

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

**ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN
SEKONDER METABOLİT ÜRETİCİSİ AKTİNOMİSETLERİN
RİBOZOMAL OLMAYAN PEPTİD SENTETAZ (NRPS) VE
POLİKETİD SENTAZ (PKS-I) GENLERİNİN TARANMASI**

İlknur PORSUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
Haziran 2011**

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

**ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN
SEKONDER METABOLİT ÜRETİCİSİ AKTİNOMİSETLERİN
RİBOZOMAL OLMAYAN PEPTİD SENTETAZ (NRPS) VE
POLİKETİD SENTAZ (PKS-I) GENLERİNİN TARANMASI**

İlknur PORSUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
Haziran 2011**

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

İlknur PORSUK tarafından yapılan “Endemik Bitki Rizosferlerinden İzole Edilen Sekonder Metabolit Üreticisi Aktinomisetlerin Ribozomal Olmayan Peptid Sentetaz (NRPS) ve Poliketid Sentaz (PKSI) Genlerinin Taranması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

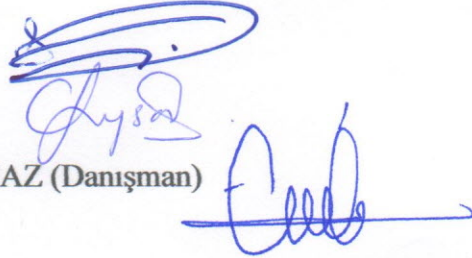
Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Fikret UYAR

Üye : Doç. Dr. Göksel KIZIL

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



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 29/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgisini, tecrübesini ve manevi desteğini benden esirgemeyen, lisans ve yüksek lisans dönemi boyunca her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında laboratuvar desteği konusunda yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Murat KIZIL'a ve Biyoorganik Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Deneyisel aşamalardaki yardımlarının yanı sıra yüksek lisans dönemi boyunca sevincimi ve üzüntümü paylaştığım değerli grup arkadaşlarım İsmail ACER, Süleyman ÖZAKIN ve Bülent BALI'ye teşekkür ederim.

Manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli dostlarım İsmet IŞIK ve Abdullah Emrah İMRE'ye teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen hayatım boyunca karşılaştığım her zorlukta yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP, Proje no: 11-FF-32) ve TÜBİTAK (Proje no: 109T843) Temel Bilimler Araştırma Grubuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
RESİM LİSTESİ	X
KISALTMALAR VE SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Genel Bilgiler.....	5
2.1.1. Aktinomisetler.....	5
2.1.1.1 Aktinomisetlerin Doğadaki Yayılışları.....	5
2.1.1.2. Aktinomisetlerin Endüstriyel Önemleri.....	6
2.1.1.3. Aktinomisetlerin Taksonomisi.....	6
2.1.2. <i>Streptomyces</i> Türlerinin Özellikleri.....	9
2.1.3. Sekonder Metabolitler.....	11
2.1.4. Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Peptidler.....	12
2.1.4.1. Ribozom Dışı Peptid Sentezi.....	14
2.1.4.2. NRPS Biyosentetik Gen Kümeleri.....	18
2.1.5. Poliketidlerin Genel Özellikleri.....	18
2.1.5.1. Poliketid Sentezi.....	20
2.1.5.2. PKS-I'lerin Biyosentetik Gen Kümeleri.....	22
2.1.6. Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin PCR Yöntemiyle Taranması..	23

2.2.	Önceki Çalışmalar.....	24
3.	MATERYAL ve METOD.....	31
3.1.	Materyal.....	31
3.1.1.	Biyolojik Materyal.....	31
3.1.2.	Kullanılan Besiyerleri.....	31
3.1.2.1.	Kromozomal DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri.....	31
3.1.2.2.	Kullanılan Diğer Besiyerleri.....	32
3.1.3.	DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.4.	Agaroz jel Elektroforezi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.5.	Kullanılan Enzimler.....	32
3.1.6.	Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Gerekli Kimyasallar.....	32
3.1.7.	Jelden DNA'nın Geri Kazanılması İçin Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.8.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.9.	Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.10.	Transformasyon ve Rekombinant Seçimi İçin Kullanılan Kimyasallar.....	34
3.1.11.	Plazmid İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar.....	34
3.1.12.	Kullanılan Cihazlar.....	34
3.2.	Metod.....	36
3.2.1.	Organizmaların Üretilmesi.....	36
3.2.2.	Kromozomal DNA İzolasyonu.....	36
3.2.3.	NRPS Genlerinin Adenilasyon Domaininin PCR ile Amplifikasyonu.....	37
3.2.4.	PKS-I Genlerinin Ketosentaz Domaininin PCR ile Amplifikasyonu.....	37
3.2.5.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.2.6.	Jelden PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması.....	38
3.2.7.	<i>E. coli</i> DH5- α Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	38
3.2.8.	PCR Ürünlerinin Ligasyonu.....	38
3.2.9.	Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu.....	39

3.2.10.	Plazmid İzolasyonu.....	39
3.2.11.	DNA Dizi Analizi.....	39
3.2.12	Biyoinformatik İncelemeler.....	39
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	41
4.1.	Bulgular.....	41
4.1.1.	Kullanılan Mikroorganizmaların Morfolojik Özellikleri.....	41
4.1.2.	Kromozomal DNA'ların Jelde İncelenmesi.....	46
4.1.3.	NRPS ve PKS-I Genlerinin Bakterilerin Genomlarında Taranması.....	46
4.1.3.1.	NRPS Genlerinin Taranması.....	46
4.1.3.2.	PKS-I Genlerinin Taranması.....	50
4.1.4.	Klonlama.....	56
4.1.4.1.	NRPS Genlerinin Pütatif Adenilasyon Domainlerinin Klonlanması.....	56
4.1.4.2.	PKS-I Genlerinin Pütatif Ketosentaz Domainlerinin Klonlanması.....	59
4.1.5..	Biyoinformatik İncelemeler.....	60
4.1.5.1.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 NRPS Kütüphanesinin İncelenmesi	60
4.1.5.2.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17 PKS-I Kütüphanesinin İncelenmesi	61
4.2.	Tartışma.....	62
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
6.	KAYNAKLAR.....	67
	ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÖZET

ENDEMİK BİTKİ RİZOSFERLERİNDEN İZOLE EDİLEN SEKONDER METABOLİT ÜRETİCİSİ AKTİNOMİSETLERİN RİBOZOMAL OLMAYAN PEPTİD SENTETAZ (NRPS) VE POLİKETİD SENTAZ (PKS-I) GENLERİNİN TARANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur PORSUK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Biyolojik aktiviteye sahip olan doğal sekonder metabolitler günümüzde ilaç keşfi için vazgeçilmez kaynaklardır. Bilinen mikrobiyal metabolitlerin % 60'dan fazlası aktinomisetler tarafından üretilmekte olup *Streptomyces* cinsinin üyeleri, en verimli sekonder metabolit üreticisidirler. Bu yapısal çeşitliliğe sahip metabolitler arasında antibiyotikler, antitümör ajanlar, antihelmintikler ve immünbaskılayıcı ajanlar bulunmaktadır. Biyolojik aktiviteye sahip poliketid ve peptid bileşiklerinin çoğu ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) ve poliketid sentazlar (PKS-I) tarafından sentezlenmektedir. NRPS ve PKS-I'ler mikroorganizmalar tarafından üretilen önemli biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının sentezinde gerekli olan biyosentetik sistemlerdir.

NRPS ve PKS-I genlerini PCR yöntemiyle taramayı amaçladığımız projemizde 3 endemik bitkinin kök çevresi topraklarından izole edilmiş ve moleküler teşhisleri yapıp antimikrobiyal özellikleri belirlenmiş olan 15 *Streptomyces* türünün kromozomal DNA'ları izole edildi. NRPS ve PKS-I genleri, dejenere primerler kullanılarak PCR yoluyla çoğaltıldı. NRPS geni açısından organizmaların tümünde, PKS-I geni açısından ise 15 izolatın 12'sinde amplifikasyon elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri uygun vektörlere klonlanarak *Streptomyces* sp. CS41 için NRPS, *Streptomyces* sp. CA17 için PKS-I mini gen kütüphaneleri kuruldu. Kütüphanelerden seçilen klonların DNA dizi analizlerine göre *Streptomyces* sp. CS41 izolatının 6 farklı NRPS geni A domaini içerdiği, *Streptomyces* sp. CA17 izolatının ise 1 adet PKS-I geni KS domaini içerdiği tespit edildi. BLASTx analizinde, *Streptomyces* sp. CS41 izolatındaki 6 gruptan 4'ünün, şimdiye kadar rapor edilen *Streptomyces* türlerinin NRPS genleri ile % 70'in altında homoloji gösterdiği tespit edildi. Bu sebeple, bahsedilen klonların yeni antibiyotik gen kümelerine ait olabileceği düşünüldü. Önümüzdeki çalışmalarda; hibridizasyon çalışmaları ile genom taranarak bu gen kümelerine ulaşılmaya çalışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: NRPS, PKS-I, Biyoaktif Sekonder Bileşik, PCR, *Streptomyces*.

ABSTRACT

SCREENING OF NRPS AND PKS-I GENES FROM SECONDARY METABOLITE PRODUCER ACTINOMYCETES WHICH WERE ISOLATED FROM RHIZOSFERIC SOILS OF TURKISH ENDEMIC PLANTS

MsC THESIS

İlknur PORSUK

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

2011

Natural products are biological functionality and they are indispensable for drug discovery. Over 60% of the known microbial metabolites are produced by members of the order Actinomycetales, and the genus *Streptomyces* is reported as the most prolific producer of secondary metabolites. These structurally diverse metabolites include among antibiotics, antifungals, antitumor agents, antihelmintics and immunosuppressive agents. A broad range of biologically active peptide and polyketide compounds are synthesized by nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS-I), respectively. NRPS and PKS-I are biosynthetic systems involved in the synthesis of a large number of important biologically active compounds produced by actinomycetes.

15 *Streptomyces* strains were previously isolated from rhizospheric soils of three Turkish endemic plants, identified, and antimicrobial activities were determined. In this study, NRPS and PKS-I genes were screened by using PCR approach in these local isolates. NRPS and PKS-I genes were amplified by degenerate PCR primers by using chromosomal DNAs from these isolates as templates. NRPS sequences were detected in all of the isolates while PKS-I sequences in 12 out of 15 the isolates. Putative NRPS and PKS-I fragments were cloned and mini libraries were constituted for NRPS and PKS-I from *Streptomyces* sp. CS41 and *Streptomyces* sp. CA17, respectively. According to BLAST analysis 6 different A domain belong to NRPS genes were detected in *Streptomyces* sp. CS41. It was observed that four domains of these have low homology below 70 % when compared to other NRPS genes reported so far. It was also determined that *Streptomyces* sp. CA17 has only one type PKS-I gene. It can be concluded that genes obtained from this study may be candidate new genes that are responsible for new bioactive compounds. This idea will be approved by hybridization studies in the genome of isolates in future works.

Key Words: NRPS, PKS-I, Bioactive secondary metabolites, PCR, *Streptomyces*

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler	7
Çizelge 2.2.	Actinomycetales takımının taksonomik sınıflandırılması	8
Çizelge 2.3.	Ribozom dışı yolla sentezlenen bazı biyoaktif peptidler ve etkileri	13
Çizelge 2.4.	Aktinobakteriler tarafından üretilen bazı poliketid bileşikler	18
Çizelge 4.1.	<i>Streptomyces</i> türlerinin M2 besiyerinde 5 gün üretildikten sonraki morfolojik özellikleri	41
Çizelge 4.2.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 izolatının NRPS kütüphanesinden seçilen klonların BLASTn sonuçları	60
Çizelge 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 izolatının NRPS kütüphanesinden seçilen klonların BLASTx sonuçları	60
Çizelge 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17 izolatının PKS-I kütüphanesinden seçilen klonların BLASTn sonuçları	61
Çizelge 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17 izolatının PKS-I kütüphanesinden seçilen klonların BLASTx sonuçları	61

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	<i>Streptomyces</i> ' ların hayat döngüsü	10
Şekil 2.2.	ACV (penisilin öncüsü)	13
Şekil 2.3.	Basitrasin	14
Şekil 2.4.	Gramisidin S	14
Şekil 2.5.	Ribozom dışı yolla gerçekleşen peptid sentezinin aşamaları	16
şekil 2.6.	Eritromisin	19
Şekil 2.7.	Rapamisin	19
Şekil 2.8.	Daunomisin	19
Şekil 2.9.	Poliketid sentezinin aşamaları	21
Şekil 2.10.	PKS-I'ın genel modül yapısı	22
Şekil 2.11.	DEBS (6-deoxyerythronolide B synthase) proteininin domain organizasyonu	23
Şekil 3.1.	Pgem-T vektör haritası	33
Şekil 4.1.	Bu çalışmada kullanılan 15 <i>Streptomyces</i> türünün, 16S rRNA genlerine göre çizilen, beraber izole edilen diğer türler ve <i>Streptomyces</i> gruplarını temsil eden organizmalar ile oluşturulmuş filogenetik ağaç	45
Şekil 4.2.	İzole edilen kromozomal DNA'lar	46
Şekil 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. CA12 izolatından elde edilen elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini	47
Şekil 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. AR12 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini	47
Şekil 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. AA58 ve <i>Streptomyces</i> sp. AAH66 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini	48
Şekil 4.6.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini	48
Şekil 4.7.	<i>Streptomyces</i> sp. AR3, <i>Streptomyces</i> sp. AS36, <i>Streptomyces</i> sp. ASH47, <i>Streptomyces</i> sp. BA11, <i>Streptomyces</i> sp. BAH26 ve <i>Streptomyces</i> sp. BS29 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS	49

adenilasyon domainleri

Şekil 4.8.	<i>Streptomyces</i> sp. BS44, <i>Streptomyces</i> sp. CA17 ve <i>Streptomyces</i> sp. CA24 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domainleri.	49
Şekil 4.9.	<i>Streptomyces</i> sp. AS28 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini	50
Şekil 4.10.	<i>Streptomyces</i> sp. CA12 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	51
Şekil 4.11.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	51
Şekil 4.12.	<i>Streptomyces</i> sp. AA58 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	52
Şekil 4.13.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	53
Şekil 4.14.	<i>Streptomyces</i> sp. BA11 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	53
Şekil 4.15.	<i>Streptomyces</i> sp. BAH26 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.	53
Şekil 4.16.	<i>Streptomyces</i> sp. CA24 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.	54
Şekil 4.17.	<i>Streptomyces</i> sp. AR3, <i>Streptomyces</i> sp. AS36, <i>Streptomyces</i> sp. ASH47, <i>Streptomyces</i> sp. BS29 izolatlarından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.	55
Şekil 4.18.	<i>Streptomyces</i> sp. AS28 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini	55
Şekil 4.19.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41 izolatı adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.	56
Şekil 4.20.	<i>Streptomyces</i> sp. AA58 izolatı adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.	57
Şekil 4.21.	<i>Streptomyces</i> sp. BA11 izolatı adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler	58
Şekil 4.22.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17 izolatı KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.	59

RESİM LİSTESİ

<u>Resim No</u>		<u>Sayfa</u>
Resim 4.1.	<i>Streptomyces</i> sp. AA58'in M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.2.	<i>Streptomyces</i> sp. AAH66'nın M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.3.	<i>Streptomyces</i> sp. AR3'ün M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.4.	<i>Streptomyces</i> sp. AS28'in M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.5.	<i>Streptomyces</i> sp. AR12'nin M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.6.	<i>Streptomyces</i> sp. AS36'nın M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	42
Resim 4.7.	<i>Streptomyces</i> sp. ASH47'nin M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.8.	<i>Streptomyces</i> sp. BA11'in M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.9.	<i>Streptomyces</i> sp. BAH26'nın M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.10.	<i>Streptomyces</i> sp. BS29'un M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.11.	<i>Streptomyces</i> sp. BS44'ün M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.12.	<i>Streptomyces</i> sp. CA12'nin M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	43
Resim 4.13.	<i>Streptomyces</i> sp. CA17'nin M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	44
Resim 4.14.	<i>Streptomyces</i> sp. CA24'ün M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	44
Resim 4.15.	<i>Streptomyces</i> sp. CS41'in M2 Katı Besiyerindeki Görünümü	44

KISALTMALAR ve SİMGELER

A: Adenilasyon

ACP: Açıl Taşıyıcı Protein

AT: Açıltransferaz

ATP: Adenozintrifosfat

BFB : Brom fenol blue

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bç: Baz Çifti

C: Kondensasyon

°C: Santigrat Derece

DH: Dehidrataz

DMF: Dimetilformamid

DNA: Deoksiribonükleik asit

ER: Enoilredüktaz

EtOH : Etanol

EDTA : Etilendiamintetrasetik asit

EtBr : Etidyumbromür

FAS: Yağasidi Sentaz

g : Gram

GC: Guanin/Sitozin

IPTG: İsopropil-β-D-Thiogalactoside

kDa: Kilodalton

KR: Ketoredüktaz

KS: Ketosentaz

L : Litre

LB: Luria Broth

L-DAP: L-diaminopimelik asit

mm : Milimetre

mM: Milimolar

M : Molarite

Mb: Megabaz

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

NRPS: Non-ribozomal Peptid Sentetaz

ng: Nanogram

O.D: Optik Dansite

PCP: Peptid Taşıyıcı Protein

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PK: Poliketid

PKS: Poliketid sentaz

rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit

R: Ribozom

RNA: Ribonükleik asit

rpm : (revolution per minute) Dakikadaki devir sayısı

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TAE: Tris-baz Asetik Asit EDTA

TE: Tiyoesteraz

TLC : İnce Tabaka Kromatografisi

Tm: Erime Sıcaklığı

TSB : Tryptone Soya Broth

U: Ünite

UV : Ultraviyole

YEME: Maya Özütü-Malt Özütü

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

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

μm : Mikrometre

μM : Mikromolar

1. GİRİŞ

Doğal ürün terimi genel anlamda biyolojik moleküller için kullanılan bir terimdir. Doğal ürünlerin en önemli grubunu teşkil eden sekonder metabolitler kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı diğer makromoleküllerden ayrılırlar (Cannell 1998).

1983-1994 yılları arasında keşfedilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal kaynaklıdır. 23.000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si funguslar, % 16'sı ise diğer bakteri türlerince üretilmektedir (Oskay ve Tamer 2009). Mikrobiyal doğal ürünlerden elde edilen ve 1981'den beri rapor edilen yeni kimyasal bileşiklerin % 40'ından fazlası öncü ilaç bileşiği için uygun kaynaklardır (Newman ve ark. 2003). Bu ürünler ilaç potansiyelleri sebebiyle insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Antimikrobiyallerin tedavi amaçlı aşırı miktarda ve gelişigüzel kullanımı birçok bakteri türünün mevcut ilaçlara karşı dirençlilik geliştirmesine yol açmaktadır (Sosio ve ark. 2000). Son yıllarda hızlı bir şekilde antibiyotiklere dirençli türlerin ortaya çıkmasından dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir (Aghighi ve ark. 2004). Özellikle hastane enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecalis*'den *Staphylococcus aureus*'a kadar birçok patojenik bakterinin şu anda kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (Mehdi ve ark. 2006). 1980 yılından önce metisilin dirençli *S. aureus* oranı % 3'ten azken bu oran son zamanlarda % 40'ın üzerine çıkmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalardan izole edilen *Streptococcus pneumoniae*'ların % 34'ünün penisiline, *Hemophilus influenzae*'ların % 32'sinin ampisiline, *Moraxella catarrhais*'lerin ise % 92'sinin penisilin ve eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur (İkeda ve ark. 2003).

Bu nedenle son yıllarda biyoaktif doğal ürünlerle ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. *Streptomyces* cinsini de içeren aktinomisetler, biyolojik aktiviteye sahip doğal ürünlerin vazgeçilmez kaynaklarıdır (Omura ve ark. 2001). Herbir aktinomiset türünün genetiksel olarak 10-20 arasında sekonder metabolit üretme potansiyelinden dolayı (Donadio ve ark. 2002) farklı habitatlardan izole edilen *Streptomyces* türlerinde yeni metabolitlerin bulunma ihtimali artmaktadır.

Mikrobiyal kültür örneklerinin aktiviteye dayalı geleneksel yöntemlerle taranması, birçoğu farmasötik olarak kullanılan yeni biyoaktif bileşiklerin keşfine yol açmıştır. Bununla beraber son yıllarda, aktinomisetlerden yeni biyoaktif bileşiklerin keşif hızında düşüş görülmektedir. Bu azalmanın sebeplerinden biri, klasik kültür koşullarında sentezlenemeyen veya kimyasal tarama metodları ile tespit edilemeyecek kadar az üretilen bileşiklerin bulunmasıdır. Bu problemin üstesinden gelebilmek için tarama sistemlerinin yeni ve geliştirilmiş yaklaşımlara ihtiyacı vardır (Komaki ve ark. 2009). Yeni antibiyotiklerin taranması doğrultusundaki çalışmalar, farklı habitatlardan yeni *Streptomyces* türlerinin biyoaktif sekonder metabolitlerin sentezinde görevli olan genlerinin taranması ile standart fermentasyon koşullarında üretimi başarısızlıkla sonuçlanmış olan biyoaktif metabolitlerin genom analizleri ile ortaya çıkarılması ve doğrudan rasyonel yaklaşımlarla yeni biyoaktif doğal bileşiklerin tespiti, ekspresyonu ve saflaştırılması gibi stratejilerle lokal türlerin genetiksel potansiyellerini ortaya çıkarmak açısından önem arz etmektedir.

