

Doğal *Streptococcus thermophilus* İzolatlarında *comX* Gen Varlığına Bağlı DNA Transfer Frekansının Belirlenmesi

Altuğ KARAMAN¹, Ferit Can YAZDIÇ^{1*}, İsmail AKYOL², Mehmet Sait EKİNCİ¹,

Emin ÖZKÖSE¹

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü,

KAHRAMANMARAŞ

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü,

KAHRAMANMARAŞ

*e-mail: fcyazdic@ksu.edu.tr

Öz: Alternatif sigma faktör olan *comX*, streptokoklarda dışarıdan DNA alabilme kapasitesini belirleyen genlerin transkripsiyonunu kontrol eden ve dolayısıyla bu suşların yabancı genetik materyali kabul etme frekansı ile ilişkili olan bir genidir. Bu nedenle doğal izolatlardaki varlığının tespit edilmesi, bu izolatların konjugasyon kapasitelerinin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada 106 farklı *Streptococcus thermophilus* izolatında *comX* geninin varlığı araştırılmıştır. Bu izolatların 46 tanesinde polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi ile *comX* gen varlığı tespit edilmiş ve nükleotid dizileri belirlenmiştir. Kompetent hücrelerin konjugasyon frekansları için pNZ276 plazmiti ve katalaz testi kullanılmıştır. *BioSt-7*, 16, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 36, 37, 42 ve 46 nolu izolatların konjugasyon özellikleri tespit edilmiştir. *BioSt-19*, 24, 25,29 ve 42 nolu izolatların da konjugasyon frekansları % 40'tan yüksek bulunmuş ve konjugasyon oranı ile *comX* gen dizisi arasında ilişki tespit edilmiştir. *ComX* proteininde 72. amino asit pozisyonundaki asparajinin yerine izolösin değişimi (N→I), konjugasyon frekansını artırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *comX* gen dizisi üzerindeki değişim mutasyonlarının izolatların gen transfer sıklığını önemli derecede etkileyebileceğini, suşlara göre farklılık içereceğini ve konjugasyon özelliğini değiştirebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Streptococcus thermophilus*, *comX* geni, konjugasyon frekansı

Determination of DNA Transfer Frequency, Related to the Presence of *comX* Gene, in Natural *Streptococcus thermophilus* Isolates

Abstract: Activity of *comX*, alternative sigma factor, is crucial in the expression of the genes required for conjugation takes place in Streptococci and hence it is related to the frequency of competency. Determination of these genes in natural isolates, therefore, is a pivotal issue to understand the conjugation capacity of those microorganisms. In the current study, 106 *Streptococcus thermophilus* isolates are investigated for the presence of *comX* gene. Total 46 of these isolates are found to be *comX* positive using polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing data of them were obtained. The plasmid pNZ276 and catalase tests were used to investigate the conjugation frequency of competent cells. Conjugation characteristics of the isolates *BioSt-7*, 16, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 36, 37, 42 and 46 were studied and conjugation frequency of the isolates *BioSt-19*, 24, 25,29 and 42 are found to be over 40% and moreover a notable relationship between conjugation ratio and *comX* gene is determined. Substitution of isoleucine (I) for asparagine (N) in 72nd amino acid position of *comX* protein increased the conjugation frequency of the isolates. The findings of current study suggest that, some mutations occurred on *comX* gene may affect the frequency of competency and conjugated characteristics of streptococcal isolates.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, *comX* gene, conjugation frequency

1. Giriş

Streptococcus thermophilus, laktik asit formasyonu için süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve patojenik olmayan starter bir laktik asit bakterisi (LAB) türüdür (Hols ve ark., 2005). Endüstriyel olarak önemli olan bu bakterilerin metabolik özelliklerinin geliştirilmesi yaklaşımları *Streptococcus thermophilus* türünü mikrobiyal genetiğin öncülerinden birisi yapmaktadır. Bu bakteriler termofilik laktik asit bakterisi grubuna aittirler, geleneksel olarak üretilen yoğurtlarda *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) veya *Lb. helveticus* ile kombinasyon halinde kullanılırlar (El Kafsi ve ark., 2014). Ayrıca nispeten yüksek sıcaklıkta işlem gören (45 °C) emmental, gravyer, grana gibi sert peynirlerin yapımında yaygın starter kültür olarak kullanılmaktadır (Fox, 1993; Tamime ve Deeth, 1980). Yoğurt yapımında starter kültür olarak *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşları genellikle birlikte kullanılmaları nedeniyle bu iki starter tür arasında biyokimyasal yönden kompleks bir simbiyotik ilişki şekillenmiştir (Hols ve ark., 2005; Akyol ve ark., 2015). *S. thermophilus* suşları ve *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans* gibi streptokok patojenleri arasında görülen horizontal gen alışverişi türlerin birbirlerine genetik olarak benzemelerini sağlamıştır (Mitchell, 2003;

Tettelin, 2004). Starter yoğurt suşlarının (LMG 18311 ve CNRZ1066) genom dizilerinin yayınlanmasına bağlı olarak streptokok patojenleri ile starterlerin genom karşılaştırmaları yapılmıştır (Bolotin ve ark., 2004; Hols ve ark., 2005). Starter ile patojenik türlerin genetik olarak yüksek oranda birbirlerine benzerlikleri belirlenmiş ancak patojenik özelliklerin olmadığı veya sessiz gen şeklinde olduğu görülmüştür (Tettelin ve ark., 2001; Bolotin ve ark., 2004; Hols ve ark., 2005).

