompleks olup, daha fazla çeşitlilik gösterir. Sekonder metabolitler sahip oldukları özel kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı ilaç araştırmalarında öncül madde olma niteliğine sahiptirler. Mikrobiyal sekonder metabolitler; antibiyotiklerin üretiminde en büyük paya sahiptir. 1983–1994 yılları arasında keşfedilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal kaynaklıdır. Şu ana kadar keşfedilen mikrobiyal kaynaklı antibiyotiklerin çoğunluğu *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından üretilmektedir ve henüz bu antibiyotiklerin sadece % 3'ünün belirlendiği sanılmaktadır (Oskay ve Tamer 2009).

Antibiyotik kelimesi Yunanca bir kelime olup anti (karşı) ve bios (yaşam) sözcüklerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. İlk kez 1889'da Paul Vuillemin tarafından kullanılmıştır. Antibiyotikler doğal olarak veya sentetik olarak sentezlenen maddelerdir. Bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran "bakteriostatik etki" veya onları yok ederek "bakteriyosidal etki" göstermekle birlikte uzun zamandır insanların ve hayvanların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Drews 1999).

Antibiyotiklerin tedavide ilk kez kullanımı Alexander Fleming'in penisilini tesadüfen keşfetmesinden sonraki yıllara dayanır. 1940'lı yıllarda az miktarda üretilen ham penisilin, stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Antibiyotik araştırmaları 1943'de Selman Waksman ve arkadaşları tarafından, streptomisin bulunmasıyla hız kazanmıştır. O yıllarda streptomisin, tüberküloz tedavisinde kullanılan etkili ilk antibiyotik olmuş ve *Streptomyces* cinsinin tipik bir türü olan *Streptomyces griseus*'dan elde edilmiştir. Waksman ve arkadaşlarının buluşundan sonra 1950 ve 1960'lı yıllarda (Berdy 2005) çok sayıda antibakteriyal ve antifungal

1. GİRİŞ

antibiyotikler bulunmuş (Çizelge 1.1) ve bu dönem antibiyotik keşiflerinin “**Altın Çağı**” olarak nitelendirilmiştir (Hopwood 2004).

Çizelge 1.1. *Streptomyces* kökenli bazı antibiyotiklerin keşfedildiği yıllar ve kaynakları (Oskay ve Tamer 2009).

Antibiyotik	Yıl	Üretici Organizma	Kaynak
Streptomisin	1943	<i>Streptomyces griseus</i>	Toprak, New Jersey, USA
Kloramfenikol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Bataklik, Venezuela
Neomisin B	1947-53	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Yol duvarı, Paris,Fransa
Klortetrasiklin	1948	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Toprak
Neomisin	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>	Toprak, New Jersey, USA
Oksitetrasiklin	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>	Toprak
Nistatin	1950	<i>Streptomyces noursei</i>	Çiftlik toprağı, USA
Eritromisin	1952	<i>Streptomyces erythreus</i>	Toprak, Filipin adaları
Tetrasiklin	1954	<i>Streptomyces sp.</i>	Toprak, Teksas, USA
Novobiyosin	1955	<i>Streptomyces spheroides</i> <i>Streptomyces niveus</i>	Çayır ve otlaklar, Vermont, USA
Sikloserin	1955	<i>Streptomyces orchidaceus</i> <i>Streptomyces gaeryphalus</i>	Toprak, Indiana, USA Toprak, Guatemala
Vankomisin	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>	Toprak, Çin, USA
Kanamisin	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Toprak, Japonya
Paromomisin	1959	<i>Streptomyces rimosus</i>	Toprak, Kolombiya

Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu yaygın kullanımları hem ekonomik yükü hem de yan etkilerinin sıkça ortaya çıkmasına yol açmış bu ise aynı zamanda, toplum sağlığını da tehdit eder bir hale gelmelerine neden olmuştur. Özellikle az gelişmiş toplumlarda bilinçsizce kullanılması ve patojen mikroorganizmaların bunlara karşı hızla direnç kazanmaları sorun olmaktadır. Bundan dolayı antibiyotiklere karşı direnç kazanılması, yeni ve daha etkili ilaçların doğal ya da yapay yolla acilen üretilmeleri gerektiği konusunda bilim adamlarını bir araya getirmiştir. Tam zamanlı klasik antibiyotik araştırma programlarına ek olarak, mikrobiyal genetiğe dayanan yeni bütünleşik metodlar devreye sokulmuştur.

Bunlar arasında daha çok, antibiyotik üretiminden sorumlu gen dizilerinin belirlenmesi ile biyosentez teknolojisi ön plana çıkmaktadır (Levy 1992).

Son yıllarda doğal bileşik tarama programları, aktinomisetler tarafından üretilen biyolojik olarak aktif metabolitlerin keşfi üzerine yoğun bir çaba ile konsantre olmuştur. Bu sayede, ticari önemi olan ve biyosentetik sistemleri hakkında çok az bilgiye sahip oldukça fazla bileşiğin biyosentez mekanizmaları ile genetik organizasyonlarının tanımlanmasında çok büyük gelişmeler meydana gelmiştir (Ayuso-Sacido ve Genilloud, 2005). Biyosentetik potansiyeli ortaya çıkarmak için sekonder metabolitlerin sentezinde görevli olan genlerin araştırılması hem aktinomisetlerde hemde farklı taksonomik gruplarda denenmiştir (Sosio ve ark. 2000, Christiansen ve ark. 2001, Anderson ve ark. 2002, Ayuso-Sacido ve Geniloud 2005).

Ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) ve poliketid sentazlar (PKS), mikroorganizmalar tarafından üretilen önemli biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının sentezinde gerekli biyosentetik sistemlerdir (Ayuso-Sacido ve Geniloud, 2005). Dejenere PCR primerlerinin kullanılmasıyla lokal mikrobiyal türlerin NRPS ve PKS genleri moleküler olarak taranmaktadır. Bu yaklaşım, yüksek metabolik potansiyele sahip yabancı-tip izolatların taranması için alternatif bir yoldur. Her bir aktinomiset türünün genetiksel olarak 10-20 arasında sekonder metabolit üretme potansiyelinden dolayı (Donadio, 2002), farklı habitatlardan yeni lokal izolatların bu tarama çalışmalarında kullanılması yeni metabolitlerin bulunma ihtimalini arttırmak için önemli bir yaklaşımdır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. Aktinomisetler

Aktinomisetler; Gram pozitif aerobik bakteriler olup (Kuster 1968), çok çeşitli morfolojik karakterleri, ekolojisi, patojenitesi, genom uzunluğu, genomunun içerdiği G+C oranı ve genomunda kodlanan bölge sayısı yönünden bakteriler içerisinde çok dikkat çekici bir grubu oluşturmaktadır (Embley ve Stackebrandt 1994, Hopwood 2007, Venture ve ark. 2007).

2.1.1.1. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması

1870'lerde ilk aktinomisetin keşfinden 1950'lere kadar aktinomisetler; bakteriler ve funguslar arasında bir form olarak bilinmekteydi (Hopwood 2006). Bu grubun üyeleri yüzyılı aşkın bir süre öncelikli olarak morfolojik kriterlere göre sınıflandırıldı. Aktinomisetlerin gerçekte Gram pozitif hücre duvarına sahip olduğu ve DNA baz içeriğinin % 70 den yüksek G+C oranına sahip olduğu yapılan araştırmalarla ortaya çıkmıştır (Hopwood 2006). 16S rRNA'ları dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi, grup, 13 alt takıma ayrılmıştır ve bu grubun büyük bir çoğunluğu hala sınıflandırılmayı beklemektedir (Embley ve Stackebrandt 1994).

Çizelge 2.1. Aktinomisetales takımının taksonomik sınıflandırılması

Alttakım	Aile	Cins
Actinomycineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces, Mobiluncus, Arcanobacterium</i>
Actinopolysporineae	Actinopolysporaceae	Actinopolyspora
Catenulisporineae	Actinospicaceae	Actinospica
	Catenulisporaceae	Catenulispora
Corynebacterium	Nocardiaceae	<i>Nocardia, Rhodococcus.</i>
	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>
	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>
	Dietziaceae	<i>Dietzia</i>
	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella</i>
	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium, Turicella</i>

Çizelge 2.1. Aktinomisetales takımının taksonomik sınıflandırılması (devamı).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Frankineae	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
	Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>
	Geodermatophilaceae	<i>Geothermatophills, Blastococcus</i>
	Microsphaeraceae	<i>Microsphaera</i>
	Acidotherrmaceae	<i>Acidohermus</i>
Glycomycineae	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>
Kineosporiineae	Kineosporiaceae	<i>Angustibacter, Kineococcus, Kineosporia, Quadrisphaera</i>
Micrococcineae	Micrococcaceae	<i>Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria, Nesterenkonia, Rorhia, Renibacterium, Stomatococcus</i>
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas, Oeskovia, Rarobacter</i>
	Dermabacteraceae	<i>Dermatobacter, Brachybacterium</i>
	Intrasporangiaceae	<i>Intrasporangium, Sanguibacter, Terrabacter</i>
	Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>
	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium, Agrococcus, Agromyces, Aureobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Rathaybacter</i>
Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora, Actinoplanes, Catellatospora, Couchioplanes, Catenuloplanes, Pilimelia Dactylosporangium</i>
Propionibacteriineae	Propionibacteraceae	<i>Propionibacterium, Luteococcus, Microlunatus, Propioniferax</i>
Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia, Actinopolyspora, Actinosynnema, Amycolatopsis, Kibdelosporium, Kutzneria, Lentzea, Saccharomonospora, Saccharopolyspora, Saccarothrix, Streptoalloteichus, Thermocrispum.</i>
Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
Streptosporangineae	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium, Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora</i>
	Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora</i>
	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> 2011

2.1.1.2. Aktinomisetlerin Morfolojik Özellikleri

Aktinomisetler; küresel görünümüne sahip *Micrococcus*'lardan, çubuk ve küresel şekilli *Arthrobacter*'lere, *Nocardia* türlerinde görülen filamentöz forma ya da *Micromonospora* ve *Streptomyces* türlerinde görüldüğü gibi geçici ve yüksek oranda dallanan miselyumlara kadar çok çeşitli morfolojik karakterleri içeren geniş bir takımdır. Bu takım içerisinde yer alan bazı cinsler spor oluştururken bazıları oluşturmamaktadır. Sporlar hareketli zoosporlardır. Kuraklığa ve sıcaklığa dayanıklı olup diğer bakteriyel endosporlar gibi organizasyona sahip değildir .

Aktinomisetler buldukları doğal ortamlarında metabolik olarak ya aktif ya da inaktif durumdadırlar. Bazı türler içerisinde morfolojik özelliklere bakılarak metabolik olarak aktif ya da dinlenme halinde (uyku) oldukları ayırt edilebilmektedir. *Actinoplanetes*, *Maduromyces* ve *Streptomyces*'ların içerisinde bulunduğu bir çok grupta filamentler ve sporlar sırasıyla aktif form ve sonrasında inaktif yayılma aşamasına geçebilirler. Diğer gruplarda ise filamentöz formunun görüldüğü aşama çok çabuk geçmekte ve dinlenme formunun görüldüğü aşamada ise morfolojik görünümdeki farklılık aktif halde bulunan aşamaya göre çok az olmaktadır (Goodfellow ve Williams 1983).

2.1.1.3. Aktinomiset Ekolojisi

Aktinomisetler; toprakta, denizde, kaplıcalarda (Barabote ve ark. 2009), gama ışınlarının bulunduğu yüzeylerde (Phililips ve ark. 2002), bitki köklerinde (Normand ve ark. 2007), aynı zamanda önemli insan, hayvan ve bitki patojenleri gibi çok geniş habitatlarda yayılım göstermektedirler (Goodfellow ve Williams 1983, Castillo ve ark. 2002, Tokala ve ark. 2002).

Aktinomisetlerin çoğu saprofittir. Bunun yanında bazı formlar parazitik ve mutualist olarak bitki ve hayvanlarla birlikte yaşamaktadır. Aktinomisetlerin besin döngüsünde önemli rol oynadığı yaygın olarak bilinmekle birlikte yayılışları, populasyon dinamiği, büyüme oranları, degradasyon özellikleri, uyku halinden aktif büyüme durumuna geçişleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Goodfellow ve Williams 1983).

Aktinomisetler toprak mikrobiyal populasyonunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Lignoselüloz ve kitin gibi kompleks polimerlerin ayrışmasında önemli

toprak bileşenleridir (Goodfellow ve Williams, 1983). Ayrıca funguslara karşı çeşitli etkiler gösteren sekonder metabolit sentezleyebilmektedirler. Toprak aktinomisetleri spesifik funguslara karşı değişken oranlarda inhibisyon etkisi gösterirler (Keast ve Tonkin 1983, Friedman ve ark. 1989, , Pedziwilk 1995, Valois ve ark. 1996, de Boer ve ark. 1998, El-Tarabily ve ark. 2000). Toprak aktinomisetleri buldukları coğrafyada; toprağın sıcaklığı, nemi, pH'sı, organik madde içeriği, toprak çeşidi, oksijene ulaşma yeterliliği gibi çevresel etkenlerden önemli oranlarda etkilenmektedir (Arifuzzaman ve ark. 2010). Laboratuvar koşullarında üretilen aktinomisetlerin sıcaklık istekleri 25 - 30°C, termofil aktinomisetler için ise 45 - 55 °C 'dir (Nonomura ve Ohara 1969, Okami ve Okazaki 1972).

2.1.1.4. Aktinomisetlerin Endüstriyel Önemi

Aktinomisetler bakteriler içerisinde sekonder metabolit üreticisi olarak bilinen en baskın gruptur. Grup üyeleri bu özelliklerinden dolayı geniş endüstriyel uygulamalara sahiptir (Goodfellow ve Williams 1986). Biyolojik olarak aktif, ticari öneme sahip; antibiyotik, vitamin ve enzim gibi önemli bileşiklerin üreticisi olarak bilinmektedirler (de Boer ve ark. 2005). Ayrıca, farklı antimikrobiyal metabolitlerin de kaynağıdır. Aktinomisetler içerisinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin en önemli üreticileri *Streptomyces* ve *Micromonospora* türleridir (Terkina ve ark. 2006). 23000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si funguslar ve % 16'sı da diğer bakterilerce üretilmektedir (Berdy 2005). Çizelge 2.2 de aktinomiset takımına ait mikroorganizmalar ve ürettikleri biyolojik olarak aktif mikrobiyal metabolitlerin sayısı gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Aktinomiset türlerinin ürettiği biyolojik olarak aktif olan bileşik sayıları.

Aile	Cins	Üretilen Bileşik Sayısı
Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	8000
	<i>Streptoverticillium</i>	258
	<i>Kitasatosporia</i>	37
	<i>Chainia</i>	31
	<i>Microellobosporia</i>	11
	<i>Nocardioides</i>	9
Micromonosporaceae (Actinoplanetes)	<i>Micromonospora</i>	740
	<i>Actinoplanes</i>	248
	<i>Dactylosporangium</i>	58
	<i>Ampullariella</i>	9
	<i>Glycomyces</i>	2

Çizelge 2.2. Aktinomiset türlerinin ürettiği biyolojik olarak aktif olan bileşik sayıları (devamı).

	<i>Catenuloplanes</i>	3
	<i>Catellatospora</i>	1
Pseudonocardiaceae	<i>Saccharopolyspora</i>	131
	<i>Amycolatopsis/Nocardia</i>	120/357
	<i>Kibdellosporangium</i>	34
	<i>Pseudonocardia</i>	27
	<i>Amycolata</i>	12
	<i>Saccharomonospora</i>	2
	<i>Actinopolyspora</i>	1
Streptosporangiaceae (Maduromycetes)	<i>Streptosporangium</i>	79
	<i>Streptoalloteichus</i>	48
	<i>Spirillospora</i>	11
	<i>Planobispora</i>	10
	<i>Kutzneria</i>	4
	<i>Planomonospora</i>	2
Thermomonosporaceae	<i>Actinomadura</i>	345
	<i>Saccharothrix</i>	68
	<i>Microbispora</i>	54
	<i>Actinosynnema</i>	51
	<i>Nocardiopsis</i>	41
	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
	<i>Thermomonospora</i>	19
	<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
	<i>Thermoactinomyces</i>	14
	<i>Thermopolyspora</i>	1
	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
Mycobacteriaceae (Actinobacteria)	<i>Nocardia</i>	357
	<i>Mycobacterium</i>	57
	<i>Arthrobacter</i>	25
	<i>Brevibacterium</i>	17
	<i>Proactinomyces</i>	14
	<i>Rhodococcus</i>	13
Sınıflandırılmamış Türler	<i>Actinosporangium</i>	30
	<i>Microellobosporia</i>	11
	<i>Frankia</i>	7
	<i>Westerdykella</i>	6
	<i>Kitasatoa</i>	5
	<i>Synnenomyces</i>	4
	<i>Sebekia</i>	3
	<i>Elaktomyces</i>	3
	<i>Excelsospora</i>	3
	<i>Waksmania</i>	3
	<i>Alkalomyces</i>	1
	<i>Catellatospora</i>	1
	<i>Erythrosporangium</i>	1
	<i>Streptoplanospora</i>	1
	<i>Microechinospora</i>	1
<i>Salinospora</i>	1	

2.1.1.5. Aktinomiset Genomu

Aktinomisetler içerisinde en küçük genom uzunluğuna 1.93 Mb ile *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* sahip iken en büyük genom uzunluğuna ise 10.15 Mb ile *Streptomyces scabies*'e aittir. *Mycobacterium leprae* 1605 ve *S. scabies* ise 8983 protein kodlayan gen içermektedir. Aktinomiset türlerinin çoğu sirküler kromozoma sahip iken, uzun genom büyüklüğüne sahip aktinomisetler (*Rhodococcus jostii*, *Rhodococcus opacus* B4 ve bütün *Streptomyces* türleri) lineer kromozoma sahiptir. Lineer kromozoma sahip aktinomisetler diğerlerinden ayrı olarak kromozomlarının sonunda terminal proteinlerin bağlandığı ters tekrar bölgeleri içerirler (Bao ve Cohen 2001, Hopwood 2006, Mcleod ve ark. 2006).

Sekonder metabolitleri ve bilinen proteinleri kodlayan genlerin arasındaki homoloji incelendiğinde, aktinomiset üyelerinin geniş oranda çeşitli sekonder metabolit biyosentetik gen kümelerine sahip olduğu ve bu biyosentetik gen kümelerini sentezleyen 30'un üzerinde metabolik yol olduğu ortaya çıkmıştır. Özellikle Streptomycetaceae (*Streptomyces* ve *Kitasatospora* türleri), Micromonosporaceae (*Salinispora* ve *Micromonospora*) ve Pseudonocardiaceae (*Saccharopolyspora*), gibi bazı familyalar sekonder metabolitleri düzenli sentezleyen 20'den fazla gen kümesine sahiptir. Bu familyaların sekonder metabolit üretiminde potansiyellerinin sadece % 5'ini kullanmakta oldukları bilinmektedir. Doğal ürünlerce zengin olan aktinomisetlerin genomu genellikle 5 Mb'dan büyüktür ve sekonder metabolit genleri merkezden uzaktır (Takarada ve ark. 2008).

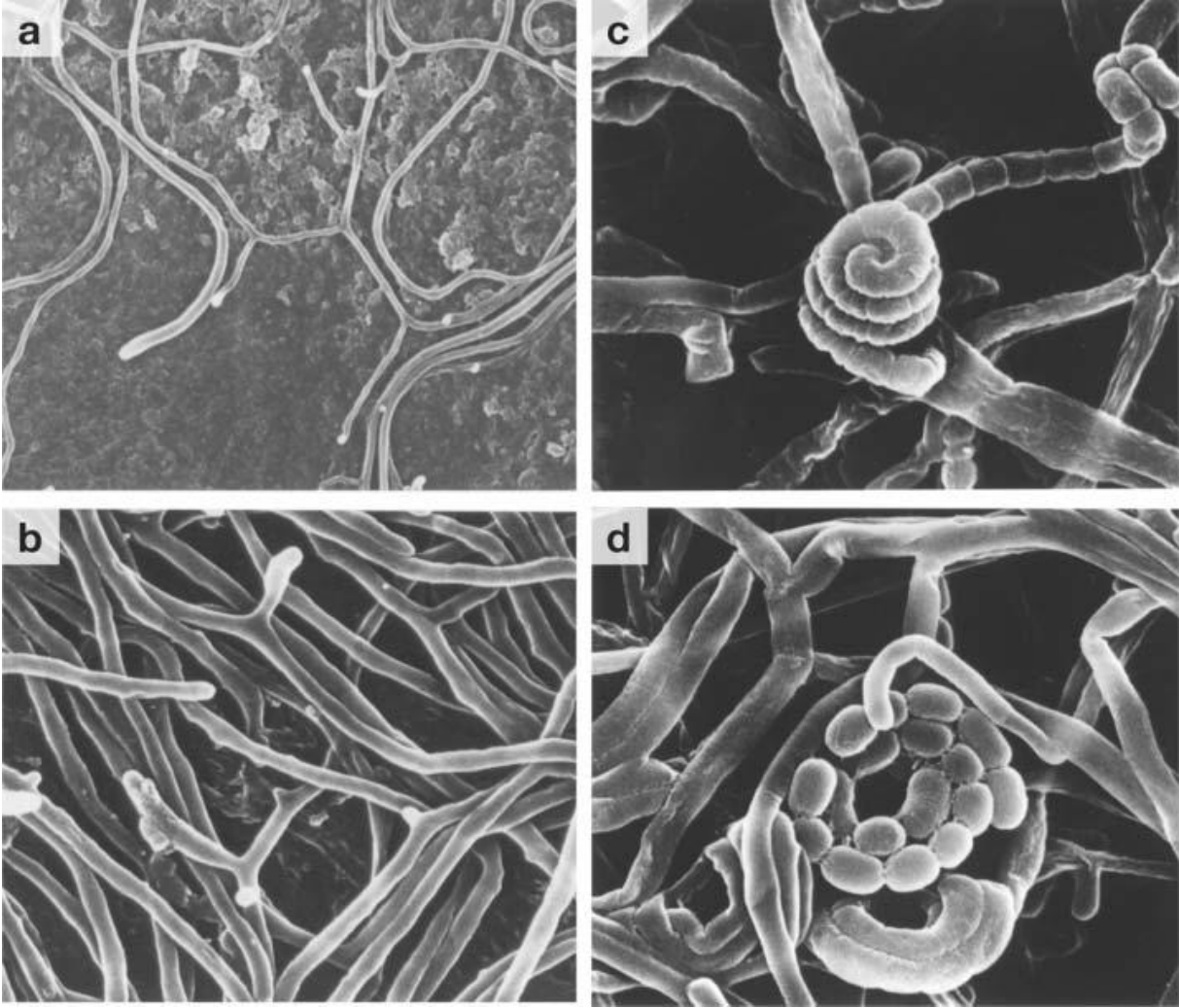
2.1.2. *Streptomyces* Türlerinin Genel Özellikleri

Streptomyces'lar; Gram pozitif toprak bakterileri olup *Actinomycetales* takımına dahildirler. Bu cinsin 900'den fazla tanımlanmış türü mevcuttur. Kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan bu organizmalar uygun koşullar altında funguslara benzer geniş misel formları oluştururlar (Chater 2001).

