

***STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* 231-X10 FAJININ KISMİ GENOMİK KARAKTERİZASYONU**

Esra Acar-Soykut*

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Beytepe, Ankara

Geliş tarihi / *Received*: 02.08.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 06.09.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 24.09.2016

Özet

Bu çalışmada, daha önce yapılmış çalışmalarla morfolojik olarak tanımlanmış, konakçı spektrumu ve yapısal proteinleri belirlenmiş, restriksiyon fragment analizleri yapılmış 231-X10 fajının belirli bir genom bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi yapılmış olan bu bölgede 13 adet açık okuma çerçevesinin yani 13 farklı fonksiyonu kodlayan gen bölgesinin olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu gen bölgelerinin faj DNA'sının replikasyonu, DNA'nın paketlenmesi, kapsid ve kuyruk yapısının oluşumundan sorumlu proteinleri kodladığı belirlenmiştir. 231-X10 fajına ait bu genom bölgesi tarafından kodlanan proteinlerin aminoasit bazında *cos*-tipi DNA paketlenme mekanizmasına sahip fajlarla yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve dolayısıyla bu fajın da *cos*-tipi olabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan bu incelemeler sonucunda *S. thermophilus* fajlarının ortak bir atadan geldiği, nokta mutasyonlar, küçük eklemeler ve kayıplar ile evrimleştikleri düşüncesi desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: *S. thermophilus* fajı, dizi analizi, genomik organizasyon

PARTIAL GENOMIC CHARACTERIZATION OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* PHAGE 231-X10

Abstract

In this study, the partial genomic sequencing of *S. thermophilus* 231-X10 phage was carried out. 231-X10 was identified morphologically, and its host spectrum, structural proteins and restriction analysis have also been completed in previous studies. Thirteen different open reading frames that was coded by thirteen genes were detected in that partial genome. These genes are responsible for DNA replication, DNA packaging and the formation of capsid and tail structure. The proteins that are encoded by the genomic region of 231-X10 phage have been found to show high similarities between the phages which have *cos*-type DNA packaging mechanism on the basis of amino acids. Thus, it is concluded that the 231-X10 phage might also be *cos*-type. As a result of these investigations, it is supported the idea that *S. thermophilus* phages come from a common ancestor and evolved with point mutations, small additions and deletions.

Key words: *S. thermophilus* phage, sequence analysis, genomic organisation

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ esra.soykut@hacettepe.edu.tr,

☎ (+90) 312 297 71 10,

☎ (+90) 312 299 21 23

GİRİŞ

Günümüzde fajlar, daha çok antibiyotik tedavisine alternatif olan faj terapi konusu ile anılsa da hala fermente ürün elde etmek için kullanılan starter kültürler için büyük tehlike oluşturmaktadır. Fermentasyon denildiğinde ilk olarak laktik asit bakterileri ve onlara etkili olan fajlar akla gelmektedir. Ortamda bulunan fajın, kültürlerden birine bile etkili olması durumunda, starter kültürün gelişmesi ya yavaşlamakta ya da tamamen durmaktadır. Dolayısıyla üretim durmakta ve ürün kaybı ile birlikte ekonomik zarar ortaya çıkmaktadır (1). Laktik asit bakterilerinden yoğurt üretiminde kullanılan *Streptococcus thermophilus* suşları da sıklıkla faj enfeksiyonlarına maruz kalmaktadır. Bu nedenle fajların izole edilmesi, bazı parametreler (konakçı spektrumları, yapısal proteinleri, restriksiyon enzimleri ile kesim şablonları gibi) kullanılarak sınıflandırılması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Ancak bu şekilde etkili ve bilinçli bir kültür rotasyon programı uygulanabilmesi ile faj probleminin önüne geçmek mümkün olabilmektedir. Ayrıca faja dirençli starter kültürlerin üretimi, bakterilerin ve fajların evrimsel gelişmelerinin takibi için de faj sınıflaması ve karakterizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (2). Faj ile bakteri arasındaki etkileşim, her ikisi için de evrimsel değişim demektir ki bu da doğadaki değişimi beraberinde getirmektedir (3). Fajlarda özellikle nokta mutasyonlar görülmekte ve bu yüzden de hibrid denilebilecek genetik materyallere sahip oldukları görülmektedir (4, 5). Mutasyonlar, konakçı spektrumlarını belirleyen genden, diğer genlere kadar her yerde görülebilmektedir (6).

