



# ***Streptomyces clavuligerus* Proteomiği-Optimizasyon**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 114Z648**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof.Dr. Gülay Özcengiz**

Bursiyer(ler):

Elif Tekin İşlerel

Ayça Çırçır

## ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen *Streptomyces clavuligerus* proteomiği-Optimizasyon başlıklı ve 114Z648 kodlu 1002 projemizde amacımız *Actinomycete* ailesi üyesi olan ve antibiyotik üretimi bakımından büyük bir önem arzeden *Streptomyces* türlerinden *S. clavuligerus*'un antibiyotik üretim artışının gözlemlendiği süreç içerisinde total protein izolasyonlarının farklı yöntemler kullanılarak yapılması ve elde edilen total proteinlerin 2D jelde yürütülerek protein profillerinin karşılaştırılmasıdır. Böylelikle, fokuslanma, protein konstrasyonu ve protein izolasyon verimi bakımından en uygun yöntem seçilerek, ileride yapacağımız *Streptomyces clavuligerus* ve farklı mutantlarının proteomik ölçekte karşılaştırılmasını içeren çalışmamız için, bu projede belirlemiş olduğumuz ve optimize edilmiş metot kullanılacaktır. Bu optimizasyon henüz draft sekansı belirlenmiş (Song vd., 2010; Medema vd., 2010) fakat proteomik profili araştırılmamış olan *Streptomyces clavuligerus* türü için bir ilk niteliği taşımakta ve ileride yapılacak çalışmaların sonuçlarını önemli ölçüde etkileyecek olması bakımından da büyük önem arz etmektedir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. GİRİŞ .....	1
1.1. <i>Streptomyces</i> ve İkincil Metabolizma .....	1
1.2. Sefamisin C Üretimi .....	3
1.3. İkincil Metabolizmanın Regülasyonu .....	6
1.4. Proteomik .....	8
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
2.1. Kültür Besiyeri ve Koşulları .....	9
2.2. Protein Ekstraksiyon Yöntemleri .....	10
2.2.1. TCA/Acetone Çöktürme Yöntemi .....	10
2.2.2. Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I.....	10
2.2.3. Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II (Fenol II).....	11
2.2.4. Etanol-Aseton Yöntemi .....	11
2.3. Protein Konsantrasyon Tayini .....	12
2.4. 2D Jel Elektroforezi.....	12
2.5. Görüntü Analizleri ve Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	12
3. BULGULAR-TARTIŞMA/SONUÇ .....	12
KAYNAKLAR.....	30

## ŞEKİLLER

Şekil 1. Penisilin, sefalosporin, sefamisin ve sefabasin biyosentetik yolu.....	4
Şekil 2. <i>S.clavuligerus</i> 'ta aspartat yolu .....	5
Şekil 3. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel .....	14
Şekil 4. Fenol ekstraksiyon yöntemi I sonrasında elde edilen 2D jel .....	15

Şekil 5. Fenol ekstraksiyon yöntemi II sonrasında elde edilen 2D jel .....	16
Şekil 6. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel .....	21
Şekil 7. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel.....	21
Şekil 8. Fenol I ve TCA-aseton çöktürme yöntemleri ile elde edilen jellerin karşılaştırılmış görüntüsü. .....	22
Şekil 9. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel .....	23
Şekil 10. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel.....	23
Şekil 11. Fenol ekstraksiyon yöntemi I sonrasında elde edilen 2D jel .....	25
Şekil 12. Fenol ekstraksiyon yöntemi II sonrasında elde edilen 2D jel .....	25
Şekil 13. Fenol ekstraksiyon yöntemi I (Fenol I) ve Fenol Ekstraksiyon yöntemi II (Fenol II) ile elde edilen jellerin karşılaştırılmış görüntüsü.....	27
Şekil 14. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel.....	28
Şekil 15. Fenol II yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel.....	28

## GRAFİKLER

Grafik 1. TCA-aseton, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I, Etanol-aseton Yöntemi, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II için protein konsantrasyonları .....	17
Grafik 2. TCA-aseton, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II için Delta2D programı ile karşılaştırma sonucu elde edilen 2D jellerinde gözlemlenen protein sayısı .....	18
Grafik 3. y eksenini TCA-aseton ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen proteinleri, x eksenini Fenol I yöntemi ile elde edilen proteinleri göstermektedir.....	20
Grafik 4. y eksenini Fenol II yöntemi ile elde edilen proteinleri, x eksenini Fenol I yöntemi ile elde edilen proteinleri göstermektedir.....	26

## TABLULAR

Tablo 1. Delta2D kantitatif analiz tablosu.....	19
---	----

## ÖZET

*Streptomyces clavuligerus*, sefamisin C antibiyotiği, bir beta laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ve anti-fungal ve antibakteriyel özelliğe sahip başka klavam bileşikleri üretmektedir. Bu metabolitlerin üretimi ve biyosentezi regülatör metabolizmaya bağlı kompleks regülatör moleküllerin etkileşimini gerektirmektedir (Liras vd., 2008). *Streptomyces*, dirençlilik, transport, biyosentetik enzimleri kodlayan genlere fiziksel olarak bağlı ya da onlar tarafından regüle edilen regülatör genleri içeren ve böylelikle antibiyotik biyosentezini düzenleyen gen kümelerine sahiptir (Chater ve Bibb, 1997; Alexander ve Jensen, 1998).

Proteomik analizler, *Streptomyces*'te daha önce karakterize edilmemiş hücresel dinamikleri ve bileşenleri açığa çıkarma potansiyeline sahiptir. Ayrıca proteomik yöntemler kullanılarak belirli koşullar altında ekspresyon seviyelerinde meydana gelen önemli değişimlerin 2D jel elektroforez yöntemi kullanılarak belirlenebileceği ve böylelikle istenen ikincil metabolitlerin üretiminin artırılmasına yönelik organizmada değişiklikler yapılabileceği gibi (Chaudhary vd., 2013) *Streptomyces*'te antibiyotik üretimi ve ikincil metabolizma ile bağlantı gösteren morfolojik değişim mekanizmaları açığa çıkarılabilir (Zhou vd., 2011).

*S.clavuligerus* türü için henüz belirlenmiş ve optimize edilmiş bir protein ekstraksiyon metodu ve 2D protein profili çıkarma yöntemi yoktur. Bu çalışmada 4 farklı protein ekstraksiyon yöntemi denenerek ve gerektiği durumlarda modifikasyonlar yapılarak, her ekstraksiyon için 2D jelleri hazırlanmış ve jeller birbirleriyle Delta2D programı ile karşılaştırılarak, protein miktarı ve yoğunluğu, ekstraksiyon yönteminin verimliliği açısından en uygun yöntem olan Fenol Ekstraksiyon yöntemi I (Faurobert vd., 2007) seçilmiştir. Böylelikle ileride yapılacak *S.clavuligerus* proteom çalışmalarımızın ilk ve en önemli basamağı için optimize bir yöntem belirlemiş bulunmaktayız.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptomyces clavuligerus*, proteom, protein ekstraksiyon, antibiyotik üretimi

## ABSTRACT

*Streptomyces clavuligerus* produces cephamycin C antibiotic, the  $\beta$ -lactamase inhibitor clavulanic acid, and several other clavam compounds that show antibacterial and antifungal activities. The production and biosynthesis of these metabolites requires the interplay of complex regulatory molecules linked to the regulatory metabolism (Liras vd., 2008). *Streptomyces* possess gene clusters that orchestrate the biosynthesis of these antibiotics, which include resistance, transport, regulatory genes physically linked and regulated with genes encoding biosynthetic enzymes (Chater and Bibb, 1997; Alexander and Jensen, 1998).

Proteomic analyses have the potential to reveal previously uncharacterized components and dynamics in the cellular networks in streptomycetes. Furthermore, the mechanism of differentiation which is correlated with antibiotic production and secondary metabolism in streptomycetes can be understood by proteomics (Zhou et al., 2011) as much as significant changes in expression levels under certain conditions by using 2D gel electrophoresis can be detected and used for engineering the organisms for the increase of secondary metabolites of interest (Chaudhary et al., 2013).

There has been no optimized procedure for the protein extraction from *S. clavuligerus* yet. In this study, 4 different protein extraction methods with the modifications on them if needed were used to prepare 2D gels and those gels were compared with each other by using Delta2D program with respect to their spot number, density and the efficiency of the extraction method so that Phenol Extraction Method I (Faurobert et al., 2007) was chosen as the most suitable protein extraction method, which is the first and the most important step for the *S. clavuligerus* proteomic studies that will be performed in the future.

**Keywords:** *Streptomyces clavuligerus*, proteome, protein extraction, antibiotic production

## 1. GİRİŞ

Gram-pozitif bakteriler genomlarında bulunan GC miktarına göre, düşük GC içeren organizmalar ve yüksek GC içeren organizmalar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Düşük GC içeren organizmalara örnek olarak *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* verilebilir. Yüksek GC içeren Gram-pozitif bakteriler ise *Actinomyces* olarak adlandırılmaktadırlar (Keiser vd., 2000).

*Actinomyces*'ler topraktan ya da denizden izole edilebilirler, bu da onların yeryüzünde çok geniş bir alana yayılmış olduklarını göstermektedir (Fenical ve Jensen, 2006; Durairandiyan vd., 2010). Ayrıca bu organizmalar, *Corynebacteria*'lerdeki gibi çubuk, küre gibi formlarda bulunabilecekleri gibi hif filamentleri oluşturan *Streptomyces* spp. gibi daha kompleks yaşam formları şekillerinde de olabilirler (Chater, 2006). *Actinomyces*'ler, toprakta bulunan bitki, mantar ve hayvansal materyalleri çok çeşitli hücre-dışı enzimler salgılayarak çürütebilirler, bu yüzden de doğadaki besinlerin geri dönüşümünü sağlamada çok önemli bir yere sahiptirler. (Goodfellow ve William, 1983; Keiser vd.,2000). Ayrıca, antibiyotik, antitümör ajanları, bağışıklık-baskılayıcılar, antiviral, antiparazitik ajanlar gibi çok çeşitli ikincil metabolitler üretiliyor olabilmeleri, biyoteknolojik anlamda bu organizmaların önemini büyük ölçüde arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar ile, biyolojik olarak aktif özellik gösteren 23.000 tane ikincil metabolitten 10.000 tanesinin *Actinomyces*'ler tarafından üretildiği ve bunlardan sadece 7.600 tanesinin *actinomyces*'lerin *Streptomyces* cinsi tarafından üretildiği gösterilmiştir (Olano vd., 2008).

### 1.1. *Streptomyces* ve İkincil Metabolizma

*Streptomyces*, genomunda yüksek oranda GC bulundurması ve çok zengin bir ikincil metabolit üretim kapasitesine sahip olması ile bilinen *Actinomyces* familyasının bir türüdür (Hopwood, 2006). *Streptomyces* mantarlarınkine benzer kompleks bir yaşam döngüsü sergiler. Buna göre *Streptomyces* spor formundan hifli yapı oluşumuna geçerken öncelikle vejetatif hifleri oluşturur fakat çevresel faktörler ve çeşitli sinyaller organizmanın vejetatif hiflerden aerial hif oluşumuna geçmesini sağlar. Aerial hiflerin oluşumu, vejetatif hifleri çözünmesi, diğer bir ifade ile aerial hiflerin onlarla beslenmesi ile gerçekleşir. Aerial hiflerin bittiği uç kısımlarda ise sporlar oluşturulur ve oluşan sporlar bir süre sonra çevreye salınır. Vejetatif hif oluşumundan aerial hif oluşumuna geçiş dönemi genel olarak organizmanın log fazdan durağan faza geçtiği dönemdir. Ayrıca *Streptomyces*'in morfolojik değişimi metabolik aktiviteleri ile iç içe geçmiş durumdadır. Aerial hif

oluşumu sırasında *Streptomyces* kolonileri çok çeşitli ikincil metabolitler ve antibiyotikler üretirler (Elliot vd., 2008).

İkincil metabolitler birçoğu insanaoğlu için büyük önem arz eden farklı biyolojik aktiviteye sahip molekül ve bileşikleri içermektedir. Bazı ikincil metabolitler antibiyotik aktiviteye sahipken, diğerleri diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyebilir ki bu da bu organizmaları klinik çalışmalar için oldukça önemli kılmaktadır. Bir diğer kısmı enzim inhibitörleri ya da antitümör ajanları hatta bitki üremesini stimüle eden fitohormonları içerebilmektedir (Liras ve Martín, 2005).

*Streptomyces*'in bu kadar zengin ikincil metabolit üretim kapasitesine sahip olmasının öncelikli nedenleri, genomlarının diğer mikroorganizmalara kıyasla uzun olması ve genomlarının uç bölgelerinde kol bölgeleri olarak da adlandırılabilen kısımların bulunması ve bu kol bölgelerinde ikincil metabolit üretimini sağlayan genlerin bulunmasıdır. Buna ilaveten kromozomları lineer olmakla birlikte, genomları genellikle birden fazla lineer plasmid içermektedir ve bu plasmidler de ikincil metabolit üretimini sağlayan farklı ya da ortolog genleri barındırmaktadır (Hopwood 2006; Chater ve Kinashi, 2007; Chen, 2007; Medema vd., 2010).

*S. clavuligerus* genomu 6,7 Mb uzunluğunda bir lineer kromozom ve 4 lineer plasmidten oluşmaktadır (pSCL1 10.266 bp & 71,96% G + C, pSCL2 149.326 bp & 70,07% G + C, pSCL3 (1442.792 bp & 70,77% G + C, pSCL4 1796.117 bp & 71,85% G + C). Buna rağmen 6,7 Mb uzunluğundaki kromozom, yaklaşık 8 Mb uzunluğunda kromozomlara sahip olan diğer *Streptomyces* türlerinininkiler ile kıyasladığında kısa bir yapıya sahiptir. Ayrıca *Streptomyces* genom sekansı ile en az 6 rRNA operon, 66 tRNA geni ve 7.898 protein-kodlayan genin varlığı gösterilmiştir (Song vd., 2010). Buna ilave olarak, Medema vd. (2010) sekansını yaptıkları 1,8 Mb uzunluğundaki megaplasmid'in 25 olası sekonder metabolit kodlayan gen kümesi içerdiği ve 6,7 Mb uzunluğundaki kromozomun da buna benzer 23 gen kümesi içerdiğini bulmuşlardır. Bu gen kümelerinden birçoğunun henüz bilinmeyen ikincil metabolitleri kodladıkları ve bunların yeni biyoaktif metabolitler olma ihtimali olduğunu belirtmişlerdir.

*Streptomyces clavuligerus*'un ikincil metabolizması sonucu ürettiği bilinen antibiyotikler şöyle sıralanabilir (Liras vd., 2008):

Sefamisin C: geniş spektrumlu ve  $\beta$ -laktamlara dirençli  $\beta$ -laktam antibiyotığıdır.



Clavulanik asit: (3R, 5R) stereokimyaya sahip klavam yapısı içeren ve güçlü  $\beta$ -laktamaz aktivitesi gösteren buna rağmen zayıf antibiyotik özelliğinde olan bir  $\beta$ -laktam antibiyotığıdır.