2.1.2.1. *Streptomyces*'ların Hayat Döngüsü

Streptomyces kolonileri çoğu bakteri türü içinde alışılmadık hücresel bir forma sahiptir. Bu bakteriler farklılaşmış "dokular" (miselyum)'dan oluşmaktadırlar. Dinlenme halinde olan spor tarafından, henüz bilinmeyen bir sinyal aracılığı ile (Chater 2001), bir

yada birden fazla germ tüpü oluşturulur (Flardh 2003). Bu tüplerin uçlarından uzama gerçekleşir. Aralıklarla çapraz duvarlar oluşur. Yan dallanmalar başlar ve yeni miseller oluşur. Yan dallanmalar aynı zamanda koloni biokütlesinin yarıdan fazla artışına yol açar (Chater ve Losick 1997). Koloni biyokütlesinin artması ve topraktaki besinin azalmasıyla vejetatif yada substrat miselleri toprakta hava boşluğuna doğru genişleyen dallanmalar oluşturur. Dallanmalar kısa bir uzama süresinden sonra merkezden uzaklaşan hava miselleri tarafından bölümlere ayrılarak özel sporulasyon septalarını, septalar da sporları meydana getirir (Hopwood 2006). Bu farklılaşma işlemi sıkı bir şekilde, çok basamaklı bir iletişim ağı ile düzenlenmektedir (Chater 2001). Şekil 2.1'de *Streptomyces lividans*'ın dört aşamadan oluşan koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *S. lividans*'ın dört aşamadan oluşan koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi. (a) Koloni etrafındaki genç vejetatif hücreler; (b) Olgun vejetatif misellerin hava misellerine dönüşümü; (c) Hava misellerinin septaları (spor öncülleri) oluşturması. (Bu organizmada spor zincirleri spiral şeklindedir); (d) Olgun spor zincirleri (Jeremy Burgess, John Innes Centre).

2.1.2.2. *Streptomyces*'ların Ekolojisi

Streptomyces'lar hem karasal ortamlarda hem de sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Çoğu *Streptomyces* tam saprofit olup bir kısmı bitki ve hayvanlarla parazitik ilişki içerisindedir (Sembiring ve Goodfellow 2008). *Streptomyces*'ların doğadaki rolü ile ilgili çok kısıtlı bilgiler olmasına rağmen toprak ekosisteminde özellikle selüloz, nişasta, kitin gibi organik maddelerin degradasyonundan sorumlu ekstrasellüler enzimleri üretmeleri ve madde döngüsünde

rol aldıkları bilinmektedir (Lechevalier 1981, Crawford 1988, Peczyńska-Czoch ve Mordarski 1988, Semêdo ve ark 2004, Cao ve ark 2004). Toprak aktinomisetleri üzerine yoğunlaşan çalışmalarda, geniş bir yayılım gösteren ve sıklıkla izole edilen *Streptomyces* türleri dikkat çekmektedir. Birçok *Streptomyces* türünün toprak funguslarını parçaladığı ya da inhibe ettiği yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Fungusları inhibe etme yeteneklerinin kitinaz üretimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (de Boer ve ark. 1998). *Streptomyces* türlerinin kitinaz ürettiği ve kitinazın bazı bitki patojen funguslarının hüflerini parçaladığı gösterilmiştir (Lyod ve ark. 1965). Ayrıca antifungal bileşik olan baflomisin B1 ve C1 *Streptomyces halstedii* tarafından sentezlenmektedir (Frandsberg ve ark. 2000).

Streptomyces'ların toprak içerisinde dağılımını, gelişimini ve aktivitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; besine ulaşılabilirlik, nem, sıcaklık, pH, toprak tipi ve mevsimsel değişimlerdir (Williams ve ark. 1972, Williams 1978, Atalan 1993, Upton 1994).

Streptomyces türleri toprak içerisinde düşük oksijen konsantrasyonunda da gelişebilmektedir. Fakat karbondioksit oranı % 10'u aştığında mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. Kurak topraklarda nem gerilimi (pF) 4.0'ün üstüne çıktığında belirli bir oranda *Streptomyces*'larda azalma görülmektedir. *Streptomyces* sporları kuraklığa dayanıklı olduğu için diğer bakterilerin toprakta bulunan vejetatif formdaki üyelerine oranla *Streptomyces* sayısı daha fazladır. *Streptomyces* sayısının optimum olduğu nötral steril toprak nem geriliminin (pF) 1.5 ile 2.0 arasındaki değerdir. Bu koşullarda toprak yeterli su ile doludur ve aerobik mikroorganizmaların gelişmesi için yeterli havayı içermektedir (Sembiring ve Goodfellow 2008).

2.1.2.3. *Streptomyces*'lar Tarafından Sentezlenen Doğal Ürünler

Streptomyces'ların biyolojik olarak aktif doğal ürün sentezleme yeteneği, mikroorganizmalar içerisinde eşsiz bir konuma sahiptir. Doğal ürün sentezleme yeteneklerinden dolayı bu organizmalar ilaç endüstrisinde çok önemli bir yere sahiptir (Berdy 2005). Günümüze kadar bilinen antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisi aktinomisetler tarafından ve bunların da yaklaşık olarak % 75'i *Streptomyces*'lar tarafından üretilmiştir (Newman ve ark 2003, Jimenez-Esquelin ve Roane 2005).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Streptomyces türleri tarafından üretilen doğal bileşikler ve bu doğal bileşiklerin özellikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. *Streptomyces* kökenli bazı antibiyotikler ve biyolojik aktiviteleri (Oskay ve Tamer 2009).

Biyolojik Aktivite	Antibiyotik	Kaynağı
Antibakteriyel	Streptomisin	<i>Streptomyces griseus</i>
	Kanamisin A, B	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
	Higromisin B	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
	Sefamisin A, B	<i>Streptomyces chartreusis</i>
	Tienamisin	<i>Streptomyces cattleya</i>
	Klavulanik asit	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Oleandomisin	<i>Streptomyces antibioticus</i>
	Lankasidin	<i>Streptomyces violaceoniger</i>
	Pristinamisin	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
	Oksitetrasiklin	<i>Streptomyces rimosus</i>
	Linkomisin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
	Spiramisin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
	Eritromisin A	<i>Streptomyces erythreus</i>
	Kloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
	Valinomisin	<i>Streptomyces griseus</i>
	2-OH-metilklavam	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Nistatin	<i>Streptomyces noursei</i>	
Antifungal	Amfoterisin B	<i>Streptomyces nodosus</i>
	Candisin/Levorin	<i>Streptomyces griseus</i>
	Rapamicin	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Antiviral	Ara-A	<i>Streptomyces antibioticus</i>
	Tunikamisin	<i>Streptomyces chartreusis</i>
	Daunorubisin	<i>Streptomyces peuceticus</i> <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
	Doxorubisin	<i>Streptomyces peuceticus</i> var. <i>Streptomyces caesius</i>
Antitümöral	Ditrisarubisin	<i>Streptomyces cyaneus</i>
	Mitomisin C	<i>Streptomyces caespitosus</i>
	Aktinomisin	<i>Streptomyces antibioticus</i>
	Sarkomisin	<i>Streptomyces erythrochromogenes</i>
	Higromisin B	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
	Avermektin	<i>Streptomyces avermitilis</i>

Çizelge 2.3. *Streptomyces* kökenli bazı antibiyotikler ve biyolojik aktiviteleri (Oskay ve Tamer 2009) (devamı).

Antiparazitik	Milbemisin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> sp. <i>Streptomyces aureolacrimosus</i>
	Monensin	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
	Salinomisin	<i>Streptomyces albus</i>
Insektisidal	Avermektin	<i>Streptomyces avermitilis</i>
	Milbemisin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> sp. <i>Streptomyces aureolacrimosus</i>
Herbisidal	Bialafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
	Fosfinotirisin	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
ATPase inhibitörleri	Bafilomisin	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces halstedii</i>
Diyabetik	Streptozotosin	<i>Streptomyces achromogenes</i>
	Lasalosid Sodyum	<i>Streptomyces</i> sp.
Büyüme Promotörü	Monensin Sodyum	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
	Salinomisin	<i>Streptomyces albus</i>
	Tilosin Fosfat	<i>Streptomyces cirratus</i>

2.1.2.4. *Streptomyces* Genomu ve Özellikleri

Streptomyces kromozomuna ait bilgilerin birçoğu *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley ve ark. 2002), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (Omura ve ark. 2001, Ikeda ve ark. 2003), ve *Streptomyces griseus* IFO 13350 (Ohnishi ve ark. 2008) genom dizilişlerinin belirlenmesiyle elde edilmiştir.

Streptomyces coelicolor A3(2)

Streptomyces coelicolor A3(2) genetiksel özellikleri çok iyi tanımlanmıştır. Aktinomisetlerin biyolojik ve kimyasal özelliklerinin aydınlatılmasında kullanılan model mikroorganizmadır. *S. coelicolor* A3(2)'nin prototipi olan M145 türünün 2002 yılında tüm genom haritası ortaya çıkarılmış ve yayınlanmıştır. M145 türü *S. coelicolor*'ın prototipi olup SCP1 ve SCP2 plazmidlerini içermemektedir. Genom haritası çıkarılan bu organizma 8.667.507 bp (% 69.1 G+C baz içeriğine sahiptir) uzunluğunda, 7769 gen kodlanmakta ve 56 pseudogen içermektedir. Lineer SCP1 plazmidini (356.023 bp; % 69.1 G+C baz içeriğine sahiptir ve 351 gen kodlamaktadır)

(Bentley ve ark. 2004) ve sirküler SCP2 plazmidi (31.317 bç; % 72.1 G+C baz içeriği ve 34 gen kodlamaktadır), (Haug ve ark. 2003) sonradan sekanslanmıştır.

Genetik çalışmalarda *S. coelicolor* A3(2)'ün kullanılmasının ya da geliştirilmesinin en önemli nedeni difüzlenebilir pigment üretmesidir. Üretilen bu pigment genetik işaretleyici olarak uygun bir biçimde kullanılmaktadır (Hoopwod, 1999). *S. coelicolor*'ın genomunun tamamı sekanslandığında; mavi, aromatik bir poliketid olan aktinohordin (Malpartida ve Hoopwod 1984); kırmızı, oligopirol olan prodiginin antibiyotik (Cerdeno ve ark. 2001, Williamson ve ark. 2006) ve kalsiyum bağımlı asidik lipopeptid antibiyotiklerinin (Hojati ve ark. 2002) yapısı ve sentezini gerçekleştiren biyosentetik gen kümeleri bilinmekteydi. *S. coelicolor*'ın genom projesi başlangıcında, kromozomunda 17 sekonder metabolit gen kümesinin olduğu bilinirken kromozomun gen haritası ortaya çıkarıldığında ise sekonder metabolit biyosentezinden sorumlu spesifik 29 gen kümesinin olduğu ortaya çıkmıştır. Genlerin subtelomerik bölgede yani merkezden uzak bölgelerde yer aldığı tespit edildi (Bentley 2002). Bu genlerden meydana gelen ürünlerin, sayısız enzimatik işlemlerden sonra oluşmakta olduğu tahmin edilmektedir. Poliketidler, nonribozomal peptidler, bakteriosinler, terpenoidler ve diğer sekonder metabolitler oluşan ürünler içerisinde yer almaktadır. Bu ürünler *Streptomyces* genomunun niteliğini de belirtmektedir. Genomu tamamen sekanslanan *S. coelicolor*, rasyonel yaklaşımlar sonucunda bilinmeyen ürünlerin metabolik yollarının ortaya çıkarılmasına olanak sağlamıştır (Challis 2000). Yapısal tahminlerle başlangıçta trimoduler NRPS olarak düşünülen ve SCO0492 gen kümesi tarafından sentezlendiği düşünülen tripeptid sideroforun (Challis 2008), sonraki izolasyon çalışmalarında yeni bir tetrapeptid olan demir şelatörü coelichelin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Lautru ve ark. 2005). Genomdan yola çıkılarak, gerçekleştirilen yapısal tahminle yeni doğal ürünlerin keşfine yol açacak olan "genome mining" (genomun taranması) yeni kimyasal ürünlerin eldesine katkı sunacak yeni bir yaklaşımdır (Nett ve ark. 2009).

***Streptomyces avermitilis* MA-4680**

Endüstriyel bir mikroorganizma olan *Streptomyces avermitilis*'in genom sekansı taslak olarak 2001'de yayınlandı. İlk defa *Streptomyces*'ların geniş sekonder metabolit üretme becerileri genomik düzeyde ortaya çıkarıldı (Omura ve ark. 2001). Genomun tam olarak tamamlanmış nükleotid sekansı, taslaktan iki yıl sonra yayınlandı. Lineer

genom 9.025.608 bç (% 70.7 G+C baz içeriğine sahiptir) ve 7582 protein kodlayan gen içermektedir (Ikeda ve ark., 2003). Bunun yanında iki lineer plazmid içermektedir. Bu plazmitler; SAP1 (94.287 bç; % 69.2 G+C içeriğine sahiptir; 96 kodlanan sekans) ve SPA2 (ca 200 kb)'dir.

S. avermitilis 1977 'de Japonya'da topraktan izole edilmiş olup, bir poliketid makrolid olan avermektini sentezlemektedir. Avermektin güçlü bir antihelmintik ajan olup, nematot, böcek ve örümcekler üzerinde etkilidir. Avermektinin semisentetik türevi olan ivermektin 1980'lerden bugüne kadar insan ve hayvanlarda sağaltım amaçlı kullanılmaktadır (Omura ve Crump 2004, Omura 2008). Bu organizmanın genomuna çok çabuk ulaşılabilir olması, avermektinin yapısına ve biyosentezine kolay ulaşılabilirliği sağlamıştır. Aynı zamanda diğer bir makrolid poliketid olan oligomisine (Ikeda 1993) ulaşılabilirliği kolaylaştırmış olup bu moleküllerin tekrar elde edilmesi sağlanmıştır. Genom sekansının ortaya çıkarılmasıyla 11 PKS gen kümesi daha ortaya çıkarılmıştır. Bu gen kümelerinden 3 grup makrolid (Lamb ve ark. 2003) daha izole edilmiş ve bunlardan birinin *S. filipinensis*'ten (Rochet ve ark. 1997) önceden izole edilen filipins oduğu bulunmuştur. Bu bileşik polien olup antifungal ajan olarak kullanılmaktadır.

S. avermitilis'te çok büyük çeşitlilikte PKS yolları mevcuttur (Jenke-Kodama ve ark., 2006). Genom birçok sekonder metabolit gen kümesi içermektedir. En az 8 nonribozomal peptit, 6 terpenoid, çeşitli pigmentler, ozmolit bileşikler, sidereforlar ve bakteriosinleri (Severinov ve ark. 2007) içerir. Ayrıca toplamda 37 sekonder metabolit gen kümesi içerir ve bunlar genomun % 6.6'sını oluşturur. Sekonder metabolit gen kümelerinin çoğu kromozomun merkezinde değil de kromozomun kollarında bulunmaktadır (Nett ve ark. 2009).

Streptomyces griseus IFO 13350

Streptomyces griseus IFO 13350, S.A. Waksman laboratuvarı tarafından yaklaşık 60 yıl önce keşfedildi. *S. griseus* çok iyi bilinen uzun zamandır insanları tüberküloz hastalığına karşı koruyan, aminoglikosid antibiyotik olan streptomisin üreticisidir (Waksman 1953).

S. griseus IFO 13350 genomunun sekansı tam olarak 2008'de tamamlandı. Lineer kromozoma sahiptir. Kromozom 8.546.929 bç uzunluğundadır. Genomunda

plazmid bulunmamaktadır. Kromozomun sonunda 132.910 bp uzunluğunda, uzun ters tekrar bölgeleri içermektedir (Ohnishi ve ark., 2008). Endüstriyel olarak önem arz eden streptomisine ek olarak *S. griseus* önemli bir bakteriyel modeldir. Difüze olabilir, düşük moleküler yoğunluktaki bileşik olan γ -butyrolactone A faktörün ekstrasellüler sinyal oluşturmaya yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır (Takano 2006, Hara ve ark 2009).

Genom analizi yapıldığında ve diğer sekanslanan *Streptomyces* türleriyle karşılaştırıldığında en az 36 gen kümesinin sekonder metabolit biyosenteziyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. *S. coelicolor* A3(2) ve *S. avermitilis* gibi sekonder metabolit biyosentezi ile ilgili genler merkezden uzak bölgelerde konumlanmıştır (Nett ve ark 2009).

2.1.3. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler; proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler gibi canlılık faaliyetleri için birinci dereceden metabolik işlemlerde ve büyümede gerekli olmayan, organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlayan moleküllerdir. Canlı sistemlerdeki birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlarlar. Bu açıdan biyolojik kontrol ajanlarıdır. Sekonder metabolitler savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücreler arası haberleşme gibi olayların gerçekleşmesinde etkin rol oynayan bileşiklerdir (Cannel 1998).

Sekonder metabolitler primer metabolizma sonucu oluşan ara metabolitlerden sentezlenirler. Bundan dolayı sekonder metabolitler primer metabolizma orijinli bileşiklerdir. Genel olarak sekonder metabolitler ekstrasellüler olarak sentezlenmektedir. Çeşitli hücreler arası stres koşulları sekonder metabolit sentezinin başlamasında önemli sinyallerdir. Sekonder metabolizmanın sentezi kromozomal DNA üzerindeki gen kümeleri tarafından ve kısmen de olsa plazmidler tarafından kontrol edilmektedir (Demain 1998).

Sekonder metabolitlerin çok eski zamanlardan beri bitkiler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Mikrobiyal kaynaklı ilk sekonder metabolit olarak değerlendirilen mikofenolikasitin, bir fungus olan *Penicillium glaucum* tarafından sentezlendiği, 1896'da Gosio tarafından rapor edilmiştir (Berdy 2005). İlk gerçek mikrobiyal sekonder metabolit ise 1928'de Fleming tarafından keşfedilen penisilindir. 1940'lara gelindiğinde penisilinin ilaç öncü molekülü olarak kullanılması mikrobiyal

sekonder bileşikler için dönüm noktasıdır. Penisilin hastalıkları iyileştirmedeki başarısı karasal mikroorganizmaların potansiyellerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır. Karasal mikroorganizmaların değerlendirilmesiyle penisilin gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip sefalosporin, aminoglikozit, tetrasiklin ve poliketidleri içeren önemli antibakteriyel ajanlar keşfedilmiştir (Dewick 2002).