Prokaryot genomlarının dizilenmesi ve bunlarla ilgili filogenetik çalışmalar, horizontal gen transferlerinin bakterilerde yaygın olduğunu ortaya koymuştur (Dagan, 2011). Patojen özellikte yatay gen transferi önemli bir rol almasına rağmen, genom karşılaştırması çalışmaları *S. thermophilus*'un genomunda bu özellik yönünden fonksiyonel kayıpların olduğunu da göstermiştir (Zaccaria ve ark., 2014). Bunun sonucunda *S. thermophilus*'da genomik esnekliğinin temeli için önemli olabilecek diğer bir özellik olan doğal transformasyonunun fonksiyonel kompetans (yeterlilik) mekanizması korumuştur (Gardan ve ark., 2009; Fontaine ve ark., 2010).

Doğal DNA transformasyonu, bir gen transfer mekanizmasıdır ve bu transferi kontrol eden gen veya genler kromozomla bütünleşmiştir (Shin ve ark., 2016). Gen

transferi için gerekli proteinler, türler arasında korunur ve belirli fizyolojik şartlarda ifade edilmektedir (Lorenz ve Wackernagel, 1994; Mao ve Lu, 2016). Bu yetenek streptokoklar arasında görülen ortak bir özelliktir (Cvitkovitch, 2001; Claverys ve Havarstein, 2002). Doğal transformasyonlar genom uyumu ve adaptasyona bağlı olmasına rağmen alıcı bakterilerin kromozomu üzerinde mutasyon etkilerine neden olabilir ve hücre büyümesini olumsuz etkileyebilmektedir (Schneider ve ark., 2002). Doğal transformasyonun temelini oluşturan kompetans, genellikle sıkı bir şekilde düzenlenmiş iki gen kümesi tarafından düzenlenir ve bu genler kompetans öncesi ve sonrası olarak ikiye ayrılırlar (Claverys ve Havarstein, 2002; Claverys ve Martin, 2003; Peterson ve ark., 2004). Yüksek-verimli doğal transformasyonun gerçekleştiği bilinen bakteriler (*Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Thermus*) doğal kompetant olarak bildirilmekte ve kolay transforme olabilme yeteneğine sahiptirler (Hülter ve ark., 2017). Transforme olabilen cinsler içerisinde sadece belirli suşlar veya türler yüksek transformasyon özelliği gösterirler (Evans ve Rozen, 2013). Transforme olan suşlarda kompetans özelliğini kontrol eden ve başka hücrelerden DNA'nın transferini sağlayan proteinler (örneğin, *S.pneumoniae*'deki RecA ve

DprA) bulunmaktadır (Bergé ve ark., 2003; Madigan ve Martinko, 2005). Bu proteinler doğal genetik transformasyon sırasında, bazı bakterilerin buldukları çevredeki yabancı DNA'ları hücre içine alabilmesini ve homolog rekombinasyon yoluyla organizmanın genomuna entegre olabilmesini sağlamaktadırlar (Madigan ve Martinko, 2005).

Doğal genetik transformasyon, 1928'de Frederick Griffith tarafından keşfedildiğinden beri, iki LAB türü olan *S. pneumoniae* ve *S. mutants* bakterilerindeki kompetans gelişimi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu iki türde görülen kompetans özelliği, genellikle sıkı bir şekilde bağlantılı iki gen kümesinden oluşur (Shanker ve Federle, 2017). Transformasyon öncesi genlerin (öncü genler; yaklaşık 20 adet) aktivasyonundan sorumlu olan *comABCDE* genleri ilk gen kümesini oluştururken, transformasyon sonrasında görevli genlerin (geç genler; yaklaşık 60 adet) ifadesi ve düzenlenmesinden sorumlu olan *comRSXW* genleri ikinci gen kümesini oluşturur (Boutry ve ark., 2012; Shanker ve Federle, 2017). Bu sistemi oluşturan *comABCDERSXW* operonunda, erken ifade olan genler *comE* geni tarafından düzenlenirken, alternatif sigma faktörü *comX*, geç genlerin ifadesi için gereklidir (Mitchell, 2003; Boutry ve ark., 2012; Peterson ve ark., 2004; Blomqvist ve ark., 2006). Bu ikili kompetans sistemde görevli

geç genler içerisinde *comX* geni iki kopya halinde bulunur (*comX1* ve *comX2*) ve transkripsiyonunu aktive eder ki bu son görevli genlerin ifadesi için önem arz etmektedir (Claverys ve Havarstein, 2002). Geç ifade olan genler, yabancı DNA transferine katıldığından, tek iplikli DNA'nın korunmasında ve genetik transformasyonun başarılı sonuçlanmasından sorumlu genlerdir (Luo ve Morrison, 2003; Prudhomme ve ark., 2006; Perry ve ark., 2009).