S. thermophilus fajlarının morfolojik olarak tek tip (Bradley sınıflaması B grubu) olduğu ve Ackermann sınıflamasına göre *Siphoviridae* familyasında yer aldıkları bilinmektedir (7-9). Farklı çalışma grupları (7-14) tarafından incelenen çok sayıda *S. thermophilus* fajı olmasına rağmen bunlardan sadece 17 adedinin tüm genom dizi analizi yapılmış ve Amerika Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (USA, National Centre for Biotechnology Information, NCBI) bünyesindeki gen bankasına girişleri yapılarak bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur. Bu fajlar, çalışan gruplar tarafından 7201 (11), O1205 (15), Sfi19, Sfi11 (16), Sfi21 (17), DT1 (12), 2972 (18), 858 (19), ALQ13.2, Abc2 (20), 5093 (21), TP-J34, TP-778L (22) ve 9871, 9872, 9873, 9874 (9) olarak kodlanmıştır.

Ayrıca bu fajlardan bazıları, DNA paketleme mekanizmalarına göre *cos*-tipi ve *pac*-tipi olarak ikiye ayrılmıştır. Fajlardan O1205, Sfi11, 2972, 858, ALQ13.2'nin *-pac* tipi; DT1, 7201, Sfi19, Sfi21, Abc2'nin ise *-cos* tipi DNA paketleme mekanizmasına sahip olduğu tespit edilmiştir (20, 23). *S. thermophilus* 5093 (21) ve 987 grubu fajlar (9) ise, DNA paketleme mekanizmalarına göre ayırt edilemedikleri için sırasıyla 3. ve 4. grupları oluşturmuşlardır.

Bu çalışmada daha önce morfolojik olarak tanımlanmış (24), gelişme parametreleri, konakçı dizgeleri, yapısal proteinleri ve restriksiyon enzimleri ile kesim şablonları (RFLP) çıkarılmış fajların (25) içinden seçilmiş 231-X10 faj genomunun bir bölümünün dizi analizi yapılmış, muhtemel açık okuma çerçeveleri (open reading frame, ORF) belirlenip (26), gen bankasında (27) bulunan diğer *S. thermophilus* fajlarına ait genlerin kodladığı proteinler ile karşılaştırılarak karakterize edilmiştir (28).

MATERYAL-METOT

Kimyasallar ve besiyerleri

Faj saflaştırılma aşamalarında ve DNA'nın izolasyonu sırasında kullanılan DNaz, RNaz ve proteinaz-K enzimleri Fermentas (Thermo-Fischer Scientific, ABD); PEG 8000, MgSO₄.7H₂O, Trizma, SDS, agaroz, Sigma-Aldrich (Almanya); NaCl, HCl, izopropanol, etanol, kloroform ve jelatin, agar ise MERCK (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Konakçı bakteri ve faj çalışmalarında da MERCK (Almanya) firması tarafından üretilen M17 besiyeri kullanılmıştır.

Mikroorganizma ve gelişme ortamları

Bu çalışma kapsamında 231 kodlu *S. thermophilus* ticari kültürü ile ona etkili 231-X10 fajı kullanılmıştır. 231-X10 fajı, TÜBİTAK/TARP 2106 nolu 'Yoğurt Fabrikalarında Faj Probleminin Çözümüne Yönelik Araştırmalar' adlı proje (1) kapsamında 231 kodlu *S. thermophilus* suşu ile ayrandan izole edilmiştir. *S. thermophilus* kültürü ile faj stoklarının hazırlanmasında, faj titresinin belirlenmesi ve yükseltilmesinde modifiye M17 Broth, modifiye M17 Yumuşak Agar (% 0.45) ve modifiye M17 Agar (% 1.5) besiyerleri kullanılmıştır (29).

Zenginleştirme ve titre belirleme

Yüksek miktarda DNA izolasyonu için, 231-X10 fajı 10^8 - 10^9 pfu/ml titreye ulaşana kadar zenginleştirilmiştir. Faj titresinin yükseltilmesi için, faj ile logaritmik fazdaki konakçı bakteri, sıvı ortamda istenilen titreye ulaşınca kadar pasajlar yapılarak karşılaştırılmıştır. Son karşılaştırmaya ait faj süspansiyonunun dilüsyonları hazırlanmış ve çift tabaka agar yöntemi ile titre belirlenmiştir. Bu amaçla, logaritmik fazdaki konakçı kültüründen 0.1 ml alınarak 3 ml yumuşak agar ile karıştırılmış ve önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Agarın katılaşmasından sonra faj dilüsyonlarından, petri kutusunda belirlenmiş olan bölgelere 10'ar µl damlatılmıştır. 43°C'de 18 saat inkübasyon sonunda oluşan faj plakları sayılarak faj titresini hesaplanmıştır (1).