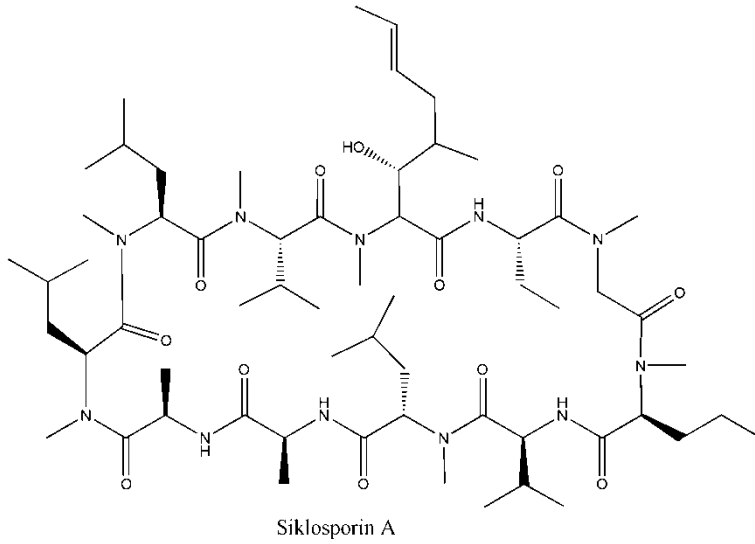
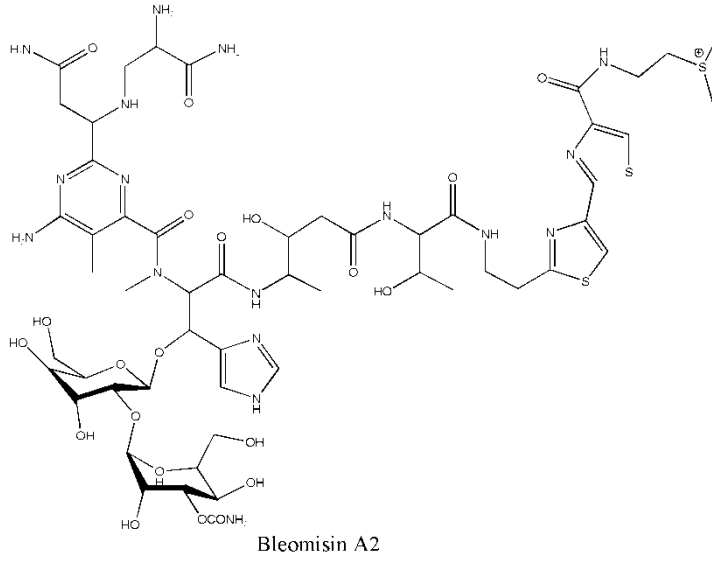
Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında; antibiyotikler, pigmentler, toksinler ve simbiyozda de etkili maddeler, enzim inhibitörleri, feromonlar, bağışıklık sistemine etki yapan bileşikler, reseptör antagonist ve agonistleri, pestisitler, antitümöral ajanlar ile bitki ve hayvan büyüme promotörleri bulunmaktadır. Üretimlerini; büyüme ortamındaki besinler, büyüme oranı, geri-besleme kontrolü (feed-back control), enzim inaktivasyonu ya da aktivasyonu etkileyebilmektedir.

Mikroorganizmalardan izole edilen sekonder metabolitler antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal), antitümör veya antiviral aktivite göstermektedir. Bu etkilere sahip moleküllerin hepsi birden antibiyotikler olarak adlandırılmaktadır (Berdy 2005).

2.1.4. Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Peptidler (NRP)

Ribozom dışı yolla sentezlenen peptidler (NRP); biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. NRP'ler geniş klinik uygulamalara sahiptir. Örneğin, (şekil 2.2'de gösterilen) antibiyotik olarak (daptomisin), antitümör olarak (bleomisin), antifungal ilaç ya da immünbaskılayıcı olarak (siklosporin) kullanılmaktadır (Walsh 2008). Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olan bu moleküllerin doğal olarak nasıl sentezlendiği bilinmektedir. NRP'ler funguslardan ve bakterilerinden sekonder metabolizma sonucu sentezlenmektedir.

NRP'ler; ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) adı verilen çok büyük multimodüler enzim sistemleri tarafından bir dizi aminoasitin biraraya getirilmesiyle oluşturulmaktadır (Walsh 2008, Finking ve Marahiel 2004). Enzim sistemi tarafından sentezlenen NRP moleküllerinin yapısı bilinen 20 aminoasit ile sınırlı değildir. İçerisinde modifiye aminoasitler, yağ asitleri ve α -hidroksi asitleri içeren yaklaşık 500 farklı monomer tanımlanmıştır (Caboche ve ark 2008). Modifiye aminoasitler, NRP'lerin hem yapısal olarak çeşitlilik oluşturmalarına hem de peptidlerin çok yönlü biyolojik aktivite göstermesine katkıda bulunmaktadır.



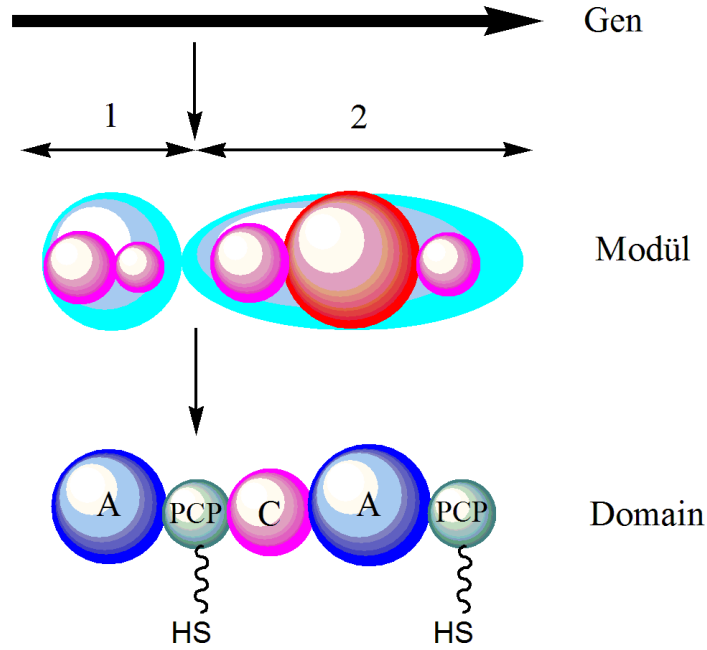
Şekil 2.2. Klinik uygulamalarda kullanılan NRP'ler (Current Opinion in Structural Biology 2010, 20:234–240).

2.1.4.1. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)

Ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) mekanizması ilk olarak 1971 yılında, yağ asiti sentez mekanizmasını da aydınlatan Fritz Lipmann tarafından ortaya atılmış ve "tiyotemplet mekanizması" olarak adlandırılmıştır (Lipmann 1971).

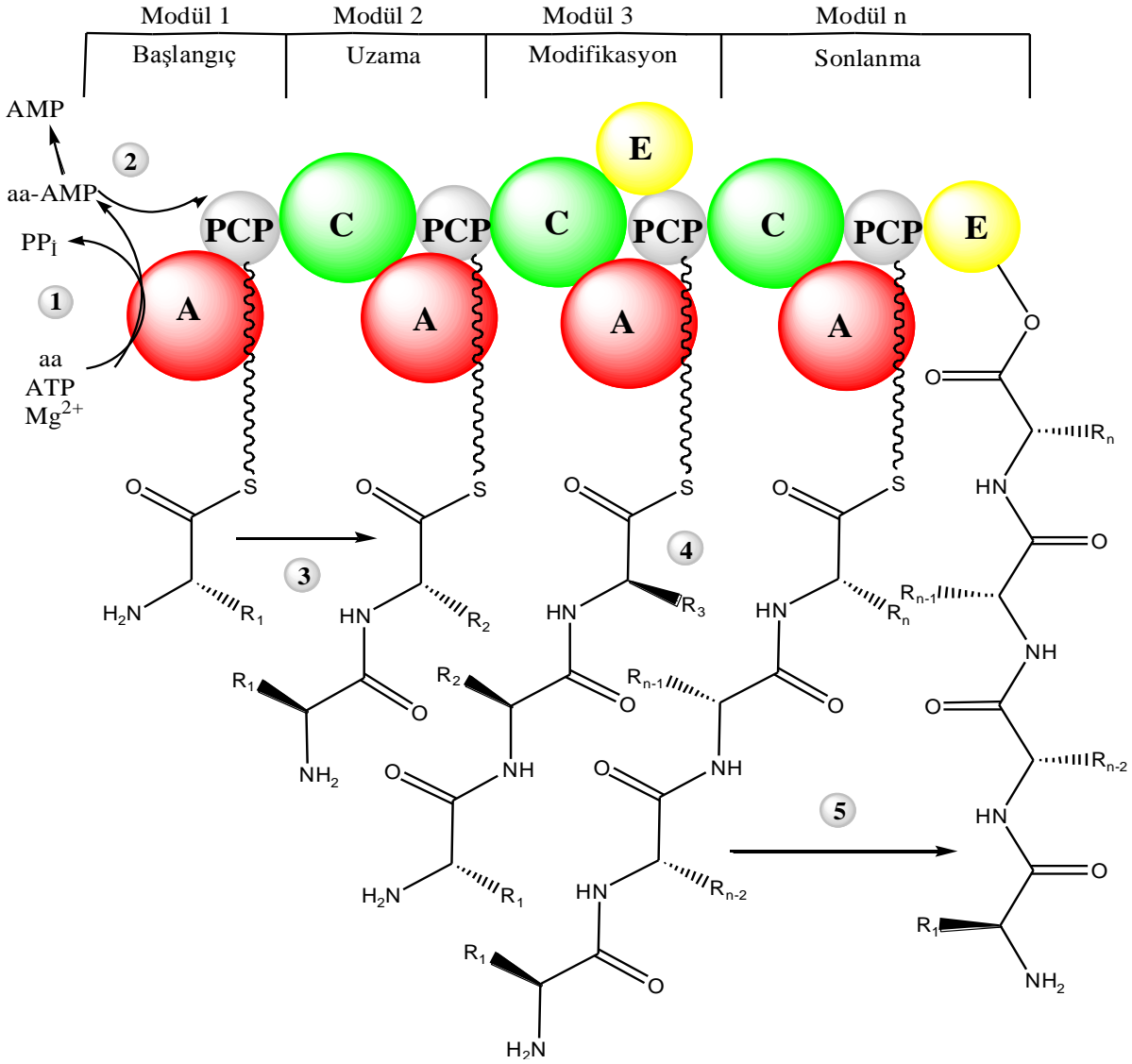
NRPS enzim sistemi tekrarlanan modüllerden meydana gelmiştir (Morris 1996, Stein ve ark 1996). Her bir modül farklı domainler içermekte ve bu domainlerde çeşitli katalitik aktiviteye sahiptir (Mootz ve ark. 1999, Stachelhaus ve ark. 1999). Tipik bir

modül yaklaşık 1000 aminoasitten oluşmaktadır (Morris 1996, Stein ve ark 1996). Bir modül peptid sentezi sırasında substrat seçiminden peptid bağı oluşumuna kadar gerçekleşen reaksiyonlardan sorumludur. Bu reaksiyonlar; seçilen substratın tanınması, substratın aktivasyonu, aktive olmuş substratın tiyoester oluşturması ve sonrasında peptid bağının oluşmasıdır. Gerçekleşen reaksiyonlar, özelleşmiş domainlerin uyumlu koordinasyonu sonucu meydana gelmektedir (Weber ve Marahiel 2001).



Şekil 2.3. Gen-Modül, Modül-Domain ilişkisi (Finking ve Marahiel 2004).

Bir minimal uzama modülü; substratı seçen ve ATP hidrolizi ile substratın aktivasyonunu gerçekleştiren 55 kDa moleküler ağırlıktaki adenilasyon domaininden (A domaini) (Turgay ve ark. 1992, Stachelhaus ve ark. 1995), tiyoester oluşturan 10 kDa moleküler ağırlıktaki peptidil taşıyıcı protein domaininden (PCP domaini) (Stachelhaus ve ark.1996) ve kondensasyonu (substrat ekleyerek peptid bağının oluşumu) gerçekleştiren 50 kDa ağırlıktaki kondensasyon domaininden (C domaini) oluşmaktadır. C domaini peptid bağı oluşumunu katalizlemektedir. Bunun sonucunda zincir uzaması gerçekleşir. Bu modüllere ek olarak epimerizasyon, N-metilasyon ve heterosiklik modifikasyonu sağlayan domainler de modüller içerisinde yer almaktadır (Konz ve Marahiel 1999). Bu modifikasyonlar sentezlenecek olan ürünlerin çeşitliliğine katkı sağlamaktadır.



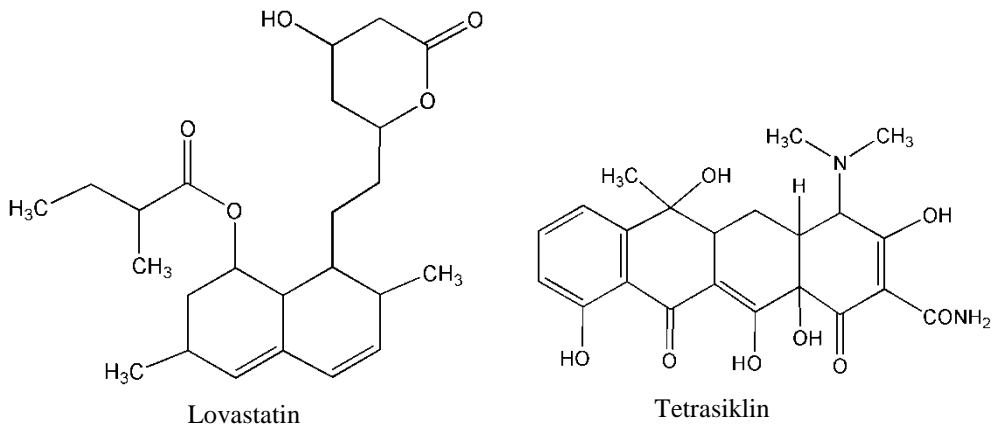
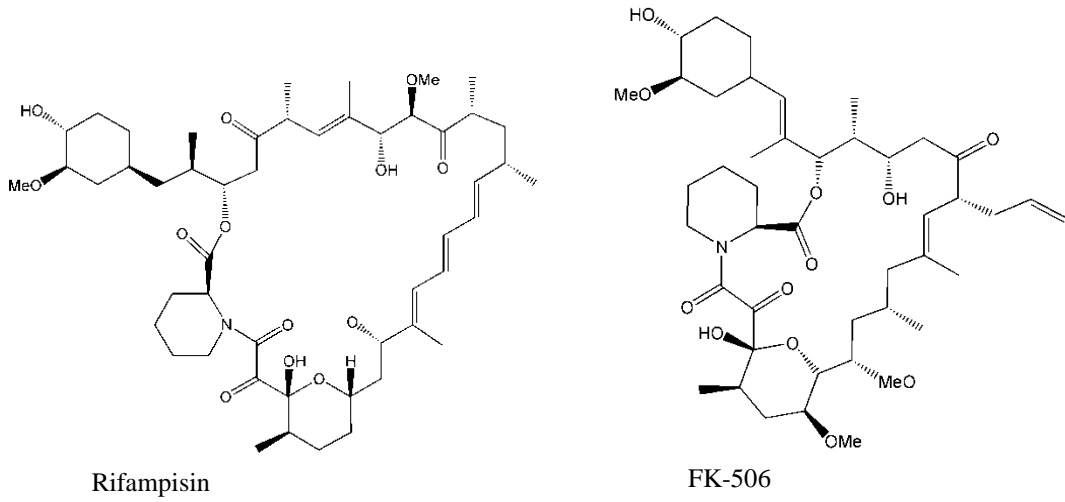
Şekil 2.4. NRPS enzim sisteminin mekanizmasının gösterimi. 1- A domaini tarafından aminoasitin aktivasyonu. 2- Aminoasitin PCP'ye aktarılması. 3- PCP'ye aminoasit eklenmesi. 4- Aminoasit modifikasyonu; örneğin, epimerizasyon domaini tarafından modifiye edilmesi. 5- Terminal PCP domainin peptid bağı esterifikasyonla taşıması. 6- Oluşan ürünün TE domaini tarafından hidroliz ile salınması (Current Opinion in Structural Biology 2010, 20:234–240).

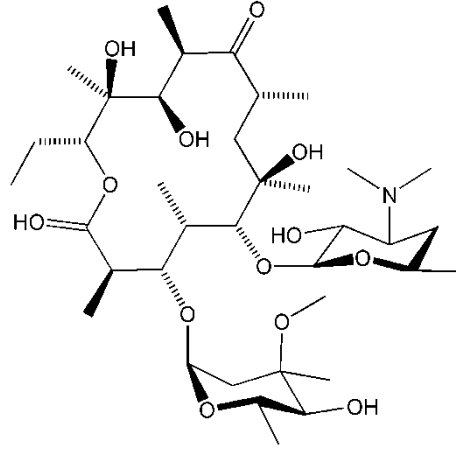
2.1.5. Poliketidler (PK)

Poliketidler; biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Bitkiler, funguslar ve bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Poliketidler; sekonder metabolitler içerisinde yapısal çeşitliliğe (makrolidler, polieterler, aromatik bileşikler) sahiptir ve önemli farmakolojik aktiviteye sahip molekülleri kapsayan geniş bir grubu temsil etmektedir (Hopwood 1997, Komaki ve ark 2009). Poliketidler; antibakteriyel (rifampisin), antifungal

(eritromisin), kolesterol düşürücü aktivite (lovastin), immünbaskılayıcı (FK506) ve antitümör (deksorubisin) özellik gösteren önemli doğal ürünlerdir (Strohl ve ark 1997) (şekil 2.5). Açıl CoA öncüllerinin kullanılmasıyla poliketid sentazlar (PKS) tarafından sentezlenirler.

Poliketidler farmakolojik endüstride çok önemli ekonomik değere sahip ilaç grubunu oluşturmaktadır. Poliketid yapısındaki ilaçların yıllık piyasa değerleri 15 milyar doları aşmaktadır (Borchardt 1999).





Eritromisin

Şekil 2.5. Klinik Uygulamalarda kullanılan poliketidler.

2.1.5.1. Poliketid Sentetazlar (PKS)

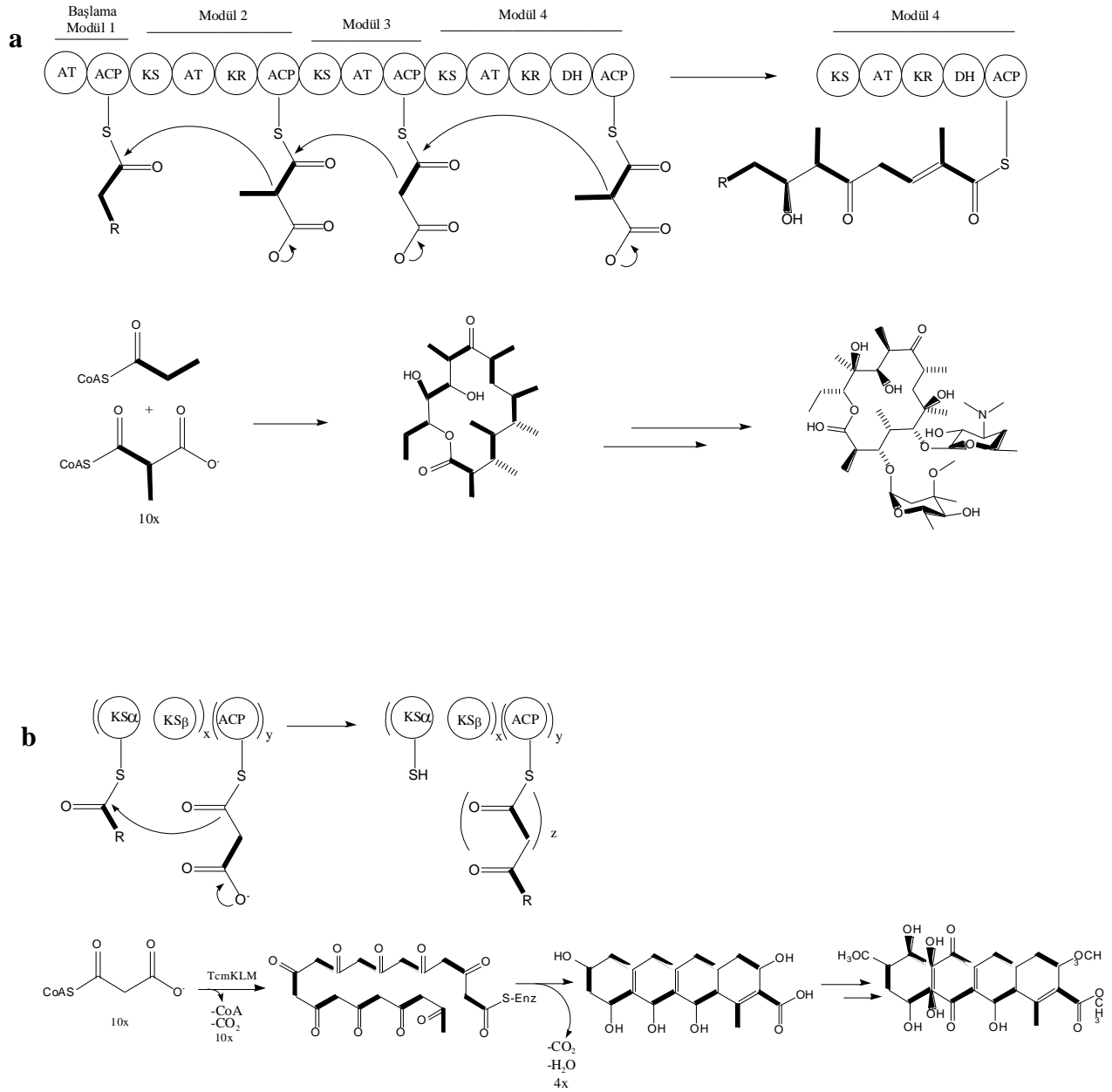
Bakteriyel PKS-I'lerle ilgili ilk bilgiler 1990'da (Cortes ve ark. 1990, Donadio ve ark. 1991), PKS II'lerle ilgili bilgiler 1984'te (Malpartida ve Hopwood 1984, Motamedi ve Hutchinson 1987), PKS-III'lerle ilgili bilgiler ise 1999'da (Funa ve ark. 1999) elde edilmiştir. PKS paradigması için bilim dünyası tarafından ilk elde edilen bilgilerden bugüne, PKS'lerin doğal ürün sentezleme kapasitelerini, geniş yapısal çeşitliliklerini ortaya çıkarabilmek için çalışmaktadır. Poliketid doğal ürünlerden yola çıkılarak doğal olmayan (sentetik) bileşiklerin kombinatoriyal biyosentezi gerçekleştirilmiştir. Bu da biyoteknolojik açıdan PKS'lerin işlenebilirliğini ortaya çıkarmıştır (Shen 2003).