ComX geninin varlığı, *Streptococcus* cinslerinde dışarıdan DNA transformasyonunu olumlu etkilediği belirtilmektedir (Luo ve ark., 2003; Shanker and Federle 2017). Ayrıca bu gen geçici olarak bir RNA polimeraz merkezi ile ilişkili olan ve son *com* genlerinin spesifik transkripsiyonunun sonucunda Com nükleotid dizi kutusuna bağlanan bir alternatif sigma faktörüdür (Boutry ve ark., 2013). Sigma faktörleri, RNA polimeraz enzimine bağlanan ve gen transkripsiyonu başlatan odak noktalarıdır (Hsu ve ark., 2006). Genin transkripsiyonunu başlatılmasında rol alan sigma faktörü, gen yapısına ve o genin transkripsiyonunu başlatmak için gerekli çevresel sinyallere bağlıdır (Paget, 2015). Diğer taraftan genlerin promotör dizilerinin RNA polimeraz tarafından seçilmesi ve bağlanması da RNA polimeraz ile ilişkili olan sigma faktörüne bağlıdır (Ho ve

Ellermeier, 2012). Bu açıdan streptokok türlerde transkripsiyon etkinliğinin kontrolü sigma X faktörü (σ^x) ile sağlanır ve bu faktör türlerde doğal transformasyonun düzenleyicisi görevi görür (Fontaine ve ark., 2015). Transkripsiyonel aktivasyonunda düzenleyici bir rol alan *comX*'in, doğal izolatlarda gen transfer yatkınlığı ile ilişkisi tam olarak belirlenememiştir. Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanmış doğal yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* izolatlarında özellikle geç evrede kompetent özelliği sağlayan genlerin tezahürü için gerekli olan *comX* geninin varlığı PZT amplifikasyonu ile tespit edilmiş ve izolatların gen transfer frekansları konjugasyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mikroorganizmalar ve Büyüme Şartları

Çalışmada moleküler tanımlamaları yapılmış 106 farklı *S. thermophilus* izolatı ve *E.coli* (EC1000) suşu kullanılmıştır. İzolatlar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Referans EC1000 suşu, *S. thermophilus* ve *E. coli*'de replike olabilen pNZ276 plazmitini taşımaktadır. *Streptococcus thermophilus* izolatları sükröz ile zenginleştirilmiş M17 besiyerinde

(SM17) (Merck, Almanya) ve *E. coli* suşu ise Luria Bertani Broth (LB) besi yerlerinde kültüre alınmıştır (Sambrook ve Russell, 2001). Katı SM17 ve LB hazırlamak için besiyerine %1,5 agar ilave edilmiştir. *Streptococcus thermophilus* suşları 42 °C’de ve *E. coli* suşu 37°C ’de kültüre alınmıştır.

2.2. Moleküler Çalışmalar

NCBI’deki streptokoklara ait *comX* gen bölgesi nükleotid dizisi Clone Manager 9 programı kullanılarak analiz edilmiş ve spesifik amplifikasyon için primerler (ComXF: 5’ ATGGAACAAGAAGTTTTGTTAAGGC 3’, ve ComXR: 5’ TCAGTCTTCTTCATTACA-TGGATCAA 3’) tasarlanmıştır. PZT amplifikasyonu işlemi toplam 40 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon; 4 µl buffer (10X) [500 mM Tris-HCl (25°C’de pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1’er µl (20 pmol), 0,5 µl DNA polimeraz (5 u/µl) [25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], 1 µl kalıp DNA (~400 ng/ml) ve 40 µl’ye tamamlamak üzere 31,5 µl dH₂O eklenerek hazırlanmıştır. PZT işleminde, 94 °C de 1 dak DNA’nın denatürasyonu, 55 °C de 30 sn primerlerin yapışması, 72°C de 1 dak uzama sıcaklığı olarak ayarlanmış ve PZT 35 döngü olarak yapılmıştır. Koloni PZT işleminden önce koloniler 95 °C de 5 dakika muamele edilip daha sonra PZT işleminde kalıp DNA

olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon işlemi sonucunda elde edilen PZT ürünleri agaroz jelde (%1 w/v) koşturulmuş ve Et-Br (0,5 µg/ml) ile 15 dakika boyandıktan sonra UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiştir. PZT ile amplifiye edilen *comX* gen bölgesinin iki yönlü olarak nükleotid dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen nükleotid dizisi, Clone Manager 9, ClustalX ve UPGMA yöntemine göre MEGA 6.0 programları ile analiz edilmiştir (Thompson ve ark., 1997; Nei ve Kumar, 2000).