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 (PKS-I) ve aromatik (PKS-II) Poliketid Sentazlar, hidroksimetilglutaril koenzimA redüktazlar ve aminoglikozit dirençlilik genleri olup, özellikle PKS-I ve NRPS genleri şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğunun yapısını oluşturmaktadırlar (Barrios-Llerena ve ark. 2007). NRPS ve PKS'lerin; antibiyotikler, toksinler, sideroforlar ve immünbaskılayıcılar gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Ehrenreich ve ark. 2005). PKS'ler, farmasötik ve endüstriyel öneme sahip biyoaktif bileşikleri içeren poliketid bileşiklerin biyosenteziyle ilişkili olan multienzim kompleksleridir (Moffitt ve Neilan. 2002). Global ölçekte büyük sıklıkta kullanılan antibiyotiklerin bir çoğu (örneğin eritromisinA) PKS'ler tarafından üretilmektedir (Ehrenreich ve ark. 2005). Dejenere PCR primerleri ile NRPS, PKS-I ve PKS-II aktinomiset dizilerinin hedef alınması bu metabolitlerin tespiti için hızlı bir yaklaşımdır (Gonzales ve ark. 2005). Son moleküler yaklaşımlar, oldukça fazla sayıda kriptik PKS genlerinin bulunduğunu göstermiştir. Örneğin; genom projesi tamamlanmış *Streptomyces coelicolor* türünün, fonksiyonu bilinmeyen fazla sayıda PKS genlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Bentley ve ark. 2002). Bu çalışmaların

yanısıra, genom projeleri tamamlanmış *Streptomyces*'lerin kültür ortamında ürettiklerinden çok daha fazla miktarda NRPS ve PKS genlerine sahip olduğu saptanmıştır (Ehrenreich ve ark., 2005). Bundan dolayı *Streptomyces*'lerin, şimdiye kadar tanımlanmamış poliketid ve peptid bileşikleri üretebilme olasılığı büyüktür. Organizmalarda yeni PKS ve NRPS genlerinin varlığı yeni poliketid ve peptidlerin üretimi için iyi ipuçları verebileceği için, PKS ve NRPS genlerinin sekanslanması yeni poliketid ve peptidlerin keşfi için bir tarama metodu olarak kullanılır (Zazopoulus ve ark. 2003, Ayuso ve ark. 2005, Komaki ve ark. 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1 Aktinomisetler

Aktinomiset terimi *aktis* (ışın demeti) ve *mykes* (mantar) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur ve bu terim organizmaların morfojileri dikkate alınarak verilmiştir (Liman 2007). Aktinomisetler Gram (+) organizmalardır. Bununla birlikte morfolojileri ve yüksek G+C oranına sahip olmaları onları diğer bakterilerden ayıran önemli özellikleridir. Onların tipik özellikleri filamentli misellere sahip olmalarıdır ve aktinomisetlerin çoğu kolayca tespit edilebilen ve havaya kolayca dağılabilen sporlar üretirler (Lacey 1997). Aktinomisetlerin sıvı ya da toprak ortamındaki büyümesi koloni şeklindedir. Aktinomisetler, substrat (vejetatif) ve hava miselleri olmak üzere iki tip misel üretir.

Vejetatif miselin jel benzeri parlak bir görünümü vardır. Miselin rengi sarı, pembe, kırmızı, turuncu, yeşil ve kahverenginin yanı sıra krem veya beyazımsı olabilir. Buna ek olarak suda çözünen pigmentler de üretilir. Bu pigmentlerin rengi kahverengi veya daha koyudur.

Aktinomisetlerin çoğunda özellikle *Streptomyces* cinsinde vejetatif miseller farklılaşarak hava misellerini oluşturur. Hava miselleri pamuksu ya da toz gibi görünen spor formuna dönüşebilirler (Waksman 1950).

2.1.1.1 Aktinomisetlerin Doğadaki Yayılışları

Aktinomisetlerin yaşama alanları ile ilgili ekolojik çalışmalar onların keşfi açısından önemlidir. Aktinomisetlerin mevcudiyetleri, dağılışları ve çeşitliliklerinin; hayvanlar (Zheng ve ark. 2000), bitkiler (Wohl ve Mcarthur 1998), mağaralar (Groth ve ark. 1999), denizler (Takizawa ve ark. 1993), bataklıklar (Suzuki ve ark. 1994), çeltik tarlaları ve dağ ormanları (Hayakawa ve ark.1988) gibi onların bulundukları çeşitli ekolojik habitatlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bunlar arasında aktinomisetler için en önemli habitat topraktır (Lee ve Hwang 2002).

Sıcaklık, toprak bitki örtüsü, nem içeriği, tuzluluk, organik maddenin miktarı topraktaki aktinomiset popülasyonunu etkileyen önemli faktörlerdir (Waksman 1967,

McCarthy ve Williams 1990). Çoğu toprak aktinomisetleri optimum büyümeyi nötral pH'ya yakın pH aralıklarında göstermekle birlikte, pH 5.0-9.0 gibi geniş bir aralıkta büyüme gösterebilirler (Goodfellow ve Williams 1983). Bununla birlikte pH 3.5-6.5 gibi bir aralıkta büyüme gösterebilen asidofilik *Streptomyces*'lar ise asidik topraklarda yaygın olarak dağılışı göstermektedirler (Kahn ve Williams 1975, Hagedorn 1976). Organik maddece zengin topraklarda aktinomisetler yaygın bir büyüme gösterirler. Henis (1986) topraktaki organik madde düzeyi ile aktinomiset miktarının pozitif yönde uyumluluk gösterdiğini belirtmiştir.

2.1.1.2. Aktinomisetlerin Endüstriyel Önemleri

Aktinomisetler; antibiyotikler, enzimler, bitki büyüme faktörleri, alkaloidler ve vitaminler gibi yüksek ticari değeri olan biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin en cazip kaynaklarıdır (Omura 1986). Doğada bulunan antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisi aktinomisetlerden izole edilmiştir. Aktinomisetler farklı kimyasal sınıflara ve biyolojik aktiviteye sahip antibiyotikleri üretme yeteneğindedirler (Okami ve Hotta 1988). Çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler Çizelge 2.1'de verilmiştir (Berdy 2005).

2.1.1.3. Aktinomisetlerin Taksonomisi

Gram pozitif bakteriler iki önemli kola ayrılırlar: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Streptococcus* cinsleri gibi düşük oranda G+C içeriğine sahip organizmalar ile aktinomisetler gibi yüksek oranda G+C içeriğine sahip organizmalar (Kieser ve ark. 2000). Aktinomisetleri tanımlamak için kullanılan önemli yöntemlerden biri de 16S ribozomal RNA analizidir. 16S rRNA'ları dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada aktinomisetler 13 alt takıma ayrılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler (Berdy 2005).

<i>Streptomycetaceae</i>	Miktar	<i>Thermomonosporaceae</i>	Miktar
<i>Streptomyces</i>	~ 8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
		<i>Microbiospora</i>	54
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Actinosynnema</i>	51
		<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Chainia</i>	30	<i>Microtetrastroma</i>	21
		<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
		<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Nocardioidea</i>	9	<i>Thermopolyspora</i>	1
		<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Micromonosporaceae</i>	Miktar	<i>Mycobacteriaceae</i>	Miktar
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Nocardia</i>	357
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Anpullariella</i>	9	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Catellatospora</i>	1		
<i>Pseudonocardiaceae</i>	Miktar	Diğer türler	Miktar
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycolopsis/Nocardia</i>	120/357	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Frankia</i>	7
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Westerdykella</i>	6
<i>Amycolata</i>	12	<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Sebekia</i>	3
<i>Streptosporangiaceae</i>	Miktar	<i>Elaktomyces</i>	3
		<i>Excelsospora</i>	3
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Alkalomyces</i>	1
		<i>Catellatospora</i>	1
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Erythrosporangium</i>	1
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Streptoplanospora</i>	1
<i>Planobispora</i>	10	<i>Microechinospora</i>	1
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Salinospora</i>	1
<i>Planomonospora</i>	2	<i>Waksmania</i>	3

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.2. Actinomycetales takımının taksonomik sınıflandırılması (<http://www.ncbi.nlm.nih/> 2011).

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

Çizelge 2.2. Devamı

Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kibdelosporium</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Saccarothrix</i> , <i>Streptoalloteichus</i> , <i>Thermocrispum</i> .
Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
Streptosporangineae	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium</i> , <i>Herbidospira</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i>
	Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i>
	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>

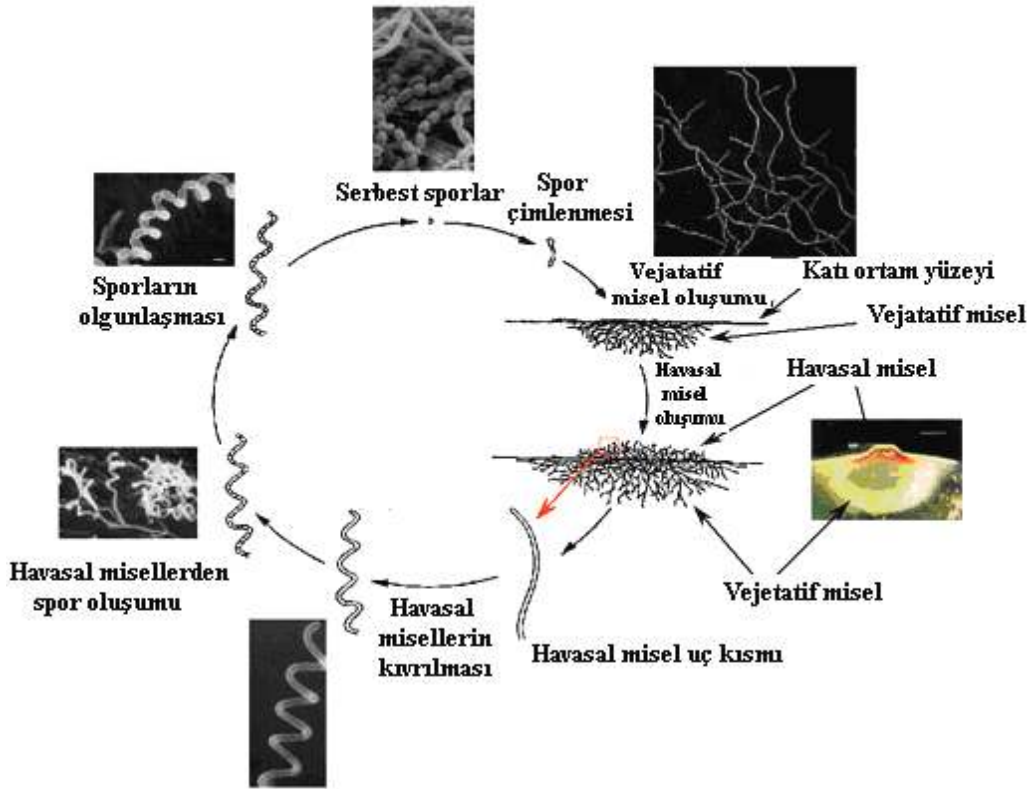
2.1.2. *Streptomyces* Türlerinin Özellikleri

Streptomyces cinsi *Actinobacteria* sınıfı içerisinde *Actinomycetales* ordosuna ait Gram pozitif aerobik bakterilerdir (Stackebrandt ve ark. 1997). DNA'ları % 67- 78 oranında G+C içeriğine sahiptir (Korn-Wendisch ve Kutzner, 1992). Peptidoglikan tabakasında di aminoasit olarak diaminopimelik asidin LL izomeri bulunur. *Streptomyces*'lar doğada her yerde bulunabilirler. Toprakta koloniler halinde vejetatif hifleri ile gelişirler ve sporlarıyla yayılarak yaşamlarını sürdürebilirler. Sporlar yaşam döngülerinde yarı uyku (semi dormant) haldedir ve toprakta uzun süre bu şekilde yaşayabilirler (Mayfield ve ark. 1972, Ensign 1978). Hatta 70 yıllık toprak örneklerinden kazanılmış kültürler bulunmaktadır (Morita 1985). Sporlar düşük besin ve su kıtlığına karşı dirençliyen misel oluşturdıkları aşamada hücre bu durumlara karşı oldukça hassastır (Karagouni ve ark. 1993). Aktinomisetler birçok ekstraselüler enzim üretirler. Bu sayede topraktaki ölü bitki hayvan ve fungal materyallerdeki polimerlerin ayrışması sağlanır (McCarthy 1987). Bu nedenle toprak biyodegradasyonunda önemlidirler (McCarthy ve Williams 1992). Bunun yanı sıra saman gibi çok kompleks materyallerin yıkımında önemi olan; ksilanaz, amilaz, selülaz, maltaz gibi. enzimler de *Streptomyces*'lar tarafından salgılanmaktadır (Kieser ve ark. 2000). Bu nedenle *Streptomyces*'lar biyoteknolojik açıdan önemli organizmalardır.

Streptomyces'lar kompleks bir yaşam döngüsüne sahiptirler. *Streptomyces* 'ların yaşam döngüsü Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Hayat döngüsü sporların uygun germinasyon

2. KAYNAK ÖZETLERİ

koşulunda germ tüplerini oluşturmasıyla başlar. Bu tüplerin dallanması sonucu substrat miseli oluşur (Chater ve Losick 1996). Besin yetersizliği ve diğer fizyolojik stres durumlarında substrat miseli farklılaşarak hava miselini meydana getirirler. Bu stres koşullarında hava miselinin yanı sıra sekonder metabolitler de salgılanır. Farklılaşmanın bir sonraki adımında ise hava misellerinden bölmelerin oluşmasıyla karakteristik uzun artrospor zincirleri meydana gelir (Weber ve ark. 2003). Henüz tanımlanmayan bir sinyal yardımıyla sporlar yeniden germine olmaya başlarlar (McBride ve ark. 1987).



Sekil 2.1. *Streptomyces*'lerin Hayat Döngüsü

Streptomyces'ler lineer kromozoma sahip bakterilerdir (Paradkar ve ark. 2003). Lineer kromozoma sahip olma durumu ilk kez genom projeleri biten *Streptomyces lividans*'da (Lin ve ark. 1993, Huang ve ark. 1998) ve *Streptomyces coelicolor*'da

görülmüştür (Kieser ve ark. 1992). *Streptomyces*'ların genom büyüklüğü yaklaşık olarak 8 Mb'dir (Lin ve ark. 1993, Huang ve ark. 1998). Kromozomun sonunda uzunluğu 20 ile 550 Kb arasında değişen terminal ters tekrarlar bulunur. Bu ters tekrarlara terminal proteinler olarak bilinen proteinler kovalent olarak bağlanır (Lin ve ark. 1993).

Streptomyces cinsi üyeleri en iyi bilinen antibiyotik ve biyoaktif sekonder metabolit üreticisidirler. Bilinen mikrobiyal ürünlerin üçte ikisi aktinomisetler tarafından ve bunların yaklaşık % 80'i *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından üretilmektedir. Aktinomisetlerin dikkat çekici özelliklerinden biri de farklılaşmayla koordineli bir şekilde düzenlenen ve eş zamanlı gerçekleşen sekonder metabolit üretimidir. Eritromisin, tetrasiklin gibi antibiyotikler, daunorubisin gibi antitümör ajanlar, rapamisin gibi immün baskılayıcı ve avermektin gibi antihelmintikler bu sekonder metabolitlerden sadece birkaç tanesini oluşturmaktadır (Chater 1993).

2.1.3. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumu ile karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin özelliği organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Bununla birlikte savunma, hücreler arası haberleşme, farklılaşma gibi fonksiyonlar üstlenirler. (Vining 1990). Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu çeşitli görevlerin yanı sıra sekonder metabolitler; antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünbaskılayıcı antilipolitik ajan gibi çok çeşitli fonksiyonlara sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Monaghan ve Tkacz 1990).

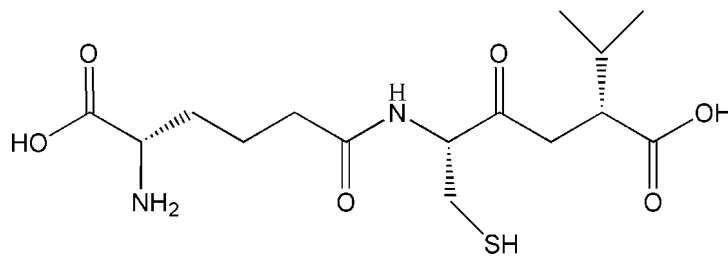
Sekonder metabolitler primer metabolizma sonucu oluşan metabolik ara ürünlerden veya onların son ürünlerinden sentezlenirler. Molekül ağırlıkları 3000 dalton küçük olup kimyasal yapı olarak oldukça çeşitlilik gösterirler. Sekonder metabolitler çok çeşitli türlerde farklı cinslerde veya familyalarda bulunabilir (Herbert 1989). Bitkiler, bakteriler ve mantarlar önemli sekonder metabolit üreticisidirler. Bilinen mikrobiyal sekonder metabolitlerin üçte ikisi aktinomisetler tarafından ve bunların % 80'i *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından sentezlenmektedir (Kieser ve ark. 2000). Poliketidler, peptid antibiyotikler, terpenler, steroidler, alkaloidler doğada yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (Herbert 1989).

2.1.4. Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Peptidler

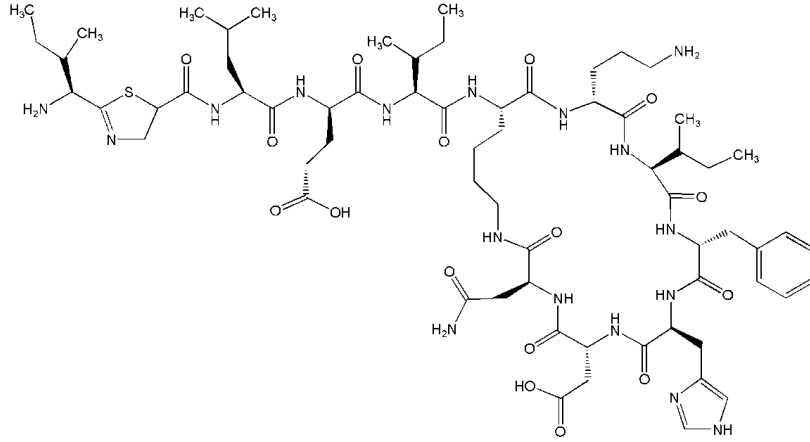
Mikrobiyal peptidler biyolojik aktiviteye sahip bilinen bileşikler arasında en önemli grubu oluşturmaktadır. Mikrobiyal peptidler arasında önemli yere sahip olan peptid antibiyotikler son yıllarda immün baskılayıcı, sitotoksik, antimikrobiyal, antitümör tedavisi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Katz ve Demain 1977, Demain, 1980). Biyoaktif peptidlerin üretimi ile ilgili iki çeşit mekanizma önerilmiştir. Biyolojik aktiviteye sahip oligo ve polipeptid yapısındaki sekonder metabolitlerden bir kısmı ribozomal protein sentez sistemi tarafından üretilir. Bu sistem diğer bütün proteinlerin sentezinde kullanılan ribozomal mekanizma yardımıyla, bütün diğer proteinlerde bulunan standart aminoasitlerden oluşan yapıları üretir. Ribozomal mekanizmayla oluşan polipeptid translasyon sonrasında modifiye edilir (Büber ve Açıan 2004). Biyoaktif peptidlerin büyük çoğunluğunun sentezlenmesinde etkin olan “tiyotemplate mekanizması” olarak bilinen ikinci mekanizmada ise biyoaktif peptidler ribozom dışı yolla sentezlenir (Weber ve Marahiel 2001). Ribozom dışı yolla sentezlenen peptid metabolitler önemli derecede aktivite göstermekte olup farmasötik alanda büyük öneme sahiptir. Ribozom dışı yolla sentezlendiği gösterilen ilk peptidler gramisidin S ve tirosidin’dir (Roskoski ve ark. 1970, Gevers ve ark. 1978). Bunu takip eden yıllarda değişik farmakolojik etkilere sahip olan çok sayıda peptidin bu yolla sentezlendiği gösterilmiştir. Çizelge 2.3’de ribozom dışı yolla sentezlenen peptidlerin bir kısmı listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Ribozom dışı yolla sentezlendiği gösterilen bazı peptidler ve etkileri (Büber ve Açıan 2004).

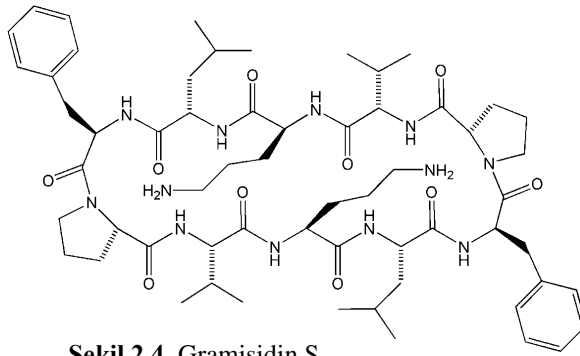
Peptid	Organizma	Etki
ACV (Şekil 2.2)	<i>Bacillus subtilis</i>	Penisilin ve sefalosporin öncülü
Aktinomisin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Antibiyotik
Basitrasin (Şekil 2.3)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Antibiyotik
Bialafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbisit
Bleomisin	<i>Streptomyces verticillus</i>	Antitümöral
Daptomisin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Antibiyotik
Enniyatin	<i>Fusarium oxysporum</i>	Antihelmintik
Eksokelin	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Siderofor
Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Biyosülfaktan, antimikrobiyal ve antiviral
Gramisidin S (Şekil 2.4)	<i>Bacillus brevis</i>	Antibakteriyel
Lovastatin	<i>Aspergillus terreus</i>	Antilipolitik
Pristinamisin I	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Antibiyotik
Siklosporin	<i>Tolypocladium niveum</i>	İmmünsüpresif
Siringomisin	<i>Pseudomonas syringae</i>	Antifungal, antimikobakteriyel
Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i>	Sülfaktan, antibakteriyel, antitümöral
Tirozidin	<i>Bacillus brevis</i>	Antibiyotik



Şekil 2.2. ACV (Penisilin öncüsü)