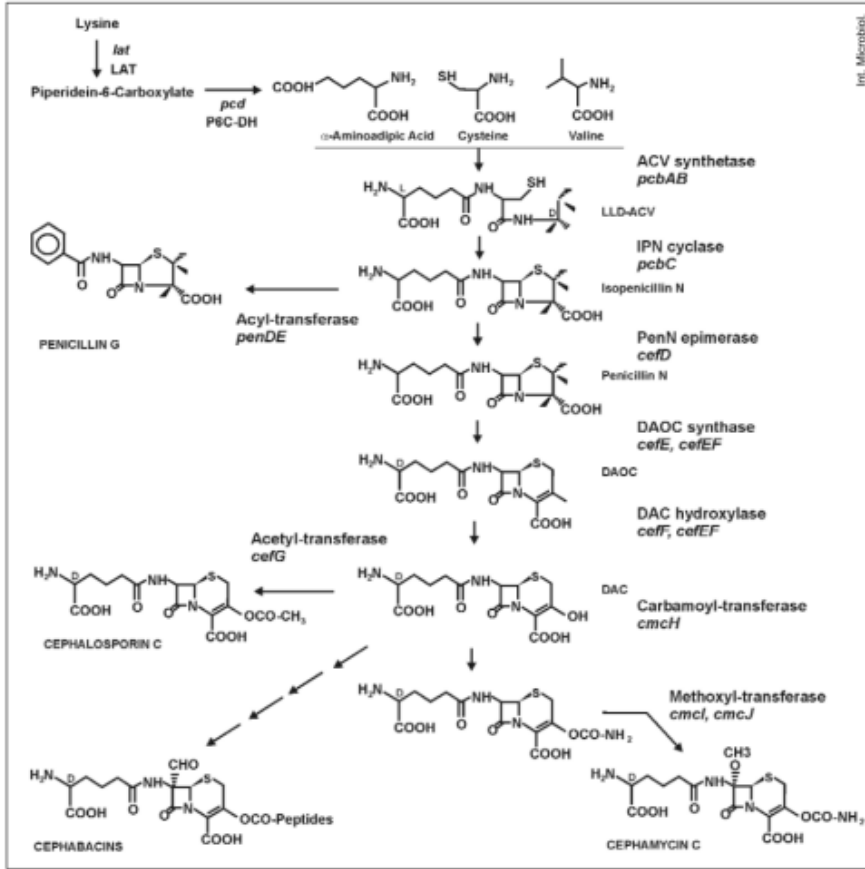
Beş farklı klavam bileşiği (klavam-2-karboksilat, 2-formiloksimetilklavam, 2-hidroksimetilklavam, hidroksietilklavam, alanilklavam): (3R, 5R) stereokimyası sergileyen klavulanik asidin aksine bu bileşikler (3S,5S) stereokimyasına sahip olduklarından  $\beta$ -laktamaz aktivitesi göstermemekte fakat çeşitli antibakteriyel ve antifungal özellikler sergilemektedirler.

Holomisin: pirodin yapısına ve antitümör aktiviteye sahip olan bir antibiyotik türüdür (Liras vd., 2008).

## 1.2. Sefamisin C Üretimi

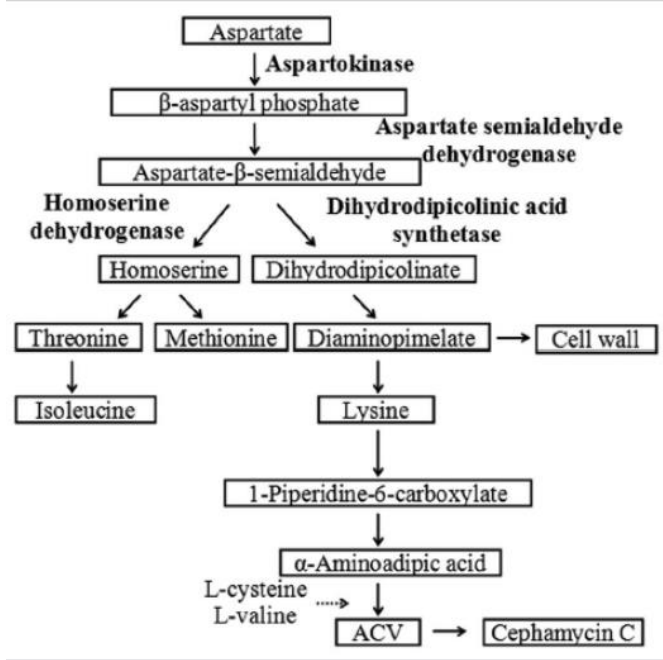
Sefamisin C hem Gram+ hem de Gram – organizmalara karşı etkin olan geniş spektrumlu bir  $\beta$ -laktam antibiyotığıdır. Sefamisin C antibiyotığını öne çıkaran en önemli özelliklerden bir tanesi penisiline dirençli bakteriler tarafından üretilen  $\beta$ -laktamazlara karşı direnç göstermesidir. Bunun sebebi, diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin aksine, sefamisinin  $\beta$ -laktam bisiklik yapısındaki sefam çekirdeğinin 7 $\alpha$  pozisyonunda metoksillenmesidir (Liras, 1999; Kagliwal vd., 2009).

Sefamisin C, 9 basamaklı bir yol sonunda üretilmektedir. Ayrıca *Streptomyces clavuligerus* sefamisin C üretimini gerçekleştirirken klavulanik asit üretimini de yapmakta ve her iki antibiyotığın üretimi için gerekli biyosentetik genleri genomunda yaklaşık 60 kb'lık bir süper küme içinde barındırmaktadır. Klavulanik asidin üretimi aynı zamanda sefamisin C üretimi için de gerekli olan genler tarafından kontrol edilmekte, diğer bir ifade ile sefamisin C üretimi gerçekleşmediği sürece klavulanik asit üretimi gerçekleşmemektedir (Liras, 1999; Liras vd., 2008) (Şekil 1).



Şekil 1. Penisilin, sefalosporin, sefamisin ve sefabasin biyosentetik yolu (Liras ve Martin, 2006).

9 basamaklı üretim yolundan önce, gerekli öncüllerin üretimi için lizin aminoasidinin üretilmesi ve ardından üretilen lizinin sefamisin C üretimi için gerekli L- $\alpha$ -aminoadipik aside dönüştürülmesi gerekmektedir. Lizin üretimi ve daha sonra gerçekleşen 9 basamaklı yol genel olarak aspartat yolu olarak bilinmektedir (Şekil 2). Aspartat yolunda öncelikle L-lizin, L-metionin, L-treonin, L-izolösin ve hücre duvarı öncülü olan mezodiaminopimelat (DAP)'ın üretimi sağlanmaktadır. Aspartokinaz ve aspartat semialdehid dehidrogenaz enzimleri başlangıç reaksiyonlarını katalizlemektedirler ve sonuç olarak aspartat  $\beta$ -semialdehid'in üretimini sağlamaktadırlar. Aspartat  $\beta$ -semialdehid'in üretiminin ardından 2 metabolik yol oluşur, bunlardan bir tanesi lizin üretimini sağlarken diğeri homoserin üretimini gerçekleştirir (Mendelovitz ve Aharonowitz, 1982).



Şekil 2. *S.clavuligerus*'ta aspartat yolu (Özcengiz ve ark., 2010)

Lizin üretiminden sonra, sefamisin C üretimini sağlayacak 9 basamaklı metabolik yol başlamaktadır. Bunların ilk iki basamağı tüm  $\beta$ -laktam üreticilerinde ortak olarak kullanılır ve metabolik yolda antibiyotik aktiviteye sahip olan ilk bileşik olan izopenisilin N üretilir. Bu yoldaki ilk enzim, bir ribozomsuz peptid sentaz olan  $\delta$  -(L-  $\alpha$  -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valin (ACV) sentetaz (ACVS)'dir. ACV sentetazlar, *pcbAB* genleri tarafından kodlanan yaklaşık 460 kDa ağırlığında olan büyük çok-fonksiyonlu proteinlerdir (Martín vd., 2000).

İkinci enzim ise *pcbC* geni tarafından kodlanan ACV siklaz olarak da bilinen izopenisillin N (IPN) sentazdır. IPN sentazlar aktiviteleri  $Fe^{2+}$ , moleküler oksijen ve askorbata ihtiyaç duyan intermoleküler dioksijenazdırlar. Bu enzimler ACV tripeptidinden 4 hidrojeni ayırarak izopenisilin N bisiklik yapısını oluştururlar (Liras ve Martín, 2006).

İzopenisilin N, tüm sefalosporin ve sefamisin üreticileri tarafından D-izomeri olan penisilin N'e dönüştürülür ve bu aktivitede sorumlu enzimi kodlayan gen *cefD*'dir ve sefamisin C gen kümesi içinde bulunmaktadır (Coque vd., 1993; Kovacevic vd., 1990). *cefD* tarafından kodlanan protein yaklaşık 43 kDa ağırlığında pridoksal fosfata bağlı enzimdir. Bundan sonraki basamak penisilin'in 5 üyeli tiazolidin halkasının açılarak 6 üyeli dihidrotiazin halkasına dönüştürülmesini

içermektedir. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim ekspanfaz olarak da bilinen deasetoksisefalosporin C (DAOC) sentazdır ve ürün olarak deasetilsefalosporin C (DAC)'yi oluşturur. Sefamisin üreten actinomycete'lerde DAC ürünü, CmcI-CmcJ kompleks proteinleri tarafından hidroksilasyon ve C-7 pozisyonuna bir metil grubunun transfer edilmesi reaksiyonlarına maruz kalarak son ürün olan sefamisin C üretiminin gerçekleşmesini sağlar (Coque vd., 1995)

### 1.3. İkincil Metabolizmanın Regülasyonu

Sefamisin C gen kümesi *pcbAB*, *pcbC*, *cefD*, *cefE*, *cefF*, *cmcl*, *cmcJ*, *cmcH* (Kovacevic vd., 1990; Liras, 1999) gibi biyosentetik enzim kodlayan genleri içermektedir. Sefamisin C üretimini sağlayan gen kümesi *lat* ve *pcd* gibi  $\alpha$ -aminoasit öncülünün biyosentezinden sorumlu genler, *bla*, *pcbR* ve *pbp74* gibi  $\beta$ -laktamaz direncinden sorumlu genler, sefamisin transportunu sağlaması muhtemel olan *cmcT* geni, SARP regülatör genini kodlayan *ccaR* geni gibi genleri içermektedir. Buna ilave olarak sefamisin C antibiyotik üretimini sağlayan gen kümesi ile birlikte 60 kb'lık süper gen kümesini oluşturan klavulanik asit kümesi ise *ceaS2*, *bls2*, *cas2*, *pah2*, *gcaS* ve *car* (Arulanantham vd., 2006; Baggaley vd., 1997) gibi biyosentetik enzim kodlayan genleri, *pbpA* ve *pbp2* gibi penisilin bağlayan genleri (Ishida vd.,2006) ve *claR* gibi LysR tipi regülatör genleri içermektedir (Liras ve Rodríguez-García, 2000).

*Streptomyces*'te antibiyotik üretimini sağlayan faktörler genel olarak şöyle sıralanabilir: Pleiotropik regülatör faktörler, metabolik yola özgü faktörler,  $\gamma$ -bütirolakton sinyal sistemi.

#### Pleiotropik regülatör faktörler:

Pleiotropik faktörler sadece ikincil metabolizmayı etkilemeyip aynı zamanda morfolojik değişimi de kontrol etmektedirler. Örneğin, *S.coelicolor*'da birçok *bld* geninin hem sporulasyon hem de antibiyotik üretimini kontrol ettiği bilinmektedir. *bldA* geni çok seyrek görülen UUA kodonunun translasyonu için gerekli olan Leu tRNA'yı kodlamaktadır (Lawlor vd., 1987) ve bu genin yokluğunda aktinorhodin ve undesilprodijiozin antibiyotiklerini üretememekte ve bald (sade) adı verilen fenotip özelliğini sergilemektedir (Champness, 1998; White ve Bibb, 1997). *Streptomyces*'te farklı biyolojik etkiye sahip neredeyse 150 genin ekspresyonunun *S.coelicolor*'da bulunan *bldA* geni tarafından etkilendiği düşünülmektedir. Bunlardan da sadece iki tanesi bir TTA kodonu içermektedir, bu da TTA içeren transkripsiyonel faktörlerin polisistronik operonlar üzerindeki ileri seviye regülasyonunu göstermektedir (Hesketh vd.,2007). *S.clavuligerus*'ta sefamisin C ve klavulanik asit üretimini kontrol eden metabolik yola özgü regülatörlerden CcaR

da TTA kodonu içermektedir. Fakat *S.clavuligerus*'un *bldA* mutantında, aerial misel oluşumu gözlenmemesine rağmen, *ccaR* geninin translasyonunda ve antibiyotik üretiminde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Trepanier vd., 2002). TTA kodon içeriği mistranslasyonda önemli bir etkiye sahiptir. Bu da TTA kodonunun TTAC ya da TTAT sekansları gibi içeriklerin (Belcourt ve Farabaugh, 1990) mistranslasyonunda etkin bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu yüzden CcaR, *bldA*'den bağımsız translasyon *ccaR* TTA'dan sonraki dizide (in-frame) mistranslasyon ya da dizi-kayması (frame-shift) tarafından kontrol ediliyor olabilir (Trepanier vd., 2002; Liras vd., 2008).

*S. clavuligerus*'ta sefamisin C ve klavulanik asit üretimini etkilediği ilk bulunan gen *bldG* genidir (Bignell vd., 2005). *ccaR* geni ekspresyonunun *bldG*'ye bağlı olduğu bulunmuş ve bu da antibiyotik üretiminin kontrol aşında *bldG* geninin *ccaR* ve *claR* genlerinden önce geldiğini göstermektedir. *bldG* geni bir anti-anti sigma faktörü kodlamaktadır (Duncan ve Losick, 1993; Bignell vd., 2000; Bignell vd., 2005) ve bu anti-anti sigma faktörü, bir sigma faktörünü hedef alan anti-sigma faktörünün aktivitesini kontrol etmektedir. Bu sigma faktörü, regülasyon sisteminde asıl önemli olan korunumlu serin residue noktasında fosforilasyon ile aktivasyonun sağlanmasına dayanmaktadır çünkü fosforile olmayan formu anti-sigma faktörüne bağlanamamaktadır (Diederich vd., 1994; Bignell vd., 2000).