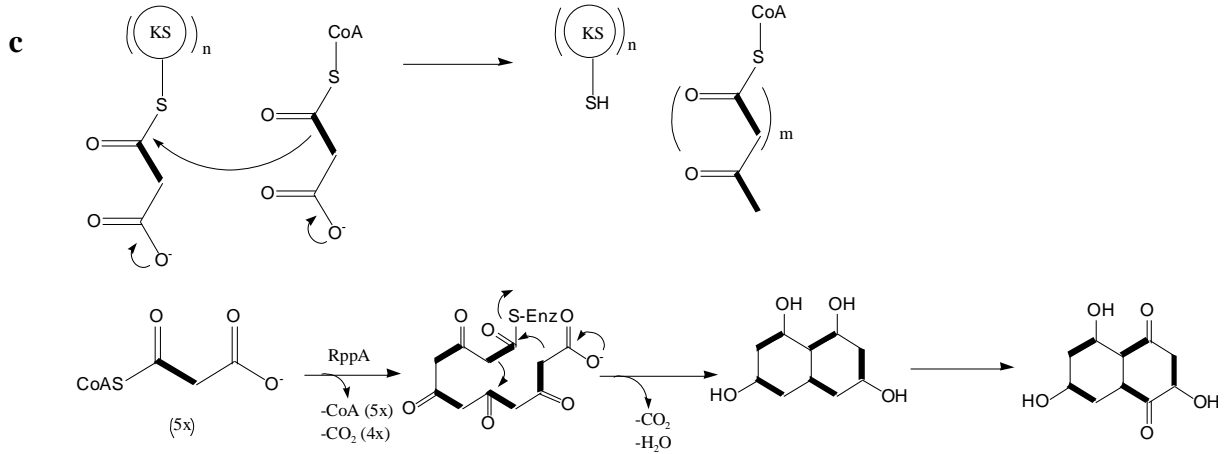
NRPS genlerine analog olan PKS genleri de 'temel' ve 'yardımcı' katalitik domainleri içeren modüllerden oluşmuşlardır. PKS modüllerinin temel organizasyonu domain sırasına göre; ketosentaz (KS) domaini, açıl transferaz (AT) domaini ve açıl taşıyıcı protein (ACP) domaininden oluşmaktadır. NRPS'lerde olduğu gibi, final PKS modülünde ürün sentezi bir tıyoesteraz (T) domaini ile sonlanır. Bilinen yardımcı PKS domainleri; ketoredüktaz, dehidrataz, metiltransferaz ve enolredüktaz domainleridir. Bütün bu domainler yeni bir poliketid zincirinin programlanmış sentezinde gereklidirler. Uzayan herbir karbon ünitesinin substrat spesifitesi AT domaini tarafından tanımlanır ki burada açıl transferazların iki temel grubu olan, malonil-CoA transferaz ve metil-malonil-transferazlar, DNA dizilimi düzeyinde açıkça ayırt edilebilir. (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005). Global ölçekte büyük sıklıkta kullanılan antibiyotiklerin bir

çoğu (örneğin; Eritromisin A) PKS'ler tarafından üretilmektedir (Ehrenreich ve ark. 2005).

Bilinen bakteriyel poliketidlerden; PKS-I'ler çok fonksiyonlu enzimler olup, modüller şeklinde organize olmuşlardır. Modüllerden her biri tekrarlı (iterative) olmayan aktiviteye sahip olup bir poliketid zincir uzamasından sorumludur. Şekil 2.6.'da (a) gösterilen, 6-deoksieritromisin B sentaz (DEBS) tarafından gerçekleştirilen indirgenmiş poliketid (yani makrolidler, polieterler ve polienler) sentezinde yani eritromisin A sentezinde olduğu gibi zincir uzamasından sorumludur (Staunton ve Weissman, 2001). PKS-II siklik multienzim kompleksleri olup tipik olarak aromatik antibiyotiklerin biyosentezinde rol alırlar. Şekil 2.6.'da (b) gösterilen tetrasenomisin C örneğinde olduğu gibi aromatik PK biyosentezinde rol alırlar (Shen 2000). PKS-III ise homodimerik kondensasyon enzimleri olup müstesna flavonoid ve kalkon (chalcone) bileşiklerinin sentezinden sorumludurlar. Şekil 2.6.'da (c) gösterilen RppA sentaz tarafından aromatik poliketidlerin (monosiklik ve bisiklik) sentezlenmesinde yani flavolin sentezinde olduğu gibi işleve sahiptir (Moore ve Hopke, 2001). PKS-I ve PKS-II'de açıl taşıyıcı proteinin görevi (ACP), açıl CoA substratlarını aktive etmek ve bağlanacak olan üniteleri poliketid zincirlerine eklemek iken, PKS-III'de ise bu reaksiyonlar ACP'den bağımsız olup açıl CoA substratları üzerinden etkisini gösterir. PKS tiplerinde poliketid biyosentezinde yapısal ve mekanistik farklılıklar olmasına rağmen açıl CoA öncüllerinin sıralı dekarboksilatif kondensasyonu ve ketoaçıl sentaz (KS) domaini (PKS-I için) ya da alt üniteler (PKS-II ve PKS-III için) C-C bağ oluşumu aşamasını katalizlemektedir (Shen 2003).

2. KAYNAK ÖZETLERİ





Şekil 2.6. Bakteriyel poliketidlerin yapısı ve mekanizması. (a) PKS-I domainlerden oluşumu ve DEBS'in eritromisindeki rolü (b) PKS-II alt üniteleri gösterilmiş ve tetrasenomisinde rol alan TemKLM (c) ACP bağımsız PKS-III

Poliketid biyosentezinin araştırmacılar tarafından ilgi odağı haline gelmesinin nedenlerini, 3 ana başlık altında toplamak mümkündür. Birincisi; poliketidlerin eşsiz biyolojik aktiviteye sahip olması ve yeni ilaç adayları olmalarından dolayı önemli oranda ticari değere sahip olmalarındandır. İkincisi; PKS'lerin sıradışı yapıları, mekanizmaları ve katalitik aktivitelerinden dolayı protein-protein etkileşimleri, moleküler tanıma ve enzim katalizinin moleküler mekanizmasının araştırılmasında önemli fırsatlar sunmaktadır. Üçüncüsü; kombinatoriyal biyosentezle elde edilemeyecek bileşiklerin, yani, yeni bileşiklerin elde edilmesinde PKS'lerin çok yönlülüklerinden yararlanılmasıdır (Shen 2003).

2.2. Önceki Çalışmalar

Metsa-Ketala ve ark. (1999) topraktan izole ettikleri aktinomiset türlerinden ve poliketid üreticisi oldukları bilinen *Streptomyces*'lerden PKS-II gen kümesinin korunmuş ketosentaz domainini (KS α) hedef alarak dizayn ettikleri primerler aracılığıyla genomda bu genin varlığını tespit etmek için PCR ile tarama yapmışlardır. Sonuç olarak topraktan izole edilen 29 türden 22'sinde amplifikasyon elde etmişlerdir. Amplifiye edilen fragmentler klonlanıp sekans analizleri yapılmıştır. Aminoasit dizilimlerinin şimdiye kadar bulunmuş PKS-II genleriyle karşılaştırılması sonucunda % 60 ile % 99 arasında akrabalık tespit edilmiştir.

Metsa-Ketala (2002) topraktan izole edilen 99 aktinomiset türünde PKS-II geninin KS α domaini primerler kullanılarak PCR ile taranmıştır. 87 örnekte amplifikasyon elde edilmiş ve bunlardan 17 KS α domainin daha önce bildirilen PKS -II genleriyle yüksek homoloji gösterdiği belirtilmiştir. Geri kalanının ise yeni PKS-II gen kümesi olabileceği öne sürülmüştür.

Ayuso-Sacido ve Genilloud 2004 yılında yapılan bir çalışmada, araştırmacılar aktinomistlerde NRPS ve PKS-I genlerini amplifiye etmek için spesifik primerler dizayn etmişler ve PCR'a dayalı tarama yöntemi ile taradıkları 210 türün % 79.9' unda NRPS ve % 56.7' sinde ise PKS-I genlerinden amplifikasyon elde edilmiştir.

Gonzalez ve arkadaşlarının (2005) likenlerden izole ettikleri aktinomisetlerin biyosentetik gen kümelerini ortaya çıkarmayı amaçladıkları çalışmalarında araştırmacılar PKS-I, PKS-II ve NRPS genlerini dejenere PCR primerleriyle taramışlardır. İzolatların; % 62.6'sında PKS-I, % 64.7'sinde PKS-II ve % 58.5'inde NRPS biyosentetik genlerini amplifiye etmişlerdir. Kullandıkları aktinomiset cinsleri arasında, PKS-I amplifikasyonu açısından en yüksek değer (% 70) *Streptomyces* cinsinin üyelerine aittir. Bu rakamlara rağmen, klasik kültür koşullarında tüm izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri % 27 olarak tespit edilmiştir.

Ehrenreich ve ark. (2005) deniz ve tatlı sulardan izole edilen 24 siyonabakteri türünün NRPS ve PKS-I genlerinin potansiyellerini ortaya çıkarmak amacıyla dizayn edilen primerlerle sırasıyla NRPS geninin A domaini ve PKS-I geninin KS domainini PCR ile taramışlardır. Bakterilerin 13'ünde NRPS geninin A domaini ve 22'sinde PKS-I geninin KS domaini amplifiye edilmiştir.

Wawrik ve ark. (2005) New Jersey' de (ABD) farklı toprak örneklerinden toplanan 21 aktinomiset türünün PKS-II geninin korunmuş KS α domaini primerler aracılığıyla PCR ile taranmıştır. Tüm türler içerisinde yapılan analizler ışığında yedi yeni KS α geni tespit etmişlerdir. Ayrıca diğer örneklerin bilinen KS α genleriyle % 74 ile % 81 arasında homoloji gösterdiği rapor edilmiştir.

Pathom-aree ve ark. (2005) deniz aktinomisetlerinin çeşitliliği ve biyosentetik sekonder metabolitlerinin tarandığı bir çalışmada, incelenen 38 aktinomisetten % 70' inde NRPS ve % 13' ünde PKS-I genleri tespit edilmiştir. Tek bir izolatta (*Micromonospora* türünde) ise PKS-II genine rastlanmıştır. Araştırmacılar, çok az çalışılmış sıradışı habitatların sekonder metabolit sentezleme yeteneği olan türler açısından zengin kaynaklar olabileceğini bildirmişlerdir.

Savic ve Vasilevic (2006) aktinomisetlerin PKS-I genlerini hedef almak için dizayn edilen dejenere primerler yardımıyla tespit edilen iki yeni PKS geninin, immünbaskılayıcı benzeri bir metabolitin biyosentezinde görevli olduğu bulunmuştur. Üretilen bileşiklerin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile incelenmesi sonucu, bu bileşiklerin, ticari olarak kullanılan immünbaskılayıcılar olan FK506, FK520 ve rapamisin ile kıyasandığında farklı özellikte bileşikler olduğu bulunmuştur.

Barrios ve ark. (2007) 21 yeni siyanobakteri türünde sekonder metabolitlerle ilgili genleri tespit etmek amacıyla PCR ile tarama yapmışlardır. 18'inde NRPS ve 19'unda PKS-I genlerinin varlığını tespit etmişlerdir. Amplikonlar klonlanarak sekans analizi yapılmıştır. Amplikonların BLAST sonuçlarına göre çoğaltılan genlerin bilinen siyanobakteri doğal ürünleriyle benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Jiang ve ark. (2007) Güney Çin Denizinde bulunan *Haliclona* sp. süngerinden izole edilen 54 bakteri türünden 24'ü PKS-I, PKS-II ve NRPS genleri için üç ayrı dejenere primer kullanılarak PCR ile taranmıştır. Örneklerin % 54' ünde PKS-I, % 71' inde PKS-II ve % 92' sinde NRPS amplifikasyonu elde edilmiştir.

Jiang ve ark. (2007) Güney Çin Denizinde bulunan *Iotrochota* sp. süngerinden elde edilen 30 aktinomiset türünde NRPS, PKS-I ve PKS-II genleri üç primer çifti aracılığıyla PCR dayalı olarak taranmıştır. Türlerin % 80 'inde PKS-I, % 73' ünde PKS-II ve % 87' sinde NRPS genlerine ait ürünler elde edilmiştir.

Komaki ve ark. (2008) Myxobakterilerde PKS-I gen kümesinin ketosentaz (KS) ve açıl tranferaz (AT) domainleri PCR ile taranmıştır. Amplikonlar klonlanmış, elde edilen sekanslar BLAST programında incelenmiştir. Sekans sonuçlarını aminoasit benzerlik oranlarına göre iki grupta toplayan araştırmacılar, % 70' in üstünde homoloji gösterenlerin daha önceden bulunan genler, % 70' in altında homoloji gösterenlerin ise yeni genler olabileceğini önceki çalışmalarına dayanarak öne sürmüşlerdir.

Zhang ve ark. (2008) Güney Çin Denizindeki süngerlerden izole edilen 109 bakteri, NRPS gen kümesinin korunmuş A domainini PCR ile taramışlardır. 15 bakteride amplifikasyon gözlemleyip rapor etmişlerdir. Klonlanıp sekans analizi yapılan organizmalar BLAST programında incelenmiş ve 15'ten 11'inin şimdiye kadar bulunmuş genlerle % 70' in altında homoloji gösterdiği belirtilmiştir.

Zhang ve ark. (2008) deniz süngerlerinden izole edilen, aktinomisetlerinde aralarında bulunduğu 98 bakteri türünde PKS-I genini PCR yöntemiyle tarandığı bir çalışmada izolatların 18'inde PKS-I geninin varlığını KS domainini çoğaltarak tespit etmişlerdir. Amino asit dizilimine göre yapılan BLAST analizlerinde 18 izolattan 12'sinin *Bacillus* türlerinde elde edilen PKS-I genleriyle % 97 homoloji gösterdikleri rapor edilmiştir.

Komaki ve ark. (2009) *S. bicolor* 12746^T'den tespit ettikleri bir PKS-I gen dizilimini referans alarak, bu genin pimarisine benzer bir polien bileşik üretiminde görevli olabileceğini öngörmüşlerdir. Bu bakteriyi kültüre ettikleri örneklerde polien bileşik taramaları yaparak, bakterinin antifungal bir bileşik ürettiğini bunun da “tetraen makrolid” olduğunu UV spektrumları ile tespit etmişlerdir. Saflaştırılan bileşiğin spektroskopik analizlere dayalı yapı aydınlatma çalışmaları sonucunda yeni bir pimarisin analogu olan JBIR-13 bileşiğini bulmuşlardır. Çalışmalarının bulgularından yola çıkarak, PKS genlerinin (özellikle PKS-I), yeni biyoaktif bileşik araştırmalarında değerli bilgiler sağladığı sonucuna varmışlardır ().

Zhao ve ark. (2009) sedimentlerden izole ettikleri 3 aktinomisetin PKS-I genini taradıkları çalışmada 3 izolatta da amplifikasyon elde etmişlerdir. Amplifiye edilen türlerden birinde merdiamisin biyosentezinden sorumlu gen kümesinin KS domaini ile yüksek homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Myronovskyy ve ark. (2009) *S. sioyaensis*'de dejenere primerler kullanılarak NRPS geninin adenilasyon domaininin amplifiye edildiği çalışmada; amplikonların sekans analizlerinin yapılması sonucunda dokuz farklı A domaini tespit edilmiştir.

Janso ve Carter (2010) tropikal bitkilerden izole edilen 123 endofitik bakteriden 29'unun; NRPS, PKS-I ve PKS-II gen kümelerinin primerler aracılığıyla PCR dayalı yapılan çalışmalarında; örneklerin % 66 'sında PKS-I, % 79' unda PKS-II ve % 100' ünde NRPS gen kümelerinin varlığı rapor edilmiştir.

Schneemann ve ark. (2010) Almanya'da bulunan Baltık Denizinden toplanan süngerlerden izole edilen 46 aktinobakteri türünde NRPS ve PKS-II geni moleküler olarak taranmıştır. Araştırmacıların analizleri sonucu 46 türün 24 (% 52)' ünde NRPS ve 13 (% 28)' ünde PKS-II ürünü elde edilmiştir. Bu türlerin 16'sında NRPS ve PKS-II geni tespit edilememiştir. NRPS ve PKS-II amplikonlarının şimdiye kadar bulunmuş olan genlerle karşılaştırılması sonucunda, sırasıyla; % 40 - % 96 arasında ve % 47 - % 100 arasında homoloji gösterdiğini belirtmişlerdir.

Zhao ve ark. (2011) Güney Çin Denizinde 10 sünger türünden elde edilen 177 fungusta PKS-I gen kümesinin korunmuş KS domainini ve NRPS gen kümesinin korunmuş A domainini primerler aracılığıyla PCR taraması yapmışlardır. 15 türde PKS ve 4 türde NRPS gen kümesinin varlığını tespit etmişlerdir.

Xin ve ark. (2011) Antartikteki derin deniz süngerlerinden izole edilen 46 bakterinin genomları PKS-I ve PKS-II gen kümelerinin potansiyellerini ortaya çıkarmak için PCR ile taranmıştır. Örneklerin % 70'inde PKS-I ve % 85' inde PKS-II gen kümeleri tespit edilmiştir.

Silva-Stenico ve ark. (2011) tatlı sulardan ve topraktan izole edilen 24 siyanobakterinin NRPS ve PKS-I genlerini PCR ile taradığı çalışmada; 24 siyanobakteriden % 92' sinde NRPS ve % 80' inde PKS-I gen kümelerinin varlığı rapor edilmiştir.

3.1 MATERYAL

3.1.1 Biyolojik Materyal

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin daha önce izolasyonları ve moleküler teşhisleri yapılmış, aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark. 2008).

Bu izolatlar; *Streptomyces* sp. AA59, *Streptomyces* sp. AAH67, *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. AR17, *Streptomyces* sp. AS29, *Streptomyces* sp. AS37, *Streptomyces* sp. BA1, *Streptomyces* sp. BA12, *Streptomyces* sp. BAH28, *Streptomyces* sp. BS32, *Streptomyces* sp. BSH50, *Streptomyces* sp. CA13, *Streptomyces* sp. CA18, *Streptomyces* sp. CA28, *Streptomyces* sp. CS42'dir.

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kloroform (Riedel-de Haen), isoamilalkol (Sigma Aldrich), fenol kloroform isoamilalkol (25:24:1) (Sigma), ethylenediaminotetraacetic asit (EDTA) (AppliChem), tris-baz (AppliChem), gliserol (Merck), agaroz (AppliChem), asetik asit (Sigma aldrich), sodyum asetat, etidyum bromür (AppliChem), brom fenol blue (Fermentase), n-n dimetilformamid (DMF), 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Roche), isopropil- β -D-thiogalactoside (IPTG) (Roche), ampisilin (Roche), kalsiyum klorür (Merck), magnezyum klorür, sodium dodecyl sulfat (SDS) (Merck), glisin (Sigma), etil alkol (Sigma Aldrich), maya özütü (Oxoid), glukoz (Merck), tripton (Difco), agar (Labosis), sükröz (Merck), malt özütü (Merck), sodyum asetat, DNA marker (Roche),

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

TSE (Tris-HCl Sükröz EDTA)

Final konsantrasyonları; Tris HCl 25 mM (pH 8.0), sükröz 0.3 M, EDTA 25 mM (pH 8.0) olacak şekilde hazırlandı.

TAE, 50x (Tris-Asetik Asit-EDTA)

Final konsantrasyonu 0.05 M EDTA (pH=8), % 5.71 asetik asit, 242 g tris baz

olacak şekilde saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

IPTG (Isopropil- β -D-thiogalactoside)

23.83 mg maddenin 1ml saf suda çözülmesiyle 100 mM'lık stok çözelti hazırlandı. Çözelti por çapı 0.2 μ m olan filtre yardımıyla steril edildi ve -20 °C'de saklandı.

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)

Stok çözelti 100 mg X-Gal/2 ml N-N-Dimetilformamid (DMF) olarak hazırlandı. Çözelti por çapı 0.2 μ m olan filtre yardımıyla steril edildi ve -20 °C'de saklandı.

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Triptik Soya Broth (TSB, Oxoid); 30 g TSB tartılarak saf su ile hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bakterilerin DNA izolasyonu için üretimde kullanıldı.

Maya özütü-Malt özütü (YEME) besiyeri; 3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g baktopepton, 10 g glukoz, 340 g sukroz tartıldı ve hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrasında filtre ile steril edilmiş 2,5 M magnezyum klorürden ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 2 ml ve % 20'lik glisinden de 25 ml eklenerek hazırlandı. DNA izolasyonu için kullanıldı.

M2 besiyeri; 10 g malt özütü, 4 g maya özütü ve 3 g glukoz, tartılarak hacmi çeşme suyu ile 1 L'ye tamamlandı ve steril edildi. Katı M2 hazırlamak için sıvı M2 besiyerine 15 g agar eklendikten sonra otoklavda steril edildi. Organizmaların üretimi ve stoklarının hazırlanması için kullanıldı.