Fajın Saflaştırılması ve konsantre edilmesi

Fajların saflaştırılması ve konsantre edilmesi için Sambrook vd. tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (30). Titresi 10^8 - 10^9 pfu/ml olan faj örneğine, bakteriye ait DNA ve RNA uzaklaştırmak için son konsantrasyonları 1 µg/ml olacak şekilde DNaz ve RNaz eklenmiş ve 37°C 'de 1-2 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası ortama son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl katılmış, 1 saat buzlu su içerisinde bekletildikten sonra, 15000-18000 g'de ve 4°C'de 15 dakika santrifüjlenerek (Sigma 3K-30) hücre artıkları ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücre artıklarından arınmış faj süspansiyonuna, son konsantrasyonu % 10 (w/v) olacak şekilde katı PEG 8000 eklenmiş, çözündükten sonra bir gece buzlu su içinde bekletilmiştir. 4°C'de 15 dakika süresince 15000-18000 g'lik santrifüj işlemi uygulanarak PEG 8000 ile faj partikülleri çöktürülmüş ve pelet, 700 µl faj tamponu (SM tamponu: 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM Tris-Cl pH 7.5), % 0.01 jelatin (w/v) içerisinde çözülmüştür. Üzerine eşit hacimde kloroform eklenerek, 4°C'de 9000 g hızla 15 dakika santrifüj edilmiş, böylece kalan hücre artıkları ve PEG 8000 faj süspansiyonundan uzaklaştırılmıştır. Faj partiküllerini yoğunlaştırmak için, süspansiyon 4°C'de 33000 g hızla 2 saat santrifüjlenmiştir.

Faj DNA izolasyonu

Faj DNA izolasyonunda, Lambda DNA Isolation Kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Öncelikle titresini 10^{10} - 10^{11} pfu/ml olacak şekilde konsantre edilmiş olan faj süspansiyonuna, SDS ve/veya proteinaz-K eklenerek, faj proteinlerinin parçalanması ve DNA'ların serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Parçalanmış faj proteinleri, potasyum asetat (2.5 M, pH 5) ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır. DNA izolasyon kitine ait resin kolona tutturulmuş olan DNA, kolondan geri alınmış üzerine eşit miktarda izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. Son olarak DNA, % 70'lik etanol ile yıkanmıştır. Elde edilen DNA peleti, steril deiyonize suda çözülerek saklanmıştır. İzolasyonları gerçekleştirilen DNA'lar, % 0.8-1'lik agaroz jelde 60 V'da yürütülmüş, GELLOGIC 100 IMAGING SYSTEM (A.U. Veterinerlik Fakültesi Viroloji Bölümü) yardımıyla görüntülenmiştir. İzole edilen DNA'nın saflığına ve miktarına, UV spektrofotometresinde (Agilent 8453 UV Spektrofotometre, Agilent Technologies, Santa Clara) 260 nm ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda aşağıda verilen formüller kullanılarak karar verilmiştir.

$$\text{DNA Saflığı} = A_{260}/A_{280}$$

$$\text{DNA Konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

DNA dizi analizi

Faj DNA'sının dizi analizleri, Roche Genome Sequencer 454 FLX System (Microsynth, İsviçre) ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, ilk olarak dizi analizi yapılmak istenen DNA örneğinin tek zincir ve fragmentler halinde eldesini istemektedir. Yaklaşık 300-800 baz uzunluğuna sahip fragmentler, sisteme dahil olan PCR ile çoğaltılıp, dizilimler okunmaktadır. Elde edilen bu parça dizilimler, sistem tarafından 4 farklı biyoinformatik sistem ile karşılaştırılmaktadır (31).

DNA diziliminin veri tabanları ile karşılaştırılması

Elde edilen DNA dizisi, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 32) programı kullanılarak, Amerika Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information, NCBI, 27) tarafından oluşturulmuş gen bankasında