#### Metabolik yola özgü faktörler:

Sefamisin gen kümesinde bulunan *ccaR* geni *S.clavuligerus*'ta hem sefamisin C hem de klavulanik asit üretimi için gerekli pozitif regülatör faktörünü kodlamaktadır (Pérez-Llarena ve Liras, 1997). Bu genin tahrip edilmesi sonucu klavulanik asit ve sefamisin C üretimi gerçekleşmemekte fakat transkomplementasyon ile tekrar üretim sağlanabilmektedir. CcaR, RedD, ActII-ORF4, AfsR ve Dnrl gibi bilenen diğer regülatörler gibi, SARP grubu proteinler sınıfına girmektedirler (Wietzorrek ve Bibb, 1997). *ccaR* geni biyosentetik genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek antibiyotik üretimini kontrol etmektedir (Kyung vd., 2001). Lizin aminotransferaz (LAT), izopenisilin-N sentaz (IPNS), izopenisilin N epimeraz (IPNE) ve deasetoksisefalosporin C sentaz (DAOCS) gibi sefamisin C üretimini sağlayan biyosentetik enzimler CcaR'a bağlıdır. Bununla birlikte klavulanik asit üretimini kontrol eden *claR* geninin aktivitesi de CcaR proteini tarafından kontrol edilmektedir. *claR* geni klavulanik asit gen kümesi içerisinde bulunmakta, LysR ailesi transkripsiyon aktivatörlerine benzeyen bir proteini kodlamakta ve özellikle klavulanik asit üretimi için gerekmektedir (Paradkar vd., 1998; Perez vd., 1998)., *claR*-

null mutantının klavulanik asit üretimi sırasında üretilen son ara ürün klavamanik asidi biriktirdiği fakat klavulanik asit üretilmediği göz önünde bulundurulduğunda ClaR transkripsiyonel regülatörünün klavulanik asit üretimini sağlayan son basamaktaki genlerin regülasyonundan sorumlu olduğu çıkarımı yapılabilir (Paradkar vd., 1998; Liras vd., 2008).

#### $\gamma$ -bütirolakton sinyal sistemi

*Actinomycete*'lerde antibiyotik üretimi başlangıcını regüle eden  $\gamma$ -bütirolakton tipi otheregülatörler yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Folcher vd., 2001; Horinouchi, 2007). Bu otheregülatörleri 3 gruba ayırmak mümkündür: VB tipi, IM-2 tipi, A faktörü tipi. Kim vd. (2004) bütirolakton reseptörü kodlayan *scaR* genini klonladılar ve IM2 tipi otheregülatör sınıfına girdiğini belirlediler. Santamarta vd. (2005) *brp* isimli aynı *orf*'in klavulanik asit ve sefamisin C üretimindeki fonksiyonunu belirlediler. *S.clavuligerus*'ta bulunan Brp proteini antibiyotik üretimini baskılayıcı özelliğe sahiptir (Takano, 2006). Bunun yanısıra bütirolakton reseptör proteinlerinin bağlandığı ARE sekansları bazı *Streptomyces* türlerinde tanımlanmıştır. *S. clavuligerus*'ta Brp proteinlerinin bağlandığı iki çeşit ARE sekansı belirlenmiştir. Bunlardan bir tanesi kendi promoter bölgesinde bulunan ARE sekansı diğeri ise *ccaR* geninin transkripsiyon start kodununun 815 nt önünde yer alan, aynı zamanda *ccaR* ATG kodonunu 75 nt önünde bulunan ARE sekansıdır (Takano, 2006; Wang vd., 2004). Bu yüzden Brp proteininin *ccaR* geninin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı özelliğe sahip olduğu söylenebilir (Liras vd., 2008).

#### **1.4. Proteomik**

Proteomik, protein ekspresyon seviyelerindeki miktarsal değişimler ve bu değişimlerin ilaç keşfi, teşhis bilimi ve terapi gibi alanlarda uygulanmalarını araştıran bilim dalıdır. Proteomik araştırmaları çok farklı uygulama alanlarında kullanılabilir: Farmasötik, toksikoloji, klinik kimya, biyoloji vs.

“Proteom” analizinin açılımı, “Bir genom, hücre veya doku tarafından ifade edilen tüm protein içeriğinin analizi” olarak verilebilir (Wasinger vd. 1995; Westermeier vd., 2008).

Diğer bir ifade ile proteomik, hücre içinde sentezlenen bütün bir protein setinin regülasyonu, fonksiyonu ve ekspresyonunu anlamak için kullanılabilir. Ayrıca hücredeki proteinler fonksiyonel birimler oldukları için ifadeleri çevresel sinyallerden ve fizyolojik durumlardan önemli ölçüde etkilenmekte ve bu da proteomun transkriptomik ve genomik çalışmalara tamamlayıcı nitelikte olmasını sağlamaktadır (Wilkins vd., 2007; Chaudhary vd., 2013).

Proteom analizinde temel olarak iki-boyutlu (2D) elektroforez sistemi ve ardından proteinlerin tanımlanması için kullanılan MALDI kütle spektrometri teknolojileri kullanılmaktadır (Westermeier vd., 2008).

*Streptomyces*'in kompleks yaşam döngüsü gelişimsel değişimleri içermekte ve değişimler de uzam-mekana bağlı protein ekspresyonunu etkilemektedir. Proteomik analizler streptomyces'te daha önceden karakterize edilmemiş bileşenleri ve hücresel dinamikleri açığa çıkarma potansiyeline sahiptir. Ayrıca *Streptomyces*'te morfolojik değişim evreleri ile ikincil metabolit ve antibiyotik üretimi arasında ilişki söz konusudur ve aralarındaki bu bağlantı proteomik çalışmalar ile daha iyi anlaşılabilir (Zhou vd., 2011). Örneğin, farklı koşullar altında ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimler 2D jel elektroforez yöntemi ile belirlenebilir ve istenilen ikincil metabolitin daha fazla üretimini sağlamak için organizmada metabolik mühendislik için gerekli yardımcı bilgileri açığa çıkarabilir (Chaudhary vd., 2013). *Streptomyces*'te yapılan ilk proteomik çalışmalar özellikle posttranslasyonel modifikasyonların bu organizmalarda önemli ölçüde gerçekleştiği, hatta bu modifikasyonların yaygın bir regülasyon mekanizması olduğunu açığa çıkarmıştır (Maharjan vd.,2008). Proteomun ikincil metabolit üretimini aydınlatmadaki rolünü gösteren bir diğer örnek olarak DXR üretimini arttırmak için *panK* geni entegre edilmiş *S. peucetius* ATCC 27952 suşunun parental suş ile karşılaştırılması ve bekleninin aksine mutant suşun daha düşük oranda DXR üretimi gerçekleştirmesi verilebilir. Bu sonucun sebebini anlayabilmek için 2D jel elektroforez yöntemi kullanılmış ve DrrA proteinin parental suşta 9.4 katı kadar daha fazla ifade edildiği açığa çıkarılmıştır. Yapılan bu çalışma, antibiyotik üretiminin fizyolojisini anlama ve host gelişiminin nasıl modifiye edilebileceği konusunda proteomik yaklaşımların ne ölçüde önemli olduğunu göstermektedir (Song vd., 2011; (Chaudhary vd., 2013).

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Kültür Besiyeri ve Koşulları**

*S.clavuligerus* 220 rpm'de, 28°C'de çentikli erlenmayerlerde Triptik Soy Besiyerinde çoğaltılmıştır.

## 2.2. Protein Ekstraksiyon Yöntemleri

### 2.2.1. TCA/Acetone Çöktürme Yöntemi

Protein ekstraksiyonu için toplanan yaklaşık 30 mL'lik miseller 5 dakika, 4000g'de, +4°C'de santrifüj edilerek toplandıktan hemen sonra sıvı azotta dondurulmuştur. Dondurulan hücreler havan içerisinde sıvı azotla ezildikten sonra, yaklaşık 20-25 mL, 20 mM DTT içeren TCA/aseton ile çözülmüştür. Karışım vortekslenildikten sonra -20°C'de 2 saat boyunca çökmeye bırakıldı. Çöken proteinler, 1 saat boyunca 40.000g'de, +4°C'de çevrilerek supernatant döküldü. Elde edilen pelet üzerine 20mM DTT içeren aseton eklenip vortekslenildikten sonra 45 dk -20°C'de bekletildi ve tekrar 40.000g'de 45 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında pelet üzerine tekrar 20mM DTT içeren aseton eklendikten sonra -20°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün santrifüjle aseton uzaklaştırılarak, saf aseton ile son bir defa yıkama işlemi gerçekleştirilip, pelet Speed-Vac cihazında kurutulmuştur.

### 2.2.2. Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I

Projemizi sunarken Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I (Fenol I) olarak Mot vd. (2007) tarafından önerilen yöntemi kullanmayı amaçlamıştık fakat sunulan bu yöntemde dondurulan hücrelerin direk tamponda çözünmesi *S. clavuligerus* gibi proteolitik aktivitesi yüksek olan organizmalarda ekstraksiyon sonucu elde edilen proteinlerin proteazlar tarafından kırılması ve doğal jelde olmaları gereken yerde görüntülenememeleri ihtimalini arttırmaktadır, bu yüzden bu yöntem çok benzeyen fakat proteolitik aktiviteyi en aza indirebilecek prosedürü öneren Faurobert vd. (2007)'nin yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntem, Faurobert vd. (2007) tarafından önerilen prosedür üzerinde yapılan bazı küçük değişikliklerle gerçekleştirilmiştir. Sıvı azotta dondurularak -80°C'de bekletilen hücreler, havanda sıvı azot ile ezildikten sonra, 1 g'lık hücre, 15mL'lik falkon tüplerde, 3 mL'lik ekstraksiyon tamponu (500 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 700 mM sükröz, 100 mM KCl, pH 8.0) içerisinde çözülerek vortekslenmiş ve ardından 10 dk boyunca buz üzerinde sallanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, ekstraksiyon tamponuna eşit hacimde Tris-tamponlu fenol (pH8.0, Sigma) eklenerek solüsyon, 10 dk boyunca oda sıcaklığında sallanmıştır. Çözünmeyen pelet kısmını ayrıştırmak için, örnek 10 dk boyunca 3200g'de santrifüjlenmiş ve üst fazda kalan fenol kısmı dikkatli bir şekilde yeni tüpe aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen fenol fazı tekrar 3 mL'lik ekstraksiyon tamponu ile ekstrakt edilmiştir. Ardından 3 dk oda sıcaklığında sallanarak bir süre vortekslenmiştir. İyice karıştırılan örnekler 10 dk boyunca 3200 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj



sonrası elde edilen fenol fazı yeni bir tüpe aktararak üzerine 4 katı hacimde çöktürme tamponu (metanol içinde çözünmüş 0.1 M amonyum asetat) eklenmiş, tüp ters-düz çevrilerek karıştırılmış ve en az 4 saat boyunca -20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, proteinler, 10 dk 3200g'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Daha sonra 3 defa soğuk çöktürme tamponuyla, bir defa da soğuk asetonla yıkanarak ve her yıkama işlemi arasında, solüsyon 10 dk 3200 g'de çevrilerek, proteinler çöktürülmüştür. Pelet, Speed-Vac ile ya da 16 saat -20°C de kurutulmuştur.

Kurutulan proteinler rehidrasyon tamponunda (8M üre, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 1% amfolit) çözülmüştür. Çözünme işlemi oda sıcaklığında 2-3 saat boyunca sallanarak, fakat 20dk'lık aralıklarla örneklerin vorteklenmesi ile ya da sonik su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.3. Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II (Fenol II)**

Sıvı azotta dondurularak -80°C'de bekletilen pelet, sıvı azot varlığında havanda ezilerek, üzerine soğuk ekstraksiyon tamponu (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% w/v DTT, 30% w/v sucrose; complete protease inhibitor cocktail (Sigma) eklenerek ardından 30 saniye boyunca vortekslendi. Daha sonra karışıma ekstraksiyon tamponu kadar soğuk Tris tamponlu fenol (pH 8.0) eklenerek örnek 15 dk boyunca 4°C'de vortekslendi. Karışım 3 dk boyunca, 6000 g'de ve 4°C'de santrifüj edildi. Fenol fazı alınarak, üzerine başlangıçtaki kadar ekstraksiyon tamponu konularak, karışım 30 s vortekslendi. Tekrar santrifüj yapılarak (3 dk, 6000 g, 4°C) ve ardından fenol fazı alınarak gece boyunca 5 katı kadar 100 mM ammonium acetate-methanol ile -20°C'de inkübe edildi. Proteinler santrifüj ile çöktürüldükten sonra Speed-Vac ile ya da 16 saat -20°C'de bekletilerek kurutuldu. (Carpentier vd., 2005).

### **2.2.4. Etanol-Aseton Yöntemi**

Sıvı azotta dondurularak -80°C'de bekletilen hücreler, 4 katı kadar hacimde etanol içinde çözüldü. Bir saat sonra, aynı miktarda soğuk aseton eklenerek, proteinler gece boyunca -20°C'de çöktürüldü. Proteinler, 26000g'de, -10°C'de, 15 dk boyunca santrifüj edildikten sonra hücre miktarının 9 katı kadar etanol:aseton:distile su (4:4:1) (v/v/v) ile yıkanarak 6 saat boyunca -20°C'de bekletildi. Proteinler, 26000 g'de (-10°C, 40 dk) santrifüj edilerek iki defa etanol:aseton:distile su (4:4:1) ile yıkandı. Elde edilen pelet oda sıcaklığında gece boyunca bekletilerek ya da Speed-Vac ile kurutuldu (Sebastiana vd., 2013).

### 2.3. Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyonu Ramagli ve Rodriguez (1985) tarafından önerilen prosedür üzerinde bazı değişiklikler yapılarak hesaplanmış ve BSA standart olarak kullanılmıştır. Buna göre, protein standartları ile protein örnekleri 40 µl dH<sub>2</sub>O ve 10 µl HCl'de çözülmüş, toplam hacim 1,8 ml'ye tamamlanarak, tüm örnekler 5 dk ışısız ortamda bekletilmiş ve ardından 595 nm'de absorbans değerleri ölçülerek elde edilen standart grafiğinden protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### 2.4. 2D Jel Elektroforezi

Örnekler rehidrasyon tamponunda çözüldükten sonra, protein konsantrasyonu 400 µL solüsyonda 350 µg protein olacak şekilde ayarlanarak IPG şerit jellerinde (17 cm, pH 4-7, BioRad) 12-16 saat pasif rehidrasyona bırakılmıştır. İzoelektrik odaklama (IEF), Ettan IPGphor3 (GEHealthcare) sisteminde yapılmış ve en az 70,000 Vh voltaj uygulanmıştır.

IEF'ten sonra, jeller eğer hemen kullanılmayacaksa -20°C'de bekletilmiş ya da direk oda sıcaklığında 4mL %2'lik DTT içeren dengeleme solüsyonunda (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M üre, %30 (v/v) gliserol, %1 SDS) 15 dakika bekletilip, daha sonra 4mL'lik %2.5'lik iyodoacetamid içeren ekilibrasyon solüsyonunda (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M üre, %30 (v/v) gliserol, %1 SDS) 15 dk inkübe edilmiştir. İzole edilen proteinler %12'lik akrilamid/bisakrilamid jelleri ile Bio-Rad Cell Sistemi kullanılarak ayrılmıştır. Ayrılan proteinleri görmek için Commassie Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Boyanan jeller Epson Perfection 750V cihazı ve Silverfast yazılımı kullanılarak taranmıştır.