Lurient Broth (LB) ; 5 g maya özütü, 10 g tripton, 5 g sodyum klorür tartılarak hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi. Hazırlanan 1 L LB besiyerine 15 g agar eklendi ve otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrasında soğutulmaya bırakılan besiyeri yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra final konsantrasyonu 100 μ l/ml olacak şekilde ampisilin eklendi ve petriye döküldü. Transformatların seçimi için kullanıldı.

Tüm besiyerleri 121 °C'de 15 dakika 1,2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

3.1.5. Kullanılan Enzimler

Taq polimeraz (Roche ve Fermentas), RNaz (Fermentas), Lizozim (Roche) enzimleri kullanıldı.

3.1.6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR)

NRPS geni A domaininin PCR ile amplifikasyonu için A domainini hedef alan ileri; A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') ve geri; A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'), (S:G+C, Y:C+T, V:G+A+C), primerleri (Ayuso ve Genniloud 2005), İontek (İstanbul) şirketine sentezletirildi. Bu primerlerin hedef aldığı bölge yaklaşık olarak 700 bp uzunluğundadır.

Tip I PKS geni KS domaininin PCR ile çoğaltılması için KS domainini hedef alan, ileri; K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'), ve geri; M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'), (S:G+C, B: G+T+C) primerleri (Ayuso ve Genniloud 2005), İontek (İstanbul) şirketine sentezletirildi. Bu primer çiftlerinin hedef aldığı bölge ortalama 1200-1400 bp uzunluğundadır.

3.1.7. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

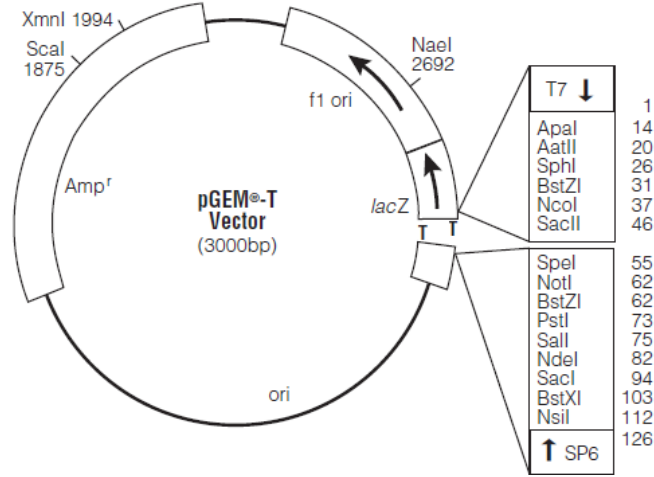
PCR ürünlerini jelden geri kazanmak için MiniElute Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagene) ve Jel Elusyon Kiti (GeneMark) kullanıldı.

3.1.8. PCR Ürünlerinin Klonlanması

pGEM-T (Şekil 3.1.) klonlama Kiti Promega şirketinden temin edildi.

3.1.9. Plazmit İzolasyonu

Bakterilerden plazmit izolasyonu için Plazmit Mini Kit (Omega Bio-Tek) ve Plazmit Mini İzolasyon (GeneMark) kitleri kullanıldı.



Şekil 3.1. pGEM-T plazmit haritası

3.1.10. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama)

Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)

PCR Cihazı (Ependorf)

Elektroforez (Scie-Plas)

Hassas Tartı (GEC Avery)

pH Metre (Mettler MP220)

Etüv (Heraeus)

Sterilizatör (Heraeus)

Derin Dondurucu (Ugur)

Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad)

Laminar Kabin (Telstar AV 100)

Orbital Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B)

Mini Santrifüj (E.S-6)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Vorteks (VWR)

Güç kaynağı (Bio-Rad)

+4 °C dolap (Sanyo)

28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)

Su banyosu (Grant LTD 66)

3.2. Metod

Bu çalışmada kullanılan 15 *Streptomyces* türü 3 farklı bitkinin kök çevresi topraklarından izole edilmiş ve moleküler teşhisleri yapılmıştır (Yılmaz ve ark. 2008). İzolatlar morfolojik görünümünün incelenmesi, stok yapılması ve taze kültürlerinin hazırlanması amacıyla M2 besiyerinde üretildi. TSB (Triptik Soya Broth)'de üretilen izolatlar, içerisinde % 20 gliserol olacak şekilde stok yapıldı.

3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzolatlar % 0.5 maltoz eklenmiş TSB besiyerinde orbital çalkalamalı inkübatörde 230 rpm'de, 28 °C'de 48 saat üretildi. TSB'de üreyen kültürün 2 ml'si 2:3 oranında TSB-YEME içeren 50 ml sıvı besiyerine aktarılıp orbital çalkalamalı inkübatörde 28°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1,5 ml'lik ependorf tüplere kültür örneği alınıp, mikrofüjde 2 dk maksimum rpm'de santrifüjlendi. Pelet kısmı izolasyon için kullanıldı. Pelet iki kez % 10.3 sükroz çözeltisi ile yıkandıktan sonra 6 mg/ml lizozim ve 75 µg/ml RNaz içeren 500 µl TSE tamponunda çözüldü. 37 °C'de 45 dk inkübasyondan sonra, 300 µl % 2 SDS eklenerek 20 sn vortekslendi. İlk olarak fenol:kloroform:izoamiloalkol (25:24:1) ve sonrasında da kloroform:izoamiloalkol (24:1) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası 10 dk maksimum rpm'de santrifüjleme ile supernatant kısmı alındı. Üst faz temizleninceye kadar ekstraksiyona devam edildi. Sonuç olarak temiz üst faz alınarak 3 M sodium asetat (pH 5.2) ve mutlak etanol eklenmesiyle DNA'nın çökmesi için -20°C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 16000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde alındıktan sonra peletin üzerine % 70'lik etanol ilave edildi. Pelet çözüldükten sonra 10 dk maksimum rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice döküldükten sonra pelet etüvde 37 °C'de kurutuldu. Kromozomal DNA'nın tamamen çözülmesi için pelete uygun miktarda saf su eklenerek 37°C'de bir gece inkübe edildi.

3.2.2. PCR

3.2.2.1. NRPS Geninin Adenilasyon (A) Domainin PCR ile Çoğaltılması

İzolasyonu yapılmış genomik DNA'lar agaroz jelde incelendikten sonra kalıp olarak kullanıldı. İleri A3F ve geri A7R primerleri kullanılarak A domaininin çoğaltılması hedeflendi. Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) kullanılarak yapılan PCR

reaksiyonu için standart koşullar; kromozomal DNA 100 ng, her bir primer 0.4 μ M, nükleotid karışımı 0.2 μ M, Taq polimeraz 1 U, tampon % 10 ve $MgCl_2$ 2 mM olarak kullanıldı final hacim distile su ile 50 μ l'ye tamamlandı. Termal döngü; 95 °C 5 dk (başlangıç denatürasyonu, 1 döngü) ve daha sonrasında 95 °C 30 sn, 59 °C 2 dk, 72 °C 4 dk olarak 35 döngü uygulandı. Final polimerizasyon 72 °C 10 dk 1 döngü yapıldı.

Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu için standart koşullar; kromozomal DNA 100 ng, her bir primer 0.4 μ M, nükleotid karışımı 0.2 μ M, Taq polimeraz 1 U, tampon % 10, GC tamponu % 10 ve $MgCl_2$ 2 mM olarak kullanıldı final hacim steril distile su ile 50 μ l'ye tamamlandı. Termal döngü; 95 °C 5 dk (başlangıç denatürasyonu, 1 döngü) ve daha sonrasında 95 °C 30 sn, 59 °C 2 dk, 72 °C 4 dk olarak 35 döngü uygulandı. Final polimerizasyon 72 °C 10 dk 1 döngü yapıldı.

Standart koşullarda ürün elde edilemeyen organizmalarda, $MgCl_2$ konsantrasyonu, kalıp DNA konsantrasyonu, enzim miktarı ve termal döngü koşulları değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

3.2.2.2. PKS-I Geninin Ketosentaz Domainin (KS) PCR İle Amplifikasyonu

İzolasyonu yapılmış genomik DNA'lar agaroz jelde incelendikten sonra kalıp olarak kullanıldı. İleri K1F ve geri M6R primerleri kullanılarak KS domaini çoğaltılmaya çalışıldı. Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) için standart PCR reaksiyon koşulları; kromozomal DNA 100 ng, her bir primer 0.4 μ M, nükleotid karışım 0.2 μ M, Taq polimeraz 1 U, Tampon % 10, GC tamponu % 10 ve $MgCl_2$ 2 mM olarak kullanıldı final hacim steril distile su ile 50 μ l'ye tamamlandı.

Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) için standart PCR reaksiyon koşulları; kromozomal DNA 100 ng, her bir primer 0.4 μ M, nükleotid mix 0.2 μ M, Taq polimeraz 1 U, tampon % 10, GC tamponu % 10 ve $MgCl_2$ 1.5 mM olarak kullanıldı final hacim saf su ile 50 μ l'ye tamamlandı. Termal döngü; 95 °C 5 dk (başlangıç denatürasyonu, 1 döngü) ve daha sonrasında 95 °C 30 sn, 55 °C 2 dk, 72 °C 4 dk olarak 35 döngü uygulandı. 72 °C 10 dk 1 döngü yapıldı.

Standart koşullarda ürün elde edilemeyen organizmalarda, MgCl₂ konsantrasyonu, kalıp DNA konsantrasyonu, enzim miktarı ve termal döngü koşulları değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Saflaştırılmış genomik DNA'nın tespiti için % 0.7'lik, PCR ürünlerinin görüntülenmesi için ise % 1'lik agaroz jel hazırlandı. TAE tamponu ile hazırlanan agaroz jele % 1'lik etidyum bromürden 5 µl eklendi. DNA'ları jele yüklemek için 1:5 oranında BFB:PCR ürünü karışım yapılarak kuyucuklara yüklendi. DNA'ların yürümesi için güç kaynağından 90 voltluk akım verildi. Örnekler 45 dk. yürütüldü.

3.2.4. Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması

Büyükükleri NRPS için 700 bç, PKS-I için ise yaklaşık 1200-1400 bç büyüklüğünde olan PCR ürünleri agaroz jelden kesilerek alındı. Sonrasında ürünlerin jelden ekstraksiyonu yapıldı.

3.2.5. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

E. coli DH5- α , LB besiyerine ön inkübasyon için ekildi ve 250 rpm'de 37 °C'de orbital çalkalamalı inkübatörde bir gece üretildi. Üretilen kültürden 1ml alınarak taze LB besiyerine ekilerek 2 saat 250 rpm 37 °C'de üretildi. Kültürün optik dansitesi O.D₅₅₀= 0.3-0.4'e geldiği zaman santrifüj tüplerine alındı ve 10 dakika buzda bekletildi. 4000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine soğutulmuş 10 mM kalsiyum klorürden 5ml eklendi. 3000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı hücrelerin üzerine 2 ml 75 mM kalsiyum klorür eklendi. Homojen karışım elde ettikten sonra 192:108 oranında, kompetent hücre: % 50 oranında seyreltilmiş gliserol karıştırılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.6. Klonlama

3.2.6.1. Ligasyon

Ligasyon karışımının total hacimi 10 µl olacak şekilde; 5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl pGEM-T plazmit, 300-400 ng PCR ürünü ve 1 µl DNA ligaz enzimi

eklendi, hacim steril distile su ile tamamlanarak verimli bir ligasyon için bir gece 16 °C'de inkübe edildi.

3.2.6.2. Transformasyon

İnkübasyon süreleri dolan ligasyon ürünleri kompetent hücrelerle bir araya getirilerek 30 dakika buzda bekletildi, bu sürenin sonunda hücreler 70 saniye 42 °C'deki su banyosuna bırakıldı ve tekrar buza alınıp 5 dakika buzda bekletildi. Bütün bu işlemlerden sonra hücrelere 1 ml LB besi yeri ilave edildi ve 2 saat boyunca 150 rpm'de 37 °C'de orbital çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda önceden IPTG ve X-Gal yayılmış 100 µg/µl ampisilin içeren katı LB besiyerine yayma yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi.

3.2.6.3. Mavi Beyaz Koloni Seçimi

Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda beyaz renkli ampisiline dirençli pütatif rekombinant koloniler mavi renkli kolonilerden seçilerek ayrıldı.

3.2.6.4. Bakteriden Plazmit DNA'nın İzolasyonu

Ampisilin içeren LB besiyerlerine aktarılan beyaz koloniler orbital çalkalayıcı inkübatörde 230 rpm, 37°C'de bir gece üretildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürden 2 ml örnek alınarak 2 dakika 16000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Elde edilen peletlerden plazmid izolasyonları yapıldı.

3.2.7. DNA Dizilieme

Saflaştırılan rekombinant plazmitlerin içerdiği fragmentlerin DNA dizi analizi İontek şirketine (İstanbul) yaptırıldı. Dizilemede NRPS genleri için A3F, PKS-I genleri için ise K1F primerleri kullanıldı.

3.2.8. Biyoinformatik İncelemeler

NRPS ve PKS-I genlerinin sırasıyla adenilasyon ve ketosentaz domainlerinin sekansları NCBI web sitesinde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) farklı Blast programlarında incelendi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

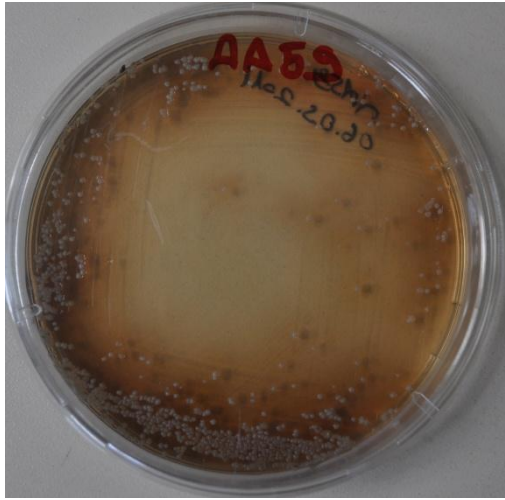
4.1. BULGULAR

4.1.1. Organizmaların Üretilmesi

Üç farklı endemik bitkinin kök çevresindeki topraktan izolasyonu ve moleküler teşhisi yapılmış (Yılmaz ve ark. 2008) 15 *Streptomyces* izolatu, M2 katı besiyerinde 28°C'de 5 gün üretildi. Organizmaların morfolojik özellikleri Çizelge 4.1. de ve katı besiyerindeki görünüşleri Şekil 4.2- 4.15'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Organizmaların morfolojik özellikleri.

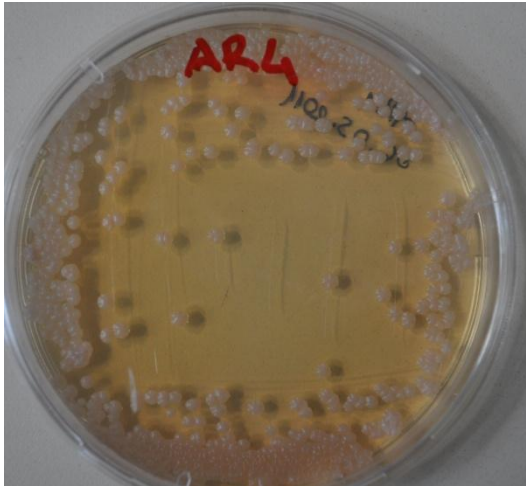
Organizma	Koloni yapısı	Substrat miseli rengi	Difüzlenebilir Pigment	Hava miseli rengi
<i>Streptomyces</i> sp AA59	Dairemsi	Krem	Kahverengi	Makroskobik olarak gözlenemedi
<i>Streptomyces</i> sp AAH67	Dairemsi	Krem	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp AR4	Dairemsi	Kahverengi	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp AR17	Dairemsi	Krem	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp AS29	Dairemsi	Krem	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp AS37	Pürtüklü	Krem	Yok	Krem
<i>Streptomyces</i> sp BA1	Dairemsi	Turuncu	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp BA12	Dairemsi	Mor	Yok	Gri
<i>Streptomyces</i> sp BAH28	Dairemsi	Krem	Yok	Beyaz
<i>Streptomyces</i> sp BS32	Kadifemsi	Krem	Yok	Gri
<i>Streptomyces</i> sp BSH50	Dairemsi-kubbemsi	Kahverengi	Açık kahverengi	Gri
<i>Streptomyces</i> sp CA13	Dairemsi	Kahverengi	Açık kahverengi	Gri
<i>Streptomyces</i> sp CA18	Dairemsi	Kahverengi	Yok	Koyu kahverengi
<i>Streptomyces</i> sp CA28	Likenimsi	Kahverengi	Kahverengi	Makroskobik olarak gözlenemedi
<i>Streptomyces</i> sp CS42	Dairemsi	Krem	Açık kahverengi	Beyaz



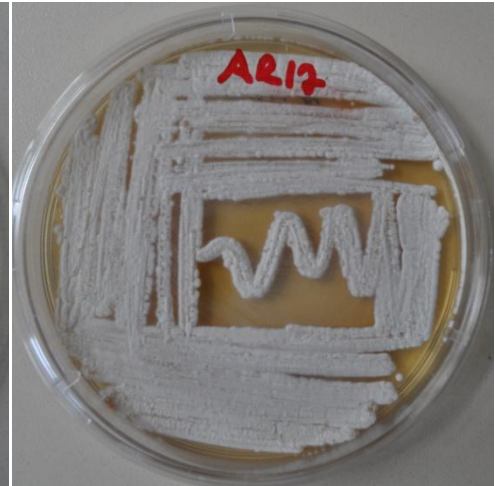
Şekil 4.2. *Streptomyces* sp. AA59



Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. AAH67



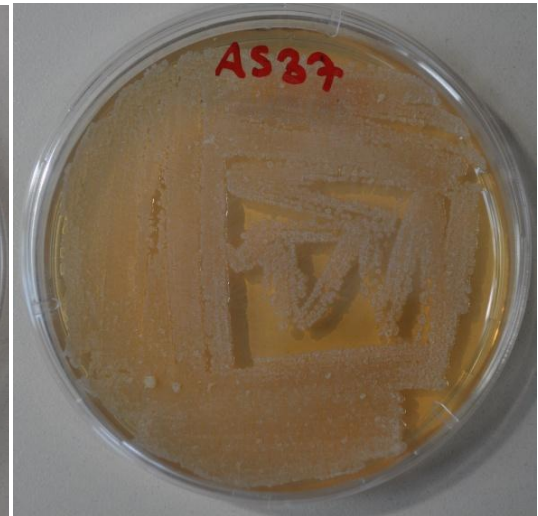
Şekil 4.4. *Streptomyces* sp. AR4



Şekil 4.5. *Streptomyces* sp. AR17



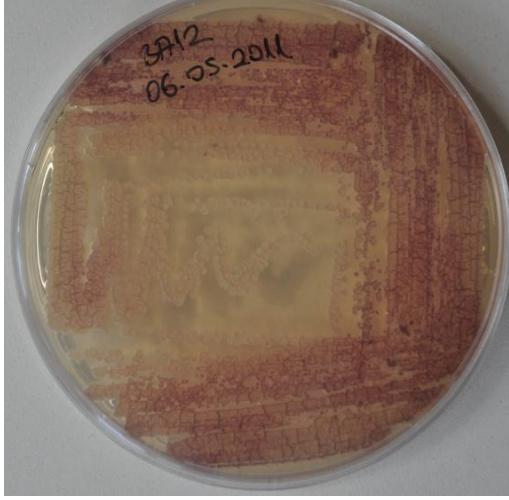
Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. AS29