bulunan diziler ile karşılaştırılmış ve nükleik asit düzeyindeki benzerlikler ve ayrılıklar ortaya çıkarılmıştır. Açık okuma çerçevelerinin (ORF) belirlenmesi için ise yine NCBI tarafından kullanıma sunulan ORF finder (26) programı kullanılmıştır. Bu program ile faj DNA'sında bulunması olası ORF'ler bulunmuştur. Bu ORF'ler içinde yer alan aminoasit sekansları, yine BLAST programlarından biri olan "blastp" aracılığıyla, var olan protein veri tabanı ile karşılaştırılmış ve böylece faj DNA'sında kodlu olan genin hangi proteinden ve fonksiyondan sorumlu olabileceği tespit edilmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, daha önce morfolojik olarak tanımlanmış (24) ve RFLP çalışmaları (25) ile koleksiyondaki diğer fajlardan ayrılmış 231-X10 fajı kullanılmıştır. Bu faj, kasılmayan uzun kuyruğu ve ikosahedral kapsid yapısı nedeniyle Bradley sınıflaması B grubuna dahil edilmiştir (24). *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII* ve *HindIII* gibi restriksiyon enzimleri ile kesim şablonları çıkarılan 231-X10 fajının DNA büyüklüğünün yaklaşık 40000-45000 baz arasında olabileceği tespit edilmiştir (25). Bu faja ait yaklaşık 20135 bazlık bölge, 454 FLX sekans belirleme sistemi tarafından okunmuş ve birleştirilmiştir (28). NCBI (27) tarafından hizmete sunulan ORF finder programı (26) kullanılarak, dizi analizi yapılmış ve bu parçada yer alan muhtemel ORF'ler bulunmuştur. Bu programın kullanımında başlangıç kodonu olarak ATG ve diğer alternatifler ile tarama yapılmış, yine NCBI tarafından kullanıma sunulmuş Blastp (32) programı ile en yüksek benzerlik gösteren faj ve/veya bakteri aminoasit dizilimleri karşılaştırılmış ve Çizelge 1'de verilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda faj genomunun bu bölümünde, anlamlı olabilecek 13 adet ORF olabileceği tespit edilmiştir. ORF'ler genom üzerinde tespit edildikleri sırayla 1'den 13'e kadar kodlanmıştır. Açık okuma çerçevelerine ait detaylı bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir. Bu Çizelge, 231-X10 faj proteinlerinin en yüksek benzerlik gösterdiği proteinlerin gen bankası (27, 28) kayıt numaralarını da içermektedir.

Dizilimin başında yer alan ilk okuma çerçevesinin (ORF1), 235 aminoasit uzunluğunda olduğu ve bu proteinin diğer *S. thermophilus* fajlarında da bulunan varsayımsal faj proteinlerinin yer aldığı "fonksiyonu bilinmeyen alanlar" (Domains of unknown function, DUF) 1340 içinde olduğu

tespit edilmiştir. Bu gen tarafından ifade edilen proteini oluşturan aminoasit sayısı aynı olsa da bazı aminoasitlerinde değişimler olduğu görülmüştür. Bu proteinin en yüksek benzerlik (% 97) gösterdiği proteinin *S. thermophilus* 7201 fajında ORF18 olarak kodlanan protein olduğu tespit edilmiştir (15, 28, Çizelge 1). Ayrıca bu bölge, pek çok DNA polimerazın yer aldığı, Polymerase and Histidinol Phosphatase bölgesi ile de örtüşmektedir. Bu bölge tarafından kodlanan polimerazların, genin doğru okunup okunmadığını kontrol etme ve DNA tamir aktiviteleri gösterdiği tespit edilmiştir (33).

ORF2 olarak adlandırılan diğer açık okuma çerçevesi, 132 aminoasit uzunluğunda olup *Streptococcus* Sfi19 fajındaki Apaf-1 related killer DARK ile % 89 benzerlik göstermektedir (34, Çizelge 1). Bu yapıda bulunan ilk 15 aminoasidin bu iki fajda birbirinden farklılaştığı görülmüştür. Daha sonraki aminoasitlerin ise birebir aynı olduğu ve korunmuş DUF 1492 bölgesi ile aynı olduğu tespit edilmiştir. DUF 1492 bölgesinin, pek çok *Streptococcus* fajında korunarak kaldığı görülmüştür (27, 28).

Streptococcus 7201 fajında ORF20 olarak kodlanmış bölge (15, Çizelge 1) ile aminoasit bazında % 98 benzerlik gösteren muhtemel açık okuma çerçevesi, 231-X10 fajında ORF3 olmuştur. Abc2 fajı ile de aynı aminoasit sayısına sahip bu protein, % 91 benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu proteinin bir kısmı da korunmuş bir gen bölgesi olarak viruslerde, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Endonükleazların (HNH, homing endonuclease) ifade edildiği bu bölge sayesinde, DNA replikasyonu, kesimi, onarımı ve kromozom parçalama gibi işlevler yerine getirebilmektedir (33, 35). Sentezlenen faj DNA'sının lokasyonu ve kapsid içinde paketlenmesi aşamasında çalışan terminaz enziminin ifade edildiği bölge ORF4 olarak adlandırılmıştır. 231-X10 fajında kodlanan bu bölgenin diğer bir *S. thermophilus* fajı olan Abc2 ile aminoasit bazında % 93 benzer olduğu görülmüştür (20, Çizelge 1). Aynı zamanda bu bölgenin *S. thermophilus* Sfi19, Sfi21 ve 7201 ait terminaz bölgesi ile sırasıyla % 92, % 91, % 68 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. 626 aminoasit uzunluğunda olan bu proteinin yukarıda verilmiş olan diğer fajlarda 623 aminoasit olduğu görülmüştür. Ayrıca bu bölge *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* farklı suşları tarafından sentezlenen terminaz enzimleri ile de benzerlik göstermektedir.