2.3. Bakterilerin Konjugasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Konjugasyon frekansını belirlemek için kullanılacak olan izolatların *comX* gen bölgesi varlığı PZT amplifikasyonu ile belirlenmiştir. *comX* amplifikasyonu pozitif olan izolatların konjugasyon özelliği açısından transkonjugasyona daha uygun olabileceği öngörüldüğünden izolatların *comX* geni varlığına bağlı konjugasyon özellikleri test edilmiştir. Alıcı hücreler (*S. thermophilus* izolatları) SM17 agarlı besiyerine yayma ekim ile ekilerek petri yüzeyini kaplayacak şekilde çoğaltılmıştır. pNZ276 plazmidini taşıyan *E. coli* suşu LB Agar besi yerine dört farklı bölgeye inoküle edilmiştir (Şekil 1). pNZ276 plazmidini *E. coli* ve *S. thermophilus* türlerinde replikle olabilen, eritromisin antibiyotik dirençli, 4.2 kb’lik bir plazmittir. Eritromisin duyarlı *Str. thermophilus* (alıcı) ile aynı antibiyotiğe dirençli *E. coli* (donör) bakterileri

eritromisin içeren seçici petride (SM17) birleştirilmiştir (Şekil 1). Seçici petrilerin 16 saatlik inkübasyonu takiben, potansiyel transkonjugantların *E. coli* veya *S. thermophilus* ayrımları katalaz testi sonucuna göre seçilmiştir. Eritromisin antibiyotik dirençli ve katalaz negatif koloniler transkonjugant koloniler olarak seçilmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışma

Çalışmada kullanılan, 106 adet *Streptococcus thermophilus* izolatının konjugasyon potansiyelinin tespit edilmesi için, konjugasyon ile ilişkili *comX* genin amplifikasyonu yapılmıştır. PZT amplifikasyonu yapılan 106 *Streptococcus thermophilus* izolatının 46 tanesinde yaklaşık uzunluğu 497 bp olan *comX* gen bölgesi varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2). PZT amplifikasyonu belirlenmiş örneklerden *BioSt-7*, 16, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 36, 37, 42 ve 46 nolu izolatların konjugasyon özellikleri incelenmiştir. Bu izolatlar selektif besiyerindeki büyüme özellikleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Normal şartlarda Eritromisinli besiyerinde gelişemeyen *Streptococcus thermophilus* bakterileri pNZ276 plazmitini taşıyan *E. coli* bakterileri ile Eritromisin içeren besiyerine ekildiğinde transkonjugasyona bağlı gelişme göstermişlerdir (Şekil 3). Bunun sonucunda *comX* bölgesine sahip izolatlarının plazmit kazanımlarının yüksek veya düşük sıklıkta

olup olmadıkları saptanmıştır. Transkonjugant petrideki, kolonilerin *E. coli* ve *S. thermophilus* ayrımı, hidrojen peroksit kullanılarak katalaz testi ile yapılmıştır. Katalaz pozitif koloniler *E. coli* sayısını (yüzdesini) katalaz negatif koloniler *Streptococcus thermophilus* koloni sayısını (yüzdesini) bildirmiştir. Çalışılan bu izolatlarda *BioSt-19*, 24, 25, 29 ve 42 nolu suşun konjugasyon frekansı % 40'ın üzerinde olduğu (Çizelge 1) ve *comX* gen varlığı bakımından pozitif olan izolatlar oldukları tespit edilmiştir. Transkonjugasyon oranı, *comX* gen varlığı bakımından negatif olarak belirlenen izolatlarda (*BioSt-7*, 36 ve 37) % 10'un altında olduğu görülmüştür. Ayrıca diğer izolatların konjugasyon frekansı dikkate alındığında, *BioSt-16*'nın % 22, *BioSt-22*'nin % 36, *BioSt-30*'un % 19 ve *BioSt-46*'nın % 31 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç konjugasyon frekansının sadece *comX* gen varlığı ile açıklanabilmesi olgusunu sınırlamaktadır. *comX* gen bölgesi yönünden pozitif olarak belirlenen 8 izolatın (*BioSt-16*, 19, 23, 24, 25, 29, 42 ve 46) *comX* gen bölgesi nükleotid dizilimi ileri ve geri okumalarla belirlenmiştir. Daha sonrasında nükleotid ve protein dizilerindeki farklılıklar analiz edilmiştir (Şekil 4). *comX* gen bölgesinin amino asit dizisinin BLAST analizi, belirlenen tüm dizilerin *comX* gen bölgesine (RNA polimerase sigma-70 factor) ait olduğunu göstermiştir. *BioSt-24* izolatından elde edilen nükleotid dizilemesi,

diğer izolatlardan farklı amino asit dizilimleri göstermiştir (Şekil 5). Referans olarak kullanılan *S. thermophilus* ND07 (Ac. No: CP016394.1) suşunun *comX* gen bölgesine göre, dizi analizi gerçekleştirilen tüm BioSt izolatlarının 60. nükleotid pozisyonundaki Guanin Timine (G→T), 267. pozisyonundaki Timin Sitozine (T→C) dönüşürken, *BioSt-19* ve *BioSt-24*'deki 229. pozisyonundaki sitozin adenine (C→A) dönüşmüştür. Dikkat çeken nokta bu pozisyonlardaki nükleotid değişiklikleri translasyonda değişikliğe yol açmazken, *BioSt-24*'deki 215. pozisyonunda bulunan adenin nükleotidi yerini timin aldığı anda (A→T), amino asit diziliminde 72. pozisyonunda polar bir amino asit olan asparajin (N), apolar bir amino asit olan izolösine (I) dönüşmüştür. Elde edilen protein dizilimindeki amino asit değişikliği proteinin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olmuş olabilir. Bunun için daha ayrıntılı olarak protein yapısının çalışılması gereklidir. Ancak *BioSt-24* nolu izolattaki amino asit değişikliğinin (N→I) konjugasyon frekansı özelliğini artırdığı belirlenmiştir.