### 2.5. Görüntü Analizleri ve Protein Profillerinin Belirlenmesi

Her bir yöntem için 3 biyolojik replika kullanılmıştır ve Delta 2D 3.4 versiyonu kullanılarak bu 3 biyolojik replika için bir füzyon jel oluşturulmuş ve füzyon jellerden bir tanesi master jel kabul edilerek diğer jeller ile çakıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

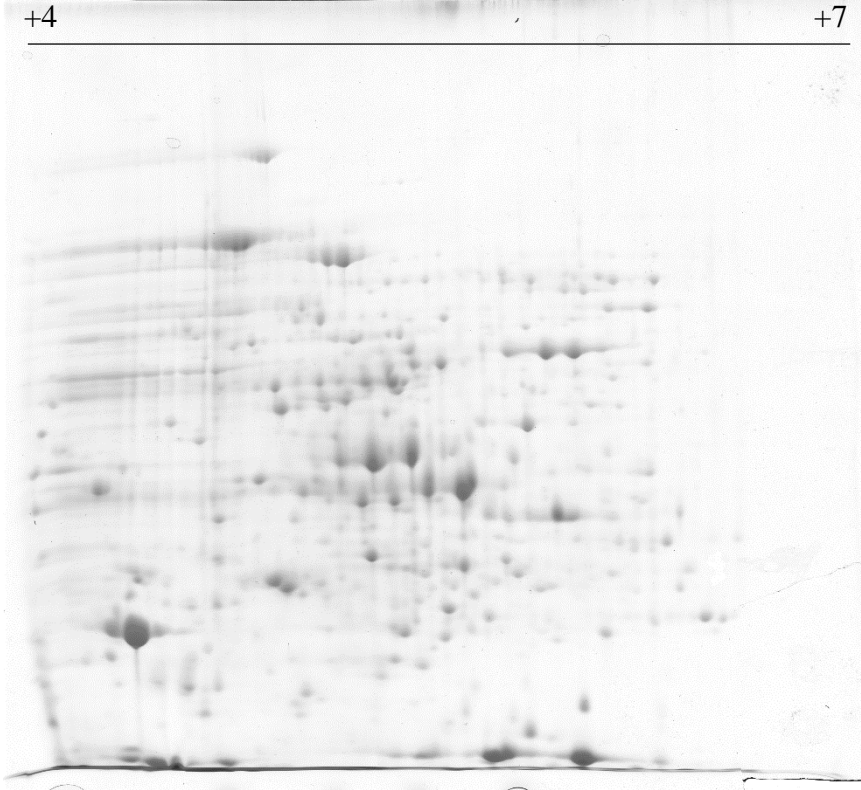
## 3. BULGULAR-TARTIŞMA/SONUÇ

Çalışmamız sırasında *S.clavuligerus* (NRRL3585) suşu kullanılmış ve bu organizmanın durağan fazda ve antibiyotik üretiminin artış gösterdiği zaman diliminde protein ekstraksiyonunu yapmak üzere 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Protein ekstraksiyonu sonrasında her bir yöntem için protein profillerinin gözlemlenebilmesi amacıyla 2D jelleri yapılmış ve proteinlerin kütle ve IEF'lerine göre

ayrılmaları sağlamıştır. Elde edilen jel görüntüleri Delta2D programına yüklenerek jeller karşılaştırılmış, spot yoğunluğu, jellerin tekrar edilebilirliği ve spot miktarları gibi faktörler göz önünde bulundurularak *S. clavuligerus* proteom çalışmaları için en uygun protein ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir.

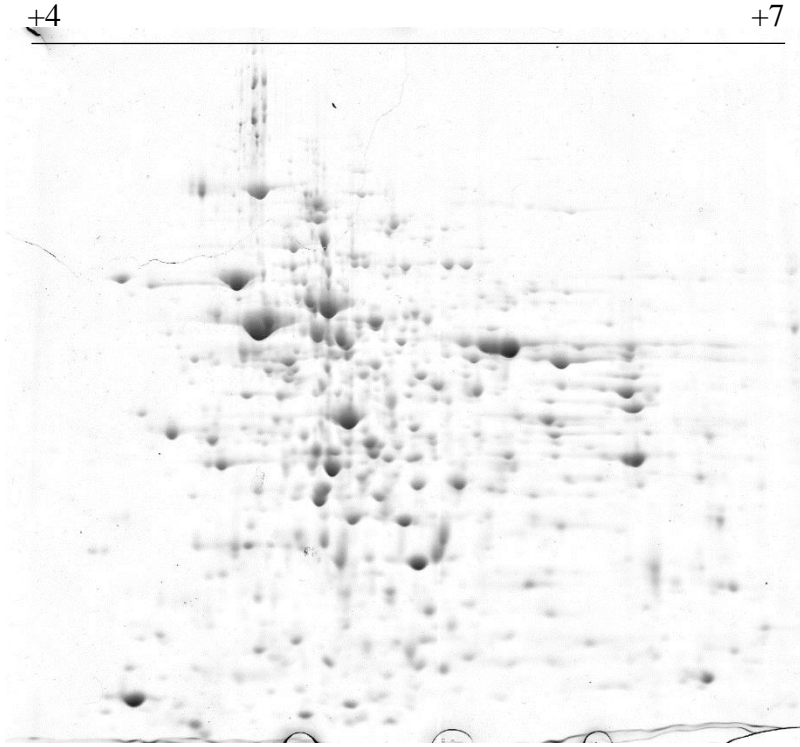
*S. clavuligerus* diğer mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında proteolitik aktivitesi yüksek birçok protein üretmekte dolayısıyla bu durum protein ekstraksiyon işlemini bu organizmalar için zorlaştırmakta ve büyük titizlik ve dikkat gerektirmektedir, diğer bir ifade ile proteinlerin degradasyonunu minimuma indirecek en etkili yöntemin bulunmasını zorunlu kılmaktadır. TCA-aseton kombinasyonu oldukça etkili bir çöktürme etkisine sahiptir. Proteolitik aktivite kendisini göstermeden proteinlerin çöktürülmesini sağlamaktadır, ayrıca tuz ve polifenol gibi protein odaklanmasına önemli engel oluşturan bileşiklerin temizlenmesini çok başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedir (Gorg vd.,2004). Bu yüzden *S. clavuligerus* gibi zorlu organizmalarda ve bitkilerde bu yöntem sıklıkla başvurulmaktadır. Fakat bu yöntemin avantajları ile birlikte dezavantajları da bulunmaktadır. TCA-aseton yöntemi ile çöktürülen proteinlerin rehidrasyon tamponunda çözülmesi oldukça zordur (Nandakumar vd., 2003) ve bu işlem sırasında birçok hidrofobik protein kaybedilmekte, tamponda çözünmemektedir. Ayrıca TCA'dan kaynaklanan düşük pH, proteinlerin çözünmelerini etkilemekle birlikte 2D jellerinin asidik kısımlarında belirgin çizgi (streak)'lerin oluşmasına yol açmaktadır (Carpentier vd., 2005) .

TCA-aseton yöntemi kullanılarak elde edilen 2D jel görüntüsü Şekil 3'te gösterildiği gibidir. Delta2D programı kullanılarak TCA-aseton yöntemi ile elde edilen jelin analizi yapıldığında toplam 646 protein bulunmuştur. Bu yöntem ile elde edilen protein konsantrasyonu ise ortalama  $2.0 \pm 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'dir.



Şekil 3. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel

Fenol ekstraksiyon yöntemi, TCA-aseton yöntemine karşı yaygın olarak kullanılan alternatif yöntemdir. Fenol ekstraksiyon yöntemi sırasında 2 faz elde edilmektedir ve bunlardan bir tanesi fenolün oluşturduğu hidrofobik kısım, bir diğeri ise sulu kısımdır. Sulu kısımda protein ekstraksiyonu sırasında kontaminasyon olarak kabul edilen karbonhidrat, nükleik asit ve çözünmeyen hücre debrisi bulunurken, fenolün oluşturduğu fazda sitosolik ve membran proteinleri bulunmaktadır (Hochstrasser vd., 1988). Ayrıca TCA-aseton yönteminde proteazları inhibe eden faktör TCA'nın kendisi iken, fenol ekstraksiyonunda EDTA ve PMSF proteazların inhibe edilmesini sağlayan asıl faktörlerdir, PMSF yerine proteaz inhibitör kokteyl de tampona eklenebilmektedir, ayrıca fenol ekstraksiyonu sırasında pH'in yüksek olması proteolitik aktiviteyi engelleyici önemli bir unsurdur (Carpentier vd., 2005). Faurobert vd. (2007)'nin önerdiği prosedür ile elde edilen 2D jel Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen toplam protein sayısı 643'tür. Protein konsantrasyonu ise  $24.4 \pm 8.19 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  olarak bulunmuştur.



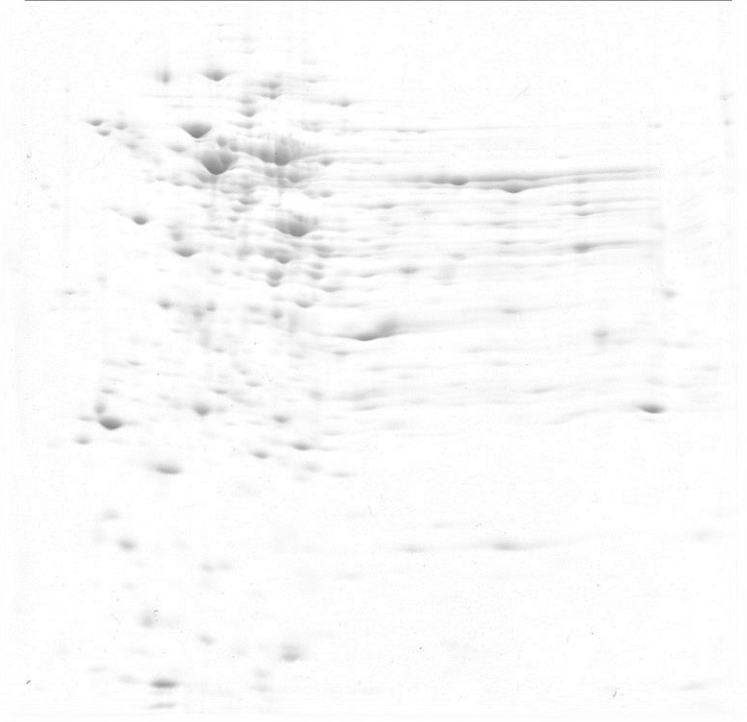
Şekil 4. Fenol ekstraksiyon yöntemi I sonrasında elde edilen 2D jel

Sebastiana vd. (2013) tarafından önerilen etanol-aseton protein ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen protein konsantrasyonu yaklaşık olarak  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  olmuştur. 2D jelleri yapmak için gerekli minimum protein miktarı etanol-aseton yöntemi ile sağlanamadığından bu yöntem *S.clavuligerus*'ta protein profillerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilecek bir method olmadığını göstermiştir. *S.clavuligerus* gibi protein ekstraksiyonu sırasında kontaminasyon olarak kabul edilebilecek pigment, lipid ve nükleik asit gibi moleküllerin organizmada fazla miktardan bulunması ve aynı zamanda ekstraksiyon sırasındaki hücre patlatma işlemi sonrasında proteazları inhibe etmek için herhangi bir ajan kullanılmaması ve aseton ile çöktürülen proteinlerin rehidrasyon tamponu ile çözünmesinin zor olması gibi faktörler bu yöntemin amacımıza pek uygun olmadığını açıklamaktadır.

Carpentier vd. (2005)'nin önermiş olduğu prosedür kullanılarak elde edilen jelde (Şekil 5) toplam 588 protein bulunmuştur. Ayrıca bu yöntem ile rehidrasyon tamponunda çözüldükten sonra elde edilen protein konsantrasyonu  $3.08 \pm 0.944 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  olarak belirlenmiştir.

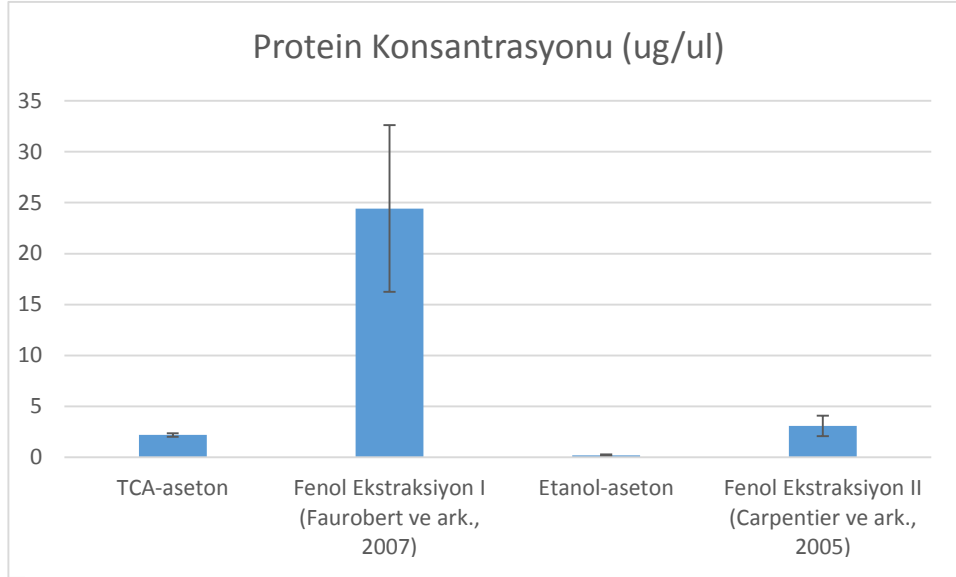
+4

+7



Şekil 5. Fenol ekstraksiyon yöntemi II sonrasında elde edilen 2D jel

Dört farklı yöntem kullanılarak, elde edilen protein konsantrasyonları Grafik 1'de verilmiştir.