Çizelge 1. 231-X10 faj DNA'sına ait olası açık okuma çerçeveleri ve fonksiyonları
Table 1. ORFs of phage 231-X10 and putative functions of proteins

ORF	Başlangıç Start (aa)	Bitiş Stop	Büyüklik Size	Tahmini fonksiyon Predicted function	En iyi eşleşme Best match	E- değeri E-value	Benzerlik Match identity (%)	Kaynak/Protein Numarası Reference/ Accession no
1	26021	25314	235	Fonksiyonu bilinmeyen protein	<i>S.thermophilus</i> 7201 fajı	1e-166	97	15/ NP_038319.1
2	24934	24536	132	Apaf-1 related killer DARK	<i>S.thermophilus</i> Sfi19 fajı	3e-80	89	32/ NP_049923.1
3	24424	23906	172	Endonükleaz ailesi	<i>S.thermophilus</i> 7201 fajı	1e-120	98	15/ NP_038321.1
4	23245	21365	626	Terminaz	<i>S.thermophilus</i> Abc2 fajı	0	93	20/ YP_003347411.1
5	19996	18836	386	portal protein	<i>S.thermophilus</i> Abc2 fajı	0	95	20/ YP_003347413.1
6	18858	18184	221	Proteaz	<i>S.thermophilus</i> 7201 fajı	4e-160	99	15/ NP_038326.1
7	18168	16975	397	Majör kapsid proteini	<i>S.thermophilus</i> Sfi19 fajı	0	97	32/ NP_049929.1
8	16677	16300	125	Kapsid-kuyruk adaptör proteini	<i>S.salivarius</i>	6e-75	91	27/ WP_014634375.1
9	16293	15874	139	Kuyruk bileşen proteini	<i>S.thermophilus</i> DT1 fajı	1e-91	94	4/ NP_049399.1
10	15481	14864	203	Major kuyruk proteini	<i>S.thermophilus</i> Abc2 fajı	7e-138	94	20/ YP_003347420.1
11	14831	14436	117	Kuyruk bileşen proteini	<i>S.thermophilus</i> DT1 fajı	4e-75	96	4/ NP_049402
12	14217	9436	1593	Kuyruk uzunluğunu belirleyen protein	<i>S.thermophilus</i> MD2 fajı	0	85	38, 39/ AAX45244.1
13	9439	7874	520	Kuyruk proteini	<i>S.thermophilus</i> YMC-2011 fajı	0	81	27/ WP_045002252

Bunun sebebi bakterilerin de fajlarda bulunan terminaz enzimine benzer enzime sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Korunmuş olan bu bölge YmfN olarak adlandırılmıştır (33). Tarafımızca ORF5 olarak adlandırılan ve 386 adet aminoasitten oluştuğu düşünülen açık okuma çerçevesinin, yine 386 aminoasitten oluşan *S. thermophilus* Abc2 faj portal proteinine % 95 oranında benzer olduğu saptanmıştır (20, 28, Çizelge 1). Ayrıca bu protein, *S. thermophilus* DT1 (386 aminoasit), 7201 (382 aminoasit), Sfi19 (386 aminoasit) ve Sfi 21 (384 aminoasit) faj portal proteinleri ile de yüksek benzerlik göstermektedir. Bunun asıl nedeninin yine yüksek oranda korunmuş olması nedeniyle faj portal ailesine ait proteinler ile örtüşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu ailede yer alan proteinler, faj DNA'sının kapsid içinde paketlenmesi ve DNA'nın bakteriye enjekte edilmesi sırasında bir

kanal oluşturularak kapsid ile kuyruk proteinleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamaktadır (36). Ayrıca farklı *Streptococcus* ve *Lactococcus* türlerine ait proteinler ile de farklı oranlarda benzerlikler tespit edilmiştir (27, 28).

Ortamda ATP olması durumunda çalışan, pek çok bakteri ve ökaryotik hücrede bulunan çok yüksek seviyede korunmuş serin proteaz enziminin kodlandığı bölüm ile örtüşen açık okuma çerçevesi ise ORF6 olarak adlandırılmıştır. 221 aminoasitlik bu protein, yine 221 aminoasit uzunluğundaki *S. thermophilus* 7201 fajı proteazı (ORF25) ile en yüksek (% 99) benzerliği göstermiştir. Bu bölge çok yüksek oranda korunmuş olmasına rağmen, varlığı tespit edilen aminoasitlerin, diğer *S. thermophilus* fajlarından (Abc2, DT1, Sfi21) önce *Streptococcus salivarius* suşunda kodlanan

enzimdeki aminoasitler ile de uyum (% 91) gösterdiği tespit edilmiştir (27, 28).