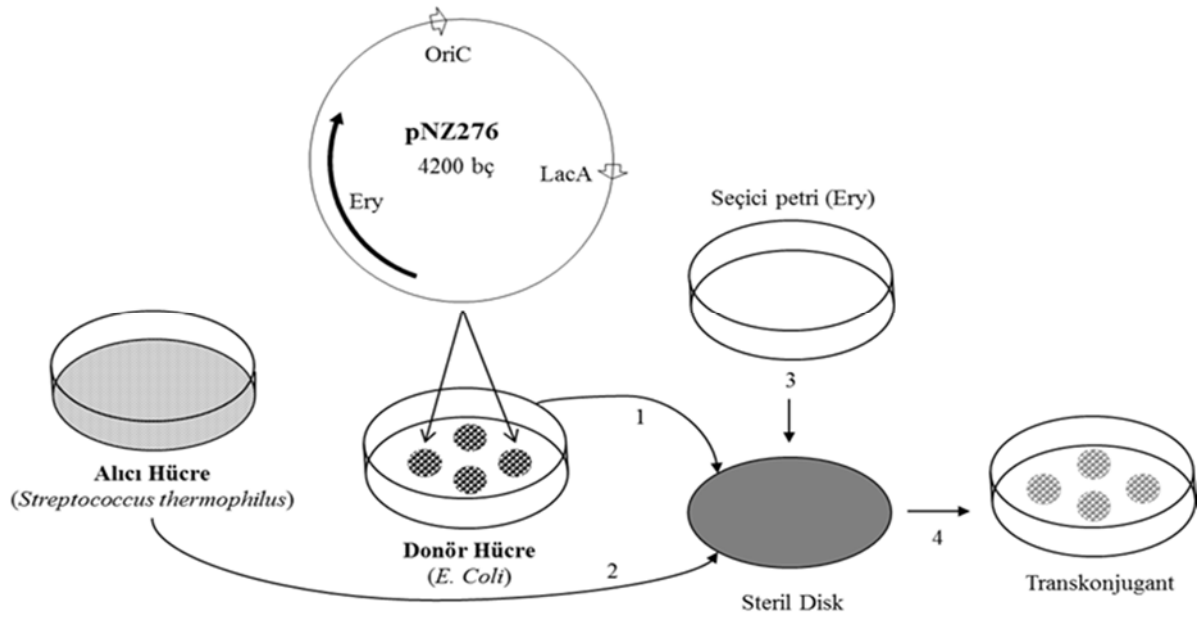
Güncel çalışmalar bakterilerde kompetans hücre özelliğinin kontrolünü sağlayan *comAB*, *comCDE* ve *comRS* operonlarının yanında, geç genlerin aktivasyonunu sağlayan *comX* geninin rolünün nedenli önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Kaspar ve ark., 2015;

Tovpeko ve Morrison, 2016; David ve ark., 2017). *comX* geninin yüksek oranda ifade edilmesi ise *S. thermophilus*'da kompetans frekansını, diğer bir ifadeyle transkonjugasyonu teşvik etmektedir (Blomqvist ve ark., 2006). Bu nedenle mevcut çalışmada kullanılan *Streptococcus thermophilus* izolatlarının (*BioSt-7,-16, -19,-23,-24,-25,-29, -30, -36, -37, -42 ve -46*) farklı konjugasyon frekansına (%10< ve >%40) sahip olması *comX* geninin değişik oranlarda ifade edildiğini gösterir niteliktedir. Benzer şekilde, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suşunda *comX* gen bölgesindeki tek nükleotidlik yapay mutasyonla doğal DNA transformasyonun *in vitro* olarak aktive edilebildiği belirtilmiştir (David ve ark., 2017). *Lactococcus lactis*'deki doğal kompetans özelliğinin *Streptococcus thermophilus*'a benzer bir yapı gösterdiği bilinmektedir (Mulder ve ark., 2017). Bu noktada mevcut çalışmada kullanılan *BioSt-24* suşunun nükleotid dizisindeki 215. pozisyonunda bulunan Adenin nükleotidinin Timin ile yer değiştirmesi (A→T), amino asit diziliminde 72. pozisyonunda polar bir amino asit olan asparjini (N), apolar bir amino asit olan izolösine (I) dönüştürmüş ve bu mutasyon suşun konjugasyon frekansının artmasına neden olmuştur.

