

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

**ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERDE MİKROBİYAL SEKONDER
METABOLİTLERİN SENTEZİNDEN SORUMLU GENLERİN
TARANMASI**

İsmail ACER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
Haziran 2011**

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

**ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERDE MİKROBİYAL SEKONDER
METABOLİTLERİN SENTEZİNDEN SORUMLU GENLERİN
TARANMASI**

İsmail ACER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
Haziran 2011**

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

İsmail ACER tarafından yapılan “Endemik Bitki Rizosferlerinden İzole Edilen Aktinomisetlerde Mikrobiyal Sekonder Metabolitlerin Sentezinden Sorumlu Genlerin Taranması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Doç. Dr. Murat KIZIL

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

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../2008

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca beni yönlendiren bilgisi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a teşekkür ederim.

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

Yüksek lisansa başladığım günden beri grup olmanın bilinci içinde olan ve çalışmada gerekli yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Süleyman ÖZAKIN, İlknur PORSUK ve Bülent BALI'ya teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, hayatın her türlü zorluğunda yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans dönemi boyunca her türlü sıkıntıda yanımda olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Evin VARLI'ya teşekkür ederim.

Değerli dostlarım Hikmet ILDIZ ve Ferit ERGİN'e teşekkür ederim.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (DÜBAP) 11-FF-119 nolu projeye desteklerinden dolayı ve TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna 109T843 nolu projeye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Genel Bilgiler.....	5
2.1.1. Sekonder Metabolitler.....	5
2.1.2. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri.....	7
2.1.3. <i>Streptomyces</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	13
2.1.4. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS).....	18
2.1.5. Poliketid Sentazlar (PKS).....	22
2.2. Önceki Çalışmalar.....	28
3. MATERYAL ve METOD.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Biyolojik Materyal.....	33
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.1.3.1. Tris-HCl/Sükroz/EDTA (TSE).....	33
3.1.3.2. Tris-baz/Asetik/Asit EDTA (TAE, 50x).....	34
3.1.3.3. Isopropil-β-D-Thiogalactoside (IPTG).....	34

3.1.3.4	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal).....	34
3.1.4.	Kullanılan Besiyerleri.....	34
3.1.5.	Kullanılan Enzimler.....	35
3.1.6.	Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR).....	35
3.1.7.	DNA'nın Jelden Geri Kazanılması.....	35
3.1.8.	PCR Ürünlerinin Klonlanması.....	35
3.1.9.	Plazmit İzolasyonu.....	35
3.1.10.	Kullanılan Cihazlar.....	36
3.2.	Metod	37
3.2.1.	Kromozomal DNA İzolasyonu.....	37
3.2.2.	PCR Amplifikasyonu.....	37
3.2.2.1.	NRPS Geninin Adenilasyon (A) Domainin PCR ile Amplifikasyonu.....	37
3.2.2.2.	Tip I PKS Geninin Ketosentaz (KS) Domainin PCR ile Amplifikasyonu.....	38
3.2.3.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.2.4.	Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması.....	39
3.2.5.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	39
3.2.6.	Klonlama.....	39
3.2.6.1.	Ligasyon.....	39
3.2.6.2.	Transformasyon.....	39
3.2.6.3.	Mavi Beyaz Koloni Seçimi.....	40
3.2.6.4.	Bakterilerden Plazmit DNA'nın İzolasyonu.....	40
3.2.7	DNA Dizileme.....	40
3.2.8.	Biyoinformatik İncelemeler.....	40
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1.	Bulgular	41

4.1.1.	<i>Streptomyces</i> İzolatlarının Üretilmesi.....	41
4.1.2.	Kromozomal DNA.....	46
4.1.3.	NRPS ve Tip I PKS Genlerinin Genomda Taranması.....	46
4.1.3.1.	NRPS Genlerinin Taranması.....	46
4.1.3.2.	Tip I PKS Genlerinin Taranması.....	49
4.1.3.3.	PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması.....	53
4.1.4.	PCR ile Elde Edilen Ürünlerin Klonlanması.....	55
4.1.4.1.	NRPS Genlerinin Adenilasyon Domainlerinin Klonlanması.....	55
4.1.4.2.	Tip I PKS Genlerinin Ketosentaz Domainlerinin Klonlanması.....	59
4.1.5.	Biyoinformatik İncelemeler.....	61
4.1.5.1.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH61'in NRPS Genlerinin İncelenmesi.....	62
4.1.5.2.	<i>Streptomyces</i> sp. AR24'ün NRPS Genlerinin İncelenmesi.....	62
4.1.5.3.	<i>Streptomyces</i> sp. AS31'in Tip I PKS Genlerinin İncelenmesi.....	63
4.1.5.4.	<i>Streptomyces</i> sp. CA3'ün Tip I PKS Genlerinin İncelenmesi.....	64
4.2.	Tartışma.....	65
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	69
6.	KAYNAKLAR	71
	ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÖZET

ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN LOKAL AKTİNOMİSETLERDE MİKROBİYAL SEKONDER METABOLİTLERİN SENTEZİNDEN SORUMLU GENLERİN TARANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İsmail ACER

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Biyoaktif sekonder metabolitler; antibiyotikler, antitümör ajanlar, toksinler ve sideroforları içeren ve işlevsel olarak birbirinden oldukça farklı biyokimyasal sınıflara dahil olan bileşiklerdir. Mikrobiyal sekonder metabolitler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin kaynaklarından birini teşkil ederler. Aktinomisetler yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için en önemli kaynaklardan birini teşkil etmektedirler. Bu bileşiklerin çoğu Poliketid Sentazlar (PKS) ve Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS) tarafından sentezlenen biyoaktif moleküllerdir. Son yıllarda, bu metabolitlerin sentezinde metabolik potansiyeli yüksek olan mikroorganizmaların biyosentetik genlerinin karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu yaklaşım her türlü kaynaktan izole edilen aktinomisetlerin biyoaktif metabolit üretme kapasitesini belirlemek ve yeni biyosentetik genleri keşfetmek için başarıyla uygulanmaktadır.

Çalışmamızda, daha önce 3 farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından izole edilmiş, moleküler teşhisleri yapılmış ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş olan 15 farklı *Streptomyces* türünün NRPS ve tip I PKS genlerinin PCR yöntemi ile taranması amaçlandı. İzolatların genomlarında yapılan taramada; 15 izolatın tamamında NRPS, 14 tanesinde de tip I PKS geni tespit edildi. *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR24, *Streptomyces* sp. CA14 ve *Streptomyces* sp. BAH46 izolatları için NRPS genlerinin adenilasyon (A) domainleri klonlanarak bu izolatlar için mini gen kütüphaneleri kuruldu. *Streptomyces* sp. CA3 ve *Streptomyces* sp. AS31 izolatlarının ise tip I PKS genlerinin Ketosentaz (KS) domainleri klonlanarak mini gen kütüphaneleri kuruldu. *Streptomyces* sp. AAH61 ve *Streptomyces* sp. AR24'ün NRPS *Streptomyces* sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3 izolatlarının ve tip I PKS mini gen kütüphanelerinden seçilen klonların DNA dizi analizleri yapıldı. Elde edilen sekanslar NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi) web sitesindeki BLAST programı kullanılarak analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda; *Streptomyces* sp. AAH61 ve *Streptomyces* sp. AR24'ün her birinin birbirinden farklı üç NRPS genine ait A domaini

taşıdığı tespit edildi. Bunun yanı sıra *Streptomyces* sp. AS31'in iki farklı, *Streptomyces* sp. CA3'ün ise yalnızca bir adet tip I PKS geni içerdiği bulundu. Elde edilen bu genlerden büyük bir kısmının şimdiye kadar bulunmuş olan NRPS ve tip I PKS genleriyle düşük homolojilere sahip olması bu genlerin yeni genler olabileceği izlenimi uyandırmaktadır. Yapılacak hibridizasyon deneyleri ile bunu kesinliğe kavuşturmak mümkün olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, NRPS, PKS, PCR, Sekonder Metabolit.

ABSTRACT

THE SCREENING OF GENES RESPONSIBLE FOR BIOSYNTHESIS OF THE SECONDARY METABOLITES FROM ACTINOMYCETES ISOLATED FROM RHIZOSPHERIC SOILS OF ENDEMIC PLANTS

MsC THESIS

İsmail ACER

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

2011

Bioactive secondary metabolites are a functionally diverse class of biochemically synthesized compounds, which include antibiotics, antitumor agents, toxins, and siderophores. Microbial secondary metabolites represent a large source of compounds endowed with ingenious structure and potent biological activities. The actinomycetes traditionally represent one of the most important sources for the discovery of new metabolites with biological activity; and many of these are described as being produced by polyketide synthetases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS). The last decade, these biosynthetic genes (NRPSs, PKSs) are studied present a strain characterization system based on the metabolic potential of microbial strains by targeting. This method was applied to study the distribution of PKS and NRPS biosynthetic systems in a collection of wild-type actinomycetes isolated from different habitats samples that were evaluated for the production of antimicrobial activities.

In the present study, it was used 15 *Streptomyces* strain that were previously isolated from rhizospheric soil of endemic plants. The molecular characterization and antimicrobial activities of these strains were also previously determined. Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) and type I Polyketide Synthase (PKS) genes were screened by polymerase chain reaction (PCR) in these strain. NRPS genes were amplified from all of 15 *Streptomyces* strains and type I PKS genes were detected in 14 out of 15 *Streptomyces* strain. PCR products of NRPS genes were cloned and constituted mini libraries from *Streptomyces* spp. AAH61, AR24, CA14 and BAH46. PCR products of type I PKS genes were cloned and constituted mini libraries from *Streptomyces* spp. CA3 and AS31. Sequence analyses of chosen clones were compared to the published sequences by performing BLAST search in the GenBank databases.

According to BLAST analysis, three A domains belong to different NRPS genes were detected in both *Streptomyces* sp. AAH61 and *Streptomyces* sp. AR24. Furthermore, two different KS domains of type I PKS genes were detected in *Streptomyces* sp. AS31 and only one type I PKS gene was found in *Streptomyces* sp. CA3. It was observed that the sequences obtained from mini libraries have low homology when compared to the genes reported so far. Therefore, these genes may be candidate novel genes that are responsible for new bioactive compounds. This hypothesis will be approved by hybridization studies in the genome of isolates.

Key word: *Streptomyces*, NRPS, PKS, PCR, Secondary Metabolite.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	<i>Aktinomiceatales</i> takımının sistematik sınıflandırılması	9
Çizelge 2.2.	Aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli antibiyotikler	10
Çizelge 2.3.	Ribozom dışı yolla sentezlenen bazı biyoaktif peptidler	19
Çizelge 4.1.	<i>Streptomyces</i> izolatlarının M2 besiyerindeki morfolojik özellikleri	41
Çizelge 4.2.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH61 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları	62
Çizelge 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH61 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları	62
Çizelge 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. AR24 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları	63
Çizelge 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. AR24 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları	63
Çizelge 4.6.	<i>Streptomyces</i> sp. AS31 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları	63
Çizelge 4.7.	<i>Streptomyces</i> sp. AS31 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASRx sonuçları	64
Çizelge 4.8.	<i>Streptomyces</i> sp. CA3 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları	64
Çizelge 4.9.	<i>Streptomyces</i> sp. CA3 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları	65

ŞEKİL ÇİZELGESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif bazı sekonder metabolitler	2
Şekil 2.1.	Önemli bazı doğal ürün antibiyotikler	7
Şekil 2.2.	<i>Streptomyces</i> 'ların aşamalı koloni gelişimi a) olgun vejetatif misellerin hava misellerine dönüşmesi. b) hava misellerinin spor zincirlerine dönüşmesi. c) olgun spiral spor zincirleri	14
Şekil 2.3.	<i>Streptomyces</i> 'ların hayat döngüsü	15
Şekil 2.4.	<i>Streptomyces</i> 'ların koloni yapıları	16
Şekil 2.5.	Bir tripeptid olan ACV'nin biyosentez mekanizması	20
Şekil 2.6.	Ribozomal olmayan peptid sentezinin adenilasyon ve açılasyon aşamaları	21
Şekil 2.7.	Ribozomal olmayan peptid sentezinin kondensasyon basamağı	21
Şekil 2.8.	Ribozomal olmayan peptid sentezinin sonlanma basamağı	22
Şekil 2.9.	Eritromisin biyosentez mekanizması	24
Şekil 2.10.	Poliketid sentezinin başlama aşaması	24
Şekil 2.11.	Poliketid sentezinin uzama aşaması	25
Şekil 2.12.	Poliketid sentezinin indirgenme basamağı	26
Şekil 2.13.	Poliketid sentezinin dehidrasyon ve redüksiyon basamakları	26
Şekil 2.14.	Poliketid sentezinin sonlanma aşaması	27
Şekil 3.1.	pGEM-T plazmit haritası	36
Şekil 4.1.	16S rRNA genleri baz alınarak neighbor-joining yöntemiyle çizilen filogenetik ağaç	42
Şekil 4.2.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. AAH61 b: <i>Streptomyces</i> sp. AAH68	43
Şekil 4.3.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. AR6 b: <i>Streptomyces</i> sp. AR24	43
Şekil 4.4.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. AS31, b: <i>Streptomyces</i> sp. AS40	43

Şekil 4.5.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. BA3, b: <i>Streptomyces</i> sp. BA14	44
Şekil 4.6.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. BAH46, b: <i>Streptomyces</i> sp. BS33	44
Şekil 4.7.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. CA3, b: <i>Streptomyces</i> sp. CA14	44
Şekil 4.8.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. a: <i>Streptomyces</i> sp. CA19, b: <i>Streptomyces</i> sp. CAH33	45
Şekil 4.9.	M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü. <i>Streptomyces</i> sp. CS43	45
Şekil 4.10.	İzole edilen kromozomal DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri	46
Şekil 4.11.	<i>Streptomyces</i> spp. BA3, BS33, CA3 ve CA19 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	47
Şekil 4.12.	<i>Streptomyces</i> spp. BA14, BAH46, CAH33 ve CS43 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	47
Şekil 4.13.	<i>Streptomyces</i> spp. AAH61, AAH68, AS31, AS40 ve CA14 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	48
Şekil 4.14.	<i>Streptomyces</i> sp. AR6 izolatından elde edilen PCR ürünleri	48
Şekil 4.15.	<i>Streptomyces</i> spp. AR24 izolatından elde edilen PCR ürünleri	49
Şekil 4.16.	<i>Streptomyces</i> spp. BS33 ve CAH33 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	50
Şekil 4.17.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH68 izolatından elde edilen PCR ürünleri.	50
Şekil 4.18.	<i>Streptomyces</i> spp. BA14 ve BAH46 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	51
Şekil 4.19.	<i>Streptomyces</i> spp. CA14 ve CS43 elde edilen PCR ürünler	51
Şekil 4.20.	<i>Streptomyces</i> sp. CA3 izolatından elde edilen PCR ürünleri	52
Şekil 4.21.	<i>Streptomyces</i> spp. AS40 ve CA19 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	52
Şekil 4.22.	<i>Streptomyces</i> spp. AAH61, AR6 ve AS31 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri	53
Şekil 4.23.	<i>Streptomyces</i> sp. BA3 izolatından elde edilen PCR ürünü	53
Şekil 4.24.	PCR sonucu elde edilen pütatif NRPS A domaini PCR ürünlerinin ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüleri	54

Şekil 4.25.	PCR sonucu elde edilen pütatif tip I PKS KS domainlerinin saflaştırıldıktan sonra agaroz jeldeki görüntüleri	54
Şekil 4.26.	Mavi-Beyaz koloni seçimi	55
Şekil 4.27.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH61 izolatu pütatif NRPS A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler.	56
Şekil 4.28.	<i>Streptomyces</i> sp. AR24 izolatu pütatif NRPS A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler	57
Şekil 4.29.	<i>Streptomyces</i> sp. CA14 izolatu pütatif NRPS A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler	58
Şekil 4.30.	<i>Streptomyces</i> sp. BAH46 izolatu pütatif A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler	59
Şekil 4.31.	<i>Streptomyces</i> sp. AS31 izolatu pütatif tip I PKS KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler	60
Şekil 4.32.	<i>Streptomyces</i> sp. CA3 izolatu pütatif tip I PKS KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler	61

KISALTMALAR ve SİMGELER

A:	Adenilasyon
ACP:	Açıl Taşıyıcı Protein
AT:	Açıltransferaz
ATP:	Adenozintrifosfat
BFB :	Brom fenol blue
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
bp:	Baz Çifti (Base Pair)
C:	Kondensasyon
°C:	Santigrat Derece
DH:	Dehidrataz
dk:	Dakika
DMF:	Dimetilformamid
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ER:	Enoilredüktaz
EtOH :	Etanol
EDTA :	Etilendiamintetrasetik asit
EtBr :	Etidyum bromür
FAS:	Yağasidi Sentaz
g :	Gram
GC:	Guanin/Sitozin Bazları
HIV:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IPTG:	İsopropil-β-D-Thiogalactoside
kDa:	Kilodalton
KR:	Ketoredüktaz
KS:	Ketosentaz
L :	Litre
LB:	Lurient Broth
L-DAP:	L-diaminopimelik asit
mm :	Milimetre
mM:	Milimolar
M :	Molarite

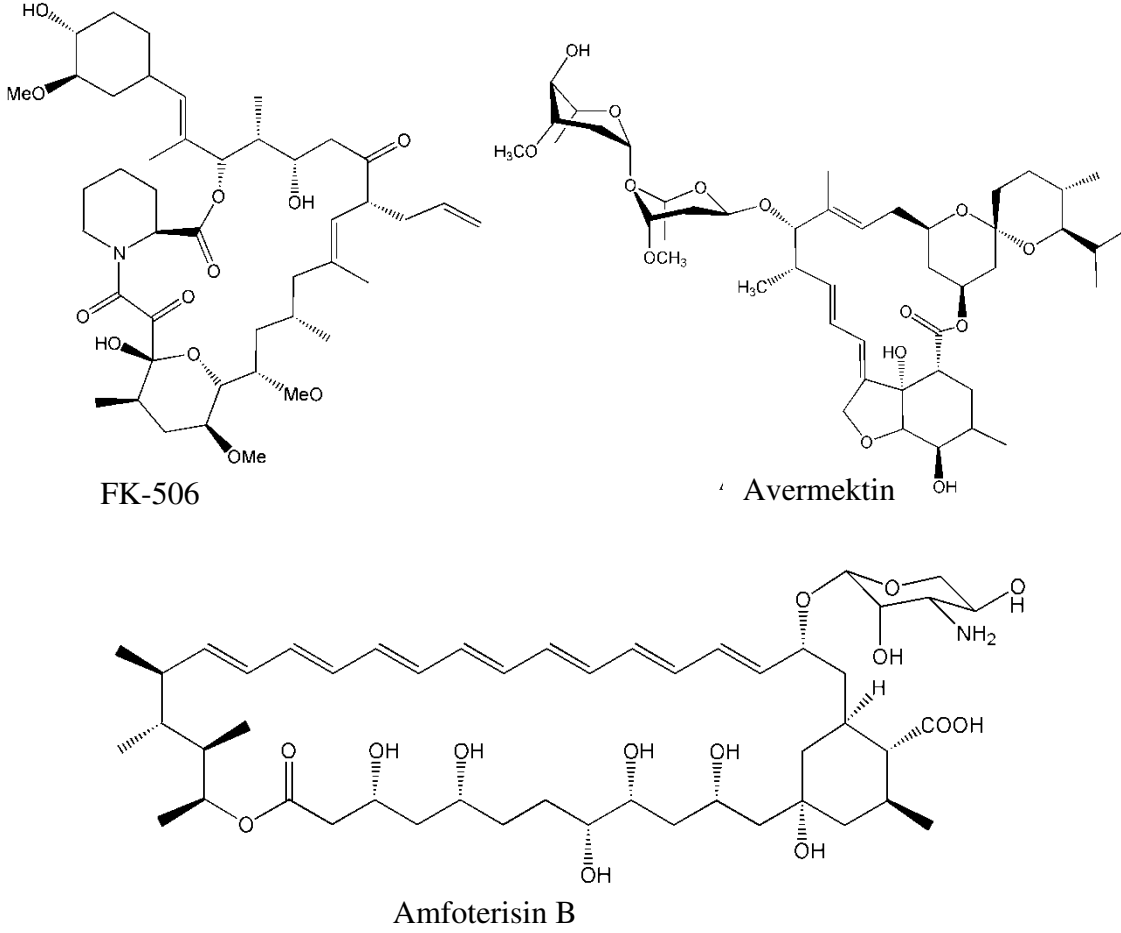
Mb: Megabaz
NCBI : Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
NRPS: Non-ribozomal Peptit Sentetaz
ng: Nanogram
O.D: Optik Dansite
PCP: Peptid Taşıyıcı Protein
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK: Poliketid
PKS: Poliketidsentaz
rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit
R: Ribozom
RNA: Ribonükleik asit
rpm : Dakikadaki devir sayısı (Revolution Per minute)
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
sn: Saniye
TAE: Tris-baz Asetik Asit EDTA
TE: Tiyoesteraz
TLC : İnce Tabaka Kromatografisi
T_m: Erime Sıcaklığı
TSB : Tryptone Soya Broth
U: Ünite
UV : Ultraviyole ışık
YEME: Maya Özütü-Malt Özütü
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
 μ g : Mikrogram
 μ l : Mikrolitre
 μ m: Mikrometre
 μ M: Mikromolar

1. GİRİŞ

Biyoaktif bileşikler, farklı kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı önemli moleküller olup ilaç keşfi için vazgeçilmez kaynaklardır (Savic ve Vailjevic 2006). Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif bileşikler sentezlenen doğal ürünlerin zengin kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Yeni ilaç geliştirilmesi çalışmalarında mikrobiyal sekonder metabolitlerin doğrudan kullanımı veya çeşitli modifikasyonlarla etkisinin artırılması ile elde edilen bileşikler; insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve aynı zamanda tarımda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Son zamanlarda biyoaktif sekonder metabolit keşfine yönelik çalışmalarda artış gözlenmektedir. Bu çalışmalar aktinomisetler üzerinde ve özellikle *Streptomyces* cinsine ait türler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bugüne kadar rapor edilen mikrobiyal sekonder bileşiklerin % 60'ından fazlasının aktinomisetler tarafından üretildiği düşünüldüğünde, bu çalışmaların neden aktinomisetler üzerinde yoğunlaştığı anlaşılabilir. Bu çalışmalar sonucunda antibakteriyel (penisilin, vankomisin ve eritromisin), antitümör ajanlar (ansamitosin, bleomisin), antihelmitik (avermektin, şekil 1.1), antifungal (amfoterisin B, Şekil 1.1), immünbaskılayıcı (FK-506, Şekil 1.1) bileşikler de rapor edilmiştir (Ayuso ve Genilloud 2004).

Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımından dolayı kemoterapotikler ve antimikrobiyal ajanlara karşı patojen organizmaların direnç kazanması nedeniyle antibiyotiklerin aktivitelerinin bu mikroorganizmalara karşı araştırılması ile yeni, etkili antimikrobiyal maddelerin elde edilmesi zorunlu hale gelmiştir. Özellikle 1990'lardan bu yana vankomisin dirençli enterokokların ortaya çıkışı, buna ek olarak bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüsler (HIV) gibi yeni patojenlerin ortaya çıkması doğal ürünlerin önemini tüm dünyada artırmaktadır.



Şekil 1.1. Aktinomisetler tarafından üretilen bazı biyoaktif sekonder metabolitler

Tıpta, ziraatte ve biyokimyasal araştırmalardaki uygulamalarda kullanılan biyoaktif peptid ve poliketid bileşiklerinin çoğu poliketit sentaz (PKS) ve ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) tarafından sentezlenirler (Ayuso ve Genilloud 2004). Yeni biyoaktif sekonder metabolit keşfine yönelik çalışmalar, PKS ve NRPS genlerinin taranması stratejisine dayanmaktadır. Sekonder metabolizma ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Bu genler; ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS), modüler (tip I PKS) ve aromatik (tip II PKS) poliketid sentazlar olup, özellikle tip I PKS ve NRPS genleri şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğunun yapısını oluşturmaktadırlar (Barrios-Llerena ve ark. 2007).

Yeni biyoaktif sekonder metabolitlerin taranması doğrultusundaki çalışmalar farklı habitatlardan yeni *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ve bunların biyoaktif etkili

bileşiklerinin değişik tarama stratejileri kullanılarak taranmasına doğru yönelenmektedir. Özellikle endemik bitki rizosferi toprakları antimikrobiyal aktiviteye sahip aktinomisetler açısından zengin bir kaynaktır (Barakata ve ark. 2002).

Çalışmamızda kullanılan *Streptomyces* türleri; Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren 3 farklı lokal endemik bitkinin (*Aethionema dumanii* (A), *Salvia aytachii* (B) ve *Achillea ketenoglui* (C)) kök çevresi topraklarından izole edilmiş ve teşhisleri yapılmış, antimikrobiyal özellikleri ve kimyasal taramaları gerçekleştirilmiş (Yılmaz ve ark. 2008) olup, bu türlerin biyoaktif sekonder metabolitlerinin sentezinden sorumlu olan tip I PKS ve NRPS genlerinin PCR ile taranması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. Sekonder Metabolitler

Bugün piyasada bulunan toksinler, reseptör agonist/antagonistleri, enzim inhibitörleri, antitümör ajan gibi antibiyotiklerin büyük çoğunluğu doğal bileşiklerden köken almaktadır (Iliç ve ark. 2007). Özellikle mikrobiyal kaynaklı doğal ürünler ilaç keşfi için en önemli kaynaklardan birini oluşturmaktadır. 1930’larda sülfonamid antibiyotiklerin ve 1940’larda penisilinin tanımlanması, tıpta bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede devrim yaratmıştır (Drews 2000 ve Sneader 2005). Bu keşifler sonraki 30 yıllık zaman içerisinde araştırmacıları bakterilere karşı yeni ilaç arayışına sevk etmişler. Selman Waksman’ın *Streptomyces griseus* tarafından üretilen streptomisini keşfetmesiyle bu alandaki çalışmalar aktinomiset grubu mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu arayışlar, bugün büyük bir çoğunluğunu doğal ürünlerin oluşturduğu antibakteriyel ilaç sınıfının keşfi ile sonuçlanmıştır (Sneader 2000, Finch 2003, Walsh 2005).