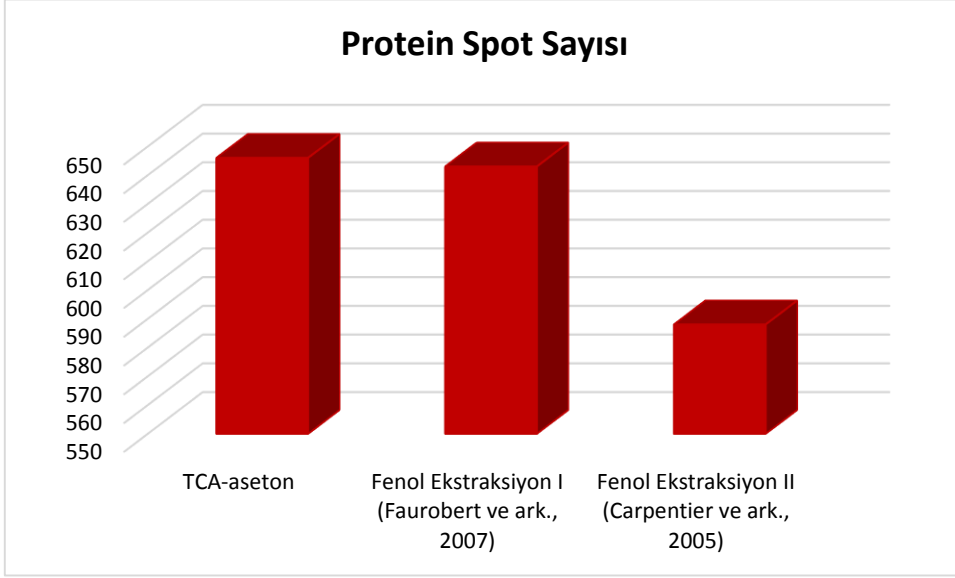


Grafik 1. TCA-aseton, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I, Etanol-aseton Yöntemi, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II için protein konsantrasyonları

Faurobert vd. (2007) tarafından önerilen yöntem (Fenol I Yöntemi), elde edilen protein miktarı bakımından en yüksek değeri vermesine rağmen, protein miktarının tayininde hata oranı diğerlerine göre daha yüksektir. Fenol ekstraksiyonu sırasında proteinlerle birlikte fenol fazında kalan pigmentlerin Bradford boyası ile reaksiyona girmesi buna sebep oluyor olabilir. Carpentier vd. (2005)'nin önerdiği fenol ekstraksiyon yönteminde (Fenol II yöntemi) hata oranının nispeten düşük olması zaten fenol fazında yakalanan protein miktarının Fenol I yönteminde neredeyse 8 katı kadar az olması ve dolayısıyla fenol fazında kalan pigment miktarının da diğer yöntemlere göre daha az miktarda bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu yöntemler içerisinde Etanol-aseton yöntemi dışındaki 3 yöntem, elde edilen protein konsantrasyonlarının 2D jel hazırlanması için yeterli oranda bulunması sebebiyle, kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Fakat bu karşılaştırma protein konsantrasyonu en yüksek olan Fenol ekstraksiyon yöntemi I (Fenol I yöntemi) ile TCA-aseton yöntemi, daha sonra olan Fenol ekstraksiyon yöntemi II (Fenol II yöntemi) ile Fenol ekstraksiyon yöntemi II (Fenol II yöntemi) olarak yapılmıştır.

Dört farklı yöntem kullanılarak elde edilen jellerin Delta 2D programında karşılaştırılması sonucu belirlenen protein spot sayıları her bir yöntem için Grafik 2'de gösterilmiştir.



Grafik 2. TCA-aseton, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II için Delta2D programı ile karşılaştırma sonucu elde edilen 2D jellerinde gözlemlenen protein sayısı

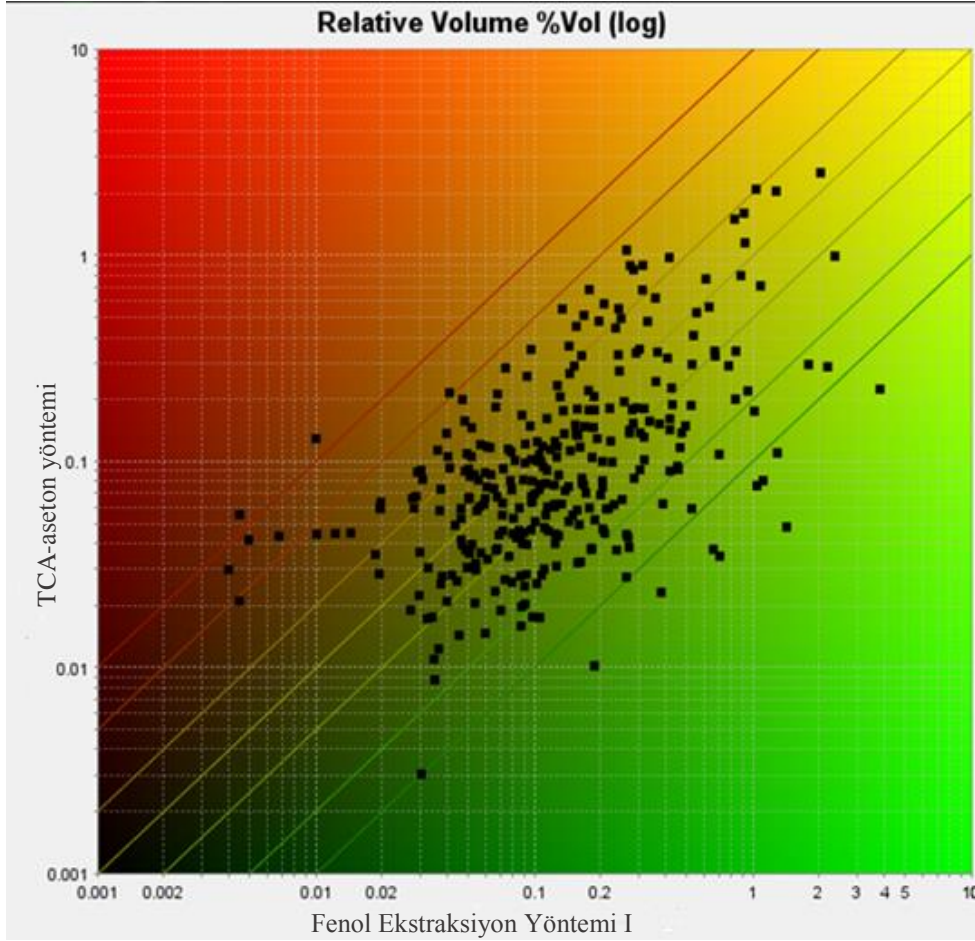
Delta2D programı ile 3 jel (TCA-aseton, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I, Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II) karşılaştırılmış ve her bir jelde görüntülenen protein spot sayıları belirlenmiş, daha sonra TCA-aseton ve Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I ile Fenol Ekstraksiyon Yöntemi II ve Fenol Ekstraksiyon Yöntemi I kendi aralarında karşılaştırılmış, bu yöntemler arasında ortak olarak jelde görüntülenebilen proteinler ve sadece bir yöntemle görüntülenebilen proteinler ile bu proteinlerin yoğunluk bakımından birbirlerine oranları belirlenmiştir. Kantitatif ifade oranlarının belirlenmesi için kullanılan Delta2D programına ait tablonun (Tablo 1) genel görüntüsü aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Tablo 1. Delta2D kantitatif analiz tablosu. Kırmızı renkli kareler sadece bir jelde ifade edilen proteinleri, yeşil ile kırmızı arasında farklı skaladaki renklerle gösterilen kareler ortak ifade edilen protein farklı yoğunlukta olduklarını, koyu yeşil ile gösterilenler proteinlerin o jelde bulunmadığını göstermektedir.

Quantitation Table - All gel images - Rows: 963 / 963 / 0 10.05.14.WT_OD_770.Highlight6_N6.Shaadow88.2.1485 / 646 / 0 WT2_30.12.14_ext.H5.N7_S_85_1:1485 / 643 / 0 1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0 Fused In																
mark	10.05.14.WT_OD_770.Highlight6_N6.Shaadow88.2.1485 / 646 / 0	WT2_30.12.14_ext.H5.N7_S_85_1:1485 / 643 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0
	10.05.14.WT_OD_770.Highlight6_N6.Shaadow88.2.1485 / 646 / 0	WT2_30.12.14_ext.H5.N7_S_85_1:1485 / 643 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0	1002.tubitak.proje-Carpenter.2005:1485 / 588 / 0
	0.113	0.147	0.175	0.087	0.769	1.194	0.590	104.438	80.562	87.031	86.446					
	0.053			0.022	∞	∞	∞	49.092			21.697					
			0.070													
				0.022	∞	∞	∞			34.759	21.631					
	0.343	0.671	0.903	0.347	0.511	1.345	0.517	317.962	368.950	449.208	346.659			0.545	0.599	0.726
	0.076	0.019	0.026	0.000	0.250	0.341		41.916	9.496	25.951				0.388	0.389	0.329
			0.075	0.031	0.000	0.000	0.417	41.011			31.082			0.407		
			0.050	0.023	∞	∞	∞	46.489			23.100			0.338		
				0.086	0.129	0.032	0.000	1.499	0.373	47.135	63.965	31.933			0.333	0.449
			0.111	0.033	0.046	0.000	0.300	0.416		61.127	16.595	46.167			0.469	0.393
			0.020	0.012	∞	∞	∞	18.773			11.580			0.353		
				0.008	0.000	0.000	0.312		13.470		7.637			0.383		
	0.034	0.068	0.068	0.027	∞	∞	∞	31.594			33.803	27.239		0.339	0.424	0.349
	0.086	0.068	0.038	∞	∞	∞	∞	79.397			33.923	38.116		0.388	0.385	0.368
	0.086	0.053	0.169	0.094	1.622	3.179	1.769	79.964	29.238	84.126	93.995			0.446	0.350	0.529
	0.027			0.016	∞	∞	∞	25.265			15.600			0.362		
				0.033	0.014	∞	∞	∞		16.246	14.038				0.380	0.318
			0.097	0.016	0.000	0.000	0.169		53.251		16.391				0.431	0.359
			0.773	0.769	∞	∞	∞	716.724			768.998			0.540		
	0.020	0.087	0.236	0.068	0.225	2.697	0.779	18.264	48.069	117.322	68.062			0.369	0.370	0.502
	0.109	0.049	0.058	0.056	2.215	1.178	1.131	101.085	27.068	28.861	55.617			0.420	0.397	0.394
			0.053	0.020	0.069	0.000	3.792	1.297		29.240	100.347	68.938			0.355	0.511
			0.048	0.077	0.028	∞	∞	∞	44.560		38.417	27.841		0.350		0.353
	0.062	0.134	0.095	0.055	0.465	0.712	0.408	57.592	73.392	47.278	54.473			0.396	0.449	0.420
	0.000	0.000	0.214	0.107	∞	∞	∞	0.000	0.000	106.323	107.077			0.000	0.000	0.453
				0.010	∞	∞	∞				10.123					0.325
			0.071	0.022	∞	∞	∞				35.384	22.084				0.419
			0.078	0.056	∞	∞	∞	72.332			59.604	55.622		0.373		0.445
	0.060			0.032	∞	∞	∞	56.055			31.908			0.341		
			0.146	0.202	0.781	2.746	1.081	135.392	102.808	255.557	201.898			0.357	0.325	0.535
	0.392	0.000		0.356	∞	∞	∞	363.316	0.000		355.693			0.565	0.000	0.627
			0.153	0.121	∞	∞	∞	141.626			120.390			0.367		
			0.031	0.020	0.584	1.569	0.391	28.315	28.754	40.838	20.439			0.361	0.343	0.434
			0.030	0.014	0.000	1.530	0.464		16.255	22.507	13.707			0.361	0.338	0.383
			0.015	0.051	0.020	∞	∞	13.929			25.171	20.266		0.339	0.479	0.372
			2.048	1.281	1.434	1.187	1.599	1.119	0.927	1898.000	704.196	713.283	1185.000	0.651	0.775	0.690
			0.105	0.075	∞	∞	∞	97.031			75.098			0.420		
			0.103	0.131	0.063	∞	∞	95.818			65.120	63.351		0.373		0.366
			0.157	0.107	∞	∞	∞	145.538			106.681			0.421		
			0.059	0.526	0.448	0.262	0.112	0.851	0.497	54.679	289.291	222.942	261.216	0.327	0.478	0.528
			0.271	0.185	∞	∞	∞	250.944			165.301			0.389		0.410
			0.037	0.056	0.018	0.326	1.532	0.492	11.399	20.094	27.862	17.983		0.322	0.363	0.386
			0.012	0.072	0.081	0.027	0.000	1.122	0.379	39.802	40.435	27.411		0.400	0.403	0.347
			0.140	0.055	0.000	0.000	0.394		76.690		54.864			0.487		
			0.259	0.093	0.062	0.093	2.787	0.669	1.002	239.880	51.040	30.915	92.957	0.473	0.307	0.383
			0.036	0.020	0.009	0.000	0.540	0.240		19.863	9.701	8.648		0.339	0.354	0.327
			0.060	0.115	0.124	0.054	0.522	1.075	0.471	55.745	63.317	61.612	54.183	0.344	0.461	0.422
			0.202	0.801	0.272	0.000	3.971	1.347		110.836	398.336	271.362		0.399	0.709	0.514
			0.000	0.000	0.236	0.106	∞	∞	0.000	0.000	117.283	105.755		0.000	0.000	0.491
			0.086	0.063	0.067	1.356	0.000	1.056	79.803	34.890	66.956			0.413	0.340	0.415
			0.051	0.108	0.031	∞	∞	∞	47.093		53.852	31.229		0.350		0.374
			0.088	0.060	0.024	0.029	1.476	0.397	0.487	81.619	32.802	11.782	29.053	0.380	0.358	0.383
			0.080	0.098	0.104	0.060	0.818	1.063	0.606	74.564	54.035	51.979	59.540	0.401	0.359	0.409
			0.164	0.130	0.073	∞	∞	∞	151.645		64.819	73.031		0.375		0.391
			0.363	0.144	0.123	0.228	2.511	0.854	1.577	336.231	79.403	61.363	227.506	0.611	0.451	0.420
			0.117	0.063	0.071	0.073	1.856	1.123	1.165	108.104	34.545	35.121	73.170	0.419	0.329	0.359
			0.000	0.000	0.051	0.020	∞	∞	0.000	0.000	25.378	19.798		0.000	0.000	0.374
			0.077	0.036	0.027	0.000	0.467	0.347		42.488	17.947	26.763		0.389	0.382	0.334

Aşağıdaki plotta protein spotlarının TCA-aseton ve Fenol Ekstraksiyon yöntemi I için dağılımı gösterilmiştir. Proteinlerin dağılımları ve dolayısıyla iki yöntem arasında protein spotlarının yoğunluk ve çeşit bakımından ne kadar farklılık gösterdikleri relatif olarak bu grafikten belirlenebilir.

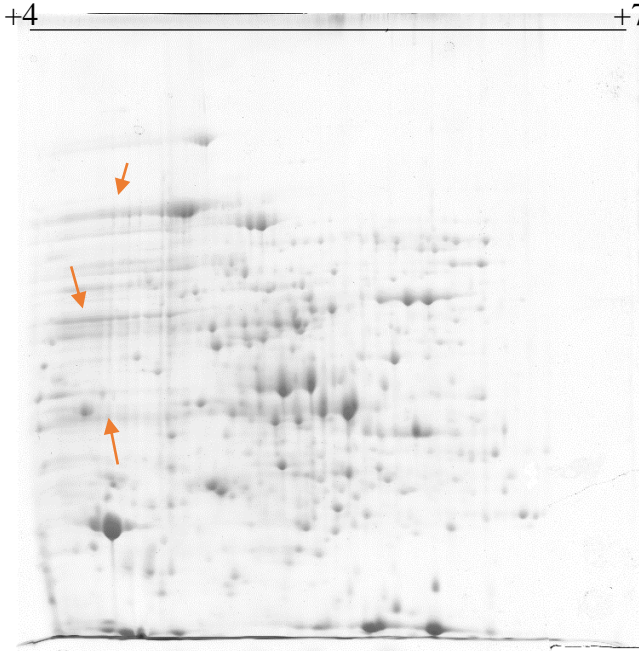


Grafik 3. y eksenini TCA-aseton ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen proteinleri, x eksenini Fenol I yöntemi ile elde edilen proteinleri göstermektedir.