Gıda endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterileri, genel itibariyle genetik özellikleri yönünden modifikasyon

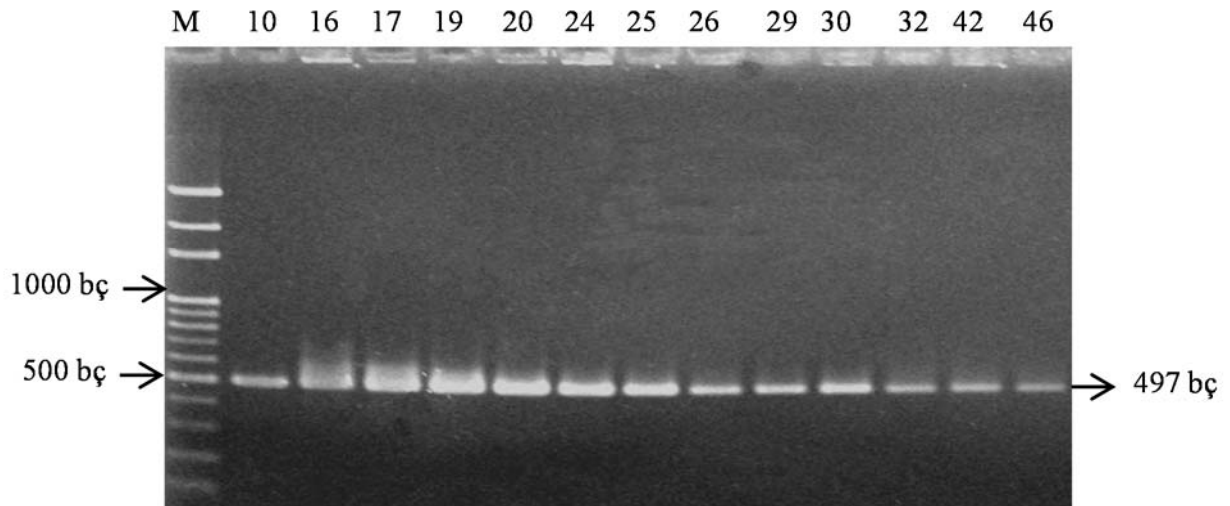
potansiyeline sahiptirler (Mayo ve ark., 2008; Mulder ve ark., 2017). Bu açıdan süt endüstrisinde son derece önemli olan *S. thermophilus*'a metabolik özellikler kazandırılması amacıyla tek nükleotid farklılık (SNP) ve çerçeve kayması mutasyonları kullanılarak gen ürünlerinin aktivasyonu veya geliştirilmiş özelliklere sahip starter suşların oluşturulmasının günümüz biyoteknolojik yöntemleriyle mümkündür. Fakat bu bakterilerin genetik mühendislik yöntemleri ile dışarıdan müdahale ile yeni özelliklerin kazandırılması yerine doğal suşlardaki konjugasyon özelliklerinden yararlanılarak yeni suşları geliştirilmesi endüstri için daha ucuz, insan tüketimi için daha güvenli

olabilecektir (David ve ark., 2017). Bu çalışmaların etkili olabilmesi içinde konjugasyon özelliğine sahip genlerin moleküler özelliklerinin ve fonksiyonlarının tam olarak bilinmesi son derece önemlidir. Bu açıdan mevcut çalışmada sunulan sonuçlar doğal izolat olan *S. thermophilus*'ların sahip olduğu *comX* geninin suşlara göre farklılık içerebileceğini ve konjugasyon özelliğini değiştirebileceğini göstermiştir. Bu nedenlerle *comX* geni ve doğal DNA transformasyonu ile ilişkili diğer gen bölgelerinin fonksiyonlarının açığa çıkarılması yönündeki çalışmalar yeni laktik asit bakterisi kültürlerin elde edilmesine öncülük edecektir.



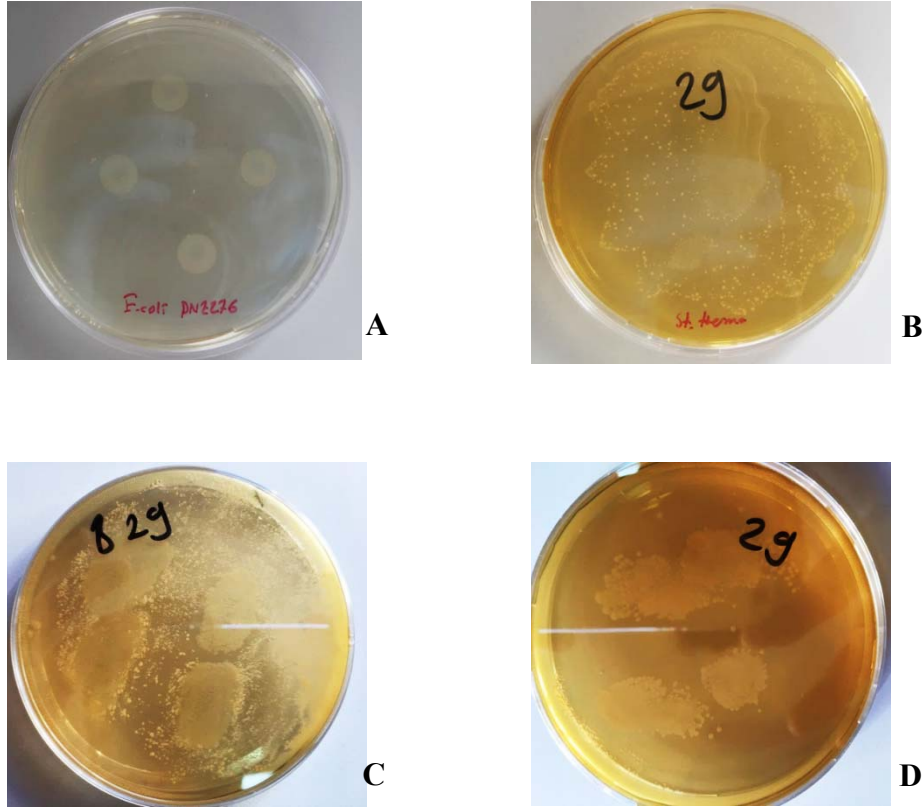
Şekil 1. Transkonjugasyon işleminin şematik gösterimi. Alıcı hücre *S. thermophilus* (eritromisine dirençsiz), donör hücre *E. coli* (eritromisine dirençli ve pNZ276 içeren EC1000 suşu) ve steril disk (121 °C’de steril edilmiş, petri büyüklüğünde kadife parçası).