397 aminoasit sayısına sahip olası proteinin (ORF7), temel kapsid proteinini oluşturduğu düşünülmüştür. Bunun nedeni çalışılan 231-X10 fajının bu bölgeye ait hem aminoasit sayısı hem de dizilimi özellikle Sfi19 fajı ile yüksek oranda benzerlik göstermesidir (28, 34, Çizelge 1). Yapılan araştırmalar sonucunda aslında bu benzerliğin temel sebebinin çift zincir DNA'ya sahip kuyruklu fajlarda görülen kapsid protein ailesinin üyesi olmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır (37). Ayrıca hemen bu proteini kodlayan genin ardından, kapsidin kuyruğa bağlanmasını sağlayan diğer bir proteinin geldiği görülmüştür (ORF8, Çizelge 1).

ORF 9-10-11, olarak adlandırılan proteinlerin fajların kuyruk yapıları ile ilgili olduğu tespit edilmiş, bu proteinlerden ilkinin (ORF 9) kuyruk bileşen proteini olduğu görülmüştür. Bu proteinin en çok *S. thermophilus* DT1 ve 7201 fajlarındaki protein ile benzer olduğu (4), HK97 fajı gp10 ailesine dâhil olduğu saptanmıştır (27, 28). Daha önce yapılan çalışmalara göre majör kuyruk proteini olduğu belirlenen diğer bir protein, bu çalışmada ORF10 olarak adlandırılmıştır. Bu protein aminoasit sayısı ve yüzde olarak en çok *S. thermophilus* Abc2, DT1, 7201 ve Sfi19 fajları ile benzerlik göstermiştir. 231-X10 fajında olduğu saptanan diğer bir proteinin (ORF11) de, Siphoviridae familyasında yer alan bazı virüslerde korunmuş bir bölge olarak kalan "faj kuyruk montaj şaperon proteinlerinden" olduğu tespit edilmiştir (38). Bu proteinin DT1 ve 7201 fajlarının sahip olduğu proteinler ile aynı aminoasit sayısına sahip olduğu ve sırasıyla onlara % 96 ve % 94 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Faj kuyruğu ile ilgili bir diğer protein de "putative tape measure protein" olarak adlandırılmıştır. Bu şekilde adlandırılmasının sebebi çok uzun aminoasit dizisine sahip olması, birbirini tekrar eden diziler içermesi ve kuyruk uzunluğundan sorumlu olduğunun düşünülmesidir (39). 231-X10 fajındaki bu proteinin (ORF12) 1593 aminoasitten oluştuğu tahmin edilmektedir. En yüksek benzerlik gösterdiği *S. mutans* MD2 (27, Çizelge 1) ve *S. thermophilus* DT1 fajında bu proteinin uzunluğu 1656 aminoasittir (27, 28). Arada yaklaşık 100 aminoasitlik fark olmasına rağmen bahsedilen bu iki faj proteinine % 85 (MD2 suşu) ve % 84 (DT1 fajı) oranında benzerlik göstermiştir (27, Çizelge

1). Sfi21 fajında bu protein 1560 aminoasit iken 7201 fajında 1554 aminoasit olduğu tespit edilmiştir (27, 28). Yapılan bazı çalışmalarda bu proteinin kuyruk uzunluğundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (40, 41). Dizi analizi yapılmış gen bölgelerinin sonunda ORF13 olarak adlandırdığımız bir protein bulunmaktadır. Sahip olduğu fonksiyon henüz bilinmeyen ama kuyruk proteini olarak tanımlanmış olan bu protein, *Siphoviridae* familyasında yer alan fajların sahip olduğu proteinlerden biri olarak karşımıza çıkmıştır (27, 28).

Yukarıda bahsedilen karşılaştırmalar dikkate alındığında, kısmi dizi analizi yapılmış 231-X10 faj proteinlerinin çoğunlukla korunmuş bölgelere sahip olduğu, aminoasit bazında en yüksek benzerliği DNA paketleme mekanizmasına göre *cos*-tipi olarak sınıflandırılan *S. thermophilus* DT1, Sfi19, Sfi21, 7201, Abc2 (20, 42) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. 231-X10 fajına ait olası açık okuma çerçeveleri ile benzerlik gösterdiği diğer ORF'ler incelendiğinde, her iki faja ait proteinin aminoasit sayıları aynı olsa da bu aminoasitlerin farklı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu fajların daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi ortak bir atadan geldiği (42), gen bölgelerindeki küçük kopmalar ve eklemelerle mutasyon geçirdikleri anlaşılmıştır. BLAST programı kullanılarak yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda 231-X10 fajının, gen bankasında yer alan *S. thermophilus* Sfi11, O1205, 2972, 858, ALQ13.2, TPJ-34, TP-778L, 5093, 9871, 9872, 9873, 9874 fajları ile ya çok düşük düzeylerde benzer olduğu ya da hiçbir ortak bölgelerinin olmadığı görülmüştür. Buna ek olarak bu fajın bazı bölgerinin kendi konakçısı dışındaki *Streptococcus* ve *Lactobacillus*, *Lactococcus* türleri ile daha fazla benzerlik gösterdiği saptanmıştır (28, 31). Dolayısıyla benzerlik gösterdiği saptanan mikroorganizmaların diğer laktik asit bakterilerinin olması, hem fajların kolay mutasyona uğradıklarını hem de bakterilerin evrimsel gelişimlerine büyük katkıları olduğu gerçeğini bir kez daha ortaya koymuştur (5).