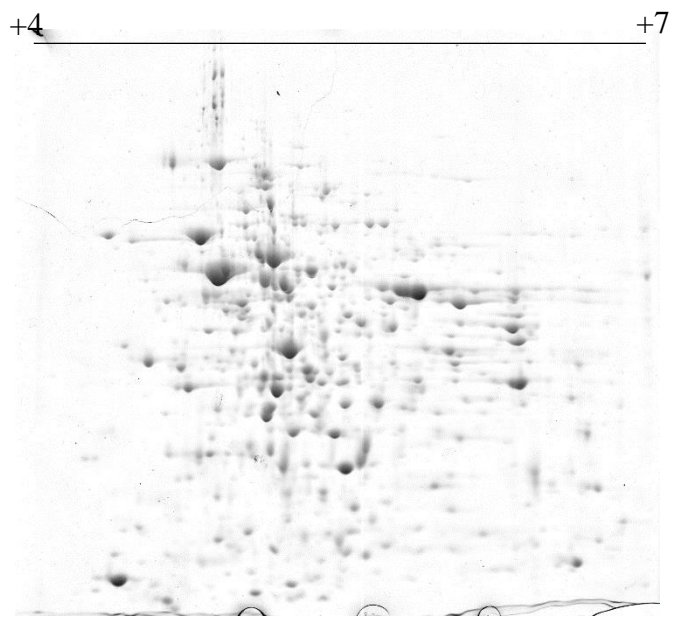
Grafik 3'te sarı çizgiler üzerinde yer alan spotlar her iki yöntem ile elde edilen proteinlerin birbirlerine göre ifade oranlarını göstermekte, kırmızı-turuncu bölgede yer alanlar sadece TCA-aseton yöntemiyle elde edilen proteinleri ve Fenol I ekstraksiyonuna göre ifadesi önemli ölçüde artan proteinleri gösterirken, yeşil-açık yeşil bölgede yer alanlar sadece Fenol I yöntemiyle elde edilen proteinleri ve TCA-aseton'da Fenol I'e göre yoğunluğu çok düşük proteinleri göstermektedir.

Yukarıdaki grafiğe göre hem TCA-aseton hem de Fenol I yöntemiyle oldukça farklı proteinlerin izole edilebileceği çıkarımı yapılabilir, ayrıca ortak olarak her iki jelde yer alan proteinlerin yoğunluk bakımından birbirlerinden farklılık gösterdiği de grafikte görülmektedir.

Delta2D çakıştırma programı ile jeller çakıştırılmış ve Fenol I yöntemi ile jelde 643 protein belirlenmiş, TCA-aseton yöntemi ile 646 protein görüntülenebilmiştir (Şekil 6 ve Şekil 7).

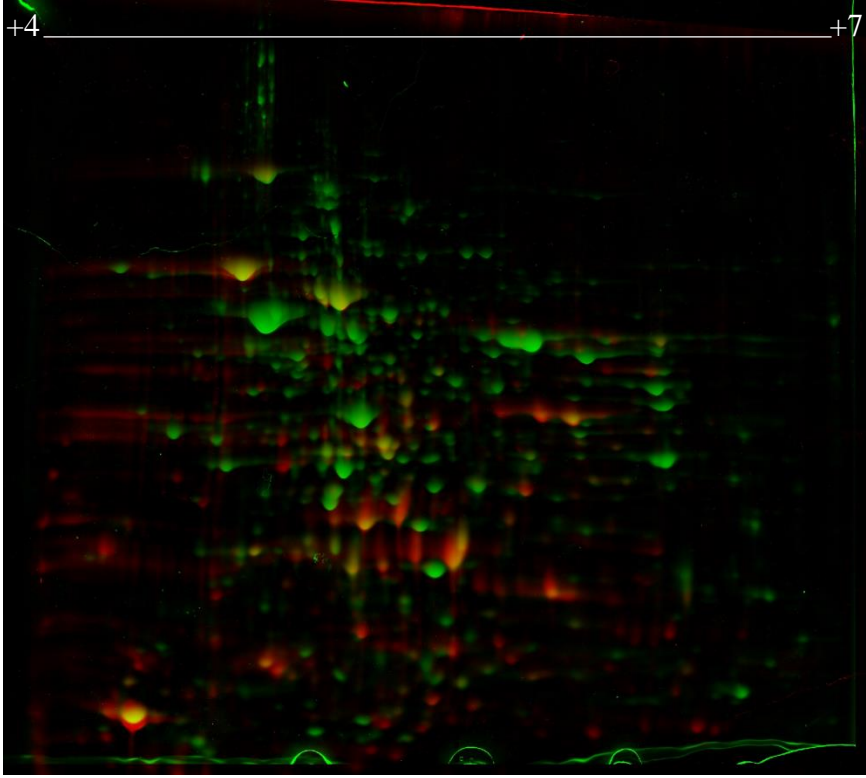


Şekil 6. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel



Şekil 7. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel

Ayrıca 2 jelin çakıştırılması sonucu (Şekil 8), 318 proteinin sadece TCA-aseton yöntemi ile elde edildiği, 266 proteinin ise sadece fenol ekstraksiyon yönteminde gözlemlendiği belirlenmiştir.



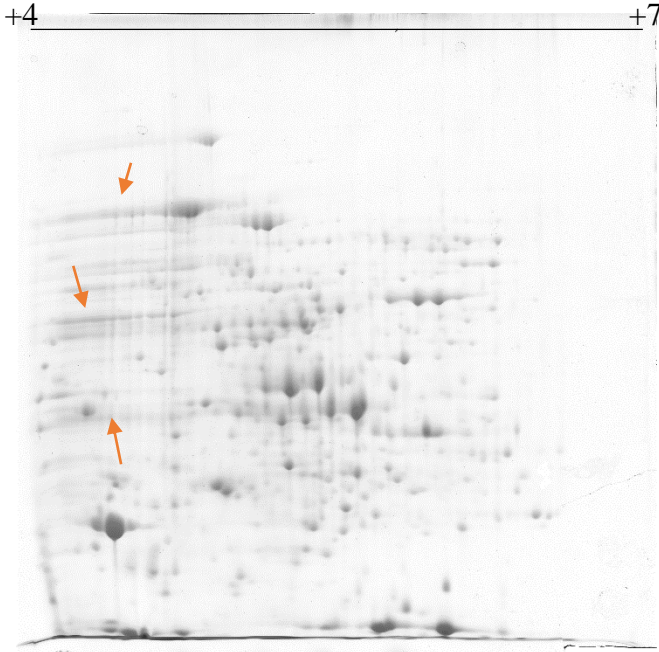
Şekil 8. Fenol I ve TCA-aseton çöktürme yöntemleri ile elde edilen jellerin çakıştırılmış görüntüsü. Kırmızı renkli spotlar TCA-aseton, yeşil renkli spotlar Fenol I yöntemini, açık yeşil, sarı ve turuncu renkli spotlar çakışan spotları temsil etmektedir.

Ayrıca 328 proteinin iki jelde ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir. Ortak proteinlerin jeldeki yoğunluğu karşılaştırılmış ve 2.0 kat artış ve 2.0 kat azalış gösteren spotlar belirlenmiştir. Buna göre Fenol I yöntemi ile 2.0 kat daha yoğun olarak gözlemlenen protein spot sayısı 104 iken, bu sayı TCA-aseton ekstraksiyon yönteminde 49'dur.

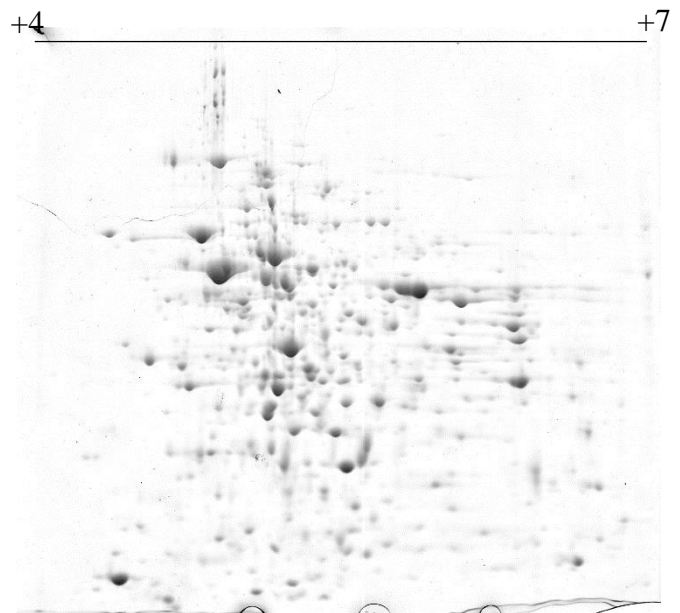
Bunların yanı sıra aşağıdaki şekilde gösterildiği üzere TCA-aseton yöntemi ile elde edilen jelin asidik kısmında (+4) yoğun bir şekilde streak (çizgiler) gözlenmektedir. Bu yüzden asidik bölgede bulunan streak kısımları program tarafından ayrı spotlar olarak belirlense de bu bölgelerde muhtemelen çok daha az spotun varlığı söz konusudur. Bu çizgilerin varlığı bu teknikte elde edilen proteinlerin fokuslanmasında bir problem olduğu ya da ekstraksiyon sırasında yıkama safhalarında TCA'dan kurtulamadığını gösteriyor olabilir. Carpentier vd. (2005) bu çizgi oluşumunu TCA-aseton yöntemindeki dezavantajlardan biri olarak nitelendirmişlerdir. Böyle bir durumda asidik bölgedeki proteinlerin doğru bir şekilde kütle spektrometri ile tanımlanması zorlaşacaktır. Şekil 9'da turuncu oklar, TCA-aseton yönteminde gözlenen çizgilerin yoğun olduğu



bölgeleri göstermektedir. Fenol I yönteminde de bu çizgilere alkalın bölgede (+7) yer yer rastlansa da TCA yöntemindeki kadar yoğun değildir (Şekil 10).



Şekil 9. TCA-aseton çöktürme yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel



Şekil 10. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel

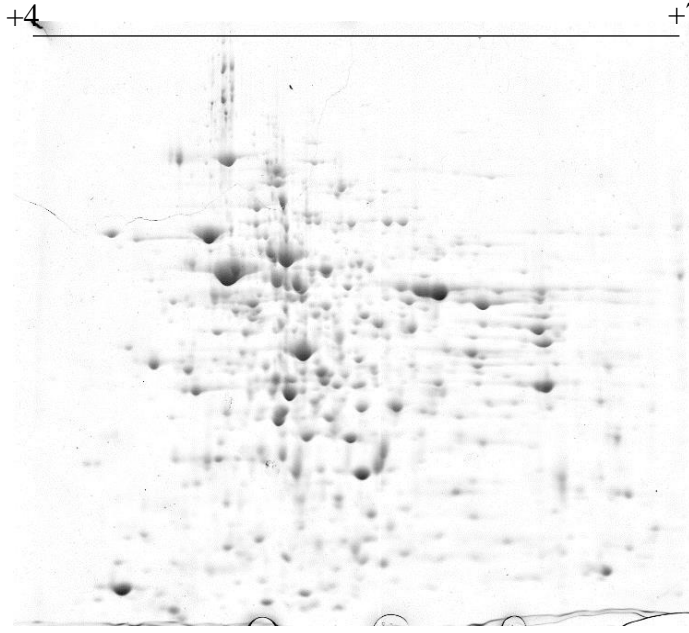
Jellerde gösterilen protein miktarı kadar protein çeşidi de büyük önem arz etmektedir. Hücre içinde her proteinin ifade seviyesi, diğer proteinlerden işlevleri dolayısıyla farklıdır. Bu yüzden bir hücrede aynı zaman dilimi içinde birçok protein ifade edilirken her birinin ifade seviyesi birbirinden farklı olacaktır; bazıları diğerlerine göre daha fazla ifade edilirken, bazıları çok daha az ifade edilmektedir. Bu yüzden, bir protein ekstraksiyon yöntemi sonucu elde edilen protein konsantrasyonu da büyük önem taşımaktadır. Konsantrasyon ne kadar yoğun olursa, az ifade edilen proteinlerin jelde görüntülenme ihtimali o kadar artacaktır. TCA-aseton yöntemi ve Fenol I yöntemi sonucu elde edilen protein konsantrasyonları karşılaştırıldığında fenol yöntemi ile  $24.4 \pm 8.19$  (sd)  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , TCA-aseton yöntemi ile  $2.0 \pm 0.18$  (sd)  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  protein elde edilmiştir. İki yöntem arasında protein konsantrasyonu bakımından önemli bir fark bulunmaktadır. Buna rağmen fenol yönteminde standard deviasyon (sd) TCA-aseton yönteminden çok daha yüksek çıkmaktadır. Bunun sebebi ekstraksiyon sırasında fenol fazında sadece proteinlerin değil lipid ve pigmentlerin de bulunmasıdır (Carpentier vd., 2005). Her ne kadar *S.clavulligerus*'un parental türlerinde pigment üretimi mutant türlerine kıyasla az olsa da, örneklerin alındığı zaman dilimi, organizmanın

durağan faza girdiği ve ikincil metabolit üretimini başlattığı döneme rastladığından ve pigmentlerin de hücre tarafından ikincil metabolit olarak üretilmesinden, Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu hesaplanırken az miktardaki pigment oranı sonuçları etkileyebilmekte ve dolayısıyla standard sapmanın artmasına neden olmaktadır. Bilindiği gibi Bradford yöntemi protein miktarını ölçmede çok duyarlı olmamakla birlikte, ölçümden ölçüme değişkenlik gösterebilmektedir. Fakat var olan en hızlı ve optimize edilmiş bir yöntem olduğundan çok yaygın olarak kullanılmakta ve genel yöntem olarak kabul edilmektedir.

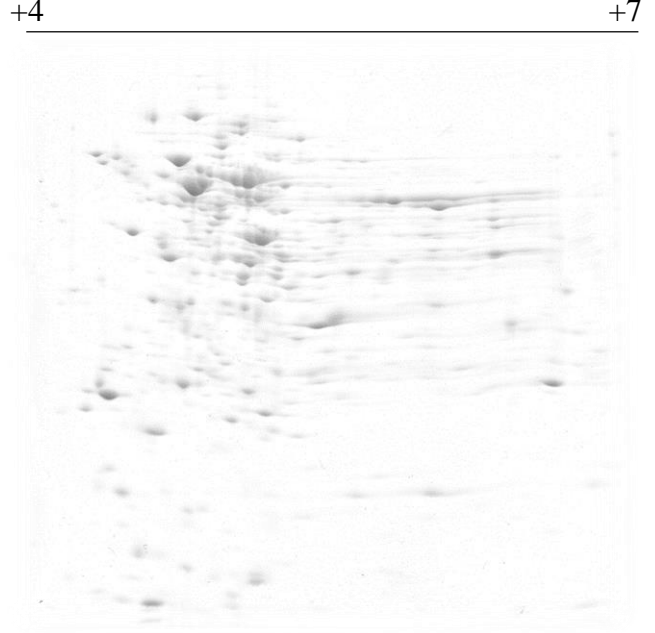
Jellerin genel kontaminantlardan (nükleik asit, tuz) arındırılması ve spotların net bir şekilde jelde görüntülenmesi söz konusu olduğunda Faurobert vd. (2007) tarafından tavsiye edilen Fenol I yönteminin, TCA-aseton yöntemine göre daha başarılı sonuç verdiği görülmektedir. Ayrıca deney prosedürünün etkinliği göz önüne alındığında TCA-aseton yönteminde TCA'nın uzaklaştırılması zor olduğundan yıkama safhaları çok daha uzun olmakta ve ekstraksiyon süreci Fenol I yöntemine göre önemli ölçüde uzamaktadır. Bunun yanı sıra, hücre içerisinde belirli bir zaman diliminde ifade edilen fakat ifade miktarı diğer proteinlere göre az olan proteinlerin belirlenmesinde başlangıç protein konsantrasyonunun fazlalığı oldukça önemlidir. Bu açıdan her iki metot karşılaştırıldığında başlangıç konsantrasyonun TCA-aseton metodununkinden en az 12 kat fazla olan Fenol I yöntemi, *S.clavuligerus* proteomunun belirlenmesi için çok daha uygun bir yöntem olduğunu ispatlamaktadır.