*Schematic representation of transconjugation process. The recipient cell is *S. thermophilus* (without erythromycin resistance), donor cell *E. coli* (EC1000 strain with erythromycin resistance and pNZ276) and sterile disk (velvety in petri dish size sterilized at 121 °C).*



Şekil 2. *Streptococcus thermophilus* izolatlarında *comX* gen bölgesinin amplifikasyonu. (M) 100 bç DNA standartı, (10-46) bakteri numarası.

comX gene amplification in *Streptococcus thermophilus* isolates. (M) 100 bp DNA standard, (10-46) bacterial number



Şekil 3. Konjugasyon işleminde kullanılan petri görüntüleri, A: *E. coli* (pNZ276), B: *BioSt-29*, C: Antibiyotiksiz besiyerinde gelişen *S. thermophilus* ve *E. coli*, D: Antibiyotikli besiyerinde gelişen *S. thermophilus* ve *E. coli*.

Petri dishes used in the conjugation process, A: E.coli (pNZ276), B: BioSt-29, C: S. thermophilus and E. coli developed in antibiotic-free media, D: S. thermophilus and E. coli developed in antibiotic media.

		10	20	30	40	50	60	70	80	
Ref.S.thermophilus-strain-ND07	1	MEQEVFVKAY	EKVRPIVLKA	FRQYFIQLWD	QADMEQEAMM	TLYQLLKKFP	DLEKDDDKLR	RYFKTKFRNR	LNDEVRRQES	80
BioSt-16	1	-----	-?*G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69
BioSt-19	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69
BioSt-23	1	-----	--?G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	68
BioSt-24	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.I	63
BioSt-25	1	-----	---	?	-----	-----	-----	-----	-----	66
BioSt-29	1	-----	-----	---	?	-----	-----	-----	-----	62
BioSt-42	1	-----	--?G?	-----	-----	-----	-----	-----	-----	68
BioSt-46	1	-----	--?	-----	-----	-----	-----	-----	-----	68

Şekil 4. Çalışmada kullanılan BioSt izolatları ve *S. thermophilus* bakterisindeki *comX* geninin amino asit dizilerinin homolojisi (ClustalW sonucu, ↓; amino asit farklılığı).

Homology of the amino acid sequences of the comX gene in S. thermophilus and BioSt isolates used in current study (ClustalW result, ↓; amino acid difference).

Çizelge 1. Doğal izolatların konjugasyon potansiyeli (*; koloni sayısı±standart hata).*Conjugation potential of natural isolates (*; number of colonies ± standard error).*

İzolat No	Katalaz	<i>comX</i> amplifikasyon	Koloni sayısı	Transformasyon Frekansı %
<i>BioSt-7</i>	-	-	32.33±7.5*	9.58
<i>BioSt-16</i>	-	+	74.33±21.5	22.01
<i>BioSt-19</i>	-	+	143.00±32.1	42.35
<i>BioSt-23</i>	-	+	123.33±26.1	36.53
<i>BioSt-24</i>	-	+	337.67±9.5	100.00
<i>BioSt-25</i>	-	+	143.67±28.0	42.55
<i>BioSt-29</i>	-	+	169.67±21.5	50.25
<i>BioSt-30</i>	-	+	64.00±6.6	18.95
<i>BioSt-36</i>	-	-	28.33±1.5	8.39
<i>BioSt-37</i>	-	-	10.00±4.0	2.96
<i>BioSt-42</i>	-	+	196.33±9.1	58.14
<i>BioSt-46</i>	-	+	105.00±3.0	31.10

Kaynaklar

- Akyol I, Ozcelik FG, Karakas-Sen A, Ozkose E, Gezginc Y, Ekinci MS (2015). Cloning and overexpression of the *als*, *pflA*, and *adhB* genes in *Streptococcus thermophilus* and their effects on metabolite formation. *Molecular Biotechnology* 57(10): 923–930.
- Bergé M, Mortier-Barrière I, Martin B, Claverys JP (2003). Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA-and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Molecular Microbiology* 50(2): 527–536.
- Blomqvist T, Steinmoen H, Håvarstein LS (2006). Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10): 6751–6756.
- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22: 1554–1558.
- Boutry C, Wahl A, Delplace B, Clippe A, Fontaine L, Hols P (2012). Adaptor protein MecA is a negative regulator of the expression of late competence genes in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 194: 1777–1788.