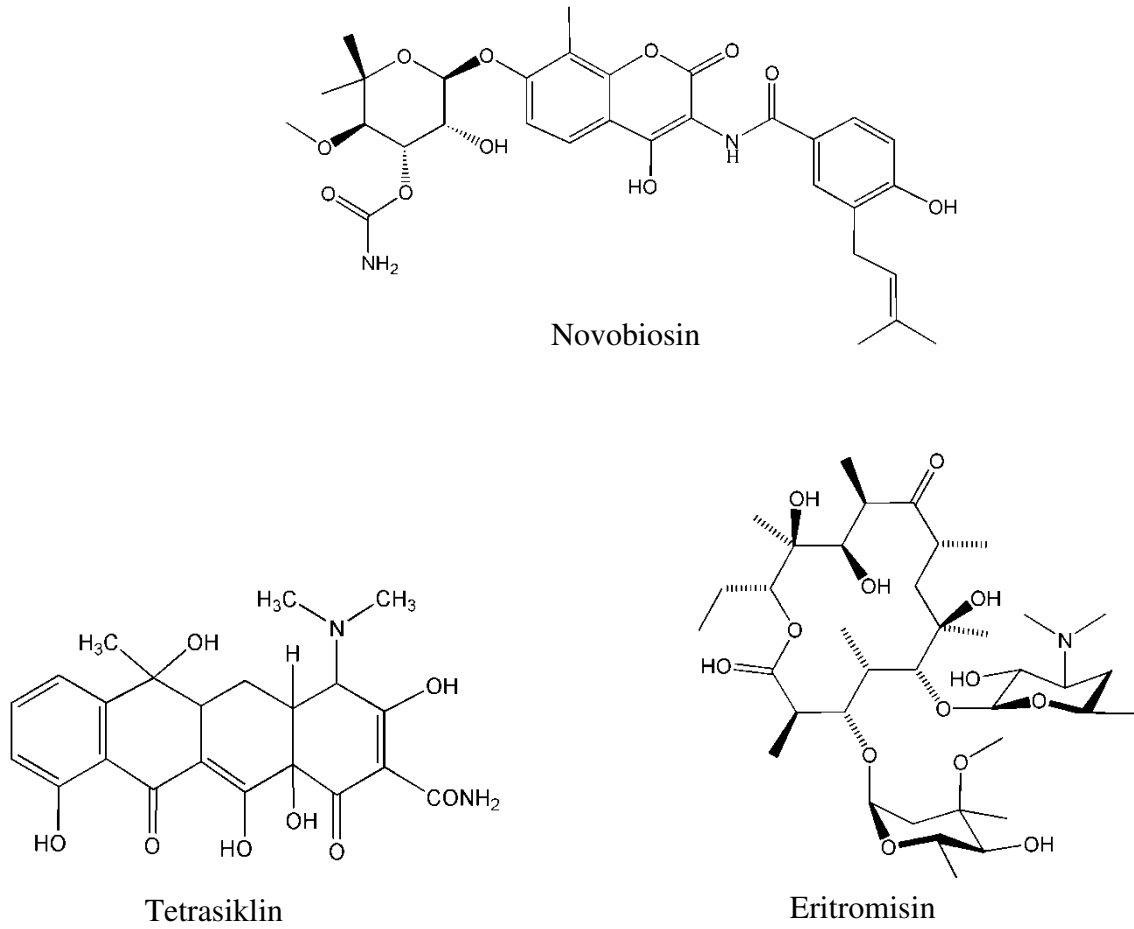
Sekonder metabolitler doğal ürünlerin en önemli grubunu oluşturmaktadır. Kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri bakımından hücrel makromoleküllerden ayrılırlar (Cannell 1998). Primer metabolitlerin ara ürünlerinden köken alan (Mehdi ve ark. 2006) sekonder metabolitler, molekül ağırlıkları 3000 daltondan küçük, taksonomik olarak farklılık gösteren, organizmaya özgü doğal ürünlerdir (Oskay ve ark. 2009). Sekonder metabolitler, organizmanın büyümesi için gerekli olmayıp, bulunduğu ortama daha iyi adapte olması için (savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücrel haberleşme gibi olayların gerçekleşmesinde rol alan bileşikler) gereken bileşiklerdir (Cannell 1998). Öte yandan çeşitli organizmalar arasında gerçekleşen simbiyotik, antagonistik ve sinerjistik etkileşimlerin temelinde sekonder metabolitler yatmaktadır (Strobel ve ark. 2004). Sekonder metabolitlerin sentezlenmeleri genellikle hücrenin bulunduğu ortamın besin miktarına ve tipine göre değişmektedir. Örneğin; ortama büyümeyi sınırlayan bir karbon kaynağı eklendiğinde antibiyotik sentezinde artış görülmektedir (Aharonowitz ve Demain 1978). Şekil 2.1’de doğal olarak üretilen bazı antibiyotikler görülmektedir.

Sekonder metabolizma genelde DNA üzerindeki bir grup gen tarafından ve nadiren de olsa plazmid DNA üzerindeki genler tarafından kontrol edilmektedir (Demain 1998). Primer metabolizmanın aksine, sekonder metabolizmayı yönlendiren metabolik yollar tam olarak anlaşılmamakla birlikte çeşitli hücrel stres koşullarının sekonder metabolit sentezinin başlamasında önemli sinyal oluşturduğu düşünülmektedir (Weber ve ark. 2003).

Bilinen 23000 mikrobiyal sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si mantarlar ve % 16'sı diğer bakteri türleri tarafından üretilmektedir. Aktinomisetler, sekonder metabolit üreticileri arasındaki en önemli gruptur. Aktinomisetler içerisinde *Streptomyces*, *Saccharopolispora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* ve *Actinoplantes* ticari öneme sahip bazı biyomoleküllerin üretiminden sorumlu önemli cinslerdir. Bunlar içerisinde *Streptomyces* cinsi % 55 ile en büyük paya sahiptir (Lazzarini ve ark. 2000). Şuan genom projeleri tamamlanmış olan *Streptomyces coelicolor* (Bentley ve ark. 2002) ve *Streptomyces avermitilis* (Omura ve ark. 2001) türlerinin ikisinde de genomlarının tümüne yayılmış durumda çok sayıda genin sekonder metabolit üretiminden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu genler çoğunlukla kromozomların uç kısımlarında bulunmaktadır (Omura ve ark. 2001).

Sekonder metabolit üretme yetenekleri en fazla olan organizmalar arasında *Streptomyces* cinsine ait üyeler yaklaşık 8000 bileşikle ilk sırada bulunmaktadır (Berdy 2004). *Streptomyces*'lar sekonder metabolitleri kendi doğal ortamlarında ve özellikle toprakta, morfolojik değişimlerle beraber üretmeye başlamaktadırlar (Vining 1990).

Mikrobiyal kaynaklı sekonder metabolitler potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin bir kaynağını oluştururlar. Sekonder metabolitler hem biyolojik aktivitelerinden hem de oldukça değişik kimyasal yapılarından dolayı farmakolojik çalışmalarda ilaç öncü maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle değişik hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların keşfedilmesi amacıyla sekonder metabolit kökenli bileşikler taranmaktadır. İlaç endüstrisi dışında tarım, tıp ve veterinerlik gibi alanlarda kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Önemli bazı doğal ürün antibiyotikler.

2.1.2. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri

Aktinomiset takımının üyeleri, doğada farklı ekolojik ortamlarda yaşayan Gram pozitif aerobik çürükçül bakterilerdir (Ames ve ark. 1984, Nonomura 1989, Halder ve ark. 1991, Franco ve ark. 2010). Aktinomisetlerin doğal yaşam alanları genellikle alkali topraklardır (Flaig ve Kutzner 1960, Goodfellow ve Williams 1983). Gruba ait türlerin çoğu nötral pH'da optimum üreme gösterirler (Williams ve Wellington 1982, Goodfellow ve Williams 1983). Topraktaki aktinomiset miktarını ve aktivitelerini etkileyen faktörlerin; besin, doğal organik madde, tuzluluk, bağıl nem, sıcaklık, pH ve toprak bitki örtüsü olduğu belirtilmiştir (Goodfellow ve Williams 1983, McCarthy ve Williams 1990).

Aktinomisetler tipik koloni özelliği göstermektedir. Bir aktinomiset kolonisi bakteriler gibi tek tek hücre kolonisi olmayıp, yoğun olarak substrat miselleri, hava

miselleri ve spor ihtiva etmektedirler. Substrat miselleri çubuk şeklinde hareketsiz elementlerdir. Bir substrat miselinde bazı hiflerin uzunluğu 600 µm'den fazla olabilir. Bu misellerin bazıları çok kısa, dallanmış ve eğridirler. Dallanma tipik olarak monoploidaldır. Hif hücrelerinin sitoplazması önceleri homojen olup, hücre yaşlandıkça koful oluşur, kofullarda yağ ve volutin granülleri bulunabilir (Elisa 1993). Çoğu aktinomiset besin yetersizliği gibi stres koşullarında substrat miselleri hava misellerine dönüşür (Weber ve ark. 2003) ve tüm koloniyi örtebilir, böylece pamuksu pudramsı bir görünüm kazanır (Kutzner 1956). Hava miselinin oluşumunda organizmanın yapısı, ortamın yapısı ve büyüme şartları rol oynamaktadır. *Streptomyces ambofaciens*'de kalsiyum miktarının 0.1-0.05 µg arasında olması havasal misel gelişimini artırdığı saptanmıştır (Natsome ve ark. 1989). Hava miselleri çoğu zaman görünür formlarda bulunmalarına rağmen bazı durumlarda ise sadece mikroskopta görülebilmekte ve çapları 1-1.4 µm'ye ulaşabilmektedir (Gordon ve Mihm 1957, Gordon ve Bernett 1974, Goodfellow ve ark. 1889). Standart koşullarda her bir aktinomiset türünde hava misellerinin yapısı karakteristik olup bu durum taksonomik çalışmalar için iyi bir kriter olarak kullanılabilir. Hava miselleri stres koşullarında spor zincirlerini oluşturur ve bu spor zincirlerinden düz-uzun veya kısa-serbest sporlar oluşur daha sonra bu sporlar çimlenerek vejetatif miselleri oluştururlar (Kieser ve ark. 2000).

Otlaklar (Lee ve Hwang 2002), kıyı kumsalları (Suzuki ve ark. 1994), yeraltı mağaraları (Groth ve ark. 1999), pirinç tarlaları (Hayakawa ve ark. 1988), meyve bahçeleri (Lee ve Hwang 2002) ve Antartika'daki buzullar gibi değişik habitatlarda yaşayan aktinomisetler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, aktinomisetlerin toprak ekolojisinde mikrobiyal populasyonun en önemli bileşenini teşkil ettiğini ve diğer bütün bakterilerden daha fazla bulunduğunu göstermiştir. (Jayasinghe ve Parkinson 2008). Aktinomisetleri önemli kılan diğer bir olgu da topraktaki azot döngüsünde rol almalarıdır (Elliot ve Lynch 1995).

Aktinomisetlerin karakterizasyonunun yapılabilmesi için katı kültürde büyüyen aktinomiset kolonisinin yapısının önemli kriterler arasında olduğu belirtilmiş olup, koloninin büyüklüğü ve şekli en önemli teşhis kriterlerinden biri olduğu kabul edilmiştir (Krinsky ve ark. 1914).

Aktinomisetler taksonomik olarak sınıflandırılken, morfolojilerinin yanında 16S rRNA genleri oldukça önem arz etmektedir. 16S rRNA genlerine dayanan sistematik sınıflandırmaya göre aktinomisetler 13 alt takıma, bu alt takımlar da 31 aileye ayrılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. *Aktinomisetales* takımının sistematik sınıflandırılması

Alttakım	Aile	Cins
Actinomycineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces, Mobiluncus, Arcanobacterium</i>
Actinopolysporineae	Actinopolysporaceae	<i>Actinopolyspora</i>
Catenulisporineae	Actinospicaceae	<i>Actinospica</i>
	Catenulisporaceae	<i>Catenulispora</i>
Corynebacterium	Nocardiaceae	<i>Nocardia, Rhodococcus.</i>
	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>
	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>
	Dietziaceae	<i>Dietzia</i>
	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella</i>
	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium, Turicella</i>
Frankineae	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
	Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>
	Geodermatophilaceae	<i>Geothermatophilus, Blastococcus</i>
	Microsphaeraceae	<i>Microsphaera</i>
	Acidothymaceae	<i>Acidothymus</i>
Glycomycineae	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>
Kineosporiineae	Kineosporiaceae	<i>Angustibacter, Kineococcus, Kineosporia, Quadrisphaera</i>
Micrococcineae	Micrococcaceae	<i>Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria, Nesterenkonia, Rorhia, Renibacterium, Stomatococcus</i>
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas, Oerskovia, Rarobacter</i>
	Dermabacteraceae	<i>Dermatobacter, Brachybacterium</i>
	Intrasporangiaceae	<i>Intrasporangium, Sanguibacter, Terrabacter</i>
	Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>
	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium, Agrococcus, Agromyces, Aureobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Rathaybacter</i>

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.1. *Aktinomisetales* takımının sistematik sınıflandırılması devamı.

Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Catellatospora</i> , <i>Couchioplanes</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Pilimelia</i> <i>Dactylosporangium</i>
Propionibacterianeae	Propionibacteraceae	<i>Propionibacterium</i> , <i>Luteococcus</i> , <i>Microlunatus</i> , <i>Propioniferax</i>
Pseudonocardineae	Pseudonocardaceae	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kibdelosporium</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Saccarothrix</i> , <i>Streptoalloteichus</i> , <i>Thermocrispum</i> .
Streptomyceineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
Streptosporangineae	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium</i> , <i>Herbidospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetrastroma</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i>
	Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i>
	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>

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

Aktinomisetler ekonomik değeri yüksek biyoaktif bileşik üreticileri olarak bilinirler. Antibiyotikler, vitaminler ve enzimler bu bileşiklerin başında gelir (de Boer ve ark. 2005). Ayrıca aktinomisetler farklı antimikrobiyal bileşik üretiminde en önemli kaynaklardan birini oluşturmaktadır (Terkina ve ark. 2006). Aktinomisetler tarafından üretilen önemli bazı antibiyotikler Çizelge 2.2’de görülmektedir (Kieser ve ark. 2000). Bu yüzden son zamanlarda aktinomisetlerin antimikrobiyal aktivitelerini konu alan bir çok çalışma yapılmaktadır. Yeni aktinomiset türleri demek yeni antimikrobiyal bileşik demek düşüncesi ile bu çalışmalar giderek artmaktadır.

Çizelge 2.2. Aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000).

Antibiyotik	Organizma	Kiyasal sınıfı	Hedef (etki)	Uygulama alanı
<i>Aktinomisin D</i>	<i>S. ssp.</i>	Peptid	Transkripsiyon	Antitümör
<i>Aktinomisin A</i>	<i>S. ssp.</i>	Makrolid	Sitokrom sistem	Telosidal
<i>Avermektin</i>	<i>S. avermitilis</i>	Makrolid	Klorit iyon yolu	Antiparazitik
<i>Bamberisin</i>	<i>S. bambergiensis</i>	Substitüe amino glikozit	Peptidoglikan	Büyümeyi teşvik edici
<i>Bialofos</i>	<i>S. hygroscopicus</i>	Peptid	Glutamin sentezi	Herbisidal
<i>Bleomisin</i>	<i>S. verticillus</i>	Glikopeptid	DNA	Antitümör
<i>Kandisidin</i>	<i>S. griseus</i>	Polien Makrolid	Membran	

Çizelge 2.2. Aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000) devamı.

Sefamisin	<i>Nocardia lactamdurans</i>	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Kloramfenikol	<i>S. venezuelae</i>	N-dikloroaçıl fenilpropanoid	Ribozom	Antibakteriyal
Kloratetrasiklin	<i>S. aureofaciens</i>	Tetrasiklin	Ribozom	Antibakteriyal
Sikloserin	<i>S. orchidaceus</i>	Substitiye siklik peptid	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Daptomisin	<i>S. roseosporus</i>	Lipopeptid	Lipoteikoik asit	Antibakteriyal
Daunomisin	<i>S. peucetius</i>	Antrasiklin	DNA interkalasyon	Antitümör
Desferrioksamin	<i>S. pilosus</i>	Peptid	Demir	
Doxorubisin (Adriamisin)	<i>S. peucetius</i> var. <i>ca esius</i>	Antrasiklin	DNA interkalasyon	Antitümör
Eritromisin	<i>Sac. erythraea</i>	Makrolid	Ribozom	Antibakteriyal
FK506 (Takrolimus)	<i>S. hygrosopicus</i>	Makrolid	FK proteinlerini bağlayarak	İmmün baskılayıcı
Fortimisin	<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
Fosfomisin	<i>S. spp.</i>	Fosforik asit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Gentamisin	<i>Micromonospora spp.</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
Higromisin B	<i>S. hygrosopicus</i>	Substitiye aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
Kanamisin	<i>S. kanamyceticus</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
Lasalosid	<i>S. lasaliensis</i>	Polieter	Membran	Büyümeyi teşvik edici
Lincomisin	<i>S. lincolensis</i>	Şeker-amid	Ribozom	Antibakteriyal
Milbemisin	<i>S. hygrosopicus</i>	Makrolid	Klorit demir kanalları	Antiparazitik
Mitramisin	<i>S. argillaceus</i>	Aureolik asit	DNA alkilasyon	Antitümör
Mitomisin C	<i>S. caespitosus</i> <i>S. verticillatus</i>	Benzakinon	DNA	Antitümör
Monensin	<i>S. cinnamomensis</i>	Polieter	Membran	Büyüme durdurucu
Natamisin	<i>S. nataensis</i>	Tetraen polien	Membran	Antifungal
Neomisin	<i>S. fradiae</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.2. Aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000) devamı.

Nikkomisin	<i>S. tendale</i>	Nükleozit	Kitin biyosentezi	Antifungal insektisidal
Nokardin	<i>Nocardia uniformis</i>	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Nosiheptid	<i>S. actuosus</i>	Tiyopeptid	Ribozom	Büyüme durdurucu
Novobiosin	<i>S. niveus</i>	Koumerin glikozit	DNA giraz (β -altünitesi)	Antibakteriyal
Nistasin	<i>S. noursei</i>	Polien Makrolid	Membran	Antifungal
Oleandomisin	<i>S. antibioticus</i>	Makrolid	Ribozom	Antibakteriyal
Oksitetrasiklin	<i>S. rimosus</i>	Tetrasiklin	Ribozom	Antibakteriyal
Fleomisin	<i>S. verticillus</i>	Glikopeptid	DNA	Antitümör
Paromomisin	<i>S. rimosus</i>	Aminoglukozit	Ribozom	Antiamibal
Polyoksins	<i>S. cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Nüklozit peptid	Kitin biyosentezi	Antifungal (Bitki koruma)
Pristinamisin	<i>S. pristinaespiralis</i>		Ribozom	Antibakteriyal
Puromisin	<i>S. alboniger</i>	Pürin nükleosit	Ribozom	Arastırma
Rapamisin	<i>S. hygrosopicus</i>	Makrolid	Protein bağları	İmmün baskılayıcı
Rifamisin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Anamisin	RNA polimeraz	Antibakteriyal Tüberküloz
Ristoketin	<i>Nocardia lurida</i>	Glikopeptid	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Salinomisin	<i>S. albus</i>	Polieter	Membran	Büyüme durdurucu
Spektinomisin	<i>S. spectabilis</i>	Aminosiklitol	Ribozom	Antibakteriyal
Spinosins	<i>Sac. spinosa</i>	Tetrasiklik makrolid	Bilinmiyor	İnsektisidal
Spiramisin	<i>S. ambofaciens</i>	Makrolid	Ribozom	Antibakteriyal
Streptogramins	<i>S. graminofaciens</i>	Makrosiklik laktonlar	Ribozom	Antibakteriyal
Streptomisin	<i>S. griseus</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
Streptotrisin	<i>S. lavendulae</i>	N-glikozit	Ribozom	Büyüme durdurucu
Teikoplanin	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Glikopeptid	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Tetrasikline	<i>S. aureofaciens</i>	Tetrasiklin	Ribozom	Antibakteriyal
Tiyenamisin	<i>S. cattleya</i>	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal

Çizelge 2.2. Aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli antibiyotikler (Kieser ve ark. 2000) devamı.

<i>Tiyoestrepton</i>	<i>S. azureus</i>	Tiopeptit	Ribozom	Büyüme durdurucu
<i>Tobramisin</i>	<i>S. tenebrarius</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Antibakteriyal
<i>Tilosin</i>	<i>S. fradiae</i>	Makrolid	Ribozom	Büyüme durdurucu
<i>Validamisin</i>	<i>S. hygrosopicus</i>	Aminoglikozit	Ribozom	Bitki koruyucusu
<i>Vankomisin</i>	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Glikopeptid	Peptidoglikan	Antibakteriyal
<i>Virjinamisin</i>	<i>S. virginiae</i>	Makrosiklik lakton	Ribozom	Büyüme durdurucu

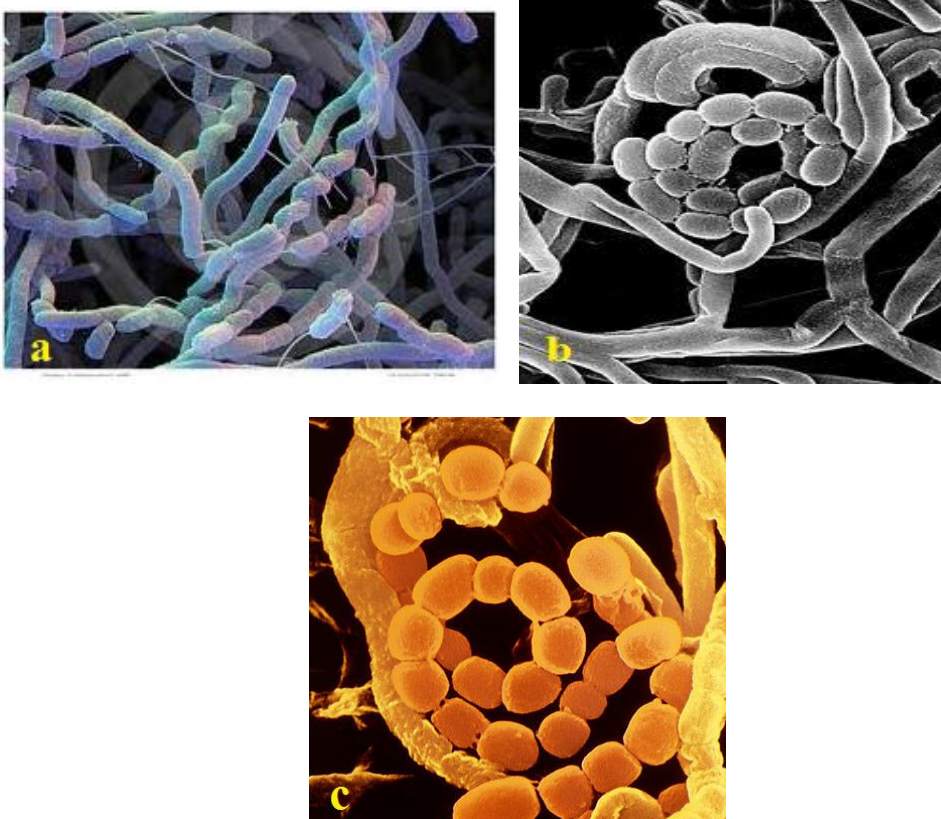
2.1.3. *Streptomyces* Cinsinin Özellikleri

Streptomyces cinsi ilk kez 1943 yılında Waksman ve Henrici tarafından önerilmiştir (Waksman 1950). Sonraki çalışmalarda, bu cinsin hücre duvarı yapısına göre *Actinobacteria* sınıfı (Stackebrandt ve ark. 1997) *Actinomycetales* takımı ve *Streptomycetaceae* ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Anderson ve Wellington 2001). *Streptomyces* cinsi geniş alana yayılış gösteren, Gram pozitif, kemoheterotrofik çürükçül toprak bakterileridir (Ashish ve ark. 2003). Toprak bakterileri olarak bilinmelerine rağmen, doğada hem sucul hem de karasal ortamlarda yoğun olarak bulunabilen *Streptomyces* cinsi üyeleri (Cao ve ark. 2004, Semedo ve ark. 2004) toprak ekolojisinde en fazla bulunan bakteri grubunu teşkil ederler (Hodgson 2000). Bundan ötürü toprak mikrobiyal populasyonunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bununla birlikte çeşitli bitkilerin kök çevrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır (Iznaga ve ark. 2004). Bitki kökleri çevresinde yoğun bulunmalarından dolayı bitkinin yaşamını sürdürmesi için bazı avantajlar sağlamaktadır. Özellikle bitkilerde patojeniteye neden olan çeşitli organizmaların üremesini engelleyerek, bitkileri bu patojenlere karşı korumaktadırlar (Crawford ve ark. 1993, Sembiring ve ark. 2000).

Streptomyces cinsinin topraktaki dağılışı ve aktivitelerini; nem oranı, pH, sıcaklık, organik madde içeriği ve bitki örtüsü gibi çevresel faktörler etkilemektedir (Basilio ve ark. 2003). Optimum gelişme pH'sı 6.5-8.0 aralığında optimum gelişme

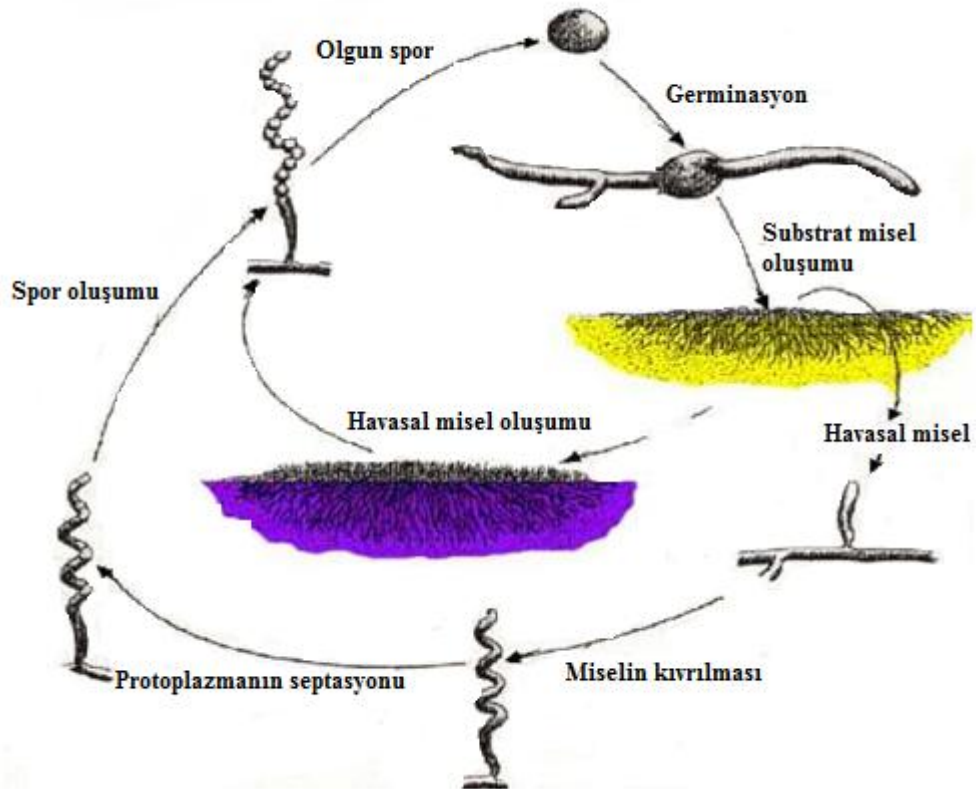
sıcaklığı ise 25-35 °C aralığındadır. Hücre çeperi peptidoglikan yapısında büyük miktarda L-diaminopimelik asit (L-DAP) içerirler. *Streptomyces* cinsinin termofilik, psikrofilik, asidofilik ve alkalofilik türleri de mevcuttur. Bu bakteriler besin durumuna göre sporulasyon ve çimlenme periyodunu izlerler (Vionis ve ark. 1998). Çoğu çürükçül olan *Streptomyces*'ların bazı türleri insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalık etkeni olarak bilinmektedir. Örneğin *Streptomyces scabies* patates, havuç ve turp gibi bitkilerde hastalık etkenidir (Hiltunen ve ark 2005).

Streptomyces cinsinin topraktaki biyopolimerlerin degradedasyonunda önemli rol oynarlar (Wang ve ark. 1989, Mc Carthy ve Williams 1992). Özellikle cinsin bazı türleri makro molekülleri parçalayan selüloz, kitinaz, lipaz ve ksilanaz gibi önemli hücre enzimleri üretebilmektedirler (Lechevalier ark. 1981, Peczynska-Czoch ve Mordarski 1988).