Şekil 4.7. *Streptomyces* sp. AS37



Şekil 4.8. *Streptomyces* sp. BA1



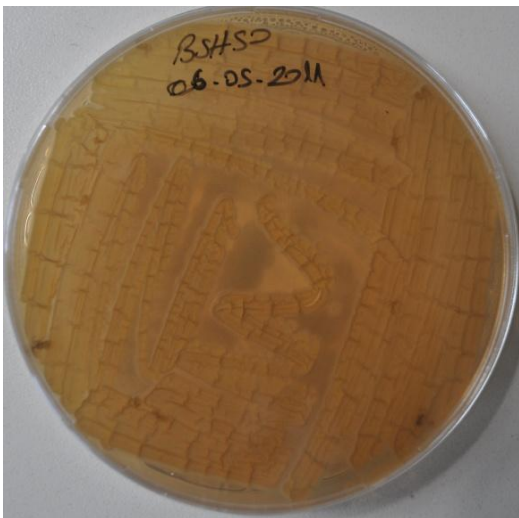
Şekil 4.9. *Streptomyces* sp. BA12



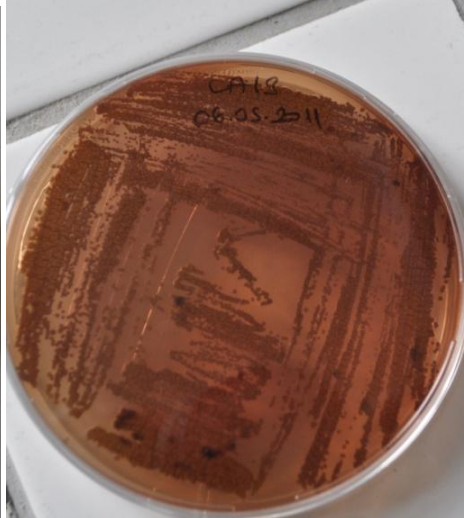
Şekil 4.10. *Streptomyces* sp. BAH28



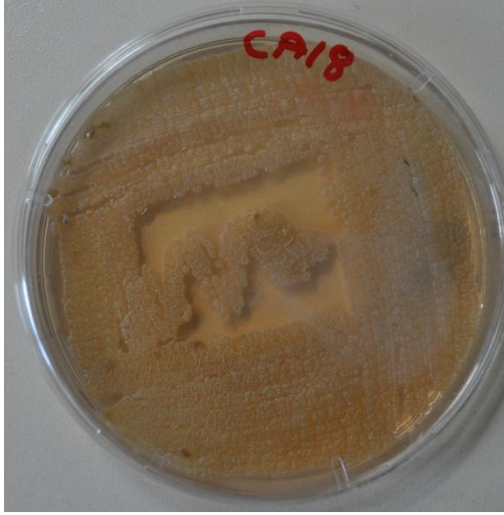
Şekil 4.11. *Streptomyces* sp. BS32



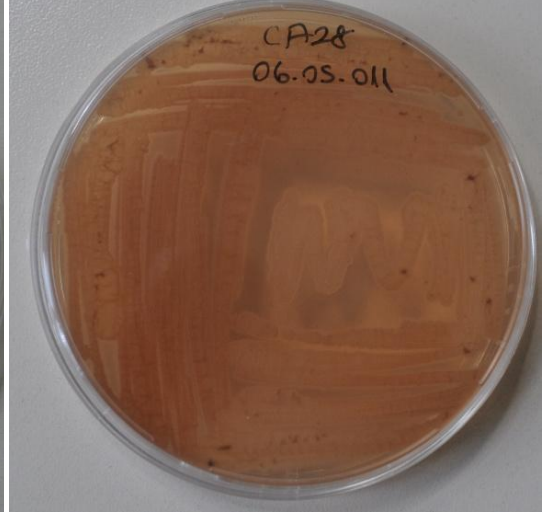
Şekil 4.12. *Streptomyces* sp. BSH50



Şekil 4.13. *Streptomyces* sp. CA13



Şekil 4.14. *Streptomyces* sp. CA18



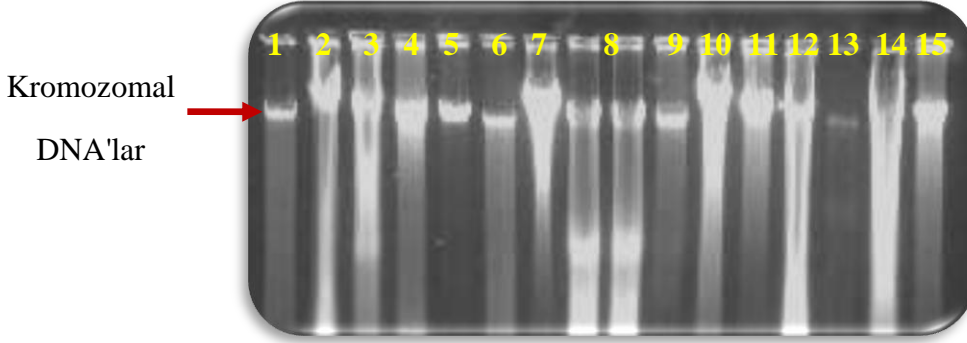
Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. CA28



Şekil 4.16. *Streptomyces* sp. CS42

4.1.2. Kromozomal DNA İzolasyonu

15 farklı *Streptomyces* türünden kromozomal DNA izolasyonları yapıldı.



Şekil 4.17. İzole edilen kromozomal DNA'lar. 1. *Streptomyces* sp. AA59, 2. *Streptomyces* sp. AAH67, 3. *Streptomyces* sp. AR4, 4. *Streptomyces* sp. AR17, 5. *Streptomyces* sp. AS29, 6. *Streptomyces* sp. AS37, 7. *Streptomyces* sp. BA1, 8. *Streptomyces* sp. BA12, 9. *Streptomyces* sp. BAH28, 10. *Streptomyces* sp. BS32, 11. *Streptomyces* sp. BSH50, 12. *Streptomyces* sp. CA13, 13. *Streptomyces* sp. CA18, 14. *Streptomyces* sp. CA28, 15. *Streptomyces* sp. CS42.

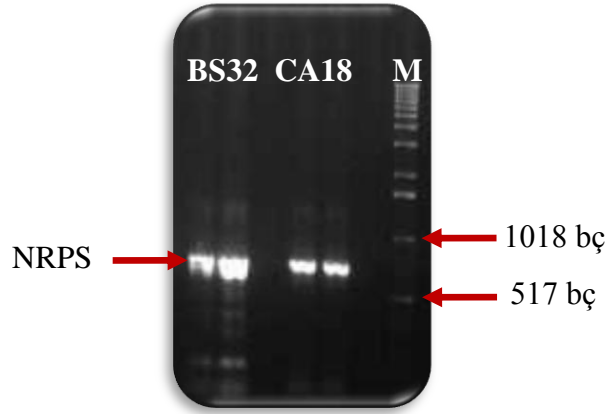
4.1.3. NRPS ve PKS-I Genlerinin İzolatların Genomlarında Taranması

4.1.3.1. NRPS Genlerinin Taranması

Lokal *Streptomyces* izolatlarından saflaştırılan kromozomal DNA'lar kullanılarak PCR ile NRPS gen kümesinin pütatif adenilasyon domaini çoğaltıldı. Lokal izolatların tümünde ilgili gende amplifikasyon elde edildi. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu, ortalama 700 bp uzunluğundadır.

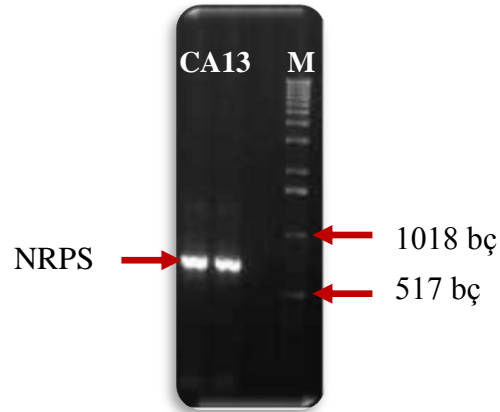
Saflaştırılan DNA'lardan elde edilen NRPS amplifikasyonu materyal ve metotta detaylı verilen standart koşullardan başlanarak; magnezyum klorür, annealing sıcaklığı ve kullanılan polimeraz değiştirilerek farklı optimizasyonlar yapıldı.

Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Fermentase) kullanılarak standart PCR koşullarında ürün elde edilemeyen izolatlardan, $MgCl_2$ konsantrasyonu 2.5 mM'a çıkarıldığında *Streptomyces* sp. BS32 ve *Streptomyces* sp. CA18 lokal izolatlarında Şekil 4.18'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



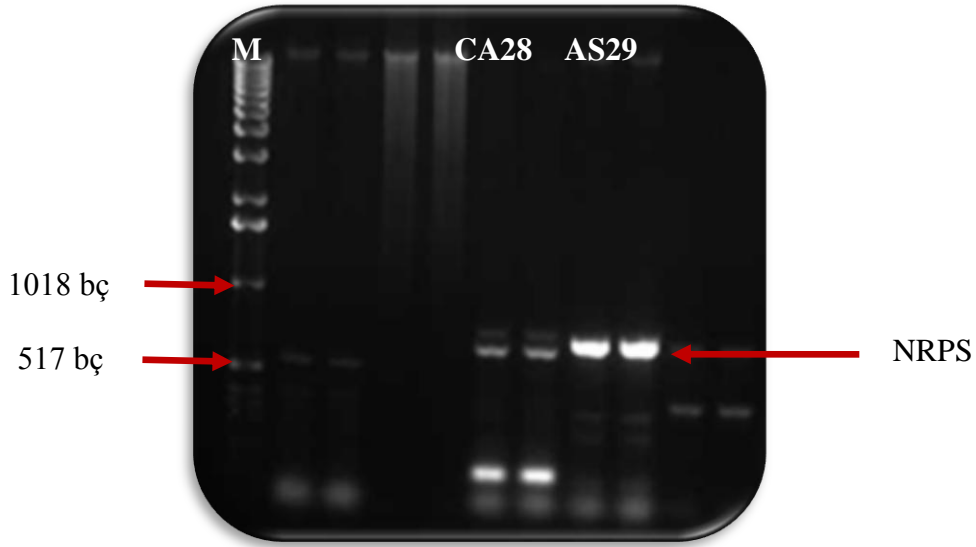
Şekil 4.18. *Streptomyces* sp. BS32 ve *Streptomyces* sp. CA18 izolatlarından elde edilen ürünler.

MgCl₂ konsantrasyonu 3.5 mM'a çıkarıldığında, *Streptomyces* sp CA3 izolatında Şekil 4.19'da görüldüğü gibi ürün elde edildi.



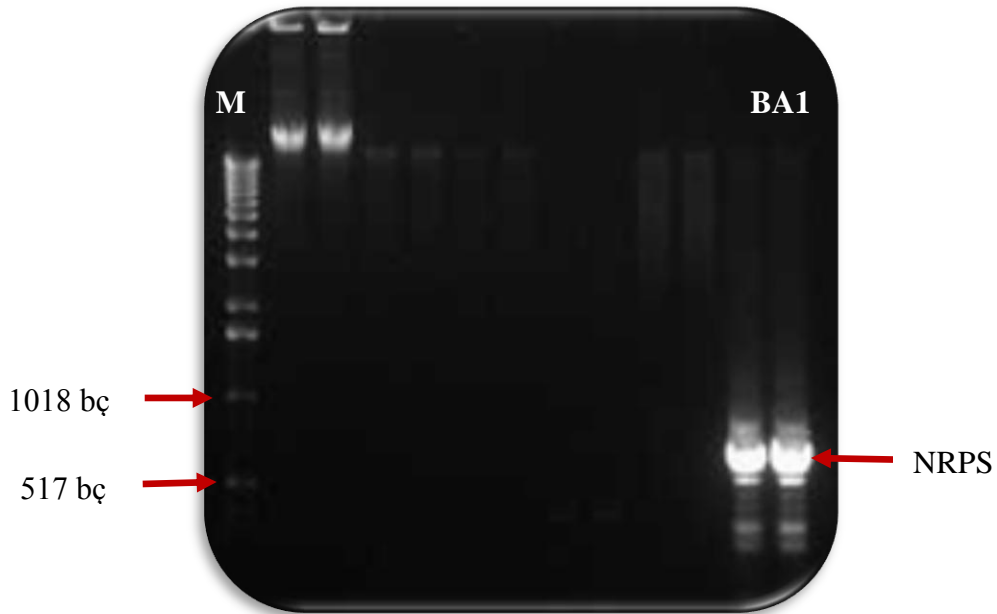
Şekil 4.19. *Streptomyces* sp. CA13 izolatından elde edilen ürün.

MgCl₂ konsantrasyonunun 2.5 mM, primerin bağlanma sıcaklığının 57 °C olduğu koşullarda, *Streptomyces* sp. CA28 ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatlarında Şekil 4.20'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



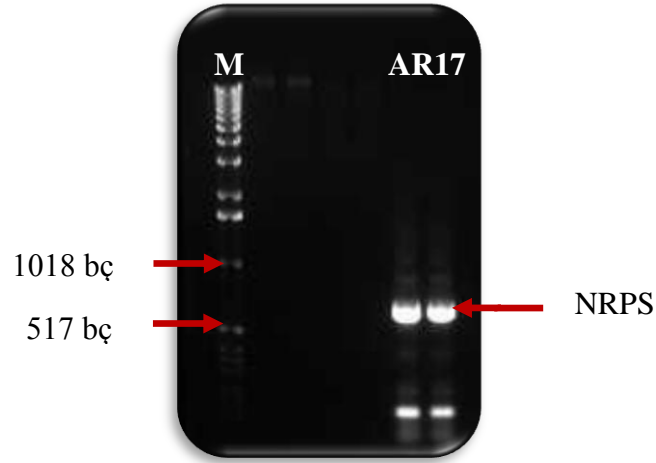
Şekil 4.20. *Streptomyces* sp. CA28 ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatlarından elde edilen ürünler.

MgCl₂ konsantrasyonunun 2.5 mM, primerin bağlanma sıcaklığının 55 °C olduğu koşullarda, *Streptomyces* sp. BA1 izolatında Şekil 4.21’de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



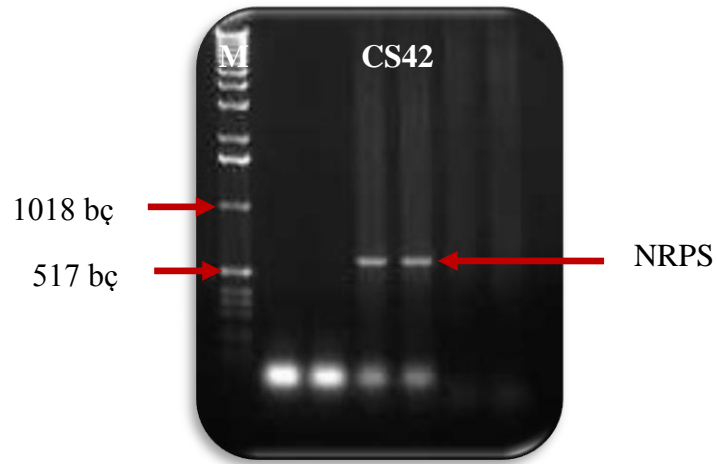
Şekil 4.21. *Streptomyces* sp. BA1 izolatından elde edilen ürün.

MgCl₂ konsantrasyonunun 2.5 mM, primerin bağlanma sıcaklığının 50 °C olduğu koşullarda, *Streptomyces* sp. AR17 izolatında Şekil 4.22’de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



Şekil 4.22. *Streptomyces* sp. AR17 izolatından elde edilen ürün.

MgCl₂ konsantrasyonunun 3.5 mM, primerin bağlanma sıcaklığının 50 °C olduğu koşullarda, *Streptomyces* sp. CS42 izolatında Şekil 4.23’de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



Şekil 4.23. *Streptomyces* sp. CS42 izolatından elde edilen ürün.

Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) kullanılarak standart PCR koşullarında lokal izolatlardan; *Streptomyces* sp. AA59, *Streptomyces* sp. AS37, *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. BAH28, *Streptomyces* sp. BSH50, *Streptomyces* sp. BA12, *Streptomyces* sp. AAH67'den Şekil 4.24'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



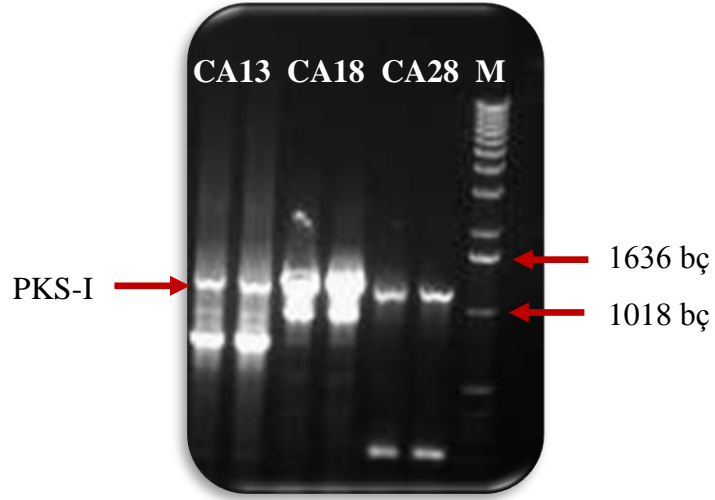
Şekil 4.24. *Streptomyces* sp AA59, *Streptomyces* sp AS37, *Streptomyces* sp AR4, *Streptomyces* sp. BAH28, *Streptomyces* sp BSH50, *Streptomyces* sp BA12, *Streptomyces* sp AAH67 izolatlarından elde edilen ürünler.

4.1.3.2 PKS-I Genlerinin Taranması

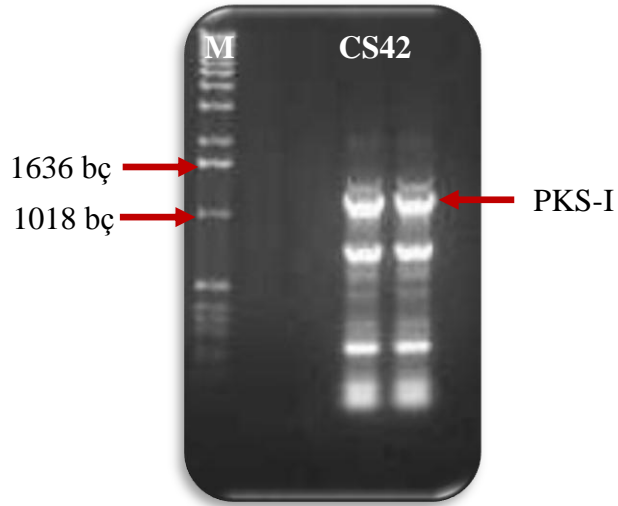
Lokal *Streptomyces* izolatlarından saflaştırılan kromozomal DNA'lar kullanılarak PCR ile PKS-I gen kümesinin ketosentaz domaini amplifiye edildi. Lokal izolatların tümünde ilgili gende amplifikasyon elde edildi. Primerlerin seçildiği gen bölgesine göre ampikonun uzunluğu, ortama 1200-1400 bp uzunluğundadır.

Saflaştırılan DNA'lardan elde edilen NRPS amplifikasyonu materyal ve metotta detaylı verilen standart koşullardan başlanarak; magnezyum klorür, annealing sıcaklığı ve kullanılan polimeraz değiştirilerek farklı optimizasyonlar yapıldı.

Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) kullanıldığı standart PCR koşullarında hiçbir izolatta ürün elde edilmedi. Primerin bağlanma sıcaklığının 53 °C , MgCl₂ konsantrasyonunun 2 mM olduğu PCR koşullarında Şekil 4.25'te görülen *Streptomyces* sp. CA13, *Streptomyces* sp. CA18, *Streptomyces* sp. CA28, ve Şekil 4.26 'da görülen *Streptomyces* sp. CS42 izolatlarından ürün elde edildi.

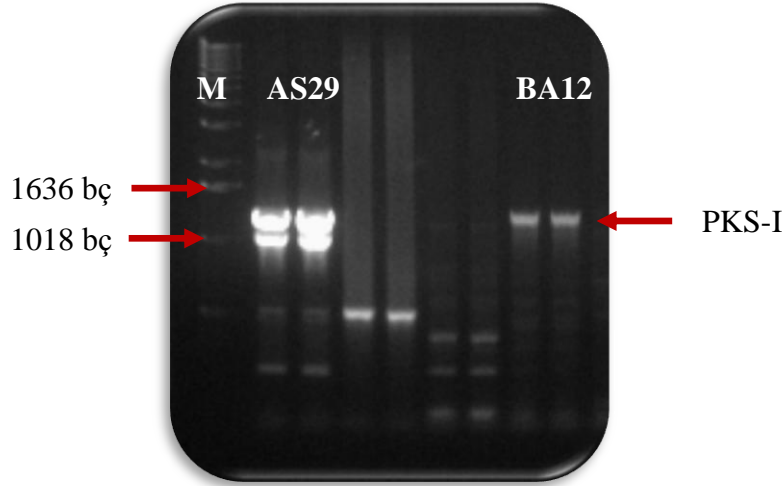


Şekil 4.25. *Streptomyces* sp. CA13, *Streptomyces* sp. CA18, *Streptomyces* sp. CA28 izolatlarından elde edilen ürünler.



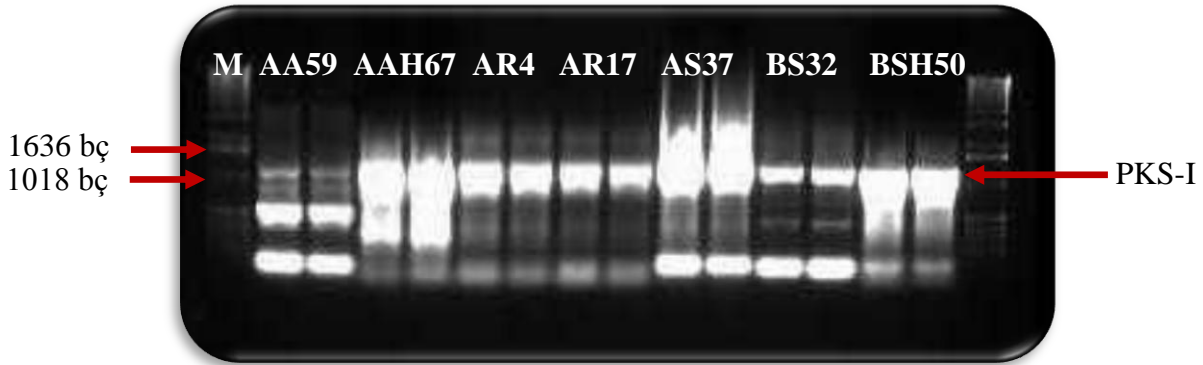
Şekil 4.26. *Streptomyces* sp. CS42 izolatından elde edilen ürün.

MgCl₂ konsantrasyonunun 3 mM, primerin bağlanma sıcaklığının 53 °C olduğu koşullarda, *Streptomyces* sp. AS29 ve *Streptomyces* sp. BA12 izolatlarından Şekil 4.27'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



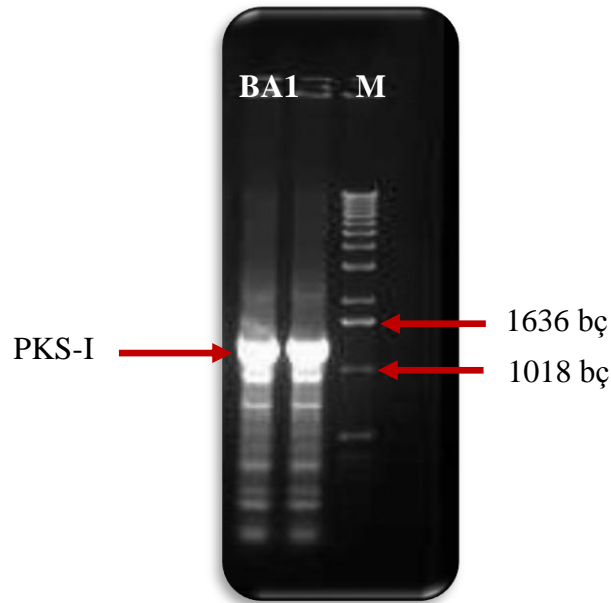
Şekil 4.27. *Streptomyces* sp. AS29 ve *Streptomyces* sp. BA12 izolatlarından elde edilen ürünler.

Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) kullanıldığında standart PCR koşullarında; *Streptomyces* sp. AA59, *Streptomyces* sp. AAH67, *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. AR17, *Streptomyces* sp. AS37, *Streptomyces* sp. BS32, *Streptomyces* sp. BSH50 izolatlarında şekil 4.28'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.

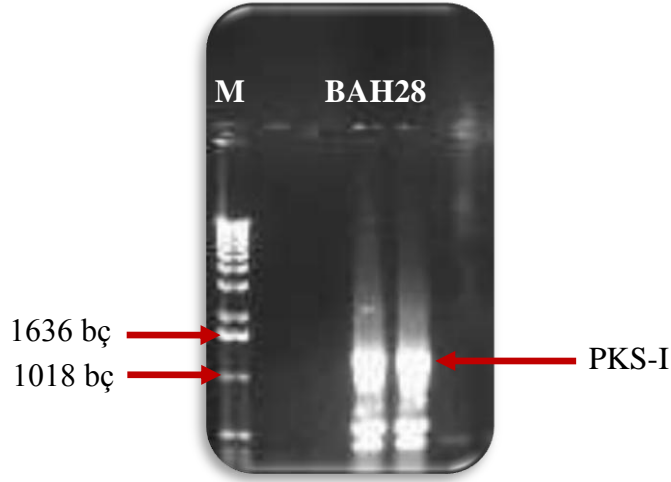


Şekil 4.28. *Streptomyces* sp. AA59, *Streptomyces* sp. AAH67, *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. AR17, *Streptomyces* sp. AS37, *Streptomyces* sp. BS32, *Streptomyces* sp. BSH50 izolatlarından elde edilen ürünler.

Termal döngü; 95 °C 5 dk (başlangıç denatürasyonu, 1 döngü) ve daha sonra 95°C 45 sn, 55 °C 1.5 dk, 72 °C 3 dk olarak 35 döngü uygulandı. 72 °C 10 dk (final polimerizasyon, 1 döngü) uygulanarak, denatürasyon, bağlanma ve polimerizasyon süreleri üzerinde değişiklik denemelerinin yapılmasıyla ürün elde edilemeyen *Streptomyces* sp. BA1 ve *Streptomyces* sp. BAH28 izolatlarından sırasıyla Şekil 4.29 ve 4.30'da görüldüğü gibi ürün elde edildi.



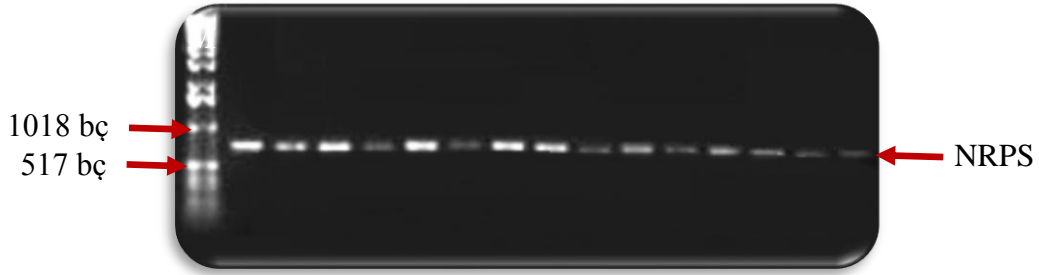
Şekil 4.29. *Streptomyces* sp. BA1 izolatından elde edilen ürün.



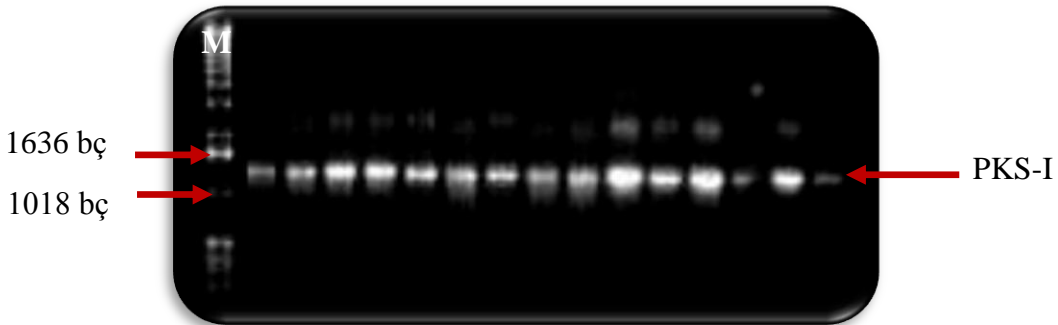
Şekil 4.30. *Streptomyces* sp. BAH28 izolatından elde edilen ürün..

4.1.3.3. PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu

PCR sonrasında yaklaşık 700 bç uzunluğunda olan NRPS gen kümesinin pütatif A domaini ile, 1200-1400 bç uzunluğunda olan PKS-I gen kümesinin pütatif KS domaini jelden kesilerek ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrası jel görüntüleri Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’de görülmektedir.



Şekil 4.31. Jel ekstraksiyonsonunda elde edilen NRPS fragmentleri

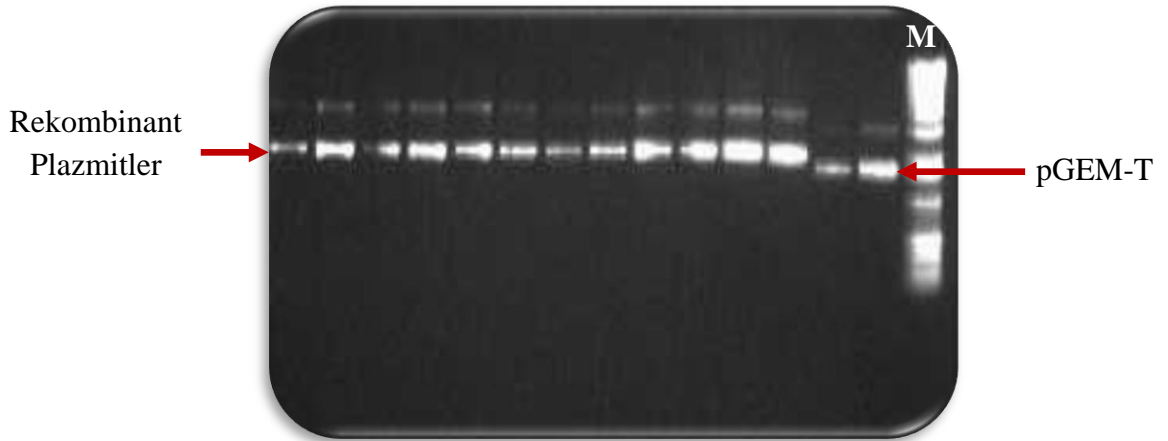


Şekil 4.32 Jel ekstraksiyonu sonunda elde edilen PKS-I fragmentleri

4.1.4. PCR ile Elde Edilen Ürünlerin Klonlanması

4.1.4.1. NRPS Gen Kümesinin Adenilasyon Domaininin Klonlanması

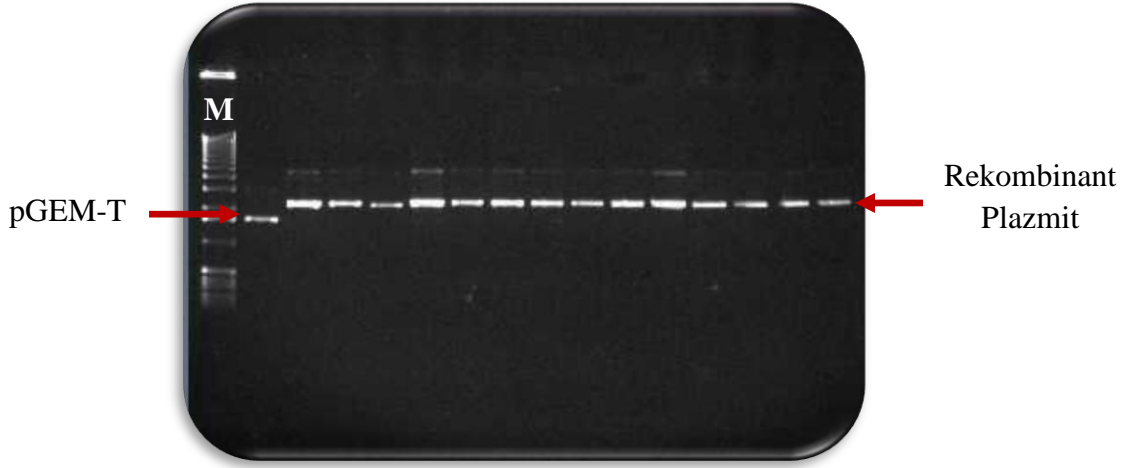
Streptomyces sp. BSH50 izolatından elde edilen NRPS genlerine ait pütatif adenilasyon domainleri pGEM-T vektörlere klonlandı. *E.coli* DH5- α kompetent hücrelerine transformasyon yapılarak ilgili gen ve organizma için mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. Transformantlar ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi. Beyaz renkli ampisiline dirençli kolonilerin rekombinant plazmid içermesinden dolayı, bu koloniler yeniden üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları yapıldı. İzolasyonu yapılan rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.33'te görülmektedir.



Şekil 4.33. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatı adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler.

4.1.4.2. PKS-I Gen Kümesinin Ketosentaz Domaininin Klonlanması

Streptomyces sp. AS29 izolatından elde edilen PKS-I genlerine ait pütatif ketosentaz domainleri jelden geri kazanılarak pGEM-T lineer vektörlerine klonlandı. *E. coli* DH5- α kompetent hücrelerine transformasyon yapılarak ilgili gen ve organizma için mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. Transformantlar ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi. Beyaz renkli ampisiline dirençli kolonilerin pütatif rekombinant plazmid içermesinden dolayı, bu koloniler yeniden üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları yapıldı. İzolasyonu yapılan rekombinant plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.34'de görülmektedir.



Şekil 4.34. *Streptomyces* sp. AS29 izolatu ketosentaz domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler.

4.1.5. Biyoinformatik İncelemeler

Streptomyces sp. BSH50 izolatu NRPS ve *Streptomyces* sp. AS29 izolatu NRPS I genlerinin mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. Bu kütüphanelerden seçilen klonların DNA dizilimleri NCBI web sitesinde BLASTn ve BLASTx programlarında homoloji incelemelerine tabi tutuldu.

4.1.5.1. *Streptomyces* sp. BSH50'nin NRPS Genlerinin İncelenmesi

Kurulan mini kütüphaneden seçilen 48 klonun sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. BSH50 izolatu NRPS genlerine ait 11 farklı A domaini içerdiği tespit edildi. Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterildiği gibi grupladığımız bu klonların Genbankasında sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri yapıldı. Bu analizlere göre incelenen domainlerin gerek *Streptomyces* türlerinin gerekse diğer aktinomiset cinslerine dahil türlerin NRPS genleri ile homolojilere rastlandı. Özellikle BLASTx analizlerine bakıldığında; ; I. grubun *S. roseosporus* NRRL 11379 organizmasının NRPS geni ile % 69 oranında, II. grubun *S. flavogriseus* ATCC 33331 organizmasının NRPS geni ile % 68 oranında, VI. grubun *Chitinophaga pinensis* DSM 2588 organizmasının NRPS geni ile % 45 oranında, XI. grubun *S. cf. griseus* XylebKG-1 organizmasının NRPS geni ile % 65 oranında amino asit homolojisi gösterdiği belirlendi. Özellikle VI. grupta sınıflandırılan A domainin şimdiye kadar bulunmuş

diğer NRPS A domainleri ile çok düşük bir homolojisinin saptanması bunun yeni bir gen kümesine olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.2. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları

Grup No	Gen bankasındaki en yakın Organizma/Gen Bankası Giriş No	% Homoloji	Seçilen Klon Sayısı
I	<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22 (emb FN554889.1)	73	1
II	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 DNA(dbj BA000030.3)	76	9
III	<i>Frankia alni</i> str. ACN14A (emb CT573213.2)	85	3
IV	<i>Streptomyces macromyceticus</i> (dbj AB432517.1)	88	9
V	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827 (gb CP001630.1)	74	7
VI	<i>Myxococcus xanthus</i> (gb U24657.1 MXU24657)	68	12
VII	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 (emb AM238664.2)	90	2
VIII	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 (gb CP002475.1)	74	2
IX	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827 (gb CP001630.1)	77	1
X	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 (gb CP002475.1)	79	2
XI	<i>Streptomyces griseus subsp. griseus</i> NBRC 13350 DNA (dbj AP009493.1)	73	1

Çizelge 4.3. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları

Grup No	Gen bankasındaki en yakın Organizma/Gen Bankası Giriş No	% Homoloji	Seçilen Klon Sayısı
I	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379 (ref ZP_04713303.1)	69	1
II	<i>Streptomyces</i> sp. e14(ref ZP_06710581.1)	86	9
III	<i>Frankia alni</i> ACN14a (ref YP_712765.1)	80	3
IV	<i>Streptomyces macromyceticus</i> (dbj BAH68554.1)	83	9
V	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 (gb ADW01559.1)	68	6
VI	<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588 (ref YP_003123086.1)	45	12
VII	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736 (ref ZP_07301718.1)	94	2
VIII	<i>Micromonospora</i> sp. ATCC 39149 (ref ZP_04608967.1)	85	2
IX	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827 (ref YP_003101337.1)	74	1
X	<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205 (gb ABV96291.1)	80	2
XI	<i>Streptomyces</i> cf. <i>griseus</i> XylebKG-1(ref ZP_08236937.1)	65	1

4.1.5.2. *Streptomyces* sp. AS29'un PKS-I Genlerinin İncelenmesi

Kurulan mini kütüphaneden seçilen 32 klonun sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. AS29, izolatının PKS-I genlerine ait 3 farklı KS domaini içerdiği tespit edildi. Çizelge 4.3 ve 4.4'de gösterildiği gibi grupladığımız bu klonların Genbankasında sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri yapıldı. Bu analizlere göre

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Streptomyces sp. AS29'un sahip olduğu PKS-I geni KS domainleri *Streptomyces* başta olmak üzere diğer aktinomisetlerle yüksek homoloji gösterdiği saptandı. BLASTx analizlerinde II. grupta bulunan klonlar *S. avermitilis* MA-4680 organizmasının PKS-I genleriyle % 61 ve III. grupta bulunan klonlar ise *Streptomyces* sp. ID05-A0098 organizmasının PKS-I genleri ile % 63 gibi düşük amino asit homolojileri tespit edildi. Bununla beraber grup II ve grup III'teki domainlerin yeni bir PKS-I genine ait olma ihtimalleri vardır.

Çizelge 4.4. *Streptomyces* sp. AS29 izolatının PKS-I gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları.

Grup No	Gen bankasındaki en yakın Organizma/Gen Bankası Giriş No	% Homoloji	Seçilen Klon Sayısı
I	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0098 (gi 238767403 dbj AB431656.1)	75	22
II	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827 (gi 255918463 gb CP001630.1)	73	8
III	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (gi 238766643 dbj AB431274.1)	74	2

Çizelge 4.5. *Streptomyces* sp. AS29 izolatının PKS-I gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları

Grup No	Gen bankasındaki en yakın Organizma/Gen Bankası Giriş No	% Homoloji	Seçilen Klon Sayısı
I	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>ossamyceticus</i> (gi 238766124 dbj BAH67053.1)	72	22
II	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 (gi 29829440 ref NP_824074.1)	61	8
III	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0098 (gi 238767404 dbj BAH67693.1)	63	2

4.2. Tartışma

Biyosentetik potansiyeli ortaya çıkarmak için sekonder metabolitlerin sentezinde görevli olan gen dizilerinin araştırılması hem aktinomisetlerde hemde farklı taksonomik gruplarda uygulanmıştır (Sosio ve ark., 2000; Christiansen ve ark., 2001; Anderson ve ark., 2002; Ayuso-Sacido ve Genilloud, 2005). Sekonder metabolizma ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır (Metsa-Ketela ve ark. 1999, Anderson ve ark. 2002, Sigmund ve ark. 2003, Ritacco ve ark. 2003, Ayuso ve Genilloud 2005, Ayuso ve ark. 2005).

Çalışmamızda 15 farklı *Streptomyces* türünün genomunda NRPS gen bölgesinin A domaini ve PKS-I gen bölgesinin KS domainini hedef alan primerler kullanılarak (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005) PCR yöntemine dayalı yapılan taramada, izolatların tümünde NRPS ve PKS-I genlerinin ürünleri elde edildi. 2005 yılında aynı primer çiftlerinin kullanıldığı bir çalışmada (K1F/M6R ve A3F/A7R) aktinomisetlere ait 210 türden, 168'inde (% 79) NRPS genleri, 111'inde ise (% 56.7) PKS-I genleri tespit edilmiştir. Tarama yapılan aktinomisetler içerisinde en büyük amplifikasyon oranının (% 97 NRPS ve % 79 PKS-I) *Streptomyces*'larda olduğu rapor edilmiştir (Ayusu-Sacido ve Genilloud 2005). Bu çalışmada denenen 15 *Streptomyces* türünün tümünde ilgili genlerin saptanmış olması, bu izolatların metabolik potansiyellerinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. İzolatların bitki kök çevresi topraklarından izole edilmiş olması, bitkinin köklerini her türlü istilaya karşı korumak için aktinomisetlerin yüksek biyoaktiviteye sahip olduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Sekonder metabolitlerin sentezi için gerekli öncü bileşikler primer metabolizma sonucu olduğundan dolayı sekonder metabolit sentezi primer metabolizma ile yakından ilişkilidir. Bu nedenden dolayı kültür ortamının temel bileşenleri, sekonder metabolit sentezinde önemli rol oynamaktadır. Primer metabolizma sonucu sentezlenen sekonder metabolit öncülü bileşikler belli bir metabolik yolda bulunan enzimlerin aktivitesine bağlı olarak sentezlenmektedir. Çalışmamızda kullanılan lokal izolatların antimikrobiyal aktiviteleri, daha önce farklı besiyerlerinde araştırılmış ve 15 izolatın sadece 5'inde (*Streptomyces* sp. BSH50, *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. BA12, *Streptomyces* sp. BS32 *Streptomyces* sp. CS42) antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir

(Yılmaz ve ark. 2005, Özakin 2010). Kültür ortamı bileşenlerinin sekonder metabolit üretimini etkilediği, bu nedenle diğer izolatlarda herhangi bir antimikrobiyal aktivitenin elde edilememiş olması, üretilme potansiyeli olabilecek bileşiklerin kültür ortamında ifade şansı bulamamasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Oysa yaptığımız PCR taramasında izolatların tümünde NRPS ve PKS-I genlerinin tespit edilmiş olması, bu mikroorganizmaların sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu genlere sahip olduğunu ve bu genlerin kriptik olabileceği düşüncesini de desteklemektedir. *S. coelicolor*'ın kültür ortamında yalnızca 3 bileşiği sentezlediği ve sekonder metabolit sentezinden sorumlu 17 gen kümesinin olduğu bilinirken genom projesinin ortaya çıkarılmasıyla bu sayının 29' a çıktığı rapor edilmiştir. (Bentley 2002). Dolayısıyla kriptik genlerin açığa çıkarılması açısından genetik taramanın oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu görülmektedir. Janso ve Carter (2010) yaptıkları bir çalışmada; taradıkları 91 endofitik aktinomiset türünün % 60' ının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, bunların içerisinde antimikrobiyal aktivite göstermeyen ve *Streptomyces* olmayan 29 izolatin yapılan genetik taramasında ise tümünde NRPS ve % 66' sında PKS-I genlerini tespit etmişlerdir (Janso ve Carter 2010). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, genetik taramanın; klasik kültür koşullarında sentezlenemeyen veya kimyasal tarama metodları ile tespit edilemeyecek kadar az üretilen bileşiklerin keşfedilmesine yol açtığı görülmektedir. Öte yandan stres veya tehdit koşulları olmaksızın ekspresyonu olmayan kriptik genlerin varlığının ortaya çıkarılması açısından da genetik tarama oldukça önem taşımaktadır.

Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz klonlarımız içerisinde, Genbankasında şimdiye kadar bulunmuş olan bileşiklerin genleri ile anlamlı oranda bir homolojiye rastlanmayan örneklerimizin mevcut olması, bu genlerin yeni bileşikler üreten gen kümelerine ait olabileceği sonucunu doğurmaktadır. *Streptomyces* sp. BSH50'nin yapılan biyoinformatik incelemelerinde; BLASTx analizleri amino asit homolojisine dayalı olduğu için homoloji, BLASTn analizlerine göre daha düşük olup sonuçların protein-protein benzerliğini ortaya koyması açısından önemlidir. BLASTx sonuçlarına dikkat edilirse 11 grup içerisinde homoloji oranı % 45-94 arasında değişmektedir ve I, II, VI, ve XI. grupların % 70' in altında homolojiye sahip oldukları görülmektedir. *Streptomyces* sp. AS29 'un PKS-I mini gen kütüphanesinden seçilen klonların BLASTn ve BLASTx analizleri sonucunda, *Streptomyces*'lara ait PKS-I genleri ile değişik

oranlarda homoloji gösterdiği tespit edilmiş olup, II. ve III. grupların homoloji oranları oldukça düşüktür. Bununla birlikte gruptaki klonların homoloji gösterdiği NRPS genlerinin hangi bileşiğin sentezinden sorumlu olduğu rapor edilmemiştir. BLASTx sonuçlarında düşük homolojilerin olması elimizdeki bu domainlerin ait olduğu NRPS gen kümelerinin yeni olma ihtimalini oldukça güçlendirmektedir. Biyosentetik gen kümelerine ait domainlerde % 70'in altında olan BLASTx homolojilerinde, incelenen dizilimin yeni bir gene ait olduğu düşünülmektedir (Zhang 2009, Komaki ve ark. 2008). Düşük homoloji gösteren genlerin yeni bileşiklerin sentezinden sorumlu genler olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyosentetik potansiyelin değerlendirilmesi için sekonder metabolitlerin sentezinde gerekli olan genlerin tespiti, farklı taksonomik gruplarda ve aktinomisetlerde uygulanmıştır (Sosio ve ark. 2000, Christiansen ve ark. 2001, Anderson ve ark. 2002, Ayuso-Sacido ve Geniloud 2005). Bu yaklaşım, yüksek metabolik potansiyele sahip yabancı tip izolatların taranmasında önemli bir strateji olarak görünmektedir. Ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) ve poliketid sentazlar (PKS), mikroorganizmalar tarafından üretilen önemli biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının sentezinde gerekli biyosentetik sistemlerdir (Ayuso-Sacido ve Geniloud 2005). Çalışmamızda dejenere PCR primerlerinin kullanılmasıyla lokal *Streptomyces* türlerin NRPS ve PKS-I genleri moleküler olarak taranmıştır.

1. 15 lokal izolatın tümünde NRPS ve PKS-I genleri elde edildi.
2. Bir izolattan NRPS ve bir izolattan PKS mini gen kütüphanesi kuruldu.
3. *Streptomyces* sp. BSH50 izolatının mini gen kütüphanesinden NRPS genlerine ait 11 farklı A domaini tespit edildi.
4. Bunların içerisinde I, V, VI, XI nolu klonların yeni NRPS genlerine ait olabileceği düşünülmektedir.
5. *Streptomyces* sp. AS29 mini gen kütüphanesinden PKS-I genlerine ait 3 farklı KS domaini tespit edildi.
6. Bunlar içerisinde II ve III nolu klonların yeni PKS-I genlerine ait olabileceği düşünülmektedir.

Yeni olmaya aday fragmentler homolog prob olarak kullanılıp Southern hibridizasyonu ile izolatların genomları taranacaktır. Bu da yeni biyoaktif bileşiklerin genlerinin aydınlatılmasına yol açacaktır.

6. KAYNAKLAR

Atalan, E. 1993. Selective Isolation, Characterisation and Identification of some *Streptomyces* species [Thesis]. Newcastle upon Tyne UK: Univ of Newcastle.

Ayuso, A., Clark, D., Gonzalez, I., Salazar, O., Anderson, A., Genilloud, O. 2005. A novel actinomycetes strain de-replication approach based on the diversity of poliketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 67: 795-806.

Ayuso-Sacido, A. and Genilloud, O. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in *actinomycetes*: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49:10-24.

Bao, K., Cohen, SN. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.*, 15:1518–27.

Barabote, R. D., G. Xie, D. H. Leu, P. Normand, A. Necsulea, V. Daubin, C. Me'digue, W. S. Adney, X. C. Xu, A. Lapidus, R. E. Parales, C. Detter, P. Pujic, D. Bruce, C. Lavire, J. F. Challacombe, T. S. Brettin, and A. M. Berry. 2009. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res.*, 19:1033–1043.

Barrios-Llerena, M.E., Burja, A.M., Wright, P.C. 2007. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 34: 443-456.

Basilio, A., González, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A. & Genilloud, O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 814-823.

Bentley, S. D., S. Brown, L. D. Murphy, D. E. Harris, M. A. Quail, J. Parkhill, B. G. Barrell, J. R. McCormick, R. I. Santamaria, R. Losick, M. Yamasaki, H. Kinashi, C. W. Chen, G. Chandra, D. Jakimowicz, H. M. Kieser, T. Kieser, and K. F. Chater. 2004. SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*, 51:1615–1628.

Bentley, SD., Chater, KF., Cerden˜ o-Ta'rraga, AM., Challis, GL., Thomson, NR., et al.2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Nature*, 417:141–47.

Borchardt, J.K. 1999. Combinatorial Biosynthesis Panning for Pharmaceutical gold. *Modern Drug Discovery* , 2, 22-29.

Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58(1):1–26.

Caboche S, Pupin M, Leclere V, Fontaine A, Jacques P, Kucherov G. 2008. Norine: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res.*, 36: D326-331.

Cannell, R.J.P. 1998. *How to Approach the Isolation of a Natural Product*. Humana Press, 1-51, Totowa.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. & Zhou, S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 425-430.

Cerdeño, AM., Bibb, MJ., Challis, GL. 2001. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem. Biol.*, 8:817–829.

Chater, KF., Losick, R. 1997. Mycelial life style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as Multicellular Organisms*, ed. JA Shapiro, M Dworkin. New York: Oxford Univ. Press, pp. 149–82.

Challis, GL., Ravel, J. 2000.. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 187:111–114.

Challis, GL. 2008. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154:1555–1569.

Challis, GL. 2008. Genome mining for novel natural product discovery. *J. Med. Chem.*, 51:2618–2628.

Crawford, D. L. 1988. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: M. Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, pp. 433-459, London.

Demain, A.L., 1998. Induction of microbial secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463

De Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 795–811.

De Boer, W., Gunnewiek, P.J.A.K., Lafeber, P., Janse, J.D., Spit, B.E., Woldendorp, J.W. 1998. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol. Biochem*, 30, 193–203.

Del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, MA., del Castillo, FJ., Alvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N. Engl. J. Med.*, 24;346(4):243-9.

Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M., Puglia, A.M. 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol*, 99: 187–198

Drews, J. 1999. In quest for tomorrow's medicine. chapter 2

El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., St. J. Hardy, G.E. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol. (Oxf.)*, 49, 573–583.

Ehrenreich, I. M., Waterbury, J. B. and Webb, E. A. 2005. Distribution and diversity of natural product genes in marine freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 7401-7413.

Embley, T. M., and E, Stackebrandt. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48:257–289.

Friedman, J., Hutchins, A., Li, C.Y., Perry, D.A. 1989. Actinomycetes inducing phytotoxic or fungistatic activity in a Douglas-fir forest and in an adjacent area of repeated regeneration failure in Southwest Oregon. *Biologia Plantarum*, 31, 487–495.

Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Horinouchi, S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400:897-899.

Frändberg, E., Petersson, C., Lundgern, L.N., Schnürer, J. 2000. *Streptomyces halstedii* K122 produces the antifungal compounds bafilomycin B1 and C1. *Can. J. Microbiol*, 46, 753–758.

Flärdh, K. 2003. Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*, 49:1523–36.

Gonzalez, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., Genilloud, O. 2005. *Actinomycetes* isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology*, 54: 401-415.

Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 189–216.

Goodfellow, M., Williams, E. 1986. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. *Biotechnol Genet Eng Rev.*, 4:213–262.

Gross, H. 2009. Genomic mining - a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 12:207–219.

Hara, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. 2009. DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 155:2197–2210.

Haug, I., Weissenborn, A., Brolle, D., Bentley, SD., Kieser, T. 2003. *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*: deductions from the complete sequence. *Altenbuchner J. Microbiology*, 149:505–513.

Hopwood, DA.1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev.*, 97:2465-2497.

Hopwood, DA. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *J. Gen. Microbiol.*, 145:2183–202.

Hopwood, D. 2004. New Drugs by Manipulating *Streptomyces* genes *Microbiology Today*, 34: 64–65.

Hopwood, DA. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet.*, 40: 1–23.

Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, PJ., Rudd, BAM., Hayes, MA., Smith, CP., Micklefield, J. 2002. Structure biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem. Bio.*, 9:1175–1187.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., et al. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.*, 21:526–31.

Ikeda, H., Takada, Y., Pang, CH., Tanaka, Y., Omura, S. 1993. transposon mutagenesis by Tn4560 and applications with avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *J.Bacteriol.*, 175:2077–2082.

Janso, J. E. and Carter, G. T. 2010. Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (13): 4377–4386.

Jenke-Kodama, H., Börner, T., Dittmann, E. 2006. Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Comput. Biol.*, 2:e132.

Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J., Li, X. 2007. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 405–416.

Jiang, S., Li, X., Zhang, L., Sun, W., Dai, S., Xie, L., Liu, Y., Lee, K. J. 2008. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Mar Biol.*, 153: 945–952.

Jimenez-Esquilin, A.E., Roane, E.T.M. 2005. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 378–381.

Keast, D., Tonkin, C., 1983. Antifungal activity of Western Australian soil actinomycetes against *Phytophthora* and *Pythium* species and a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. *Aust. J. Biol. Sci.* 36, 191–203.

Konz, D., and Marahiel, M.A. 1999. Production of a polyketide natural product in nonpolyketases generate structural diversity? *Chem. Biol.*, 6, R39–R48.

Komaki, H. and Harayama, S. 2006. Sequence Diversity of Type II Polyketide Synthase Genes in *Streptomyces*. *Actinomycetologica*, 20: 42-48.

Komaki, H., Fudou, R., Lizuka, T., Nakajima, D., Okazaki, K., Shibata, D., Ojika, M., Haryama, S. 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (17): 5571–5574.

Komaki, H., Izumikawa, M., Ueda, J., Nakashima, T., Khan, S. T., Takagi, M. 2009. Discovery of pimarinic acid analog JBIR-13, from *Streptomyces bicolor* NBRC 12746 as predicted by sequence analysis of type I polyketide synthase gene *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83:127–133.

Kuster, E. 1968. Taxonomy of soil Actinomycetes & related organisms. In: "Ecology of soil bacteria", eds. Gray TRG Parkinson (D.) Liverpool University Press, 322-336., Liverpool.

Lamb, DC., Ikeda, H., Nelson, DR., Ishikawa, J., Skaug, T., Jackson, C., Omura, S., Waterman, MR., Kelly, SL. 2003. Cytochrome p450 complement (CYPome) of the avermectin-

producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307:610–619.

Lautru, S., Deeth, R.J., Bailey, L.M., Challis, G.L. 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat. Chem. Biol.*, 1:265–269.

Lechevalier, H. A. 1981. Ecological associations involving actinomycetes. In: K. P. Schaal, and G. Pulverer (ed.), *Actinomycetes. Proc. 4th Int. Symp. on actinomycete biology*, Cologne, 1979. Gustav Fischer Verlag, pp. 159- 166, Stuttgart.

Levy, S.B. 1992. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle. *New York Plenum Press*, 324(24), pp:279.

Lipmann, F. 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. *Science*, 173: 875-84.

Lloyd, A.B., Noveroske, R.L., Lockwood, J.L. 1965. Lysis of fungal mycelium by *Streptomyces* spp. and their chitinase systems. *Phytopathology*, 55, 871–875.

Lockwood, J.L. 1959. *Streptomyces* spp. as a cause of natural fungitoxicity in soils. *Phytopathology*, 49, 327–331.

Luscombe , M. & GRAYT, R. G. 1974. Characteristics of *Arthrobacter* grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology*, 82,213-222.

Malpartida, F., Hopwood, D.A. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*, 309:462-464.

Markus Nett, Haruo Ikeda, and Bradley S. Moore. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 26(11): 1362–1384.

McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., et al. 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *P. Natl .Acad. Sci.* 103: 15582–15587. USA.

Metsa-Ketela, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. 1999. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 1–6.

Metsa-Ketela, M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Matsala, P. and Ylihonko, K. 2002. Molecular evolution of aromatic poliketides and comparative ribosomal DNA genes from various. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4472-4479. 6

Motamedi, H., Hutchinson, CR. 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. Proc. Natl. Acad. Sci., 84:4445-4449, USA.

Moore, B.S. and Hopke, J.N. 2001. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. Chembiochem. 2. 35-38.

Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. 1999. Design and application of multimodular peptide synthetases. Curr. Opin. Biotechnol., 10, 341–348.

Moffitt, M. C., Neilan, A. B. 2002. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. J. Mol Evol., 56: 446-457.

Myronovskyy, M. L., Ostash, B. E. and Fedorenko, V. A. 2010. Diversity of Genes Encoding Nonribosomal Peptide Synthetases in the *Streptomyces sioyaensis* Genome. Russian Journal of Genetics, 46 (7): 794–800.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981–2002. J. Nat. Prod., 66, 1022–1037.

Nonomura, H., Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. (VI). A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of Microbispora and Streptosporangium strains in soil (part 1). J. Ferment. Tech., 47, 463–469.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J Bacteriol., 190: 4050–4060.

Okami, Y. & Okazaki, T. 1972. Studies on marine microorganisms. I. Actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. Journal of Antibiotics, 25, 456-460.

Omura, S. 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. Int. J. Antimicrob. Agents, 31:91–98.

Omura, S., Crump, A. 2004. The life and times of ivermectin - a success story. Nat. Rev. Microbio., 2:984–989.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci, 98:12215–12220. U. S. A.

Oskay, M., Tamer, A. 2009 *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarın., Journal of New World Science Academy, 4, 48-60.

Ostash, B. E., Ogonyan, S .V., Luzhetskyy, A. N., Bechthold, A., and Fedorenko, V. A. 2005. The Use of PCR for Detecting Genes That Encode Ttype I polyketide Synhases in Genomes of Actinomycetes. Russian jornal of Genetics, 41 (5): 473-478.

Pathom-aree, W., Stach, J .E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles, 10: 181–189.

Paul, M. Dewick. 2009. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley and Sons, - 539 .

Pedziwilk, Z. 1995. The numbers and the fungistatic activity of actinomycetes in different soils supplemented with pesticides and organic substances. Pol. J. Soil Sci., 28, 45–52.

Peczynska-Czoch, W. & Mordarski, M. 1988. Actinomycete enzymes, pp. 219-283. In: M, Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski (ed.), Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, San Diego.

Phillips, O.L., Malhi, Y., Vinceti, B., Baker, T., Lewis, S.L., Higuchi, N., Laurance, W.F., Vargas, P.N., Martinez, R.V., Laurance, S., Ferreira, L.V., Stern, M., Brown, S. and Grace, J. 2002. Changes in growth of tropical forests: Evaluating potential biases. Ecological Applications, 12: 576-587.

Philippe, Normand., Clothilde, Queiroux., Louis, S. Tisa., David, R. Benson., Zoé Rouy., Stéphane, Cruveiller., Claudine, Médigue. 2007. Exploring the genomes of *Frankia*. Physiologia Plantarum Volume 130, Issue 3, pages 331–343.

Robert Finking and Mohamed A. Marahiel. 2004. Annu. Rev. Microbiol., 58:453–88.

Roberts, M.A. and Crawford, D.L. 2000. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. Applied Enviromental Microbiology, 66:2555–2564.

Savic, M., Vasiljevic, B. 2006. Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. J. Ind. Microbiol Biotechnol., 33: 423–430.

Semiring, L. and Goodfellow, M. 2008. Ecological Approach to Unravel Streptomycete Diversity as an Unsurpassed Sources of Natural Bioactive Products. Microbiol Indones. Volume 2, Number 2, p 49-56.

Severinov, K., Semenova E., Kazakov, A., Kazakov, T., Gelfand, MS. 2007. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Mol. Microbiol.*, 65:1380–1394.

Spiewack, R., Gora, A. and Dutkiewitz, J. 2001. Work-related skin symptoms and type I allergy among eastern-Polish farmers growing hops and other crops. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 8: 51–56.

Shen, B. 2000. Biosynthesis of aromatic polyketides. *Curr. Top. Chem.*, 209:1-51

Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D. J., Chen, M., Murrell, J. M. 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, 27: 378–385.

Shen, B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 285-295.

Silva-Stenico, E.M., Silva, C.S.P., Lorenzi, A.S., Shishido, T.K., Etchegaray, A., Lira, S.P., Moraes, L.A.B., Fiore, M.F. 2011. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, 166: 161-175.

Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A., Donadio, S. 2000. Multiple Peptide Synthetase Gene Clusters in Actinomycetes. *Molecular and General Genetics*, 264: 213-221

Staunton, J., Weissman, K.J., 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep.*, 18:380-416.

Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A. 1995. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* 270, 6163–6169.

Stein, T., et al., and Morris, H.R. 1996. The multiple carrier model of non-ribosomal peptide biosynthesis at modular multi enzymatic templates. *J. Biol. Chem.*, 271, 15428-15435.

Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M.A. 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 3, 913–921.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 6, 493–505.

Staunton, J., Weissman, K. J. 2001. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 380–416.

Staunton, J., Wilkinson, B. 2001. Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. *Curr Opin Chem Biol.*, 5: 159–164.

Takano, E. Curr. 2006 . Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Opin. Microbiol., 9:287–294.

Takarada, H., Sekine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N., Harayama, S. J. 2008. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. Bacteriol, 190:4139–4146.

Terkina, I.A., Parfenova, V.V., Ahn, T.S. 2006. Antagonistic activity of actinomycetes.

Tokala, R. K., J. L. Strap, C. M. Jung, D. L. Crawford, M. H. Salove, L. A. Deobald, J. F. Bailey, and M. J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol., 68:2161-2171. of Lake Baikal. Appl. Biochem. Microbiol., 42 (2), 173–176.

Turgay, K., Krause, M., and Marahiel, M.A. 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. Mol. Microbiol., 6, 2743–2744.

Upton, M. 1994. Ecological Approaches to Selective Isolation of Actinomycetes for Bioactivity Screening [Thesis]. Newcastle upon Tyne UK: Univ of Newcastle

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Dery, C., Brzezinski, R., Beaulieu, C. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol., 62, 1630–1635.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, GF., Chater, KF., & van Sinderen, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol., R 71: 495–548.

Waksman, SA. 1953. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. Science. 118:259–266.

Walsh, CT. 2008. The Chemical Versatility of Natural-Product Assembly Lines. Acc. Chem Res., 41:4-10.

Weber, T., Marahiel, M.A., 2001. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. Structure, 9:3-9.

Williams, S.T. 1976. *Streptomyces* in the soil ecosystem. *Nocardia* and *Streptomyces*. In: Modarski, M., Kurylowicz, W., Jeljaszewicz, J. (Eds.), Proceedings of the International Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces*, 1978. Gustav Fischer Verlag, pp. 137–144. Stuttgart.

Williams, ST. 1978. *Streptomyces* in the soil ecosystem. Zentral Bakteriell Parasiten Infektion Hygiene. Abteilung 1. Suppl., 6:137-144.

Williams, ST., Shameemullah, M., Watson, ET., Mayfield, CI. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VI The influence of moisture tension on growth and survival. Soil Biol. Biochem., 4:215-225.

Williamson, NR., Fineran. PC., Leeper, FJ., Salmond, GPC. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nat. Rev. Microbiol., 4:887–899.

Williams, ST., Wellington, E.M.H & Tipler, L.S. 1980. The taxonomic implications of the reactions of representative *Nocardia* strains to actinophage. J.gen.Microbiol., 119: 173-178.

Xin, Y., Kanagasabhapathy, M., Janussen, D., Xue, S., Zhang, W. 2011. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from Antarctic deep-sea sponges. Polar Biol., DOI 10.1007/s00300-011-1009.

Yılmaz, E.İ., Kızıl, M., Yavuz, M., 2008. Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomyces Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 1461-1470.

Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang, F. 2009. The Screening of Antimicrobial Bacteria with Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China Sea Sponges. Mar. Biotechnol., 11:346–355.

Zhao, J., Yang, N., Zeng, R. 2008. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. Extremophiles, 12: 97–105.

Zhao, X. Q., Jiao, W. C., Jiang, B., Yuan, W. J., Yang, T. H., Hao, S. 2009. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. World J Microbiol Biotechnol., 25: 859–866.

Zhou, K., Zhang, X., Zhang, F .and Li, Z. 2011. Phylogenetically Diverse Cultivable Fungal Community and Polyketide Synthase (PKS), Non-ribosomal Peptide Synthase (NRPS) Genes Associated with the South China Sea Sponges. Microb Ecol., DOI 10.1007/s00248-011-9859-y.

Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., and Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan strait, China. FEMS Microbiol. Lett., 188: 87–91.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Bülent

Soyadı: BALI

Doğum tarihi: 20/01/1986

Doğum yeri: Diyarbakır

Medeni hali: Bekar

Yabancı dili: İngilizce

EĞİTİM DURUMU

İlkokul: Yahya Kemal Bayatlı İlköğretim Okulu (1996)

Ortaokul: Yunus Emre İlköğretim Okulu (1999)

Lise: Ziya Gökalp Lisesi (Y.D.A) (2003)

Lisans: Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009)