- Boutry C, Delplace B, Clippe A, Fontaine L, Hols P (2013). SOS response activation and competence development are antagonistic mechanisms in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 195(4): 696–707.
- Claverys JP, Havarstein LS (2002). Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience* 7: 1798–1814.
- Claverys JP, Martin B (2003). Bacterial competence genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiology* 11: 161–165.
- Cvitkovitch DG (2001). Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 12: 217–243.
- Dagan T (2011). Phylogenomic networks. *Trends Microbiology* 19: 483–491.
- David B, Radziejwoski A, Toussaint F, Fontaine L, de Frahan MH, Patout C, Hols P (2017). Natural DNA transformation is functional in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KW2. *Applied and Environmental Microbiology* AEM-01074.
- El Kafsi H, Binesse J, Loux V, Buratti J, Boudebouze S, Dervyn R, Moumen B (2014). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BioMed Central Genomics* 15(1): 407.
- Evans. BA, Rozen DE (2013). Significant variation in transformation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *The ISME Journal* 7(4): 791.
- Fontaine L, Boutry C, de Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of Bacteriology* 192: 1444–1454.
- Fontaine L, Wahl A, Flécharde M, Mignolet J, Hols P (2015). Regulation of competence for natural transformation in Streptococci. *Infection, Genetics and Evolution* 33: 343–360.
- Fox PF (1993). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Chapman and Hall, London, UK.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V (2009). The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *Journal of Bacteriology* 191: 4647–4655.
- Ho TD, Ellermeier CD (2012). Extra cytoplasmic function σ factor activation. *Current Opinion in Microbiology* 15(2): 182–188.
- Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Dusko Erlich S, Guedon E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus*

- thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 435–463.
- Hsu HH, Chung KM, Chen TC, Chang BY (2006). Role of the sigma factor in transcription initiation in the absence of core RNA polymerase. *Cell* 127(2): 317–327.
- Hülter N, Sørum V, Borch-Pedersen K, Liljegren MM, Utne AL, Primicerio R, Johnsen PJ (2017). Costs and benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *BMC Microbiology* 17(1): 34.
- Kaspar J, Ahn SJ, Palmer SR, Choi SC, Stanhope MJ, Burne RA (2015). A unique open reading frame within the *comX* gene of *Streptococcus mutans* regulates genetic competence and oxidative stress tolerance. *Molecular Microbiology* 96(3): 463–482.
- Lorenz MG, Wackernagel W (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58(3): 563–602.
- Luo P, Li HY, Morrison DA (2003). ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 50: 623–633.
- Luo P, Morrison DA (2003). Transient association of an alternative sigma factor, *comX*, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 185(1): 349–358.
- Madigan M, Martinko J (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th edn. 149–152.
- Mao J, Lu T (2016). Population-dynamic modeling of bacterial horizontal gene transfer by natural transformation. *Biophysical Journal* 110(1): 258–268.
- Mayo B, Sinderen DV, Ventura M (2008). Genome analysis of food grade lactic acid producing bacteria: from basics to applications. *Current Genomics* 9(3): 169–183.
- Mitchell TJ (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology* 1: 219–230.
- Mulder J, Wels M, Kuipers OP, Kleerebezem M, Bron PA (2017). Unleashing natural competence in *Lactococcus lactis* by induction of the competence regulator ComX. *BioRxiv* 147132.
- Nei M, Kumar S (2000). Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford University Press*, Oxford.
- Paget MS (2015). Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules* 5(3): 1245–1265.

- Perry JA, Jones MB, Peterson SN, Cvitkovitch DG, Lévesque CM (2009). Peptide alarmone signalling triggers an auto-active bacteriocin necessary for genetic competence. *Molecular Microbiology* 72: 905–917.
- Peterson SN, Sung CK, Cline R, Desai BV, Snesrud EC, Luo P, Walling J, Li H, Mintz M, Tsegaye G, Burr PC, Do Y, Ahn S, Gilbert J, Fleischmann RD, Morrison DA (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular Microbiology* 51: 1051–1070.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313: 89–92.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK.
- Schneider KB, Palmer TM, Grossman AD (2002). Characterization of comQ and comX, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184(2): 410-419.
- Shanker E, Federle MJ (2017). Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. *Genes* 8(1): 15.
- Shin JE, Lin C, Lim HN (2016). Horizontal transfer of DNA methylation patterns into bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research* 44(9): 4460–4471.
- Tamime AY, Deeth HC (1980). Yogurth: Technology and biochemistry. *Journal of Food Protection* 43: 939–977.
- Tettelin H (2004). Streptococcal genomes provide food for thought. *Nature Biotechnology* 22: 1523–1524.
- Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293: 498–506.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.

- Tovpeko Y, Bai J, Morrison DA (2016). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mutations in σ_a bypass the *comW* requirement for late gene expression. *Journal of Bacteriology* 198(17): 2370–2378.
- Zaccaria E, Van Baarlen P, De Greeff A, Morrison DA, Smith H, Wells JM (2014). Control of competence for DNA transformation in *Streptococcus suis* by genetically transferable phenotypes. *PloS one* 9(6): e99394.