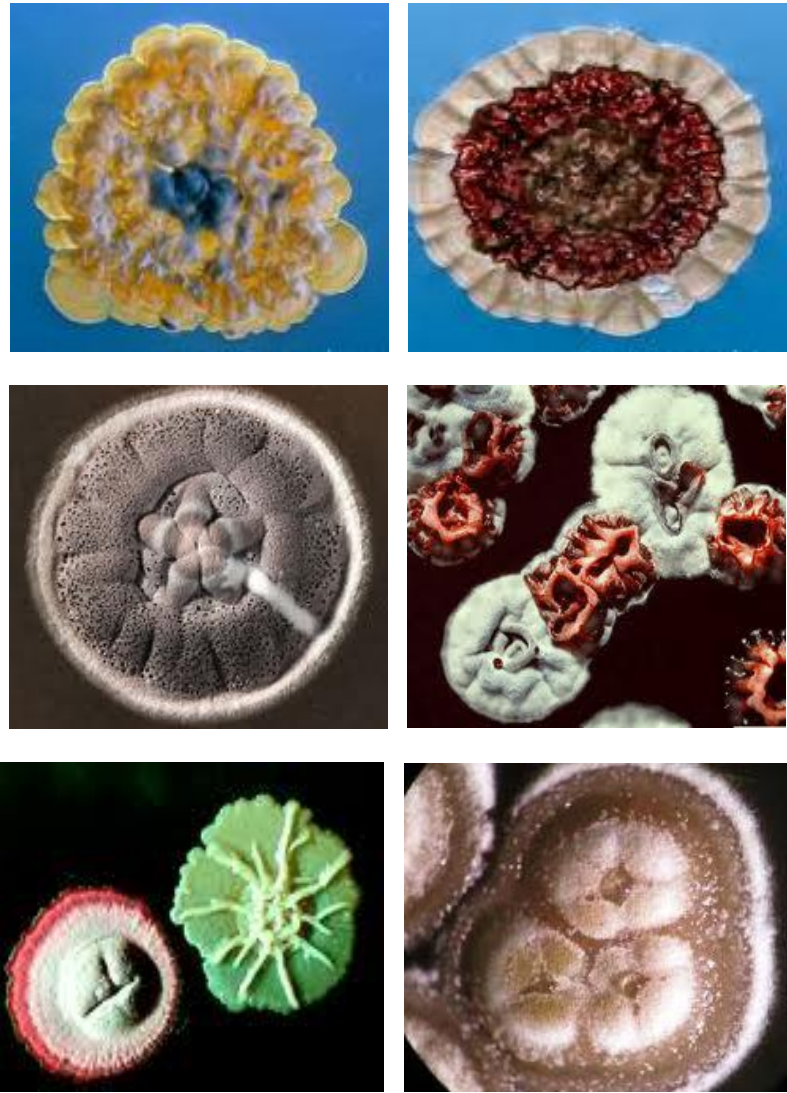
Şekil 2.2. *Streptomyces*'ların aşamalı koloni gelişimi **a)** olgun vejetatif misellerin hava misellerine dönüşmesi. **b)** hava misellerinin spor zincirlerine dönüşmesi. **c)** olgun spiral spor zincirleri (Hopwood 2006).

Streptomyces cinsi kompleks bir hayat döngüsüne sahiptir. Hem dallanan misel formunda büyümeleri hem de sporların oluşturulması ve oluşturulan sporların yayılmasında görev alan hava misellerini oluşturma bakımından filamentli mantarlara benzemektedirler (Flardh ve Buttner 2009). Cinsin üyeleri için karakteristik olan hava miselleri hareketsiz sporları içermektedir (Şekil 2.2b) (Williams ve ark. 1989). Hareketsiz olan sporların çimlenmesi ile üreme başlar ve vejetatif (substrat) miseller oluşur. Vejetatif misellerin uçlarında büyümenin başlaması ile yeni dallanmalar meydana gelir. Bu durum oluşacak yeni hücrelerin hücre duvarının misellerin uçlarında sentezlenmesi ile olur (Flardh ve ark. 2003). Vejetatif miseller besin kıtlığı gibi stres koşullarında hava misellerine dönüşür (Şekil 2.2a). Bu miseller yan zincir olarak gelişir ve arthrospor oluşturmaları ile hayat döngüsü tamamlanmış olur. Sporlar stres koşulları altında semi-dormant (yarı-uyku) olarak uzun bir süre toprakta çimlenmeden canlı kalabilmektedirler. Stres koşulları ortadan kalktığı zaman çimlenerek tekrar vejetatif miselleri oluşturabilirler (Şekil 2.3) (Kieser ve ark. 2000).



Şekil 2.3. Streptomyces'ların hayat döngüsü (Kieser ve ark. 2000).

Streptomyces'lar substrat misellerinin renginden sorumlu çok sayıda pigment üretebilmekte, ayrıca renkli ve difüzlenebilen pigmentler üreterek bulunduğu ortama renk verebilmektedirler (Goodfellow ve Simpson 1987). Oluşturdukları kolonilerin rengi türe özgü olup dairemsi, likensi ve derimsi şekillerde olabilir. Başlangıçta oldukça düz fakat, daha sonra pamuksu veya yünsü, tozsuz veya kadifemsi görüntülere dönüşebilmektedir (Şekil 2.4). Bu durum morfolojilerinin tanımlanmasında oldukça önemlidir (Korn-Wendisch ve Kutzner 1992).



Şekil 2.4. *Streptomyces*'ların koloni yapıları (<http://www.sciencephoto.com>)

Streptomyces cinsinin üyeleri oldukça büyük ve doğrusal bir kromozoma sahiptirler. Bunun yanı sıra sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu doğrusal plazmitler de içerebilirler (Mochizuki ve ark. 2003). Cinsin genomu hakkındaki bilgilerin çoğu *Streptomyces coelicolor* A(3)2 (Bentley ve ark. 2002) ve *Streptomyces avermitilis*'in (Ikeda ve ark. 2003) genom dizilişlerinin belirlenmesiyle elde edilmiştir. *S. coelicolor* 8.7 Mb büyüklüğündeki genomuyla ve 9.03 Mb'lık genomu ile *S. avermitilis* genom projeleri tamamlanmış bakteriler arasında en büyük bakteriyel genomlara sahiptirler. Ayrıca DNA'larında yüksek oranda G (guanin)/C (sitozin) bazlarının olması bu cinsin karakteristik bir özelliğidir (Ashish ve ark. 2003).

Streptomyces cinsinin üyelerinde yaşamın devam ettirilmesi için gerekli (hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon gibi olaylarda görev alan proteinler/enzimler) temel genler, genelde doğrusal kromozomun merkezine yakın bölgelerde bulunurken, temel olmayan genler ise (sekonder metabolitler, hidrolitik eksoenzimler, gaz vezikül proteinleri ve transpozonlar) kromozomların uçlarına yakın yerlerde konumlanmışlardır (Hopwood 1999).

Streptomyces cinsinin üyeleri geniş varyetede ve mükemmel kapasitede biyoaktif madde üreticisi olarak dikkat çekmektedirler. Çok sayıda *Streptomyces* türüne ait suş, biyoaktif bileşikler üretme kapasitelerine göre karakterize edilmektedir. Bitkilerin kök çevresi topraklarından izole edilen *Streptomyces violaceusniger* kümesine ait *Streptomyces griseus* ve *Streptomyces hygroscopicus* suşlarının çok sayıda biyoaktif metabolit üretme yetenekleri yönünden diğer *Streptomyces* türlerine üstünlük sağladığı görülmektedir (Hayakawa ve ark. 2004). Genom projesi tamamlanmış olan *S. coelicolor*'ın sekonder metabolit üretiminden sorumlu 29 gen kümesinin olduğu tahmin edilmektedir (Nett ve ark. 2009). Bu nedenle nadir bulunan ve yaygın olmayan *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ve sekonder metabolitler açısından taranması, doğal ürünlerin keşfinin çok önemli bir parçasıdır (Goodfellow ve Williams 1986). Yapılan çalışmalar sonucunda cinsin üyelerinden yaklaşık 8000 kadar doğal biyoaktif sekonder metabolit elde edilmiştir (Berdy 2004). Geniş spektrumda biyolojik aktiviteye sahip ve yapısal olarak çeşitlilik gösteren doğal bileşiklerin zengin kaynakları içerisinde; antibiyotikler (eritromisin ve tetrasiklin), antikanser ilaçlar (mitomisin ve daunomisin), immünbaskılayıcılar (rapamisin ve FK506) ve veterinerlikte kullanılan ajanlar (tiyostrepton ve monensin) başlıcalarıdır. *Streptomyces* 'lar biyoaktif sekonder bileşik

üretimi dışında başta insanlar ve hayvanlar olmak üzere çeşitli canlıların büyümeleri üzerinde olumlu etki yapan B₁₂ (Rickes ve ark. 1948) ve niasin, pentotanik asit, riboflavin (Hall ve ark. 1953) gibi önemli vitaminleri sentezlediği keşfedilmiştir. Bu bileşiklerin sentezinden sorumlu genler; ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS), modüler (tip I PKS) ve aromatik (tip II PKS) poliketid sentazlar, hidroksimetilglutaril koenzimA redüktazlar ve aminoglikozit dirençlilik genleridir (Metsa-Ketela ve ark. 1999, Anderson ve ark. 2002, Sigmund ve ark. 2003, Ritacco ve ark. 2003, Ayuso ve Genilloud 2005, Ayuso ve ark. 2005). Şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğu poliketidler, ribozomal olmayan peptidler veya her ikisinin hibridi olan moleküllerdir. Tip I poliketid sentazlar ve ribozomal olmayan peptid sentetazlar özellikle bu doğal ürünlerin biyosentezinde rol alırlar (Barrios-Llerena ve ark. 2007).

2.1.4. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)

Ribozomal olmayan peptid sentezi mekanizması ilk olarak 1971 yılında, yağ asidi sentez mekanizmasını da aydınlatmış olan Fritz Lipmann tarafından ortaya atılmıştır (Lipmann 1971). Bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenen, farmakolojik öneme sahip antibiyotikler ve antiviral bileşikler de içeren doğal peptidler ribozomal olmayan yolla sentezlenmektedir. Kimyasal yapıları oldukça çeşitlilik gösteren bu peptidler, yapılarında nonproteinogenik aminoasitler (D-aminoasitler, β -aminoasitler ve N-metilaminoasitler, hidroksiasitler) içerdiğinden dolayı büyük moleküllerdir (Döhren 1999).

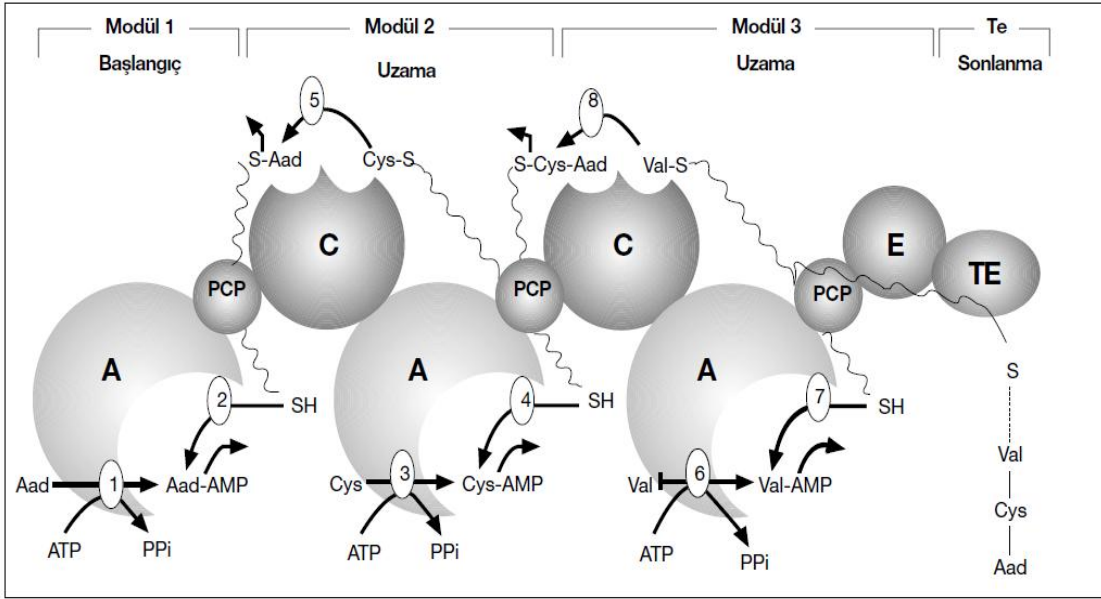
Ribozomal dışı yolla sentezlendiği tespit edilen ilk peptidler Gramidisin S ve Tirosidin'dir (Gevers ve ark. 1969, Roskoski ve ark. 1970). Çizelge 2.3'de verilen ve klinikte kullanılan önemli peptidler, ribozomal dışı yolla sentezlenmektedirler. Bunların sentezinden çok fonksiyonlu NRPS enzimleri sorumludur.

Her bir NRPS enzimi molekül ağırlığı yaklaşık 120 kDa olan modüllerden her bir modül ise domainlerden oluşur. Enzimdeki modül sayısı, sentezlenen peptidteki amino asit sayısına, modüllerin enzimdeki dizilişi ise peptidteki amino asitlerin sırasına bağlı olarak değişmektedir (Marahiel 1997, Büber ve Açıkan 2004). Böylece modüller, peptid sentezine kalıplık yapmaktadırlar. Bir modül adenilasyon (A), peptidil taşıyıcı protein (PCP), kondensasyon (C) ve final modülünde tiyoesteraz (TE) olmak üzere dört

temel domainden oluşur. Bunlara ek olarak oluşacak ürüne bağlı olarak; epimerizasyon, N-metilasyon, siklizasyon ve oksidasyon gibi domainler de bulunabilir.

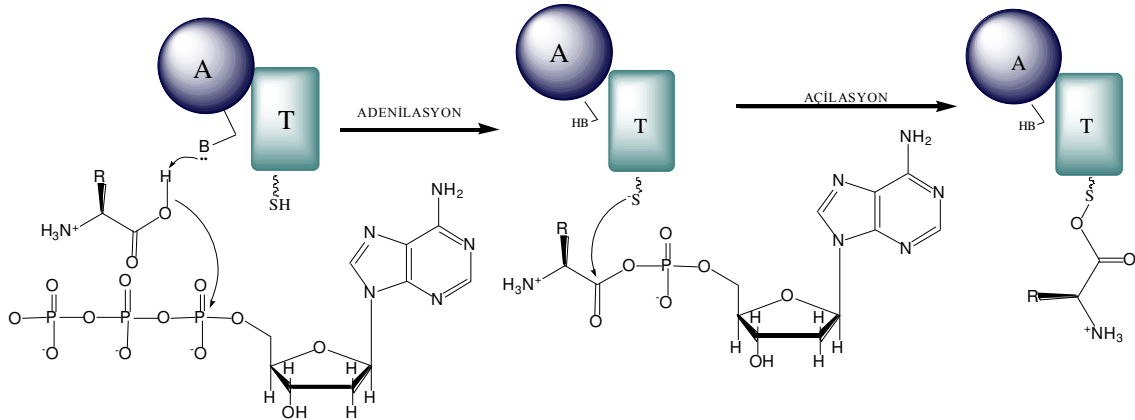
Çizelge 2.3. Ribozom dışı yolla sentezlenen bazı biyoaktif peptidler (Büber ve Açıan 2004).

Peptid	Organizma	Etki	Kaynak
<i>ACV</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Penisilin ve sefalosporin öncülü	Aharonowitz (1993)
<i>Aktinomisin</i>	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Antibiyotik	Stindl (1993)
<i>Basitrasin</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	Antibiyotik	Konz (1997)
<i>Bialafos</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbisit	Hara (1988)
<i>Bleomisin</i>	<i>Streptomyces verticillus</i>	Antitümöral	Shen (1999)
<i>Daptomisin</i>	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Antibiyotik	Mchenney (1998)
<i>Enniatin</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antihelmintik	Zocher (1982)
<i>Eksokelin</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Siderofor	Yu (1998)
<i>Fengisin</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Biyosümfaktan, antimikrobiyal ve antiviral	Tosato (1997)
<i>Gramisidin S</i>	<i>Bacillus brevis</i>	Antibakteriyel	Roskoski (1970)
<i>Lovastatin</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	Antilipolitik	Hendrickson (1999)
<i>PristinamisinI</i>	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Antibiyotik	Thibaut (1997)
<i>Siklosporin</i>	<i>Tolypocladium niveum</i>	İmmün baskılayıcı	Zocher (1984)
<i>Siringomisin</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Antifungal, antimikobakteriyel	Acan (1995)
<i>Surfaktin</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Sümfaktan, antibakteriyel, antitümöral	Kluge (1988)
<i>Tirosidin</i>	<i>Bacillus brevis</i>	Antibiyotik	Gevers (1969)



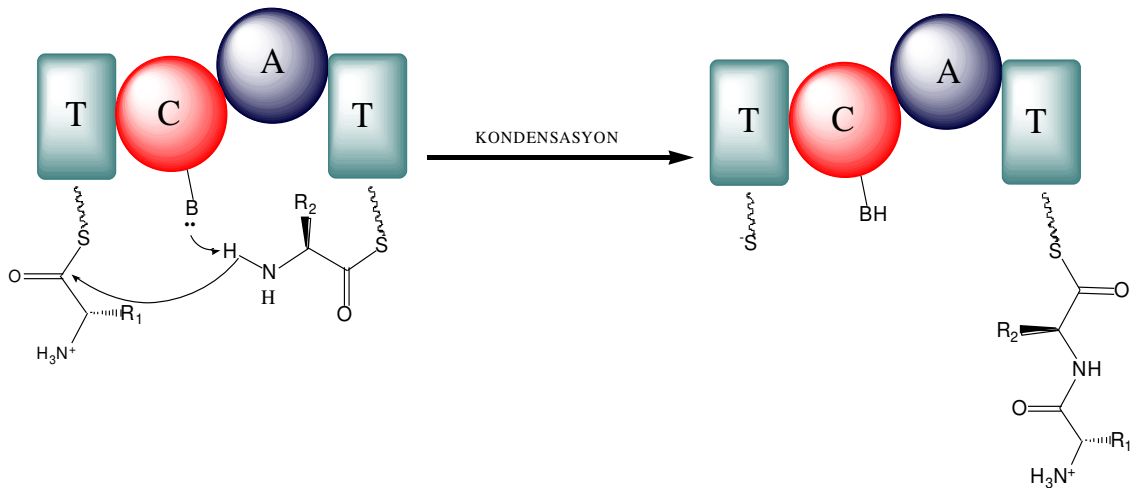
Şekil 2.5. Bir tripeptid olan ACV'nin biyosentez mekanizması. A: adenilasyon domaini, C: kondensasyon domaini, PCP: peptidil taşıyıcı protein, E: epimerizasyon domaini, TE: tiyoesteraz domaini, Aad: aminoadipil, -SH: sülfidril grubu, ATP: adenosin trifosfat, AMP: adenosin monofosfat, PPi: pirofosfat (Büber ve Açan 2004).

Adenilasyon domaininin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 50 kDa ağırlığında ve 500 amino asit uzunluğundadır. Bu domain sentezlenecek peptide katılacak olan aminoasidi tanıır ve ATPaz aktivitesini kullanarak aminoasidi aktive eder (Şekil 2.5'de 2, 4 ve 7 nolu reaksiyonlar) (Büber ve Açan 2004). Adenilasyon domaininin aktif merkezindeki aminoasidin nükleofil grubu substrat aminoasidin karboksil protonuna saldırır. Daha sonra, oluşan karboksilat grubu ATP'nin α -fosfat grubuna saldırır. Bunun sonucunda aminoasit aktive edilir. Peptidil taşıyıcı proteinin (PCP) görevi ise aminoasitleri adenilasyon bölgesinden kondensasyon bölgesine taşımaktır. Bunu yaparken fosfopantetein grubundaki sülfidril grubu aktive olmuş aminoasidin karbonil karbonuna nükleofilik atak yapar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ribozomal olmayan peptit sentezinin adenilasyon ve açilasyon aşamaları. A: Adenilasyon domaini, T: Peptidil taşıyıcı protein (Michael ve ark. 2005).

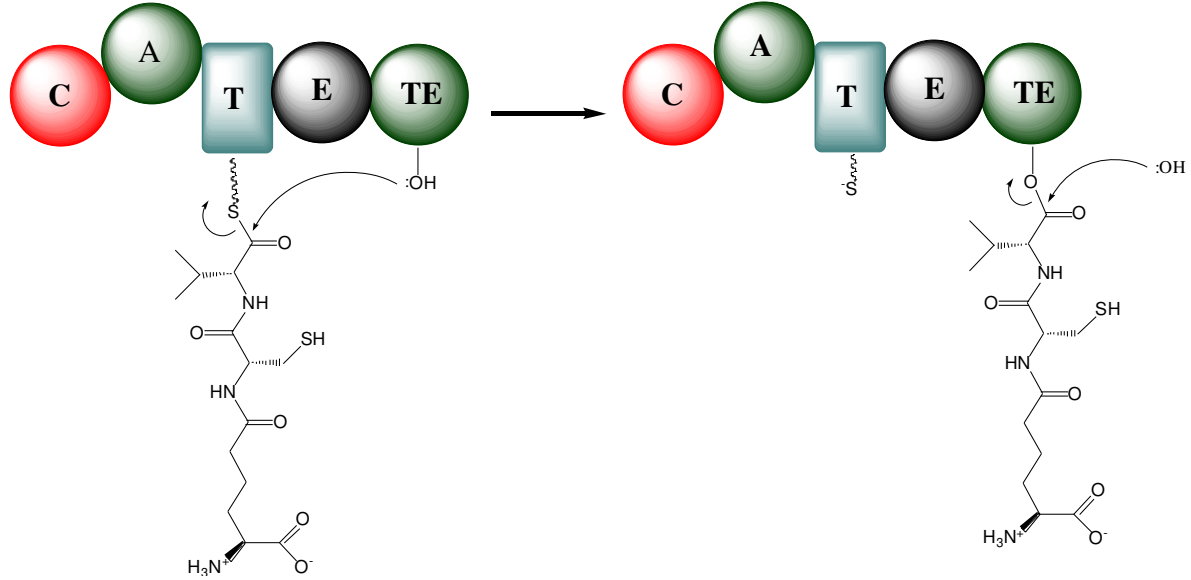
50 kDa ağırlığıda olan kondensasyon (C) domaini uzamakta olan zincirde peptid bağı oluşturmada görev alır (Şekil 2.5’de 5 ve 8 nolu reaksiyonlar) (Michael ve ark. 2005). Kondensasyon domaininin aktif merkezinde bulunan nükleofilik grup ikinci modüldeki peptidil taşıyıcı proteine (T) bağlanmış olan aminoasidin amin grubundaki protona nükleofilik atak yapar. Azot üzerindeki ortaklaşmamış elektronlar başlangıç modülündeki aminoasidin karbonil karbonuna saldırması ile peptid bağı oluşur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ribozomal olmayan peptit sentezinin kondensasyon basamağı. A: Adenilasyon domaini, C: Kondensasyon domaini, T: Peptidil taşıyıcı protein (Michael ve ark. 2005).

Peptid sentezi sonlanma modülündeki tiiyoesteraz (TE) domaininde son bulur. Tiiyoesteraz domaininin aktif bölgesindeki serin aminoasidin hidroksil grubu (OH), üçlü

peptidin peptidil taşıyıcı proteine bağlı aminoasidin karbonil karbonuna saldırmasıyla üçlü peptidi kovalent bağla kendi üzerine alır. Ortamda bulunan su molekülü karbonil karbonuna saldırarak ester bağının hidrolizini sağlar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Ribozomal olmayan peptid sentezinin sonlanma basamağı. A: Adenilasyon domaini, C: Kondensasyon domaini, E: Epimerizasyon domaini, T: Peptidil taşıyıcı protein, TE: Tiyooesteraz domaini (Michael ve ark. 2005).

2.1.5. Poliketid Sentazlar (PKS)

Poliketid bileşikler doğal ürünlerin en önemli sınıflarından birini oluşturmaktadır. İlaç sektöründeki yıllık pazar payı 15 milyon doları aşmaktadır. Poliketid doğal ürünler insan hastalıklarının tedavisinde büyük öneme sahiptir. Kolesterol düşürücü ajanların (lovastatin) yanı sıra antimikrobiyal (eritromisin, rifamisin, tetrasiklin), antifungal (amfoterisin B), immünbaskılayıcı (FK-506, rapamisin) ve antikanser ajan (doksorubisin, epotilon, geldanamisin) özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Poliketid bileşiklerin sentezi poliketid sentaz olarak adlandırılan enzimler tarafından yapılmaktadır.

Poliketid sentazlar (PKS) birçok bileşiğin biyosentezinden sorumlu çok fonksiyonlu enzim grubudur (Hopwood 1997 ve Weisman 2001). Bu bileşiklerin çoğu bakteri ve funguslar tarafından sentezlenmekte olup antibiyotik veya mikotoksik

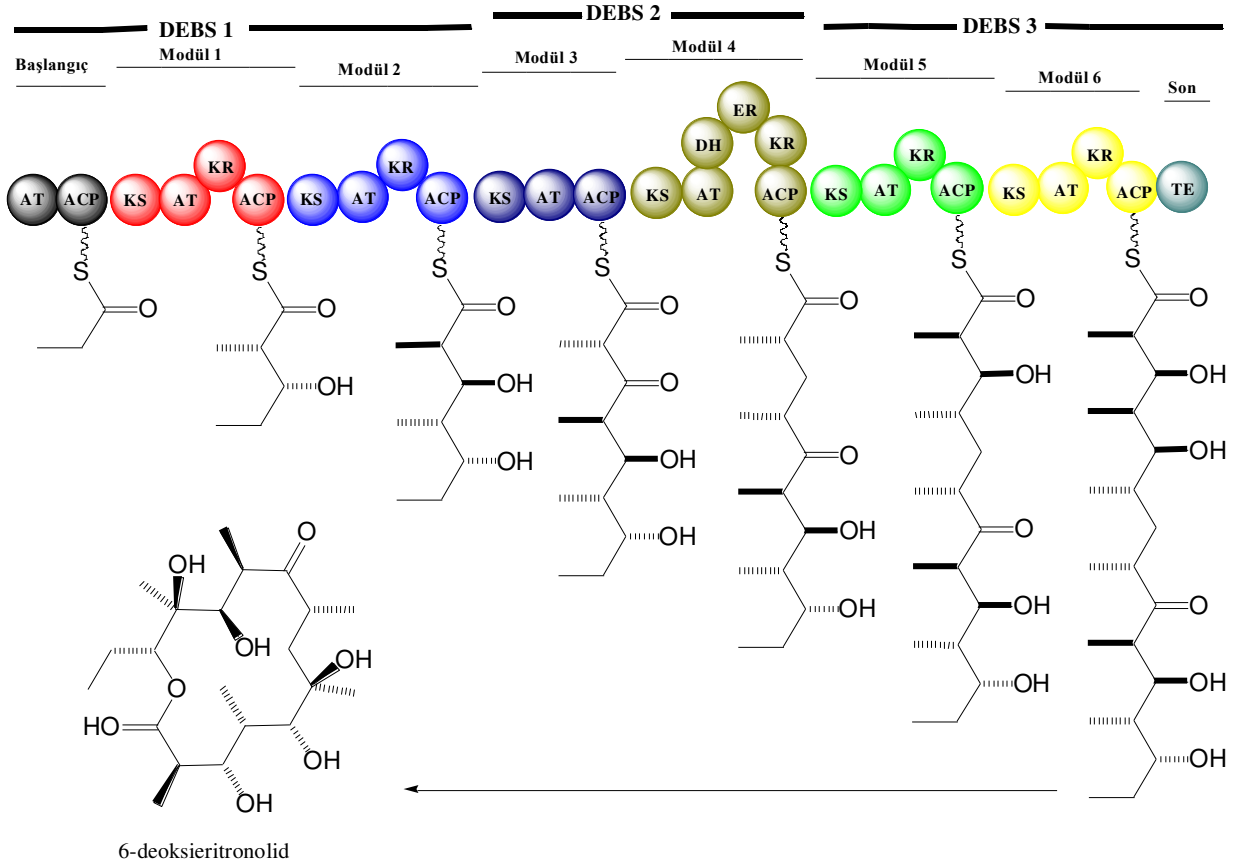
özelliğe sahiptirler. Biyolojik aktiviteye sahip poliketid moleküller farmakolojik araştırmalarda önemli yer tutmaktadır.

Poliketid sentaz (PKS) ve yağ asidi sentaz (YAS) benzer protein domainlerine sahip olup metabolik biyosentez yollarında benzerlik göstermektedirler. PKS'ler asetil CoA ve malonil CoA gibi öncü moleküllerden β -keto karbon birimlerinin kondensasyon katalizlerini gerçekleştirir. PKS'ler; tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Moss ve ark. 2004). Tip I PKS çok fonksiyonlu polipeptit yapıdadır. β -keto karbon zincirlerinin uzaması ya modüler (bakterilerde) ya da tekrarlı (iterative) yapılarla (mantarlarda) olmaktadır. Modüler yapıdaki PKS'lerde her bir polipeptit bir veya daha fazla modül içermektedir. Ayrıca her modül β -keto zincirlerinin kondensasyon işleminden sorumludur. Tip I PKS'lerde her katalitik domain yalnızca bir biyosentez işleminden sorumludur. Buna karşın tekrarlı tip I PKS'ler ise monomodüler yapıdadır. Ayrıca karbon zincirlerinin uzaması ve sonraki aşamalarda görev alan katalitik domainler birçok kez tekrarlanmaktadır (Kroken ve ark. 2003, Jenke-Kodama ve ark. 2005).