Şekil 2.3. Basitrasin



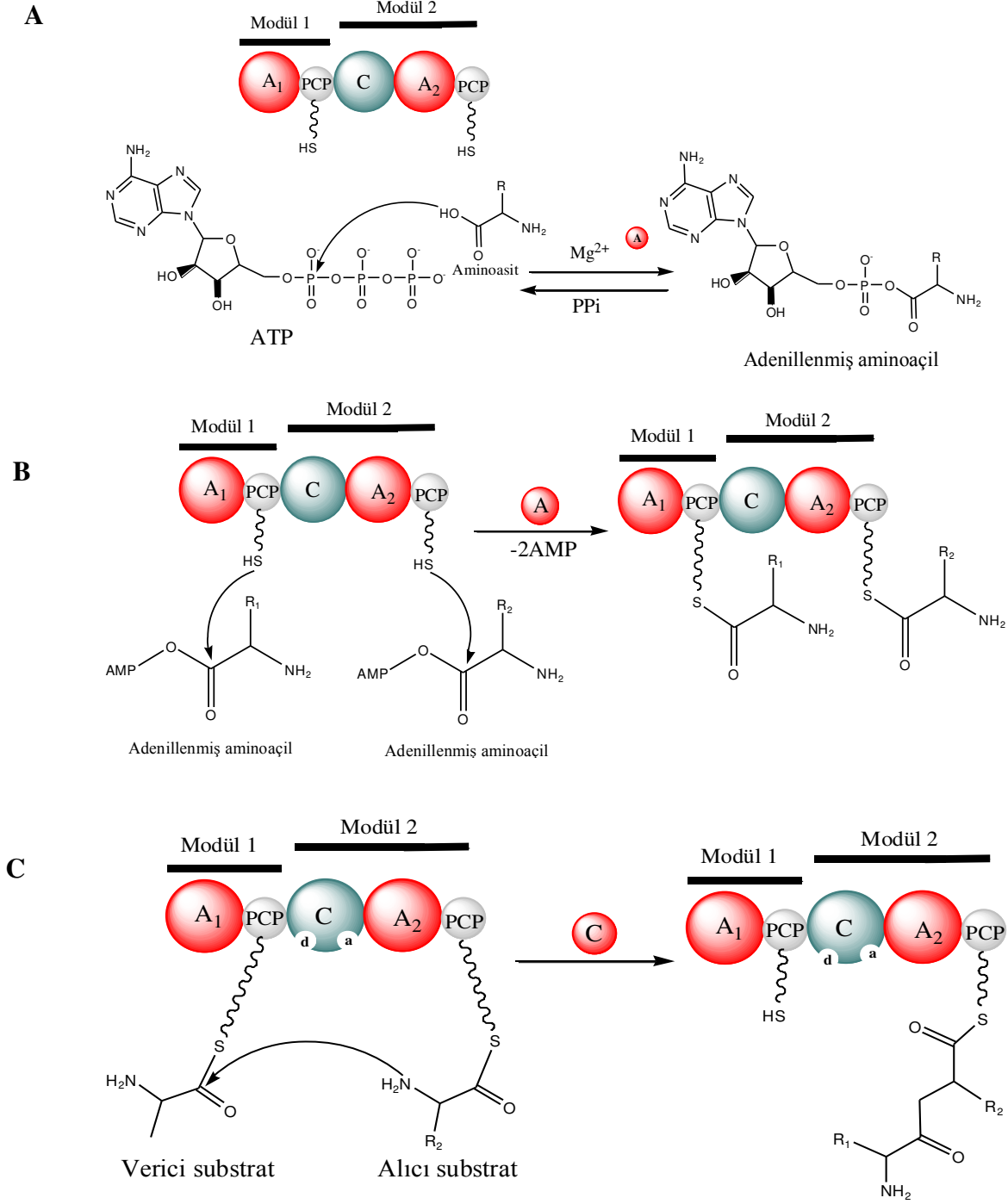
Şekil 2.4. Gramisidin S

2.1.4.1. Ribozom Dışı Peptid Sentezi

Ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) modül olarak adlandırılan alt birimlerden oluşurlar. Yaklaşık 1000-1500 aminoasit içeren ve molekül ağırlığı 120 kDa civarında olan her bir modül, belirli bir aminoasitin eklenmesi için özgüdür. Peptid sentetazda bulunan modül sayısı, genellikle oluşan peptitteki yapı taşlarının sayısına eşittir. Peptid sentetazları kodlayan genler 20 kb ve üstü büyüklükte gen kümeleri halinde düzenlenmişlerdir. Tek bir modülü kodlayan gen 3 kb civarındadır. Modüllerin sırası genellikle sentezlenen peptitteki yapı taşlarının dizilişini belirler. Bu şekilde, modüller, peptid sentezinde kalıp işlevi görür. Bir modül; adenilasyon domaini (A),

peptidil taşıyıcı protein ya da tiyolasyon domaini (PCP/T) ve kondensasyon domaini (C) olmak üzere en az üç domain içerir (Büber ve Açıan 2004). Ayrıca, oluşacak ürüne göre; epimerizasyon, N-metilasyon, siklizasyon, oksidoredüksiyon, redüksiyon gibi domainler de bulundurulabilirler (Walsh ve ark. 2001). Final modülü bir tiyoesteraz (TE) domaini ile sonlanır. Bu, zincir uzamasının bitişini katalizler. Peptid sentetazlar tarafından peptid bağı oluşumu mekanizmasını açıklamak üzere geliştirilen modele “multiple carrier model/ çoklu taşıyıcı model” adı verilmektedir (Büber ve Açıan 2004). Bu mekanizmaya göre; adenilasyon domaininde substrat olan aminoasit, ATP hidrolizi yoluyla aktive edilir. Adenilasyon yoluyla aktive olmuş aminoasitler PCP domainindeki 4’fosfopantetein grubuna bağlı sülfidril grubuna (SH) kovalent olarak bağlanır (Marahiel ve ark. 1997, Mootz ve ark. 2002, Sieber ve Marahiel 2005, Grünewald ve Marahiel 2006). Bu aşamadan sonra substrat; eğer varsa epimerizasyon veya N-metilasyon gibi değişiklikler geçirir (Döhren ve ark. 1999). Bu değişiklikleri geçirdikten sonra bir kondensasyon domainindeki alıcı (akseptör) konumuna taşınır. Bir önceki modülün fosfopantetein taşıyıcısı tarafından verici (donör) konumuna yerleştirilmiş olan aminoasitin peptidil grubu ile kondensasyon meydana gelerek peptid bağı oluşumu gerçekleşir (Sieber ve Marahiel 2005). Aşamalar Şekil 2.5’de görülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ



Şekil 2.5. Ribozom dışı yolla gerçekleşen peptid sentezinin aşamaları. A: adenilasyon aşaması, B: tiyolasyon aşaması, C: kondensasyon aşaması (Sieber ve Marahiel 2005).

NRPS Temel Domainleri

Adenilasyon Domaini

Yaklaşık 500 aminoasit içeren bu bölge aminoasitleri tanıyıp aktive eder. Adenilasyon bölgesinin büyük kısmı çok iyi korunmuş aminoasit dizilerinden oluşur. Ayrıca, aminoasitin tanındığı yaklaşık 10 aminoasitlik özgül bir diziye de sahiptir (Büber ve Açan 2004).

Peptidil Taşıyıcı Protein Domaini

Bu bölge tiyolasyon bölgesi olarak da adlandırılır. 80 ile 100 civarında aminoasit içerir ve fonksiyon bakımından yağ asiti sentetazlar ve poliketid sentazlardaki açıl taşıyıcı proteinle benzerlik gösterir. 4'-fosfopantetein grubu bu bölgedeki bir serinin hidroksiline kovalent olarak bağlanmıştır ve ileri geri hareket ederek, aminoasitleri kondensasyon bölgesine taşıyan bir taşıyıcı görevi görür (Büber ve Açan 2004).

Kondensasyon Domaini

Peptid bağı oluşumu 450 aminoasit içeren kondensasyon bölgesinde gerçekleşir (Büber ve Açan 2004).

Tiyoesteraz Domaini

Peptid sentezinin sonlanması ve oluşan peptidin sentetazdan ayrılması en sonda yer alan tiyoesteraz bölgesi yardımıyla başlar. Bu bölge 250 kadar aminoasitten oluşmuştur. Sentez tamamlanıp ürün serbest bırakıldıktan sonra da bazı yapı modifikasyonları gerçekleşebilir. Bazen enniatide ve gramisidin S'de olduğu gibi, peptid sentetazın sentezlediği birkaç ünite birleşerek halkasal oligopeptid yapısını oluşturur (Büber ve Açan 2004).

Ayrıca, oluşacak ürüne göre; epimerizasyon, N-metilasyon, siklizasyon, oksidoredüksiyon, redüksiyon gibi ek domainler de bulundurulabilirler (Walsh ve ark. 2001).

2.1.4.2. NRPS Biyosentetik Gen Kümeleri

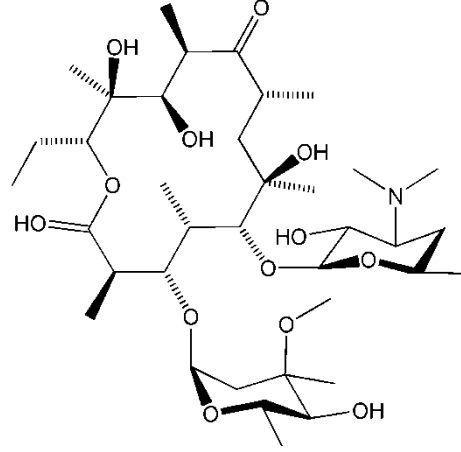
Şu ana kadar peptid sentetazlardaki gen kodları ile ilgili çok sayıda bakteri ve fungus operonunun klonlama, sekanslama ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır (Sosio ve ark. 2000). Bunlardan biri olan halkasal peptid antibiyotik surfaktin (Cosmina ve ark. 1993) sentezinden sorumlu *srfA* gen kümesinin 25 kb'ın üstünde bir uzunluğa sahip olduğu, *srfA-A*, *srfA-B*, *srfA-C*, *srfA-Te* olmak üzere 4 açık okuma çerçevesi (ORF, Open Reading Frame) içerdiği tespit edilmiştir. *SrfA-A*, *srfA-B*, *srfA-C* genlerinin sırasıyla 3, 3, 1 olmak üzere toplamda 7 modül içerdiği görülmüştür (Roongsawang ve ark. 2011).

2.1.5. Poliketidlerin Genel Özellikleri

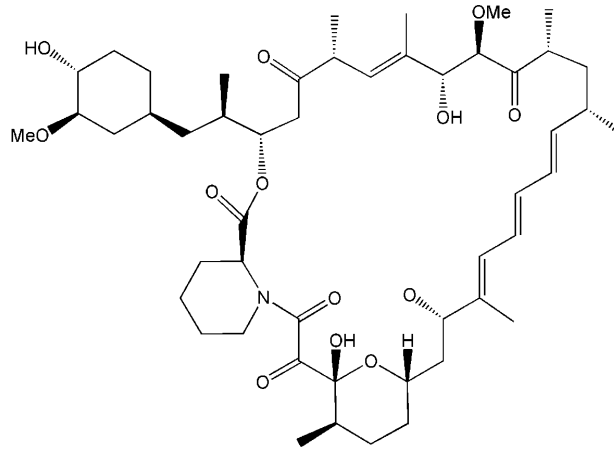
Poliketidler bitkilerden bakterilere kadar birbirinden farklı organizmalarda poliketid sentaz (PKS) olarak adlandırılan multienzim kompleksleri tarafından sentezlenen bileşiklerdir (Staunton ve Weissman 2001). Çizelge 2.4'de görüldüğü gibi çok çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Doksorubisin (adriyamisin) 1993'de antitümör ilaç olarak kullanıldığında 156 milyon dolarlık bir gelir sağlamıştır (Strohl 1997). Bu nedenle ekonomik olarak büyük öneme sahiptir.

Çizelge 2.4. Aktinobakteriler tarafından üretilen bazı poliketid bileşikler.

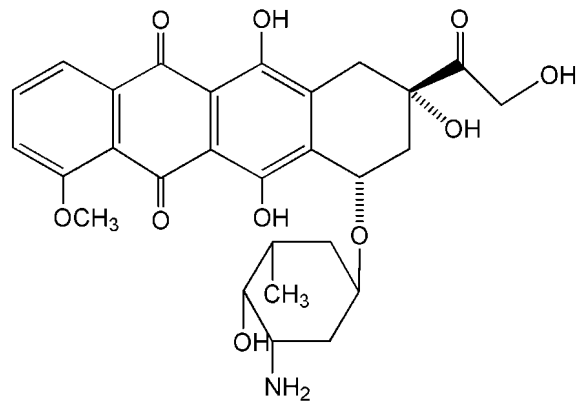
Poliketid	Organizma	Etki
Eritromisin (Şekil 2.6)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Antibakteriyel
Rapamisin (Şekil 2.7)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antifungal/ Antitümör /İmmunbaskılayıcı
Daunomisin (Şekil 2.8)	<i>Streptomyces</i> sp. C5	Antikanser
Pradimisin	<i>Actinomadura hibisca</i>	Antifungal
Avermektin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Antiparazitik



Şekil 2.6. Eritromisin



Şekil 2.7. Rapamisin



Şekil 2.8. Daunomisin

Poliketid sentazlar temel olarak üç sınıfa ayrılır. PKS-I'ler modüler ve tekrarlı olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Modüler PKS-I'de her bir modül zincir uzamasının bir

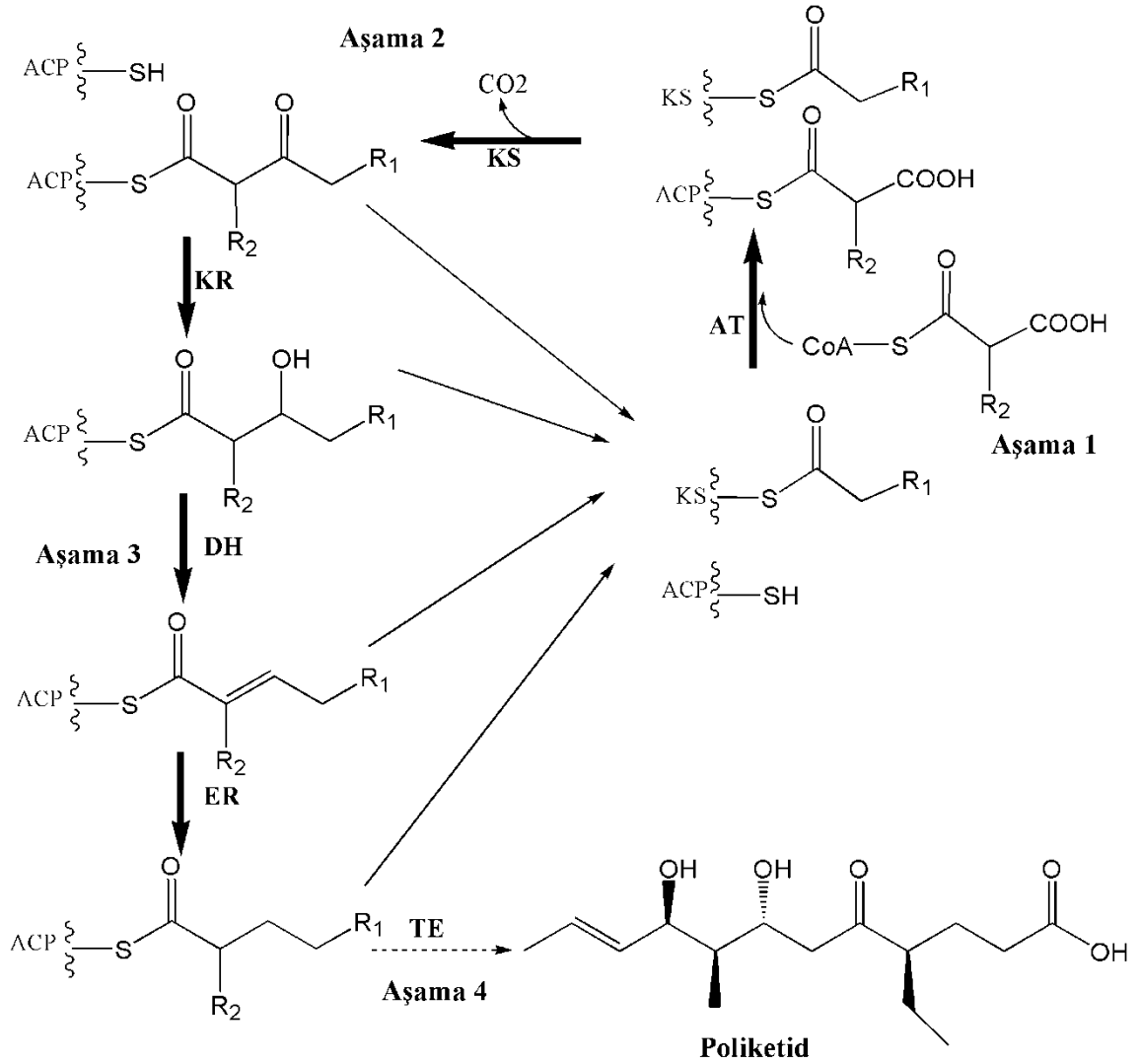
döngüsünden sorumludurlar. Tekrarlı PKS-I'ler unimodüler yani tek bir çeşit modül içerir. PKS-I'in bu çeşidi genellikle fungal sistemlerde bulunmakla birlikte *Streptomyces viridochromogenes* tarafından sentezlenen avilamisin gibi, bakterilerde de bazı örneklerle rastlanabilir (Moss ve ark. 2004). PKS-II'ler siklik multienzim kompleksleri olup tipik olarak aromatik antibiyotiklerin biyosentezinde rol alırlar. PKS-III'ler ise homodimerik kondensasyon enzimleri olup flavonoid ve kalkon (chalcone) bileşiklerinin sentezinden sorumludurlar. PKS enzimlerinde modüllerin sırası biyosentetik olayların dizilimini belirler. Modüllerin içindeki domainlerin değişkenliği oluşan doğal üründe gözlenen yapısal çeşitliliğe işaret eder (Shen ve ark. 2001, Staunton ve Wilkinson 2001, Barrios-Llerena ve ark. 2007).

PKS modüllerinin temel organizasyonu domain sırasına göre; ketosentaz (KS) domaini, açıl transferaz (AT) domaini ve açıl taşıyıcı protein (ACP) domaininden oluşmaktadır. NRPS'lerde olduğu gibi, final PKS modülünde ürün sentezi bir tiyoesteraz (TE) domaini ile sonlanır. Bilinen yardımcı PKS domainleri; ketoredüktaz (KR), dehidratat (DH), metiltransferaz ve enoilredüktaz (ER) domainleridir. Bütün bu domainler yeni bir poliketid zincirinin programlanmış sentezinde gereklidirler. Uzayan herbir karbon ünitesinin substrat spesifitesi AT domaini tarafından tanımlanır (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005).

2.1.5.1. Poliketid Sentezi

Poliketid sentezi; bakteri, ilkel ve gelişmiş ökaryotlardaki yağ asidi sentezine benzemektedir (Jimenez ve ark. 2010). Sentez AT domaininde bir açıl-CoA monomerinin (genellikle malonil-CoA veya metil malonil-CoA) seçimiyle başlar. Bir sonraki aşamada açıl-CoA ACP domainine transfer edilerek ACP domainindeki fosfopantetein grubuna bağlı sülfidril grubuna (SH) kovalent olarak bağlanır (Şekil 2.9, aşama 1). Kondensasyon aşamasında KS domainine bağlı bulunan sisteinin sülfidril grubuna bağlı asetil veya propionil grubu fosfopanteteinin sülfidril grubuna transfer edilir. Bu durumda kondensasyon reaksiyonu meydana gelmekte ve malonil-CoA içindeki karboksil grubu CO₂ şeklinde ayrılmaktadır (Şekil 2.9, aşama 2). Oluşan ürün daha sonraki aşamalarda oluşacak poliketid ürüne göre KR domainindeki katalizle redüklenir, DH domaininde dehidratlanır, ER domaininde ise DH domainindeki dehidratasyon sonucunda oluşan çift bağ indirgenerek doymun hale getirilir (Şekil 2.9,

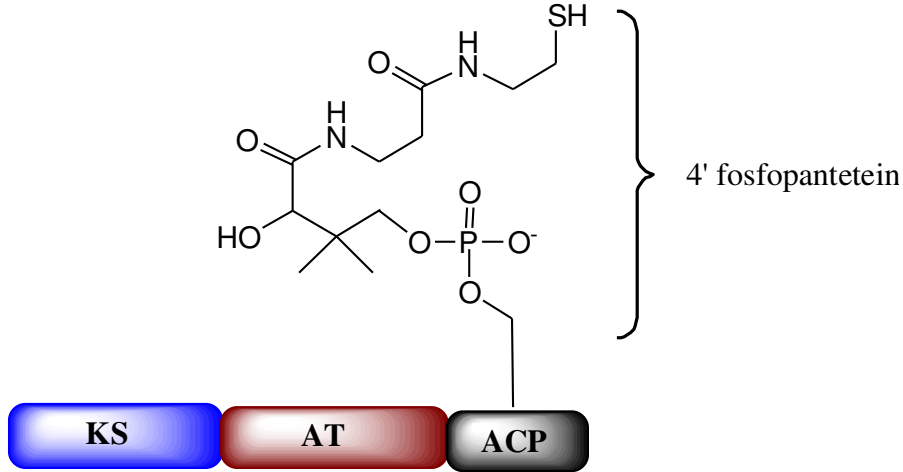
aşama 3). Kondensasyon döngüsü bu şekilde devam ederek zincir uzaması devam eder. Sentezin son aşamasında TE kataliziyle zincir uzaması tamamlanır (şekil 2.9, aşama 4) (Hopwood ve Sherman 1990, Khosla 1997, Schwarzer ve ark. 2003, Jimenez ve ark. 2010).



Şekil 2.9. Poliketid sentezinin aşamaları (Khosla 1998).

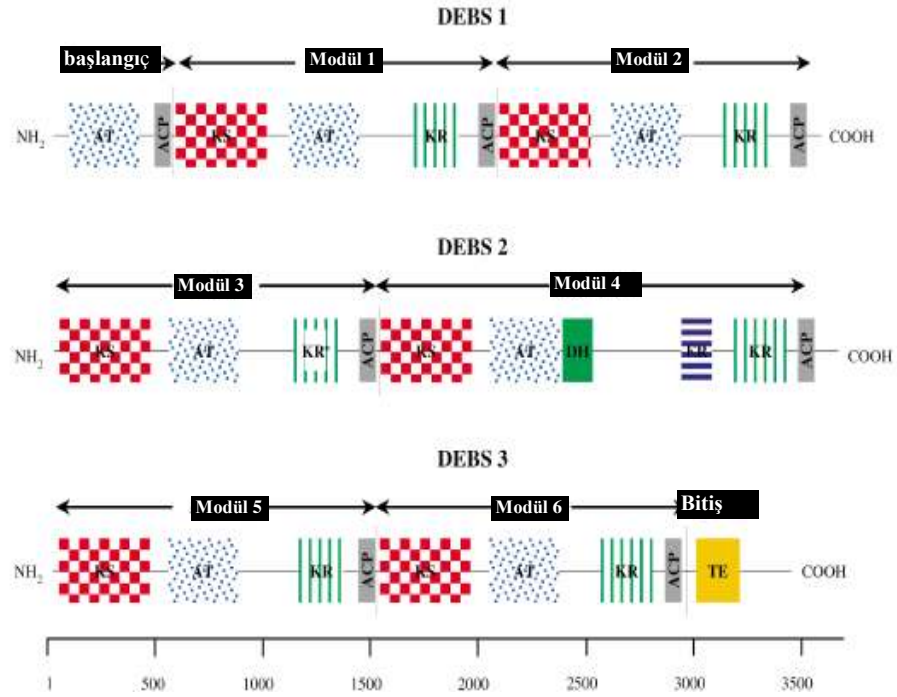
2.1.5.2. PKS-I'lerin Biyosentetik Gen Kümeleri

Büyük (>3000 aminoasit) ve çok fonksiyonlu proteinleri şifreleyen geniş bir ORF (open reading frame /açık okuma çerçevesi) içermeleri PKS-I genlerinin tipik özellikleridir (Cortes ve ark. 1990). Bu çok fonksiyonlu proteinler modül olarak adlandırılan katalitik bölgeler içerirler (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. PKS-I'in genel modül yapısı (Keating and Walsh 1999).

PKS-I'ler gen kümesi şeklinde organize olmuşlardır. Bu gen kümesi içinde KS domainleri yüksek oranda korunmuştur. Eritromisin sentezinden sorumlu PKS geni tipik bir PKS-I örneğidir. *EryAI*, *eryAII*, and *eryAIII* olarak adlandırılan 3 gen tarafından şifrelenir. Bu üç gen DEBS (6-deoxyerythronolide B synthase) olarak adlandırılan poliketidi şifreler. DEBS; KS, AT, KR, DH, ER, and ACP domainlerinin kombinasyonunu içeren modüller şeklinde organize olmuştur. Şekil 2.11'de DEBS proteininin domain organizasyonu görülmektedir.



Şekil 2.11. DEBS (6-deoxyerythronolide B synthase) proteininin domain organizasyonu (Staunton ve Weissman 2001).

2.1.6. Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin PCR Yöntemiyle Taranması

Sekonder metabolizma ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır. . Bu genler; NRPS, modüler (PKS-I) ve aromatik (PKS-II) poliketid sentazlar, hidroksimetilglutaril koenzimA redüktazlar ve aminoglikozit dirençlilik genleri olup, özellikle PKS-I ve NRPS genleri şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğunun yapısını oluşturmaktadırlar (Barrios-Llerena ve ark. 2007). Sekonder metabolizmaya ilişkili genlerin tespiti için yapılan PCR temelli tarama çalışmaları aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini değerlendirme açısından kullanışlıdır (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005, Ayuso ve ark. 2005).

Biyosentetik domainlerdeki korunmuş diziler hedef alınarak dizayn edilen dejenere PCR primerleri ile sekonder metabolit sentezinden sorumlu genlere ulaşılması bu metabolitlerin tespiti için hızlı bir yaklaşımdır.

2.2. Önceki Çalışmalar

Kuczeck ve arkadaşları (1997) *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomik DNA kütüphanesinden elde ettikleri kosmid DNA'yı kalıp olarak kullanıp, PCR yoluyla AT domainine denk gelen bölgeyi amplifiye edip klonlamışlardır. Klonladıkları fragmentlerin aminoasit sekanslarının PKS-I AT domainleriyle % 31- 44 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Bu gibi sentazların antibiyotik veya immünbaskılayıcı olarak büyük öneme sahip makrolid ve poliyeter bileşiklerin aglikon kısımlarının üretimini katalizlediğini belirtmişlerdir.

Metsa-Ketela ve arkadaşları (1999), poliketid antibiyotik üreticisi olarak bilinen *Streptomyces* türleri ile toprak örneklerinden elde edilmiş aktinomiset türlerinde ketosentaz (KS α) domainini hedef alan dejenere PCR primerleri dizayn etmişler ve bu primerlerle taradıkları türlerin çoğunda PKS-II amplifikasyonu gözlemişlerdir. Amino asit sekansları bilinen KS α gen domainleri ile homoloji taraması yaptıklarında % 60- 99 arasında benzerlik elde etmişlerdir.

Moffitt ve Neilan (2002), siyanobakteri ve dinoflagellat organizmalarında KS domainlerini hedef alarak tasarladıkları dejenere PCR primerleri ile bu bölgeyi amplifiye ederek klonlamışlardır. Sekans analizi sonucunda sekansların filogenetik analizlerinde hibrit PKS/NRPS genleriyle homoloji gösteren gruplar tespit etmişlerdir.

Zazopoulus ve arkadaşları (2003), PKS ailesinden sentezlenen enedin antitümör antibiyotiğinin biyosentez genlerini, ellerindeki aktinomisetler içerisinde taramış ve standart fermentasyon koşullarında enedin elde edilemeyen aktinomisetlerin bu bileşiğin biyosentez genlerini taşıdığını tespit etmişlerdir. Kültür koşullarında enedinlerin üretimini indükleyerek bunları saflaştırmayı başarmışlardır.

Gonzalez ve arkadaşları (2005), likenlerden izole ettikleri 337 aktinomiset izolatının sekonder metabolit biyosentetik genlerini tespit etmeyi amaçladıkları çalışmalarında PKS-I, PKS-II ve NRPS genlerini dejenere PCR primerleriyle taramışlardır. İzolatlarının; % 62.6'sında PKS-I, % 64.7'sinde PKS-II ve % 58.5'inde NRPS biyosentetik genlerini amplifiye etmişlerdir. Bu rakamlara rağmen, klasik kültür koşullarında tüm izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri % 27 olarak tespit edilmiştir. Bununla; standart fermentasyon koşullarında üretimi başarısızlıkla sonuçlanmış olan biyoaktif metabolitin, genom analizleri ile ortaya çıkarılması ve

doğrudan rasyonel yaklaşımlarla yeni biyoaktif doğal bileşiklerin tespiti, ekspresyonu ve saflaştırılmasının mümkün olabileceği görülmektedir.

Ayuso-Sacido ve Genilloud (2005), aktinomisetlerde NRPS ve PKS-I genlerini amplifiye etmek için spesifik primerler dizayn etmişler ve PCR'a dayalı tarama yöntemi ile taradıkları 210 türün büyük bir çoğunluğunda bu genlerin varlığını ortaya koymuşlardır. Bu genlerin tarandığı türler arasında *Streptomyces* türleri en iyi potansiyeli göstermiştir. Elde edilen domainlerin bilinen adenilasyon domainleri ile % 61- 99 değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Ayuso ve arkadaşları (2005), türlerin biyosentetik genlerini hedef alarak metabolik potansiyele dayalı bir tür karakterizasyon sistemi ortaya koymuşlardır. Amplifiye edilen PKS-I, PKS-II ve NRPS dizilerini restrüksiyon analizlerine tabii tutarak bir parmak izi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin toprak örneklerinden izole edilen aktinomisetlerde NRPS ve PKS biyosentetik sistemlerinin taranmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. İzolatlar arasında özellikle *Streptomyces* cinsinde çok aktif türlere rastlamışlardır. Özellikle bu cinste biyosentetik genlerin varlığı ve antimikrobiyal aktivite üretimi arasında sıkı bir paraleliğe rastlanmıştır.

Ehrenreich ve arkadaşları (2005), 24 deniz ve tatlı su siyanobakteri kültüründe dejenere PCR primerleri kullanarak NRPS ve PKS genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmada; organizmaların % 54'ünde NRPS ve % 92'sinde PKS amplifikasyonu elde etmişlerdir. Amplifiye edilen genlerin gerek tamamlanmış gerekse devam etmekte olan siyanobakteri genom araştırmaları ile karşılaştırıldığında çoğunun diğer siyanobakterilerde tanımlanmadığı ve bunların yeni doğal ürünler olabileceği ihtimalini vurgulamışlardır. Ayrıca amplifiye ettikleri bu gen fragmentlerinin siyanobakterilerdeki doğal ürünlerin keşfi ile ilgili çalışmalarda prob olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ostash ve arkadaşları. (2005), PCR stratejisini temel alarak antibiyotik üreticisi aktinomisetlerin genomunda PKS-I genlerini taramışlardır. *Streptomyces globisporus* 1912 türünde amplifiye ettikleri PKS-I amplikonlarını klonlayarak, sonrasında yapılan sekans analizinde BLASTx homolojilerinden yola çıkarak bu fragmentlerin pimarisin ve nistatin gibi polien antibiyotik sentezinde rol oynayan PKS-I genleri ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Komaki ve Harayama (2006), 83 *Streptomyces* türünde PKS-II geninin varlığını araştırdıkları çalışmada 9 türde daha önce rapor edilmiş aromatik poliketidlerle ilişkili olan KSa genlerini tespit etmişlerdir. 55 türde ise daha önce tespit edilmemiş aromatik poliketidlerle ilgili yeni KSa genlerini saptamışlardır. *Streptomyces* türlerindeki bu yeni kriptik KSa geninin varlığı ile onların yeni aromatik poliketid sentezleme potansiyellerinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir.

Pathom-aree ve arkadaşlarının. (2006) deniz aktinomisetlerinin çeşitliliği ve biyosentetik metabolik yollarını taradıkları bir çalışmada, incelenen 38 aktinomisetten % 70’inde NRPS ve % 13’ünde PKS-I genleri tespit edilmiştir. Tek bir izolatta (*Micromonospora* türünde) ise PKS-II genine rastlanmıştır. Araştırmacılar, çok az çalışılmış sıradışı habitatların sekonder metabolit sentezleme yeteneği olan türler açısından zengin kaynaklar olabileceğini bildirmişlerdir.

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

Barrios-Llerena ve arkadaşları (2007), 21 siyanobakteri türünde sekonder metabolit sentezinden sorumlu NRPS ve PKS-I genlerinin sırasıyla adenilasyon ve ketosentaz domainlerini hedef alan dejenere PCR primerlerini kullanarak bu genleri moleküler tarama yöntemiyle tespit etmeye çalışmışlardır. Taradıkları türlerin 19’unda PKS-I ve 18’inde NRPS genlerini tespit etmişlerdir. Adenilasyon fragmenti taşıyan, 33 klonun BLASTx analizlerinde siyanobakterilere ait bilinen NRPS sekanslarıyla % 43-97 benzerlik gösterdiğini, BLASTp analizinde 33 klondan 25’nin siyanobakteriler tarafından üretilen bilinen doğal ürünlerle benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda ketosentaz fragmenti taşıyan, 29 klonun BLASTx analizinde siyanobakterilere ait bilinen PKS sekanslarıyla % 49- 95 benzerlik gösterdiğini, BLASTp analizinde 29 klondan 22’sinin siyanobakteriler tarafından üretilen bilinen doğal ürünlerle benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Jiang ve arkadaşları (2007), izole ettikleri 24 deniz aktinomiset türünde sekonder metabolit senteziyle ilişkili olan NRPS, PKS-I ve PKS-II genlerini taramışlardır. İzolatların % 92'sinde NRPS, % 54'ünde PKS-I ve % 71'inde PKS-II amplifikasyonu elde etmişlerdir.

Zhao ve arkadaşları (2008), sediment örneğinden izole edilen iki bakteri türünde NRPS ve PKS-I gen çeşitliliğini araştırdıkları çalışmada amplifiye ettikleri NRPS ve PKS-I gen fragmentlerini klonlamışlardır. Klonlar RFLP profillerinin karşılaştırılması yoluyla gruplandırılıp sekanslanmıştır. BLASTx analizi sonucunda PKS-I için % 80'in altında NRPS için % 60'ın altında sekans homolojileri olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca aminoasit (BLASTx) sekanslarının filogenetik analizinde iki türde % 70'in altında benzerlik gösteren toplam 5 farklı grup ve hibrid NRPS-PKS enzim kompleksleri tespit etmişlerdir. % 70'in altında homoloji göstermesi bu genlerin daha önce tespit edilmemiş yeni genler olabilme ihtimalini arttırmakta olduğunu belirtmişlerdir.

Komaki ve arkadaşları (2008), 9 mikrobakteri türünde PKS-I geninin ketosentaz ve açıltransferaz domainlerini şifreleyen DNA bölgesini PCR yoluyla amplifiye etmişlerdir. Sekans analizi sonucunda elde edilen sekansların filogenetik analizinde bilinen PKS-I genleriyle benzerliğinin düşük olduğunu, bu nedenle yeni ve farklı poliketidler olabileceği sonucuna varmışlardır.

Hakvag ve arkadaşları (2008), deniz suyundan izole ettikleri 7 *Streptomyces* izolatının PKS-I geninin KS domainini hedef alan primerler kullanarak PCR yoluyla amplifiye edip klonlayarak sonrasında yapılan sekans analizi sonucunda 7 izolatta, farklı organizmalarla farklı oranlarda homoloji gösteren toplam 13 farklı PKS-I geni tespit etmişlerdir.

Jiang ve arkadaşları (2008), izole ettikleri 30 deniz aktinomisetinde NRPS, PKS-I, PKS-II genlerinin korunmuş domainlerini hedef alan primerler kullanarak sekonder metabolit senteziyle ilişkili bu genler açısından izolatların potansiyellerini araştırmışlardır. İzolatların % 87'sinde NRPS % 80'inde PKS-I, % 73'ünde PKS-II, amplifikasyonu elde etmişlerdir.

Zhao ve arkadaşları (2009) izole ettikleri 3 deniz aktinomisetinde PKS-I geninin KS domainini hedef alan dejenere primerler kullanarak KS fragmentini amplifiye etmişlerdir. Bu üç türden birinin sekansının meridamisin biyosentezinden sorumlu KS

2. KAYNAK ÖZETLERİ

geniyle yüksek homoloji gösterdiği görülünce, bu türün nörotrofik aktivitesine bakılmıştır. Aktivite sonucunda tahmin edildiği gibi nörotrofik aktivite tespit edilmiştir.

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

Zhang ve arkadaşları (2009), deniz süngerinden izole ettikleri 109 izolatta PCR yoluyla NRPS gen kümesinin adenilasyon domainini taramışlardır. İzolatların 15'inde NRPS geni tespit edilmiş olup, tespit edilen 15 NRPS geninin korunmuş A domaini aminoasit sekansının filogenetik analizinde; 11 tanesinin % 70 'in altında homoloji gösterdiğini ve bu nedenle bu genlerin yeni olabileceğini belirtmişlerdir. NRPS geni tespit ettikleri izolatlarda aynı zamanda antimikrobiyal aktivite testi yapılmış. Gram (+) / (-) bakteriler ve mantarları içeren test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir.

Janso ve arkadaşları (2010), tropikal bitkilerden izole ettikleri endofitik 213 aktinomiset türünde kimyasal tarama yoluyla bu organizmaların sentezlediği sekonder metabolitleri tespit etmeye çalışmışlardır. Kültür ortamında üretim ile tespit edemedikleri 29 türde moleküler tarama yöntemiyle tespit etmeye çalışmışlardır. Bu bağlamda bu türler, uygun primerler kullanılarak PKS-I, PKS-II ve NRPS, genleri açısından taranmıştır. Tarama yaptıkları 29 türden % 66'sında PKS-I, % 79'unda PKS-II ve tümünde NRPS amplifikasyonu gözlemlemişlerdir.

Gontang ve arkadaşları (2010), izole ettikleri 60 deniz aktinomiset türünü sekonder metabolit senteziyle ilişkili genler açısından PCR yoluyla taramışlardır. NRPS'lerin adenilasyon (A) domaini, PKS-I'lerin modüler, tekrarlı, hibrit ve enedin ketosentaz (KS) domainini hedef alan primer setlerini kullanmışlardır. 26 türde PKS-I, 5 türde enedin PKS ve 38 türde de NRPS amplifikasyonu elde edilmiştir. KS amplikonları

ile kurulan kütüphanelerden klonlar seçilip sekanslanmıştır. Bunların BLAST analizi sonucunda 90 KS domaini tespit edilmiş. Bunlardan 14'ünün aminoasit sekansı açısından % 85'in üstünde homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

Myronovskyy ve arkadaşları (2010), *Streptomyces sioyaensis* Lv81 türünde NRPS gen kümesinin adenilasyon domainini hedef alan dejenere primerler kullanarak adenilasyon domaininin amplifikasyonunu ve klonlamasını gerçekleştirmişlerdir. Sekans analizi sonucunda 9 farklı A domaini tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Zhou ve arkadaşları (2011) izole ettikleri 24 fungus türünde NRPS ile modüler ve tekrarlı PKS-I genlerinin korunmuş bölgelerini temel alarak dizayn ettikleri PCR primerleri ile 7 izolatta PKS ve 2 izolatta NRPS amplifikasyonu belirlemişlerdir. Sekans analizi sonucunda PKS geni tespit edilen 7 izolatta; 9'u modüler 6'sı tekrarlı olmak üzere farklı KS dizilimleri ile homoloji gösteren toplam 15 PKS bulmuşlardır. NRPS geni tespit edilen 2 izolatta ise farklı A dizilimleri ile homoloji gösteren toplam 4 NRPS geni tespit etmişlerdir. NRPS ve PKS genlerinde % 98-99 oranında homoloji tespit ettikleri türlerle yaptıkları filogenetik analizlere göre 15 PKS geninden 3'ünün filogenetik ağaçta diğer türlerin PKS genlerinden ayrı bir kolda yer aldığını saptamışlardır. NRPS genlerinin ise filogenetik ağaçtaki diğer türlerle güçlü bir benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Xin ve arkadaşları (2011) deniz süngerinden izole ettikleri 46 izolatta PKS genlerini PCR yoluyla taramışlardır. İzolatların % 70'inde PKS-I ve % 85'inde PKS-II geninin varlığını tespit etmişlerdir. 46 izolattan 36'sı biyoaktivite analizleri için seçilmiş ve bu izolatların % 88'inin en az bir test organizmasına karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Biyolojik Materyal

Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında *Aethionema dumanii*, *Salvia aytachii* ve *Achillea ketenoglui* endemik bitkilerinin, sırasıyla pH 8.8, pH 7.7 ve pH 7.7 olan alkali özellikteki kök çevresi topraklarından izole edilen ve moleküler teşhisleri yapılmış olan (Yılmaz ve ark. 2008) aktinomiset izolatlarından *Streptomyces* sp. AA58, *Streptomyces* sp. AAH66, *Streptomyces* sp. AR3, *Streptomyces* sp. AR12, *Streptomyces* sp. AS28, *Streptomyces* sp. AS36, *Streptomyces* sp. ASH47, *Streptomyces* sp. BA11, *Streptomyces* sp. BAH26, *Streptomyces* sp. BS29, *Streptomyces* sp. BS44, *Streptomyces* sp. CA12, *Streptomyces* sp. CA17, *Streptomyces* sp. CA24, *Streptomyces* sp. CS41 izolatları NRPS ve PKS-I genlerinin taranması amacıyla kullanıldı.

Transformasyon çalışmalarında alıcı hücre olarak *Escherichia coli* DH5α kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri

Tryptik Soya Besiyeri

Tryptik Soya Broth (TSB, Oxoid) 30 g TSB tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edildi.

Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME)

3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g pepton (Bacto, Oxoid), 10 g glukoz, 340 g süzkroz (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Sterilizasyon sonrası 1 L YEME besiyerine filtre (Sartorius 0.2µm) ile steril edilmiş 2.5 M MgCl₂.6 H₂O'dan 2 ml ve % 20'lik glisinden (Sigma) 25 ml eklendi.

3.1.2.2. Kullanılan Diğer Besiyerleri

M2 Katı Besiyeri

10 g malt özütü (Merck), 4 g maya özütü (Oxoid), 3 g glukoz (Merck), 15 g agar (Fluka) tartılarak çeşme suyu ile 1 L'ye tamamlanıp (pH 7.8) steril edildi

Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g malt özütü (Merck), 5 g maya özütü (Oxoid), 5 g NaCl (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

Katı LB besiyeri hazırlamak için ise 15 g/L olacak şekilde agar (Fluka) eklendi.

Bütün besiyerleri 121°C'de 15 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

3.1.3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Maltoz (Sigma), süktroz (Merck), Tris-HCl (Merck), sodyum asetat (Merck), sodyum dodesil sülfat (SDS, Merck), EDTA (AppliChem) kimyasalları kullanıldı. Fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) Sigma-Aldrich'den, izoamilalkol, kloroform Sial'den, etil alkol Riedel de Haën'den temin edildi.

3.1.4. Agaroz jel Elektroforezi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris-asetik asit-EDTA tamponu (TAE 50X); 0.05 M EDTA (pH 8), % 5.71 asetik asit, 242 g tris baz olacak şekilde saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Tris baz ve EDTA Merck'ten, asetik asit ise Carlo Erba'dan temin edildi.

Agaroz jel için agaroz AppliChem'den, etidyum bromür Sigma'dan, brom fenol blue (BFB) Fermentase'dan, moleküler ağırlık markörü Roche'dan temin edildi.

3.1.5. Kullanılan Enzimler

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

3.1.6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Gerekli Kimyasallar

NRPS geninin adenilasyon domaininin ve PKS geninin ketosentaz domaininin amplifikasyonu için İontek firmasından temin edilen sırasıyla ileri A3F

(5'GCSTACSYSATSTACACSTCSGG3') geri A7R (5'SASGTCVCCSGTSCGGTAS3'); ileri K1F (5'TSAAGTCSAACATCGGBCA3'), geri M6R (5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3') primerleri (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005) kullanıldı (S= G/C, Y= C/T, V=G/A/C, B = G/T/C).

Primerler dışında reaksiyon için gerekli olan Taq polimeraz, PCR tamponu deoksिनुकлеотитрифосфатлар, MgCl₂ ve GC tamponu içeren Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) ve Fermentase Kit kullanıldı.

3.1.7. Jelden DNA'nın Geri Kazanılması İçin Kullanılan Malzemeler

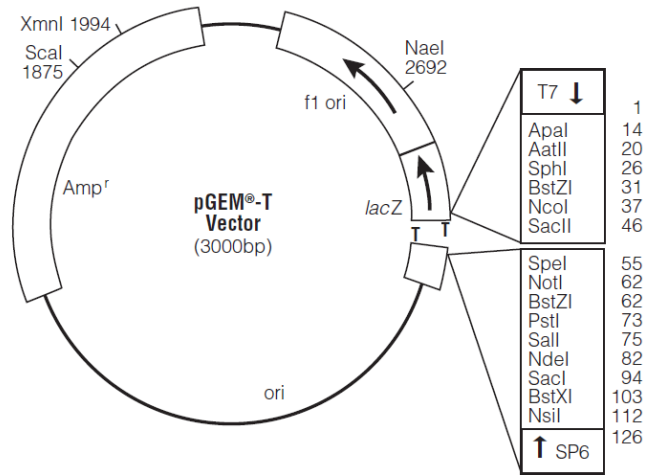
PCR ürünlerinin jelden geri kazanılması için ekstraksiyon kitleri kullanıldı (GeneMark ve Qiagen).

3.1.8. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler

10 mM ile 75 mM'lık kalsiyum klorür çözeltileri ve % 50'lik gliserol hazırlanıp +4°C'de saklandı.

3.1.9. Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler

Ligasyon için, içerisinde ligasyon tamponu, pGEM-T vektör, DNA ligaz bulunan pGEM-T klonlama kiti (Promega) kullanıldı.



Şekil 3.1. pGEM-T vektör haritası.

3.1.10. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi İçin Kullanılan Kimyasallar

100 mg X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside)/2 ml N-N-Dimetilformamid olacak şekilde hazırlanıp -20°C’de saklandı.

Stok çözelti 100 mM olacak şekilde 23.83 mg IPTG (Isopropyl-B-D-Thiogalactoside) 1 ml suda çözülerek filtre (Sartorius 0.2 µm) yoluyla steril edilip -20°C’de saklandı.

Ampisilin (Roche); 100 mg/ml olacak şekilde saf suyla hazırlanıp filtre (Sartorius 0,2 µm) ile steril edildi.

3.1.11. Plazmid İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar

Plazmid izolasyon kiti kullanıldı (OMEGA ve GeneMark).

3.1.12. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama)

Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)

PCR Cihazı (Eppendorf)

Elektroforez (Biolab)

Hassas Tartı (GEC Avery)

pH Metre (Mettler MP220)

Etüv (Heraeus)

Sterilizatör (Heraeus)

Derin Dondurucu (Ugur)

Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad)

Laminar Kabin (Telstar AV 100)

Orbital Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B)

Mini Santrifüj (E.S-6)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Spektrofotometre (Varian)

Vorteks (VWR) Güç kaynağı (Bio-Rad)

+4 °C dolap (Sanyo)

28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)

Su banyosu (Grant LTD 66)

Isıtıcı (Heildoph)

Mikropipet (Pipetman ve eppendorf)

3.2. Metod

Üç farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından izole edilen ve moleküler teşhisleri yapılmış olan 15 aktinomiset izolatının kromozomal DNA izolasyonları, PCR ile NRPS ve PKSİ genlerinin ilgili domainlerinin amplifikasyonları, bunların klonlanması ve biyoinformatik incelemeleri yapıldı.

3.2.1. Organizmaların Üretilmesi

Daha önceden TSB (Tryptik Soya Broth, Oxoid)'de üretilerek % 50 gliserollü stoğu hazırlanmış izolatlar M2 agara aktarılarak 28 °C'de 5 gün süreyle etüvde üretildi. Böylelikle taze kültürü hazırlanan bakteriler kromozomal DNA izolasyonları için uygun sıvı besiyerlerine alındı.