Bu çalışma ile 454 genome sequece sistemi kullanılarak kısmi DNA analizi yapılmış olan 231-X10 fajının, ORFfinder ve BLAST programları kullanılarak yapılan analizleri sonucunda bu bölgede muhtemel 13 adet ORF olduğu ve bunların da replikasyon, DNA paketleme, kapsid ve kuyruk yapısının oluşumundan sorumlu genler ve

proteinler olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu fajda muhtemel proteinlerin kodlandığını ve fonksiyonlarını tam anlamıyla ortaya koymak için detaylı bir protein analizinin yapılması gerekmektedir. Bunun için fajın eksik kalan genom diziliminin belirlenmesi ve detaylı bir transkripsiyon haritasının çıkartılması çalışmalarına başlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, maddi olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiş 110O035 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bilimsel desteklerinden ve anlayışlarından dolayı Prof. Dr. Nezihe Tunail, Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı, Prof. Dr. Aykut Özkul ve Prof. Dr. K. Serdar Diker'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Tunail N, Ayhan K, Akçelik M, Durlu-Özkaya F, Doğan HB, Kaleli D, Tükel Ç, Acar E. 2002. Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar. TÜBİTAK/TARP-2106 Nolu Proje Raporu.
2. Ackermann HW. 2006. Classification of bacteriophage. In: The Bacteriophage 2nd. Calendar R. (Ed), Oxford University Press, USA, pp. 8-16.
3. Paez-Espino D, Sharon I, Morovic W, Stahl B, Thomas BC, Barrangou R, Banfield JF. 2015. CRISPR immunity drives rapid phage genome evolution in *Streptococcus thermophilus*. mBio, mbio.asm.org, 6 (2), e00262-15.
4. Lamothe G, Levesque C, Bissonnette F, Cochu A, Vadeboncoeur C, Frenette M, Duplessis M, Tremblay D, Moineau S. 2005. Characterization of the cro-ori region of the *Streptococcus thermophilus* virulent bacteriophage DT1. *Appl Environ Microbiol*, 71 (3), 1237-1246.
5. Brüßow H, Desiere F. 2006. Evolution of Tailed Phages: Insights from Comparative Phage Genomics. In: The Bacteriophage 2nd. Calendar R. (Ed), Oxford University Press, USA, pp. 26-36.
6. Brüßow H, Suarez JE. 2006. *Lactobacillus* phages. In: The Bacteriophage 2nd. Calendar R. (Ed), Oxford University Press, USA, pp. 653-657.
7. Quiberoni A, Moineau S, Rousseau GM, Reinheimer J, Ackermann HW. 2010. *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Int Dairy J*, 20, 657-664.
8. Ali YHM, Yousef NMH. 2014. Detection and characterization bacteriophages attacking dairy *Streptococcus thermophilus* starter cultures. *African J Microbiol Res*, 8 (27), 2598-2603.
9. McDonnell B, Mahonya J, Neve H, Hanemaaijer L, Nobend J-P, Kouwen T, van Sinderen D. 2016. Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 82 (17), 5153-5165.
10. Prevots F, Relano P, Mata M, Ritzenthaler P. 1989. Close relationship of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* at both the protein and the DNA level, *J Gen Microbiol*, 135, 3337-3344.
11. Le Marrec C, Sinderen D, Walsh L, Stanley E, Vlegels E, Moineau S, Heinze P, Fitzgerald G, Fayard B. 1997. Two groups of bacteriophages *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3246-3253.
12. Tremblay DM, Moineau S. 1999. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology*, 255, 63-76.
13. Suárez VB, Quiberoni A, Binetti AG, Reinheimer JA. 2002. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *J Food Prot*, 65 (10), 1597-1604.
14. Quiberoni A, Auad L, Binetti AG, Suarez VB, Reinheimer JA, Raya RR. 2003. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yoghurt industrial plant. *Food Microbiol*, 20, 461-469.
15. Stanley E, Fitzgerald GF, Le Marrec C, Fayard B, van Sinderen D. 1997. Sequence analysis and characterization of phiO1205, a temperate bacteriophage infecting *Streptococcus thermophilus* CNRZ1205. *Microbiology*, 143, 3417-3429.
16. Lucchini S, Desiere F, Brüßow H. 1998. The structural gene module in *Streptococcus thermophilus* bacteriophage phiSfi11 shows a hierarchy of relatedness to Siphoviridae from a wide range of bacterial hosts. *Virology*, 246, 63-73.

