

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NİSİN DİRENÇLİLİK GENLERİNİN LAKTİSİN 481 ÜRETİCİSİ
L. lactis subsp. *lactis* MBLL9 SUŞUNDA İFADESİ**

Ercan KOCA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2009**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NİSİN DİRENÇLİLİK GENLERİNİN LAKTİSİN 481 ÜRETİCİSİ *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 SUŞUNDA İFADESİ

Ercan KOCA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, nisin dirençlilik (*nisFEG* ve *nisI*), regülasyon (*nisRK*) ve regülasyon/dirençlilik (*nisRKFEG*) genlerinin laktisin 481 üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşundaki ifadesi araştırıldı. Araştırmada *nisFEG* (LL175), *nisI* (LL176), *nisRK* (LL177), *nisRKFEG* (LL178) genlerini ifade eden rekombinant suşların ve kontrol suşun (MBLL9) laktisin 481 üretiminin, sırasıyla 80.000 AU L⁻¹, 80.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹ ve 80.000 AU L⁻¹ düzeylerinde olduğu tespit edildi. LL177 ve LL178 rekombinant suşlarının laktisin 481 üretiminde meydana gelen azalmalar, LL175 ve LL176 rekombinant suşlarında görülmemesi nedeniyle, nisin regülasyon genlerinin (*nisRK*) ifadesiyle ilişkili bulundu. Bu durum, söz konusu lantibiyotiklerin her ikisinin de yeter sayı algılama mekanizmasıyla regüle edildiğini ve birbirinden bağımsız çalışan ancak aynı sinyal iletim yolunu kullanan regülatör sistemler arasındaki uyumsuzluğa işaret etmektedir. Ayrıca 1 IU mL⁻¹ nisinin indükleyici molekül olarak gelişme ortamına ilave edilmesinin kontrol suşun ve rekombinant suşların laktisin 481 üretiminde değişiklik meydana getirmediği bulgusu da, regülasyonların farklı regülatörler tarafından yapıldığını desteklemektedir. Rekombinant suşlarda nisin dirençliliği, kontrol suşunun (MBLL9) 250 IU mL⁻¹ olan doğal nisin dirençlilik düzeyi ile kıyaslandığında LL175, LL176 ve LL178 suşlarında sırasıyla 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹ ve 500 IU mL⁻¹ düzeylerine yükseldiği, LL177 suşunda ise 100 IU mL⁻¹ düzeyine düştüğü saptandı. LL177 suşunun laktisin 481 üretim düzeyinde meydana gelen azalmanın, aynı zamanda bu suşun nisin dirençlilik düzeyinde de saptanması, nisin ve laktisin 481 üretimini kontrol eden iki elemanlı regülatör sistemler arasındaki uyumsuzluk görüşünü destekler niteliktedir. LL178 suşunda LL175 suşuna oranla nisin dirençlilik düzeyinde daha yüksek bir oranda artışın meydana gelmesi, *nisRK* genlerinin otoindüksiyon işlevi ile ilişkili bulundu. Nisin üreticilerinde dirençlilik proteini olarak işlev gören *nisI* gen ürününün, laktisin 481 üreticisi LL176 suşunda da aynı etkinliğe sahip olduğunun gösterilmesi, *nisI* fonksiyonunun tanımlanması açısından önemli bir bulgudur.

Haziran 2009, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, laktisin 481, laktisin 481 regülasyonu, nisin dirençlilik, nisin regülasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

EXPRESSION OF NISIN RESISTANCE GENES IN LACTICIN 481 PRODUCER
L. lactis subsp. *lactis* MBLL9

Ercan KOCA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, expression of nisin resistance (*nisFEG* ve *nisI*), regulation (*nisRK*) and regulation/resistance (*nisRKFEG*) genes in lacticin 481 producer strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBLL9, was investigated. In the research, it was determined that lacticin 481 production of recombinant strains expressing *nisFEG* (LL175), *nisI* (LL176), *nisRK* (LL177), *nisRKFEG* (LL178) genes and control strain (MBLL9) were in the level of 80.000 AU L⁻¹, 80.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹, 40.000 AU L⁻¹ and 80.000 AU L⁻¹, respectively. Reductions that occurred at the lacticin 481 production of LL177 and LL178 recombinant strains were found related to expression of nisin regulation genes (*nisRK*), because it wasn't shown in LL175 and LL176 recombinant strains. This situation points out that both of the lantibiotics in question are regulated with quorum sensing mechanism, and disharmony between the regulator systems which work independently, but use same signal transduction pathway. Furthermore, the evidence -addition of 1 IU mL⁻¹ nisin as inducing molecule to growing mediums didn't generate difference in lacticin 481 production of control strain and recombinant strains-supports that regulations are performed by different regulators. When compared with 250 IU mL⁻¹ spontaneous nisin resistance level of control strain (MBLL9), it was detected that nisin resistance levels in LL175, LL176 and LL178 strains increased to 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹ and 500 IU mL⁻¹ levels, respectively, but in LL177 strain it decreased to 100 IU mL⁻¹. The detection of reduction which was both occurred at lacticin 481 production level of LL177 strain and also detected at this strain's nisin resistance level, supports the disharmony view between two-component regulator systems that control nisin and lacticin 481 production. When compared with LL175 strain, the relatively high increase at nisin resistance level of LL178 strain was found related with autoinduction function of *nisRK* genes. In terms of defining the function of *nisI*, it is a prominent evidence that *nisI* gene product that function as a resistance protein in nisin producers, was also proved to have same activity in lacticin 481 producer LL176.

June 2009, 64 pages

Key Words: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lacticin 481, lacticin 481 regulation, nisin resistance, nisin regulation

TEŞEKKÜR

Başta bana bu konuda çalışma imkanı sunan, her zaman bilgi, yardım ve önerilerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e olmak üzere;

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Araş. Gör. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e;

Güzel anılarla hatırlayacağım, laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim ve yardımlarını esirgemeyen çalışma grubu arkadaşlarımdan; Neslihan TAŞKALE'ye, Dr. Başar UYMAZ'a, Araş. Gör. Nefise AKKOÇ'a, Duygu ABBASOĞLU'na, Meral KAYA'ya, Selcan KASAPLAR'a, Ayla GHAMAT'a ve Dr. Banu ÖZDEN'e;

Ve ayrıca canım aileme;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ercan KOCA

Ankara, Haziran 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Laktisin 481.....	3
2.1.1 Laktisin 481'in yapısal özellikleri.....	3
2.1.2 Antimikrobiyel etki şekli ve stabilitesi.....	5
2.1.3 Laktisin 481 üretiminden sorumlu gen kümesi.....	6
2.1.4 Laktisin 481 biyosentez genleri.....	7
2.1.5 Laktisin 481 dirençlilik genleri.....	8
2.1.6 Laktisin 481 regülasyon genleri.....	9
2.1.7 Laktisin 481 biyosentezi.....	11
2.2 Nisin.....	12
2.2.1 Nisin üretiminden sorumlu gen kümesi.....	13
2.2.2 Nisin dirençlilik genleri.....	14
2.2.3 Nisin biyosentezi.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Bakteri suşları ve plazmidler.....	18
3.1.2 Bakterilerin gelişme ortamları.....	18
3.2 Yöntem.....	20
3.2.1 Rekombinant suşların oluşturulması.....	20
3.2.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> suşundan genomik DNA izolasyonu.....	20
3.2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları.....	20
3.2.1.3 Restriksiyon endonükleaz ve fosfataz uygulamaları.....	21
3.2.1.4 Ligaz uygulaması.....	22

3.2.1.5 <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması.....	23
3.2.1.6 Rekombinant plazmidlerin <i>E. coli</i> hücrelerine elektroporasyonu.....	24
3.2.1.6 <i>L. lactis</i> hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması.....	24
3.2.1.7 Rekombinant plazmidlerin <i>L. lactis</i> hücrelerine elektroporasyonu.....	25
3.2.2 Plazmid DNA izolasyonları.....	26
3.2.2.1 <i>E. coli</i> suşlarından plazmid DNA izolasyonu.....	26
3.2.2.2 <i>L. lactis</i> suşlarından plazmid DNA izolasyonu.....	26
3.2.3 Laktisin 481 ve özgül laktisin 481 aktivitesinin tespiti.....	29
3.2.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının farklı nisin konsantrasyonlarına karşı gelişim düzeylerinin belirlenmesi.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 Suşuna Aktarılarak Rekombinant <i>L. lactis</i> Suşlarının Oluşturulması.....	31
4.2 Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin Laktisin 481 Üretimine Etkilerinin Belirlenmesi.....	37
4.3 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 ve Rekombinantlar Suşların Farklı Nisin Konsantrasyonlarına Karşı Gelişim Düzeyleri.....	46
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
AU	Arbitrary Unit
bç	Baz çifti
Dha	Dehidroalanin
Dhb	Dehidrobütirin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
g	Gram
GRAS	Genel olarak güvenilir
IU	International Unit
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Laktisin 481'in birincil yapısı ve yapısında bulunan nadir amino asitler.....	4
Şekil 2.2	Laktisin 481 gen kümesi ve gen bölgelerinden oluşturulan transkriptler, Tn5721 ve komşu bölgesinin genetik organizasyonu.....	7
Şekil 2.3	Laktisin 481 gen kümesi, terminatörler ve regülasyondan sorumlu promotorların yerleşimi.....	10
Şekil 2.4	P170, P1 ve P3 promotorlarında yer alan ACID-box.....	10
Şekil 2.5	<i>L. lactis</i> 'te asit teşvikli regülasyonunun şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.6	Nadir amino asitlerin sentezi ve laktisin 481 biyosentezi.....	12
Şekil 2.7	Nisin A'nın birincil yapısı ve yapısındaki nadir amino asitler.....	13
Şekil 2.8	Nisin Z üretimi, regülasyonu ve dirençliliğinde görevli genler.....	14
Şekil 2.9	Nisin üretiminden sorumlu biyosentez, regülasyon ve dirençlilik mekanizmalarının şematik gösterimi.....	17
Şekil 4.1	PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri.....	32
Şekil 4.2	pNI, pNRK, pNFEG ve pNRKFEG rekombinant plazmidlerinin oluşturulma aşamaları.....	33
Şekil 4.3	pLEB124 ve rekombinant plazmidler.....	34
Şekil 4.4	Restriksiyon işlemi sonucunda elde edilen fragmentler.....	35
Şekil 4.5	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının plazmid profilleri.....	36
Şekil 4.6	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu, pLEB124 plazmidini taşıyan <i>L. lactis</i> LL179 suşu ve rekombinant suşlar tarafından üretilen laktisin 481'in <i>M. luteus</i> suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.....	39
Şekil 4.7	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının laktisin 481 üretim düzeyleri.....	40
Şekil 4.8	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının 1 IU mL-1 nisin varlığında laktisin 481 üretim düzeyleri.....	41
Şekil 4.9	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının özgül laktisin 481 üretim düzeyleri.....	43

Şekil 4.10	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının 1 IU mL-1 nisin varlığında özgül laktisin 481 üretim düzeyler.....	44
Şekil 4.11	Nisin içermeyen ortamda <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşu ve rekombinant suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	47
Şekil 4.12	100 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	48
Şekil 4.13	200 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	49
Şekil 4.14	250 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	50
Şekil 4.15	300 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	51
Şekil 4.16	350 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	52
Şekil 4.17	400 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	53
Şekil 4.18	500 IU mL-1 nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışma kapsamında kullanılan bakteri suşları ve plazmidler.....	19
Çizelge 3.2	Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan PZR karışımı.....	21
Çizelge 3.3	Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler.....	21
Çizelge 4.1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 doğal suşu ve rekombinant <i>L. lactis</i> suşlarının bakteriyel gelişme düzeyleri ve laktisin 481 üretimleri.....	42

1. GİRİŞ

Lantibiyotikler, translasyon sonrası gerçekleşen enzimatik modifikasyonlar sonucu lantionin ya da β -metillantionin gibi nadir bulunan amino asitleri yapılarında bulunduran bakteriyosinlerdir. Bu grup bakteriyosinlerin en bilinen üyesi, gıda endüstrisinde çok yaygın uygulama olanağı bulan nisindir. GRAS (genel olarak güvenli) düzeyli bir organizma olan *Lactococcus lactis*'in atipik suşları tarafından üretilen nisin; başta peynirler olmak üzere, konserve gıdalar ve diğer süt ürünlerinde gıda koruyucusu olarak tüm dünyada kullanılmaktadır.

Bakteriyosinlerin, gıdaların mikrobiyel güvenlik ve kalite özelliklerinin artırılmasında katkı maddesi olarak kullanımları yanında, bakteriyosin üreticisi suşların doğrudan gıda sistemlerinde kullanımı da endüstriyel gıda koruma programlarının ana çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Bu doğrultuda en yaygın kullanım alanı bulan laktokok suşları yine nisin üreticileridir. Ancak son 20 yıldır, nisine yakın bir antimikrobiyel aktivite etkinliği gösteren laktisin üreticisi *L. lactis* üyeleri de özellikle starter kültür suşu olmayan laktik asit bakterilerinin inhibisyonunun gerçekleştirilmesi amacı ile fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Diğer yandan, laktisin 481 üreticilerinin üreme oranlarının, diğer starter kültür suşlarına kıyasla daha düşük oluşu, yavaş olgunlaştırılan peynir türlerinde starter kültür suşu olarak kullanımlarında büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Bakteriyosinlerin gıda katkı maddesi olarak etkinliklerinin artırılmasında genel kabul gören yeni yaklaşım, bu antibakteriyel bileşiklerin farklı kombinasyonlarının kullanımınıdır. Konserve gıdalar ve fermente süt ürünlerinin bu uygulamaya tabi tutulmasında öne çıkan bakteriyosinler nisin ve laktisindir. Nisin en geniş antimikrobiyel etkinliğe sahip olmasından dolayı ana koruyucu ajan olarak, genellikle doğrudan söz konusu gıdalara katılmakta, laktisin 481 üreticileri ise hem gıda koruyucu ve hem de gıda kalitesine katkı amacı ile canlı kültürler halinde kullanılmaktadır. Bu kombinasyonların kullanılmasında ana sorun katkı maddesi olan nisinin, canlı kültürler olarak ilave edilen bakteriyosin üreticilerine karşı antagonistik etki oluşturmasıdır.

Bu tez çalışmasında, gıda sistemlerinde birlikte kullanımları halinde kalite ve güvenlik açısından yüksek düzeyde katkı sağlayacak nisin preparatları ve laktisin 481 üreticisi suşlarında antagonistik etkiyi ortadan kaldıracak genetik düzenlemelerin yapılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda laktisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşuna nisin dirençlilik ve regülasyon genlerinin aktarımı sonucu, nisin dirençlilik yeteneğinin geliştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar ışığında ayrıca, aynı grup üyesi olan iki lantibiyotiğin regülasyon ve dirençlilik sistemlerinin aynı suştaki etkileşimleri tanımlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktisin 481

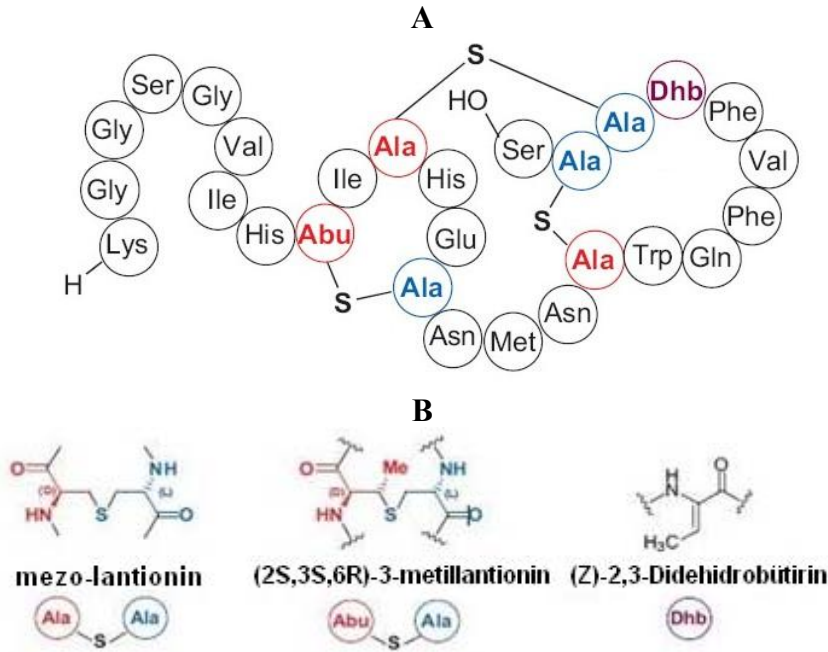
Laktisin 481, lantibiyotik ailesine ait antimikrobiyel bir peptittir (Piard *et al.* 1992, Piard *et al.* 1993, Rincé *et al.* 1997, Uguen *et al.* 2005). Tek peptit zincirinden oluşan bu bakteriyosin, ismini verdiği laktisin 481 grubunun en geniş ölçüde çalışılmış üyesidir (Dufour *et al.* 2000, Guder *et al.* 2000, Twomey *et al.* 2002, Xie *et al.* 2004, Uguen *et al.* 2005). Laktisin 481, bakteriyosin sınıflandırmasında, lantibiyotiklerin yer aldığı grup I bakteriyosinleri arasında yer almaktadır (Piard *et al.* 1993, Rincé *et al.* 1997, Dufour *et al.* 2007).

Laktisin 481, bazı atipik *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretilmektedir (Piard *et al.* 1992, Rincé *et al.* 1994, Rodríguez *et al.* 2000, Özkalp *et al.* 2007). Bu bakteriyosin, birçok laktik asit bakterisi yanında, bozulma etkeni *Clostridium tyrobutyricum* bakterisinin de gelişimini engelleme özelliğine sahiptir. Ayrıca, starter suşları yıkıma uğratması neticesinde çeşitli hücre içi enzimleri açığa çıkartarak peynir olgunlaşmasını hızlandırması ve starter olmayan laktik asit bakterilerinin gelişimini engellemesi, laktisin 481'in peynir üretiminde kullanım olanağı bulabileceğine işaret etmektedir (Thuault *et al.* 1991, O'Sullivan *et al.* 2002, O'Sullivan *et al.* 2003, Ávila *et al.* 2005, Özkalp *et al.* 2007). Peynirde yüksek basınç ile birlikte laktisin 481 uygulamasının, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve gram negatif bakteri *Escherichia coli* O157:H7 gibi hastalık etkeni bakteriler üzerinde etkili olduğu da belirlenmiştir (Arqués *et al.* 2005a, Arqués *et al.* 2005b, Rodríguez *et al.* 2005, Akkoç *et al.* 2008).

2.1.1 Laktisin 481'in yapısal özellikleri

Laktisin 481'in birincil yapısının ortaya çıkartılması için ilk çalışmalar Piard *et al.* (1992, 1993) tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmalarda, 27 amino asitlik karboksi (C) terminal propeptit ve 24 amino asitlik amino (N) terminal lider peptitin oluşturduğu 51 amino asitlik öncü peptit yapısı tanımlanmıştır. İki boyutlu NMR tekniği kullanılarak oluşturulan laktisin 481 yapısal modelinde, lantionin (Lan), metillantionin (MeLan) ve

dehidrosibütirin (Dhb) gibi nadir amino asitlerin bulunduğu saptanmıştır. Bu model temelinde tahmin edilen moleküler kütle ile, kütle spektrometrisi analizleri birbiriyle uyumlu sonuçlar vermiştir. Söz konusu çalışmalar ışığında laktisin 481'in moleküler kütlelerinin 2901 dalton olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, laktisin 481 yapısındaki tiyoeter köprülerinin pozisyonları için olası iki model önerilmiştir (Piard *et al.* 1993). Tiyoeter köprülerinin kesin pozisyonları ise, van den Hooven *et al.* (1996) tarafından tanımlanan peptit kimyası kombinasyonları, kütle ve NMR spektrometrisi analiz sonuçları ile kesinlik kazanmıştır. Bu çalışmalar neticesinde, tiyoeter köprülerinin 9. ile 14., 11. ile 25. ve 18. ile 26. amino asit kalıntıları arasında olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1) (van den Hooven *et al.* 1996). Yapısında yer alan tiyoeter köprüleri, laktisin 481'in C-terminal kısmının N-terminal kısmına oranla globüler yapıda olmasını sağlamaktadır (Sahl *et al.* 1995, Uguen *et al.* 2000, Dufour *et al.* 2007). Laktisin 481'in nötral pH'da net yükü yoktur ve hidrofobiktir (Sahl *et al.* 1995, Kaiser *et al.* 1998, Willey and van der Donk 2007).



Şekil 2.1 Laktisin 481'in birincil yapısı (A) ve yapısında bulunan nadir amino asitler (B) (Willey and van der Donk 2007)

2.1.2 Antimikrobiyel etki şekli ve stabilitesi

Laktisin 481'in antibakteriyel etkisinin, hedef hücre membranında por oluşumu yoluyla gerçekleştiği görüşü yaygındır. Bu etki şeklinde bakteriyosin, iyonların ve küçük moleküllerin sızmasına sebep olan voltaj-bağımlı, kısa ömürlü porlar oluşturma yoluyla hedef hücreye tesir eder (Sahl 1991, Abee 1995, Jack *et al.* 1995, Rincé *et al.* 1997). Laktisin 481 grubu lantibiyotiklerin, bakteriyosinleri, hücre membranından hücre dışı ortama çıkarma şeklindeki korunma sistemini paylaşmaları, bu gruptaki tüm lantibiyotiklerin hücre membranını hedeflediklerine işaret etmektedir (Dufour *et al.* 2007, Willey and van der Donk 2007). Hücre membranında por oluşturma hipotezini destekleyen çalışmalar, laktisin 481'in, yapay lipid tek-tabakasıyla etkileşiminin belirlenmesini esas almaktadır. Bunun yanı sıra, laktisin 481'in nisin Z'ye kıyasla, zivitteryonik lipitlere anyonik lipitlerden daha çok ilgi gösterdiği de saptanmıştır. Bu sonucun, laktisin 481'in farklı antimikrobiyel aktivite spektrumu ile ilişkilendirilebileceğine dikkat çekilmiştir. Ayrıca laktisin 481 grubu bakteriyosinlerin, lipid II'ye bağlanma yoluyla etki şekli gösterebileceği de düşünülmektedir (Demel *et al.* 1996, Dufour *et al.* 2007).

Laktisin 481'in N-terminalinde yer alan lizin amino asitinin biyolojik aktivitesi için gerekli olmadığı ancak beş adet N-terminal amino asidin yokluğunda, antimikrobiyel aktivitenin yaklaşık on kat azaldığı saptanmıştır. Laktisin 481'in yapısında yer alan lantionin ve metillantionin köprülerinin yer değişimi antimikrobiyel aktivitesinde önemli değişimlere yol açmamakla birlikte, bu köprülerin yıkımı durumunda aktivitenin kaybolduğu belirlenmiştir (Xie *et al.* 2004, Uguen *et al.* 2005, Chatterjee *et al.* 2006, Willey and van der Donk 2007).

100 °C'de 15-30 dakika sıcaklık muamelesi sonrasında antibakteriyel etkinliğini kaybetmeyen laktisin 481, pH 4-10 gibi geniş bir aralıkta etkinliğini sürdürmektedir (Dufour *et al.* 2007). Lantibiyotiklerde bulunan nadir amino asitler biyolojik aktivite ve yapısal stabilitenin sağlanmasında kritik bir rol üstlenmektedir. Tiyoeter köprülerinin, lantibiyotiklerin biyolojik olarak aktif konformasyonunu kilitli tutma yoluyla yapısal stabilite sağladığı kanıtlanmıştır. Ayrıca lantionin ve metillantionin kalıntılarının, potansiyel ayrılma bölgelerini kısıtlayarak, lantibiyotik yapısını proteazlara karşı

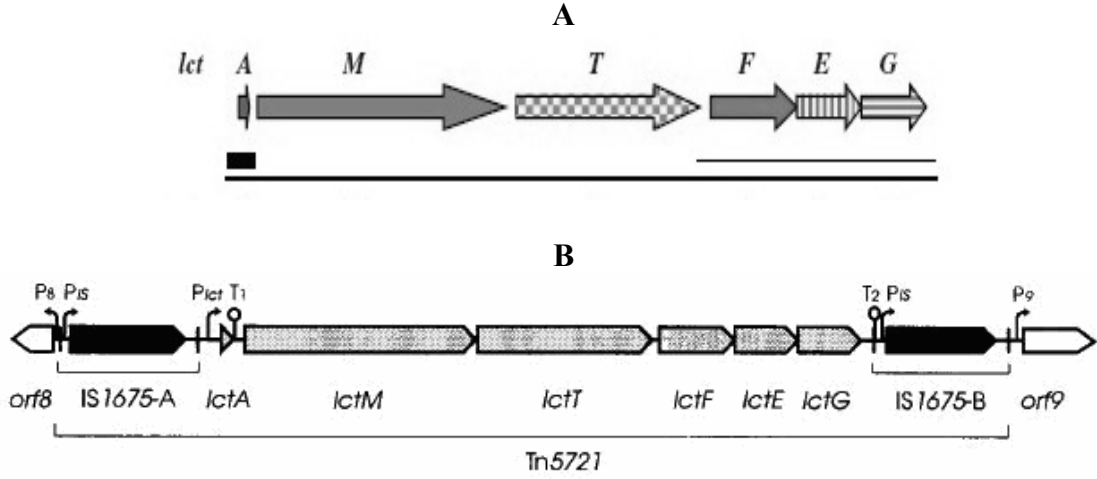
korumada görev aldığı belirlenmiştir (Nagao *et al.* 2006, Dufour *et al.* 2007, Draper *et al.* 2008).

2.1.3 Laktisin 481 üretiminden sorumlu gen kümesi

Piard *et al.* (1993) tarafından gerçekleştirilen DNA dizilim analizinde, *lct* geninin yukarı akış yönünün varsayılan bir açık okuma çerçevesinin sonu olduğu ve veri tabanı taramasında bu bölgeye karşılık gelen protein diziliminin *Escherichia coli* IS4 insersiyon elementlerinden transpozaz (Tpaz) ile % 26 benzerlik taşıdığına dikkat çekilmiştir. Rincé *et al.* (1994), laktisin 481'in genetik determinantlarını *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ADRIA 85L030 suşunda 70 kb'lık plazmid (pOS5) üzerinde tespit etmiş ve ayrıca *lct* genlerinin yukarı akış yönündeki promotorları (P1, P2 ve P3) tanımlamıştır. Dufour *et al.* (2000), laktisin 481'in genetik organizasyonunu 70 kb'lık plazmid üzerinde karmaşık transpozon olarak tanımlanan Tn5721'i oluşturma potansiyeline sahip IS1675'in iki kopyası arasında olduğunu saptamıştır (Şekil 2.2). Ayrıca, IS1675'in, transpozaz enzimini kodlayan IS4 ailesinin bir üyesi olduğu da bu çalışmada belirlenmiştir (Dufour *et al.* 2000). Tn5721'de çevreleyen genlerin laktisin 481 biyolojisi ile ilişkili olmadığından, bu gen kümesinin sadece altı gen (*lctAMTFEG*) içerdiği tanımlanmıştır (Dufour *et al.* 2007). Laktisin 481 üretiminden sorumlu genlerin, *L. lactis* suşları 147G, OC2 ve MN24'de sırasıyla 82 kb, 16 kb ve 22,4 kb'lık plazmidler üzerinde yer aldığı da saptanmıştır (Phillidge *et al.* 2000, Akçelik *et al.* 2006, Akkoç *et al.* 2008).

Laktisin 481 sentezinde, tek bir operondan *lctAMTFEG* şeklinde transkript oluşturulmaktadır (Şekil 2.2). Ayrıca laktisin 481 operonunun dirençlilik genleri *lctFEG*, hem *lctAMT* ile birlikte, hem de *lctT*'de yer alan zayıf bir promotor (P4) sayesinde bağımsız olarak da transkribe edilmektedir (Şekil 2.2). Yapılan çalışmalarda, *lctAMTFEG* ve *lctFEG* transkriptlerinin 30:1 oranında sentezlendiği tespit edilmiştir. Laktisin 481 yapısal geni *lctA*, aşağı akış yönü biyosentez genleriyle birlikte ya da *lctA* monosistronik mRNA'sını oluşturacak şekilde transkribe edilebilmektedir. *lctA* ve *lctM* arasında yer alan T1 terminatörü ile oluşturulan *lctA* mRNA'sının, *lctAMT*

transkriptinden 12 kat daha fazla sentezlendiği saptanmıştır (Hindré *et al.* 2004, Dufour *et al.* 2007, Draper *et al.* 2008).



Şekil 2.2 Laktisin 481 gen kümesi ve gen bölgelerinden oluşturulan transkriptler (A) (Dufour *et al.* 2007), Tn5721 ve komşu bölgesinin genetik organizasyonu (B) (Dufour *et al.* 2000)

2.1.4 Laktisin 481 biyosentez genleri

Piard *et al.* (1992), *Lactococcus lactis* CNRZ 481 suşunun ürettiği bakteriyosini saflaştırılıp, kısmi amino asit dizilimini belirlemiş ve bu bakteriyosini laktisin 481 olarak isimlendirmiştir. Bu çalışmaların devamında yapısal genin DNA dizilimi belirlenmiş ve *lctA* olarak tanımlanmıştır (Piard *et al.* 1993). Rincé *et al.* (1994) bu çalışmalardan bağımsız olarak *L. lactis* ADRIA 85LO30 tarafından üretilen bakteriyosini tanımlamış ve laktokoksin DR olarak isimlendirmiştir. Bu yayında, 70 kb'lık plazmid üzerinde yer alan operonda, *lcnDR1*, *lcnDR2* ve *lcnDR3* olarak adlandırılan üç gen tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra, *lcnDR1*'in laktisin 481'in yapısal geni *lctA* ile özdeş olduğunu saptamış ve laktokoksin DR, *lcnDR1*, *lcnDR2* ve *lcnDR3* sırasıyla laktisin 481, *lctA*, *lctM* ve *lctT* olarak değiştirilmiştir (Rincé *et al.* 1997). 922 amino asit içeren ve 108,1 kDa moleküler ağırlığa sahip olan LctM'nin, LasM ve CylM ile benzerlikler taşıması hem dehidrasyon hem de halka oluşumunda fonksiyonu olduğuna işaret etmiştir (Rincé *et al.* 1994, Siezen *et al.* 1996, Rincé *et al.* 1997). LctM'nin peptit olgunlaşmasındaki rolü hakkında ilk deneysel kanıt Uguen *et al.* (2000) tarafından sağlanmıştır. Bu yayında, maya ikili hibrid sisteminde

LctM ile laktisin 481 prepeptiti LctA arasındaki doğrudan etkileşim tanımlanmıştır. Xie *et al.* (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *in vitro* koşullarda LctM'nin LctA'yı translasyon sonrası modifikasyonlarla aktif laktisin 481'e dönüştürmesi, LctM'nin biyosentezdeki rolünü netleştirmiştir. Bu çalışmalarda, Tip AII lantibiyotiklerin biyosentez proteini LanM'nin, LanB ile benzerlik taşımadığı fakat LanM'ye ait C-terminalin LanC proteinleri ile % 20-27 dizilim homolojisi gösterdiği saptanmıştır (Siezen *et al.* 1996, Uguen *et al.* 2000, Xie *et al.* 2004).

Lantibiyotiklerin antimikrobiyel aktivitelerini kazanmaları için, N-terminal lider peptit öncü peptitten ayrılmalı ve sitoplazma membranını geçerek hücre dışına transfer edilmelidir. Lantibiyotik biyosentezinde yer alan diğer bir gen olan *lctT* (*lcnDR3*) ürününün 691 amino asitten oluştuğu ve ABC (ATP-bağlayıcı kaset) taşıma proteinleriyle büyük oranda benzerlik taşıdığı bildirilmiştir (Rincé *et al.* 1994, Uguen *et al.* 2005). Laktisin 481 grubunun *lanT* geni tarafından kodlanan proteinin fonksiyonları, N-terminal proteaz bölgesine sahip ABC taşıma proteinleriyle benzerliği tanımlanarak açıklanmıştır. Bu tip taşıyıcı proteinler (AMS proteini; ABC-içeren olgunlaşma ve salgılama proteini), lider peptitin ayrılması ve çift glisin tipi (GG, GA) lider peptite sahip bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması gibi ikili fonksiyonları yerine getirmektedir (Håvarstein *et al.* 1995, Franke *et al.* 1999, Uguen *et al.* 2005). AMS proteinleri, tip AI lantibiyotiklerdeki LanT ile karşılaştırıldığında fazladan bir N-terminal sistein peptidaz bölgesi içermektedir. Fakat proteaz fonksiyonu henüz tanımlanamamıştır (Nagao *et al.* 2006).

2.1.5 Laktisin 481 dirençlilik genleri

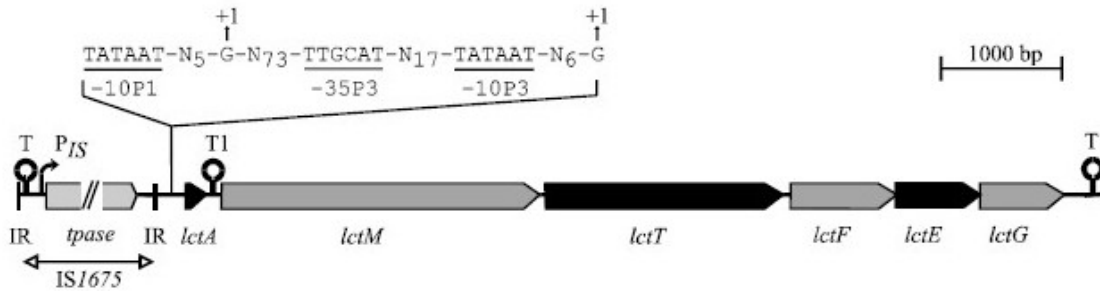
Rincé *et al.* (1997) tarafından laktisin 481 gen kümesinde üç açık okuma çerçevesi (*lctF*, *lctE* ve *lctG*) daha tanımlanmıştır (Şekil 2.2). *lctF* (306 amino asit), *lctE* (250 amino asit), *lctG* (245 amino asit) olarak isimlendirilen bu genlere ait ürünlerin hidrofobiklik profilleri ve dizilim benzerlikleri, bu ürünlerin ABC taşıma sistemi ile ilişkili olduğuna işaret etmiştir. Laktisin 481 duyarlı bir suşta üç genin birlikte ifadesi, bu suşu bakteriyosine dirençli hale getirmiştir. Bu üç genden herhangi birinin çıkarılması durumunda, laktisin 481'e karşı duyarlılığın meydana gelmesi, üç genin de laktisin 481'e dirençlilik için gerekli olduğunu kanıtlamıştır. Uguen *et al.* (2005)

tarafından yürütülen çalışmalarda da sadece *lctAMT* genlerinin ifadesinin üretici hücreler için toksik olduğu belirlenmiştir. Çoklu açık-okuma kalıbında kodlanan ve ABC-taşıma proteinleri olan LanFEG'nin, hücre membranına giren bakteriyosin molekülünü ortama geri göndererek taşıma rolü oynadığı ve böylece membranda bakteriyosin konsantrasyonunu kritik bir seviyenin altında tuttuğu ileri sürülmektedir (Chen and Hoover 2003, Dufour *et al.* 2007).

2.1.6 Laktisin 481 regülasyon genleri

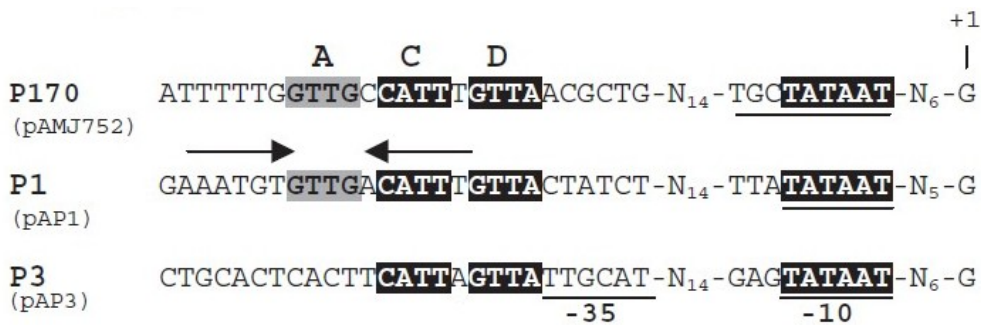
Uguen *et al.* (1999) tarafından yürütülen çalışmada, laktisin 481 üreticisi bir suşun, osmotik strese maruz kaldığında bakteriyosin üretiminin teşvik edildiği belirlenmiştir. Gelişme ortamına glisin betain veya analoglarının ilave edilmesi halinde bu etkinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Söz konusu etkinin transkripsiyonel seviyede oluşup oluşmadığı bilinmemekle birlikte, osmatik stres altındaki hücrelerin sitoplazmalarında laktik asit biriktirdikleri saptanmıştır (Uguen *et al.* 1999, Dufour *et al.* 2007).

Bazı araştırmacılar ise asit algılama yolu ile çalışan bir sistemin laktisin 481'in regülasyonunda rol aldığını ileri sürmektedir. Bu sistemde, *L. lactis* tarafından üretilen laktik asidin etkisiyle oluşan asidik pH laktisin 481 üretimine katılan promotorlardan transkripsiyonun indüksiyonunu gerçekleştirmektedir. Bu nedenle, laktisin 481 üretimi, ortamın tampon içeriği ve başlangıç pH'sına bağlı olarak bakteriyel üremenin sonrasında stimüle edilir. Bu regülasyon modelinde, *lctA*'nın yukarı ucunda yer alan, asit-indüklenebilen P1 ve P3 promotorlarında transkripsiyonel aktivasyon meydana gelmektedir. IS1675 ile *lctA* arasında yer alan P1 ve P3 promotorları (Şekil 2.3) bütün laktisin 481 operonunun transkripsiyonundan sorumludur. Ayrıca transkripsiyonel füzyon tekniği ile P3 promotorunun P1 promotorundan 3 kat daha güçlü olduğu tespit edilmiş, bununla birlikte P1 promotorunun regülasyonda daha etkili olduğu saptanmıştır (Hindré *et al.* 2004, Dufour *et al.* 2007).

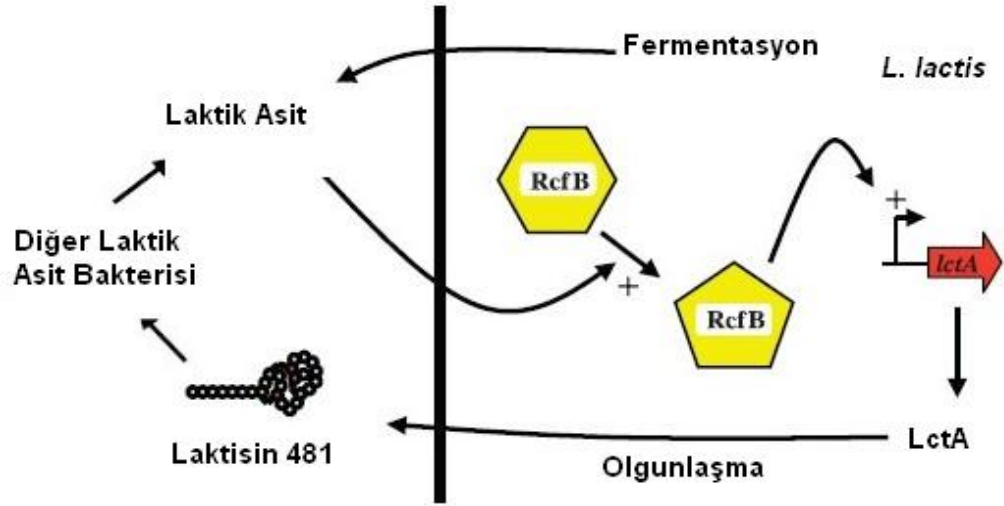


Şekil 2.3 Laktisin 481 gen kümesi, terminatörler ve regülasyondan sorumlu promotorların yerleşimi (Hindr  *et al.* 2004)

P1 ile P3 promotorları ve diğ er bir *L. lactis* asit-ind uklenmiş promotoru P170 arasındaki bir dizilim benzerliği (Şekil 2.4), her  c promotorun aynı regülatör tarafından kontrol edildiğini d ş nd r m şt r. P1 promotorunda karakterize edilen 14 bç'lik regülatör bölgeye bağlanan regülatörün RcfB olduğu ileri sürülmüştür. Önerilen bu regülatör, transkripsiyonel aktivatörlerin Crp-Fnr ailesi üyesidir. RcfB, global stres-benzeri bir protein ve çoklu-ilaç taşıyıcısıyla birlikte kromozomal olarak kodlanır. RcfB, büyük olasılıkla promotor P1, P170 ve kısmi olarak P3'e özgü DNA dizilimi olan özel bölgeye (ACID-box) transkripsiyonun başlamasını aktive etmek üzere bağlanır (Şekil 2.4). RcfB'nin hücrelerarası asit bir çevreyle karşılaştığında aktive olduğu ve *Lactococcus lactis*'in asit adaptasyonunda rol oynadığı önerilmiştir (Şekil 2.5). RcfB mutantlarının asidik koşullarda hayatta kalma yeteneğinin azalması (doğal suşun 130'da biri oranında), RcfB'nin bu regülasyondaki rolüne ait en önemli kanıttır (Madsen *et al.* 2005, Dufour *et al.* 2007).