3.2.2. 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 20/30 oranında TSB-YEME içeren sıvı besiyerine aktarılıp orbital çalkalamalı inkübatörde 230 rpm'de 28 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1.5 ml'lik ependorf tüplere kültür örnekleri alınıp 2 dakika maksimum rpm'de santrifüjlenerek pelet kısmı izolasyon için kullanıldı. Pelet iki kez % 10.3 sükröz çözeltisi ile yıkandıktan sonra 4 mg/ml lizozim ve 75 µg/ml RNaz eklenmiş olan, 500 µl TSE tamponunda [25 mM Tris HCl (pH 8.0), 0.3 M sükröz, 25mM EDTA (pH 8.0)] çözüldü. 37 °C'de 45 dakika inkübasyondan sonra, 300 µl % 2 SDS eklenerek 20 saniye vortekslendi. İlk olarak fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ve sonrasında da kloroform:izoamil alkol (24:1) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası 10 dakika 16.000 rpm'de santrifüjleme ile supernatant kısmı alındı. Üst faz temizleninceye kadar kloroform :izoamilalkol (24:1) ekstraksiyona devam edildi. Sonuç olarak temiz üst faz alınarak 1/10 oranında 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ve üstfazın 3 katı oranında mutlak etanol eklenmesiyle DNA'nın çökmesi için -20 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası +4 °C'de maksimum rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp pelet üzerine % 70'lik etilalkol ilave edilerek 10 dakika 16.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde alındı ve etanolün tamamen uçması için pelet bir süre etüvde

bekletildi. Daha sonra kromozomal DNA'nın tamamen çözülmesi için pelete uygun miktarda saf su eklenerek 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

3.2.3. NRPS Genlerinin Adenilasyon Domaininin PCR İle Amplifikasyonu

Saflaştırılan genomik DNA'lardan; ileri A3F ve geri A7R primerleri ile NRPS gen kümesinin adenilasyon domaini amplifiye edildi. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu yaklaşık 700 bp uzunluğundadır.

Total hacim 50 µl olmak üzere Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kitiyle; 100 ng template DNA, 5 µl (% 10) PCR tamponu, 0,5 µl (1 U) Taq DNA polimeraz, 2 µl (0,2 µM) dNTP mix, 2 µl (0,4 µM) ileri ve geri primerler, 3 µl (1.5 mM) MgCl₂, 5 µl (% 10) GC tamponu eklendi. Fermentase firmasından temin edilen Taq polimeraz kiti kullanıldığında ise GC tamponu yerine steril distile su kullanıldı. Standard PCR koşullarının termal döngüsü: 95 °C'de 5 dakika (başlangıç denatürasyonu) 1 döngü, sonrasında 35 döngü; 95 °C'de 30 saniye, 59 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 4 dakika ve final uzama adımı 72 °C'de 10 dakika 1 döngü olarak uygulandı.

3.2.4. PKS-I Genlerinin Ketosentaz Domaininin PCR İle Amplifikasyonu

Saflaştırılan genomik DNA'lardan; ileri K1F ve geri M6R primerleri ile Fermentase ve Roche firmalarından temin edilen Taq polimeraz kiti kullanılarak PKS-I gen kümesinin ketosentaz domaini amplifiye edildi. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu yaklaşık 1200-1400 bp arasındadır.

Total hacim 50 µl olmak üzere Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kitiyle; 100 ng template DNA, 5 µl (% 10) PCR tamponu, 0,4 µl (1 U) Taq DNA polimeraz, 2 µl (0.2 µM) dNTP mix, 2 µl (0.4 µM) ileri ve geri primerler, 3 µl (1.5 mM) MgCl₂, 5 µl (% 10) GC tamponu eklendi. Fermentase firmasından temin edilen Taq polimeraz kiti kullanıldığında ise GC tamponu yerine steril distile su kullanıldı. Standard PCR koşullarının termal döngüsü: 95 °C'de 5 dakika (başlangıç denatürasyonu) 1 döngü, sonrasında 35 döngü; 95 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 4 dakika ve final uzama adımı olarak 72 °C'de 10 dakika 1 döngü olarak uygulandı

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Kromozomal DNA tespiti için % 0,7'lik, PCR ürünlerinin ve rekombinant plazmitlerin görüntülenmesi amacıyla ise % 1'lik agaroz jel hazırlandı. TAE tamponu içerisinde çözünen agaroz jele final konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür çözeltisinden eklendi. DNA boyasıyla beraber kuyucuklara yüklendi. Daha sonra güç kaynağından 90 voltluk akım verilerek yürümeye bırakıldı.

3.2.6. Jelden PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması

PCR sonrası NRPS için yaklaşık 700 bp, PKS-I için 1200-1400 bp uzunluğundaki fragmentler jelden kesilip, jel ekstraksiyon kiti (GeneMark ve Qiagen) kullanılarak ekstrakte edildi.

3.2.7. *E. coli* DH5-α Kompetent Hücrelerin Hazırlanışı

LB agar'dan alınan *E. coli* DH5-α hücrelerinin 10 ml LB içeren sıvı besiyerine ekimi yapıp orbital çalkamalı inkübatörde bir gece 37 °C sıcaklıkta 250 rpm'de üretildi. LB besiyerinde üreyen kültürün 1 ml'si 50 ml'lik LB sıvı besiyerine aktarılıp OD (optik dansite) 0.45 oluncaya kadar orbital çalkamalı inkübatörde 37 °C sıcaklıkta 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültür, 20 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 10 dakika buzda bekletildi. Bu süre sonunda 4°C'de santrifüjde 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Pelete 5 ml 10 mM'lık CaCl₂ eklenerek homojen olacak şekilde çözünmesi sağlandı. Daha sonra 4°C sıcaklıktaki santrifüjde 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Pelete 2 ml 75 mM'lık CaCl₂ eklenerek homojen olacak şekilde çözünmesi sağlandı. Bu işlem sonunda 192 µl çözünen bakteri örneği, 108 µl % 50'lik gliserol ile karıştırılarak -20 °C'de saklandı. Bütün bu işlemler buzda gerçekleştirildi.

3.2.8. PCR Ürünlerinin Ligasyonu

Ligasyon için pGEM-T klonlama kiti (Promega) kullanıldı. Verimli ligasyon için reaksiyon 16 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.9. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu

-20 °C’de tutulan kompetent hücreler buza alındı. 300 µl *E. coli* DH5-α kompetent hücrelerine 10 µl ligasyon ürünleri eklenerek yarım saat buz içerisinde bekletildi. Daha sonra 70 saniye 42 °C sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi. Sonraki süreçte hücreler hızlı bir şekilde buza alınıp buzda 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda her bir tüpe 1 ml LB eklenip 37 °C sıcaklıkta 150 rpm’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ampisilin (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerine 30 µl X-Gal, 100 µl IPTG eklenerek besiyerinin her tarafına homojen bir şekilde yayıldı. Inkübasyon süresi sonunda her bir besiyerine yaklaşık 300 µl gelecek şekilde hücrelerin yayılması sağlanarak etüvde 37 °C’de bir gece boyunca bekletildi.

3.2.10. Plazmid İzolasyonu

Ampisiline dirençli beyaz renkli putatif rekombinant koloniler 100 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine aktarılarak orbital çalkalamalı inkübatörde 37 °C 230 rpm’de bir gece boyunca üretildi. Hücre kültürü maksimum rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Omega ve Qiagen firmalarından temin edilen plazmit izolasyon kitleri kullanılarak izolasyon yapıldı.

3.2.11. DNA Dizi Analizi

İzole edilen rekombinant plazmitler NRPS ve PKS-I gen dizi analizine tabi tutuldu. Dizi analizleri İontek Şirketine (İstanbul) yaptırıldı.

3.2.12. Biyoinformatik İncelemeler

NRPS ve PKS-I gen kümelerinin amplifiye edilen ilgili domainlerinin dizilimleri NCBI web sayfasında: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Blast programında incelendi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

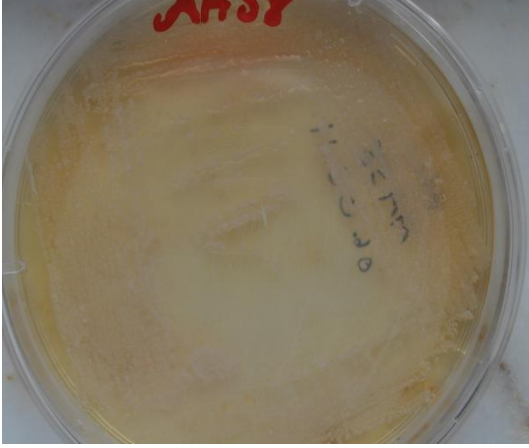
4.1.1. Kullanılan Mikroorganizmaların Morfolojik Özellikleri

M2 agarda büyütülen izolatların morfolojik özellikleri saptandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de, izolatların katı besiyerindeki görünüşleri ise Resim 4.1-4.15’de verilmiştir.

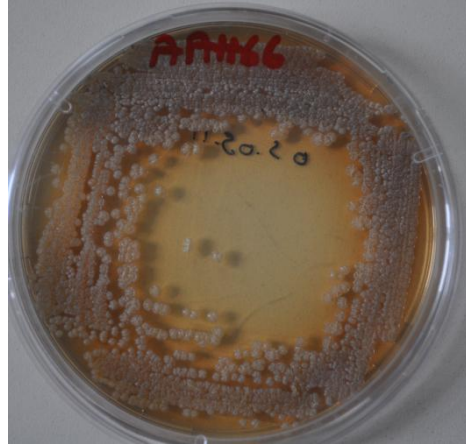
Çizelge 4.1. *Streptomyces* türlerinin M2 besiyerinde 5 gün üretildikten sonraki morfolojik özellikleri.

Organizma	Koloni görünümü	Substrat miseli	Hava miseli	Difüzlenebilen Pigmenti
<i>Streptomyces</i> sp. AA58	Likensi	Beyaz- Krem	Sarı	-
<i>Streptomyces</i> sp. AAH66	Likensi	Turuncu	Gri	Sarı
<i>Streptomyces</i> sp. AR3	Likensi	Krem	Krem- sarı	-
<i>Streptomyces</i> sp. AR12	Dairemsi	Sarı	Gri	Sarı
<i>Streptomyces</i> sp. AS28	Kubbemsi	Krem	Beyaz	-
<i>Streptomyces</i> sp. AS36	Dairemsi	Kahverengi	Beyaz	Sarı
<i>Streptomyces</i> sp. ASH47	Yıldızımsı	Turuncu	Gri	-
<i>Streptomyces</i> sp. BA11	Kubbemsi	Krem	Beyaz	-
<i>Streptomyces</i> sp. BAH26	Dairemsi	Kahverengi	Beyaz	Kahverengi
<i>Streptomyces</i> sp. BS29	Dairemsi	Sarı	Sarı	Gri
<i>Streptomyces</i> sp. BS44	Kubbemsi	Krem	Beyaz	-
<i>Streptomyces</i> sp. CA12	Küremsi	Krem	Beyaz	-
<i>Streptomyces</i> sp. CA17	Kubbemsi	Açık kahverengi	Kahverengi	Kahverengi
<i>Streptomyces</i> sp. CA24	dairemsi	Krem	Gri	-
<i>Streptomyces</i> sp. CS41	Kubbemsi	Krem	Beyaz	-

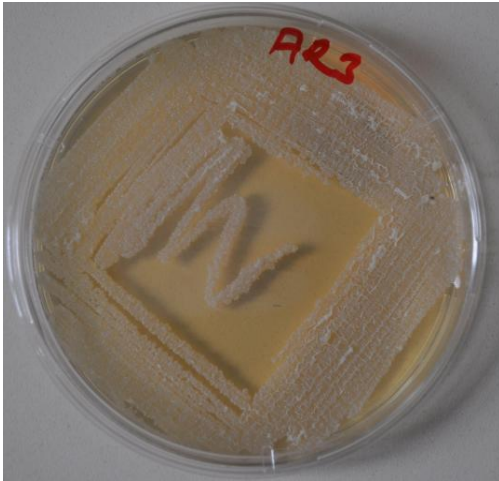
4. BULGULAR ve TARTIŞMA



Resim 4.1. *Streptomyces* sp AA58'in M2 katı besiyerindeki görünümü.



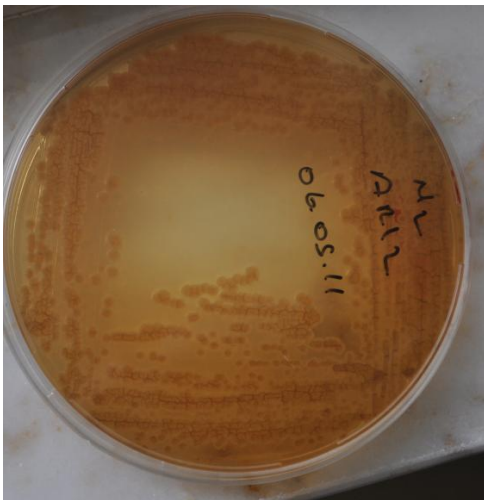
Resim 4.2. *Streptomyces* sp AAH66'nın M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.3. *Streptomyces* sp AR3'ün M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.4. *Streptomyces* sp AS28'in M2 katı besiyerindeki görünümü.



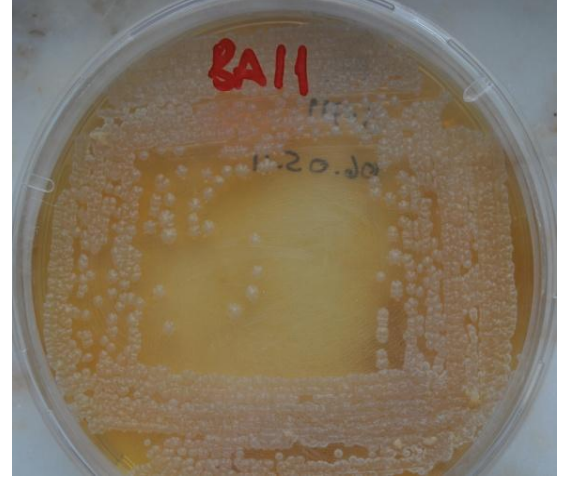
Resim 4.5. *Streptomyces* sp AR12'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.6. *Streptomyces* sp AS36'nın M2 katı besiyerindeki görünümü.



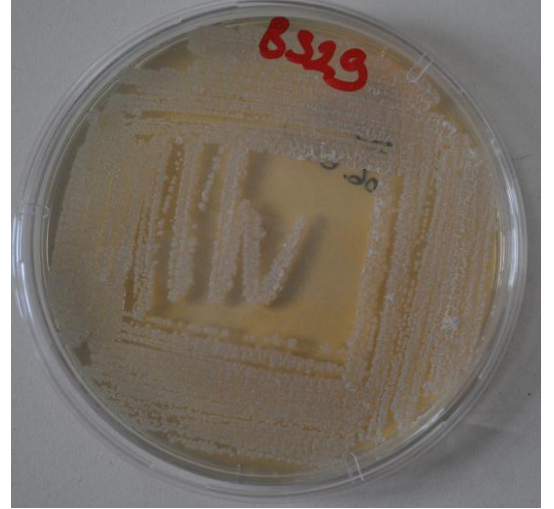
Resim 4.7. *Streptomyces* sp ASH47'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.8. *Streptomyces* sp BA11'in M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.9. *Streptomyces* sp BAH26'nın M2 katı besiyerindeki görünümü.



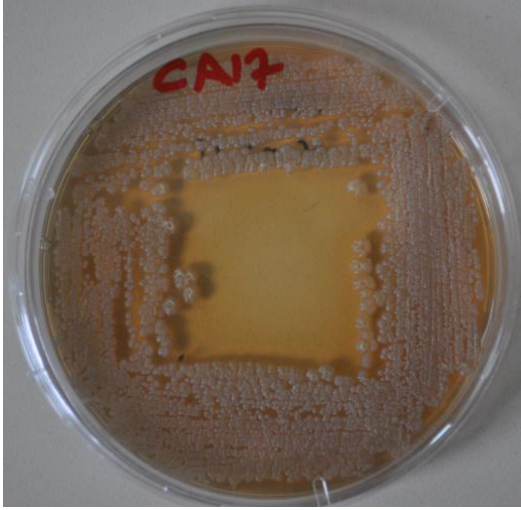
Resim 4.10. *Streptomyces* sp BS29'un M2 katı besiyerindeki görünümü.



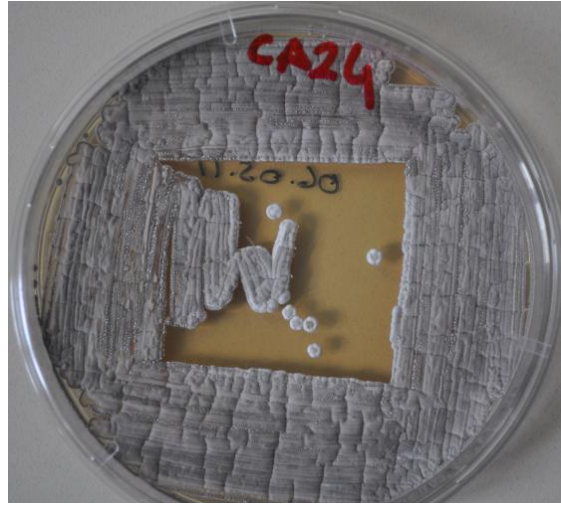
Resim 4.11. *Streptomyces* sp BS44'ün M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.12. *Streptomyces* sp CA12'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.13. *Streptomyces* sp CA17'nin M2 katı besiyerindeki görünümü.

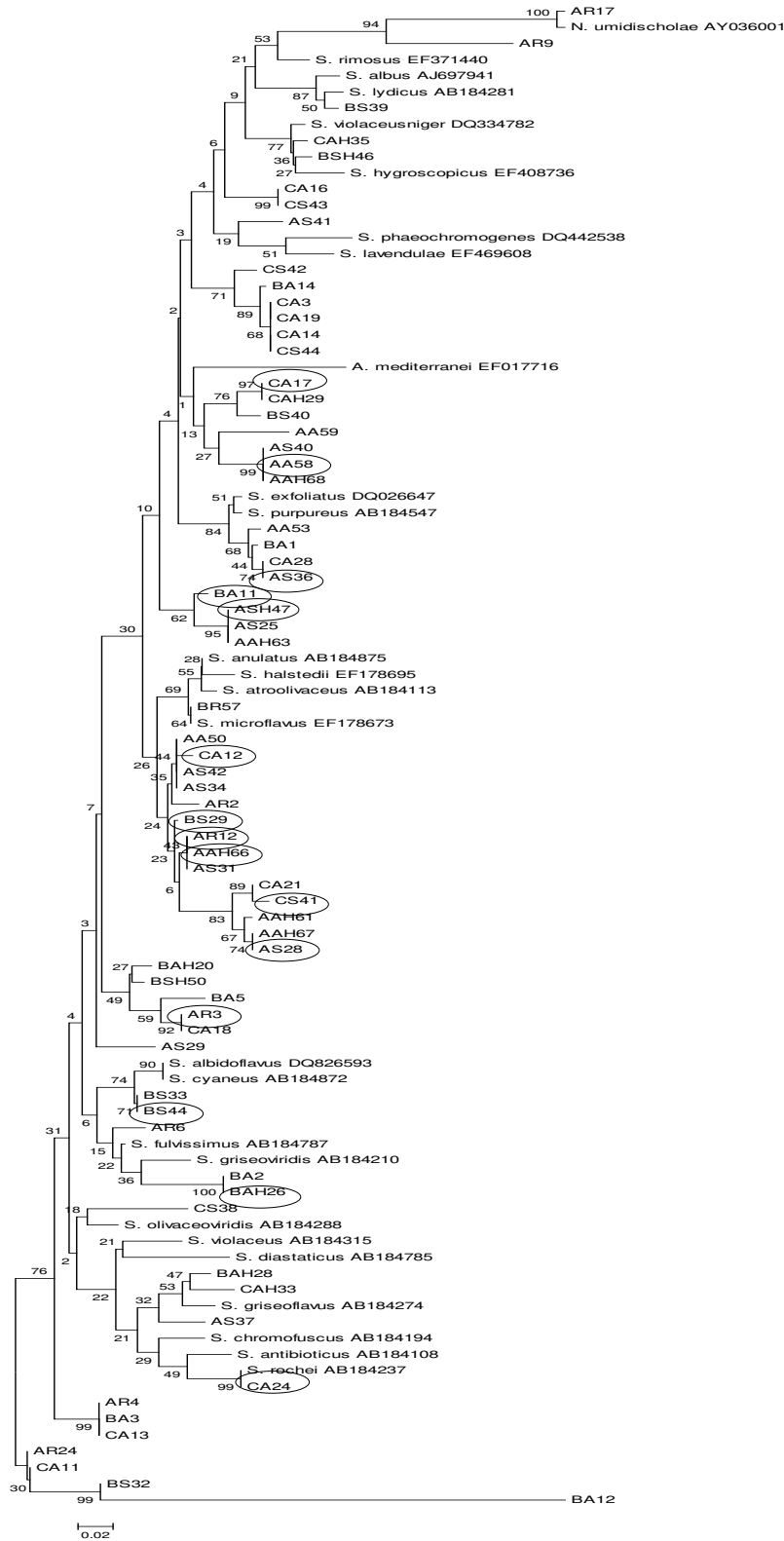


Resim 4.14. *Streptomyces* sp CA24'ün M2 katı besiyerindeki görünümü.



Resim 4.15. *Streptomyces* sp CS41'in M2 katı besiyerindeki görünümü.

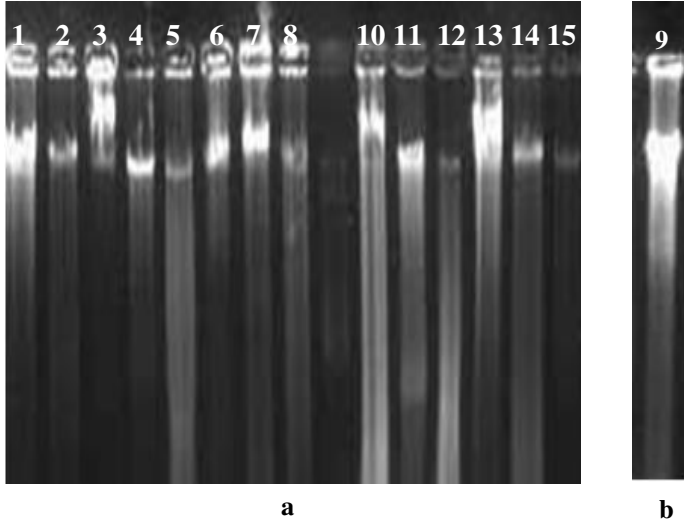
Moleküler teşhisleri daha önceden gerçekleştirilmiş 15 aktinomiset izolatının filogenetik ağaçtaki yerleri Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Bu çalışmada kullanılan 15 *Streptomyces* türünün, 16S rRNA genlerine göre çizilen, beraber izole edilen diğer türler ve *Streptomyces* gruplarını temsil eden organizmalar ile oluşturulmuş filogenetik ağaç (Yılmaz ve ark. 2008). Bu çalışmada kullanılan izolatlar ağacın üzerinde daire içine alınmıştır.

4.1.2. Kromozomal DNA'ların Jelde İncelenmesi

15 farklı aktinomiset türünden kromozomal DNA izolasyonları yapıldı (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. İzole edilen kromozomal DNA'lar. a) 1. *Streptomyces* sp. AA58, 2. *Streptomyces* sp. AAH66, 3. *Streptomyces* sp. AR3, 4. *Streptomyces* sp. AR12, 5. *Streptomyces* sp. AS28, 6. *Streptomyces* sp. AS36, 7. *Streptomyces* sp. ASH47, 8. *Streptomyces* sp. BA11, 9. *Streptomyces* sp. BAH26, 10. *Streptomyces* sp. BS29, 11. *Streptomyces* sp. BS44, 12. *Streptomyces* sp. CA12, 13. *Streptomyces* sp. CA17, 14. *Streptomyces* sp. CA24, 15. *Streptomyces* sp. CS41. b) 9. *Streptomyces* sp. BAH26

4.1.3. NRPS ve PKS-I Genlerinin Bakterilerin Genomlarında Taranması

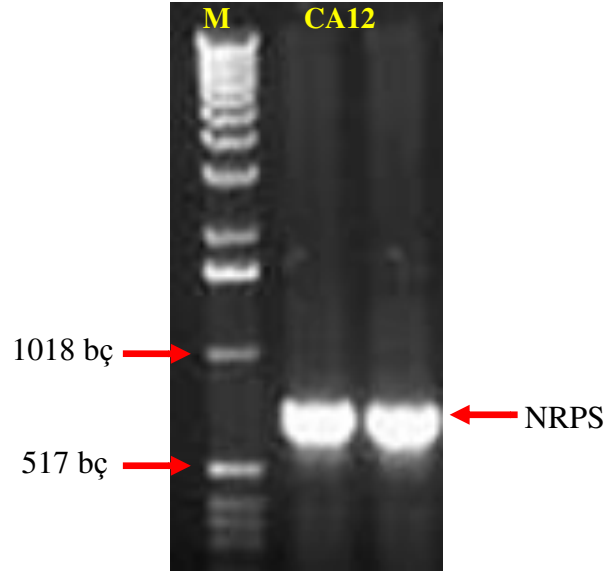
4.1.3.1. NRPS Genlerinin Taranması

Saflaştırılan genomik DNA'lardan NRPS amplifikasyonu standart koşullardan başlanarak yapıldı. Standart koşullarda ürün elde edilmeyen izolatlarda $MgCl_2$ miktarı, termal döngü koşulları ve kullanılan PCR kiti değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

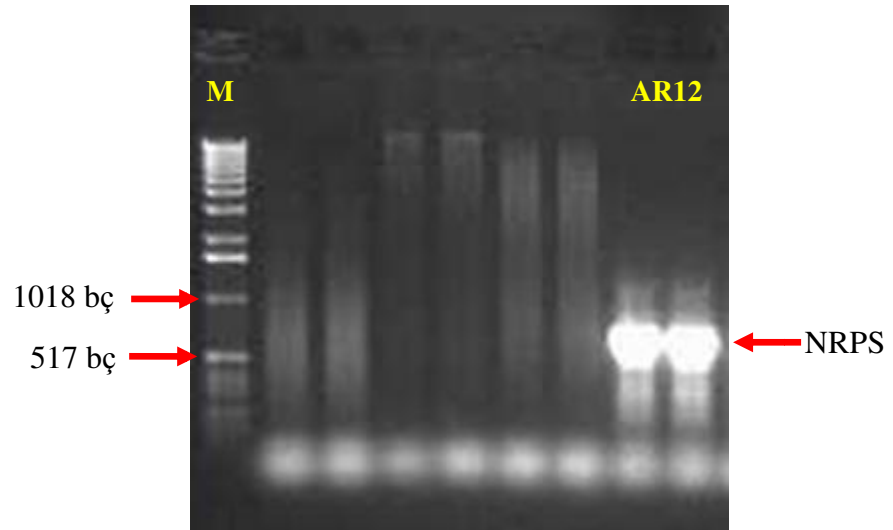
15 aktinomiset izolatında amplifikasyon için öncelikle standart koşullardan başlandı. Ancak hiçbir izolatta amplifikasyon gözlenmedi.

Bunun üzerine Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı $57^{\circ}C$ ve $MgCl_2$ 'ün final konsantrasyonu 1.5 mM olarak

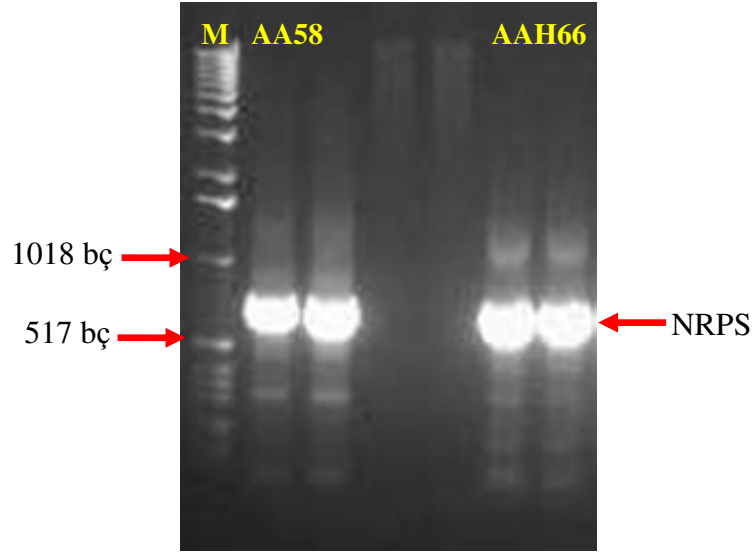
değiştirildiğinde; *Streptomyces* türleri CA12 (Şekil 4.3), AR12 (Şekil 4.4), AA58, AAH66 (Şekil 4.5) ve CS41 (Şekil 4.6) izolatlarında amplifikasyon gözlemlendi.



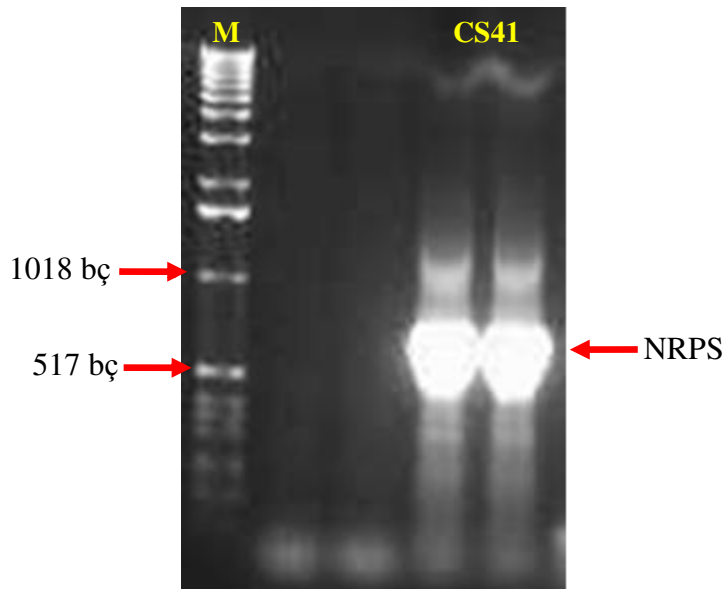
Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. CA12 izolatından elde edilen elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.



Şekil 4.4. *Streptomyces* sp. AR12 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.

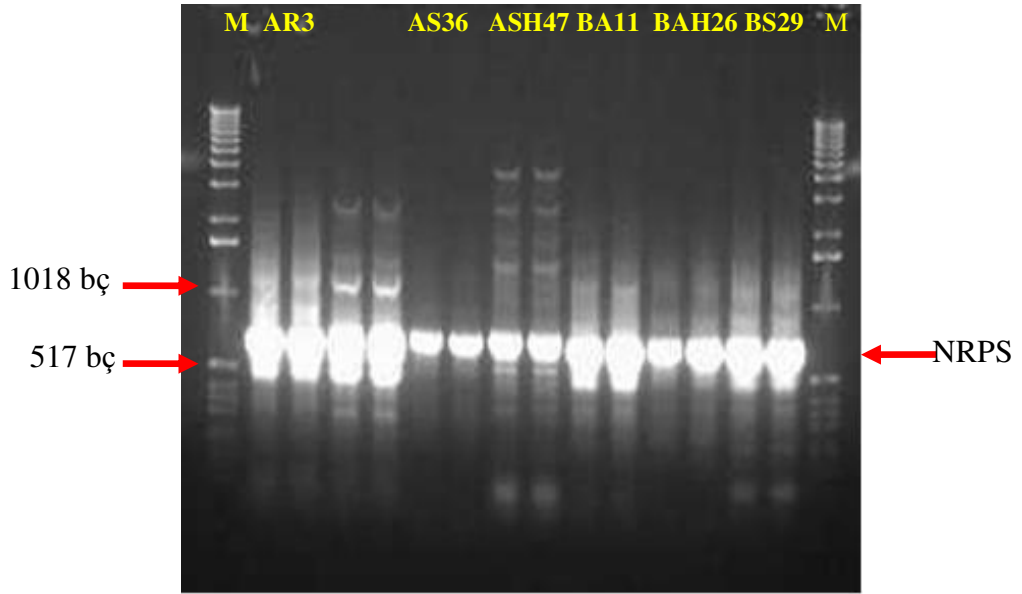


Şekil 4.5. *Streptomyces* sp. AA58 ve *Streptomyces* sp. AAH66 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.

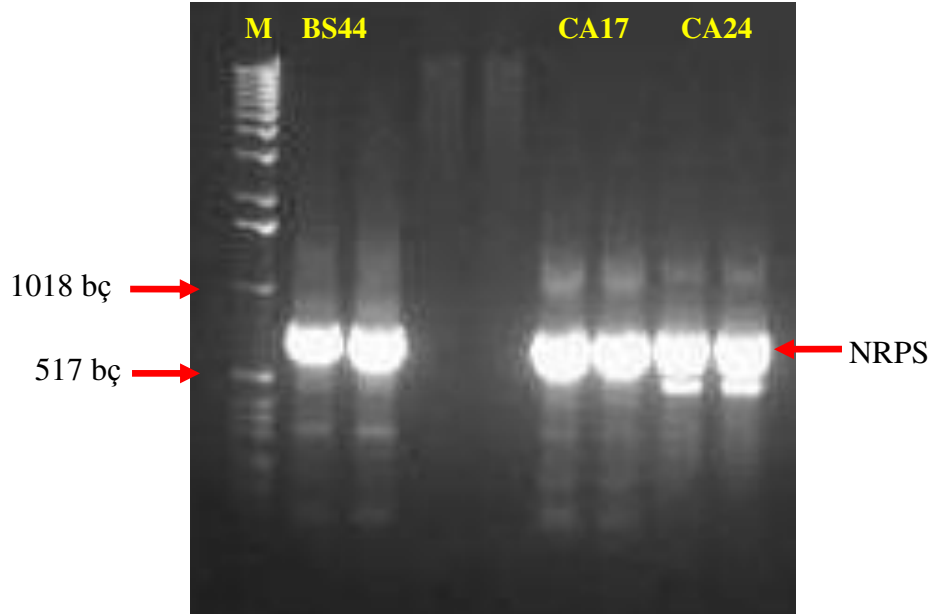


Şekil 4.6. *Streptomyces* sp. CS41 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.

Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 55°C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 2 mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* türleri AR3, AS36, ASH47, BA11, BAH26, BS29 (Şekil 4.7), BS44, CA17, CA24 (Şekil 4.8)'de amplifikasyon gözlemlendi.



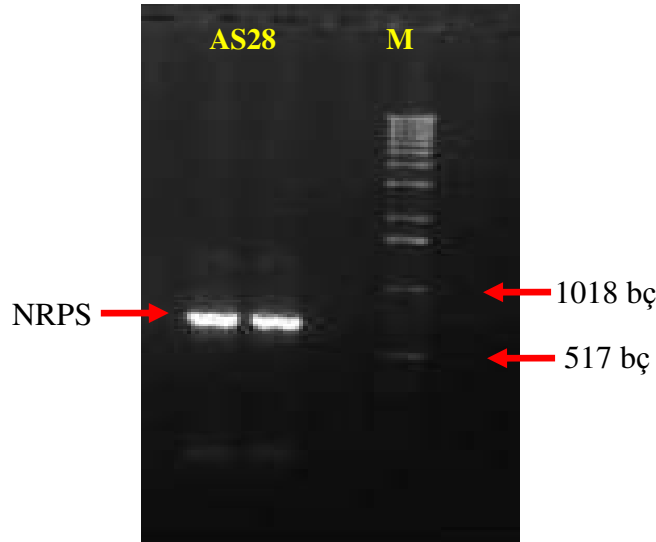
Şekil 4.7. *Streptomyces* sp. AR3, *Streptomyces* sp. AS36, *Streptomyces* sp. ASH47, *Streptomyces* sp. BA11, *Streptomyces* sp. BAH26 ve *Streptomyces* sp. BS29 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.



Şekil 4.8. *Streptomyces* sp. BS44, *Streptomyces* sp. CA17 ve *Streptomyces* sp. CA24 izolatlarından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 50 °C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 2 mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* sp. AS28 izolatında amplifikasyon gözlemlendi (Şekil 4.9).



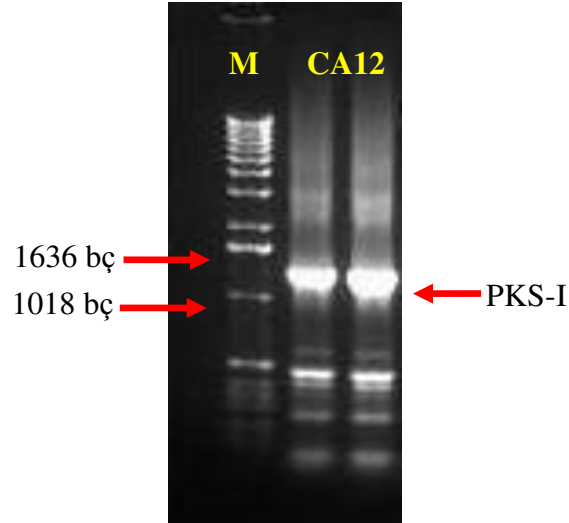
Şekil 4.9. *Streptomyces* sp. AS28 izolatından elde edilen pütatif NRPS adenilasyon domaini.

4.1.3.2. PKS-I Genlerinin Taranması

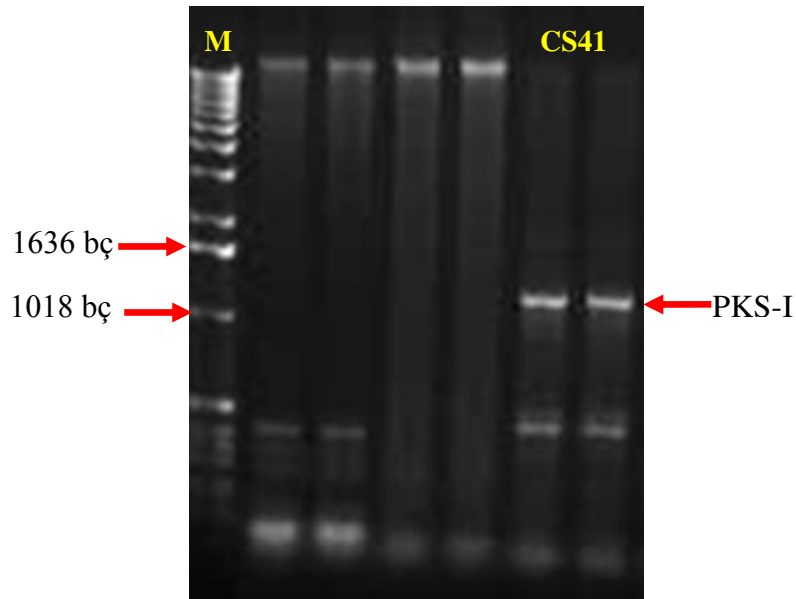
Saflaştırılan genomik DNA'lerden NRPS amplifikasyonu standart koşullardan başlanarak yapıldı. Standart koşullarda ürün elde edilmeyen izolatlarda MgCl₂ miktarı, termal döngü sıcaklıkları ile süreleri ve kullanılan PCR kiti değiştirilerek optimizasyonlar yapıldı.

15 aktinomiset izolatında amplifikasyon için öncelikle standart koşullardan başlandı. Ancak hiçbir izolatta amplifikasyon gözlenmedi.

Bunun üzerine Fermentase firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 53 °C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 3.5 mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* sp. CA12 (Şekil 4.10) ve *Streptomyces* sp. CS41 (Şekil 4.11) izolatlarında amplifikasyon gözlemlendi.

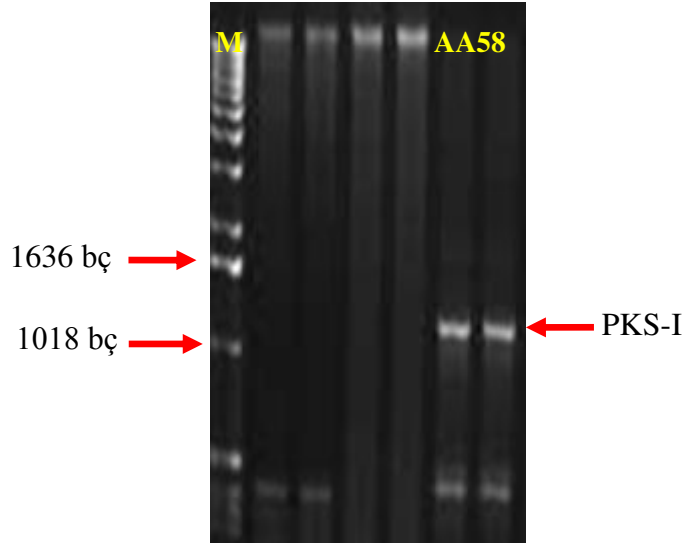


Şekil 4.10. *Streptomyces* sp. CA12 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

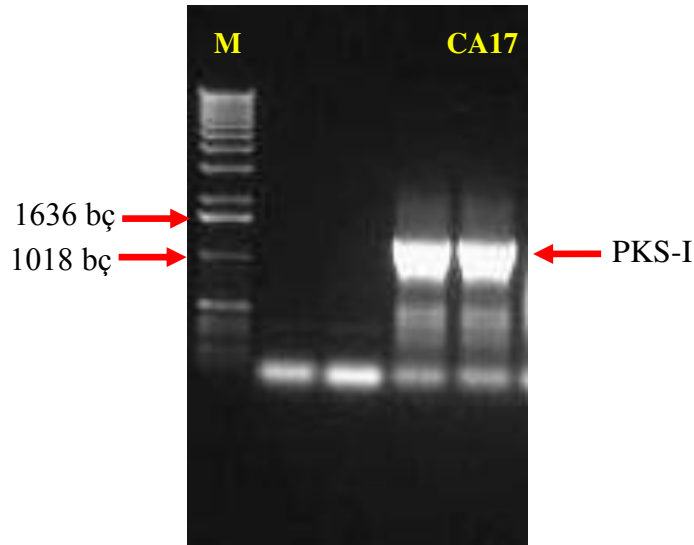


Şekil 4.11. *Streptomyces* sp. CS41 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

Fermentase firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 50 °C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 1.5 mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* sp. AA58 (Şekil 4.12) ve *Streptomyces* sp. CA17 (Şekil 4.13) izolatlarında amplifikasyon gözlemlendi.

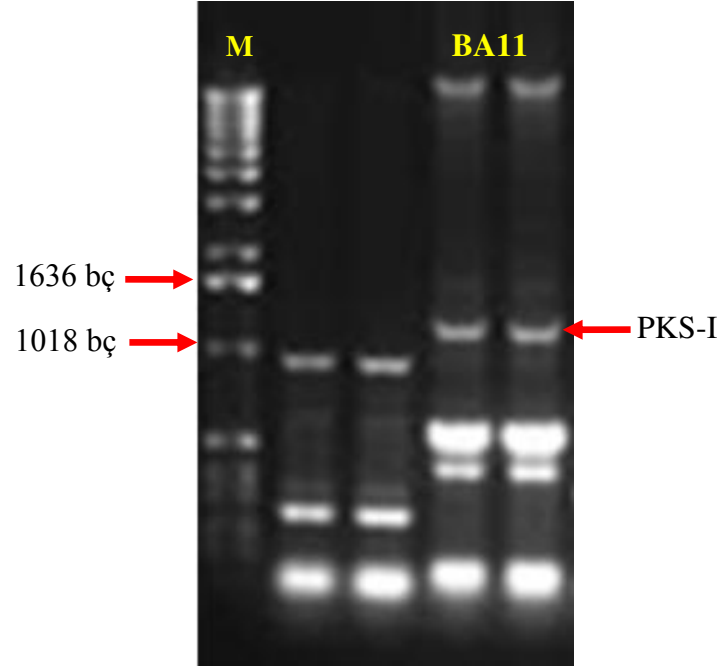


Şekil 4.12. *Streptomyces* sp. AA58 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

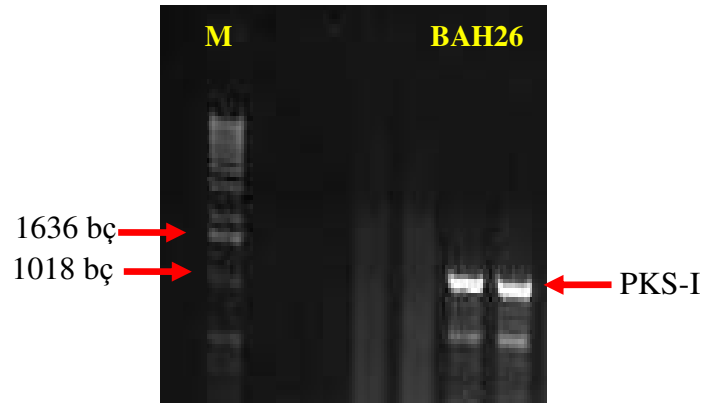


Şekil 4.13. *Streptomyces* sp. CA17 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

3) Fermentase firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 50 °C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 2.5 mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* sp. BA11 (Şekil 4.14) ve *Streptomyces* sp. BAH26 (Şekil 4.15) izolatlarında amplifikasyon gözlemlendi.