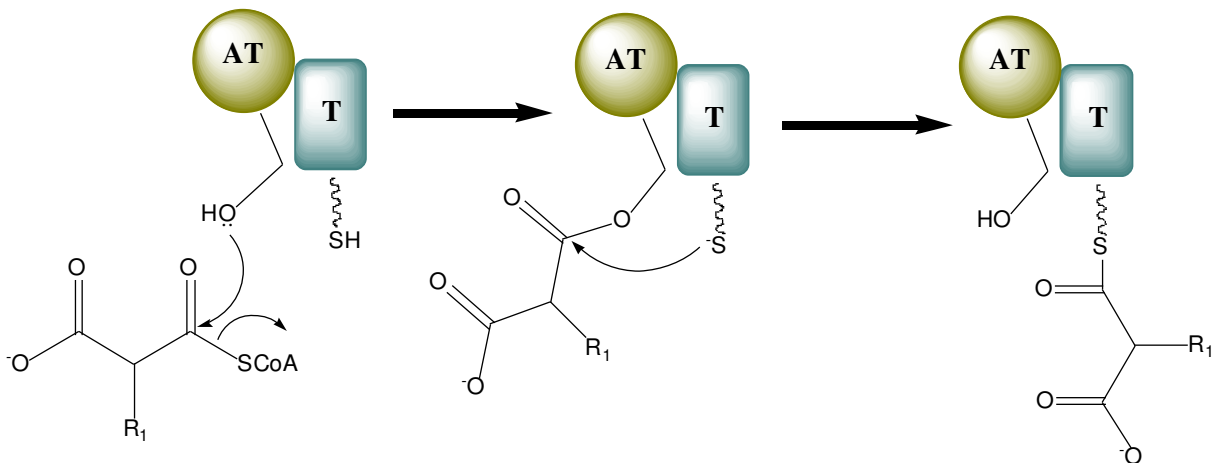
Tip I PKS; ketoaçilsentaz (KS), açıl transferaz (AT), fosfopantetein grubu içeren açıl taşıyıcı protein (ACP) olmak üzere üç temel domain içermektedir (Hopwood 1997). Bu domainlere ek olarak oluşacak ürünün modifikasyonlarına bağlı olarak ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH), enolredüktaz (ER) ve tiyoesteraz (TE) domainlerini içerir.

PKS tip I enzim sistemi tarafından sentezlenen eritromsin sentezi Şekil 2.9'da şekilde görüldüğü gibi başlangıç modülü AT ve ACP domainlerini içermektedir. AT domaini ACP'ye transfer edilecek olan açıl monomerini (propionil CoA) seçer. AT domainindeki OH grubu açıl monomerinin karbonil karbonuna nükleofilik atak yaparak bağlanır. Bu arada ACP domaini üzerinde bulunan fosfopantetein grubuna ait SH, AT'ye bağlanmış olan açıl monomerine nükleofilik atak yapar. Böylece sentezin başlaması için gerekli olan monomer ACP'ye taşınmış olur (Şekil 2.10).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

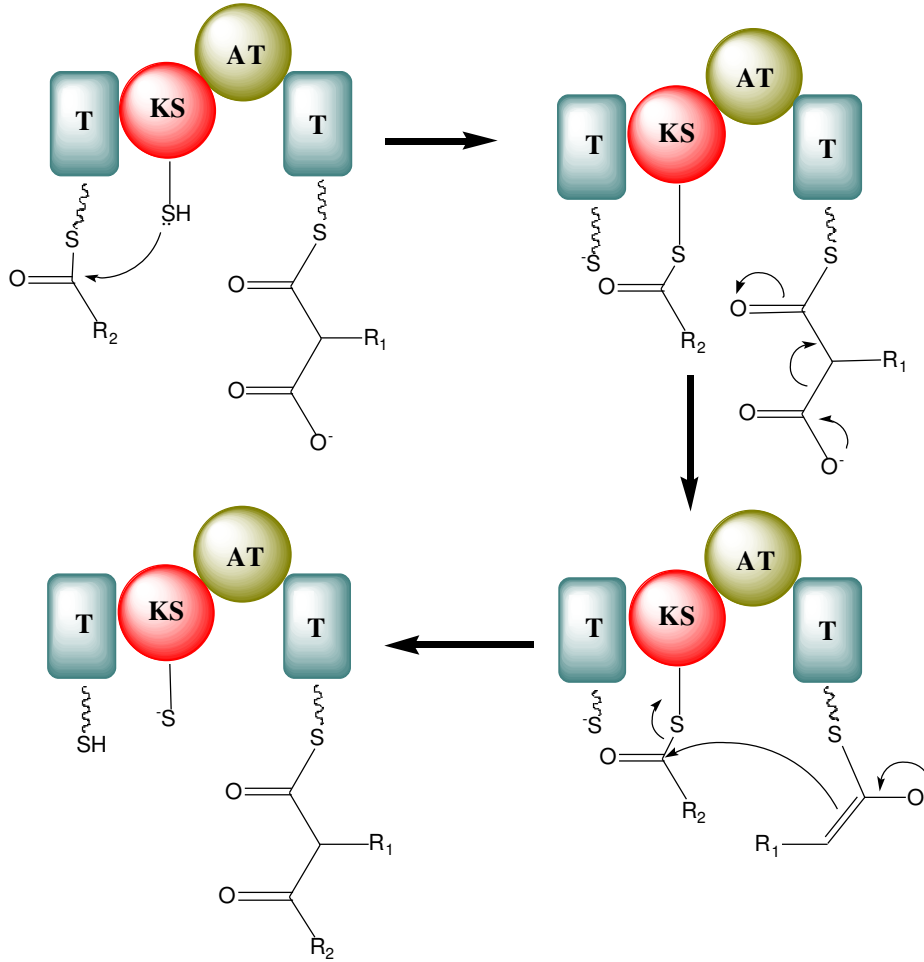


Şekil 2.9. Eritromisinin biyosentez mekanizması. ACP: Açıl Taşıyıcı Protein. AT: Açıl transferaz domaini, KS: Ketosentaz domaini, KR: Ketoredüktaz domain, ER: Enolredüktaz domaini, DH: Dehidrataz domaini, TE:Tiyoesteraz domaini (Staunton ve Weissman 2001).



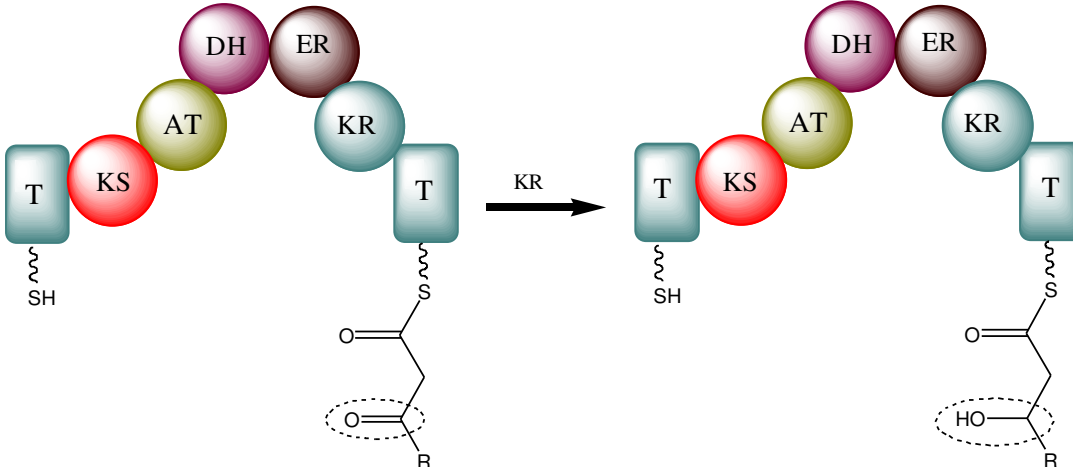
Şekil 2.10. Poiketid sentezinin başlama aşaması. AT: Açıltransefaz domaini, T: Açıl Taşıyıcı Protein (Michael ve ark. 2005).

Modül-1’de KS domainindeki SH grubu başkangıç modülündeki ACP’ye bağlı açıl tiyoester grubuna nükleofilik atak yapar. ACP domainine bağlı metilmalonilin dekarboksilasyonu sonucu oluşan bileşik ile KS domaininde bulunan açıl tiyoesteri arasında C-C bağı meydana gelir (Şekil 2.11).



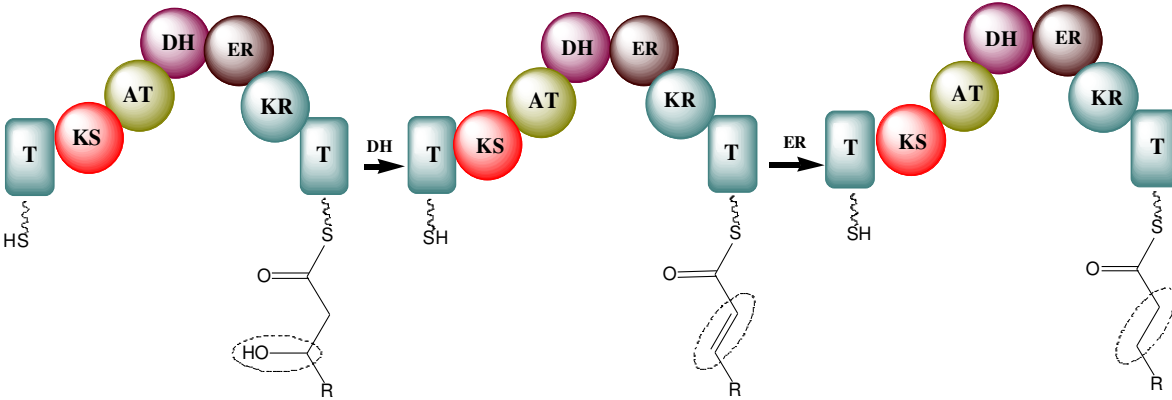
Şekil 2.11. Poliketid sentezinin uzama aşaması. AT: Açıl transferaz domaini, KS: Ketosentaz domaini, T: Açıl taşıyıcı protein (Michael ve ark. 2005).

Modül-2’de bulunan temel domainlere ek olarak KR domaini kondensasyon ürünündeki β -keton grubunu β -hidroksi grubuna indirger (Şekil 2.12).



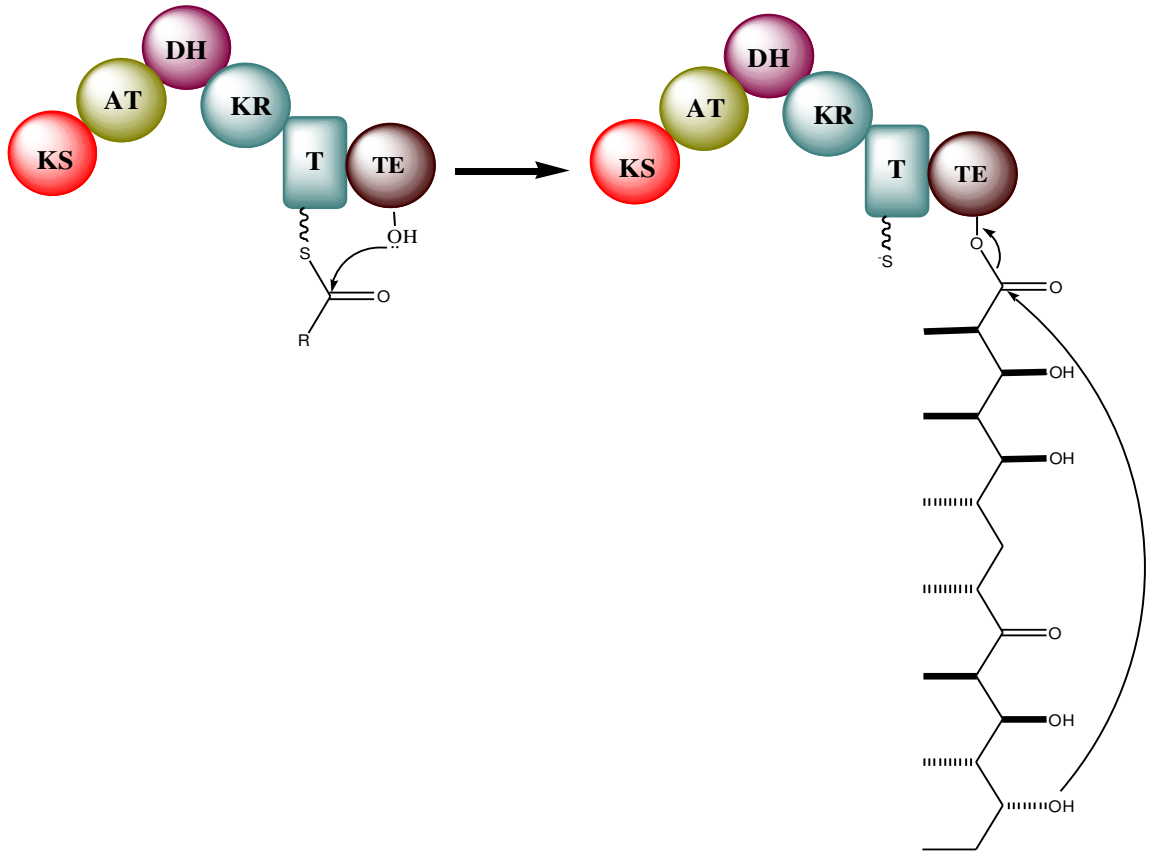
Şekil 2.12. Poliketid sentezinin indirgenme basamağı. AT: Açıl transferaz domaini, DH: Dehidrataz domaini, ER: Enoil redüktaz domaini, KS: Ketosentaz domaini, KR: Ketoredüktaz domaini, T: Açıl taşıyıcı protein (Michael ve ark. 2005).

DH domaini tarafından β -hidroksiaçilin dehidrasyonu sonucu β -enoil oluşur. Oluşan bu gruptaki çift bağ ER redüksiyon etkisi ile doyurulur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Poliketid sentezinin dehidrasyon ve redüksiyon basamakları. AT: Açıl transferaz domaini, DH: Dehidrataz domaini, ER: Enoil redüktaz domaini, KS: Ketosentaz domaini, KR: Ketoredüktaz domaini, T: Açıl taşıyıcı protein (Michael ve ark. 2005).

Sentez döngüsü şekildeki domainlerin sırasına göre devam eder. Zincir uzaması TE domaininde sonlanır. TE domaininde bulunan OH grubu uzaması tamamlanmış ACP'ye bağlı kalıp zincir ile ACP arasındaki tiyoester bağını kopararak zinciri üzerine alır. TE domaini son olarak kalıp zincirin ayrılmasını katalizler (Şekil 2.14) (Michael ve ark. 2005).



Şekil 2.14. Poliketid sentezinin sonlanma aşaması. AT: Açıl transferaz domaini, DH: Dehidratat domaini, KS: Ketosentaz domaini, KR: Ketoredüktaz domaini, T: Açıl taşıyıcı protein, TE: Tiyoesteraz domaini (Michael ve ark. 2005).

Tip II PKS'ler, bakteri ve bitkilerde bulunmaktadır. Tip I PKS'lerin aksine tip II PKS'lerde karbon zincirlerinin uzamasında ve sonrasındaki reaksiyonlarından sorumlu domainler tekrarlı polipeptit zincirlerine ayrılmazlar. Bu gruptaki PKS'ler oksitetrasiklin gibi aromatik bileşiklerin sentezinden sorumludur.

Tip III PKS, bitkilerde ve bazı bakterilerde tanımlanmıştır (Moore ve Hopke 2001). Bitkilerdeki flavonoid biyosentezinin öncü maddesi olan kalkon ve bakterilerdeki flaviolin gibi bileşikler tip III PKS ürünlerine örnek verilebilir. Tip III PKS'de, tip I PKS ve tip II PKS'nin aksine sentez, aktif bölgedeki tek multifonksiyonel bölge ile gerçekleşir. Ayrıca tip III PKS'de açıl taşıyıcı protein bulunmaz.

2.2. Önceki Çalışmalar

Streptomyces caelestis türünde nidadamisin sentezinden sorumlu PKS genlerinin teşhis edilmesi için yapılan bir çalışmada, KS ve AT domainlerinin korunmuş bölgelerini baz alarak oluşturulan dejenere primerler kullanılmıştır. Elde edilen 900 bp büyüklüğündeki fragmentler uygun vektörlere klonlanmış ve 7 klonun sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi yapılan fragmentlerin daha önce rapor edilen nidadamisin antibiyotığının sentezinden sorumlu PKS gen kümesinin 5. modülündeki KS ve AT domainleri ile aynı olduğu gösterilmiştir (Stephan ve ark. 1997).

Topraktan izole edilen 29 aktinomiset ile yapılan çalışmada, tip II PKS genleri KSα domaininin korunmuş bölgesi baz alınarak oluşturulan dejenere primerlerin PCR’da kullanılması ile, izolatların % 75’inde ürün elde edilmiştir. Bu amplikonların klonlanarak sekansları yapılmış olup sekans analizleri sonucunda farklı organizmalarda tespit edilen aromatik poliketidlerin KSα domainleri ile % 60-99 arasında değişen oranlarda homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Metsa-Ketela 1999).

Bir bakteri olan *Stigmatella aurantiaca* ile yapılan çalışmada tip I PKS gen kümesinin KS domainini hedef alan primerler kullanılarak amplifiye edilen fragmentler klonlanmış olup sekans analizleri sonucunda % 22 oranında PKS gen kümesi ile homoloji gösterdiği bu gen kümelerinin ise 4 tanesinin NRPS/PKS hibrit gen kümesi olduğu belirlenmiştir (Silakowski ve ark. 2001).

Topraktan izole edilen 99 aktinomiset türünün filogenetik analizleri yapılmış olup, izolatların tanımlaması için hem 16S rDNA hem de tip II PKS geni KSα domainini hedef alan primerler kullanılmıştır. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen fragmentlerin analizi ile izolatların % 80’inde tip II PKS gen kümesinin KSα domaini tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında 17 KSα domainin daha önce rapor edilen tip II PKS genleri ile maksimum homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Metsa-Ketela 2002).

Izumikawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2003) *Streptomyces albus*’da tip I PKS genlerinin KS domainini hedef alan dejenere KSMA-F ve KSMB-R primerleri kullanılarak amplifiye edilen fragmentlerin prob olarak kullanılarak koloni hibridizasyonu yapılmış. Pozitif koloniler izole edilerek sekans analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda bu fragmentlerin bir antibakteriyel antibiyotik olan salinomisin

sentezinden sorumlu tip I PKS geninin bir bölgesi olduğu tespit edilmiştir (Izumikawa ve ark. 2003).

Karasal bir siyanobakteri olan *Nostoc* sp. GSV224 izolatu, NRPS ve PKS gen kümelerinin varlığı açısından incelendiğinde, araştırmacılar NRPS/PKS hibrit bileşiği olan nostopeptolid A'nın varlığını, hem genetik olarak hemde kültür ortamındaki ürünü tespit etmişlerdir (Hoffmann ve ark. 2003).

2004 yılında 33 cinse ait 210 farklı aktinomiset türünün biyosentetik gen potansiyellerini ortaya çıkarmak amacıyla yapılan bir çalışmada NRPS ve tip I PKS genlerinin PCR yöntemi ile taranması amaçlanmıştır. Bu türlerin % 79.5'inde NRPS, % 56.7'sinde de tip I PKS geni tespit edilmiştir. Bu cinsler içerisinde *Streptomyces* türlerinde % 97 oranında NRPS, % 79 oranında da tip I PKS geni amplifiye edilmiştir. Araştırmacılar, *Streptomyces* türlerinden elde edilen bu oranların biyosentetik potansiyelleri araştırılan diğer taksonomik gruplara göre çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2004).

2004 yılında *Streptomyces carzinostaticus* var. F-41 ile yapılan bir çalışmada antitümör aktiviteye sahip poliyen neocarzilin'nin PKS gen kümesinin KS domaininin KSMA-F ve KSMB-R primerleri kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bu amplikonlar, hibridizasyon deneylerinde prob olarak kullanılmıştır. Neocarzilin bileşiğinin sentezinden sorumlu tip I PKS gen kümesini genomda tespit etmişlerdir. (Otsuka ve ark. 2004).

Tatlısulardan ve denizlerden izole edilen 24 siyanobakteri türü ile yapılan çalışmalarda ketosentaz (KS) ve adenilasyon (A) domainlerini hedef alan dejenere primerlerin kullanılmasıyla türlerin % 54'ünde NRPS genlerinin A domaini % 91'inde tip I PKS genlerinin KS domaini elde edilmiştir. Elde edilen amplikonların sekans analizleri BLAST programında incelenmiş, değişken ve daha önce rapor edilmeyen A ve KS domainleri tespit edilmiştir (Ehrenreich ve ark. 2005).

Likenlerden izole edilen aktinomisetlerin biyosentetik gen dizilimlerini tespit etmek için yapılan bir çalışmada tip I PKS, tip II PKS ve NRPS genleri PCR stratejisi ile taranmıştır. Araştırmacılar, izolatlarının % 62.6'sında tip I PKS, % 64.7'sinde tip II PKS ve % 58.5'inde NRPS biyosentetik genlerini amplifiye etmişlerdir. Kullandıkları aktinomiset cinsleri arasında, tip I PKS amplifikasyonu açısından en yüksek değer (%)

70) *Streptomyces* cinsinin üyelerine ait oldukları tespit edilmiştir (Gonzalez ve ark. 2005).

CS001 ve CS002 primerleri kullanılarak *Streptomyces globisporus* 1912 suşunun DNA'sından amplifiye edilen fragmentlerin *Streptomyces natalensis* tarafından üretilen pimarisin antibiyotiğinin sentezinden sorumlu tip I PKS ile % 52-92 oranında amino asit homolojisi gösterdiği tespit edilmiş. Ayrıca bu bakterilerden elde edilen bir makrolid antibiyotik olan eritromisinin sentezinden sorumlu tip I PKS ile % 35-60, poliketid-heptapeptid olan mikrosistin sentezinden sorumlu tip I PKS ile % 48-60 oranında aminoasit homolojisi gösterdiği belirlenmiştir (Ostash ve ark. 2005).

Deniz aktinomisetlerinin çeşitliliği ve biyosentetik metabolik yollarının tarandığı bir çalışmada incelenen 38 aktinomisetten % 70'inde NRPS ve % 13'ünde tip I PKS genleri tespit edilmiştir. Tek bir izolatta ise tip II PKS genine rastlanmıştır. Araştırmacılar, çok az çalışılmış sıradışı habitatların sekonder metabolit sentezleme yeteneği olan türler açısından zengin kaynaklar olabileceğini bildirmişlerdir (Pathomaree ve ark. 2005).

2005 yılında aktinomiset türleri ile yapılan bir çalışmada tip II PKS gen kümesinin KS α domainini hedef alan primerler kullanılarak PCR ile tarama yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen amplikonlardan yedi tanesinin daha önce rapor edilmediği, dolayısıyla yeni KS α olabileceği düşünülmüştür. Geri kalan amplikonların sekans analizlerinin bilenen KS α domainleri ile % 74-81 arasında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Wawrik ve ark. 2005).

83 *Streptomyces* türü ile yapılan bir çalışmada, tip II PKS gen kümesinin β -ketoaçil sentaz domainin iki alt (KS α ve KS β) bileşeninden biri olan KS α altünitesini amplifikasyonu ve tanımlanması hedef alınmıştır. Yapılan çalışmalarda daha önce aromatik poliketid üreticisi olduğu rapor edilen 9 türde KS α altünitesi amplifiye edilmiştir. Diğer 55 türde ise yeni KS α domaini tespit edilmiştir (Komaki ve Harayama 2006).

Streptomyces sp. NP13 ve *Streptomyces* sp. MS405 izolatları ile yapılan çalışmalarda FK506, FK520 ve rapamisin doğal ürünlerinin korunmuş bölgeleri dikkate alınarak dizayn edilen 3 çift primer ile PCR denemeleri yapılmıştır. Yapılan analizlerde

iki yeni PKS geni tespit edilmiş ve bunların immünbaskılayıcı benzeri bir metabolitin biyosentezinde görevli olduğu bulunmuştur (Savic ve Vasiljevic 2006).

24 siyanobakteri türü ile yapılan bir çalışmada NRPS ve tip I PKS gen kümelerinin varlığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik NRPS gen kümesinin A domainini hedef alan MTF2/MTR dejenere primer çifti, tip I PKS gen kümesinin KS domainini hedef alan DKF/DKR primer çifti dizayn edilmiştir. Bu primerlerin kullanılması ile yapılan PCR sonucunda organizmaların % 75'inde NRPS ve % 79.1'inde de tip I PKS genlerinin varlığı tespit edilmiştir. 33 farklı A domaini ile 29 farklı KS domaini tespit edilmiş olup yapılan BLAST analizleri sonucunda A domainlerin daha önce rapor edilmiş siyanobakteri NRPS gen kümesinin A domainleri ile % 43-97 oranında homoloji gösterdiği, sekanslanan KS domainlerinin ise daha önce rapor edilmiş siyanobakteri PKS genlerinin KS domainleri ile % 49-97 oranları arasında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Martin ve ark. 2007).

2008 yılında yapılan bir çalışmada mikrobakteri genomunda PCR yöntemi ile tip I PKS gen kümesi araştırılmış ve bu doğrultuda bu gen kümesinin KS ve AT domainlerini hedef alan primerler kullanılmıştır. Elde edilen ampikonların sekans analizleri BLAST programında araştırılmış, araştırmacılar elde ettikleri verileri iki grupta toplamışlardır. Buna göre aminoasit homolojisi % 70 ve altında olan domainlerin yeni tip I PKS genleri olmaya aday olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (Komaki ve ark. 2008).

2008 yılında izole edilen endofitik aktinomiset izolatlarının genomlarında yapılan PCR taramalarında tip I PKS gen kümesinin KS domainini, tip II PKS kümesinin KSα domainini ve NRPS gen kümesinin A domaininin çoğaltılması hedeflenmiştir. İzolatların % 34.1'inde tip I PKS gen kümesi, % 63.4'ünde tip II PKS gen kümesi ve % 61.3'ünde de NRPS gen kümesi tespit edilmiştir (Li ve ark. 2008).

2009 yılında yapılan bir çalışmada *Streptomyces bicolor* 12746T'den tespit edilen bir tip I PKS gen dizilimi referans alınarak, bu genin pimarisine benzer bir polien bileşik üretiminde görevli olabileceğinin öngörülmüştür. Araştırmacılar bu bakteriyi kültüre ettikleri örneklerde polien bileşik taramaları yaparak, bakterinin antifungal bir bileşik ürettiğini tespit etmişlerdir. Saflaştırılan bileşiğin spektroskopik analizlere dayalı yapı aydınlatma çalışmaları sonucunda yeni bir pimarisin analogu olan JBIR-13

bileşimini bulmuşlardır. Çalışmalarının bulgularından yola çıkarak, PKS genlerinin (özellikle tip I PKS), yeni biyoaktif bileşik araştırmalarında değerli bilgiler sağladığı sonucuna varmışlardır (Komaki ve ark. 2009).

Zhang ve arkadaşları (2009) tarafından izole edilen 109 bakterinin genomunda NRPS geni taranmıştır. Taranan izolatların % 13.7'sinde NRPS geni tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda NRPS geni tespit edilen 15 izolattan 11'inde daha önce rapor edilen NRPS genleriyle % 70'in altında aminoasit homolojisi gösterdiği tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2009).