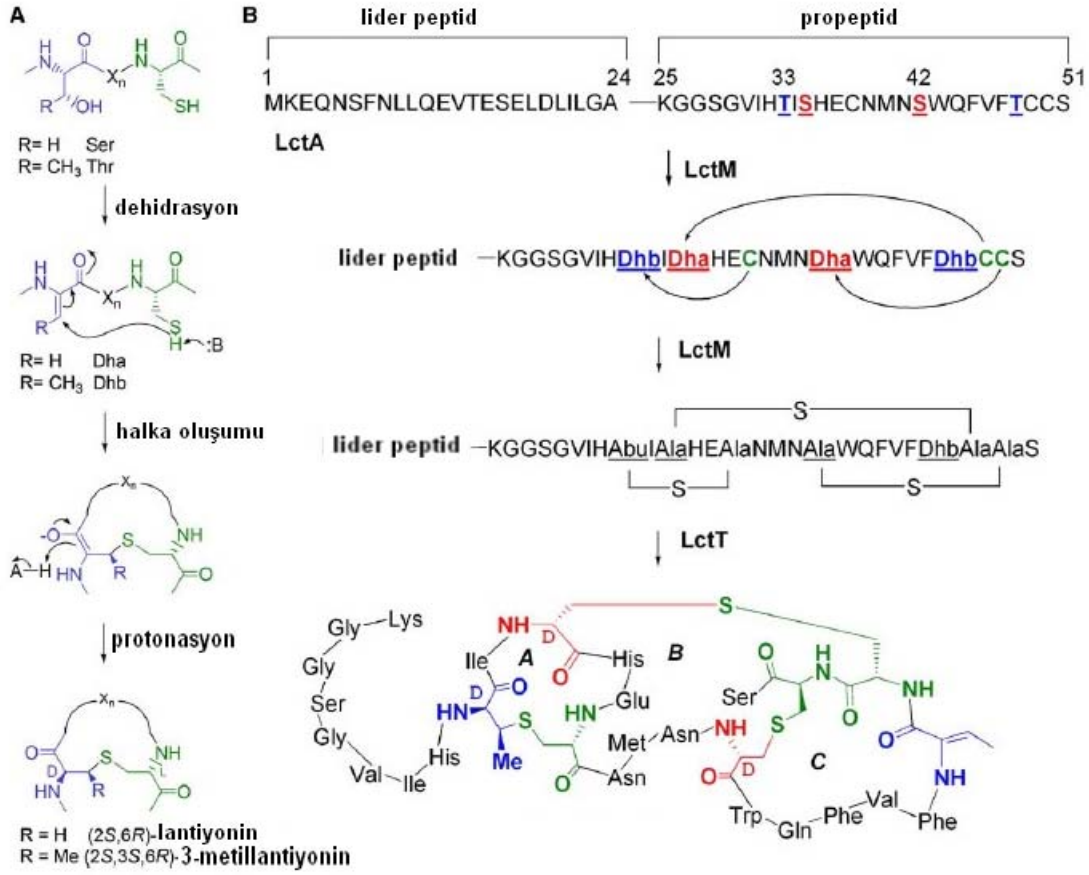
Şekil 2.4 P170, P1 ve P3 promotorlarında yer alan ACID-box (A, C ve D olarak gösterilen bölgeler) (Madsen *et al.* 2005)



Şekil 2.5 *L. lactis*'te asit teşvikli regülasyonunun şematik gösterimi (Dufour *et al.* 2007)

2.1.7 Laktisin 481 biyosentezi

Laktisin 481 biyosentezi, ribozomal olarak sentezlenen 51 amino asitten oluşan öncü peptitin translasyon sonrası modifikasyonları ile tamamlanmaktadır. Ribozomal sentezli öncü peptit (*LctA*) düzlemsel ve biyolojik olarak inaktif haldedir. Çift fonksiyona sahip *LctM* (Rincé *et al.* 1994, Xie *et al.* 2004, Uguen *et al.* 2005) tarafından, serin ve treonin amino asitleri dehidre edilir ve halka oluşumu (siklasyon) sağlanır. Yine çift fonksiyona sahip ikinci enzim *LctT* (Rincé *et al.* 1994, Sahl *et al.* 1995, Rincé *et al.* 1997, Uguen *et al.* 2005) modifiye edilmiş olan öncü peptiti hücre dışına taşır ve lider peptitin molekülden uzaklaştırılmasını sağlar. Böylece biyolojik olarak aktif, 27 amino asitten oluşan laktisin 481 molekülünün biyosentezi gerçekleştirilmiş olur (Şekil 2.6).



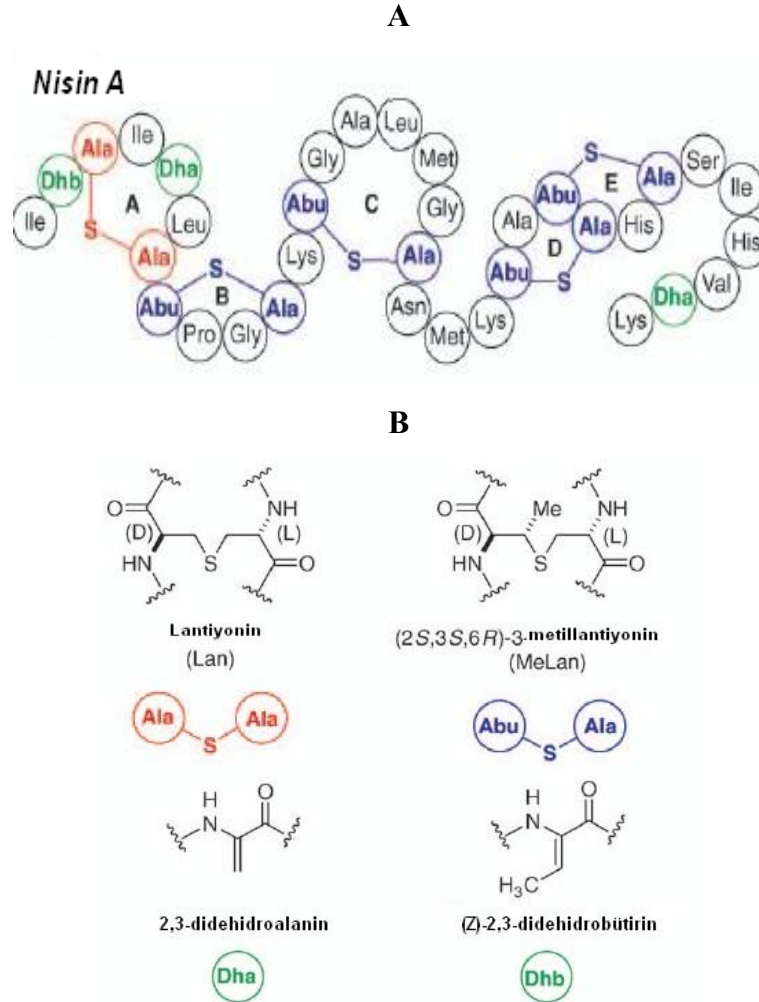
Şekil 2.6 Nadir amino asitlerin sentezi (A) ve laktisin 481 biosentezi (B) (Chatterjee *et al.* 2006)

2.2 Nisin

L. lactis suşları tarafından üretilen nisin, lantibiyotikler olarak adlandırılan I. Grup bakteriyosindir (Klaenhammer 1993, Nes *et al.* 1996). Özellikle *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere, Gram pozitif bakterilere karşı etkili antimikrobiyel özellik içermektedir (Hurst 1981, Lubelski *et al.* 2008). Nisin gıda koruyucusu olarak; süt ürünleri, sıvı yumurta, pastane mamulleri, sebze, et ve balık ürünlerinde kullanılmaktadır (Abee 1995, Delves-Broughton *et al.* 1996).

Nisin 3353 dalton moleküler ağırlığa sahip olan nisin, bir lantionin ve dört β-metil-lantionin halkası ve ayrıca dehidroalanin, dehidrobütirin gibi nadir amino asitleri içeren

34 amino asitten meydana gelmiştir (Şekil 2.7) (Patton and van der Donk 2005). Nisin antimikrobiyel etkisini, hedef hücrede por oluşturma ve hücre duvarı sentezini engelleme yoluyla gerçekleştirir (Sahl *et al.* 1987, Sahl 1991, Lubelski *et al.* 2008).

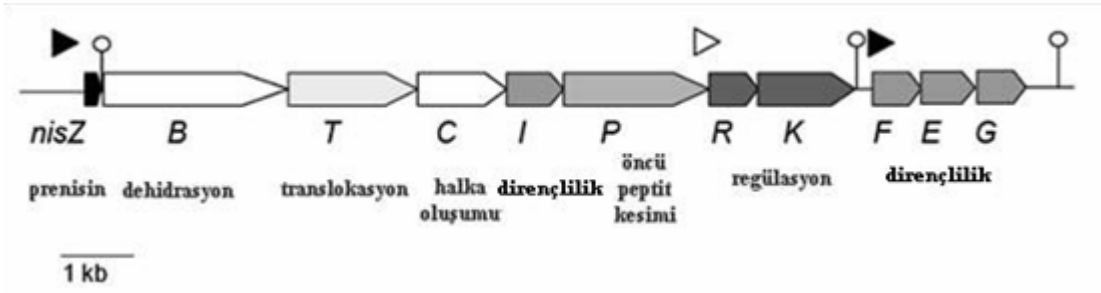


Şekil 2.7 Nisin A'nın birincil yapısı (A) ve yapısındaki nadir amino asitler (B) (Patton and van der Donk 2005)

2.2.1 Nisin üretiminden sorumlu gen kümesi

Lactococcus lactis suşlarının çoğunda nisin biyosentezi, 11 gen tarafından kodlanır (Şekil 2.8) ve söz konusu genler büyük bir konjugatif nisin-sakaroz transpozonunda yer almaktadır (Engelke *et al.* 1994, Kuipers *et al.* 1995, Siegers and Entain 1995, Ra *et al.* 1996, Siezen *et al.* 1996). Nisin varyantları A, Z, Q'nun biyosentezi ve üreticinin dirençliliği için gerekli genler, *nisA/Z/QBTCIPRK* ve *nisFEG* şeklinde nisin tarafından

teşvik edilebilen iki operonda organize olmuşlardır (Kuipers *et al.* 1995, de Ruyter *et al.* 1996). *nisRK* genleri önünde konstütatif bir promotor bulunmaktadır (de Ruyter *et al.* 1996). Ayrıca *nisI* geninin yukarı akış yönünde iç promotor bulunabileceği de rapor edilmiştir. (Li and O’Sullivan 2006). Nisinin diğer bir varyantının üreticisi olan *Streptococcus uberis*’te genler farklı olarak *nsuPRKFEGABTCI* şeklinde düzenlenmiştir (Wiraman *et al.* 2006).



Şekil 2.8 Nisin Z üretimi, regülasyonu ve dirençliliğinde görevli genler (McAuliffe *et al.* 2001, Zendo *et al.* 2003)

2.2.2 Nisin dirençlilik genleri

Üretici suşlarda nisin dirençliliği; *nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleri tarafından kodlanan proteinler ile sağlanmaktadır (Şekil 2.8). *nisFEG* genleri ABC sınıfı taşıma proteinlerini, *nisI* ise bir lipoproteini kodlamaktadır. İlk tanımlanan nisin dirençlilik geni, nisin-sakaroz transpozonu Tn7256’da yer alan *nisI*’dir. Bu gen, 245 amino asitlik NisI proteinini kodlamaktadır. NisI’nın amino asit dizilimi, veritabanındaki bilinen herhangi proteinle benzerlik taşımamakla birlikte karboksi terminal ucundaki sinyal dizisi, NisI’nın hücre membranı dışında yer alan periferel membran proteini olabileceğine işaret etmiştir. Nisine duyarlı *L. lactis* MG1614 suşunda NisI’nın ifadesi edilmesi sonucunda, nisin üreticisi hücrelerde direnç gelişimi saptanmıştır (Kuipers *et al.* 1993). Qiao *et al.* (1995) deneysel olarak NisI’nın hücre membranında yerleşimini tanımlamıştır. Ra *et al.* (1999) *nisI* geninde çerçeve kayması mutasyonu içeren bir *L. lactis* suşunu, doğal tip suşla karşılaştırarak nisin dirençliliğinin önemli derecede azaldığını göstermiştir. Stein *et al.* (2003) *Escherichia coli*’de üretilen NisI ve nisin arasındaki etkileşimi belirlemiş ve NisI’nın alıkoyucu bir molekül olabileceğini ileri sürmüştür. Koponen *et al.* (2004) gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda, NisI’nın

yaklaşık yarısının kültür üst sıvısında bulunduğunu tespit etmiş ve bunun lipit modifikasyon sisteminden kaçtığına dikkat çekmiştir. Lipit modifikasyon sisteminden kaçan salgılanmış NisI (lipitsiz-NisI) üzerinde yapılan başka bir çalışma sonucunda bu molekülün dirençliliğe katkısının olduğu bildirilmiştir (Takala *et al.* 2004). Li and O'Sullivan (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *nisA* transkripsiyonu yokluğunda *nisI* mRNA'sının bulunduğu gözlenmiştir. Bu gözlem sonucunda operonda bir iç promotorun bulunabileceği önerilmiştir.

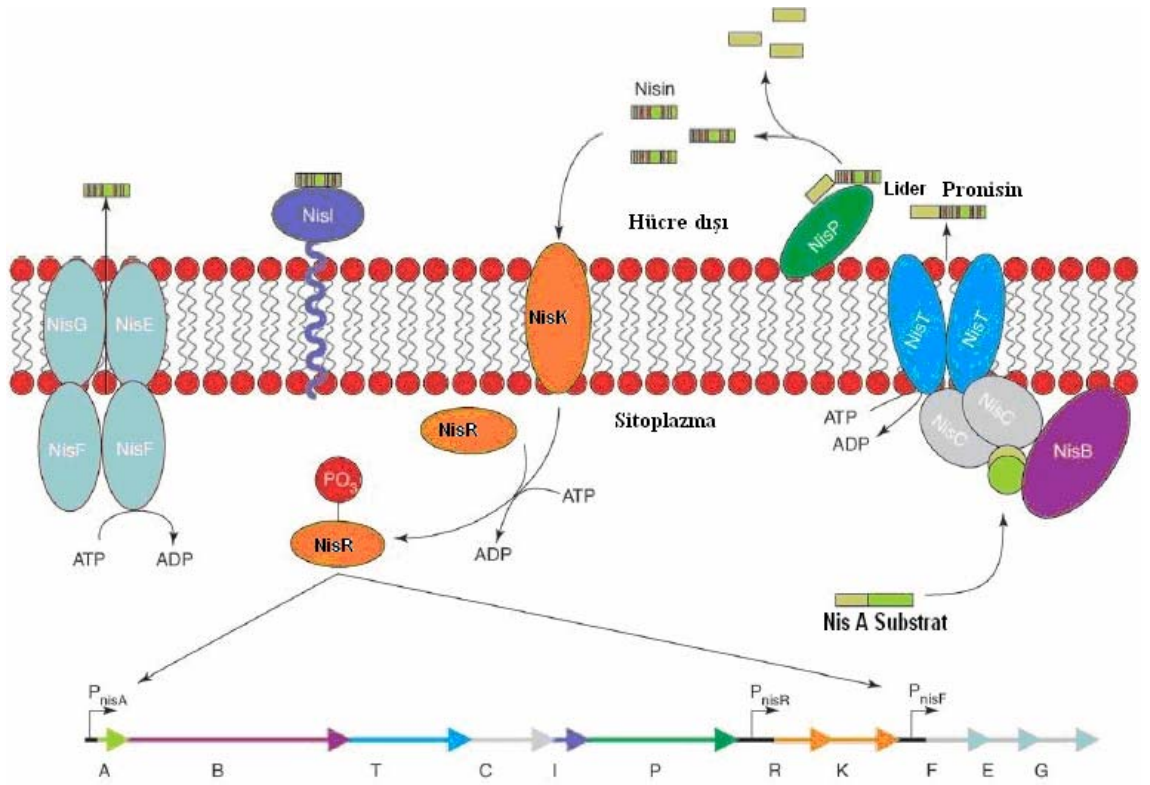
Siegers and Entain (1995) tarafından nisin gen kümesinde *nisF*, *nisE* ve *nisG* isimli üç gen daha tanımlanmıştır. Nisin üreticisi suş *Lactococcus lactis* N8'de *nisE*, *nisG* genleri antisens-RNA tekniği ile susturulmuş ve dirençliliğin azaldığı tespit edilmiştir (Immonen and Saris 1998). NisFEG'nin rolü için bir kanıtta, Stein *et al.* (2003) tarafından *Bacillus subtilis*'te NisFEG ve NisI'nin değişik kombinasyonlarının denenmesiyle ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda dört protein eşzamanlı üretildiğinde en yüksek dirençlilik seviyesine ulaşıldığı saptanmıştır. Nisin operonunda *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleri, *nisF* geninde yer alan promotorun ikili regülasyon sistem indüksiyonu ile bağımsız olarak ifade edilmektedir (de Ruyter *et al.* 1996, Stein *et al.* 2003, Takala *et al.* 2004).

Kuipers *et al.* (1993) *nisI* geninde gerçekleştirdiği delesyon sonucunda dirençliliğin % 80 azaldığını saptamış ve bu durum NisFEG'nin dirençliliğin % 20'sinden sorumlu olduğuna işaret etmiştir. Bu iki sistemin ayrı ayrı delesyonu (Siegers and Entain 1995, Ra *et al.* 1999) ile elde edilen dirençlilik seviyelerinin, her iki sistemin birlikte oluşturduğu tam dirençlilik seviyesinin sadece % 5 ile 20'sinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, her iki sistemin sinerjik olarak çalıştığına işaret etmiştir (Lubelski *et al.* 2008). Ayrıca herhangi bir nisin genin bulunmadığı suşta *nisI*'in ifadesi, nisin üreticisi doğal suşun direnç seviyesinin sadece % 1-4'ü kadar olduğu da saptanmıştır (Kuipers *et al.* 1993, Lubelski *et al.* 2008).

2.2.3 Nisin biyosentezi

Nisin biyosentezinde ribozomlarda sentezlenen inaktif öncü peptit iki ana yapıyı içermektedir. Bunlardan birincisi sentezlenen molekülü inaktif halde tutan lider peptit (23 amino asit) ve ikincisi de biyolojik aktif nisin öncüsü olan propeptittir (34 amino asit). Translasyon sonrasında lider peptit, üretilen molekülün sitoplazmik membranda bulunan modifikasyon mekanizmasına yönlendirilmesini sağlamaktadır. Öncelikle NisB proteini, serin ve treonini; sırasıyla α/β -doygun olmayan amino asitler 2,3-didehidroalanin (Dha) ve 2,3-didehidrobütirin (Dhb) formunu kazanmak için dehidre eder. Sonrasında, NisC vasıtasıyla komşu sistein kalıntılarının tiyol grupları ve didehidro amino asitlerin çift bağlarını içeren molekül içi Michael ekleme reaksiyonu katalizlenir ve reaksiyonlar tiyoeter köprülerinin oluşmasıyla sonuçlanır. Nisin molekülü ABC taşıma proteini NisT vasıtasıyla hücre dışına taşınır. Nisin molekülünden lider peptitin proteolitik ayrılması serin proteaz NisP tarafından katalizlenir (Şekil 2.9) (Qiao *et al.* 1996, Ra *et al.* 1996, Siegers *et al.* 1996, Koponen *et al.* 2002, Horn *et al.* 2004, Diep *et al.* 2007).

Nisin üretimi, yeter sayı algılama (quorum-sensing) sistemi ile regüle edilmektedir. Sistemde bir indükleyici peptit feromon (nisin) ve iki elemanlı (NisRK) regülatörler görev almaktadır (Kuipers *et al.* 1995, Ra *et al.* 1996, Kleerebezem and Quadri 2001, Diep *et al.* 2007). Bu sistemin işleyişinde öncelikle hücre dışındaki olgun nisin, NisK'ya (Histidin kinaz) bağlanır. Nisin ve NisK'nın etkileşimi sonucunda oluşan hücre dışı sinyale yanıt olarak, NisK hücre içinde bulunan bir histidin kalıntısını otofosforilize eder. Sonrasında bu fosforil grup, transkripsiyonel aktivatör olan hücre içi NisR'nin bir aspartik asit kalıntısına aktarılır. Bu durum yanıt regülatöründe (NisR) konformasyonel bir değişikliği uyarır. Aktive edilen yanıt regülatörü NisR, *nisA/Z/Q* ve *nisF* indüklenabilen promotörlerinin alt akış yönünde bulunan genlerin transkripsiyonunu yönetir (Şekil 2.9) (Kuipers *et al.* 1995, Ra *et al.* 1996, Sahl and Bierbaum 1998, Kleerebezem and Quadri 2001, Lubelski *et al.* 2008).



Şekil 2.9 Nisin üretiminden sorumlu biyosentez, regülasyon ve dirençlilik mekanizmalarının şematik gösterimi (Patton and van der Donk 2005)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri suşları ve plazmidler

Bu çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Laktisin 481 üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşu, nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu, mekik vektör pLEB124’ü taşıyan suş *Escherichia coli* ECO123, alıcı suş *E. coli* TG1 ve laktisin 481 aktivitesinin tespitinde kullanılan indikatör suş *Micrococcus luteus* NCIMB8166 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlandı.