17. Desiere F, Lucchini S, Brussow H. 1999. Comparative sequence analysis of the DNA packaging, head, and tail morphogenesis modules in the temperate cos-site *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi21. *Virology*, 260, 244-253.
18. Levesque C, Duplessis M, Labonte J, Labrie S, Fremaux C, Tremblay D. 2005. Genomic organization and molecular analysis of virulent bacteriophage 2972 infecting an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4057-4068.
19. Deveau H, Barrangou R, Garneau JE., Labonte J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P. and Moineau S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190, 1390-1400.
20. Guglielmotti DM, Deveau H, Binetti AG, Reinheimer JA, Moineau S, Quiberoni A. 2009. Genome analysis of two virulent *Streptococcus thermophilus* phages isolated in Argentina. *Int J Food Microbiol*, 136, 101-109.
21. Milles S, Griffin C, O'Sullivan O, Coffey A, Mcauliffe OE, Meijer WC, Serrano LM, Ross RP. 2011. A new phage on the "Mozzarella" block: Bacteriophage 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *Int Dairy J*, 21, 963-969.
22. Ali Y, Koebeg S, Heßner S, Sun X, Rabe B, Back A, Neve H, Heller KJ. 2014. Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. *Front Microbiol*, 5: 98.
23. Brüssow H. 2001. Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 283-303.
24. Acar Soykut E, Tunail N. 2010. Morphological Characterization of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* virulent phages, *GIDA (FOOD)*, 35 (5), 317-323.
25. Acar-Soykut E, Tunail N. 2016. Classification of *Streptococcus thermophilus* phages originating from Turkey, *J Food Saf*, 36, 186-194.
26. ORFfinder, Open Reading Frame finder, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (Accessed 01 August 2016).
27. NCBI, National Centre for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov (Accessed 01 August 2016).
28. Acar-Soykut E, Diker S. K. 2011. Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajların Genomik Karakterizasyonları TÜBİTAK 110O035 nolu proje.
29. Krusch U, Neve H, Luschei B, Teuber M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 39 (3), 155-167.
30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1626 p.
31. 454 De Novo Genome Sequence, http://454.com/downloads/454SystemsBrochureSpread_Fin_Final.pdf (Accessed 30 August 2016).
32. BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accessed 01 August 2016).
33. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 43 (Database issue), D222–D226.
34. Desiere F, Lucchini S, Brussow H. 1998. Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *J Virol*, 241 (2), 345-356.
35. Hsia K-C, Chak K-F, Liang P-H, Cheng Y-C, Ku W-Y, Yuan H-S. 2004. DNA binding and degradation by the HNH Protein ColE7. *Struct*, 12 (2), 205-214.
36. Williams LS, Levdikov VM, Minakhin L, Severinov K, Antson, AA. 2013. 12-fold symmetry of the putative portal protein from the *Thermus thermophilus* bacteriophage G20C determined by X-ray analysis. *Acta Crystallogr F*, 69 (11), 1239-1241.
37. Gan L, Speir JA, Conway JF, Lander G, Cheng N, Firek BA, Hendrix RW, Duda RL, Liljas L, Johnson JE. 2006. Capsid conformational sampling in HK97 maturation visualized by X-Ray crystallography and cryo-EM. *Struct*, 14, 1655-1665.

38. Pell LG, Cumby N, Clark TE, Tuite A, Battaile KP, Edwards AM, Chirgadze NY, Davidson AR, Maxwell KLA. 2013. Conserved spiral structure for highly diverged phage tail assembly chaperones. *J Mol Biol*, 425 (14), 2436–2449.
39. Belcaid M, Bergeron A, Poisson G. 2011. The evolution of the tape measure protein: units, duplications and losses. *BMC Bioinformatics*, 12 (Suppl 9): S10.
40. Katsura I, Hendrix RW. 1984. Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell*, 39, 691-698.
41. Abuladze NK, Gingery M, Tsai J, Eiserling FA. 1994. Tail Length Determination in Bacteriophage T4, *Virology*, 199 (2), 301-310.
42. Brüssow H, Desiere F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Mol Microbiol*, 39 (2), 213-222.