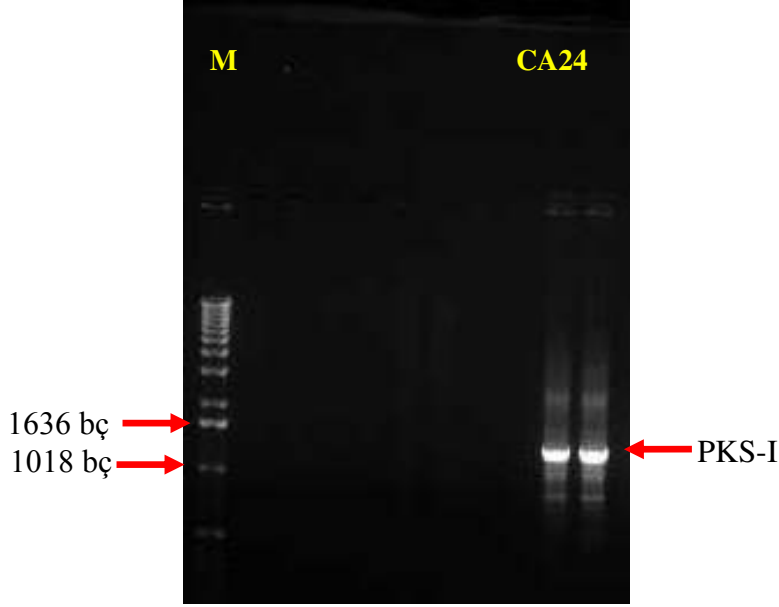
Şekil 4.14. *Streptomyces* sp. BA11 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.



Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. BAH26 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

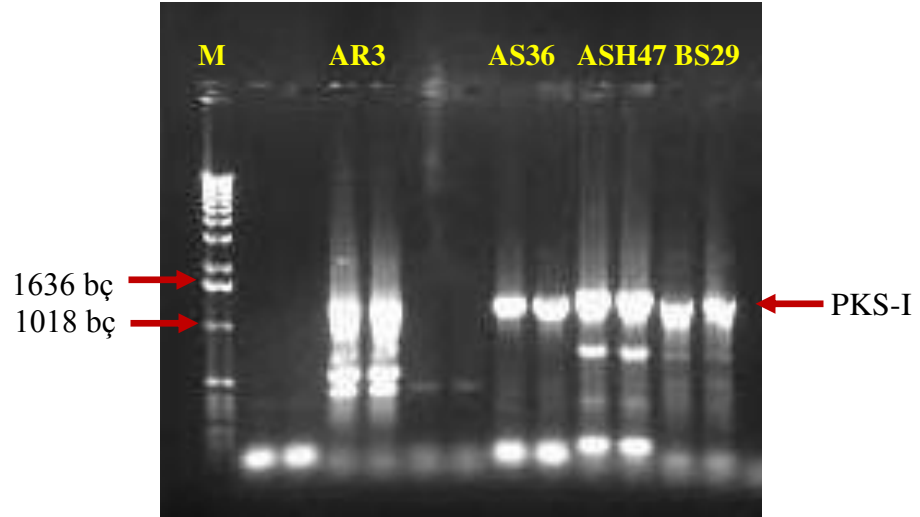
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak bağlanma sıcaklığı 45°C ve MgCl₂'ün final konsantrasyonu 2mM olarak değiştirildiğinde; *Streptomyces* sp. CA24 izolatında amplifikasyon gözlemlendi (Şekil 4.16).

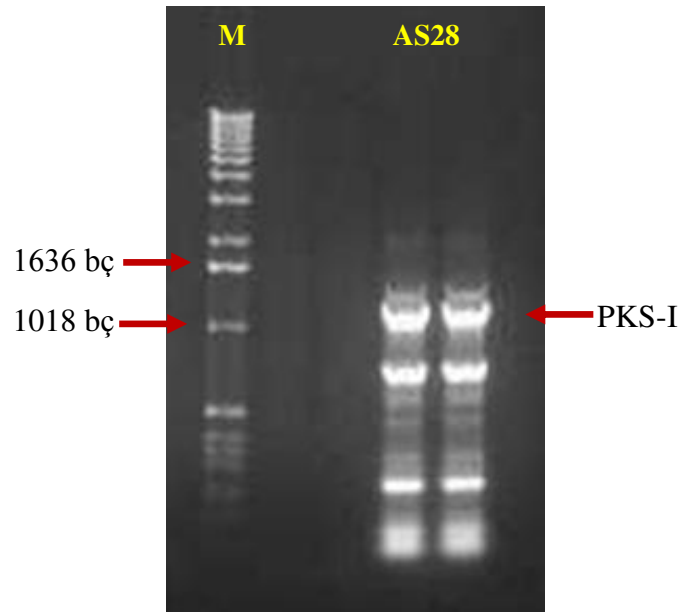


Şekil 4.16 *Streptomyces* sp. CA24 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

Roche firmasından temin edilen Taq polimeraz kullanılarak termal döngüde; denatürasyon süresinin 30 saniyeden 45 saniyeye çıkarılması, bağlanma sıcaklığının 55 °C'den 50 °C' ye, süresinin ise 2 dakikadan 1.5 dakikaya düşürülmesi ve aynı zamanda polimerizasyon süresinin 4 dakikadan 3 dakikaya düşürülmesi sonucunda; *Streptomyces* türleri AR3, AS36, ASH47, BS29 (Şekil 4.17) ve AS28 (Şekil 4.18)'de amplifikasyon gözlemlendi.



Şekil 4.17. *Streptomyces* sp.AR3, *Streptomyces* sp. AS36, *Streptomyces* sp. ASH47, *Streptomyces* sp. BS29 izolatlarından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.



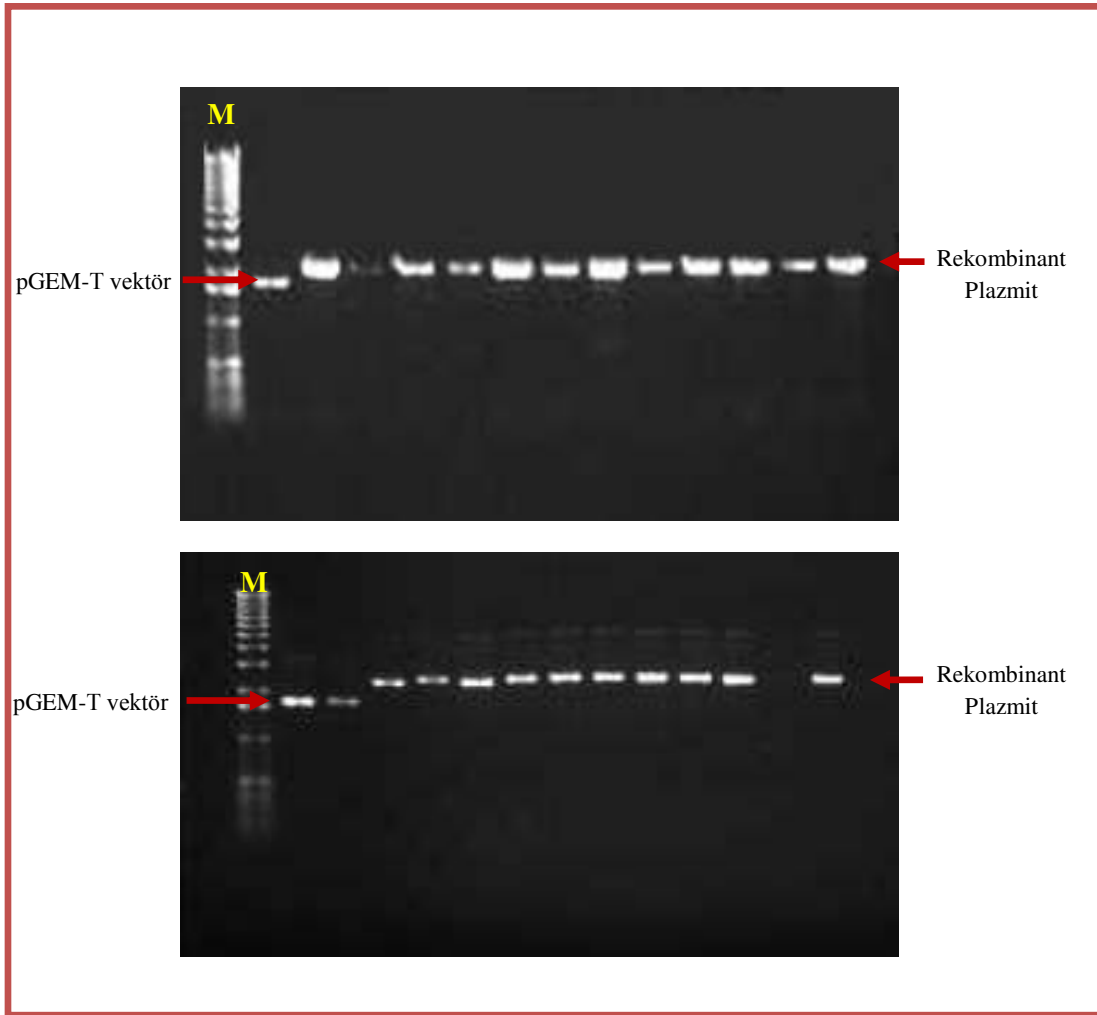
Şekil 4.18. *Streptomyces* sp.AS28 izolatından elde edilen pütatif PKS-I KS domaini.

NRPS ve PKSİ genlerinin tarandığı 15 *streptomyces* türü için yapılan optimizasyonlar sonucunda 15’inde NRPS ve 12’sinde PKSİ genlerinin varlığı tespit edildi.

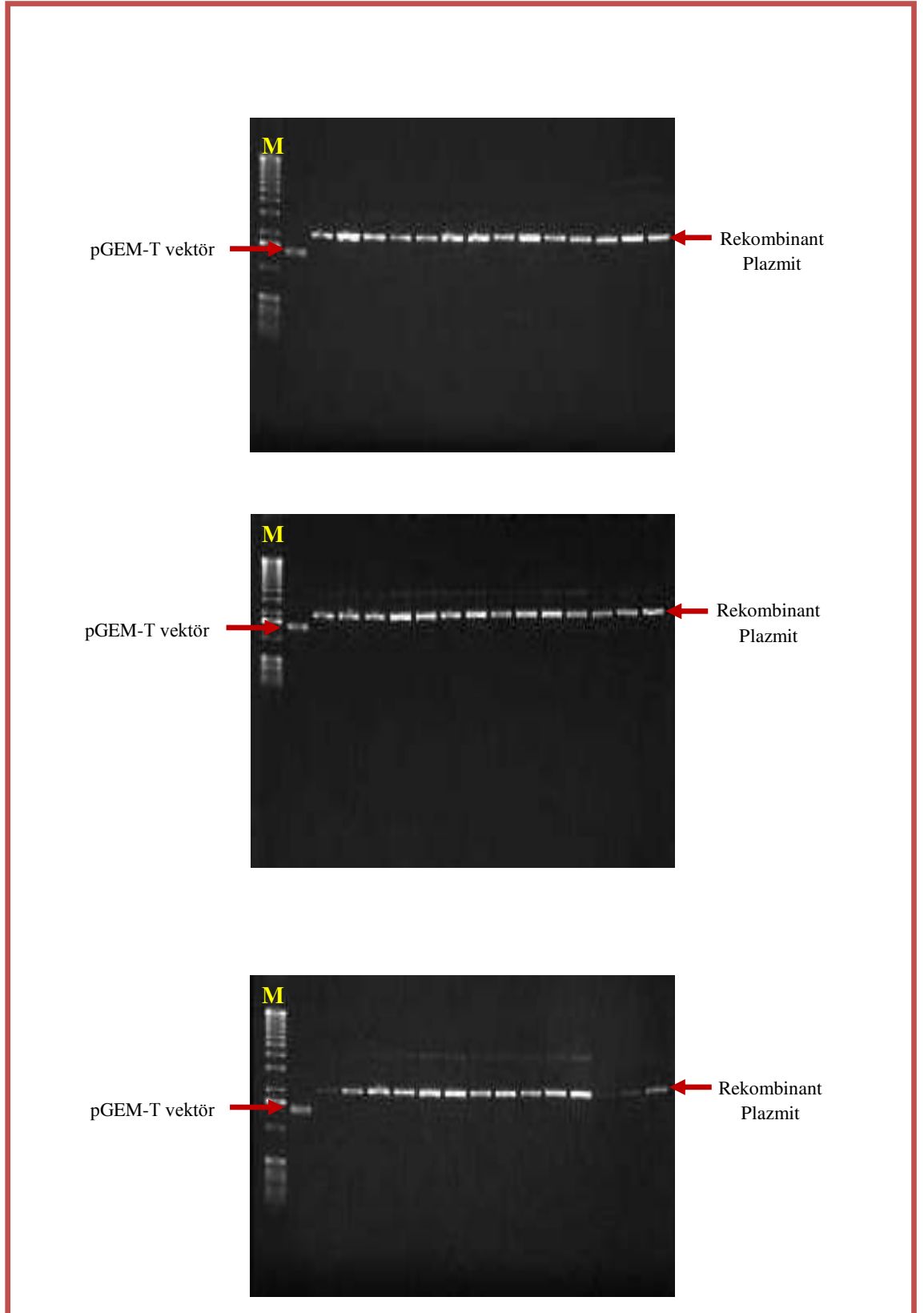
4.1.4. Klonlama

4.1.4.1. NRPS Genlerinin Pütatif Adenilasyon Domaininlerinin Klonlanması

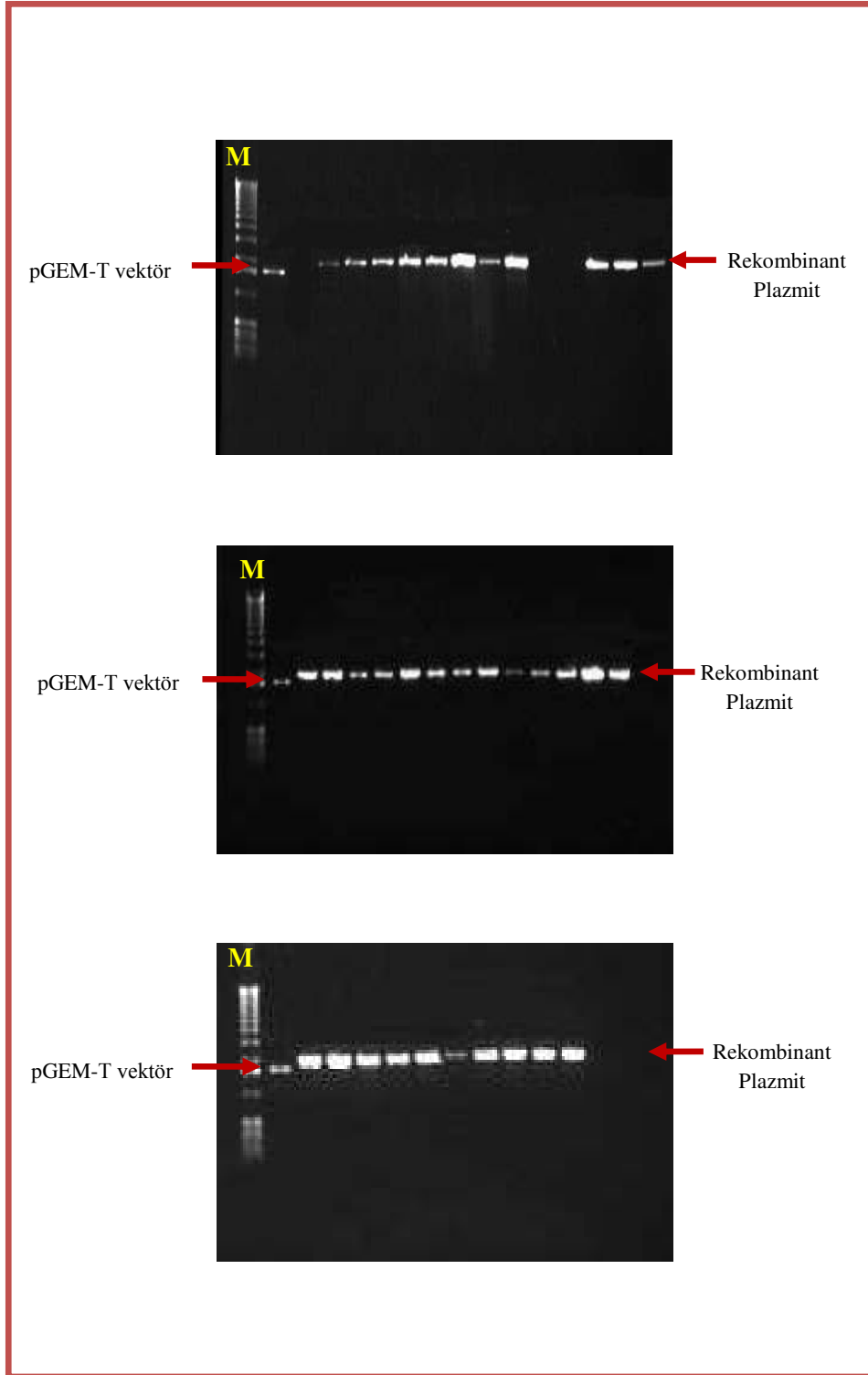
Streptomyces sp. CS41, *Streptomyces* sp. AA58 ve *Streptomyces* sp. BA11 izolatlarından elde edilen NRPS genlerine ait adenilasyon domainleri klonlanarak mini gen kütüphaneleri kuruldu. Oluşan mavi beyaz kolonilerden rekombinant plazmitleri taşıyan beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı. Rekombinant plazmitlerin jel fotoğrafları Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.19. *Streptomyces* sp. CS41 izolatı, NRPS adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.



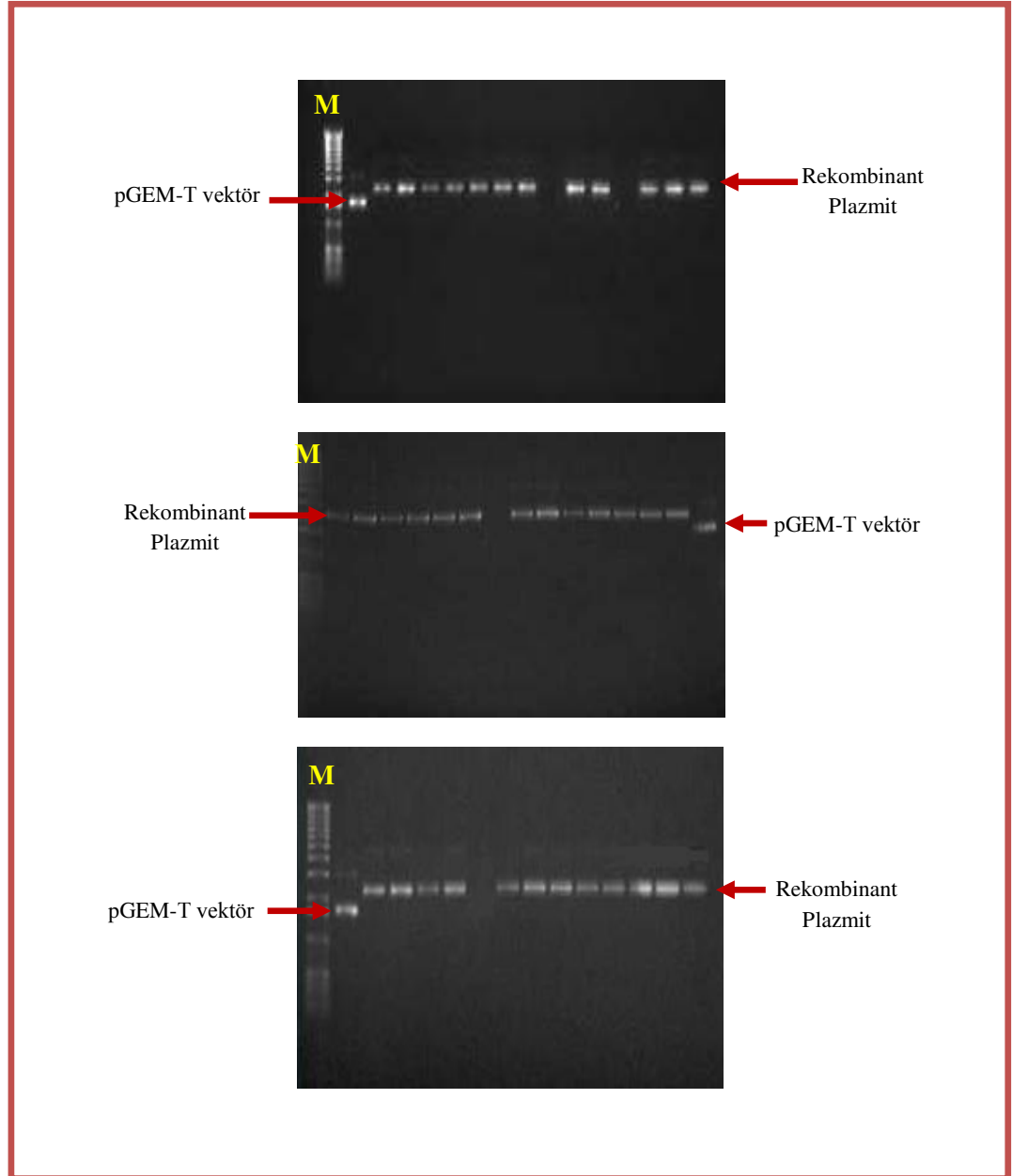
Şekil 4.20. *Streptomyces* sp. AA58 izolatu, NRPS adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler (sekansları devam ediyor).



şekil 4.21. *Streptomyces* sp. BA11 izoladı, NRPS adenilasyon domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler (sekansları devam ediyor).

4.1.4.2. PKS-I Genlerinin Pütatif Ketosentaz Domainlerinin Klonlanması

Streptomyces sp. CA17 izolatından elde edilen PKS-I geni ketosentaz domainleri klonlanarak mini gen kütüphanesi kuruldu. Oluşan mavi beyaz kolonilerden rekombinant plazmitleri taşıyan beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı. Rekombinant plazmitlerin jel fotoğrafları Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. *Streptomyces* sp. CA17 izolatı, PKS-I KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1.5. Biyoinformatik İncelemeler

4.1.5.1. *Streptomyces* sp. CS41 NRPS Kütüphanesinin İncelenmesi

Kütüphaneden 28 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. CS41 izolatının NRPS genlerinin 6 farklı A domaini içerdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.2 ve 4.3’de grıpladığımız bu klonların Genbankasında sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdiği NRPS genlerinin ait olduğu bakteriler görölmektedir.

Çizelge 4.2. *Streptomyces* sp. CS41 izolatının NRPS kütüphanesinden seçilen klonların BLASTn sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank no	Homoloji	Seçilen klon sayısı
1	<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1 (gb CP002047.1)	% 71	12
2	<i>Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae</i> (dbj AB432446.1)	% 74	2
3	<i>Streptomyces endus</i> (dbj AB432579.1)	% 74	6
4	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 (emb AL646052.1)	% 68	1
5	<i>Streptomyces coeruleoprınus</i> (dbj AB432675.1)	% 85-91	3
6	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32 (gb CP002000.1)	% 71	1

Çizelge 4.3. *Streptomyces* sp. CS41 izolatının NRPS kütüphanesinden seçilen klonların BLASTx sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank no	Homoloji	Seçilen klon sayısı
1	<i>Streptomyces cf. griseus</i> XylebKG-1 (ref ZP_08236938.1)	% 57	12
2	<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004 (ref YP_003468051.1)	% 40-42	2
3	<i>Streptomyces endus</i> (dbj BAH68616.1)	% 74	6
4	<i>Lutiella nitroferrum</i> 2002 (ref ZP_03697987.1)	% 56	1
5	<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712 (emb CCA60345.1)	% 82	3
6	<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07 (ref YP_003752508.1)	% 60	1

Homoloji sonuçlarına göre özellikle 1, 2, 4 ve 6. grupta tespit edilen NRPS A domainlerinin, şimdiye kadar rapor edilmemiş domainler ile düşük akrabalık derecesi

dikkat çekicidir. Bu domainlerin yeni antibiyotik gen kümelerinin bir parçası olabilme olasılığı büyüktür.