3.1.2 Bakterilerin gelişme ortamları

E. coli ECO123, *E. coli* TG1 ve rekombinant plazmidleri taşıyan diğer *E. coli* suşları Luria Bertani (LB, Fluka) ortamında 37 °C’de inkübe edildi. Doğal ve rekombinant *L. lactis* suşları % 0.5 glukoz içeren M17 (GM17, Merck) ortamında 30 °C’de geliştirildi. Seçici ortamlara eritromisin, *L. lactis* suşları için 5 µg mL⁻¹, *E. coli* suşları için ise 200 µg mL⁻¹ oranında ilave edildi. *M. luteus* suşu, LB sıvı besiyeri ortamında 37 °C’de ve 200 rpm karıştırma hızında geliştirildi.

Çizelge 3.1 Çalışma kapsamında kullanılan bakteri suşları ve plazmidler

Suşlar ve plazmidler	Özellikleri	Kaynak
<i>E. coli</i> TG1	Transformasyon alıcı suş	Sambrook <i>et al.</i> 1989
<i>E. coli</i> ECO123	Mekik vektör pLEB124'ü taşımaktadır. Em ^r	Qiao <i>et al.</i> 1996
<i>E. coli</i> EC5	pNFG plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>E. coli</i> EC4	pNI plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>E. coli</i> EC6	pNRK plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>E. coli</i> EC7	pNRG plazmidini taşımaktadır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9	Laktisin 481 üreticisi	Özkalp <i>et al.</i> 2007
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27	Nisin üreticisi	Akçelik <i>et al.</i> 2006
<i>L. lactis</i> LL175	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşuna pNFG plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LL176	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşuna pNI plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LL177	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşuna pNRK plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LL178	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşuna pNRG plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>L. lactis</i> LL179	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MBLL9 suşuna pLEB124 vektör plazmidi aktarılmıştır. Em ^r	Bu çalışma
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166	İndikatör suş	Qiao and Saris 1996
pLEB124	Mekik vektör, P45 laktokok promotorunu ve eritromisin dirençlilik genini içermektedir.	Qiao <i>et al.</i> 1996
pNFG	pLEB124 vektörüne klonlanan <i>nisFEG</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma
pNI	pLEB124 vektörüne klonlanan <i>nisI</i> genini içermektedir.	Bu çalışma
pNRK	pLEB124 vektörüne klonlanan <i>nisRK</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma
pNRG	pLEB124 vektörüne klonlanan <i>nisRKFEG</i> genlerini içermektedir.	Bu çalışma

Em^r: Eritromisine dirençli

3.2 Yöntem

3.2.1 Rekombinant suşların oluşturulması

3.2.1.1 *Lactococcus lactis* suşundan genomik DNA izolasyonu

Nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşundan genomik DNA izolasyonu, genomik DNA saflaştırma kiti (Fermentas, EU) kullanılarak yapıldı. Suşun 1 gecelik kültüründen, kit kullanma kılavuzundaki tavsiye uyarınca, santrifüj işlemi (+4 °C'de 7500 rpm'de 10 dk) sonrasında 10-20 mg hücre çökeltisi elde edilerek izolasyona başlandı. Kitte mevcut olan liziz çözeltisiyle hücreler yıkıma uğratıldı ve sonraki aşamada deterjan yapısındaki çöktürme çözeltisiyle seçici bir şekilde çöktürüldü. Ribonükleaz A (son konsantrasyonu 0.2 mg mL⁻¹) eklenerek RNA yıkımı gerçekleştirildi. Soğuk ortamda (-20 °C'de) etanol çöktürmesi ile DNA'nın yoğunlaşması ve tuzun uzaklaştırılması sağlandı. Son aşamada, DNA steril deiyonize suda çözündürülüp izolasyon tamamlandı.

3.2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları

Polimeraz zincir reaksiyonları, termal döngü cihazında (Techne, UK) gerçekleştirildi. Çizelge 3.2'de verilen PZR karışımı kullanılan reaksiyonlar için, 1 çevrimden oluşan başlangıç denatürasyonu (94 °C'de 5dk), 30 çevrimden oluşan çoğaltma (her bir çevrim; 94 °C'de 30 saniye / 63,1 °C'de 30 saniye / 72 °C'de 3 dk) ve 1 çevrimden oluşan son uzama (72 °C'de 10 dk) basamaklarını içeren PZR protokolü uygulandı. Dört farklı DNA fragmentinin çoğaltılması için kullanılan primerler (NisFG ve NisI primer çiftleri: Bioneer / NisRK ve NisRG primer çiftleri: Oligomer Oy, Finland) Çizelge 3.3'de verilmiştir. PZR uygulamalarında High Fidelity DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. PZR uygulaması sonrasında, DNA örnekleri % 1 agaroz içeren jelde yürütüldü ve etidyum bromit içeren tamponda bekletildi. Jel, Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı (Sambrook *et al.* 1989).

Çizelge 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan PZR karışımı

Madde adı	Hacim (µL)
dH ₂ O	35.5
10X PZR Tamponu (MgCl ₂ 'süz)	5.0
10 mM dNTP karışımı	2.0
Primer (ileri)	0.5
Primer (geri)	0.5
MgCl ₂ (25 mM)	4.0
High Fidelity DNA polimeraz	0.5
Kalıp DNA	2.0
Toplam hacim	50.0

Çizelge 3.3 Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler. Altı çizili diziler restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini göstermektedir

Primer	Dizilim 5'-3'	T _m (°C)
NisFG İleri- <i>Hind</i> III	AGATACA <u>AGCTT</u> GGGCCCTAAAGTGAGGAAATATAATGCAGGTA	72.8
NisFG Geri- <i>Sall</i>	AGATTC <u>CGTCGACTT</u> CCCGGGAGGTAAAAATGCACTTTATATGTCTATC	75.3
NisI İleri- <i>Bam</i> HI	ACTATGGATCCATGAAAGGAGGGAAGAGGAAATGAGA	71.1
NisI Geri- <i>Apa</i> I	TATCAGGGCCCACTCTAGTTTCTAACTTCGTTG	69.6
NisRK İleri- <i>Hind</i> III	TATCATA <u>AAGCTT</u> AATCGGAGGTAAAGTGGTGTATA	64.8
NisRK Geri- <i>Apa</i> I	AGATAGGGCCCTTCAGAAACAAAAAAGTAATCCTTGA	67.4
NisRG İleri- <i>Hind</i> III	TATCATA <u>AAGCTT</u> AATCGGAGGTAAAGTGGTGTATA	64.8
NisRG Geri- <i>Apa</i> I	AGATTCGGGCCCAGGTAAAAATGCACTTTATATGTCTATC	69.5

T_m: Primer erime sıcaklığı

3.2.1.3 Restriksiyon endonükleaz ve fosfataz uygulamaları

Restriksiyon endonükleaz uygulamalarında, üretici firma önerileri dikkate alınmıştır. Enzim kesim reaksiyonları 100 µL toplam hacim içerisinde gerçekleştirildi. İlk enzim ile muameleden sonra DNA fragmentleri, Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA) kiti ile saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında, DNA örnekleri ikinci

enzimle yine 100 µL toplam hacim içerisinde kesildi. Kesim işlemleri *HindIII* (Fermentas), *SallI* (Fermentas) ve *BamHI* (Fermentas) enzimleri için 37 °C inkübasyon sıcaklığında, *ApaI* (Fermentas) enzimi için ise 25 °C inkübasyon sıcaklığında 2 saatte gerçekleştirildi.

Fosfataz enzim uygulaması, üretici firması kullanım önerisi doğrultusunda, kesilmiş vektör DNA'yı içeren restriksiyon endonükleaz enzim tamponuna karides alkali fosfatazın (Fermentas) eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu işlem için, vektörün (pLEB124) son kesim enzimi ile muamelesinden sonra her bir µg DNA için 1 µL (1 Ünite µL⁻¹) karides alkali fosfataz (SAP) ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bu ortam, su banyosunda 65 °C'de 15 dk tutularak fosfataz enziminin inaktivasyonu sağlandı. Enzimatik reaksiyonlarla modifiye edilmiş DNA'lar, bu enzimlere ait tamponlardan, Wizard® SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA) kiti aracılığı ile uzaklaştırıldı. Bu işlem sonrasında DNA örnekleri % 1 agaroz içeren jelde yürütüldü ve Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak görüntülendi (Sambrook *et al.* 1989). Ayrıca DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık oranları PharmaSpec (Shimadzu, Japan) spektrofotometre cihazı kullanılarak tespit edildi.

3.2.1.4 Ligaz uygulaması

Ligaz uygulaması, T4 DNA ligaz (Fermentas) enzimi kullanılarak 20 µL toplam hacimde gerçekleştirildi. Üretici firmanın uygulama önerisi dikkate alınarak, klonlanacak DNA örnekleri ve vektörün (pLEB124) molar konsantrasyonlarına göre 1:1, 2:1, 3:1 oranlarını içeren ligasyon karışımları hazırlandı. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında aşağıda verilen denklemden faydalanıldı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng)} = \text{Ligasyon oranı} \times \frac{\text{DNA boyutu (bç)}}{\text{Vektör boyutu (bç)}} \times \text{Vektör Konsantrasyonu (ng)}$$

Hesaplanan DNA-Vektör molar oranlarına göre ligasyon karışımı (1:1, 2:1 ve 3:1 oranları için ayrı ayrı) oluşturuldu. Bu karışımlar 22 °C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda su banyosunda 65 °C’de 15 dk tutularak T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu sağlandı. Oluşturulan rekombinant plazmidler kullanımlarına kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Ligasyon Karışımı:

Vektör (pLEB124)	400 ng (~4µL)
DNA	DNA boyutuna göre değişken
10X Tampon	2 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
dH ₂ O	20 µL’ye tamamlandı.

3.2.1.5 *Escherichia coli* hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması

Elektrokompetent *E. coli* hücrelerin hazırlanmasında Sambrook *et al.* (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. -80 °C’de muhafaza edilen *E. coli* TG1 suşu, 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplerde 37 °C ve 200 rpm karıştırma hızında 1 gece geliştirildi. Bu kültür, LB Agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze ile ekildi ve 37 °C’de 1 gece inkübe edildi. Agar yüzeyinde gelişen tipik koloniler öze ile 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere alındı. Hücreler 37 °C ve 200 rpm karıştırma hızında 1 gece inkübe edildi. Gelişen kültür, inkübatörde tutularak sıcaklığı 37 °C’ye getirilmiş LB besiyerine 1/100 oranında aktarıldı. 37 °C’de ve 200 rpm karıştırma hızında iki saatlik inkübasyon sonrasında, her 15 dk da bir ortamın optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerleri ölçüldü. Kültürün optik yoğunluğu 0.4-0.6 değerleri arasına ulaştıktan sonra inkübasyon sonlandırıldı ve ortam buz üzerine alınarak sıcaklığı 4 °C’nin altına düşürüldü. Hücre süspansiyonları, önceden buz içerisine yerleştirilerek soğutulan santrifüj tüplerine dağıtıldı ve 4 °C’de 10000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Üst sıvının dökülerek uzaklaştırılmasından sonra, hücre çökeltileri önceden 4 °C’ye soğutulmuş % 10 gliserol içeren steril deiyonize su içerisinde çözüldü. Elde edilen süspansiyon, 4 °C’de 10000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek tekrar hücre çökeltileri elde edildi. % 10 gliserol içeren steril deiyonize su ile yapılan bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi. Son aşamada, hücre çökeltisi başlangıç hücresel hacmin 1/100 oranında % 10 gliserol içeren deiyonize su ile çözüldü ve önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 40 µL’lik süspansiyonlar halinde dağıtıldı. Hazırlanan kompetent hücreler, kullanılıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.1.6 Rekombinant plazmidlerin *E. coli* hücrelerine elektroporasyonu

Oluşturulan rekombinant plazmidler, CelljecT Uno elektroporatör cihazında (Thermo, USA), 2 mm genişliğinde örnek haznesine sahip elektroporasyon küvetleri (Thermo, USA) kullanılarak alıcı kompetent hücre *E. coli* TG1'e aktarıldı. Bu işlem öncesinde, -80 °C'de muhafaza edilen kompetent hücreler, -20 °C'de muhafaza edilen plazmid solüsyonları ve elektroporasyon küvetleri buz üzerinde bekletildi. Buz üzerinde çözündürülen plazmid solüsyonundan 5 µL alınarak çözünmüş kompetent hücreler (40 µL) üzerine aktarıldı. 10 dk buz üzerinde inkübe edilen bu karışım, pipetle elektroporasyon küveti içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı. Cihazda 1800 V değeri ayarlanarak elektrik uygulaması yapıldı. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin bulunduğu küvete 1 mL rejenerasyon ortamı (SOC ve glukoz) ilave edildi ve tüm içerik steril deney tüpüne aktarıldı. 2 saat 37 °C'de çalkamalı olarak inkübe edilen ortam ve bu ortamdan steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile hazırlanan 1/10 oranındaki dilüsyon, 200 µg mL⁻¹ eritromisin içeren LB agar plaklarına yayıldı. Yayma yapılan bu ortamlar, 37 °C'de 48 saat inkübe edildi (Sambrook *et al.* 1989).

SOC Ortamı:

Trypton	2 g
NaCl	0.5 g
KCl (1 M)	0.25 mL
MgSO ₄ (1 M)	2 mL
dH ₂ O	97 mL

pH, 4 N NaOH kullanılarak 7.0'a ayarlandı ve ortam 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Ortam kullanılmadan hemen önce 18 µL (1 mL için) 1 M glukoz ilave edildi.

3.2.1.7 *L. lactis* hücrelerinin elektroporasyona hazırlanması

Elektrokompetent *L. lactis* hücrelerin hazırlanmasında Holo and Nes (1989) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. Öncelikle, -80 °C'de muhafaza edilen *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşu GM17 ortamında bir gece 30 °C'de geliştirildi. Gelişen bu kültür, GM17 agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze ile ekildi ve 30

°C'de 1 gece inkübe edildi. Gelişen tipik koloniler, 5 mL GM17 ortamına aktarıldı ve 30 °C'de 1 gece inkübe edildi. Bu kültür, 10mL'lik % 1 glisin içeren M17 glukoz (% 0.5) sakaroz (0.5 M) ortamına aktarıldı ve 30 °C'de 1 gece inkübe edildi. Bu ortamdan % 1 glisin içeren M17 glukoz (% 0.5) sakaroz (0.5 M) ortamına 1/100 oranında ekim yapıldı ve optik yoğunluğu (OD₆₀₀) 0.2-0.4 aralığına ulaşınca kadar 30 °C'de inkübe edildi. Bu aralığa ulaşan ortam, buz üzerine alınarak soğutuldu ve hücreler 8000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek hücreler toplandı. Üst sıvı dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 4 °C'ye soğutulmuş % 10 gliserol ve 0.5 M sakaroz içeren yıkama çözeltisi içerisinde çözüldü. Elde edilen süspansiyon, 4 °C'de 8000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek tekrar hücre çökeltisi elde edildi. % 10 gliserol ve 0.5 M sakaroz içeren deiyonize su ile yapılan bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi. Son aşamada hücre çökeltisi başlangıç hücresel hacmin 1/100 oranındaki % 10 gliserol ve 0.5 M sakaroz içeren deiyonize su ile çözüldü ve önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 40 µL'lik süspansiyonlar halinde dağıtıldı. Hazırlanan kompotent hücreler, kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.1.8 Rekombinant plazmidlerin *L. lactis* hücrelerine elektroporasyonu

Rekombinant plazmidlerin kompotent *L. lactis* hücrelerine elektroporasyonunda, kompotent *E. coli* hücreleri için izlenen aşamalar uygulandı. *L. lactis* hücreleri için elektrik akımı uygulamasında farklı olarak 2500 volt değeri ayarlanarak çalışıldı. Elektroporasyon işleminden sonra hücreler ifade ortamına alındı ve 2 saat 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortam ve bu ortamdan steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile hazırlanan 1/10 oranındaki dilüsyon, 5 µg mL⁻¹ eritromisin içeren M17 glukoz (% 0.5) sakaroz (0.5 M) agar ortamına ekildi ve 30 °C'de inkübe edildi (Holo and Nes 1989).

İfade Ortamı:

2XM17 : 5 mL
1 M Sakaroz : 5 mL
% 20 Glukoz : 250 µL
1 M MgCl₂ : 200 µL
1 M CaCl₂ : 20 µL

3.2.2 Plazmid DNA izolasyonları

3.2.2.1 *E. coli* suşlarından plazmid DNA izolasyonu

E. coli suşlarından plazmid DNA izolasyonunda, Qiagen plazmid miniprep kit (Omega, USA) kullanıldı. Kit kullanım kılavuzundaki tavsiye uyarınca, LB sıvı besiyerine inoküle edilen suşlar 16 saatlik gelişme süresini geçmeyecek şekilde 37 °C’de 200 rpm’de çalkalamalı olarak inkübe edildi. Santrifüj ile çöktürülerek besiyeri ortamından uzaklaştırılan hücreler, kit kullanım protokolünde belirtilen sıraya göre reaktantlarla muamele edildi. Plazmid DNA’yı içeren sıvı, seçici özellikteki spin kolonlara aktarıldı. Kolonlara tutunan plazmid DNA, son basamakta steril deiyonize su ile geri kazanılarak mikrosantrifüj tüplerine alındı. Bu işlem sonrasında DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık oranları PharmaSpec (Shimadzu, Japan) spektrofotometre cihazı kullanılarak tespit edildi. Ayrıca izole edilen plazmid DNA örnekleri % 1 agaroz içeren jelde yürütüldü. Daha sonra etidyum bromit içeren tamponda bekletilen jel, Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı. Plazmid izolatları -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.2.2 *L. lactis* suşlarından plazmid DNA izolasyonu

GM17 sıvı besiyeri ortamında 30 °C’de 18 saat geliştirilen *L. lactis* kültürleri, 10mL’lik GM17 sıvı besiyeri ortamına 1/10 oranında inoküle edildi ve 3 saat 30°C gelişme sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürler steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve +4°C’de 6000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Takiben üst faz uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisi kurumaya bırakıldı. Hücre çökeltisi kuruduktan sonra, 379 µL sakaroz çözeltisinde çözülerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 37°C’de 5 dk bekletildi. Bu ortama 96.5 µL lizozim eklendi ve enzimin optimum olarak çalışması için 37 °C’de 5 dk inkübe edildi. 48.2 µL Tris-EDTA-1 aktarılmasından sonra, % 20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 27.6 µL eklendi ve 37 °C’de 10 dk bekletildi. Süre bitiminde tüpler, kromozomal DNA’nın kırılması amacıyla mekanik karıştırıcıda 30 sn karıştırıldı. Yeni hazırlanmış 27.6 µL 3 N NaOH eklendi ve 10 dk düz bir zeminde yavaşça karıştırılarak kromozomal DNA’nın alkali denatürasyonu için

koşullar sağlandı. Denatürasyon basamağı sonrasında, nötralizasyon sağlaması amacıyla 49.6 µL 2 M Tris-HCl eklenilip, 3 dk yine düz bir zeminde yavaşça karıştırıldı. Bu ortama, +4°C’de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 71.1 µL eklenilerek karıştırıldı ve sonrasında % 3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 µL ilave edildi. Yavaşça karıştırılan tüplere, +4°C’de 12500 rpm’de 20dk santrifüj işlemi uygulandı ve üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı. Protein yapıların uzaklaştırılması amacıyla 700 µL kloroform/izoamil alkol (24:1) çözeltisi ilave edildi ve 12500 rpm’de 15dk +4 °C’de santrifüj edildi. Üst faz yeni mikrosantrifüj tüpüne alınarak 500 µL etanol ilave edildi. -20°C’de bir gece bekletilen tüplerdeki plazmid DNA’nın çöktürülmesi amacıyla 12500 rpm’de 20dk +4°C’de santrifüj işlemi uygulandı. Üst faz uzaklaştırılarak çökeltiler kurumaya bırakıldı. Çökeltiler kuruduktan sonra 20 µL Tris-EDTA-2 tamponu ile çözüldü. 2 µL RNaz A stok çözeltisi eklendi ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Takiben 37°C’de 45 dk su banyosunda inkübe edildi (Anderson and McKay 1983).

Sakaroz Çözeltisi:

Tris	0.655	g
EDTA	0.0372	g
Sakaroz	6.7	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Lizozim Çözeltisi:

Tris	0.3	g
Lizozim	0.1	g
Destile su	10	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-1:

Tris	0.6	g
EDTA	9.31	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-HCl:

Tris-HCl	31.52	g
Destile su	10	mL
pH 7.0 ± 0.02		

SDS Cözeltisi:

Tris	0.6	g
EDTA	0.74	g
SDS	20	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Tris-EDTA-2:

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL
pH 7.5 ± 0.02		

% 3 NaCl ile Doyorulmuş Fenol Cözeltisinin Hazırlanışı: 100 g fenol üzerine 20 mL destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45 °C'deki su banyosunda cözöldü. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edildi ve karıştırlarak oda sıcaklığında tutuldu.

RNaz A Cözeltisinin Hazırlanışı: 5 mL steril destile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat cözeltisinin pH'sı, asetik asit ile 5.0'a ayarlandı ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edildi. Kaynar su içerisinde 5 dk tutulduktan sonra, ortam -20 °C'de saklandı.

Plazmid DNA örnekleri, elektroforez uygulaması öncesinde, 2 µL marker boya ile karıştırlıldı ve % 0.7 agaroz içeren jelin kuyularına aktarıldı. Yatay elektroforez sisteminde, tris-asetat tamponlu ortamda yürütölen DNA örnekleri, elektroforez işleminin sonunda yine aynı tamponun 0.2 µL mL⁻¹ etidyum bromit içeren cözeltisinde 30 dk boyama işleme tabi tutuldu. Boyama işleminde sonunda, Kodak Gel Logic 200

Imaging System (Kodak, USA) kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Macrina *et al.* 1982).

Tris-Asetat Tampon:

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	mL
EDTA	0.37	mL
Destile su	1000	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya:

Bromfenol blue	0.25	g
Sakaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.3 Laktisin 481 ve özgül laktisin 481 aktivitesinin tespiti

Laktisin 481 aktivitesinin tespiti için Schillinger and Lücke (1989) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Doğal laktisin 481 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 ve oluşturulan rekombinant *L. lactis* suşlarının aktif kültürleri, GM17 besiyeri ortamlarına 1/100 oranında inoküle edildi ve 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. 6., 8., 10., 12. ve 24. saatlerde alınan her bir örneğin OD₆₀₀ değerlerinin ölçülmesi sonrasında 8000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemiyle hücrelerinin çöktürülmesi sağlandı. Hücresiz üst sıvı, yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak 80 °C’de 15 dk ısı uygulamasına tabi tutuldu. Her bir hücresiz üst sıvı, % 0.1 oranında tween 80 içeren pH’sı 2.5 olan çözeltilde 2⁻⁵ oranına kadar seyreltildi. Aktif *M. luteus* kültürü, 5 mL LB yumuşak agar ortamına inoküle edilerek, LB agar alt tabaka üzerine yayıldı. İkinci tabakanın katılmasından sonra, agarda kuyular açıldı. Her bir örnek dilüsyonundan 100 µL (2 paralel) kuyulara pipetle aktarıldı. Nisin indüklemesinin laktisin 481 üretimine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada farklı olarak, GM17 besiyeri ortamlarına suşların inokülasyonu öncesinde, son konsantrasyonu 1 IU mL⁻¹ olacak şekilde nisaplin (Sigma) eklendi. Örneklerin kuyulara aktarılması ve 37 °C’de 1 gece inkübasyon sonrasında, inhibisyon zonları incelendi. Aktivite hesaplamasında kritik dilüsyon yöntemi kullanıldı. Buna göre, her

petride inhibisyon zonu mevcut olan son kuyu saptanmış ve verilen denklemden yararlanarak birimi AU L⁻¹ olan aktivite sonuçlarına ulaşılmıştır.

$$\text{Bakteriyosin aktivitesi (AU L}^{-1}\text{)} = \frac{1000}{\text{Kuyulara aktarılan sıvı hacmi (mL)}} \times \text{Seyreltme faktörü} *$$

* İnhibisyon zonu mevcut olan son kuyuya ait seyreltme faktörü

Özgül laktisin aktivitesi, tespit edilen laktisin 481 aktivitesinin söz konusu örneğin alımında ölçülen OD₆₀₀ değerine bölümü ile hesaplanmıştır.

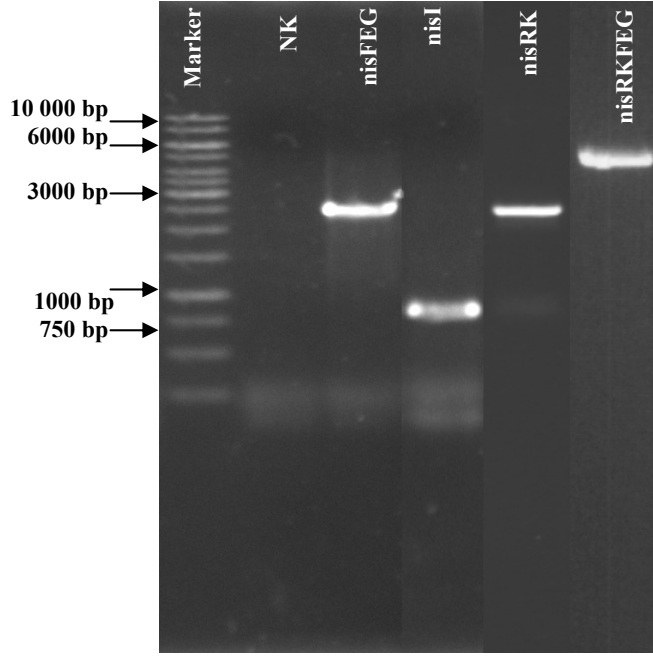
3.2.4 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ve rekombinant *L. lactis* suşlarının farklı nisin konsantrasyonlarına karşı gelişim düzeylerinin belirlenmesi

Doğal laktisin 481 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ve oluşturulan rekombinant *L. lactis* suşların farklı konsantrasyonlardaki nisine karşı gelişim düzeyleri çalışıldı. Buna göre, son konsantrasyonlarında 100 IU mL⁻¹, 200 IU mL⁻¹, 250 IU mL⁻¹, 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹, 400 IU mL⁻¹, 500 IU mL⁻¹ nisaplin (Sigma) içeren ve nisaplin (nisin) içermeyen GM17 ortamlarına aktif suşlardan 1/100 oranında inoküle edilerek, 30 °C'de gelişmeye bırakıldı. 3., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11. ve 12. saatlerdeki OD₆₀₀ değerleri ölçülerek zamana karşı gelişim eğrileri çizildi.

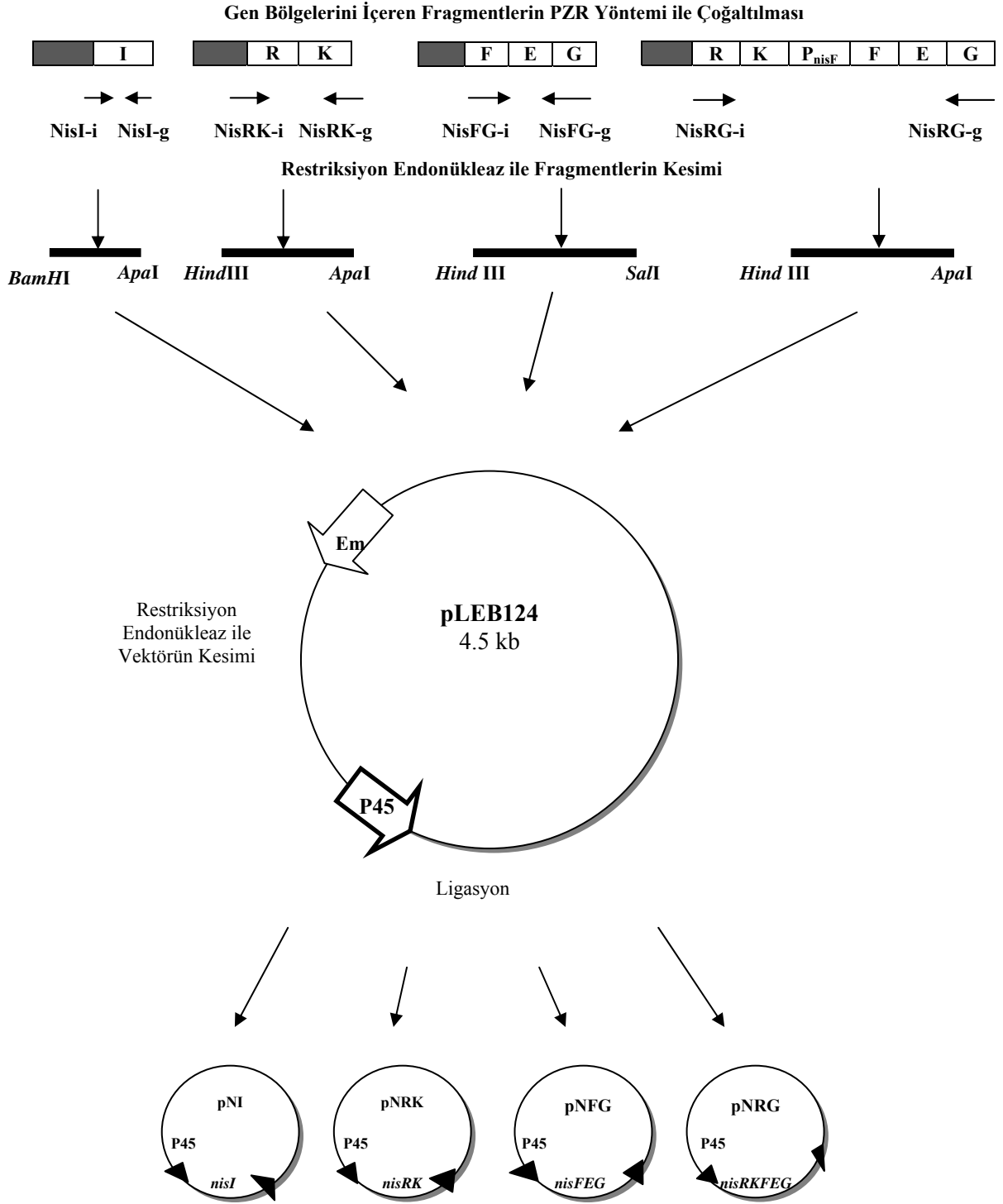
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 Suşuna Aktarılarak Rekombinant *L. lactis* Suşlarının Oluşturulması

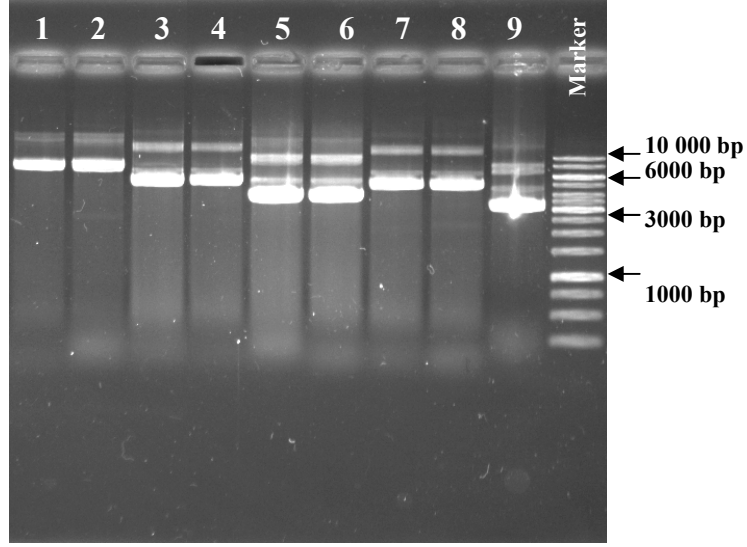
Bu tez çalışmasında, laktisin 481 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşuna nisin dirençlilik (*nisFEG* ve *nisI*), regülasyon (*nisRK*) ve regülasyon/dirençlilik (*nisRKFEG*) genlerini içeren plazmidlerin ayrı ayrı aktarımları gerçekleştirilerek dört farklı rekombinant suş oluşturuldu. Çalışmada öncelikle Çizelge 3.2’de verilen primer çiftleri kullanılarak nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşundan *nisFEG*, *nisI*, *nisRK* ve *nisRKFEG* genlerini içeren fragmentler çoğaltıldı. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi *nisFEG* genlerini içeren 2.5 kb’lık fragment, *nisI* genini içeren 0.8 kb’lık fragment, *nisRK* genlerini içeren 2.3 kb’lık fragment ve *nisRKFEG* genlerini içeren 5.1 kb’lık DNA fragmentleri elde edilmiştir. Sonrasında bu fragmentler, 4.5 kb’lık pLEB124 vektöründe bulunan ve kesintisiz çalışan P45 promotörü altına klonlanarak rekombinant plazmidler oluşturuldu (Şekil 4.2). Bu aşamadan sonra rekombinant plazmidler, ara konakçı *E. coli* TG1 suşuna elektroporasyon yöntemiyle aktarıldı ve elde edilen rekombinant hücreler seçilerek plazmid analizine tabi tutuldu. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi pNFG plazmidinin 6.5 kb, pNI plazmidinin 5.2 kb, pNRK plazmidinin 6.3 kb ve pNRG plazmidinin 9.5 kb büyüklükte olduğu belirlendi. Plazmidlerin taşıdıkları fragmentlerin doğru pozisyonda olup olmadıkları restriksiyon analizi ile araştırıldı. pNFG plazmidini *HindIII-SalI*, pNRK plazmidini *HindIII-ApaI*, pNI plazmidini *BamHI-ApaI* ve pNRG plazmidini *HindIII-ApaI* enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu işlem sonunda pNFG, pNRK ve pNI plazmidlerinde PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen fragmentlere benzer boyutlarda bantlar saptanmıştır (Şekil 4.4). pNRG plazmidinin kesim işlemi sonucunda, *nisRKFEG* genlerini içeren fragmentin ve boş vektörü (pLEB124) içeren fragmentin birbirine yakın büyüklükte olması nedeniyle aynı bant üzerinde profil oluşturdukları belirlendi (Şekil 4.4). pNFG, pNI, pNRK ve pNRG plazmidlerini taşıyan *E. coli* suşları sırasıyla *E. coli* EC5, *E. coli* EC4, *E. coli* EC6 ve *E. coli* EC7 olarak adlandırıldı. Plazmidler üzerinde bu fragmentlerin pozisyonları tanımlandıktan sonra, ilgili plazmidler *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşuna elektroporasyon yöntemiyle



Şekil 4.1 PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri. Marker: 1 kb lineer DNA marker (Fermantas), NK: Negatif kontrol



Şekil 4.2 pNI, pNRK, pNFEFEG ve pNRKFEG rekombinant plazmidlerinin oluşturulma aşamaları. Em; eritromisin direnç geni, P45; laktokok promotörü



Şekil 4.3 pLEB124 ve rekombinant plazmidler

Marker: 1 kb linear DNA marker (Fermantas)

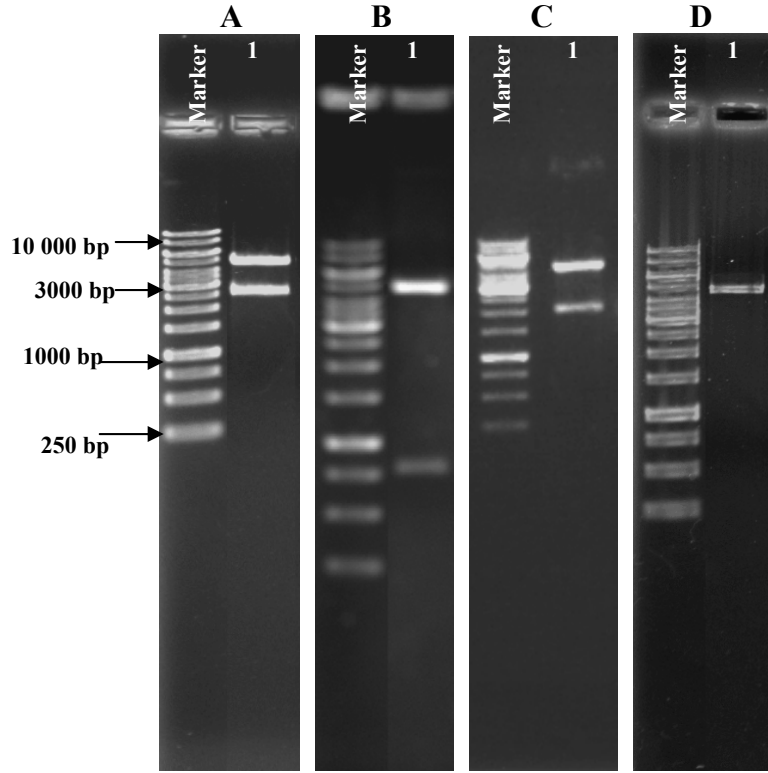
1, 2: *nisRKFEG* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid pNRG

3, 4: *nisFEG* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid pNFG

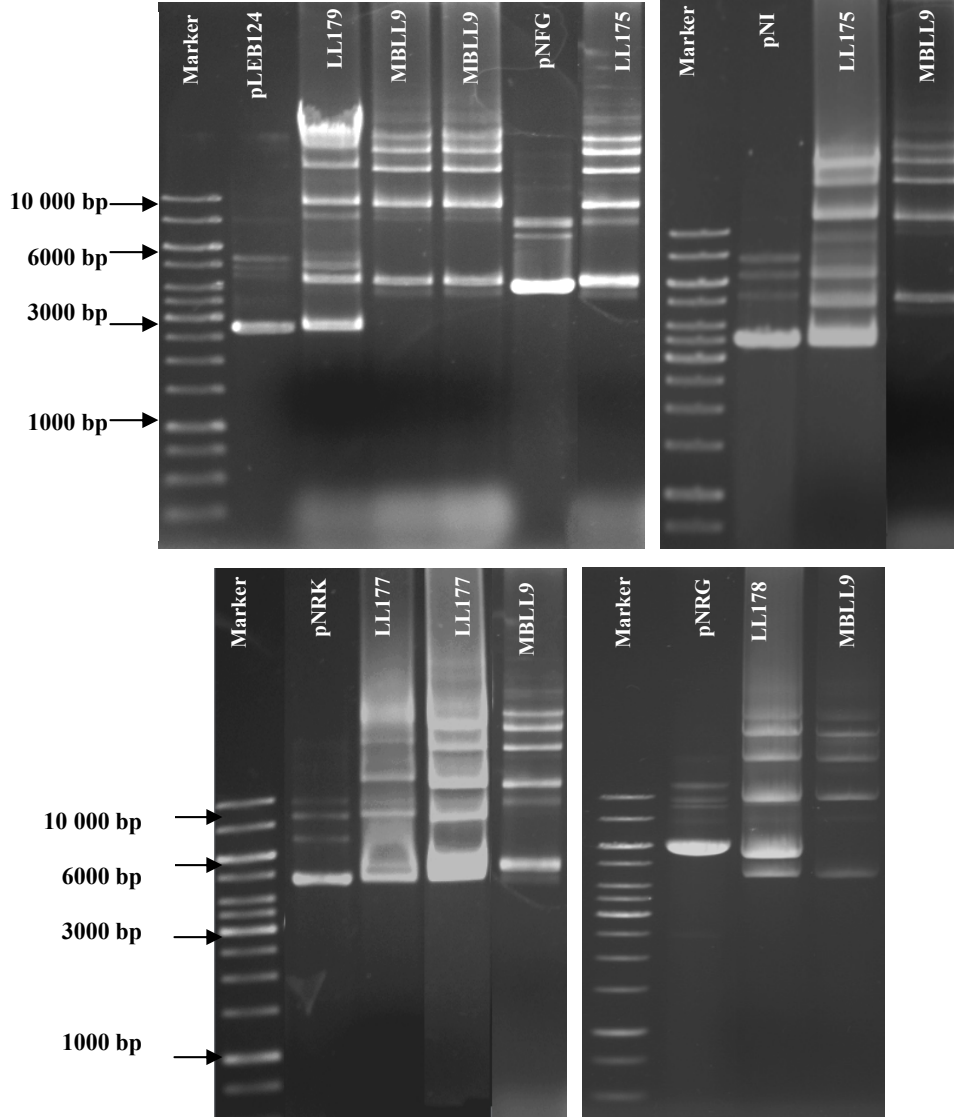
5, 6: *nisI* genini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid pNI

7, 8: *nisRK* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid pNRK

9: Saflaştırılmış pLEB124 vektörü



Şekil 4.4 Restriksiyon işlemi sonucunda elde edilen fragmentler
Marker: 1 kb lineer DNA marker (Fermantas)
A) 1: pNFG plazmidi (*Hind*III-*Sal*I kesimli)
B) 1: pNI plazmidi (*Bam*HI-*Apa*I kesimli)
C) 1: pNRK plazmidi (*Hind*III-*Apa*I kesimli)
D) 1: pNRG plazmidi (*Hind*III-*Apa*I kesimli)



Şekil 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ve rekombinant *L. lactis* suşlarının plazmid profilleri

Marker: 1 kb lineer DNA marker (Fermentas)

MBLL9: *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suş

pLEB124: Saflaştırılmış pLEB124 vektörü

pNFG: *nisFEG* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid

pNI: *nisI* genini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid

pNRK: *nisRK* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid

pNRG: *nisRKFEG* genlerini içeren saflaştırılmış rekombinant plazmid

LL175: pNFG plazmidini içeren *L. lactis* suşu (*L. lactis* LL175)

LL176: pNI plazmidini içeren *L. lactis* suşu (*L. lactis* LL176)

LL177: pNRK plazmidini içeren *L. lactis* suşu (*L. lactis* LL177)

LL178: pNRG plazmidini içeren *L. lactis* suşu (*L. lactis* LL178)

LL179: pLEB124 vektörünü içeren *L. lactis* suşu (*L. lactis* LL179)

aktarılmıştır. Daha sonra plazmid analizi yapılarak rekombinant plazmidlerin aktarımı kontrol edilmiştir. pNFG, pNI, pNRK ve pNRG plazmidleri aktarılacak elde edilen rekombinant *L. lactis* suşları sırasıyla *L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178, boş vektörün (pLEB124) aktarıldığı *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ise *L. lactis* LL179 olarak adlandırılmıştır. Plazmid analizlerine göre *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda elektroporasyona bağlı olarak doğal plazmidlerde herhangi bir kayıp gözlenmemiştir (Şekil 4.5). Söz konusu plazmidlerin *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 suşunda stabiliteilerinin sağlanmasının ardından plazmidlerin üzerinde yer alan fragmentlerin laktisin 481 üretimindeki etkileri araştırıldı.

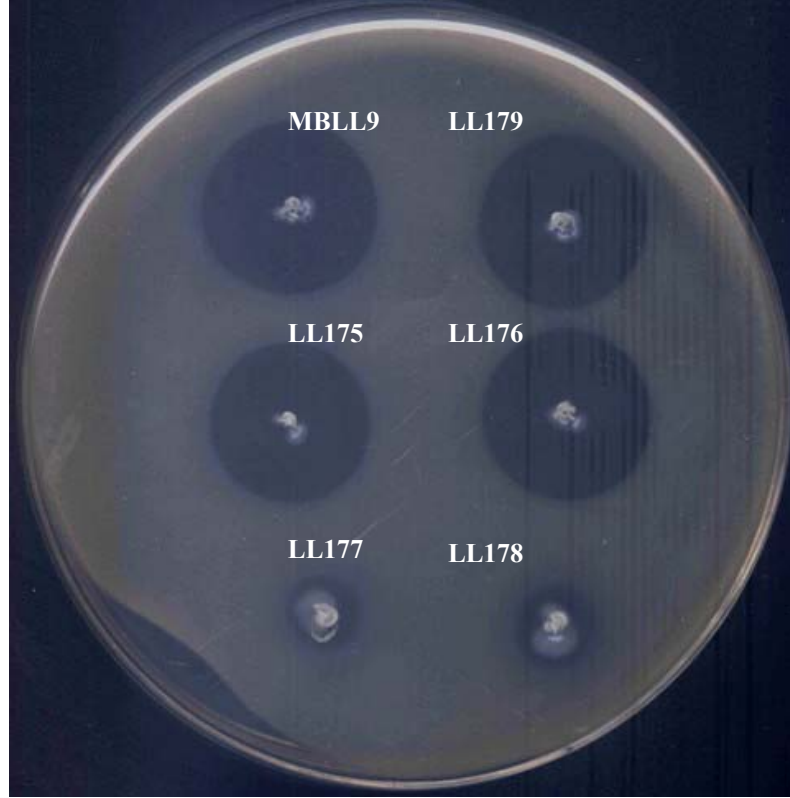
4.2 Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin Laktisin 481 Üretimine Etkilerinin Belirlenmesi

Rekombinantların suşların (*L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178) laktisin 481 üretim düzeyleri, doğal suş *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.6). Gelişmenin 6. saatinde tüm suşların (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178) nisin içermeyen ve 1 IU mL⁻¹ nisin içeren GM17 besiyeri ortamlarında 20.000 AU L⁻¹ laktisin 481 ürettikleri tespit edildi. 8 saatlik inkübasyon sonucunda nisin içermeyen ortamda *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175 ve *L. lactis* LL176 suşları 40.000 AU L⁻¹, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178 suşları ise 20.000 AU L⁻¹ laktisin 481 üretti. 1 IU mL⁻¹ nisin içeren GM17 besiyeri ortamında 8 saatlik gelişim sonucunda ise *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176 ve *L. lactis* LL178 suşlarının 40.000 AU L⁻¹, *L. lactis* LL177 suşunun da 20.000 AU L⁻¹ laktisin 481 ürettiği saptandı. 10 ve 12 saatlik gelişme sürelerinin her ikisinde de nisin içermeyen ve 1 IU mL⁻¹ nisin içeren GM17 besiyeri ortamlarında *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175 ve *L. lactis* LL176 suşlarının 80.000 AU L⁻¹, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178 suşlarının ise 40.000 AU L⁻¹ laktisin 481 ürettikleri belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonucunda nisin içermeyen ortamda *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175 ve *L. lactis* LL176 suşları 80.000 AU L⁻¹, *L. lactis* LL177 suşu 40.000 AU L⁻¹ ve *L. lactis* LL178 suşu ise 20.000 AU L⁻¹ laktisin 481 ürettiği tespit edildi. Ayrıca 24. saatte 1 IU mL⁻¹ nisin içeren GM17 besiyeri ortamında *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9,

L. lactis LL175 ve *L. lactis* LL176 suşlarının 80.000 AU L⁻¹, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178 suşlarının ise 40.000 AU L⁻¹ düzeyinde laktisin 481 ürettikleri belirlendi (Şekil 4.7, Şekil 4.8).

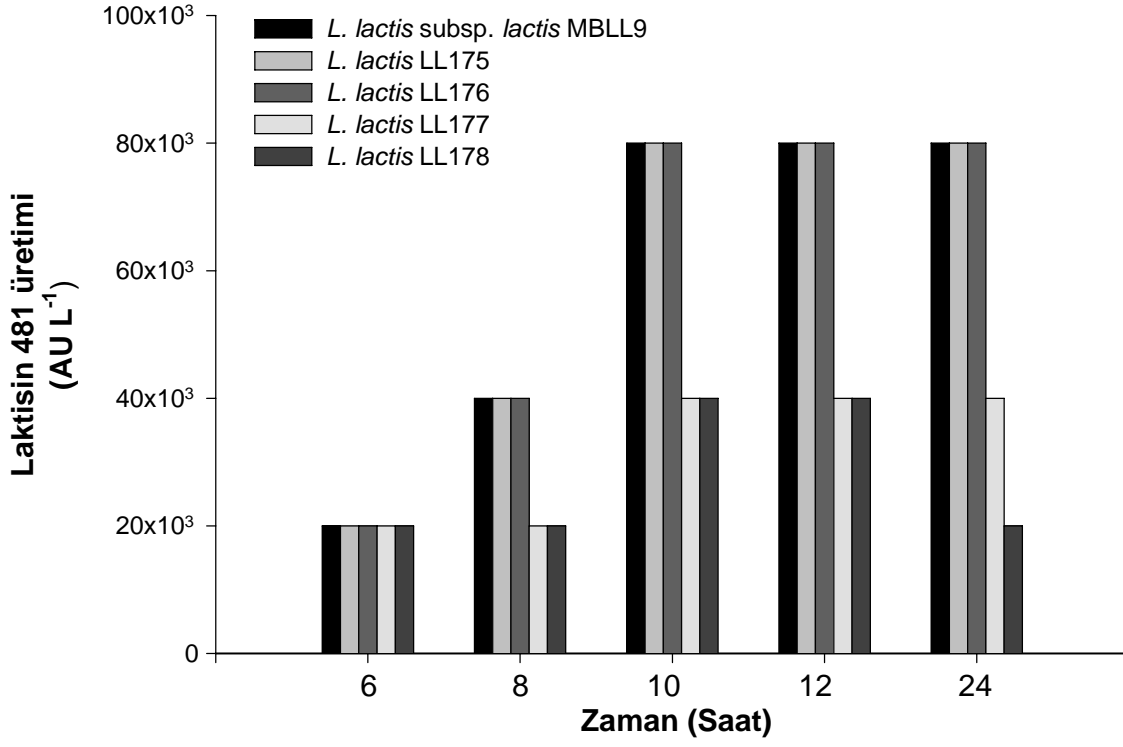
Özgül laktisin 481 üretimi, Çizelge 4.1’de tanımlanan laktisin üretim düzeyi sonuçlarının, yine aynı çizelgede bulunan optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerlerine bölünmesi ile elde edilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Özgül laktisin 481 üretimi ile ilgili grafiklerde doğal suş *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ve rekombinant suşların üretim düzeyleri oransal olarak karşılaştırıldığında, dikkat çekici farklılıklar görülmemiştir. Laktisin 481 ve özgül laktisin üretim düzeyi çalışmalarının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, doğal suş *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ile kıyaslanan *L. lactis* LL175 ve *L. lactis* LL176 suşlarının laktisin 481 üretiminde değişiklik olmadığı, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178 suşlarının laktisin 481 üretiminde ise % 50 oranında azalmanın olduğu saptanmıştır.

Laktisin 481 üreticisi suşa *nisRK* ya da *nisRKFEG* genlerinin aktarımı sonrasında laktisin üretiminde meydana gelen azalmaların *nisI* ya da *nisFEG* genlerinin aktarıldığı rekombinantlarda görülmemesi, söz konusu baskılayıcı etkinin *nisRK* genlerinin ifadesinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Nisin üreticisi suşlarda, bu bakteriyosinin sentezi *nisRK* genleri tarafından regüle edilmektedir. NisK, çevresel nisin konsantrasyonu sinyaline bağlı olarak çalışan bir histidin kinaz enzimidir. Bu çevresel sinyali histidin kinaz fosforilasyon yolu ile NisR yanıt proteinine aktarır ve aktive olan NisR, nisin operonunda transkripsiyonu indükler (van der Meer *et al.* 1993, Kuipers *et al.* 1995, de Ruyter *et al.* 1996, Kleerebezem 2004). Tipik bir yeter sayı algılama sistemi (Quorum sensing) olan bu mekanizmanın laktisin 481 üreticisi suşlarda bir varyasyonunun bulunduğu öngörülmektedir. Laktisin 481 üreticilerinde, bu bakteriyosinin sentezini kontrol eden operon *lctAMTFEG* olarak adlandırılan altı gen içermektedir. *lctA* laktisin biyosentezinden, *lctMT* öncü proteinin sentezi ve olgun proteinin salgılanmasından, *lctFEG* ise, nisinde olduğu gibi dirençlilikten sorumludur. Bu operonda, laktisin 481 üretimini regüle eden herhangi bir gen yer almamaktadır. Bu özelliği ile laktisin 481 diğer tüm lantibiyotiklerden ayrılmaktadır (Piard *et al.* 1993,

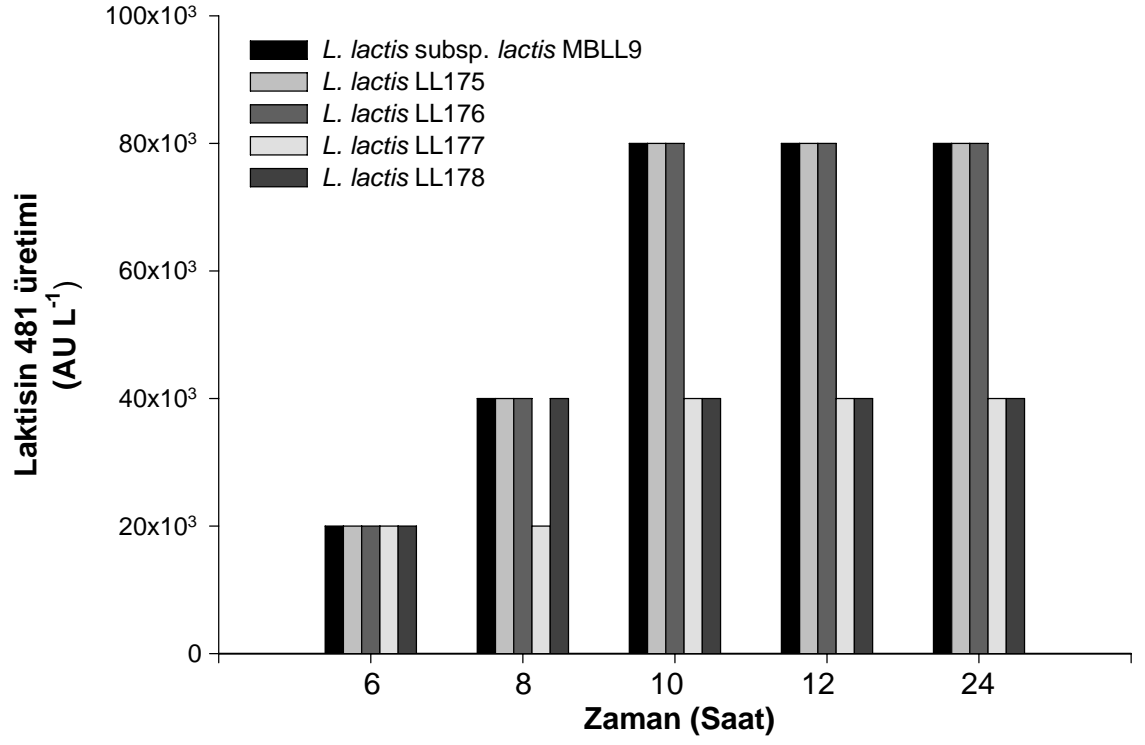


Şekil 4.6 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu, pLEB124 plazmidini taşıyan *L. lactis* LL179 suşu ve rekombinant suşlar tarafından üretilen laktisin 481'in *M. luteus* suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonu

- MBLL9: *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9
LL175: *L. lactis* LL175 (*nisFEG* rekombinantı)
LL176: *L. lactis* LL176 (*nisI* rekombinantı)
LL177: *L. lactis* LL177 (*nisRK* rekombinantı)
LL178: *L. lactis* LL178 (*nisRKFEG* rekombinantı)
LL179: *L. lactis* LL179



Şekil 4.7 *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve rekombinant *L. lactis* suşlarının laktisin 481 üretim düzeyleri

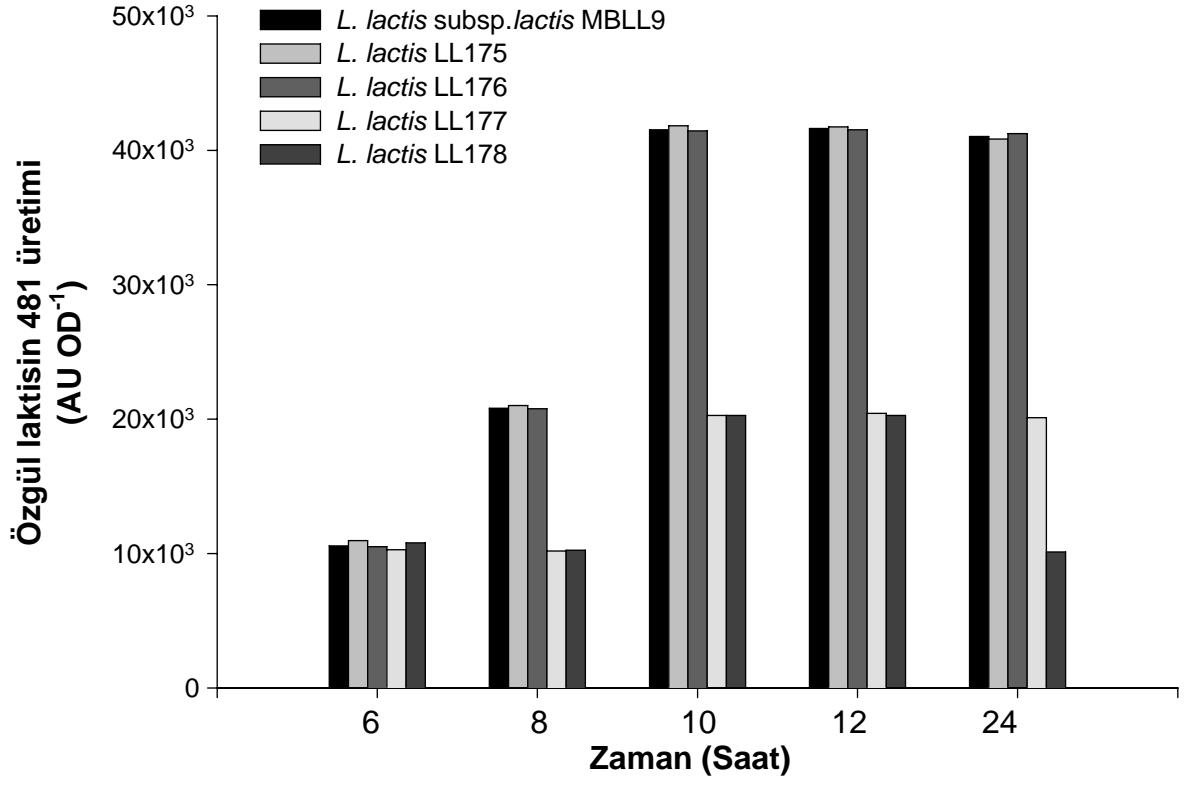


Şekil 4.8 *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve rekombinant *L. lactis* suşlarının 1 IU mL⁻¹ nisin varlığında laktisin 481 üretim düzeyleri

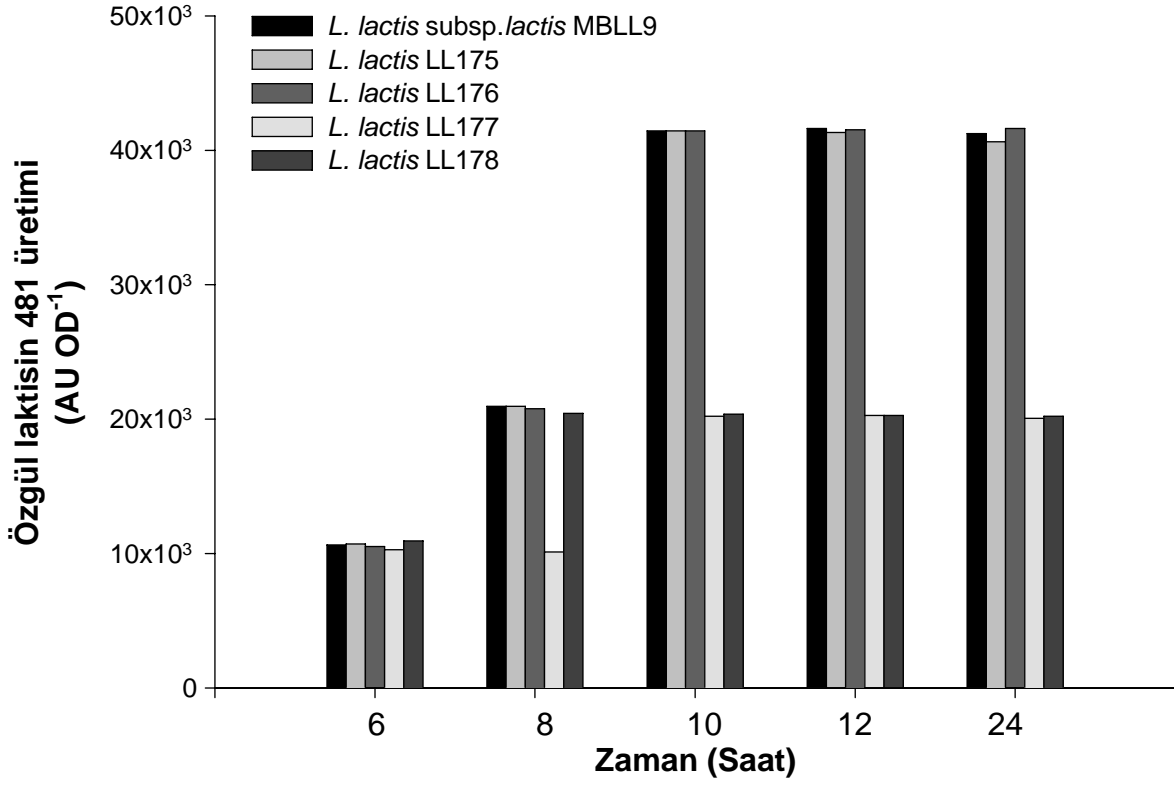
Çizelge 4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve rekombinant *L. lactis* suşlarının bakteriyel gelişme düzeyleri ve laktisin 481 üretilmeleri

Suş Kod No.	6.Saat		8.Saat		10.Saat		12.Saat		24.Saat	
	OD ₆₀₀	AU L ⁻¹	OD ₆₀₀	AU L ⁻¹	OD ₆₀₀	AU L ⁻¹	OD ₆₀₀	AU L ⁻¹	OD ₆₀₀	AU L ⁻¹
MBLL9	1.892	20.000	1.922	40.000	1.927	80.000	1.922	80.000	1.950	80.000
MBLL9 (1 IU mL ⁻¹ nisın varlıgında)	1.880	20.000	1.909	40.000	1.931	80.000	1.922	80.000	1.940	80.000
LL175	1.827	20.000	1.904	40.000	1.913	80.000	1.917	80.000	1.959	80.000
LL175 (1 IU mL ⁻¹ nisın varlıgında)	1.868	20.000	1.909	40.000	1.931	80.000	1.936	80.000	1.969	80.000
LL176	1.904	20.000	1.927	40.000	1.931	80.000	1.927	80.000	1.940	80.000
LL176 (1 IU mL ⁻¹ nisın varlıgında)	1.900	20.000	1.927	40.000	1.931	80.000	1.927	80.000	1.922	80.000
LL177	1.945	20.000	1.964	20.000	1.974	40.000	1.959	40.000	1.989	40.000
LL177 (1 IU mL ⁻¹ nisın varlıgında)	1.945	20.000	1.979	20.000	1.979	40.000	1.974	40.000	1.995	40.000
LL178	1.852	20.000	1.954	20.000	1.974	40.000	1.974	40.000	1.979	20.000
LL178 (1 IU mL ⁻¹ nisın varlıgında)	1.830	20.000	1.959	40.000	1.964	40.000	1.974	40.000	1.979	40.000

MBLL9: *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9
 LL175: *L. lactis* LL175
 LL176: *L. lactis* LL176
 LL177: *L. lactis* LL177
 LL178: *L. lactis* LL178



Şekil 4.9 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 doğal suşu ve rekombinant *L. lactis* suşlarının özgül laktisin 481 üretim düzeyleri



Şekil 4.10 *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 doğal suşu ve rekombinant *L. lactis* suşlarının 1 IU mL⁻¹ nisin varlığında özgül laktisin 481 üretim düzeyleri

Rincé *et al.* 1994, Rincé *et al.* 1997, Hindré *et al.* 2004). Lantibiyotik 481 regülasyonu üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda, hücre içi asitliğin artışına paralel olarak, laktisin 481 üretiminin arttığı belirlenmiştir. Transkripsiyonel analizler ile detaylandırılan araştırmalarda, hücre içi asitlik artışının *lctAMTFEG* operonunun ana promotorları olan P1 ve P3 promotorlarından transkripsiyonun teşvikine yol açtığı tespit edilmiştir. Bu nedenle söz konusu promotorlar asit teşvikli promotorlar olarak adlandırılmıştır (Hindr  *et al.* 2004, Madsen *et al.* 2005, Dufour *et al.* 2007). Halen asitliğin P1 ve P3 promotorlarında transkripsiyonun teşvikinde nasıl etkinlik gösterdiği bilinmemektedir.

Çalışmamızda *nisRK* (nisin ikili regülatör sistemini kodlayan genler) genlerinin laktisin 481 üreticisinde ifade edilmesi durumunda laktisin üretimini % 50 gibi yüksek oranda düşürmesi, söz konusu lantibiyotiklerin her ikisinin de yeter sayı algılama sistemi ile regüle edildiğine işaret etmektedir. Zira bu rekombinantlarda sürekli  alışan P45 promotorunun kontrolindeki *nisRK* genleri çevresel sinyali algılama ve iletmeye laktisin 481'in benzer sistemlerinden daha etkin çalışmaktadır. Muhtemelen laktisin 481 regülasyonunda da çevresel asitliğin algılayıcısı ve ileticisi olan regülatör protein sinyali hücre içine iletilmekte ve yanıt proteini P1 ve P3 promotorlarından transkripsiyonu teşvik etmektedir. Asitliğin artışı, tıpkı nisinde olduğu gibi, *L. lactis* populasyonunda indüksiyon için yeter sayı sinyalidir. Bu durumda birbirinden bağımsız çalışan ancak aynı sinyal iletim mekanizmasına sahip olan sistemlerden, güçlü bir promotor ile etkinleştirilmiş olanın, diğerini baskılaması en olası sonuçtur.

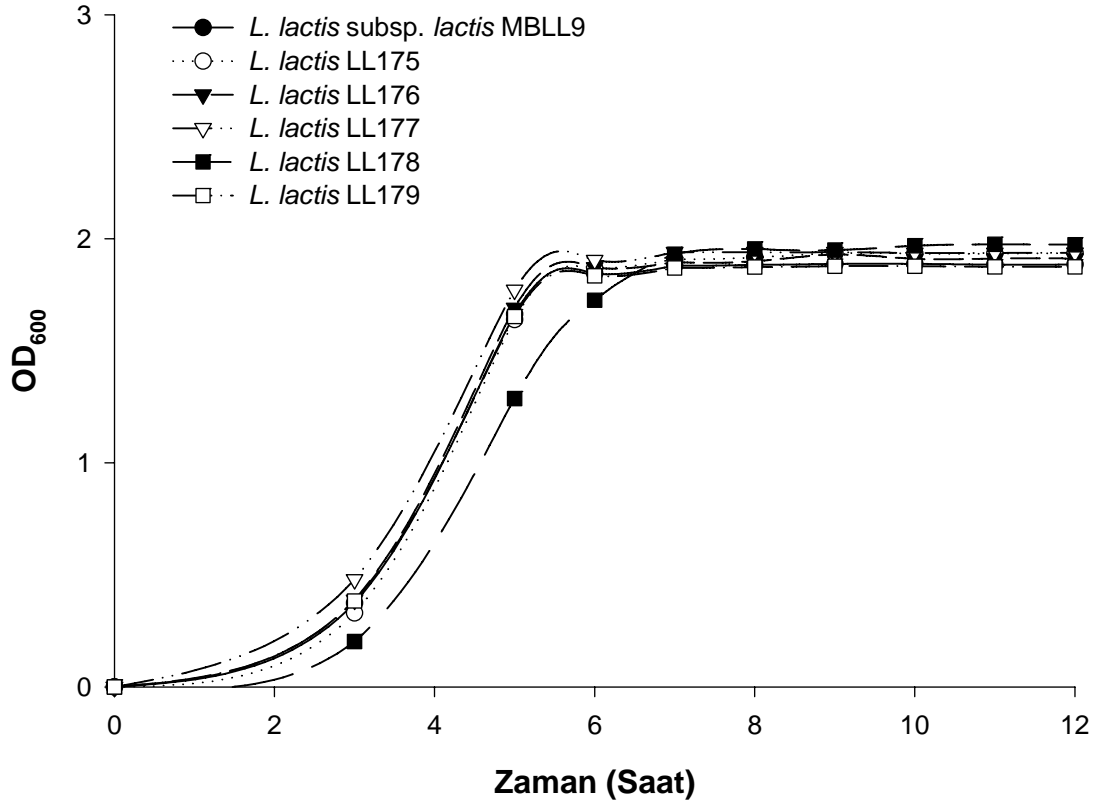
Bu çalışmalardan elde edilen diğer bulgular da bu olasılığı destekler niteliktedir. Zira rekombinantların üreme ortamına 1 IU mL⁻¹ oranında indükleyici molekül nisinin ilavesi laktisin 481 üretiminde bir değişikliğe yol açmamıştır. Tüm bu bulgular laktisin 481 üretiminin regülasyonunun da yeter sayı algılama mekanizması ile ancak farklı regülatörler tarafından yapıldığına işaret etmektedir. Halen detayları açıklanmamış olan laktisin 481 regülasyonu üzerinde sağlanan  n bulgular ışığında, özellikle transpozon mutant bankaları oluşturularak mikro dizin analizlerinin yapılması planlanmaktadır.

4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 ve Rekombinantlar Suşların Farklı Nisin Konsantrasyonlarına Karşı Gelişim Düzeyleri

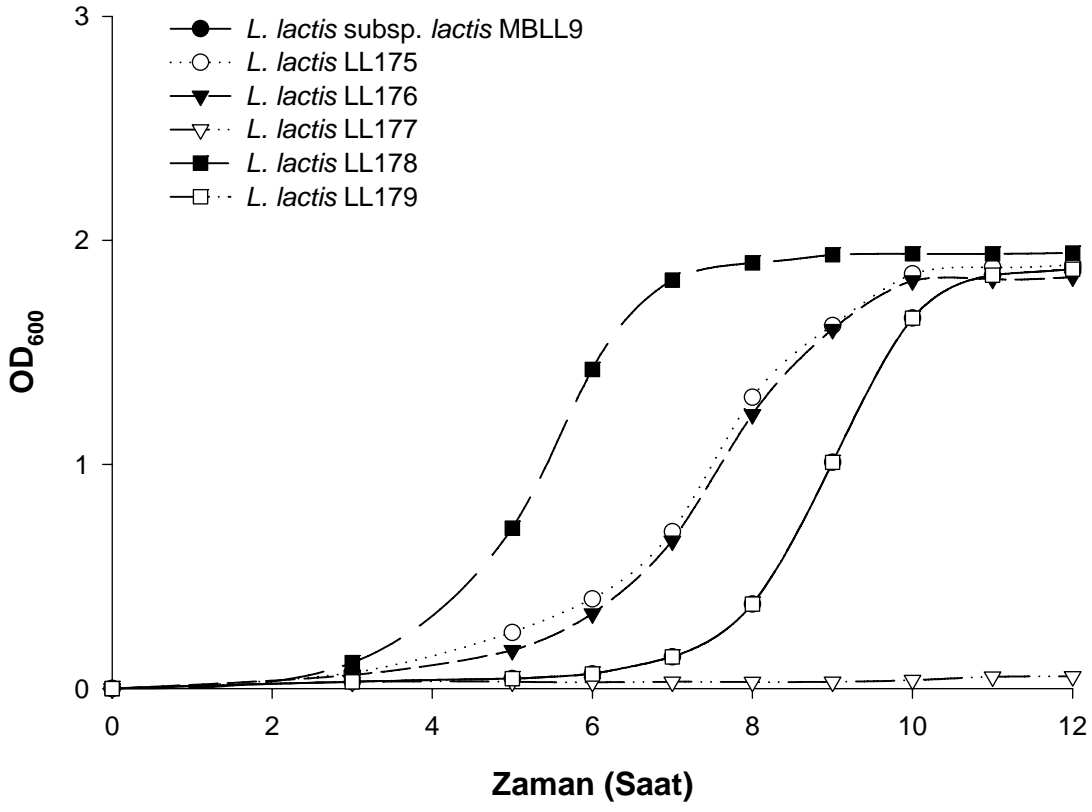
Doğal suş *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, boş vektörü (pLEB124) içeren *L. lactis* LL179 ve rekombinantlar suşların (*L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178) farklı nisin konsantrasyonlarında zamana karşı gelişimleri kıyaslanmıştır. Nisin içermeyen ortamda tüm suşların (*L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9, *L. lactis* LL175, *L. lactis* LL176, *L. lactis* LL177 ve *L. lactis* LL178, *L. lactis* LL179) benzer gelişim karakteristiklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9'un 12 saatlik gelişim süresinde, 250 IU mL⁻¹ nisin düzeyine kadar dirençlilik tespit edilmiştir. Yine 12 saatlik gelişim süresinde boş vektörü (pLEB124) içeren *L. lactis* LL179 suşunda da 250 IU mL⁻¹ nisin konsantrasyonuna karşı direnç düzeyi tespit edildi. *L. lactis* LL175 (*nisFEG* rekombinantı), *L. lactis* LL176 (*nisI* rekombinantı), *L. lactis* LL177 (*nisRK* rekombinantı) ve *L. lactis* LL178 (*nisRKFEG* rekombinantı) suşlarının ise, sırasıyla; 300 IU mL⁻¹, 350 IU mL⁻¹, 100 IU mL⁻¹ ve 500 IU mL⁻¹ nisin düzeylerine karşı dirençlilik gösterdiği 12 saatlik gelişim takipleri sonucu belirlenmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18).

Laktisin 481 operonunda, üretici suşun dirençliliğini kontrol eden genler ABC transport proteinlerini kodlayan ve P1 ve P3 ya da P4 promotorlarından transkripsiyonu gerçekleştirilen *lctFEG* genleridir. P4 promotoru *lctT* geni içerisinde yer alan ve P3 promotorundan 30 kez daha zayıf bir transkripsiyon başlatıcısıdır. P3 promotorundan yapılan güçlü transkripsiyon yine *lctMT* genleri arasında yer alan T1 terminatöründe sonlandırılarak yapısal ve regülatör genlerin ifade düzeyleri ayarlanmaktadır. Bu sayede laktisin 481 yapısal genleri, regülatör genlerden 12.5 kat daha fazla ifade edilmektedir. Ancak özellikle bakteriyosin yapısal genlerinin aktivasyonuna bağlı olarak P4 promotoru ilave dirençlilik sağlamak üzere devreye girmektedir (Hindré *et al.* 2004).

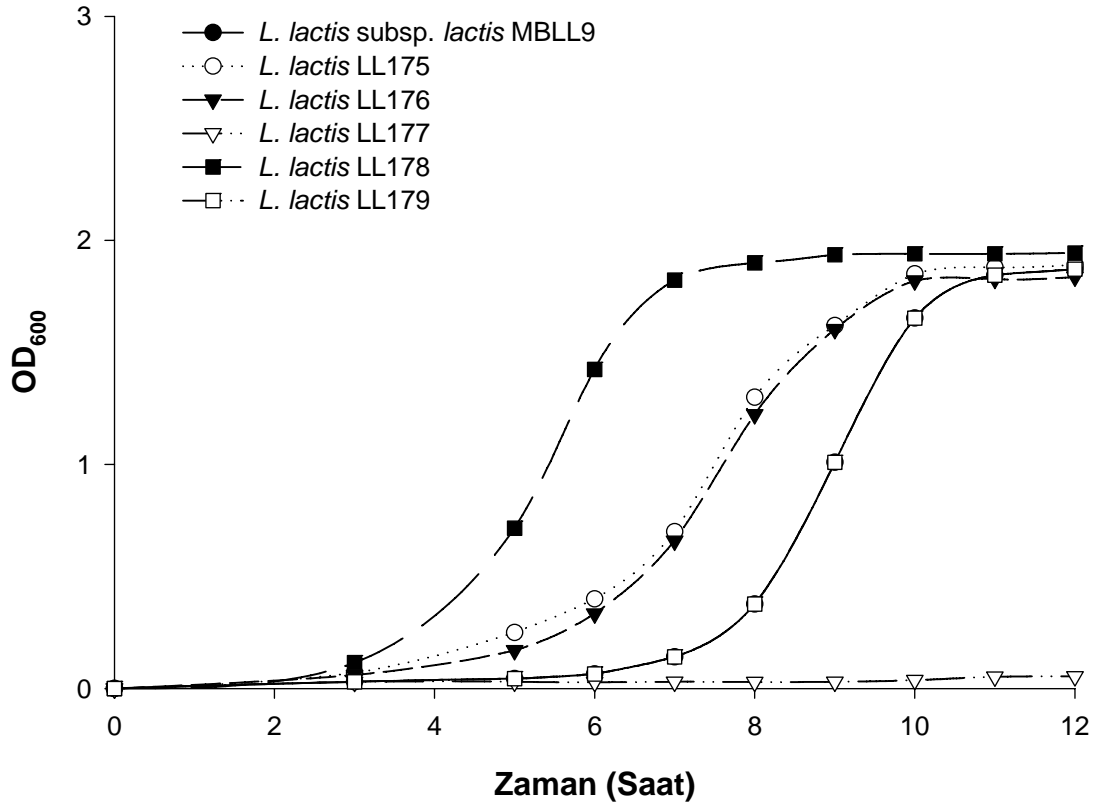
nisRK genlerinin laktisin 481 üretici suşuna klonlanması halinde laktisin üretim seviyesinde meydana gelen düşmenin, aynı zamanda bu suşun içsel (insintric) nisin dirençlilik düzeyinde de saptanması, nisin ve laktisin 481 üretimini kontrol eden ikili regülatör sistemler arasındaki uyumsuzluğu desteklemektedir. Farklı çevresel sinyalleri



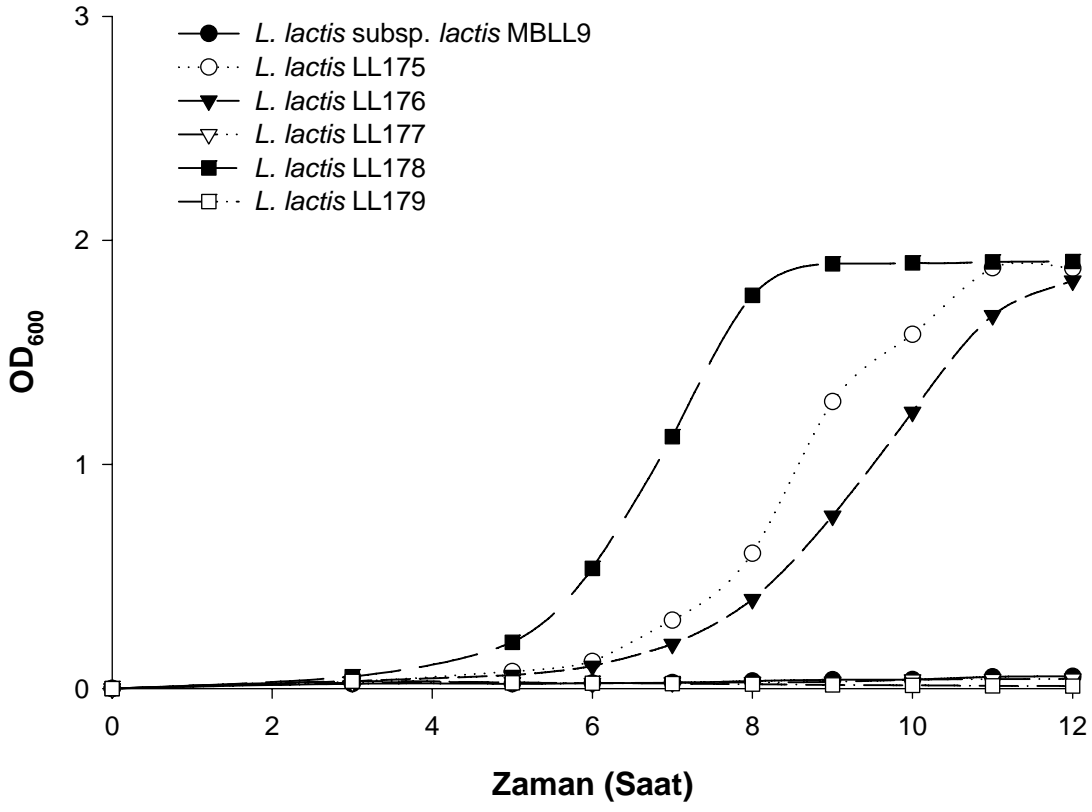
Şekil 4.11 Nisin içermeyen ortamda *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşu ve rekombinant suşların zamana karşı gelişim eğrileri



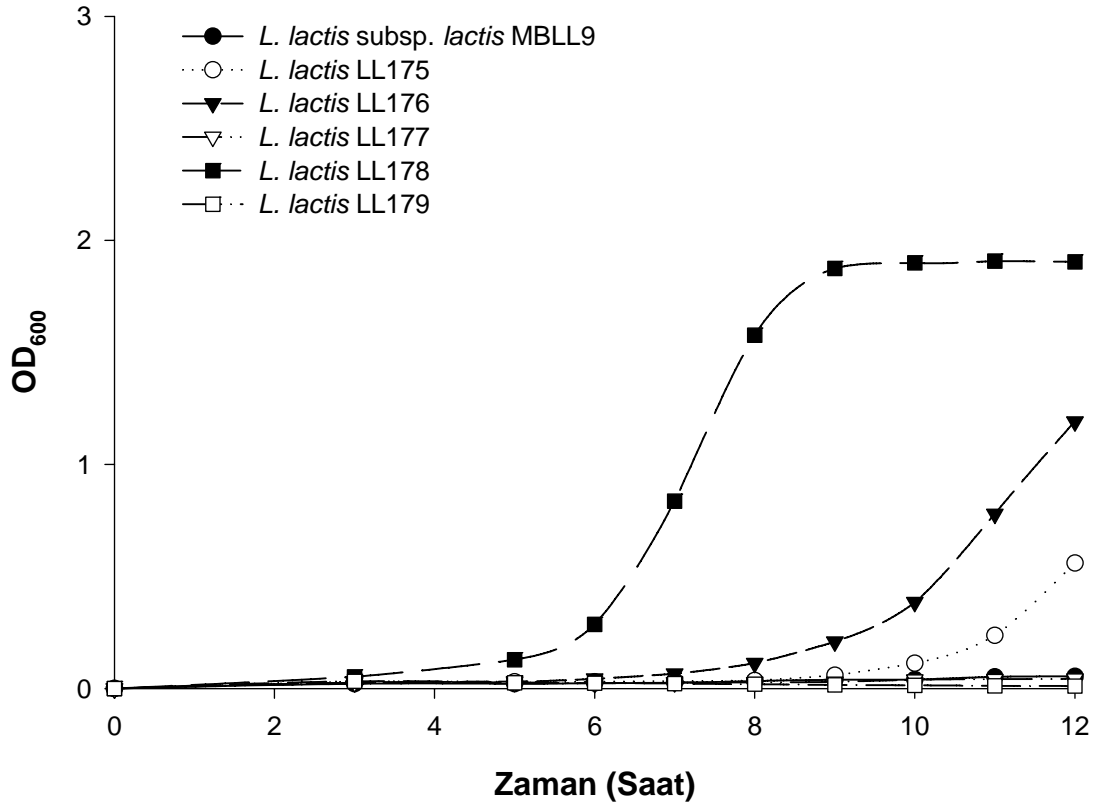
Şekil 4.12 100 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