Streptomyces lydicus'tan izole edilen streptolydigin, bakteriyel RNA polimerazları çok güçlü bir şekilde inhibe eden PKS-NRPS hibridi bir sekonder metabolittir. Yapısı bir poliketid olan streptolol ve bir tetramik asitten oluşmaktadır. Streptolol açıl zinciri PKS metabolik yollarından 4 malonat ve 4 propionatın kondensasyonu ile oluşmuştur. Tetramik asit ise NRPS'ler yardımıyla bir aspartat türevi olarak oluşmaktadır (Zhao ve ark. 2009).

2011 yılında yapılan bir çalışmada *Streptomyces* sp. SCSIO1666 izolatının genomunda, güçlü bir RNA Polimeraz inhibitörü hibrid poliketid-peptid antibiyotik olan tirandamisin'nin varlığı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu antibiyotikğin sentezinden sorumlu gen kümesinin üç PKS ve bir NRPS'den oluştuğu saptanmıştır (Mo ve ark. 2011).

Topraktan ve tatlı sulardan izole edilen 24 siyanobakteri izolatının genomik DNA'larında NRPS/PKS genlerinin PCR yöntemi ile taranması amacıyla A domainin amplifikasyonu için MTF/MTR primer çifti, KS domaininin amplifikasyonu için ise KSF/KSR primer çifti kullanılmıştır. Yapılan PCR optimizasyonları sonucunda izolatların % 92'sinde NRPS, % 80'inde PKS genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Silva-Stenico ve ark. 2011).

Çeşitli bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından izole edilen *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Oerskovia*, *Nonomuraea*, *Promicromonaspora* ve *Rhodococcus* cinslerine ait 60 endofitik türün genomunda NRPS, tip I ve tip II PKS genleri taranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda izolatların % 53'ünde tip I PKS genleri, % 82'sinde tip II PKS genleri ve % 53'ünde de NRPS genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Zhao ve ark. 2011).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin daha önce izolasyonları ve moleküler teşhisleri yapılmış ve antimikrobiyal özellikleri daha önce incelenmiştir (Yılmaz ve ark. 2008).

Bu izolatlar; *Streptomyces* sp.AAH61, *Streptomyces* sp. AAH68, *Streptomyces* sp. AR6, *Streptomyces* sp. AR24, *Streptomyces* sp. AS31, *Streptomyces* sp. AS40, *Streptomyces* sp. BA3, *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. BAH46, *Streptomyces* sp. BS33, *Streptomyces* sp. CA3, *Streptomyces* sp. CA14, *Streptomyces* sp. CA19, *Streptomyces* sp. CAH33, *Streptomyces* sp. CS43'tür.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Tris-HCl/Süktroz/EDTA (TSE)

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

3.1.3.2. Tris-baz/Asetik Asit/EDTA (TAE, 50x)

Final konsantrasyonu 0.05 M EDTA (pH=8), % 5.71 asetik asit, 242g tris baz olacak şekilde saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Isopropil- β -D-Thiogalactoside (IPTG)

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

3.1.3.4. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal)

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

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Triptik Soya Broth (TSB, Oxoid); 30 g TSB tartılarak saf su ile hacmi 1 L'ye tamamlandı ve otoklavda steril edildi. Kromozomal DNA izolasyonu için hücrelerin üretiminde kullanıldı.

Maya özütü-Malt özütü (YEME); 3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g baktepepton, 10 g glukoz, 340 g sukroz tartıldı ve hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrasında 1 L besiyerine filtre ile steril edilmiş 2.5 M magnezyum klorürden ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 2 ml ve % 20'lik glisinden de 25 ml eklenerek hazırlandı. Kromozomal DNA izolasyonu için hücrelerin üretiminde kullanıldı.

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

Luria Broth (LB) besiyeri; 5 g maya özütü, 10 g tripton, 5 g sodyum klorür tartılarak hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı ve 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk otoklavda sterilizasyonu yapıldı.

Hazırlanan 1 L LB besiyerine 15 g agar eklendi ve otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrasında soğutulmaya bırakılan besiyeri yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi ve petriye döküldü. Transformatların seçimi için kullanıldı.

3.1.5. Kullanılan Enzimler

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

3.1.6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR)

NRPS geni A domaininin PCR ile amplifikasyonu için A domainini hedef alan ileri; A3F (GCSTACSYSATSTACACSTCSGG), geri; A7R (SASGTCVCCSGTSCGGTAS) primerleri (Ayuso ve Genniloud 2004), İontek (İstanbul) şirketinden temin edildi. Bu primerlerin hedef aldığı bölge yaklaşık olarak 700 bp uzunluğundadır. (S= G/C, Y= C/T, V=G/A/C)

Tip I PKS geni KS domaininin PCR ile çoğaltılması için KS domeinini hedef alan ileri; K1F (TSAAGTCSAACATCGGBCA), geri; M6R (CGCAGGTTSCSGTACCAGTA) primerleri (Ayuso ve Genniloud 2004), İontek (İstanbul) şirketinden temin edildi. Bu primerlerin hedef aldığı bölge ortalama 1200-1400 bp uzunluğundadır. (S= G/C, B = G/T/C).

3.1.7. DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

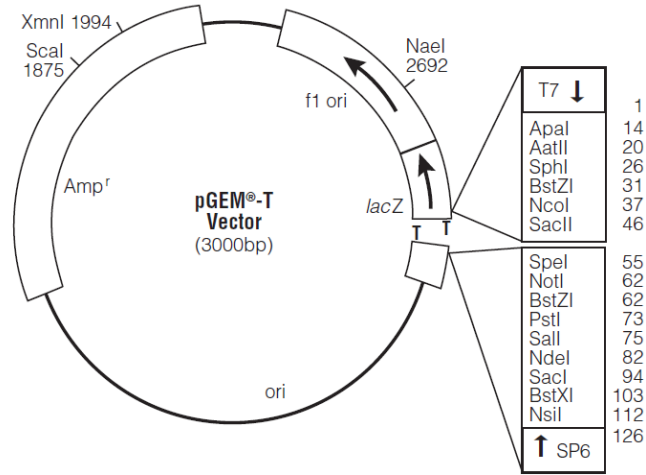
PCR ürünlerini jelden geri kazanmak için MiniElute Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagene) ve Jel Elution Kiti (GeneMark) kullanıldı.

3.1.8. PCR Ürünlerinin Klonlanması

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

3.1.9. Plazmit İzolasyonu

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



Şekil 3.1. pGEM-T plazmit haritası

3.1.10. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama)
Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)
PCR Cihazı (Eppendorf)
Elektroforez (Biolab)
Hassas Tartı (GEC Avery)
pH Metre (Mettler Toledo MP220)
Etüv (Heraeus)
Sterilizatör (Heraeus)
Derin Dondurucu (Ugur)
Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad)
Laminar Kabin (Telstar AV 100)
Orbital Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B)
Mini Santrifüj (E.S-6)
Magnetik Karıştırıcı (Stuart)
Vorteks (VWR)
Güç kaynağı (Bio-Rad)
+4 °C dolap (Sanyo)
Etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)
Su banyosu (Grant LTD 66)
Isıtıcı (Heildoph)
Mikropipet (Gilson ve Eppendorf)

3.2. Metod

Üç farklı endemik bitkinin kök çevresindeki topraklardan izolasyonu ve moleküler teşhisi yapılmış (Yılmaz ve ark. 2008) 15 *Streptomyces* izolatu M2 katı besiyerinde üretilip sıvı besiyerinde stokları yapıldı.

3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

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

3.2.2. PCR Amplifikasyonu

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

İzolasyonu yapılmış kromozomal DNA’lar agaroz jelde kontrol edildikten sonra PCR’da kalıp olarak kullanıldı. İleri A3F ve geri A7R primerleri kullanılarak A domaini amplifiye edildi. Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) için standart PCR reaksiyon koşulları; kromozomal DNA 100 ng, her bir primer 0.4 µM, nükleotit karışımı 0.2 µM,

Taq polimeraz 1 ünite, PCR tamponu % 10 ve magnezyum klorür 2 mM olarak kullanıldı, final hacim saf su ile 50 µl'ye tamamlandı. Termal döngü 95 °C 5 dk (Başlangıç denatürasyonu, 1 döngü), 95 °C 30 sn, 59 °C 2 dk. 72 °C 4 dk. olarak 35 döngü uygulandı son olarak 72 °C 10 dk (1 döngü) uygulamasıyla PCR döngüsü tamamlandı.

Standart koşullarda ürün elde edilemeyen organizmalarda, gerek magnezyum klorür konsantrasyonları, gerekse termal döngü koşulları değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

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

İzolasyonu yapılmış kromozomal DNA'lar agaroz jelde kontrol edildikten sonra PCR'da kalıp olarak kullanıldı. İleri K1F ve geri M6R primerleri kullanılarak KS domaini amplifiye edildi.

Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) için standart PCR reaksiyon koşulları; kromozomal DNA 100 ng, Her bir primer 0.4 µM, Nükleotit karışımı 0.2 µM, Taq polimeraz 1 ünite, PCR tamponu % 10 ve magnezyum klorür 2 mM olarak kullanıldı, final hacim saf su ile 50 µl'ye tamamlandı.

Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) için standart PCR reaksiyon koşulları; kromozomal DNA 100 ng, Her bir primer 0.4 µM, Nükleotit mix 0.2 µM, Taq polimeraz 1 ünite Taq, Tamponu (magnezyum klorürsüz) % 10, GC tamponu % 10 ve magnezyum klorür 1.5 mM olarak kullanıldı, final hacim saf su ile 50 µl'ye tamamlandı. Termal döngü 95 °C 5 dk (Başlangıç denatürasyonu, 1 döngü), 95 °C 30 sn, 55 °C 2 dk. 72 °C 4 dk. olarak 35 döngü uygulandı, son olarak 72 °C 10 dk (1 döngü) uygulanmasıyla PCR döngüsü tamamlandı.

Standart koşullarda ürün elde edilemeyen organizmalarda, gerek magnezyum klorür konsantrasyonları, gerekse termal döngü koşulları değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Saflaştırılmış kromozomal DNA'nın tespiti için % 0.7'lik, PCR ürünlerinin görüntülenmesi için ise % 1'lik agaroz jel hazırlandı. TAE tamponu ile hazırlanan

agaroz jele % 1'lik etidyum bromürden 5 µl eklendi. DNA'ları jele yüklemek için 1:5 oranında BFB:DNA karışımı yapıldı. DNA'lar oda ısısında 90 voltluk akım altında 45 dk. yürütüldü.

3.2.4. Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması

Büyüklikleri NRPS için 700 bp, tip I PKS için ise yaklaşık 1200-1400 bp büyüklüğünde olan PCR ürünleri agaroz jelden kesilerek alındı. Elute Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagene) ve Jel Elution Kiti (GeneMark) kullanılarak DNA'lar jelden ekstrakte edildi.

3.2.5. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

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

3.2.6. Klonlama

3.2.6.1. Ligasyon

Ligasyon karışımının total hacmi 10 µl olacak şekilde; 5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl pGEM-T vektör, 300-400 ng PCR ürünü, 1 µl DNA ligaz enzimi eklendi ve verimli bir ligasyon için bir gece 16 °C'de inkübe edildi.

3.2.6.2. Transformasyon

İnkübasyon süreleri dolan ligasyon ürünleri kompetent hücrelerle bir araya getirilerek 30 dakika buzda bekletildi, bu sürenin sonunda hücreler 42 °C'de 70 saniye su banyosuna bırakıldı, bu süre sonunda buzda 5 dakika bekletildi. Bütün bu

işlemlerden sonra hücrelere 1 ml LB besi yeri ilave edildi ve 150 rpm’de 37 °C’de orbital çalkalamalı inkübatörde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda önceden IPTG ve X-Gal yayılmış, 100 µg/µl ampisilin içeren katı LB besiyerine 400-450 µl yayma yapıldı ve bir gece 37 °C’de inkübe edildi.

3.2.6.3. Mavi Beyaz Koloni Seçimi

Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda ligasyonun başarılı olduğu hücreler beyaz, ligasyonun başarısız olduğu hücreler ise mavi koloni oluşturmaktadır. Bu durum işaret geninin ürünü olan β-galaktozidaz enziminin ortamdaki X-gal’i parçalamasına dayanmaktadır. Ligasyonun başarısız olduğu hücrelerde β-galaktozidaz enzimi salgılanır ve X-Gal’i parçalayarak sonuçta mavi renk oluşumu gözlenir. Ligasyonun başarılı olduğu hücrelerde işaret geni bozulduğu için β-galaktozidaz enzimi X-gal’i parçalayamayacağı için beyaz renk oluşumu gözlenir. Bir gecelik inkübasyon süresi sonunda beyaz renkli rekombinant koloniler mavi renkli kolonilerden seçilerek ayrıldı.

3.2.6.4. Bakterilerden Plazmit DNA İzolasyonu

Ampisilin içeren LB besiyerlerine aktarılan beyaz koloniler orbital çalkalayıcı inkübatörde 230 rpm’de, 37°C’de bir gece üretilir. İnkübasyon süresi sonunda kültürden 2 ml örnek alınarak 2 dakika 16000 rpm’de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Elde edilen peletten Plazmit Miniprep Purification Kit (GeneMark) kullanılarak plazmid izolasyonları yapıldı.

3.2.7. DNA Dizileme

Saflaştırılan rekombinant plazmitlerin içerdiği fragmentlerin DNA dizi analizi İontek şirketine (İstanbul) yaptırıldı. Pütatif NRPS fragmentlerinin dizilenmesi için A3F primeri, pütatif tip I PKS fregmentlerinin dizilenmesi için K1F primeri kullanılmıştır.

3.2.8. Biyoinformatik İncelemeler

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

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

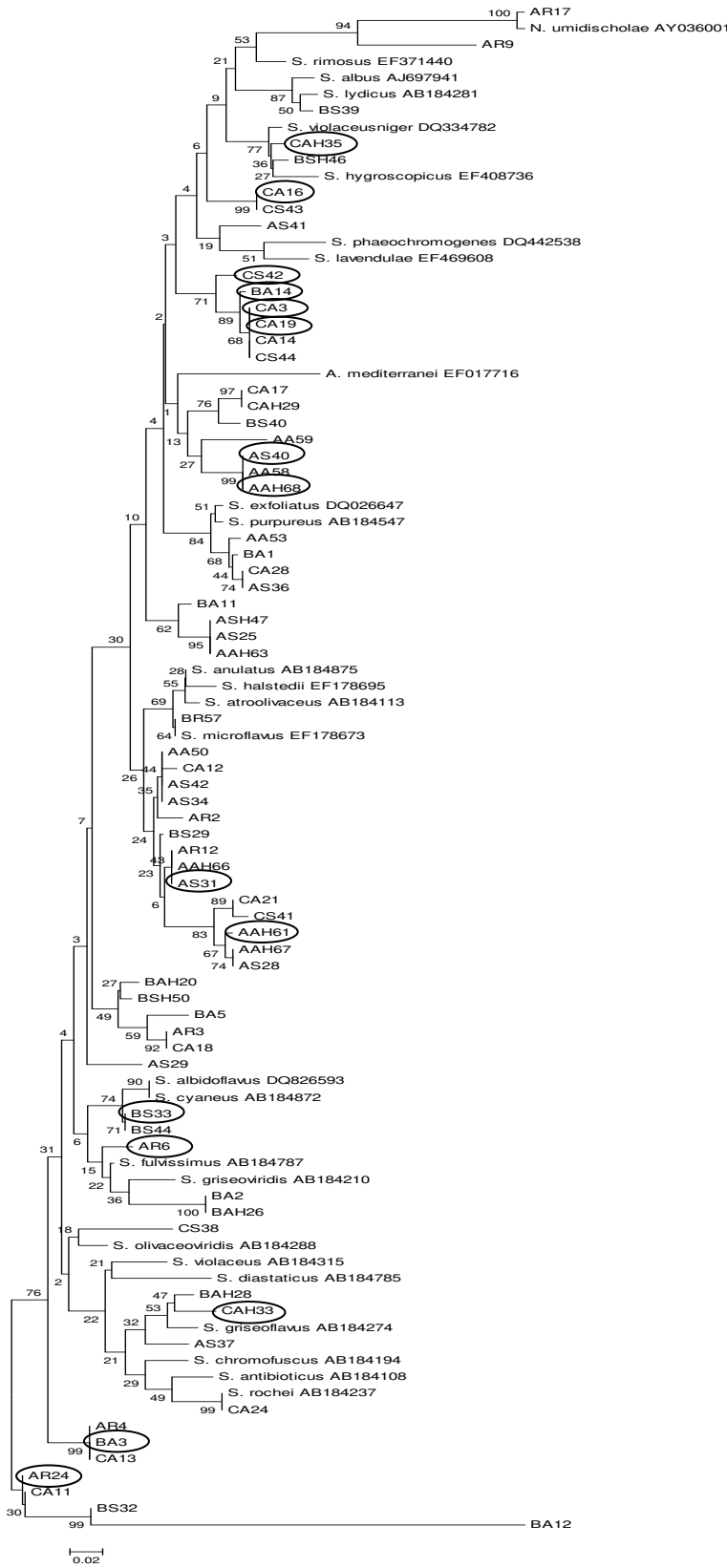
4.1. Bulgular

4.1.1. *Streptomyces* İzolatlarının Üretilmesi

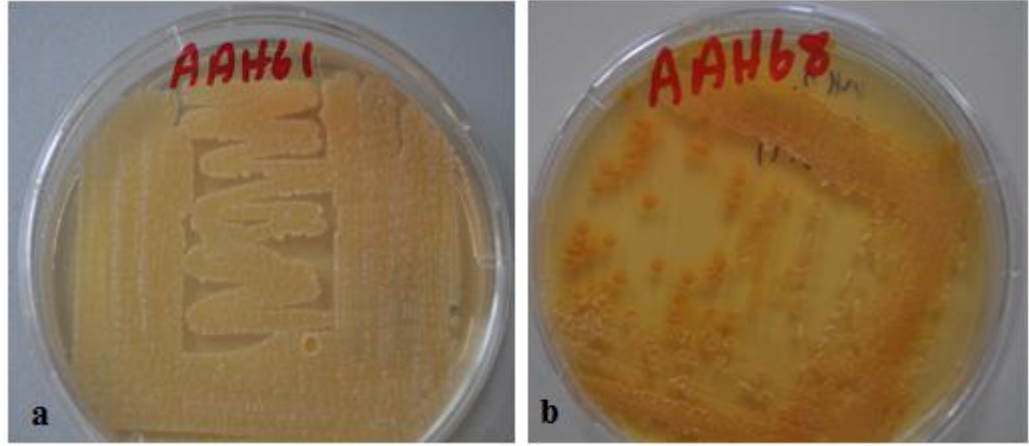
Üç farklı toprak örneğinden izole edilip 16 rRNA genleri baz alınarak moleküler teşhisleri yapılan (Yılmaz ve ark. 2008) (Şekil 4.1) *Streptomyces* cinsine dahil lokal izolatların M2 besiyerinde 28 °C’de üretimleri yapıldı ve bu besiyerindeki üreme görünümleri takip edildi. Çizelge 4.1’de bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* türlerinin morfolojik özellikleri ve Şekil 4.2-4.9’da M2 katı besiyerindeki üreme görünümleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Streptomyces* izolatlarının M2 besiyerindeki morfolojik özellikleri

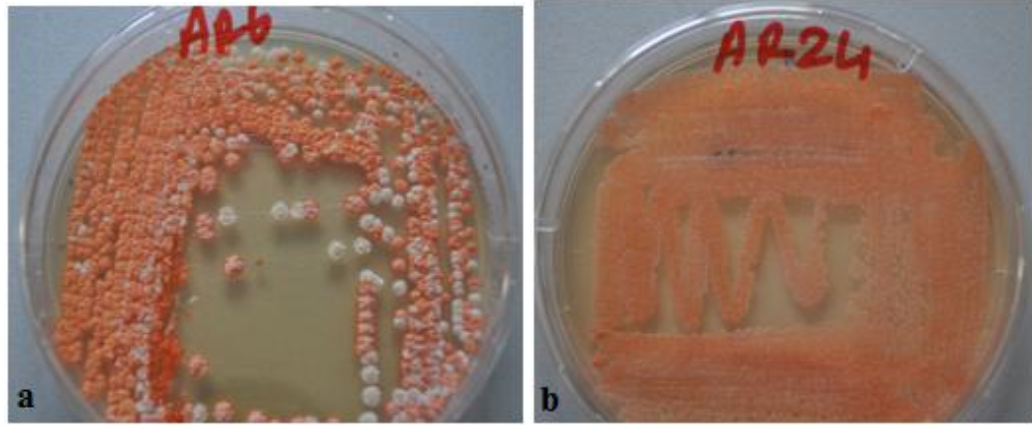
Organizma	Koloni yapısı	Substrat miseli rengi	Difüzlenebilen pigment	Hava miseli rengi
AAH61	Derimsi	Sarı	-	Beyaz
AAH68	Likenimsi	Sarı	-	Sarı
AR6	Likenimsi	Turuncu	-	Gri
AR24	Dairemsi	Pembe	-	Makroskopik olarak gözlenmedi
AS31	Dairemsi	Yeşil-Kahverengi	Açık kahve rengi	Gri
AS40	Likenimsi	Sarı	-	Sarı
BA3	Likenimsi	Krem rengi	-	Beyaz
BA14	Likenimsi-Kadifemsi	Yeşil	Mor-kırmızı	Yeşil
BAH46	Dairemsi	Krem rengi	-	Beyaz
BS33	Kubbemsi	Krem rengi	-	Beyaz
CA3	Dairemsi (Cıvık)	Yeşil	-	Makroskopik olarak gözlenmedi
CA14	Dairemsi	Yeşil	Yeşil	Makroskopik olarak gözlenmedi
CA19	Likenimsi	Kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahve rengi
CAH33	Likenimsi	Turuncu-Pembe	Açık kahve rengi	Turuncu
CS43	Dairemsi	Krem renginde	-	Beyaz



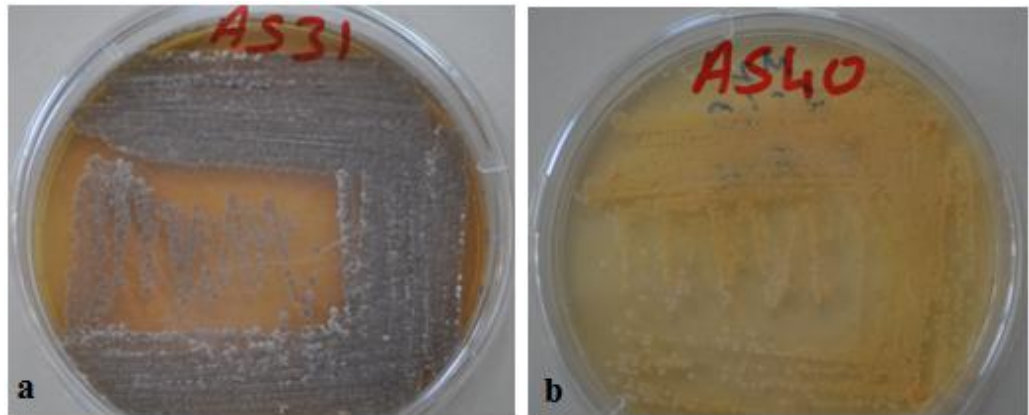
Şekil 4.1. 16S rRNA genleri baz alınarak neighbor-joining yöntemiyle çizilen filogenetik ağaç (Yılmaz ve ark. 2008). Bu çalışmada kullanılan izolatlar ağaç üzerinde daire içine alınmıştır.



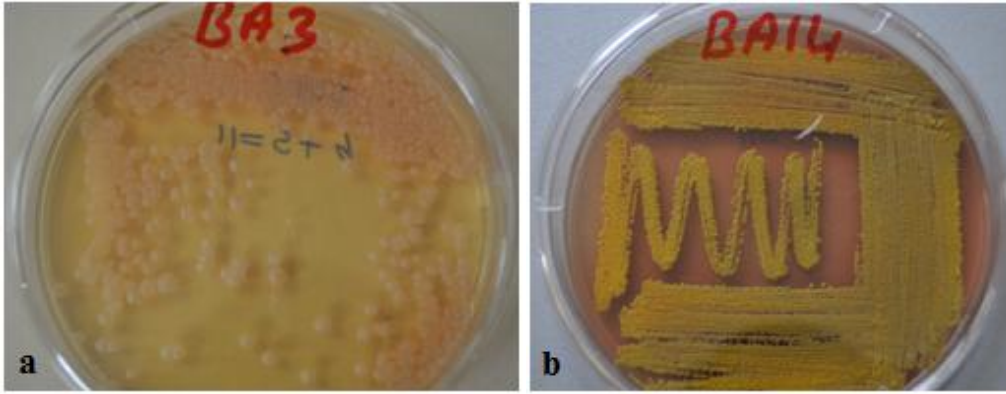
Şekil 4.2. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. AAH61 b: *Streptomyces* sp. AAH68.



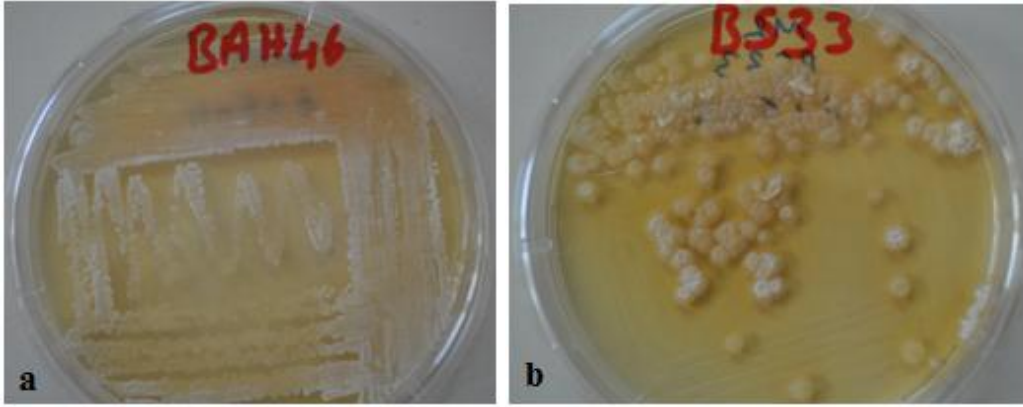
Şekil 4.3. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. AR6 b: *Streptomyces* sp. AR24



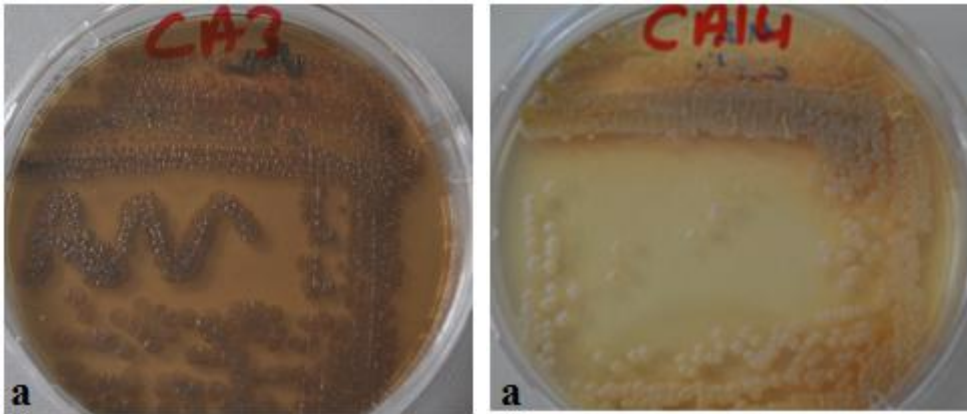
Şekil 4.4. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. AS31, b: *Streptomyces* sp. AS40



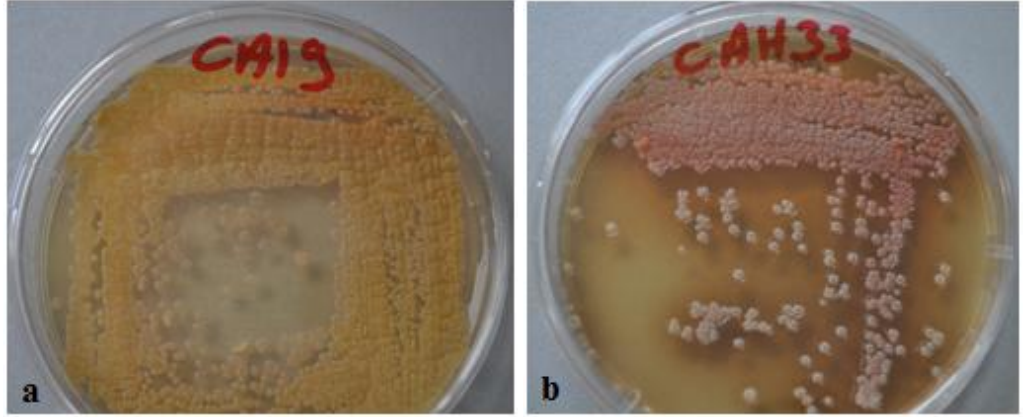
şekil 4.5. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. BA3, b: *Streptomyces* sp. BA14



şekil 4.6. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. BAH46, b: *Streptomyces* sp. BS33



şekil 4.7. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. CA3, b: *Streptomyces* sp. CA14



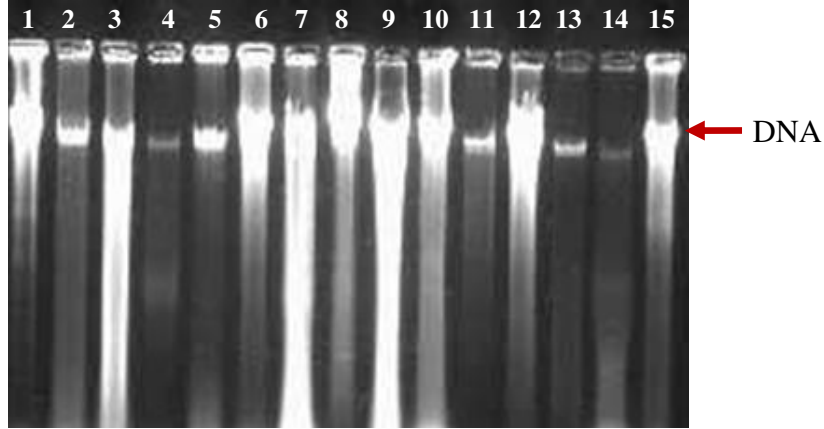
Şekil 4.8. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
a: *Streptomyces* sp. CA19, b: *Streptomyces* sp. CAH33



Şekil 4.9. M2 Besiyerinde 7 gün sonrasında üreyen bakterilerin koloni görünümü.
Streptomyces sp. CS43

4.1.2. Kromozomal DNA

15 farklı *Streptomyces* türünden kromozomal DNA izolasyonları yapıldı. Kromozomlar şekil 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.10. İzole edilen kromozomal DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1. *Streptomyces* sp. AAH61, 2. *Streptomyces* sp. AAH68, 3. *Streptomyces* sp. AR6, 4. *Streptomyces* sp. AR24, 5. *Streptomyces* sp. AS31, 6. *Streptomyces* sp. AS40, 7. *Streptomyces* sp. BA3, 8. *Streptomyces* sp. BA14, 9. *Streptomyces* sp. BAH46, 10. *Streptomyces* sp. BS33, 11. *Streptomyces* sp. CA3, 12. *Streptomyces* sp. CA14, 13. *Streptomyces* sp. CA19, 14. *Streptomyces* sp. CAH33, 15. *Streptomyces* sp. CS43.