Fenol I yöntemi ile elde edilen protein konsantrasyon oranı  $24.4 \pm 8.19 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  iken Fenol II yöntemi ile elde edilen oran  $3.08 \pm 0.944 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'dir, dolayısıyla protein başlangıç miktarlarında yaklaşık olarak 8 kat fark bulunmaktadır.

Ayrıca bu iki yöntem Delta2D programı kullanılarak karşılaştırılmış ve 2 jeldeki spot miktarları belirlenmiştir (Şekil 11 ve Şekil 12).

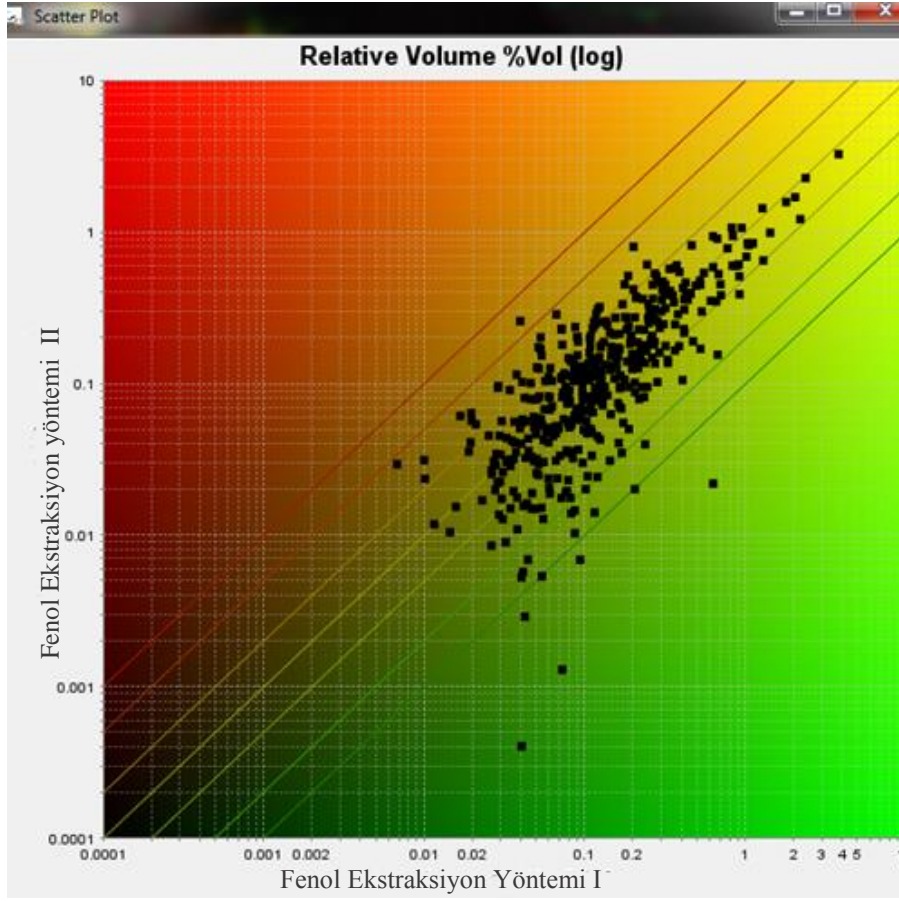


Şekil 11. Fenol ekstraksiyon yöntemi I sonrasında elde edilen 2D jel



Şekil 12. Fenol ekstraksiyon yöntemi II sonrasında elde edilen 2D jel

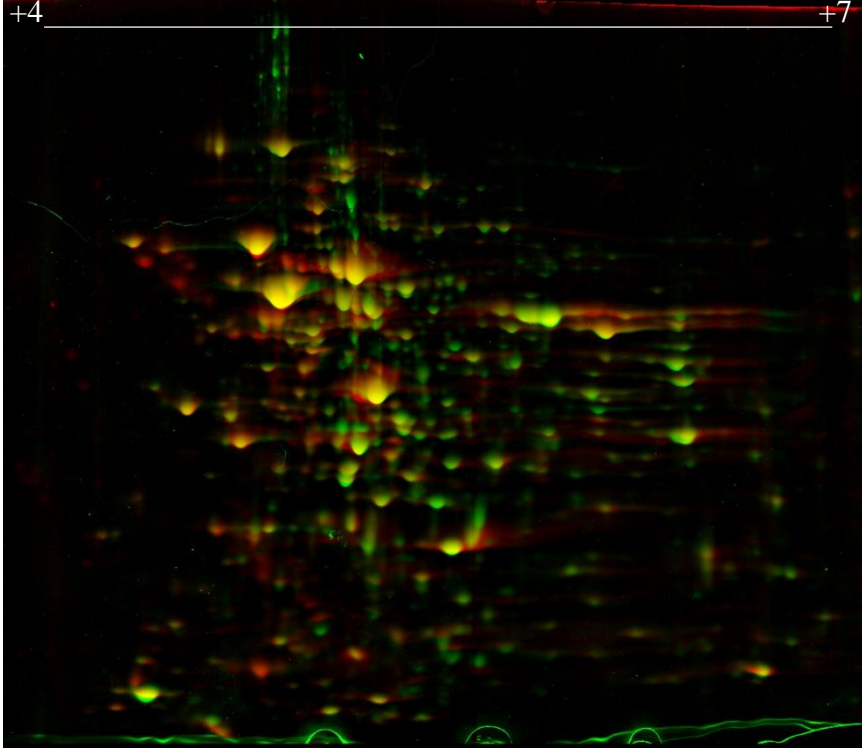
Grafik 4'te protein spotlarının Fenol I ve Fenol II yöntemleri için relatif dağılımı gösterilmiştir. Proteinlerin dağılımları ve dolayısıyla iki yöntem arasında protein spotlarının yoğunluk ve çeşidi grafikten göreceli olarak yorumlanabilir. Şekilde görüldüğü gibi ortak bölgedeki proteinlerin sayısı oldukça fazlayken, Fenol I ekstraksiyonunda yeşil bölgede bulunan proteinlerin sayısı daha fazladır, diğer bir ifade ile Fenol I ekstraksiyonunda Fenol II ekstraksiyonuna göre daha farklı proteinlerin jelde gözlenlendiği sonucu çıkarılabilir.



Grafik 4. y eksenini Fenol II yöntemi ile elde edilen proteinleri, x eksenini Fenol I yöntemi ile elde edilen proteinleri göstermektedir.

Kantitatif olarak Delta2D programı ile her iki jel karşılaştırıldığında Fenol II yönteminde 588 protein spotu, Fenol I yönteminde 643 protein spotu belirlenmiştir. Bu proteinlerden 172 tanesi sadece Fenol I yöntemiyle elde edilen jelde gözlemlenirken, 148 spot sadece Fenol II yöntemi ile belirlenebilmiştir (Şekil 13).



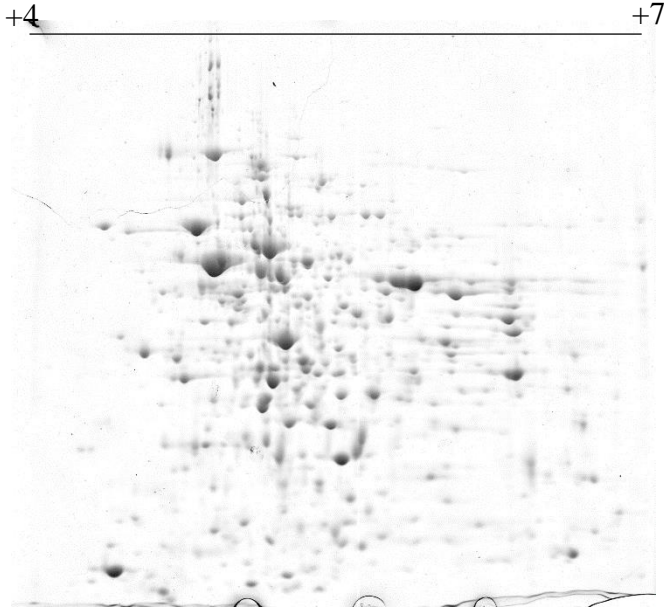


Şekil 13. Fenol ekstraksiyon yöntemi I (Fenol I) ve Fenol Ekstraksiyon yöntemi II (Fenol II) ile elde edilen jellerin çakıştırılmış görüntüsü. Kırmızı renkli spotlar sadece Fenol II, yeşil renkli spotlar sadece Fenol I'i temsil etmektedir. Açık yeşil, sarı ve turuncu renkli spotlar ortak olarak çakışan proteinleri temsil etmektedir.

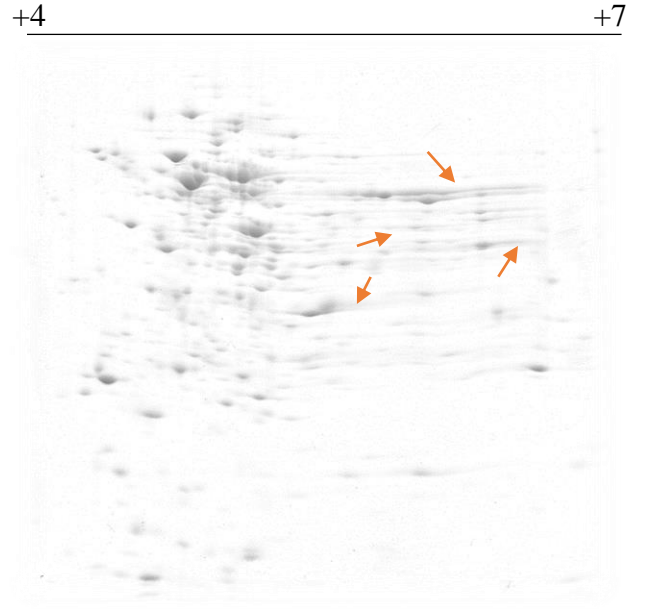
Ayrıca 440 proteinin her iki jelde de ortak olarak bulunduğu gözlenmiştir. Bu ortak proteinler, jeldeki yoğunlukları bakımından karşılaştırılmış ve 2.0 kat artış ve azalış gösteren spotlar belirlenmiştir. Buna göre Fenol II yöntemiyle 42 spotun 2.0 kat ve üzeri daha fazla yoğunlukta olduğu, Fenol II yöntemiyle ise 82 spotun 2.0 kat ve üzeri daha yoğun olarak jelde bulunduğu belirlenmiştir.

Bunun yanı sıra jel görüntüleri incelendiğinde (Şekil 14 ve Şekil 15) Fenol II yöntemi ile elde edilen jelde çok yoğun streak (çizgi) oluşumu söz konusudur. Şekil 15'te Fenol II yöntemi ile elde edilen jelde bazik bölgeyi (+7) işaret eden turuncu oklar, çizgilerin yoğun olarak oluştuğu yerleri göstermektedir. Bunun çeşitli nedenleri olabilir. Öncelikle kontaminasyonlardan (tuz, nükleik asitler) kaynaklı olarak IEF safhasında proteinlerin pI değerlerine göre yürümleri engellenmiş olabilir, bu da proteinlerin normalde olmaları gereken yerlerden farklı yerlerde odaklanmalarını ve

streak oluşumunu tetikler. Fakat her iki yöntem bazı farklar dışında birbirine oldukça benzemekte ve her iki yöntemde de ekstraksiyon için fenol kullanılmaktadır. Bu yüzden oluşan çizgilerin, kontaminasyon faktörlerinden başka sebeplerden kaynaklanıyor olması ihtimali yüksektir. Fenol II yönteminde kullanılan EDTA ve Tris-HCl konsantrasyonları Fenol I yöntemine göre 10 kat daha azdır. Proteazların engellenmesi ve pH dengesini sağlamak için kullanılan bu iki faktörün miktarsal olarak daha az olması proteaz aktivitesi yüksek olan *S.clavuligerus* suşu için yeterli olmayabilir. Bu da proteinlerin degradasyona uğramasına ve olmaları gereken yerlerden farklı yerlerde görünmelerine yol açmış olabilir ve oluşan peptid fragmanları da çizgi oluşumuna katkıda bulunabilir. Bunun yanısıra Fenol II yönteminde vorteks süresi ve miktarı Fenol I yöntemine göre çok daha uzundur. Zaten proteaz aktivitesini durdurmak için yeterli olmayan Tris ve EDTA'ya ilave olarak vorteks sürelerinin uzunluğu da peptid fragmanlarının oluşumunu arttırmış olabilir. Bu da fokuslanma sırasında sorunlara neden olacaktır.



Şekil 14. Fenol I yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel



Şekil 15. Fenol II yöntemi sonrasında elde edilen 2D jel

Fenol I ve Fenol II yöntemleri, protein konsantrasyonları, jellerin fokuslanması ve jelde belirlenen protein miktarları bakımından karşılaştırıldığında, Fenol II yöntemi *S.clavuligerus* proteomunun çıkarılmasında daha uygun bir yöntem olduğunu ispatlamıştır.

Sonuç olarak, 4 metot protein konsantrasyonları, protein spot sayıları ve proteinlerin odaklanması bakımından karşılaştırıldığında, Fenol I yöntemi her açıdan diğer üç metoda göre üstünlük sağlamaktadır. Diğer bir ifade ile, *S.clavuligerus* proteom çalışmalarında Faurobert vd. (2007) tarafından önerilen prosedürde yaptığımız değişikliklerle (Fenol Ekstraksiyon yöntemi I) gerçekleştirmiş olduğumuz protein ekstraksiyonu başarı ile kullanılabilir. Yapmış olduğumuz bu optimizasyon ile ileride yapacağımız proteom çalışmalarını gerçekleştirmemiz söz konusu olabilecektir.