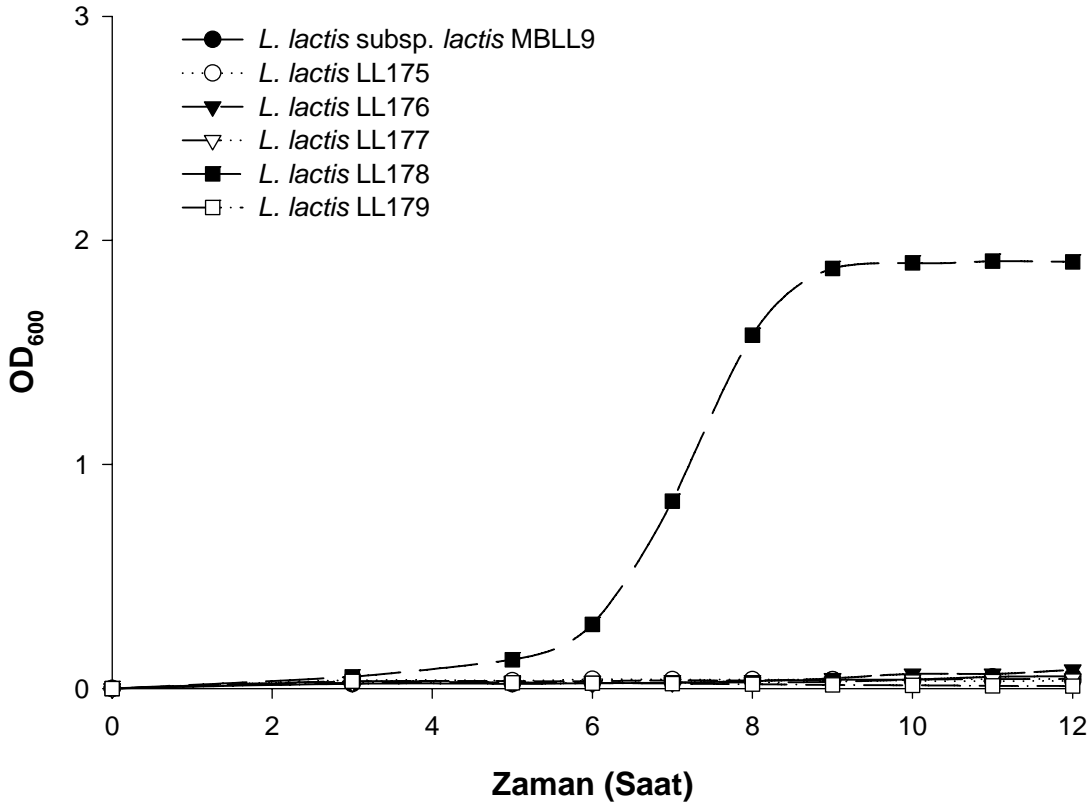
Şekil 4.13 200 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



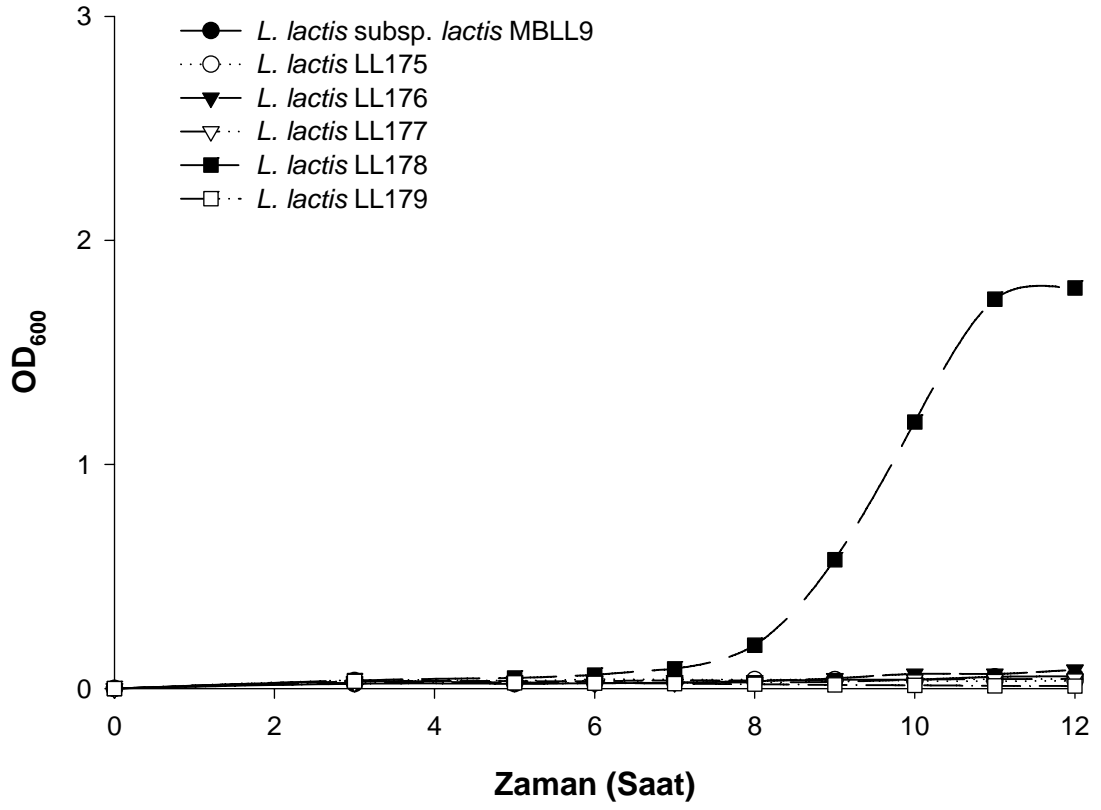
Şekil 4.14 250 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



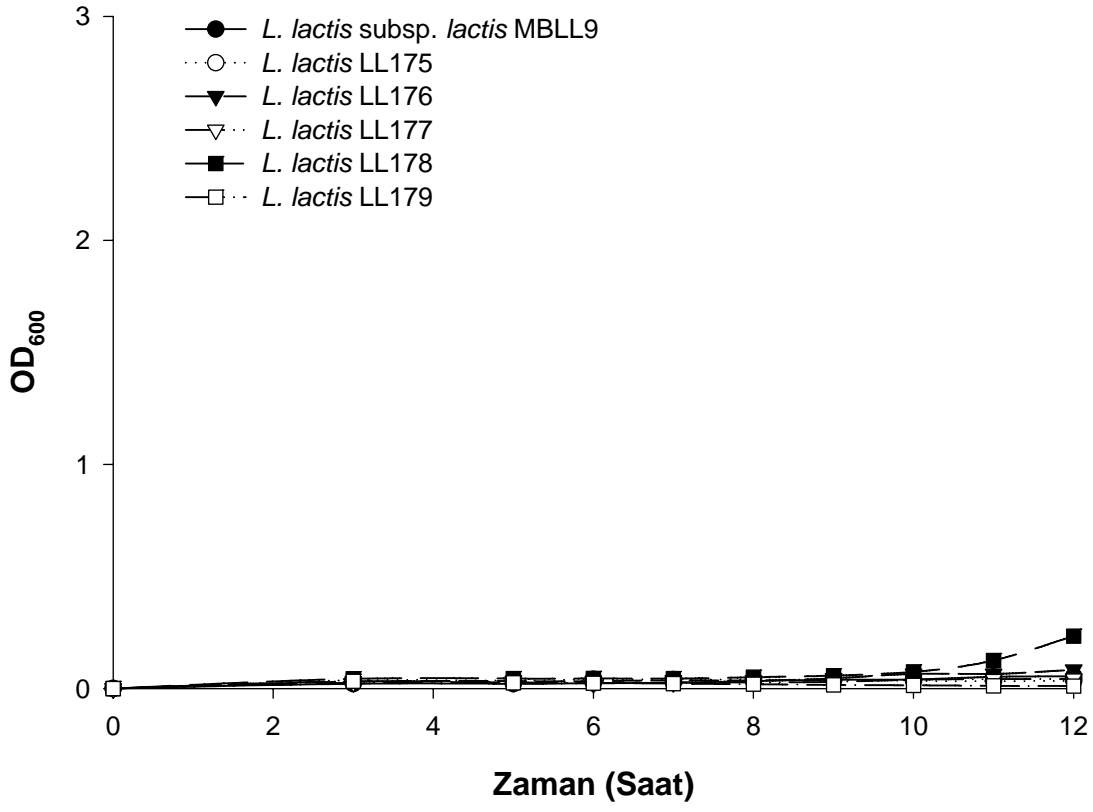
Şekil 4.15 300 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



Şekil 4.16 350 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



Şekil 4.17 400 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri



Şekil 4.18 500 IU mL⁻¹ nisin içeren ortamda suşların zamana karşı gelişim eğrileri

algılayan kinazlar ve transkripsiyonel aktivatör yanıt regülatörleri aynı anda çalıştıklarında büyük olasılıkla laktisin 481 sinyal transdüksiyonu bozulmakta ve transkripsiyonel aktivasyon mekanizmasının gücü düşmektedir. Bununla beraber *nisRKFEG* genlerinin birlikte aktarıldığı laktisin 481 üretici suşunda (*L. lactis* LL178) nisin dirençlilik düzeyi 250 IU mL⁻¹'den 500 IU mL⁻¹'ye çıkmıştır. Sadece *nisFEG* genlerinin aktarıldığı *L. lactis* LL175 suşunda bu direnç düzeyi 300 IU mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. *nisFEG* genlerinin analogu *lctFEG* genleri, yüksek düzeyde homoloji gösteren dirençlilik proteinlerini (ABC transport proteinleri) kodlamaktadır. Her iki gen grubunun kodladığı proteinler, lantibiyotiklerin hücre dışına transportunda görev almaktadır. Sadece *nisFEG* genlerinin klonlandığı *L. lactis* LL175 suşunda *nisRKFEG* genlerinin beraber klonlandığı *L. lactis* LL178 suşuna oranla nisin dirençlilik düzeyinde daha düşük bir düzeyde artışın meydana gelmesi, *nisRK* genlerinin otoindüksiyon işlevini desteklemektedir. *lanFEG* (*nisFEG* ve *lctFEG*) gen kopya sayısının üreticide artırılması, aktarılan genlerin regülatörleri ile birlikte yapıldığında transkripsiyon daha yüksek bir etkinliğe ulaştırılmaktadır. Bu çalışma sonuçları da *L. lactis* LL178 (*nisRKFEG* genlerini içeriyor) rekombinantında *nisRK* genlerinin ifadesinin FEG ürünlerinin artışına yol açtığı yani P45 promotorundan yapılan transkripsiyonu indüklediğini kanıtlamaktadır. Bu otoindüksiyon sistemi laktisin 481 suşunda homolog ve heterolog gen ifadesi çalışmaları için ideal bir mekanizma olarak görülmektedir.

Dirençlilik çalışmalarından elde edilen bir diğer önemli bulgu *nisI* geni aktarılan *L. lactis* LL176 suşunda nisin dirençlilik düzeyinin 250 IU mL⁻¹'den 350 IU mL⁻¹'ye çıkmasıdır. *nisI* geni ürünü bir lipoproteindir. NisI'nın dirençlilikteki rolü hücre membranı yüzeyinde lokalize olarak hücre dışındaki nisinin gevşek bağlanmasını yönlendirmek suretiyle, hedef hücredeki etkinliğini düşürmek olarak tanımlanmaktadır (Kuipers *et al.* 1993, Qiao *et al.* 1995, Ra *et al.* 1999, Stein *et al.* 2003, Koponen *et al.* 2004, Takala *et al.* 2004, Li and O'Sullivan 2006). Diğer lantibiyotik üreticilerinde *nisI* geninin benzer bir mekanizmaya sahip olduğu bugüne kadar belirlenmemiştir. Bu çalışma *nisI* gen ürününün laktisin 481 üreticisi suşta da aynı etkinliğe sahip olduğunu göstererek, *nisI* fonksiyonunu tanımlaması açısından kritik bir değer taşımaktadır.

Çalışmamızda geliştirilen *L. lactis* LL175 (*nisFEG* genleri klonlanan) ve *L. lactis* LL176 (*nisI* genleri klonlanan) rekombinantları, üretici suşta laktisin üretim düzeyini engellemeksizin nisin dirençlilik gelişimi görülmesi açısından önemlidir. Zira bu rekombinantlar nisin gıda koruyucusu olarak kullanıldığı ürünlerde starter kültürler olarak kullanılabilirler. Nisin gıdalara genellikle 50-200 IU mL⁻¹ düzeylerinde ilave edilmektedir. Bu rekombinantların kullanımı halinde, katılan nisinden etkilenmeleri engellenecek ve ürettikleri laktisin 481 sayesinde de ilave bir koruyucu özellik kazandıracaktır. *nisRKFEG* genlerinin klonlandığı *L. lactis* LL178 rekombinatında ise laktisin 481 üretimi önemli ölçüde düştüğü için pratik kullanımı önerilmemektedir. Ancak bu rekombinant lantibiyotiklerin regülasyon sistemlerinin tanımlanması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abee, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129; 1-10.
- Akçelik, O., Tükel, C., Özcengiz, G. and Akçelik, M. 2006. Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50; 306-313.
- Akkoç, N., Simşek, Ö. and Akçelik, M. 2008. Determination of metabolic plasmids and their effects on the growth of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MN24. *International Journal of Dairy Technology*, 62; 118-125.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. A simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46; 549-552.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B. and Nñez, M. 2005a. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 98; 254-260.
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M. and Nñez, M. 2005b. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 15; 893-900.
- Ávila, M., Garde, S., Medina, M., and Nñez, M. 2005. Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *Journal of Food Protection*, 68; 1026-1033.
- Chatterjee, C., Patton, G.C., Cooper, L., Paul, M., van der Donk, W.A. 2006. Engineering dehydro amino acids and thioethers into peptides using lactacin 481 synthetase. *Chem. Biol.* 13; 1109-1117.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2; 82-100.
- de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., van Alen-Boerrigter, I. and de Vos, W.M. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178; 3434-3439.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69; 193-202.
- Demel, R.A., Peelen T., Siezen, R.J., de Kruijff, B. and Kuipers, O.P. 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lactacin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.* 235; 267-274.

- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS*, 104; 2384-2389.
- Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C. and Cotter, P.D. 2008. Lantibiotic immunity. *Current protein and peptide science*, 9(1); 39-49.
- Dufour, A., Rincé, A., Uguen, P. and Le Pennec, J-P. 2000. IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. *J. Bacteriol.*, 182 (19); 5600-5605.
- Dufour, A., Hindré, T., Haras, D. and Le Pennec, J-P. 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol*, 31; 134-167.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M. and Entian, K-D. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 814-825.
- Franke, C.M., Tiemersma, J., Venema, G. and Kok, J. 1999. Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter protein LcnC. Involvement of LcnC in lactococcin A maturation. *J. Biol. Chem.*, 274; 8484-8490.
- Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H-G. 2000. Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Science)*, 55; 62-73.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. and Nes., I.F. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16; 229-240.
- Hindré, T., Le Pennec, J-P., Haras, D. and Dufour, A. 2004. Regulation of lantibiotic lactacin 481 production at the transcriptional level by acid pH. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231; 291-298.
- Holo, H. and Nes, I.F. 1989. High-frequency transformation by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55; 3119-3123.
- Horn, N., Fernández, A., Dodd, H. M., Gasson, M. J. and Rodriguez, J. 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70; 5030-5032.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27; 263-265.
- Immonen, T. and Saris, P.E.J. 1998. Characterization of the *nisFEG* operon of the nisin *Z* producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 strain. *DNA Seq.*, 9; 263-274.

- Jack, W.R., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59; 171-200.
- Kaiser, D., Jack, R.W. and Jung, G. 1998. Lantibiotics and microcins: Novel posttranslational modifications of polypeptides. *Pure and Appl. Chem.*, 70 (1); 97-104.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 39-85.
- Kleerebezem, M. 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25; 1405-1414.
- Kleerebezem, M. and Quadri L.E. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, 22; 1579–1596.
- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J. and Saris, P.E.J. 2002. Nis B is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology*, 148; 3561-3568.
- Koponen, O., Takala, T.M., Saarela, U., Qiao, M. and Saris, P. E. J. 2004. Distribution of the NisI immunity protein and enhancement of nisin activity by the lipid-free NisI. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231; 85-90.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. and de Vos W.M. 1993. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur.J.Biochem.*, 216; 281-291.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G.G.A., Luensink, E.J. and de Vos, W.M. 1995. Autoregulation of Nisin Biosynthesis in *Lactococcus lactis* by Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, 270; 27299-304.
- Li, H. and O'Sullivan, D.J. 2006. Identification of a *nisI* promoter within the *nisABCTIP* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J. Bacteriol.*, 188; 8496-8503.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N. and Kuipers, O.P. 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (3); 455-476.
- Macrina, F.L., Kopecko, D.J, Jones, K.R., Evans, R.P. and Clewell, D.B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19; 345-353.

- Madsen, S.M., Hindré, T., Le Pennec, J.P., Israelsen, H. and Dufour, A. 2005. Two acid-inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RcfB. *Mol Microbiol*, 56; 735-746.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol.*, 25; 285-308.
- Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: Insight and Foresight for New Paradigm. *Journal Of Bioscience and Bioengineering*, 102 (3); 139-149.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 113-28.
- O'Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lacticin 481, produced by *L. lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.*, 85; 2130-2140.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2003. A lacticin 481 producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *J. Appl. Microbiol.*, 95; 1235-1241.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P. and Akçelik, M. 2007. Technological Characterization of Wild-type *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Raw Milk and Traditional Fermented Milk Products in Turkey. *Lait*, 87; 521-534.
- Patton, G.C. and van der Donk, W.A. 2005. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8; 543-551.
- Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeaud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (1); 279-284.
- Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeaud, M.J. and de Vos W.M. 1993. Structure, organization, and expression of the *lct* gene for Lacticin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (22); 16361-16368.
- Pillidge, C.J., Collins, L.J., Ward, L.J.H., Cantillon, B.M., Shaw, B.D., Timmins, M.J., Heap, H.A. and Polzin, K.M. 2000. Efficacy of four conjugal lactococcal phage resistance plasmids against phage in commercial *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* cheese starter strains. *Int. Dairy J.*, 10; 617-625.
- Qiao, M., Immonen, T., Koponen, O., and Saris, P. E. J. 1995. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, 131; 75-80.

- Qiao, M. and Saris, P. E. J. 1996. Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, 144; 89-93.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T. and Saris, P. E. J. 1996. Regulation of The Nisin Operons In *Lactococcus lactis* N8. *Journal of Appl. Bacteriol.*, 80; 626-634.
- Ra, R. S., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, P. E. J. 1996. Genes Responsible for Nisin Biosynthesis, Regulation and Immunity from a Regulon of Two Operons and Are Induced By Nisin In *Lactococcus lactis* N8. *Journal of Appl. Bacteriol.*, 142; 1281-1288.
- Ra, R., Beerthuyzen, M.M., de Vos, W.M., Saris, P.E. and Kuipers, O.P. 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene clusters of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology*, 145; 1227-1233.
- Rincé, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C.M. and Le Penec, J.P. 1994. Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of Genes Involved in Production of Lactococcin DR, a Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (5); 1652-1657.
- Rincé, A., Dufour, A., Uguen, P., Le Penec, J.P. and Haras, D. 1997. Characterization of the lacticin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (11); 4252-4260.
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M. and Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.*, 10; 7-15.
- Rodríguez, E., Arqués, J.L., Nuñez, M., Gaya, P. and Medina, M. 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 71; 3399-3404.
- Sahl, H-G., Kordel, M. and Benz, R. 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide nisin. *Arch. Microbiol.*, 149; 120-124.
- Sahl, H-G. 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, In: Nisin and novel antibiotics. Jung, G. and Sahl, H.G. (eds), Escom, Leiden, pp. 347-358, The Netherlands.
- Sahl, H-G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230; 827-853.

- Sahl, H-G. and Bierbaum, G. 1998. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52; 41-79.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
- Schillinger, U. and Lücke, F-K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55; 1901-1906.
- Siegers, K. and Entian, K.D. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 1082-1089.
- Siegers, K., Heinzmann, S. and Entian, K-D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.*, 271; 12294-12301.
- Siezen, R.J., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1996. Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 171-184.
- Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I. And Entian, K-D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 278; 89-94.
- Takala, T.M., Koponen, O., Qiao, M. and Saris, P.E.J. 2004. Lipid-free NisI: interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237; 171-177.
- Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J. and Bourgeois, C.M. 1991. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 74; 1145-1150.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82; 165-185.
- Uguen, P., Hamelin, J., Le Penec, J-P. and Blanco, C. 1999. Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65; 291-293.
- Uguen, P., Le Penec, J-P. and Dufour, A. 2000. Lantibiotic biosynthesis: interactions between pre-lactacin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *J. Bacteriol.*, 182 (18); 5262-5266.

- Uguen, P., Hindré, T., Didelot, S., Marty, C., Haras, D., Le Pennec, J-P., Vallée-Réhel, K. and Dufour, A. 2005. Maturation by LctT is required for biosynthesis of full-length lantibiotic lactacin 481. *Appl Environ Microbiol.*, 71(1); 562-565.
- Xie, L., Miller, L.M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N.L. and van der Donk, W. A. 2004. Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science*, 303; 679-681.
- van den Hooven, H.W., Lagerwerf, F.M., Heerma, W., Haverkamp, J., Piard, J-C., Hilbers, C.W., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. and Rollema, H.S. 1996. The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.*, 391; 317-322.
- van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P and de Vos, W. M. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175; 2578-2588.
- Willey, J.M. and van der Donk, W.A. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology*, 61; 477-501.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W. and Tagg, J.R. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 1148-1156.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67; 1616-1619.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ercan KOCA
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 30.10.1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara Laborant Meslek Lisesi (1997)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü (1998-)