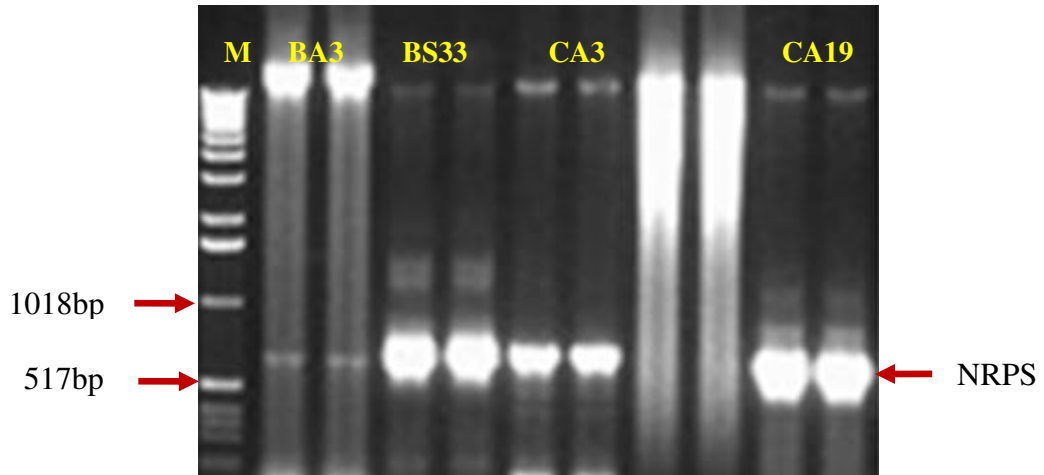
4.1.3. NRPS ve Tip I PKS Genlerinin Genomda Taranması

4.1.3.1. NRPS Genlerinin Taranması

Lokal *Streptomyces* izolatlarından saflaştırılan kromozomal DNA'lar kullanılarak PCR ile NRPS gen kümesinin adenilasyon domaini çoğaltıldı. Lokal izolatların 15 tanesinde de ilgili gende amplifikasyon elde edildi. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu yaklaşık 700 bp uzunluğundadır.

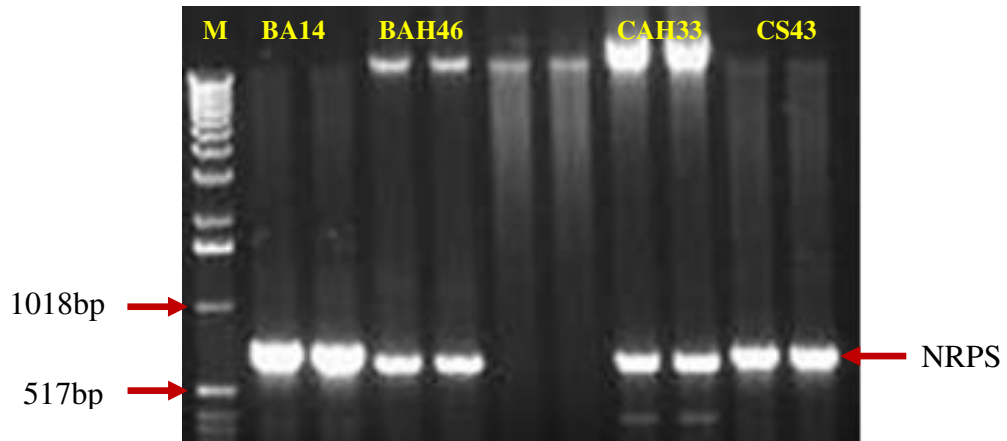
Saflaştırılan DNA'lardan elde edilen NRPS amplifikasyonu materyal ve metotta detaylı verilen standart koşullardan başlanarak; magnezyum klorür, primer bağlanma sıcaklığı ve kullanılan Taq polimeraz kiti değiştirilerek farklı optimizasyonlar yapıldı.

Materyal ve metodta verilen Taq DNA polimeraz (Fermentas) kit için standart koşulların kullanılmasıyla; *Streptomyces* sp. BA3, *Streptomyces* sp. BS33, *Streptomyces* sp. CA3 ve *Streptomyces* sp. CA19 izolatlarında beklenen ürün elde edildi (Şekil 4.11).



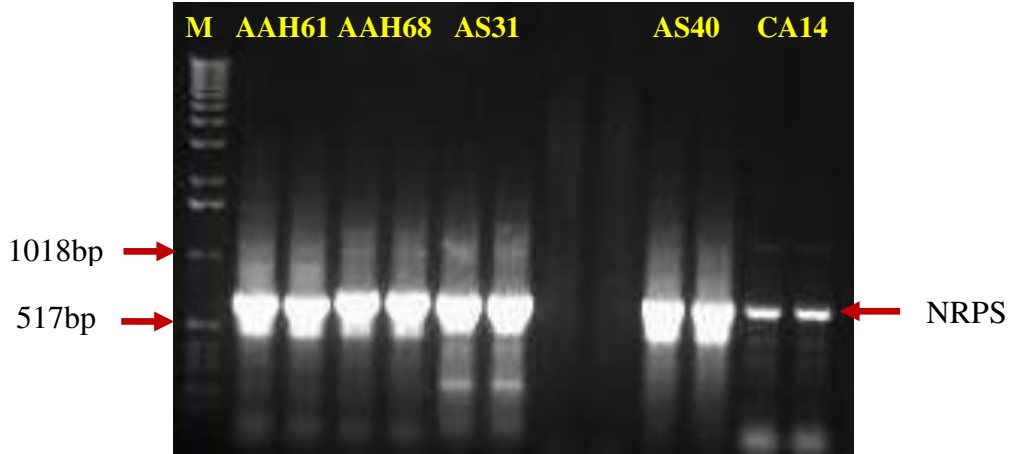
Şekil 4.11. *Streptomyces* sp. BA3, *Streptomyces* sp. BS33, *Streptomyces* sp. CA3 ve *Streptomyces* sp. CA19 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri.

Standart koşullarda ürün elde edilemeyen *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. BAH46, *Streptomyces* sp. CAH33 ve *Streptomyces* sp. CS43 izolatları için magnezyum klorür konsantrasyonu 2.5 mM'a çıkarıldığı zaman ürün elde edildi (Şekil 4.12).



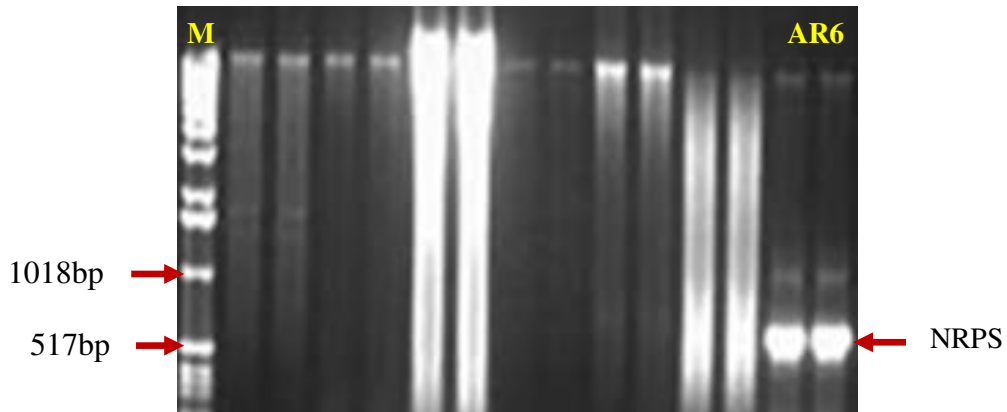
Şekil 4.12. *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. BAH46, *Streptomyces* sp. CAH33 ve *Streptomyces* sp. CS43 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri.

Magnezyum klorür konsantrasyonu 3 mM'a çıkarıldığı zaman *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AAH68, *Streptomyces* sp. AS31, *Streptomyces* sp. AS40 ve *Streptomyces* sp. CA14 izolatlarında Şekil 4.13'de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



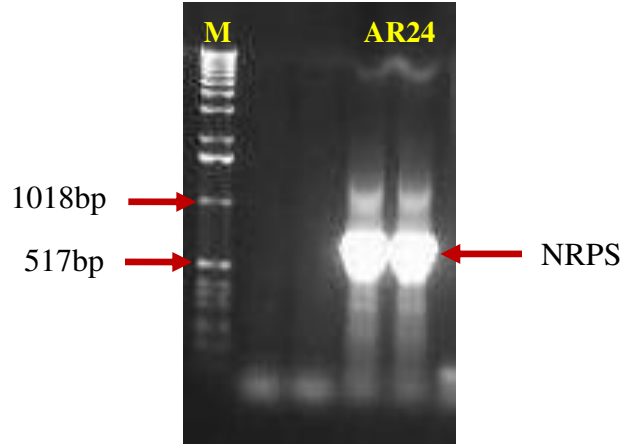
Şekil 4.13. *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AAH68, *Streptomyces* sp. AS31, *Streptomyces* sp. AS40 ve *Streptomyces* sp. CA14 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri.

Streptomyces sp. AR6 izolatında ise 2.5 mM magnezyum klorür varlığında ve 55 °C primer bağlanma sıcaklığında Şekil 4.14’de de görüldüğü gibi ürün elde edildi.



Şekil 4.14. *Streptomyces* sp. AR6 izolatında elde edilen PCR ürünü.

Şekil 4.15’de görüldüğü gibi *Streptomyces* sp. AR24 izolatında 2.5 mM magnezyum klorür varlığında ve 45 °C bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.



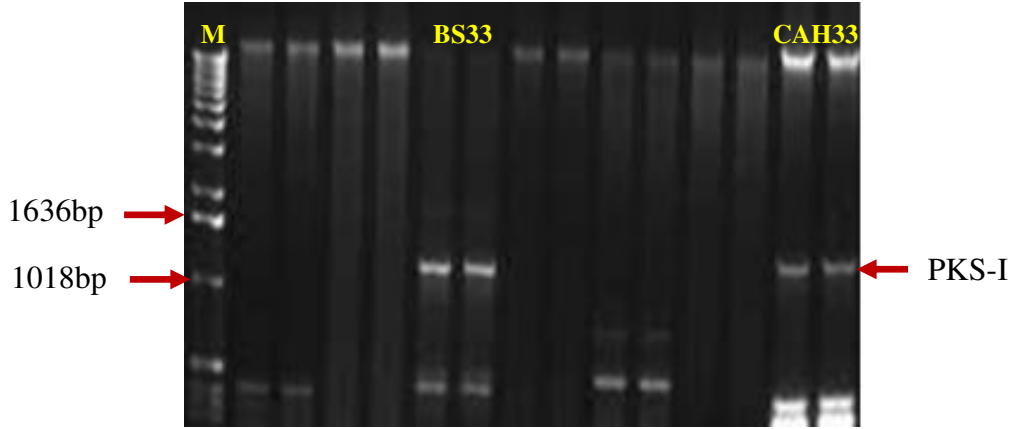
Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. AR24 izolatında elde edilen PCR ürünü.

4.1.3.2. Tip I PKS Genlerinin Taranması

Lokal *Streptomyces* izolatlarından saflaştırılan kromozomal DNA'lar kalıp olarak kullanılarak tip I PKS genlerinin ketosentaz domaini PCR yardımıyla çoğaltıldı. 15 lokal izolatın 14 tanesinde amplifikasyon elde edildi. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen amplikonun uzunluğu yaklaşık 1200-1400 bp uzunluğundadır.

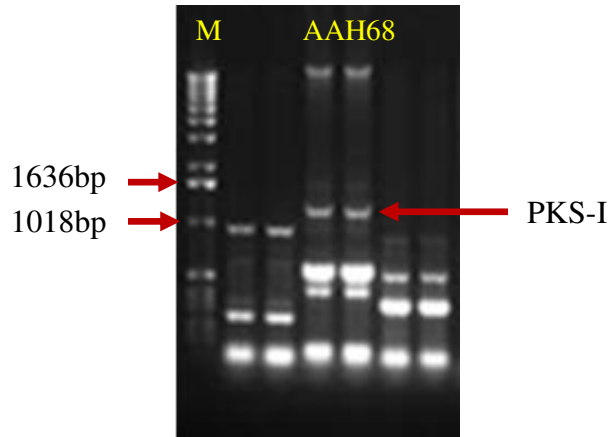
Saflaştırılan DNA'lardan elde edilen tip I PKS amplifikasyonu materyal ve metodta detaylı verilen standart koşullardan başlanarak; magnezyum klorür, primer bağlanma sıcaklığı ve kullanılan Taq polimeraz kiti değiştirilerek farklı optimizasyonlar yapıldı.

Materyal ve metotta verilen Taq DNA polimeraz Kit (Fermentas) için standart koşullarda hiçbir izolatda ürün elde edilmedi. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, Şekil 4.16'da görüldüğü gibi *Streptomyces* sp. BS33 ve *Streptomyces* sp. CAH33 izolatlarında 3.5 mM magnezyum klorür varlığında ve 53 °C primer bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.

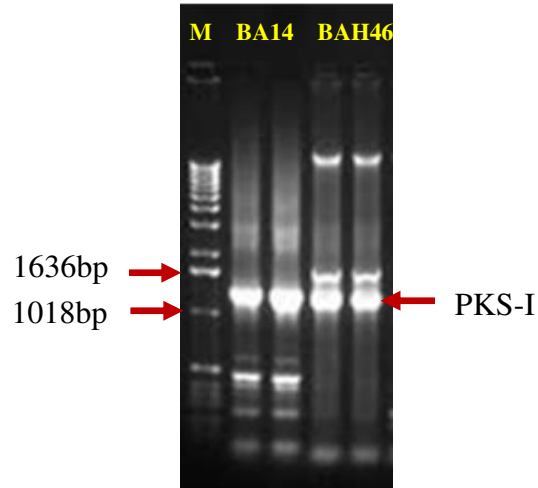


Şekil 4.16. *Streptomyces* sp. BS33 ve *Streptomyces* sp. CAH33 izolatlarında elde edilen PCR ürünleri.

Şekil 4.17’de *Streptomyces* sp. AAH68 ve Şekil 4.18’de görüldüğü gibi *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. BAH46 izolatlarında 2 mM magnezyum klorür ve 50 °C bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.

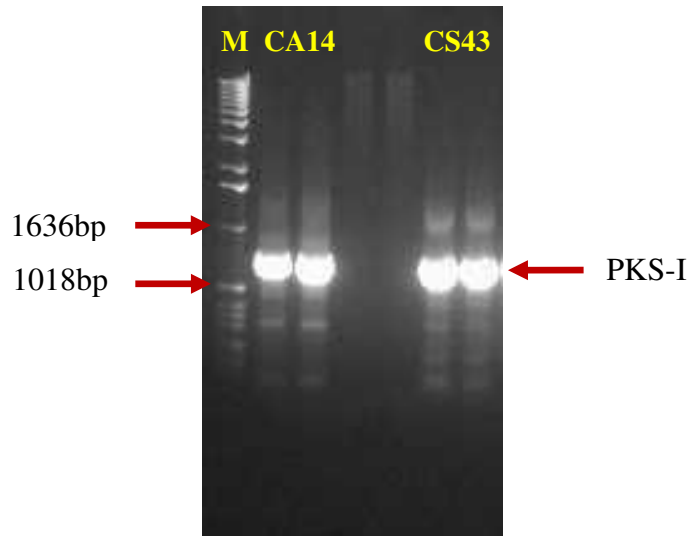


Şekil 4.17. *Streptomyces* sp. AAH68 izolatında elde edilen PCR ürünü.



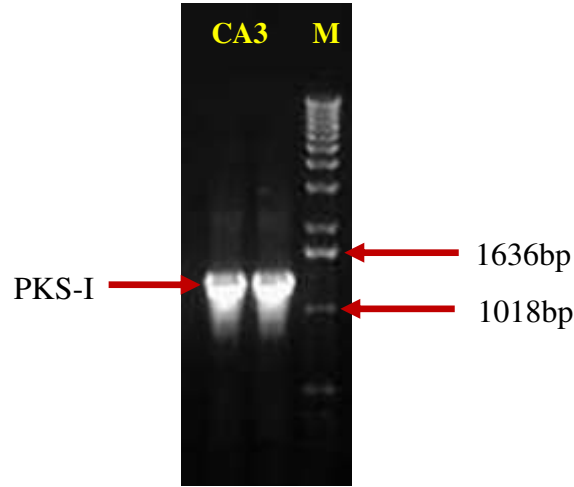
Şekil 4.18. *Streptomyces* sp. BA14 ve *Streptomyces* sp. BAH46 izolatlarında elde edilen PCR ürünleri.

Streptomyces sp. CA14 ve *Streptomyces* sp. CS43 izolatlarında şekil 4.19’da görüldüğü üzere 2 mM magnezyum klorür varlığında ve 47 °C bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.



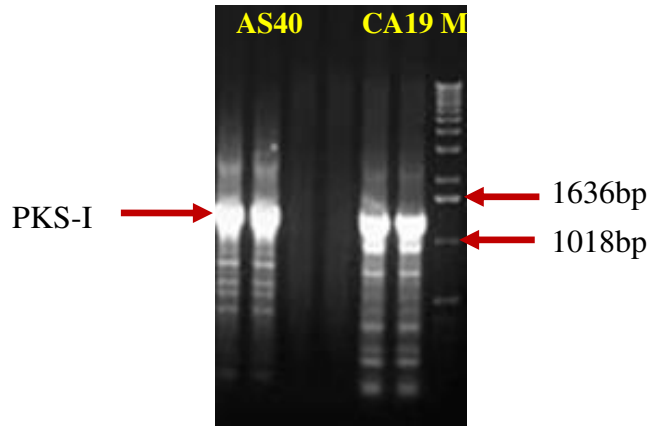
Şekil 4.19. *Streptomyces* sp. CA14 ve *Streptomyces* sp. CS43 elde edilen PCR ürünleri.

Materyal ve metotta verildiği üzere Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) için standart PCR reaksiyon koşullarının kullanılmasıyla *Streptomyces* sp. CA3 izolatında ürün elde edildi (Şekil 4.20).



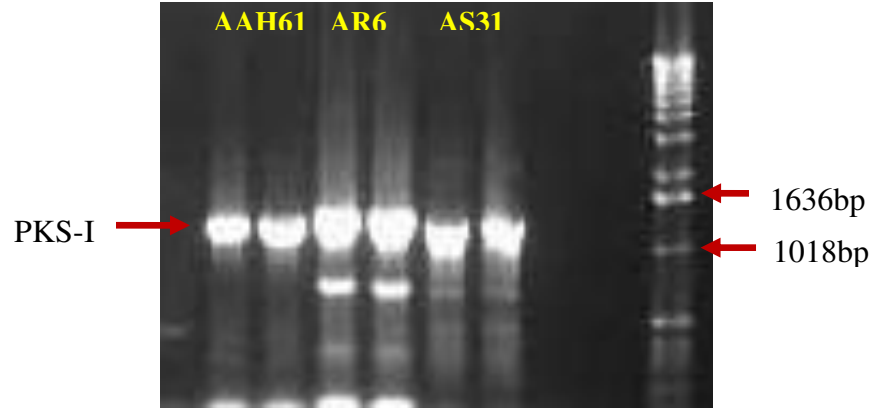
Şekil 4.20. *Streptomyces* sp. CA3 izolatından elde edilen PCR ürünü.

Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) için standart koşullarda ürün elde edilmeyen *Streptomyces* sp. AS40 ve *Streptomyces* sp. CA19 izolatlarında 2.5 mM magnezyum klorür varlığında ve 53 °C bağlanma sıcaklığında amplifikasyon elde edildi (Şekil 4.21).



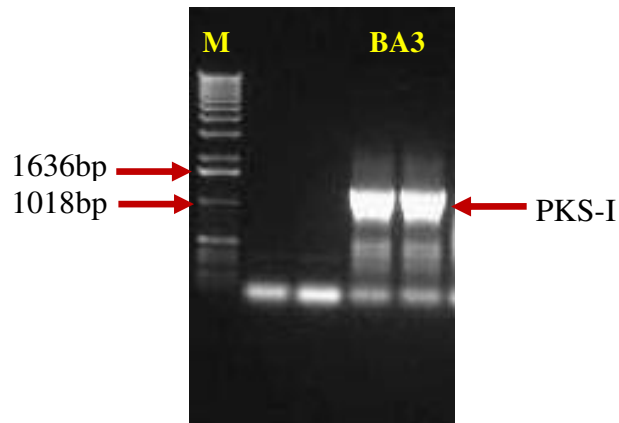
Şekil 4.21. *Streptomyces* sp. AS40 ve *Streptomyces* sp. CA19 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri.

Streptomyces sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR6, *Streptomyces* sp. AS31 izolatlarında Şekil 4.22’de de görüldüğü üzere 2.5 mM magnezyum klorür varlığında ve 45 °C primer bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.



Şekil 4.22. *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR6, *Streptomyces* sp. AS31 izolatlarından elde edilen PCR ürünleri.

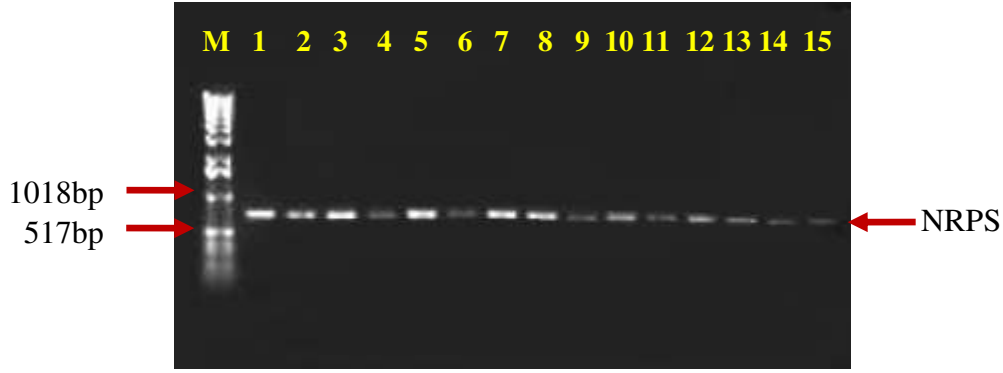
Ürün elde edilmeyen *Streptomyces* sp. BA3'te termal döngüde denatürasyon süresi 1 dakikaya çıkartılıp, magnezyum klorür 1.5 mM olarak kullanıldığında ürün elde edildi (Şekil 4.23).



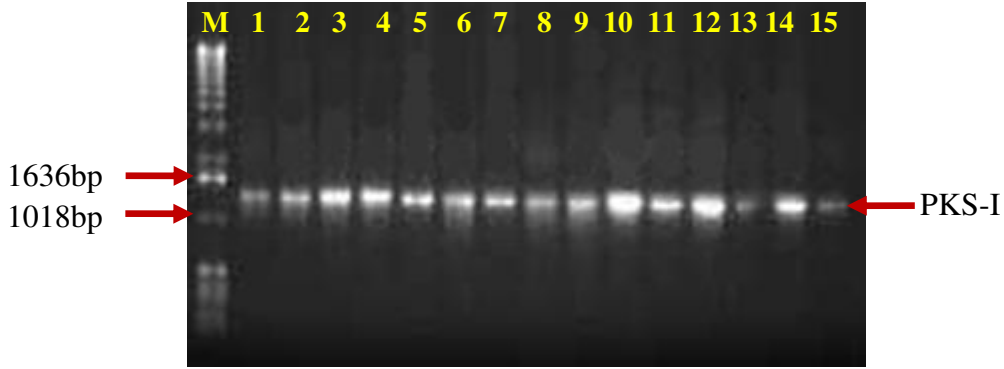
Şekil 4.23. *Streptomyces* sp BA3 izolatından elde edilen PCR ürünü.

4.1.3.3. PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması

PCR sonrasında yaklaşık 700 bp uzunluğunda olan NRPS ve 1200-1400 bp uzunluğunda olan tip I PKS amplifikasyon ürünleri jelden kesilerek ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrası jel görüntüleri Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de görülmektedir.



Şekil 4.24. PCR sonucu elde edilen pütatif NRPS A domainlerinin saflaştırıldıktan sonra agaroz jeldeki görüntüleri. 1. *Streptomyces* sp. AAH61, 2. *Streptomyces* sp. AAH68, 3. *Streptomyces* sp. AR6, 4. *Streptomyces* sp. AR24, 5. *Streptomyces* sp. AS31, 6. *Streptomyces* sp. AS40, 7. *Streptomyces* sp. BA3, 8. *Streptomyces* sp. BA14, 9. *Streptomyces* sp. BAH46, 10. *Streptomyces* sp. BS33, 11. *Streptomyces* sp. CA3, 12. *Streptomyces* sp. CA14, 13. *Streptomyces* sp. CA19, 14. *Streptomyces* sp. CAH33, 15. *Streptomyces* sp. CS43.

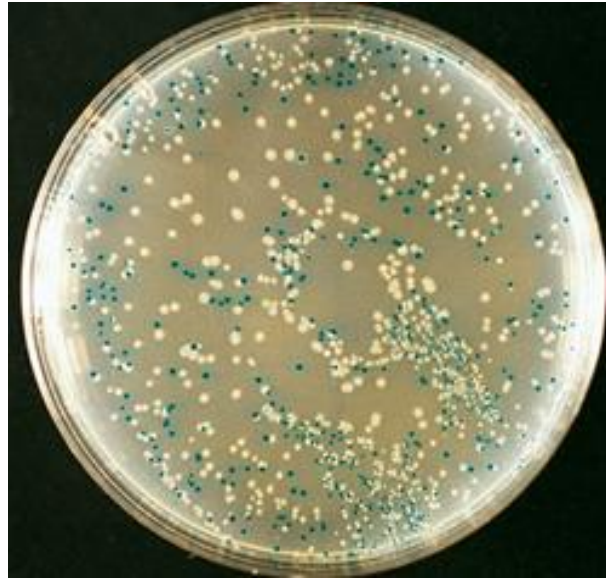


Şekil 4.25. PCR sonucu elde edilen pütatif tip I PKS KS domainlerinin saflaştırıldıktan sonra agaroz jeldeki görüntüleri. 1. *Streptomyces* sp. AAH61, 2. *Streptomyces* sp. AAH68, 3. *Streptomyces* sp. AR6, 4. *Streptomyces* sp. AR24, 5. *Streptomyces* sp. AS31, 6. *Streptomyces* sp. AS40, 7. *Streptomyces* sp. BA3, 8. *Streptomyces* sp. BA14, 9. *Streptomyces* sp. BAH46, 10. *Streptomyces* sp. BS33, 11. *Streptomyces* sp. CA3, 12. *Streptomyces* sp. CA14, 13. *Streptomyces* sp. CA19, 14. *Streptomyces* sp. CAH33, 15. *Streptomyces* sp. CS43.

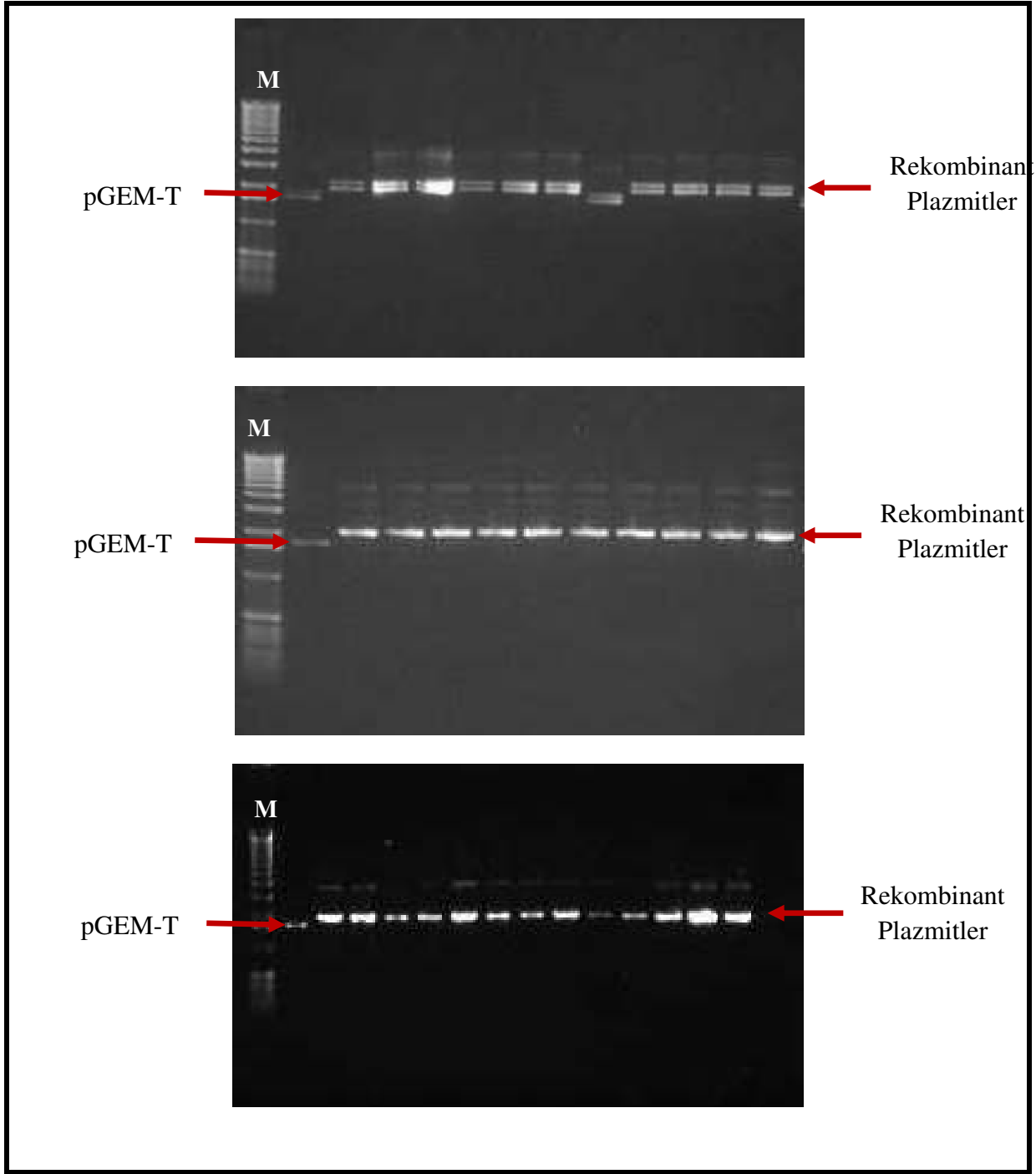
4.1.4. PCR ile Elde Edilen Ürünlerin Klonlanması

4.1.4.1. NRPS Genlerinin Adenilasyon Domainlerinin Klonlanması

Streptomyces sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR24, *Streptomyces* sp. CA14 ve *Streptomyces* sp. BAH46 izolatlarından elde edilen NRPS genlerine ait pütatif adenilasyon domainleri pGEM-T vektörlere klonlanarak mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. *E.coli* DH5- α kompetent hücrelerine transformasyon yapılarak ilgili gen ve organizma için mini gen kütüphaneleri kurulmuş oldu. Transformantlar ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi (Şekil 4.26). Beyaz renkli ampisiline dirençli kolonilerin pütatif rekombinant plazmid içermesinden dolayı, bu koloniler yeniden üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları yapıldı. *Streptomyces* sp. AAH61'in NRPS geni A domaininden elde edilen rekombinant plazmitler Şekil 4.27'de verilmiştir.

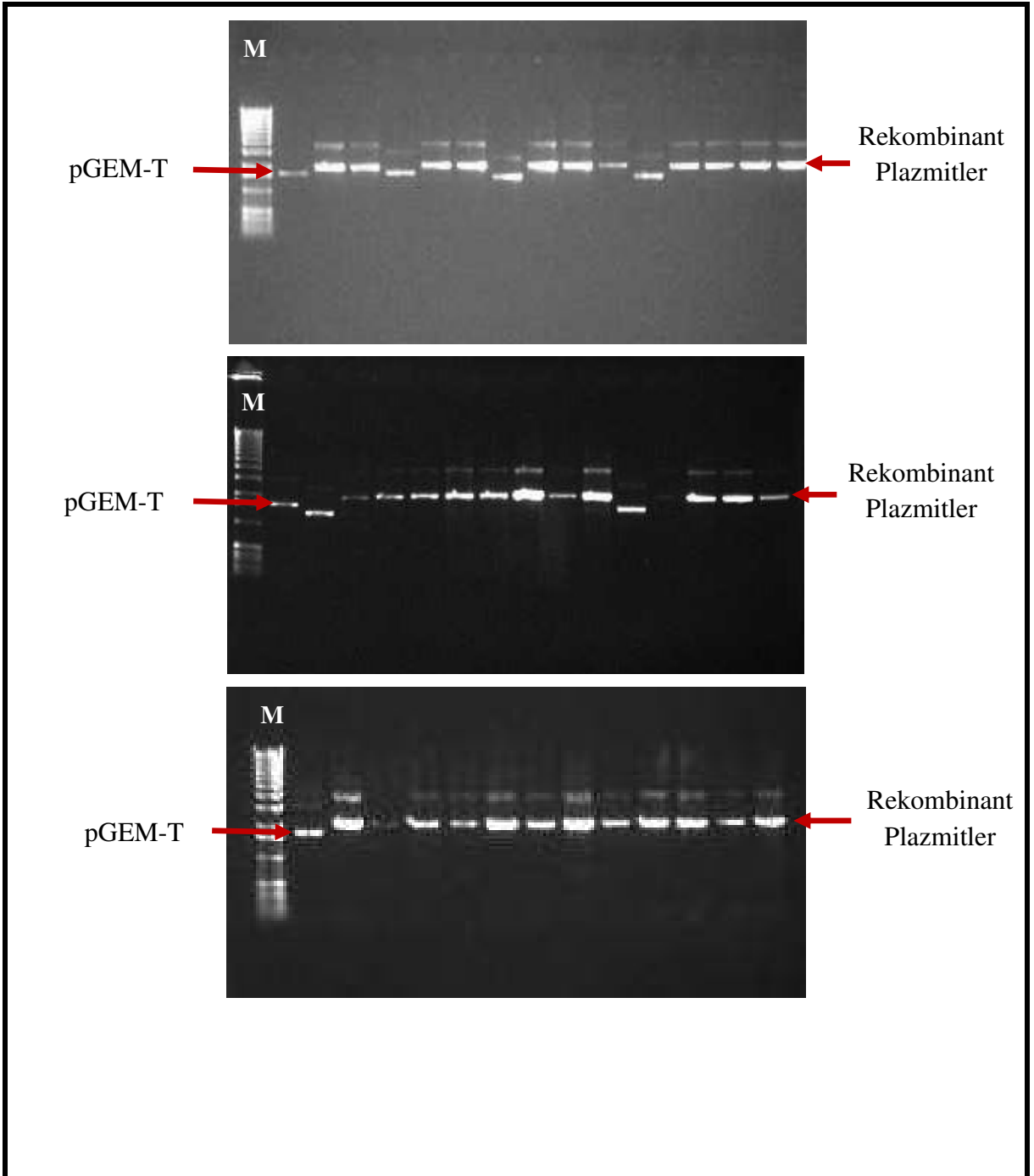


Şekil 4.26. Mavi-beyaz koloni seçimi (<http://www.sigmaaldrich.com> (2011))



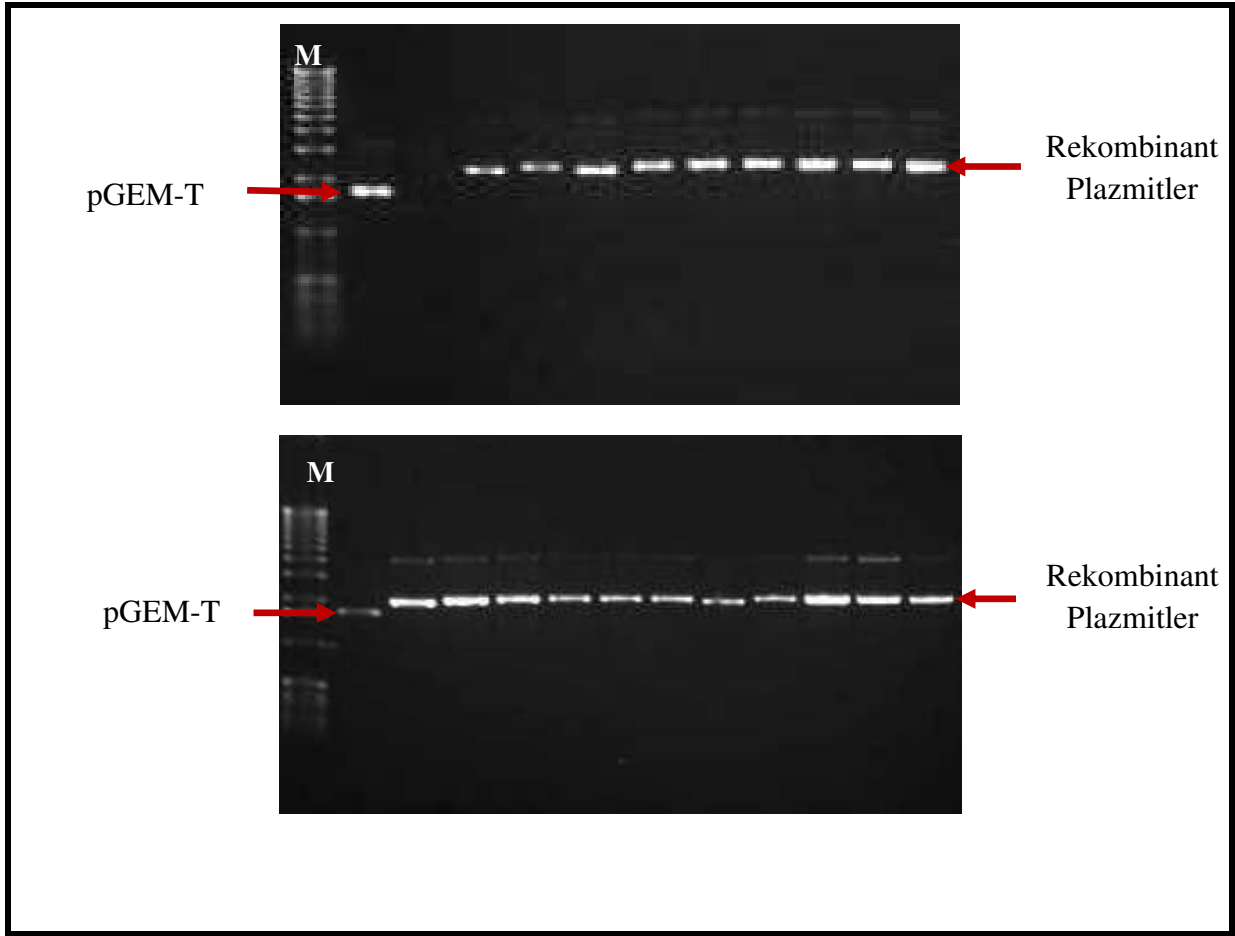
Şekil 4.27. *Streptomyces* sp. AAH61'in pütatif NRPS geni A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.

Streptomyces sp. AR24'ün NRPS geni A domaininden elde edilen rekombinant plazmitler Şekil 4.28'de görülmektedir.



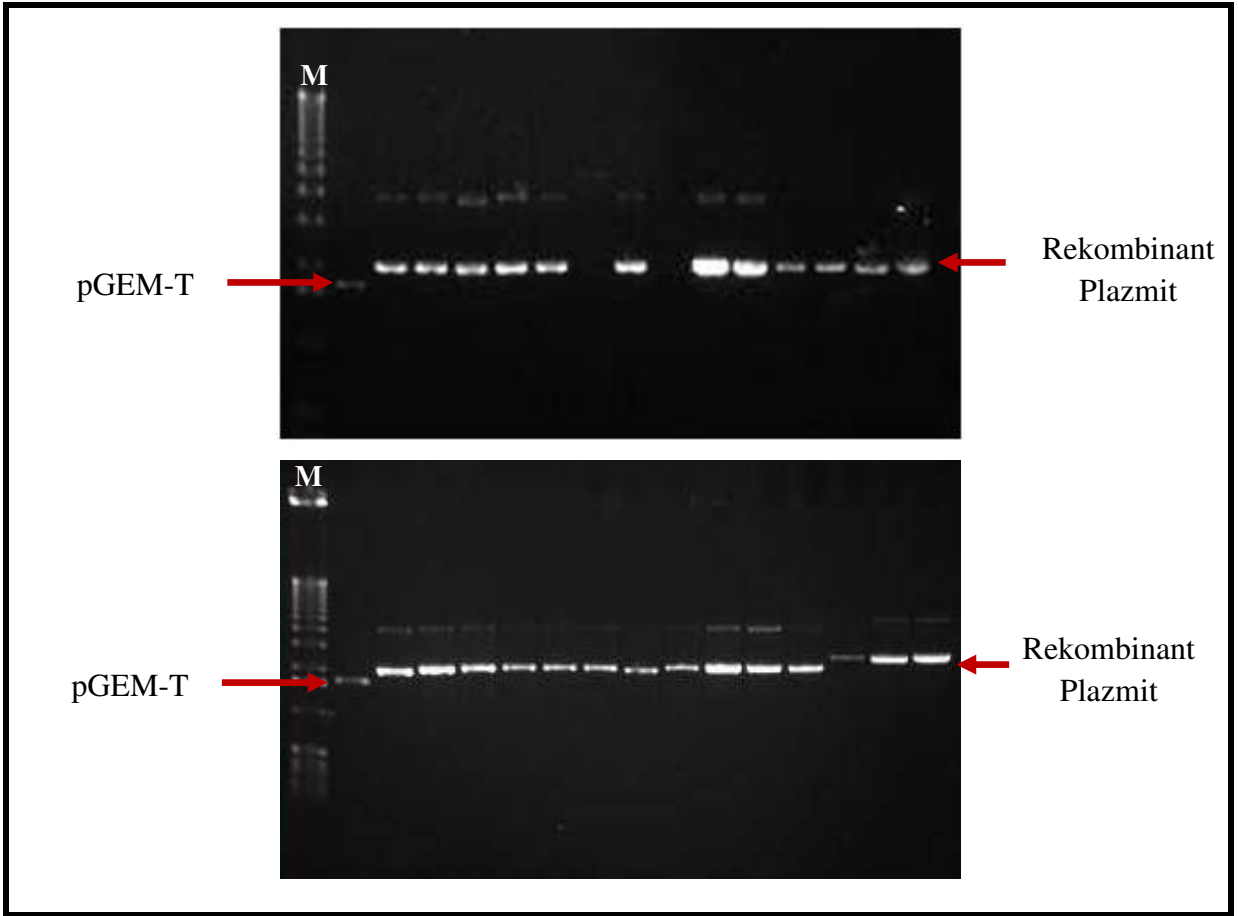
Şekil 4.28. *Streptomyces* sp. AR24'ün pütatif NRPS geni A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.

Streptomyces sp. CA14'ün NRPS geni A domaininden elde edilen rekombinant plazmitler şekil 4.29'da verilmiştir.



şekil 4.29. *Streptomyces* sp. CA14'ün pütatif NRPS geni A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler

Streptomyces sp. BAH46'nın NRPS geni A domaininden elde edilen rekombinant plazmitler Şekil 4.30'da verilmiştir.

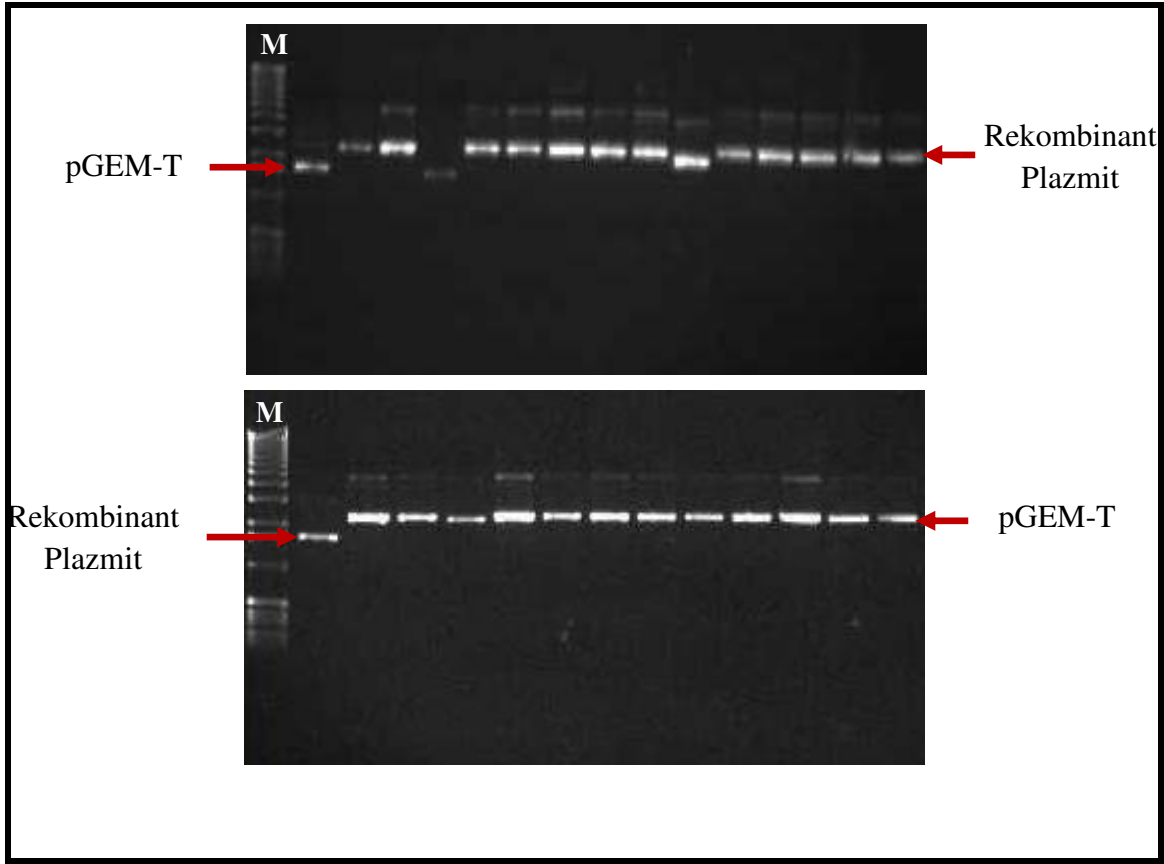


Şekil 4.30. *Streptomyces* sp. BAH46'nın pütatif NRPS geni A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler

4.1.4.2. Tip I PKS Genlerinin Ketosentaz Domainlerinin Klonlanması

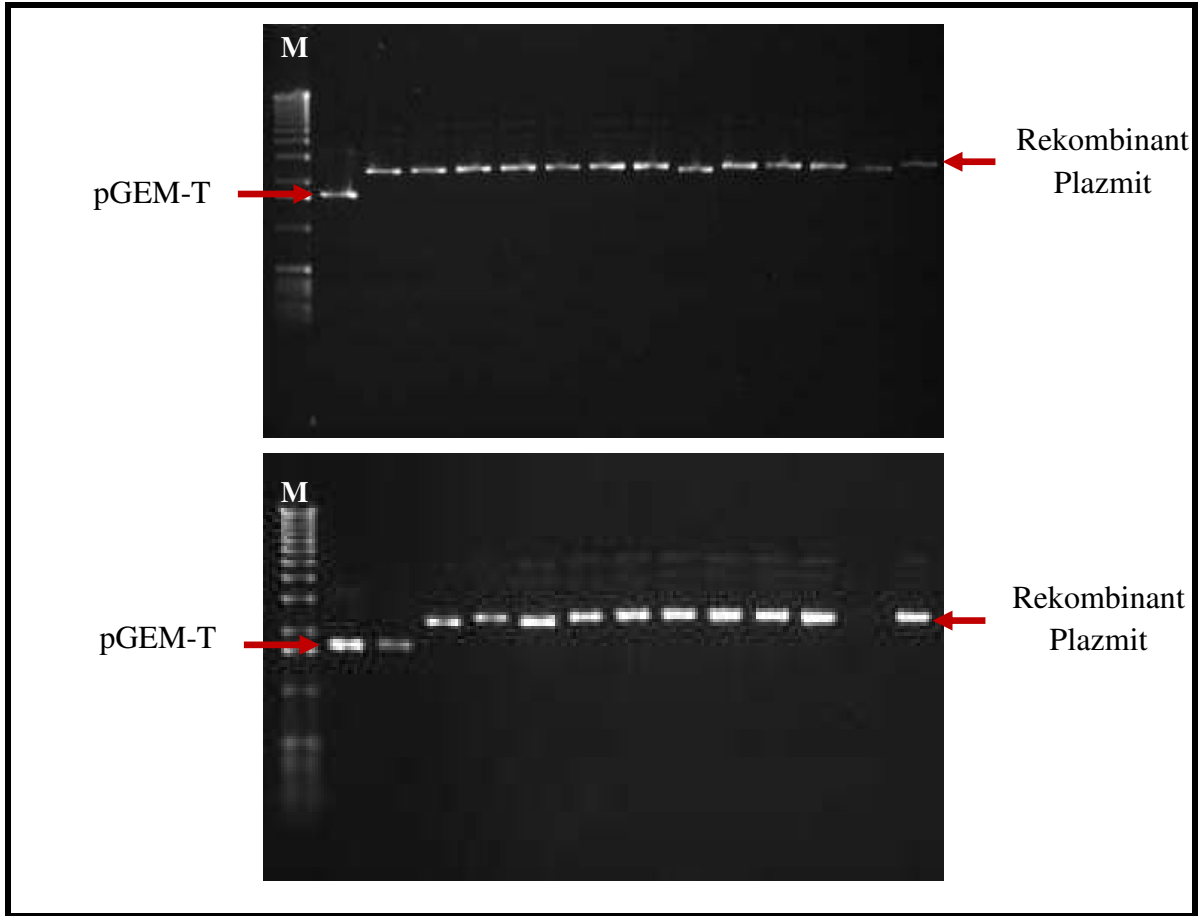
Streptomyces sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3 izolatlarından elde edilen tip I PKS genlerine ait pütatif ketosentaz domainleri jelden geri kazanılarak pGEM-T lineer vektörlerine klonlandı. *E. coli* DH5- α kompetent hücrelerine transformasyon yapılarak ilgili gen ve organizma için mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. Transformantlar ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi. Beyaz renkli ampisiline dirençli kolonilerin pütatif rekombinant plazmid içermesinden dolayı, bu koloniler yeniden üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları

yapıldı. *Streptomyces* sp. AS31'in tip I PKS geni KS domaininden elde edilen rekombinant plazmitler Şekil 4.31'de görülmektedir.



Şekil 4.31. *Streptomyces* sp. AS31'in pütatif tip I PKS geni KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.

Streptomyces sp. CA3'ün tip I PKS geni KS domaininden elde edilen rekombinant plazmitler Şekil 4.32'de görülmektedir.



Şekil 4.32. *Streptomyces* sp. CA3'ün pütatif tip I PKS geni KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinat plazmitler

4.1.5. Biyoinformatik incelemeler

NRPS mini gen kütüphaneleri oluşturulan *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR24, *Streptomyces* sp. CA14 ve *Streptomyces* sp. BAH46 izolatlarından *Streptomyces* sp. AAH61 ve *Streptomyces* sp. AR24 kütüphanelerinden elde edilen klonların DNA dizi analizleri yapıldı. Tip I PKS mini gen kütüphaneleri oluşturulan *Streptomyces* sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3'den elde edilen klonların DNA dizi analizleri yapıldı, NCBI web sitesinde BLASTn ve BLASTx programlarında homoloji incelemeleri yapıldı.

4.1.5.1. *Streptomyces* sp. AAH61'in NRPS Genlerinin İncelenmesi

Kurulan NRPS kütüphanesinden 35 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. AAH61 izolatının; NRPS genlerine ait 3 farklı A domaini içerdiği bulundu. Çizelge 4.2 ve 4.3'de grupladığımız bu klonların sırasıyla; BLASTn ve BLASTx analizleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdikleri NRPS genlerinin ait olduğu bakteriler görülmektedir.

Çizelge 4.2. *Streptomyces* sp. AAH61 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3/(gb CP002600.1)	% 72	14
2	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0293/(dbj AB432849.1)	% 67	
	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD/(gb CP000442.1)	% 67	12
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain C7R12/(gb EF010975.1)	% 65	
3	<i>Streptomyces</i> sp. 42-30-7/(dbj AB432775.1)	% 69	9

Çizelge 4.3. *Streptomyces* sp. AAH61 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu4113/ (ref ZP_07610598.1)	% 52-56	14
2	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD/(ref YP_778354.1)	% 48-50	
	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL159988/ (ref ZP_04691971.1)	% 52	12
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.oryzae str.16/ (ref ZP_04586198.1)	% 49-51	
3	<i>Streptomyces</i> sp. Tu6071 (ref ZP_08455386.1)	% 64	9

4.1.5.2. *Streptomyces* sp. AR24'ün NRPS Genlerinin İncelenmesi

Kurulan NRPS kütüphanesinden 19 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. AR24 izolatının; NRPS genlerine ait 3 farklı A domaini içerdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.4 ve 4.5'da grupladığımız bu klonların sırasıyla; BLASTn ve BLASTx analizleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdikleri NRPS genlerinin ait olduğu bakteriler görülmektedir.

Streptomyces sp. BAH46 ve *Streptomyces* sp. CA14 izolatlarının kurulan NRPS kütüphanelerinden seçilen rekombinant klonların DNA dizi analizleri devam etmektedir. Tamamlanınca BLASTn ve BLASTx analizleri yapılacaktır.

Çizelge 4.4. *Streptomyces* sp. AR24 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları

Grup NO	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces bikiniensis</i> /(dbj AB432622.1)	% 68-72	8
2	<i>Streptomyces fungicidicus</i> /(gb DQ403252.1)	% 76	9
3	<i>Frankia</i> sp. CcI3/(gb CP000249.1)	% 69	2

Çizelge 4.5. *Streptomyces* sp. AR24 izolatının NRPS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları.

Grup ismi	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	Kültüre edilmemiş bakteri/(gb ADK54820.1)	% 53-63	8
2	<i>Streptomyces fungicidicus</i> /(gb ABD65957.1)	% 72	9
3	<i>Streptomyces albus</i> J1074/(ref ZP_04705330.1)	% 57	2

4.1.5.3. *Streptomyces* sp. AS31'in Tip I PKS Genlerinin İncelenmesi

Kurulan tip I PKS kütüphanesinden 32 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. AS31 izolatının tip I PKS genlerine ait 2 farklı KS domaini tespit edilmiştir. Çizelge 4.6 ve 4.7'de grupladığımız bu klonların sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdikleri NRPS genlerinin ait olduğu bakteriler görülmektedir.

Çizelge 4.6. *Streptomyces* sp. AS31 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları

Grup İsmi	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i> /(dbj AB431110.1)	% 70	27
2	<i>Streptomyces</i> sp. 98-62/(gb DQ450945.1)	% 70-71	5

Çizelge 4.7. *Streptomyces* sp. AS31 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113/(ref ZP_07610617.1)	% 62	27
2	<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1/(gb ADI05104.1)	% 60	5

4.1.5.4. *Streptomyces* sp. CA3'ün Tip I PKS Genlerinin İncelenmesi

Kurulan tip I PKS kütüphanesinden 14 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. CA3 izolatının tip I PKS genlerinin tek çeşit KS domainine rastlandı. Çizelge 4.8 ve 4.9'da bu gruptaki klonların sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdikleri tip I PKS genine ait olduğu bakteriler görülmektedir.

Çizelge 4.8. *Streptomyces* sp. CA3 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTn sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbankası giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces collinus</i> /(emb AM746336.1)	% 67	14

Çizelge 4.9. *Streptomyces* sp. CA3 izolatının tip I PKS gen kütüphanesi klonlarının BLASTx sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbankası giriş no	Homoloji	Sekanslanan klon sayısı
1	<i>Streptomyces orinoci</i> /(emb CAO85896.1)	% 46	14

4.2. Tartışma

Son yıllarda organizmaların biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için sekonder metabolitlerin sentezinde görevli olan gen dizilerinin araştırılmasını amaçlayan bir çok çalışma yapılmıştır. Sekonder metabolizma ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır.

Çalışmamızda 15 farklı *Streptomyces* izolatının genomunda PCR yöntemine dayalı olarak NRPS ve tip I PKS genlerinin taraması yapıldı. Belirtilen genleri PCR ile amplifiye etmek için Ayuso ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada (Ayuso ve ark. 2005), ilgili genlerin sırasıyla A ve KS domainlerinin korunmuş bölgeleri dikkate alınarak dizayn ettikleri primer çiftleri kullanıldı. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda; izolatların tümünde (% 100) NRPS genlerinin, 14'ünde (% 93) ise tip I PKS genlerinin varlığı tespit edildi. 2005 yılında aynı primer çiftlerinin kullanıldığı bir çalışmada (K1F/M6R ve A3F/A7R) aktinomiset grubuna dahil cinslerin 210 türü NRPS ve tip I PKS genleri bakımından taranmıştır (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005). Bu çalışmada 168 (% 79) türde NRPS genleri, 111 (% 56.7) türde de tip I PKS genleri tespit edilmiştir. Tarama yapılan aktinomiset cinsleri arasında en büyük amplifikasyon oranında (NRPS'de % 97, tip I PKS'de % 79) *Streptomyces* cinsinde rastlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatlar da *Streptomyces* cinsinin üyeleri olup, aynı şekilde oldukça yüksek oranda bahsedilen biyosentetik genlere sahiptirler.

Sekonder metabolitler primer metabolizma ile ilişkilidir. Bundan dolayı besiyeri bileşenlerinin sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisi oldukça önemlidir. Kullandığımız izolatların antimikrobiyal aktiviteleri, daha önce farklı besiyerlerinde araştırılmış ve 15 izolatın sadece 4 tanesinde (*Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. CA3, *Streptomyces* sp. CA14, *Streptomyces* sp. CS43) antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark. 2005). Besiyeri bileşenlerinin sekonder metabolit üretiminde öneminin bilinmesine karşın, tamamlanan genom projeleri göstermektedir ki, aktinomisetler herhangi bir kültür ortamında üretmedikleri birçok sekonder metabolitin genlerine sahiptir. Örneğin; *S. coelicolor*, sekonder metabolit biyosentezinden sorumlu spesifik 29 gen kümesi içermesine rağmen (Nett ve ark. 2009), kültür ortamında yalnızca 3 bileşiğin üretildiği görülmüştür (Malpartida ve Hoopwood 1984, Cerdano ve

ark. 2001, Hojati ve ark. 2002, Williamson ve ark. 2006). Dolayısıyla böyle kriptik genlerin açığa çıkarılması açısından genetik taramanın oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu görülmektedir. Silva-Stenico ve arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada; taradıkları siyanobakterilerin % 34'ünün *Bacillus subtilis*'e karşı % 22'sinin ise *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiş olmasına rağmen, yapılan genetik taramalar sonucunda, bu organizmaların % 92'sinde NRPS ve % 80 PKS genleri tespit edilmiştir (Silva-Stenico ve ark. 2010). Öyle ki genetik tarama klasik kültür koşullarında sentezlenemeyen veya kimyasal tarama metodları ile tespit edilemeyecek kadar az üretilen bileşiklerin keşfedilmesine yol açmaktadır. Başka bir deyişle stres veya tehdit koşulları olmaksızın ekspresyonu olmayan kriptik genlerin varlığının ortaya çıkarılması açısından genetik tarama oldukça önem taşımaktadır. 2005 yılında Yılmaz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada izolatların çoğunluğunda antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamış olması (Yılmaz ve ark. 2005), bu genlerin kriptik olabileceği yönündeki görüşü güçlendirmektedir.

Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz klonlarımız içerisinde, Genbankasında şimdiye kadar bulunmuş olan bileşiklerin genleri ile anlamlı oranda bir homolojiye rastlanmayan örneklerimizin mevcut olması, bu genlerin yeni bileşikler üreten gen kümelerine ait olabileceği sonucunu doğurmaktadır. Yaptığımız biyoinformatik analizlerinde; BLASTn incelemeleri sonucunda elde edilen homoloji nükleotid-nükleotid homolojisine dayalı olduğu için oran daha yüksektir. Blastx incelemeleri ise amino asit homolojisine dayalı olduğu için homoloji daha düşük olup sonuçların protein-protein benzerliğini ortaya koyması açısından önemlidir. Örneğin *Streptomyces* sp. AAH61 izolatının BLAST analizlerinde BLASTx sonuçlarına dikkat edilirse 3 grup içerisinde homoloji oranı % 48-64 arasında değişmektedir. Bununla birlikte gruptaki klonların homoloji gösterdiği NRPS genlerinin hangi bileşiğin sentezinden sorumlu olduğu rapor edilmemiştir. BLASTx sonuçlarında homolojilerin bu kadar düşük olması elimizdeki bu domainlerin ait olduğu NRPS gen kümelerinin yeni olma ihtimalini oldukça güçlendirmektedir. Zira, biyosentetik gen kümelerine ait domainlerde % 70'in altında olan BLASTx homolojilerinde, incelenen dizilimin yeni bir gene ait olduğu düşünülmektedir (Zhang 2009). Aynı sekansların 1. gruptaki klonlarının BLASTx analizleri sonucunda *S. violaceusniger* türünün NRPS geni ile % 52 gibi düşük amino asit homolojisi gösterdiği, 2. grubundaki klonların da *Burkholderia ambifari* AMMD ve

Pseudomonas syringae pv. *oryzae*_16 gibi aktinomiset olmayan organizmalarla % 48-49 arasındaki benzerliği dikkat çekmektedir. Öte yandan grup 3'teki klonların da *Streptomyces* sp. Tu6071 izolatının NRPS geni ile % 70'in altında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı genlerin kendi organizma grubu yerine daha uzak akraba olan bakterilerin genlerine benzemesi ve bu bakterilerin iyi birer antibakteriyal ve antifungal üreticisi olması, bu gruptaki genlerin biyoaktif etkili bileşikler sentezleyen yeni genler olabilme ihtimalini güçlendirmektedir.

Streptomyces sp. AR24'ün NRPS kütüphanesindeki klonların ise özellikle BLASTx homolojilerinin düşük olduğu grup 1 ve grup 2'de yeni bileşik genleri olmaya aday klonlar mevcuttur. Özellikle grup 1'de kültüre edilmeyen bir bakterin NRPS genleri ile tespit edilen homoloji (% 53) 3. gruptaki klonların *S. albus* türünün NRPS geni ile % 57 amino asit homolojisi göstermesi; bu gruptaki klonların yeni bileşik sentezinden sorumlu NRPS genleri olma ihtimalini düşündürmektedir.

Streptomyces sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3 izolatlarının tip I PKS mini gen kütüphanesinden seçilen klonlarının, BLASTn ve BLASTx analizleri sonucunda, farklı mikroorganizmalara ait tip I PKS genleri ile değişik oranlarda homoloji gösterdiği belirlenmiş olup, homoloji oranları oldukça düşüktür. *Streptomyces* sp. AS31 izolatından seçilen klonların BLASTx analizlerinde Grup 1'in *S. violaceusniger* Tu4113'in 6-deoxyerythronolide-B (eritromisin bileşeni) sentezinden sorumlu tip I PKS geni ile % 62 oranında homoloji gösterdiği tespit edildi. Özellikle *Streptomyces* sp. CA3 izolatından elde edilen sekansların Blastx analizinde *S. orinoci* türünün tip I PKS geni ile % 46 gibi çok düşük bir homolojinin tespit edilmesi bu klonun da buna benzer diğerleri gibi yeni bileşik sentezinden sorumlu tip I PKS olma ihtimalini güçlendirmektedir.

Yeni olmaya aday ampikonların homolog prob olarak kullanılmasıyla Southern hibridizasyonu ile izolatların genomlarında bu domainlerin ait olduğu gen kümeleri taranacak ve ortaya çıkarılacaktır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. 15 *Streptomyces* izolatının tümünde NRPS genlerinin varlığı ortaya kondu
2. 15 *Streptomyces* izolatının 14'ünde tip I PKS genlerinin varlığı tespit edildi.
3. *Streptomyces* sp. AAH61, *Streptomyces* sp. AR24, *Streptomyces* sp. BAH46 ve *Streptomyces* sp. CA14 izolatları için, PCR ile elde edilen NRPS A domainleri klonlanarak mini gen kütüphaneleri kuruldu.
4. *Streptomyces* sp. AAH61 ve *Streptomyces* sp. AR24 izolatlarının NRPS, *Streptomyces* sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3 izolatlarının tip I PKS gen kütüphanelerinden seçilen klonların DNA dizi analizleri yapıldı.
5. *Streptomyces* sp. AS31 ve *Streptomyces* sp. CA3 izolatları için tip I PKS mini gen kütüphaneleri kuruldu.
6. BLAST programı kullanılarak DNA dilimleri incelendi.
7. BLAST analizleri sonucunda *Streptomyces* sp. AAH61 ve *Streptomyces* sp. AR24 izolatlarında NRPS genlerine ait farklı 3'er A domaini, *Streptomyces* sp. AS31'de iki farklı ve *Streptomyces* sp. CA3'te de yalnız bir adet tip I PKS geni KS domaini tespit edildi.

6. KAYNAKLAR

Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J.M. 1993. Delta-(Lalpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in beta-lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Biotechnology*, 11:807-10.

Ames, R.N., Reid, C.P., Ingham, E.R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 96:555–563.

Anderson, A.S., Clark, D., Gibbons, P. and Sigmund, J. 2002. The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of *actinomycetes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 60-69.

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

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

Barakata, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K.H., Beaulieu, C. 2002. Characterization of Rhizospheric Soil *Streptomyces* from Moroccan Habitats and Their Antimicrobial Activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 49-54.

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

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

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Haris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K.,

O'Neil, S., Rabbinoiwitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, 91 K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. ve Hopwood, D.A. 2002 Complete genome sequence of the model *actinomycetes Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 417: 141-147.

Büber, E., Açıan, N.L. 2004. Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler. Hacettepe Tıp Dergisi, 35: 43-48

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

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

Concepcion, G.P.; Lazaro, J.E.; Hyde, K.D. 2001. In Bio Exploitation of Filamentous Fungi Pointing. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 93-130.

Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M. & Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterisation of *Actinomycetes* antagonists of a fungal root pathogen. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3899-3905.

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

Demain, A.L. 1998. Induction of microbial secondary Metabolism. Int. Microbiol, 1: 259-264.

Drews J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. Science, 287(5460):1960–4.

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

Elisa, M., Migue'lez, Martin, G., Hardisson, C. and Manuel, B., Manzanal. 1993. Hyphal Death during Colony Development in *Streptomyces antibioticus*: Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote. The Journal of Cell Biology, (145): 515-525.

Elliot, L.F., Lynch, J.M. 1995. The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *Am. J. Alt. Agric*, 10: 50–73.

Finch R.G., Greenwood D., Norrby S.R., Whitley R.J., editors. 2003. Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. 8th ed. New York: Churchill Livingstone. 259.

Fischbach, M.A, Walsh C.T. 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev.*, 106: 3468-3496.

Flaig, W., Kutzner, H.J. 1960. Beitrag zur Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Archives für Mikrobiologie*, 35: 207–228.

Flardh, K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 564–571.

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

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

Goodfellow M., Lechevalier, M.P. 1989. Genus *Nocardia*. Edited by Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Company, 1458–1471. Baltimore, Trevisan.

Goodfellow, M. & Simpson, K. E. 1987. Ecology of *Streptomyces*. *Frontiers in Applied Microbiology*, 2: 97-125.

Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of *Actinomycetes*. *Annual Review of Microbiology*, 37: 189–216.

Goodfellow, M., Williams, E. 1986. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 4: 213-262.

Gordon, R.E. Mihm, J.M. 1957. A comparative study of some strains received as nocardiae. J. Bacteriol., 73: 15–27.

Gordon, R.E. Mihm, J.M. 1962. The type species of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol, 27: 1–10

Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz- Jimenez, C. 1999. *Actinomycetes* in Karstic caves of Northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). J. Microbiol. Methods, 3: 115–122

Halder, A.K., Mishra, A.K., Chakarbarthy, P.K. 1991. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. Ind. J. Exp. Biol., 29: 28–31.

Hall, A.N., Thomas, G. A., Tiwari, K. S., and Walker, T. K. 1953. Nutrition of *Acetobacter* species. Arch. Biochem. and Biophys, (46): 485-487.

Hayakawa, M., Ishizawa, K., Nonomura, H. 1988. Distribution of rare *Actinomycetes* in Japanese soils. J. Ferment. Technol, 66: 367–373.

Hayakawa, M., Yoshida, Y. & Iimura, Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil *actinomycetes* belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. Journal of Applied Microbiology, 96: 973-981.

Hiltunen, L. H., Weckman, A., Ylhainen, A., Rita, H., Richter, E., and Valkonen, J. P. T. 2005. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. Ann. Appl. Biol., 146: 395-403.

Hodgson, D.A. 2000 Primary metabolism and its control in *Streptomyces* a most unusual group of bacteria. Adv. Microb. Physiol., 42 :47-238.

Hoffmann, D., Hevel, J.M., Moore, R. E., Moore, B. S. 2003. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. Gene, 311: 171-180.

Hopwood, D.A. 2006. Soil togenomics: The *Streptomyces* chromosome. Annual Review of Genetics, 40: 1-23.

Hopwood, D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. Chem. Rev., 97: 2465–2497.

Hopwood, D.A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. Microbiology Uk, 145 (9): 2183–2202.

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

Ilić, S.B., Konstantinovic, S.S., Todorovic, Z.B., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., Jokovic, N., Radovanovic, B.C. 2007. Characterization and Antimicrobial Activitiy of Bioactive Metabolites in *Streptomyces* Isolates. Mikrobiologiya, 76, 421-428.

Iznaga, Y., Lemus, M., Gonzalez, L., Garmendía, L., Nadal, L. & Vallín, C. 2004. Antifungal activity of *Actinomycetes* from Cuban soils. Phytother. Res., 18: 494-496.

Izumikawa, M., Murata, M., Tachibana, K., Ebizuka, Y. and Fujii, I. 2003. Cloning of modular type I poliketide synthase gene from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus*. Bioorganic and Medicinal Chemisry, 11: 3401-3405.

Jaccard, P. 1908. Nouvelle reserches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise de. Science Naturel, 44: 223-270.

Janos, B. 2004. Bioactive Microbial Metabolites. A Personal View Received 2004, Japan Antibiotics Research Association. J. Antibiotic, (58): 1–26.

Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., Dittman, E. 2005. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. Mol. Biol. Evol. 22: 2027–2039.

Kakavas, S.J., Katz, L. and Stassi, D. 1997. Identification and characterization of the niddamycin poliketide genes from *Streptomyces caelestis*. Jounal of Bacteriology, 179 (23): 7515-7522.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, UK: John Innes Foundation

Kluge, B., Vater, J., Salnikow, J., Eckart, K. 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. FEBS Letter, 231:107-10.

Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., Marahiel, M.A. 1997. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC10716: Molecular characterization of three multi-modular peptide synthetase. *Chemistry and Biology*, 4: 927-37.

Komaki, H., Fudou, R., Iizuka, T., Nakajima, D., Okazaki, K., Shibata, D., Ojika, M. and Harayama, S. 2008. PCR detektion of type I poliketide synthase genes in *Myxobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (17): 5571-5574.

Komaki, H. and Harayama, S. 2006. Sequence diversity of type-II poliketide synthase genes in *Streptomyces*. *Actinomysotologica*, 20 (2): 42-48.

Krainsky, A. 1914. Die Actinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. Zentr Bakteriell Parasitenk. II Abt., (41) 649-688 der.

Kroken, S., Glass, N.L., Taylor, J.W., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 15670–15675.

Kutznet, H. J. 1956. Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. Dissertation, Landwirtschaftlichen Hochschule, 187. Hohenheim, Germany.

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. 2000. Rare genera of *actinomycetes* as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 399-405.

Lechevalier, M. P., Stern, A. E. and Lechevalier, H. A. 1981. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. Edited by Schaal, K. P. and Pulverer, G. In *Actinomycetes*, Gustav Fischer Verlag, 111-116. Stuttgart.

Lee, J.L., Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal *actinomycetes* in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol*, 48: 407–417.

Li, J., Zhao, G. Z., Chen, H. H., Wang, H. B., Qin, S., Zhu, W. Y., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Li, W. J. 2008. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic *Streptomyces* from pharmaceutical in rainforest. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 574-580.

Lipmann, F. 1971 Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. *Science*, 173:875-884.

Maraheil, M.A. 1997. Protein templates for the biosynthesis of antibiotics. *Chem Biol.*, 4:561-567

Martin, E.B., Adam M.B., Phillip, C.W. 2007. Genetic analysis of poliketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *J. Ind Microbiol Biotechnol*, 34: 443-456.

McCarthy, A.J., Williams, S.T. 1990. Methods for studying the ecology of *actinomycetes*. *Methods in Microbiology*, 22: 533–563.

McCarthy, A.J. ve Williams, S.T. 1992. *Actinomycetes* as agents of biodegradation in the environmental. A Review. *Gene*, 115: 189-192.

Mchenney, M.A., Hosted, T.J., Dehoff, B.S., Rosteck, P.R., Jr. Baltz, R.H. 1998. Molecular cloning and physical mapping of the daptomycingene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology*, 180:143-51.

Mehdi, R.B.A., Sioud, S., Fguira, L.F.B., Bejar, S., Mellouli, L. 2006. Purification and Structure Determination of Four Bioactive Molecules From a Newly Isolated *Streptomyces* sp. TN97 Strain. *Process Biochemistry*, 41, 1506-1513.

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

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

Mo, X., Wang, Z., Wang, B., Ma, J., Huang, H., Tian, X., Zhang, S., Zhang, C., Ju, J. 2011. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster of the bacterial RNA polimerase inhibitor tirandamycin from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO1666. 406: 341-347.

Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Yamada, K., Kinashi, H. 2003. The Large Linear Plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an Unusually Condensed Gene Organization for Secondary Metabolism. *Molecular Microbiology*, 48: 1501-1510.

Moore, B.S., Hopke, J.N. 2001. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem.*, 2: 35–38.

Moss, S.J., Martin, C.J., Wilkinson, B. 2004. Loss of co-linearity by modular polyketide synthases: a mechanism for the evolution of chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 575–593.

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

Nonomura, H. 1989. Edited by Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Company. 2545–2551. Baltimore, Trevisan.

Oskay, M.; Tamer, A. 2009. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını. *Journal of New World Science Academy*, 4: 48-60

Ostash, B. E., Ogonyan, S. V., Luzhetskyy, A. N., Bechthold, A. and Fedorenko, V. A. 2005. The use of PCR for detection genes that encode type I poliketide synthases in genomes of *actinomycetes*. *Russian Journal of Genetics*, 41 (5): 473-478.

Otsuka, M., Ichinose, K., Fujii, I. And Ebizuka, Y. 2004. Cloning, sequencing and functional analysis of an iterative type I poliketide synthase gene cluster for biosynthesis of the antitumor chlorinated polyenone neocarzilin in “*Streptomyces carzinostaticus*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (9): 3468-3476.

Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R. & Stassi, D. 2003. *Streptomyces* Genetics: A Genomic Perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (1): 1-27

Peczynska-Czoch, W. and Mordarski, M., 1988. *Actinomycetes* enzymes, Edited by Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. *Actinomycetes* in biotechnology. Academic Press, 219-283. San Diego.

Priscu, J.C., Adams, E.E., Lyons, W.B., Voytek, M.A., Mogk, D.W., Brown, R.L., McKay, C.P., Takacs, C.D., Welch, K.A., Wolf, C.F., Kirshtein, J.D., Avci, R. 1999. Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok. *Antarctica Sci.*, 286: 2141– 2144.

Rickes, E.L., Brink, N.G., Konuszy, F.r., Wood, T.R., and Folkers, K. 1948. Comparative data on vitamin B12, from liver and from anev sorce, S.griseus. Science, 148 (108): 634-635.

Ritacco, F.V., Haltli, B., Janson, J.E., Greenstein, M., Bernan, V.S. 2003. Dereplication of *Streptomyces* soil isolates and dedection of specific biosynthetic genes using an automated ribotyping instrument. J Ind Microbiol Biotechnol, 30: 472–479.

Savic, M. and Vasiljevic, B. 2006. Targetting poliketide synthase gene pool within *actinomycetes*: new degenerate primers. J. Ind. Microbiol Biotechnol, 33: 423-430.

Schroder, J., et al. 1998. Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. Biochem, 37. 8417–8425.

Sembiring, L., Ward, A. C. & Goodfellow, M. 2000. Selective isolation and characterisation of members *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. Antonie van Leeuwenhoek, 78: 353-366.

Semêdo, L., Gomes, R. C., Linhares, A. A., Duarte, G. F., Nascimento, R. P., Rosado, A. S., Margis-Pinheiro, M., Margis, R., Silva, K., Alviano, C. S., Manfio, G. P., Soares, R., Linhares, L. F. & Coelho, R. 2004. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 1323-1328.

Sigmund, J.M., Clark, D.J., Rainey, F.A. and Anderson, A.S. 2003. Detection of eubacterial 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzym A reductases from natural populations of actinomycetes. Microbiol. Ecol., 46: 106–112.

Silakowski, B., Kunze, B., Müller, R. 2001. Multiple hybrid poliketide synthase/non-robosomal peptide synthatase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantica*. Gene, 275: 233-240.

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

Sneader, W. 2005. Drug discovery: a history. Chichester: John Wiley & Sons. 468. UK

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 47: 479-491.

Staunton, J., Wiessman, K.J. 2001, Poliketide Biosynthesis: A Millennium Review. Nat. Prod. Rep., 18: 380-416

Stindl A, Keller U. 1993. The initiation of peptide formation in the biosynthesis of actinomycin. Journal of Biological Chemistry, 268:10612-20.

Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural Product from Endophytic Microorganism, Journal of Natural Products, 2004, 67, 257-268.

Suzuki, K., Nagai, K., Suzuki, Y. 1994. Search for *actinomycetes* in screening for new bioactive compounds. Actinomycetologica, 8: 122–127.

Terkina, I.A., Parfenova, V.V., Ahn, T.S. 2006. Antagonistic activity of *Actinomycetes* of Lake Baikal. Appl. Biochem. Microbiol. 42 (2): 173–176.

Todd, A.C., Tricia S., Brice P. N., Cristina C. 2006. A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. Gene, 392: 47-58

Vionis, A.P., Katsifas, E.A. ve Karagouni, A.D. 1998. Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms. Antonie van Leeuwenhoek, 73:103-115.

Yılmaz, E.İ., Kızıllı, M., Yavuz, M. 2008. Molecular Characterization of Rhizospheric Soil *Streptomyces* Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their 112 Antimicrobial Activity. World Journal of Microbiology Biotechnology, 24: 1461-1470.

Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang, F. 2009. The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes from South china sea sponges. Mar. Biotechnol, 11: 346-355.

Zhang, J.H., Quigley, N.B., Gross, D.C. 1995. Analysis of *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. Journal of Bacteriology, 177:4009-20.

Zhao, G. R., Luo, T., Zhou, Y. J., Jiang, X., Qiao, B., Yu, F. M., Yuan, Y. J. 2009. fabC of *Streptomyces lydicus* involvement in the biosynthesis of streptolydigin. Appl Microbiol Biotechnol, 83: 305-313.

Zhao, K., Penttinen P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindström, K., Zhang, L., Zhang, X., Strobel, G. A. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic *actinomisetes* isolated from medicinal plants in panxi plateau. Curr Microbiol, 62: 182-190.

Zocher, R., Madry, N., Peeters, H., Kleinkauf, H. 1984. Biosynthesis of cyclosporin A. Phytochemistry, 23:549-51.

Walsh, C.T., Wright, G. 2005. Introduction: antibiotic resistance. Chem Rev., 105(2):391-3.

Wang, Z., Crawford, D.L., Pometto, III.A.L. ve Rafii, F. 1989. Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem. Can. J. Microbiol., 35: 535-543.

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

Weber, T., Wenzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W. 2003. Exploiting the Genetic Potential of Polyketide Producing *Streptomyces*, Journal of Biotechnology, 106: 221-232.

Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J., Salmond, G.P.C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nat. Rev. Microbiol., 4:887-899.

Williams, S. T., Goodfellow, M. & Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici, Edited by Williams, S. T., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins Company, 2452-2492. Baltimore, USA.

Williams, S.T., Wellington, E.M.H. 1982. *Actinomycetes*. Edited by A.L., Miller, R.H., Keency, O.R. Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties, second ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America. 969-987. Madison.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: İsmail

Soyadı: ACER

Doğum tarihi: 04/03/1985

Doğum yeri: Mardin/Derik

Medeni hali: Bekar

Yabancı dili: İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Ortaokul: Yahya Kemal Bayatlı İlköğretim Okulu (2002)

Lise: Namık Kemal Lisesi (2004)

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