4.1.5.2. *Streptomyces* sp. CA17 PKS-I Kütüphanesinin İncelenmesi

Yaklaşık 28 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda *Streptomyces* sp. CA17 izolatının 2 farklı PKS gen kümesi içerdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.4 ve 4.5’de grupladığımız bu klonların Genbankasında sırasıyla BLASTn ve BLASTx incelemeleri sonucunda, en yakın homoloji gösterdikleri PKS-I genlerinin ait olduğu bakteriler görülmektedir.

Çizelge 4.4. . *Streptomyces* sp. CA17 izolatının PKS-I kütüphanesinden seçilen klonların BLASTn sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank no	Homoloji	Seçilen klon sayısı
1	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0197 (dbj AB431744.1)	% 77	34

Çizelge 4.5. . *Streptomyces* sp. CA17 izolatının PKS-I kütüphanesinden seçilen klonların BLASTx sonuçları

Grup ismi	Organizma/Genbank no	Homoloji	Seçilen klon sayısı
1	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ATCC 53653 (ref ZP_07294852.1)	% 74	34

Homoloji sonuçlarına göre *Streptomyces* sp. CA17 izolatının sahip olduğu PKS-I geninin *Streptomyces hygroscopicus*’un NRPS genleri ile hatırı sayılır bir homoloji olduğu görülmektedir. Böyle bir homolojiye rağmen ; *Streptomyces* sp. CA17’nin bu gen kümesinden sentezlenen ketid bileşiğinin başka ek domainleri sayesinde başka bir bileşiği kodlayan genin bir parçası olma olasılığı da mevcuttur.

4.2. Tartışma

Biyolojik aktiviteye sahip olan doğal ürünler günümüzde ilaç keşfi için vazgeçilmez kaynaklardır (Savic ve Vasiljevic 2006). Biyolojik aktiviteye sahip peptid ve poliketid bileşiklerinin çoğu ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) ve poliketid sentazlar (PKS) tarafından sentezlenmektedir. NRPS ve PKS'ler mikroorganizmalar tarafından üretilen önemli biyoaktif bileşiklerin büyük bir kısmının sentezinde gerekli biyosentetik sistemlerdir (Ayuso-Sacido ve Geniloud 2005). Sekonder metabolitlerin üretimi için farklı doğal ortamlarda yayılım gösteren aktinomiset cinslerinin genetik potansiyelini araştırmış olan bazı çalışmalar mevcut olup (Metsa-Ketela ve ark. 1999, Metsa-Ketela ve ark. 2002, Ayuso-Sacido ve Geniloud, 2005, Gonzales ve ark. 2005, Savic ve Vasiljevic, 2006), bunlar içerisinde *Streptomyces* türlerinin biyoaktif sekonder metabolit üreticisi olarak yüksek frekansa sahip olduğu bulunmuştur.

Sekonder metabolit sentezinden sorumlu NRPS ve PKS-I genlerini lokal aktinomiset türlerinde taramayı amaçladığımız çalışmamızda 15 organizmanın 15'inde NRPS (% 100) ve 12'sinde (% 80) PKS-I amplifikasyonu elde edildi. Çalıştığımız organizmalarda bileşik üretme potansiyelinin olması, aktinomiset türlerinin mikrobiyal sekonder metabolit üretimi açısından zengin organizma grubunu teşkil ettikleri şeklindeki görüşü destekler niteliktedir.

Çalışmamızda kullanılan organizmalar antimikrobiyal aktivite yönünden farklı besiyerlerinde test edilmiştir (Yılmaz ve ark. 2008, Özakin 2010). 15 organizmadan *Streptomyces* sp. AA58, *Streptomyces* sp. AR12, *Streptomyces* sp. ASH47, *Streptomyces* sp. CA12, *Streptomyces* sp. CA17, izolatları M2 ve TSB besiyerlerinde, *Streptomyces* sp. BAH26 izolatu sadece TSB besiyerinde, daha önceki iki besiyerinde antimikrobiyal aktivite göstermeyen *Streptomyces* sp. AS28, *Streptomyces* sp. BS29 izolatları ise Benett +Glukoz besiyerinde, *Streptomyces* sp. CS41 izolatu ise her üç besiyerinde üretildikleri zaman antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Sonuç itibarıyla çalışmamızda kullanılan 15 organizmadan 9'unda antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Yaptığımız genetik taramada tüm izolatlarda NRPS, 12'sinde PKS-I geni açısından biyoaktif sekonder metabolitlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu da genetik taramanın kimyasal taramaya üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Gonzalez ve arkadaşları (2005), likenlerden izole ettikleri 337 aktinomiset izolatının sekonder metabolit

biyosentetik genlerini tespit etmeyi amaçladıkları çalışmalarında PKS-I, PKS-II ve NRPS genlerini dejenere PCR primerleriyle taramışlardır. İzolatlarının; % 62.6'sında PKS-I, % 64.7'sinde PKS-II ve % 58.5'inde NRPS biyosentetik genlerini amplifiye etmişlerdir. Bu rakamlara rağmen, klasik kültür koşullarında tüm izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri % 27 olarak tespit edilmiştir. Bu ve buna benzer birçok çalışmada gösterildiği gibi; standard fermentasyon koşullarında üretimi başarısızlıkla sonuçlanmış olan biyoaktif metabolitin, genom analizleri ile ortaya çıkarılması ve doğrudan rasyonel yaklaşımlarla yeni biyoaktif doğal bileşiklerin tespiti, ekspresyonu ve saflaştırılmasının mümkün olabileceği görülmektedir. Genom projeleri tamamlanmış *Streptomyces*'lerin kültür ortamında ürettiklerinden çok daha fazla miktarda NRPS ve PKS bileşiklerine sahip olduğu saptanmıştır (Ehrenreich ve ark. 2005). Genom projesi tamamlanmış *S. avermitilis*'in 29 adet potansiyel sekonder metabolit şifrelediği, bunların 8'inin NRPS'lerin ürettiği peptidler, 11'inin ise PKS'ler tarafından üretilen poliketid bileşikleri olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal tarama ile genetik tarama karşılaştırıldığında genetik tarama sonucu, sahip olunan bileşik oranının daha yüksek olmasının en önemli sebeplerinden biri organizmaların genomlarında varolan kriptik genlerdir. Genetik tarama ile bunların tespiti; sadece klasik kültür koşullarında sentezlenemeyen bu bileşikleri ortaya çıkarmakla kalmayıp aynı zamanda kimyasal tarama metodları ile tespit edilemeyecek kadar az üretilen bileşiklerinin keşfedilmesine de yol açacaktır.

Kurulan kütüphanelerden seçilen klonlarımız içerisinde Genbankasında şimdiye kadar bulunmuş olan bileşiklerin genleri ile anlamlı oranda bir homolojiye rastlanmayan örnekler de bulunmuştur. Bunların ürünlerinin yeni bileşikler olabileceği sanılmaktadır. *Streptomyces* sp. CS41 NRPS kütüphanesinden yaklaşık 28 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda bu izolatın 6 farklı grup içerdiği tespit edildi. BLASTx incelemeleri sonucunda 6 gruptan 1. grubun *Streptomyces cf. griseus* XylebKG-1 NRPS adenilasyon domaini ile % 57, 2. grubun *Xenorhabdus bovienii* SS-2004 peptid sentetazı ile yaklaşık % 40 homoloji gösterdiği saptandı. Bu klonların düşük homolojilerinden dolayı yeni gen kümelerine ait A domainleri olabileceği düşünülmektedir. Dikkat çekici diğer gruplar olan 4. gruptaki klonların *Lutiella nitroferrum* 2002'nin NRPS A domaini ile % 56, ve 6. gruptaki klonların ise *Ralstonia solanacearum* PSI07'nin bir peptid bileşiği olan siderofor sentetazı ile % 60 homoloji

gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde düşük homolojilerden dolayı, bunların yeni genler için aday olabileceği sonucuna varıldı. BLASTx incelemeleri amino asit homolojisine dayalı olduğu için sonuçların protein protein benzerliğini ortaya koyması açısından önemlidir. Biyosentetik gen kümelerine ait domainlerde % 70'in altında olan BLASTx homolojilerinde, incelenen dizilimin yeni bir gene ait olduğu daha önce araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (Zhang ve ark. 2009, Komaki ve ark. 2009)1.

CA17 PKS-I kütüphanesinden 38 klonun seçilerek sekanslanması sonucunda bu izolatın yalnızca tek çeşit PKS-I geni içerdiği tespit edildi. Bunun ise *S. hygroscopicus* ATCC 53653 oleandomisin poliketid sentazı ile % 74 homoloji gösterdiği tespit edildi. Dolayısıyla *Streptomyces* sp. CA17 izolatının da bir oleandomisin ya da bunun benzer bir türevi başka bir bileşiği sentezleme potansiyeli tespit edilmiştir.

NRPS ve PKS-I genlerinin BLAST sonuçlarına dikkat edilirse NRPS gen çeşitliliğinin PKS'ye göre daha fazla olduğu görülmektedir. İzolatlarımızın ürettiği peptid bileşiklerinin ketid bileşiklere göre daha fazla olduğu sonucuna varıldı.

Düşük homoloji tespit ettiğimiz klonlar ilgili izolatın genomunda NRPS genlerinin taranmasında prob olarak kullanılacaktır. Bu strateji ile genomda , yeni bileşik sentezinden sorumlu genlere ulaşılması amaçlanmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bilinen mikrobiyal metabolitlerin % 60'ından fazlası aktinomisetler tarafından üretilmekte olup, bunların içerisinde *Streptomyces* cinsinin türleri geniş varyetede ve mükemmel kapasitede biyoaktif madde üreticisi olarak dikkat çekmektedirler. Çok fazla sayıda *Streptomyces* izole edilerek tarama çalışmaları yapıldığında yeni izolatlardan yeni metabolitlerin bulunma şansı giderek artmaktadır (Lancini ve Lorenzetti 1993, Sossio ve ark. 2000). Antimikrobiyal aktivite gibi basit testler, *Streptomyces*'ların diğer aktinomiset cinsleri olan *Actinoplanes* ve *Streptosporangium* gibi diğer cinslere nazaran oldukça yüksek bir biyoaktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Sekonder metabolitlerin üretimi için farklı doğal ortamlarda yayılış gösteren aktinomiset cinslerinin genetik potansiyelini araştırmış olan bazı çalışmalar mevcut olup (Metsa-Ketela ve ark. 1999, Ayuso-Sacido ve Genilloud, 2005, Gonzales ve ark. 2005, Savic ve Vasiljevic, 2006), bunlar içerisinde *Streptomyces* türlerinin biyoaktif sekonder metabolit üreticisi olarak yüksek frekansa sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaların yanısıra, genom projeleri tamamlanmış *Streptomyces*'ların kültür ortamında ürettiklerinden çok daha fazla miktarda NRPS ve PKS genlerine sahip olduğu saptanmıştır (Ehrenreich ve ark. 2005).

Bu amaçlar doğrultusunda yapmış olduğumuz çalışmalarda;

- 1) 15 *Streptomyces* izolatının tamamında NRPS, 12'sinde PKS-I genlerinin varlığı ortaya konuldu.
- 2) 3 izolatın (*Streptomyces* sp. AA58, *Streptomyces* sp. BA11, *Streptomyces* sp. CS41) NRPS, 1 izolatın (*Streptomyces* sp. CA17) ise PKS-I mini gen kütüphanesi kuruldu.
- 3) Yapılan DNA dizi analizi sonucunda; *Streptomyces* sp. CS41 izolatının 6 farklı NRPS A domaini içerdiği, *Streptomyces* sp. CA17 izolatının ise tek çeşit PKS-I KS domaini içerdiği tespit edildi.
- 4) *Streptomyces* sp. CS41 izolatının NRPS kütüphanesinde tespit edilen 6 farklı grup içerisinde 4 grupta (1, 2, 4 ve 6) BLASTx analizlerinde % 70'in altında homoloji gösterdiği tespit edildi. Bu durum bunların yeni bir gene ait olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılacak hibridizasyon çalışmalarında, domainler homolog prob olarak kullanılarak biyosentetik genler bakterilerin genomlarında taranacaktır.

6. KAYNAKLAR

Aghighi, S., Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Batayneh, S., Saadoun, I. 2004. First Report of Antifungal Spectra of Activity of Iranian Actinomycetes Strains Against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3: 463-471.

Ayuso, A., Desmond, C., Gonzalez, I., Salazar, O., Anderson, A., Genilloud, O. 2005. A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide 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.

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 metabolite. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 34: 443-456.

Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.*, 58(1): 1-26.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerden, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K.D., Harris, 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’Niel, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147.

Büber, E., Açıkan, 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*, 25: 1-51.

Chater, K. F. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. 1993. *Annu.Rev.Microbiol.*, 47: 685-713.

Chater, K. F., Losick, R., 1996. The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. Edited by, Shapiro, C.H., Dworkin, M. Bacteria as Multicellular Organisms. Oxford University Press, 93-114, Oxford.

Cortes, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J and Leadlay, P. F. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature, 348: 176-178.

Cosmina, P.; Rodriguez, F.; de Ferra, F.; Grandi, G.; Perego, M.; Venema, G.; van Sinderen, D. 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 8: 821–831.

Demain, A. L. 1980. Do antibiotics function in nature. Search, 11: 148-151.

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

Döhren, H. V., Dieckmann, R., Vrancic, M. P. 1999. The nonribosomal code. Chemistry and Biology, 6: R273–R279.

Ehrenreich, I. M., Waterbury, J. B., and Webb, E. A. 2005. Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine and Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. Applied and Environmental Microbiology, 71 (11): 7401–7413.

Ensign, J.C., 1978. Formation, properties and germination of actinomycete spores. Ann.rev.Microbiol., 32: 185-219.

Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F. 1969. Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme bound thioester intermediates. Proceedings of the National Academy of Science , 63:1335-42.

Gontang, E. A., Gaudencio, S. P., Fenical, W. and Jensen, P. R. 2010. Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 76 (8): 2487–2499.

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 Ecology, 54: 401–415.

Goodfellow, M., and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol, 37: 189–216.

- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., and Saiz Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in Karstic caves in northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J. Microbiol. Methods*, 36: 115–122.
- Grünwald, J., Marahiel, M. A. 2006. Chemoenzymatic and templatedirected synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev.*,70(1): 121-146.
- Hagedorn, C. 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol*, 32:368–375.
- Hakvag, S., Fjaervik, E., Josefsen, K. D., Ian, E., Ellingsen, T. E. and Zotchev, S. B. 2008. Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway *Mar. Drugs.*, 6: 620-635.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K., and Nonomura, H. 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.*,66: 367–373.
- Henis, Y. 1986. Soil microorganisms, soil organic matter and soilfertility. Editörler: Chen, Y. and Avnimelech, Y. In *The role of organic matter in modern agriculture*. Martinus Nijhoff, 159–168, Dordrecht.
- Herbert, R. B. 1989. *The biosynthesis of secondary metabolites*. 2nd Ed. Chapman and Hall. New York. USA.
- Hopwood, D. A., Sherman, D. H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 37-66.
- Huang, C. H., Lin, Y. S., Yang, Y. L., Huang, S. W., Chen, C.W. 1998. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol.Microbiol.*,28 (5): 905-916.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. 2003. Complete Genome Sequence and Comparative 39 Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature Biotechnology*, 21: 526-531.
- Janso, J. E. and Carter, G. T. 2010. Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (13): 4377–4386.
- Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J., Li, X. 2007. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 405–416.

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

Jimenez, J. T., Sturdikova, M., Sturdik, E. 2010. Bioactive marine and terrestrial polyketide and peptide secondary metabolites and perspectives of their biotechnological production. Acta Chimica Slovaca, 3 (1): 103-119.

Kargouni, A. D., Vionis, A.P., Baker, P. W., Wellington, E. M. H. 1993. The effect of soil moisture content on spore germination, mycelium development and survival of a seeded streptomycete in soil. Microbiol.Releases, 2: 47-51.

Katz, E., and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis and possible functions. Bacteriol Rev., 41: 449-474.

Keating, T. A., Walsh, C. T. 1999. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. Current Opinion in Chemical Biology, 3: 598–606.

Kahn, M. R., and Williams, S. T. 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soils. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. Soil Biol. Biochem, 7: 345–348.

Khosla, C., 1997. Harnessing the Biosynthetic Potential of Modular Polyketide Synthases. Chem. Rev., 97: 2577-2590.

Khosla, C. 1998. “Combinatorial biosynthesis of “unnatural” natural products.” Edited by, Gordon, E. M and Kerwin, J. F. Jr. Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery. Wiley-Liss. Inc., 401-417. New York, USA.

Kieser, H.M., Kieser, T., Hopwood, D.A. 1992. A combined genetic and physical map of the *c. coelicolor* A3(2) chromosome. J.Bacteriol., 174 (17): 5496-5007.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. ve Hopwood, D.A. 2000. Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, sayfa.625 England.

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

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

Komaki, H., Izumikawa, M., Ueda, J., Nakashima, T., Khan, S. T., Takagi, M. 2009. Discovery of pimaricin analog JBIR-13, from *Streptomyces* bicolor NBRC 12746 as predicted

by sequence analysis of type I polyketide synthase gene Appl Microbiol Biotechnol., 83:127–133.

Korn-Wendisch, F., Kutzner, H. J. 1992. The family Streptomycetaceae. Editörler: Balows, A., Trüper, H. G. Dworkin, M., Harder, W, Schleifer, K. H. In *The Prokaryotes*. Springer, 921-995, New York.

Kuczek, K., Pawlik, K., Kotowska, M., Modarski, M. 1997. *Streptomyces coelicolor* DNA homologous with acyltransferase domains of polyketide synthase gene complex. FEMS Microbiology Letters, 157: 195-200.

Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. Ann Agric Environ Med., 4: 113-121.

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

Lancini, G., Lorenzetti, R. 1993. Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Plenum Press, sayfa: 235, New York.

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

Liman, R. 2007. *Streptomyces coelicolor*'daki metabolik değişiklikler üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. 121.

Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A., Chen, C. W. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. Mol.Microbiol.,10 (5): 923-933.

Mayfield, C. I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. Soil Biol. Biochem., 4: 79-91.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H. D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthetasis. Chem Rev., 97: 2651–2673.

McBride, M.J., Ensing, J.C. 1987. Effect of Intracellular Trehalose Content on *Streptomyces griseus* Spore, Journal of Bacteriology, 169: 4995-5001.

McCarthy, A. C. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. J.Antibiot.,34: 544-550.

McCarthy, A.J., and Williams, S.T. 1990. Method for studying theecology of actinomycetes. Methods Microbiol, 22: 533–563.

McCarthy, A.J., Williams, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in environment-a review. Gene, 115: 189-192.

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

Metsa-Ketela, M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. 2002. Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal DNA Genes from Various *Streptomyces* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4472–4479.

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

Monaghan R. L., Tkacz J. S. 1990. Bioactive microbial products: Focus upon mechanism of action. *Annual Review of Microbiology*, 44: 271-301.

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

Mootz, H. D., Schwarzer, D., Marahiel, M. A. 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem.*, 3: 490-504.

Morita, R.Y. 1985. Starvation and miniaturisation of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state. Editörler: Fletcher, M., and Flodgate, G.D. *Bacteria in their Natural Environments*. Academic Press, 111-130, London.

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.

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

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66: 1022-1037.

Okami, Y., and Hotta, K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. Edit by Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. In *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, 33–67, London.

- Omura, S. 1986. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol. Rev.*, 50: 259–279.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki Y., and Hattori, M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS*, 98 (21): 12215–1222.
- Oskay, M., Tamer, A. 2009. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Düny, 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 Detecting Genes That Encode Ttype I polyketide Synthases in Genomes of Actinomycetes. *Russian jornal of Genetics*, 41 (5): 473-478.
- Özakın S. 2010. Lokal *Streptomyces* izolatlarının biyoaktif sekonder metabolitlerinin kimyasal olarak taranması. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 142
- Paradkar,A., Trefzer, A., Charaburtt, R. And Diane, S. 2003. *Streptomyces* Genetics: A Genomic Perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (1): 1-27.
- Pathom-aree, W., Stach, J .E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181–189.
- Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. 2011. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 141-172.
- Roskoski, R., J., Kleinkauf, H., Gevers, W., Lipmann, F. 1970. Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. *Biochemistry.*; 9: 4846-4851.
- Savic, M., Vasiljevic, B. 2006. Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 33: 423–430.
- Schwarzer, D., Finking, R. A., Marahiel, M. A. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nature Product Reports* 20: 275–287.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D. J., Chen, M., Murrell, J. M. 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 27: 378–385.

Sieber, S. A., Marahiel, M. A. 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev.*, 105: 715-738.

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

Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 47: 479-491

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

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

Strohl, W. R. 1997. Industrial antibiotics: today and the future. Edited by, Strohl, W. R., Dekker, M. *Biotechnology of antibiotics*, Marck Dekker, 1-43. New York, USA.

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

Takizawa, M., Colwell, R. R., and Hill, R. T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 997–1002.

Vining L. C. 1990. Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44: 395-427.

Walsh, C.T., Chen, H. W, Keating, T. A, Hubbard, B. K, Losey, H. C, Luo, L. S., Marshall, C.G., Miller, D.A., Patel, H. M. 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines.. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (5): 525-534.

Waksman, S. A. 1950. The Actinomycetes: their nature, occurrence, activities and importance. *Chronica Botanica Company*, Sayfa:266, WALTHAM, MASS., U.S.A.

Waksman, S.A. 1967. Distribution, isolation and methods of study. in the actinomycetes—a summary of current knowledge. *The Ronald Press Company*, sayfa:265, New York.

Weber, T., and Marahiel, M. A. 2001. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, 9: R3-R9.

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.

Wohl, D. L., McArthur, J. V. 1998. Actinomycete-flora associated with submerged freshwater macrophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26: 135–140.

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

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

Zazopoulos, E., Huang, K., Staffa, A., Liu, W., Bachmann, B. O., Nonaka, K., Ahlert, J., Thorson, J. S., Shen, B., Farnet, C. M. 2003. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol.*, 21: 187–190.

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

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

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

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

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: İlknur PORSUK

Doğum Yeri: DİYARBAKIR

Doğum Tarihi: 06-10-1988

Medeni Hali: BEKAR

Yabancı Dili: İNGİLİZCE

EĞİTİM DURUMU (KURUM VE YIL)

İlköğretim: NURİYE ÇELEBİESER İLKÖĞRETİM OKULU- 2002

Lise: NAMIK KEMAL LİSESİ-2005

Lisans: DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ - 2009