Çalışmamızda sadece pH 4-7 aralığında olan IPG stripleri kullanılmıştır. Bu da sadece pI değerleri 4 ile 7 aralığında olan proteinlerin görüntülenmesini sağlamaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda diğer pH aralıklarındaki IPG stripler de denenerek (3-5, 6-8, 7-10) farklı pI değerlerine sahip proteinlerin jelde görüntülenmesi sağlanabilir. Ayrıca bu jellerden elde edilen protein spotları kütle spektrometri analizlerine gönderilerek belirli zaman diliminde ifadesi gerçekleşen birçok proteinin aynı anda tanımlanması gerçekleştirilebilir. Kullanmış olduğumuz 2D jel yöntemi proteom çalışmaları için kullanılacak yöntemlerden sadece bir tanesidir. Bunun dışında total protein izolasyonundan sonra 2D jelleri yerine, SDS-PAGE jelleri kullanılarak, proteinlerin sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve ardından LC-MS/MS yöntemi ile proteinlerin tanımlanmaları gerçekleştirilebilir. Her iki tekniğin (2D jel ve SDS-PAGE) aynı deney set-up'ı için kullanılması sonucu elde edilen protein verileri hem birbirlerinin tamamlayıcı hem de doğrulayıcı nitelikte olacaktır. Bu yüzden optimize etmiş olduğumuz protein ekstraksiyon yöntemi daha sonradan yapılacak proteom çalışmaları için büyük önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

Alexander , D. C., Jensen, S. E. 1998. "Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein", J Bacteriol., 180, 4068-4079.

Arulanantham, H., Kershaw, N. J., Hewitson, K. S., Hughes, C. E., Thirkettle, J. E., Schofield, C. J. 2006. "ORF17 from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster catalyzes the ATP-dependent formation of N-glycyl-clavaminic acid", J Biol Chem., 6, 279–287.

Baggaley, K. H., Brown, A. G., Schofield, C. J. 1997. "Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams", Natl Prod Rep., 140, 309-333.

Belcourt, M. F., Farabaugh, P .J. 1990. "Ribosomal frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site", Cell, 62, 339-352.

Bignell, D. R. D, Tahlan, K., Colvin, K. R., Jensen S. E., Leskiw B. K. 2005. "Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*.", Antimicrob Agents Chemother, 49,1529-1541.

Bignell, D. R., Warawa, J. L., Strap, J. L., Chater, K. F., Leskiw, B. K. 2000. "Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation", Microbiology, 146, 2161-2173.

Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. 2005. "Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis", Proteomics, 5, 2497-2507.

Champness, W. C. 1988. "New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation", J Bacteriol., 170, 1168-1174.

Chater, K. F. 2006. "*Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics", Phil. Trans. R. Soc. B., 361 (1469), 761-768.

Chater, K. F. ve Bibb, M. J.1997. "Regulation of bacterial antibiotic production". Products of secondary metabolism. Editör: Kleinkauf, H. ve Döhren, H. von, Weinheim, Germany: Biotechnology.

Chater, K. F., Kinashi, H. 2007. “*Streptomyces* linear plasmids: their discovery, functions, interactions with other replicons, and evolutionary significance”, *Microbiol Monogr.*, 7, 1.

Chaudhary, A. K., Dhakal, D., Sohng, J. K. 2013. “An insight into the “-Omics” based engineering of *Streptomyces* for secondary metabolite overproduction”, *BioMed Research International*, 2013-2028.

Chen, C. W. 2007. “*Streptomyces* linear plasmids: replication and telomeres”, *Microbiol Monogr.*, 7, 33–61.

Coque, J. J. R., Enguita, F. J., Martín, J. F., Liras, P. 1995. “A two-protein component 7 $\alpha$ -cephem-methoxylase encoded by two genes of the cephamycin C cluster converts cephalosporin to 7-methoxycephalosporin C”, *J Bacteriol.*, 177, 2230-2235.

Coque, J. J. R., Liras, P., Martín, J. F. 1993. “Characterization and expression in *Streptomyces lividans* of *cefD* and *cefE* gene from *Nocardia lactamdurans*: the organization of the cephamycin gene cluster differs from that in *Streptomyces clavuligerus*”, *Mol Gen Genet.*, 236, 453-458.

Diederich, B., Wilkinson, J. F., Magnin, T., Naja, W. M., Errington, J., Yudkin, M. D. 1994. “Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*”, *Genes Dev.*, 8, 2653-2663.

Duncan, L., Losick, R. 1993. “SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein sigma F from *Bacillus subtilis*”, *Proc Natl Acad Sci.*, 90, 2325-2329.

Duraipandiyan, V., Sasi, A. H., Islam, V. I. H., Valanarasu, M., Ignacimuthu, S. 2010. “Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya”, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 20 (1), 15-20.

Elliot, M. A., Buttner, M. J., Nodwell, J. R. 2008. “Multicellular development in *Streptomyces*”, *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Editör: Whitworth, D. E. Washington, D. C: ASM Press. .

Faurobert, M., Pelpoir, E, Chaïb, J. 2007. “Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues”, *Methods Mol Biol.*, 355, 9-14.

Fenical, W., Jensen, P. R. (2006). “Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria”, *Nature Chemical Biology*, 2 (12), 666-673.

Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen, L. T., Nguyen, K. T., Lacroix, P., Bamas-Jacques, N., Rinkel, M., Thompson, C. J. 2001. "Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase", J Biol Chem, 276, 44297-44306.

Goodfellow, M., Williams S. T. 1983. "Ecology of actinomycetes", Ann. Rev. Microbiol., 37, 189-216.

Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. 2004. "Current two-dimensional electrophoresis technology", Proteomics, 4, 3665-3685.

Hesketh, A., Bucca, G., Laing, E., Flett, F., Hotchkiss, G., Smith, C. P., Chater K. F. 2007. "New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures", BMC Genomics, 8, 261.

Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A. C., Miller, M. J., Merril, C. R. 1988. "Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis", [Anal Biochem.](#), 173 (2), 424-35.

Hopwood, D. A. 2006. "Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome", Annu. Rev. Genet., 40, 1-23.

Horinouchi, S. 2007. "Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*", Biosci Biotechnol Biochem., 71, 283-299.

Ishida, K., Hung, T. V., Liou, K., Lee, H. C., Shin, C. H., Sohng, J. K. 2006. "Characterization of *pbpA* and *pbp2* encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*", Biotechnol Lett, 28, 409-417.

Kagliwal, L. D., Survase, S. A., Singhal, R. S. 2009. "A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation", Bioresource Technology, 100 (9), 2600-6.

Keiser, T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics, Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation.

- Kim, H. S., Lee, Y. J., Lee, C. K., Choi, S. U., Yeo, S., Hwang, Y. I., Yu, T. S., Kinoshita, H., Nihira, T. 2004. "Cloning and characterization of a gene encoding the gamma-butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces clavuligerus*", Arch Microbiol., 182, 44-50.
- Kovacevic, S., Tobin, M. B., Miller, J. R. 1990. "The  $\beta$ -lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*", J Bacteriol., 172, 3952-3958.
- Kyung, Y. S., Hu, W. S., Sherman, D. H. 2001. "Analysis of temporal and spatial expression of the CcaR regulatory element in the cephamycin C biosynthetic pathway using green fluorescent protein", Mol Microbiol., 40, 530-541.
- Lawlor, E. J., Baylis H. A., Chater, K. F. 1987. "Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2)", Genes Dev, 1, 1305-1310.
- Liras, P., Gomez-Escribano, J. P., Santamarta, I. 2008. "Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*", J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35, 667–676.
- Liras, P. 1999. "Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins: Cephamycins produced by *Actinomycetes*", Antonie van Leeuwenhoek, 75, 109-124.
- Liras, P., Martin, J. F. 2005. "Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*", Microbial Processes and Products. Editör: Barredo, J.S. New Jersey : Humana Press.
- Liras, P., Martín, J. F. 2006. "Gene clusters for  $\beta$ -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate?", Int. Microbiol., 9 (1), 9-19.
- Liras, P., Rodríguez-García, A. 2000. "Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics", Appl Microbiol Biotechnol., 54, 467-475.
- Liras, P., Martín, J. F. 2006. "Gene clusters for  $\beta$ -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate?", Int Microbiol., 9 (1), 9-19.
- Maharjan, S., Oh, T. J., Lee, H. C., ve Sohng J. K. 2008. "Heterologous expression of metK1-sp and afsR-sp in *Streptomyces venezuelae* for the production of pikromycin", Biotechnology Letters., 30 (9), 1621-1626.

- Martín, J. F., Gutiérrez, S., Aparicio, J. F. 2000. "Secondary metabolites". Encyclopedia of Microbiology. Editör: Lederberg, J. San Diego CA: Academic Press,
- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam M. T., Ronning, C. M., Nierman, W. C., Bovenberg, R. A., Breitling, R., Takano, E. 2010. "The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways", *Genome Biol. Evol.*, 12 (2), 212-224.
- Mendelovitz, S., Aharonowitz, Y. 1982. "Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase, and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*", *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 21 (1), 74-84.
- Mot, R. D., Schoofs, G., Nagy, I. 2007. "Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress-responsive proteins", *Arch Microbiol.*, 188, 257-271.
- Nandakumar, M. P., Shen, J., Raman, B., Marten, M. R. 2003. "Solubilization of Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitated Microbial Proteins via NaOH for Two-Dimensional Electrophoresis", *Journal of Proteome Research*, 2 (1), 89-93.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas J. A. 2008. "Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering", *Metab. Eng.*, 10 (5), 281-292.
- Özcengiz, G., Okay, S., Ünsaldı, E., Taşkın, B., Liras, P., Piret, J. 2010. "Homologous expression of aspartokinase (*ask*) gene in *Streptomyces clavuligerus* and its *hom*-deleted mutant: effects on cephamycin C production", *Bioeng Bugs.*, 1 (3), 191-7.
- Paradkar A.S., Aidoo K.A., Jensen, S. E. 1998. "A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*", *Mol Microbiol.*, 27, 831-843.
- Pérez-Llarena, F. J., Liras, P., Rodríguez-García, A., Martín, J. F. 1997. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds", *J Bacteriol.*, 179, 2053-2059.



- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Martín, J.F., Liras, P. 1998. "The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene", *Gene*, 211, 311-321.
- Ramagli, L. S. ve Rodriguez, L. V. 1985. "Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*", 6 (11), 559-563.
- Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Lorenzana, L. M., Martín, J. F., Liras, P. 2005. "Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*", *Mol Microbiol.*, 56, 824-835.
- Sebastiana, M., Figueiredo, A., Monteiro, F., Martins, J., Franco, C., Coelho, A. V., Vaz, F., Simões, T., Penque, D., Pais, M. S. ve Ferreira, S. 2013. "A possible approach for gel-based proteomic studies in recalcitrant woody plants", *SpringerPlus*, 2, 210-226.
- Song, E., Malla, S., Yang, Y.-H. vd. 2011. "Proteomic approach to enhance doxorubicin production in *panK*-integrated *Streptomyces peucetius* ATCC 27952", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38 (9), 1245-1253.
- Song, J. Y., Jeong, H., Yu, D. S., Fischbach, M. A., Park, H. S., Kim, J. J., Seo, J. S, Jensen, S. E., Oh, T. K., Lee, K. J. ve Kim J. F. 2010. "Draft Genome Sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a Producer of Diverse Secondary Metabolites", *J. Bacteriol.*, 192 (23), 6317-20.
- Takano, E. 2006. "γ-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation", *Curr Opin Microbiol.*, 9, 287-294.
- Trepanier, N. K., Jensen, S. E., Alexander, D. C., Leskiw, B. K. 2002. "The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant", *Microbiology*, 148, 643-656.
- Wang, L., Tahlan, K., Kaziuk, T. L., Alexander, D. C., Jensen S. E. 2004. "Transcriptional and translational analysis of the *ccaR* gene from *Streptomyces clavuligerus*", *Microbiology* 150, 4137-4145.
- Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., Humphery-Smith, I. 1995. "Progress with gene product mapping the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*", *Electrophoresis*, 16, 1090-1094.

Westermeier, R., Naven, T., Höpker, H-R. 2008. Proteomics in practice (2. Basım), Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

White, J., Bibb, M. 1997. “*bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade”, J Bacteriol., 179, 627-633.

Wietzorrek, A., Bibb, M. 1997. “A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold”, Mol Microbiol, 25, 1181-1184.

Wilkins, M. R., Appel R. D., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F. 2007. Proteome research: Concepts, technology and application (2. Basım)., New York, NY, USA: Springer.

Zhou, Z., Gu, J., Du, Yi-Ling, Li, Yong-Quan, ve Wang, Y. 2011. “The -omics era- toward a systems-level understanding of *Streptomyces*”, Curr Genomics., 12 (6), 404-416.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. GÜLAY ÖZCENGİZ
Proje No:	114Z648
Proje Başlığı:	Streptomyces clavuligerus Proteomiği-Optimizasyon
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	6
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BIYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/11/2014 - 15/05/2015
Onaylanan Bütçe:	28400.0
Harcanan Bütçe:	27075.0
Öz:	<p>Streptomyces clavuligerus, sefamisin C antibiyotiği, bir beta laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ve anti-fungal ve antibakteriyel özelliğe sahip başka klavam bileşikleri üretmektedir. Bu metabolitlerin üretimi ve biyosentezi regülatör metabolizmaya bağlı kompleks regülatör moleküllerin etkileşimini gerektirmektedir (Liras vd., 2008). Streptomyces, dirençlilik, transport, biyosentetik enzimleri kodlayan genlere fiziksel olarak bağlı ya da onlar tarafından regüle edilen regülatör genleri içeren ve böylelikle antibiyotik biyosentezini düzenleyen gen kümelerine sahiptir (Chater ve Bibb, 1997; Alexander ve Jensen, 1998). Proteomik analizler, Streptomyces'te daha önce karakterize edilmemiş hücre dinamikleri ve bileşenleri açığa çıkarma potansiyeline sahiptir. Ayrıca proteomik yöntemler kullanılarak belirli koşullar altında ekspresyon seviyelerinde meydana gelen önemli değişimlerin 2D jel elektroforez yöntemi kullanılarak belirlenebileceği ve böylelikle istenen ikincil metabolitlerin üretiminin artırılmasına yönelik organizmada değişiklikler yapılabileceği gibi (Chaudhary vd., 2013) Streptomyces'te antibiyotik üretimi ve ikincil metabolizma ile bağlantı gösteren morfolojik değişim mekanizmaları açığa çıkarılabilir (Zhou vd., 2011).</p> <p>S.clavuligerus türü için henüz belirlenmiş ve optimize edilmiş bir protein ekstraksiyon metodu ve 2D protein profili çıkarma yöntemi yoktur. Bu çalışmada 4 farklı protein ekstraksiyon yöntemi denenerek ve gerektiği durumlarda modifikasyonlar yapılarak, her ekstraksiyon için 2D jelleri hazırlanmış ve jeller birbirleriyle Delta2D programı ile karşılaştırılarak, protein miktarı ve yoğunluğu, ekstraksiyon yönteminin verimliliği açısından en uygun yöntem olan Fenol Ekstraksiyon yöntemi I (Faurobert vd., 2007) seçilmiştir. Böylelikle ileride yapılacak S.clavuligerus proteom çalışmalarımızın ilk ve en önemli basamağı için optimize bir yöntem belirlemiş bulunmaktayız.</p>
Anahtar Kelimeler:	Streptomyces clavuligerus, proteom, protein ekstraksiyon, antibiyotik üretimi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır