

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rhodobacter capsulatus* BAKTERİSİNDE SİTOKROM C OKSİDAZ  
BİYOGENESİZ 'İNDE ROL ALAN GENLERİN BELİRLENMESİ  
VE FONKSİYONLARININ TANIMLANMASI**

Semra AYGÜN-SUNAR

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA 2006

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rhodobacter capsulatus* SİTOKROM C OKSİDAZ  
BİYOGENESİZ 'İNDE ROL ALAN GENLERİN BELİRLENMESİ  
VE FONKSİYONLARININ TANIMLANMASI**

Semra AYGÜN-SUNAR

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU  
1. Danışman

Doç. Dr. Sevnur MANDACI  
2. Danışman

Bu tez 01/12//2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

Prof. Dr. Ünal EGELİ

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Yard. Doç. Dr. Nilüfer AYDEMİR

## ÖZET

### ***Rhodobacter capsulatus* Bakterisinde Sitokrom *c* Oksidaz Biyogenesiz 'inde Rol Alan Genlerin Belirlenmesi ve Fonksiyonlarının Tanımlanması**

*C*-tipi sitokromlar, sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksi veya *cbb*<sub>3</sub>-tip sitokrom *c* oksidaz gibi elektron transfer zincir bileşenlerinin alt birimleri ya da fizyolojik ortağı olan ve hem kofaktörü içeren proteinlerdir. Sitokrom *c* proteinlerindeki hem molekülü kompleks posttranslasyonel olgunlaşma süreçleri aracılığıyla apositokromlara kovalent olarak bağlanır. Bu çalışmada, besi yerine bağlı fotosentetik üreme özelliği gösteren ve farklı *c*-tipi sitokrom proteinlerinden yoksun *Rhodobacter capsulatus* mutantlarından yararlanılarak sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz ve *c*-tipi sitokromların biyogenesizinden sorumlu yeni genler araştırıldı. *R. capsulatus* kromozomal kütüphaneleri kullanılarak yapılan genetik tamamlama testleri sonunda mutant fenotipinden sorumlu ve genomda bitişik yer alan iki gen (*RRC00138* ve *RRC00139*) tanımlandı. *R. capsulatus* genom analizlerinde *RRC00138* gen ürünü başlangıçta 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferaz enzimi (AGPAT) olarak ve *RRC00139* gen ürünü ise hipotetik sitozolik protein olarak tanımlandı. Ancak yeni yapılan biyoinformatik analizler sonunda, bu iki gen ürünün amino asit dizisinin *Sinorhizobium meliloti* 'de ornitin lipid (OL) biyosentezinden sorumlu OlsA ve OlsB enzim dizileri ile benzerlik gösterdikleri görüldü. *RRC00138* ve *RRC00139* mutantlarının membranları tüm gliserofosfolipidleri yaban soy oranında içermesine rağmen, OL 'i içermemeleri, bu iki genin *R. capsulatus* 'da OL biyosentezi için gerekli olduğunu gösterdi.

OL 'lerin bakteriyel membranların bir bileşeni oldukları çok uzun zamandır bilinmektedir. Bakterilere özgü bu amino-lipidler, B-lenfositlerin çoğalımı, adjuvantitesi ve makrofajların aktivasyonunu kapsayan konakçı bağışıklık sistemini uyarırlar. OL 'ler bakterilerde oldukça geniş yayılım göstermelerine ve farklı biyolojik etkilere sahip olmalarına rağmen, bu lipidlerin bakterilerdeki rolü bugüne kadar tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışma ile OL 'lerin farklı bakteriyel üreme koşulları altında, *c*-tipi sitokromlarını da kapsayan bazı sitoplazmik membran proteinlerin optimal sabit miktarları için önemli oldukları görülmüştür ve OL 'lerin bakterilerdeki yeni ve önemli başka bir biyolojik rolü literatüre kazandırılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Rhodobacter capsulatus*, *c*-tipi sitokromlar, sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz, 1-açıl-*sn*-gliseroltrifosfat açıltransferaz, ornitin lipid, sitoplazmik membran proteinleri.

**ABSTRACT****Identification of Genes Involved in Biogenesis of Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter capsulatus* and Determination of Their Functions**

The *c*-type cytochromes are haemoproteins that are subunits or physiological partners of electron transport chain components, like the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex or the *cbb*<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase. Their haem moieties are covalently attached to the corresponding apocytochromes via a complex posttranslational maturation process. In this work, using the *Rhodobacter capsulatus* mutants that exhibited medium-dependent photosynthetic growth and lacked various *c*-type cytochromes, additional genes involved in this process were sought. Genetic complementation of these cytochrome *cbb*<sub>3</sub> oxidase-minus mutants using *R. capsulatus* chromosomal libraries uncovered two novel genes, *RRC00138* and *RRC00139*, which are adjacent to each other. Although on *R. capsulatus* genome *RRC00138* and *RRC00139* were annotated as corresponding to the 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase and a hypothetical cytosolic protein, respectively, more recent searches revealed that they are highly homologous to the ornithine lipid (OL) biosynthesis genes, *olsA* and *olsB*, in *Sinorhizobium meliloti*, respectively. Membranes of the *RRC00138* and *RRC00139* knock out mutants contained all major phospholipids at wild-type levels but lacked the non phosphorous OL, demonstrating these genes are required for OL biosynthesis in *R. capsulatus*.

The non-phosphorus OLs have long been known as constituents of bacterial membranes. These eubacteria-specific amino-lipids induce potent host immune responses, including B-lymphocyte mitogenicity, adjuvanticity and macrophage activation. Despite the widespread occurrence of OL, and diverse biological effects they elicit, up until now their role in bacteria producing them remained completely unknown. Our findings now indicate that under certain bacterial growth conditions OL are crucial for optimal steady-state amounts of some extracytoplasmic proteins, including several *c*-type cytochromes, and attribute them a novel and important biological function.

**KEYWORDS:** *Rhodobacter capsulatus*, cytochrome *cbb*<sub>3</sub> oxidase, *c*-type cytochromes, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase, ornithine lipid, extracytoplasmic membrane proteins.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>6</b>
2.1. Sitokromlar.....	6
2.1.1. C-Tipi Sitokromlar.....	6
2.1.1.1. C-tipi Sitokromların Biyogenesizi.....	8
2.2. Solunum Oksidazları.....	9
2.2.1. Sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> Oksidaz Enzimi.....	11
2.3. Membran Lipidleri.....	11
2.3.1. Gliserofosfolipidler.....	12
2.3.1.1. Gliserofosfolipidlerin Biyosentezi.....	13
2.3.1.2. Gliserofosfolipidlerin Hücre Fonksiyonundaki Rollerini.....	15
2.3.1.3. 1-açıl- <i>sn</i> -gliserol-3-fosfat açıltransferazlar (AGPAT).....	16
2.3.2. Fosfat Grubu İçermeyen Lipidler.....	18
2.3.2.1. Ornitin Lipidler.....	19
2.3.2.1.1 Ornitin Lipidlerin Kimyasal Yapısı.....	20
2.3.2.1.2 Ornitin Lipidlerin Biyosentezi.....	21
2.3.2.1.3. Ornitin Lipidlerin Üretimi.....	23
2.3.2.1.4. Ornitin Lipidlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	24
2.4. Model Organizma <i>Rhodobacter capsulatus</i> .....	25
2.4.1. <i>R. capsulatus</i> 'da C-tipi Sitokromların Biyogenesizi.....	28
2.4.2. <i>R. capsulatus</i> Sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> Oksidaz ve Enzimin Biyogenesizi.....	31
2.4.3. <i>R. capsulatus</i> 'da Membran Polar Lipidleri.....	34
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Bakteri Soyları ve Plazmitler.....	37
3.1.2. Kimyasallar ve Enzimler.....	37
3.2. Yöntem.....	46
3.2.1. Bakteri Soylarının Üreme Koşulları.....	46
3.2.2. Standart DNA Manipulasyonları.....	46
3.2.3. DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Analizler.....	47
3.2.4. Gen İnaktivasyonu (İnterpozon Mutagenesi).....	47
3.2.5. Konjugasyon (Üçlü Eşleşme).....	55
3.2.6. Null ('Knock-out') Mutantların Eldesi.....	55
3.2.7. Sitokrom <i>c</i> Oksidaz Aktivite Testi (Nadi Reaksiyonu).....	57
3.2.8. İntrasitoplazmik Membran Vesiküllerinin (Kromotofor Membran) Eldesi.....	57
3.2.9. Hem Boyama ile C-Tipi Sitokromların Analizi.....	58
3.2.10. <i>RRC00138</i> Gen Ürününün Kontrollü İşleyişi.....	59

3.2.10.1. <i>RRC00138</i> Geninin Klonlanması.....	59
3.2.10.2. <i>RRC00138</i> Gen Ürününün <i>E. coli</i> 'deki İşleyişi.....	62
3.2.10.3. <i>RRC00138</i> Gen Ürününün <i>R. capsulatus</i> 'daki İşleyişi...	62
3.2.10.4. <i>RRC00138</i> Protein İşlevselliğinin İmmunoblot (Western blot) Analizi ile Gözlenmesi.....	63
3.2.11. Fenotip Tamamlama Testleri.....	65
3.2.12. <i>In vitro</i> GPAT+AGPAT Aktivite Testi.....	65
3.2.13. [ <sup>14</sup> C]-G3P ile <i>In vitro</i> Koşullarda İşaretlenmiş Kromotofor Membranından Lipid İzolasyonu ve Ayrışımı.....	66
3.2.14. Total Hücre Membran Lipidlerin İzolasyonu.....	66
3.2.14.1. <i>In vivo</i> Koşullarda [1- <sup>14</sup> C]asetat ile İşaretlenmiş Hücrelerden Lipid İzolasyonu.....	66
3.2.14.2. Radyoaktif ile İşaretlenmemiş Hücrelerden Lipid İzolasyonu.....	67
3.2.14.3. Lipid Ekstrakların İki Boyutlu İnce Tabaka Kromatografisinde Ayrışımı ve Lipidlerin Gözlenmesi	67
3.2.15. Kütle Spektrometri Analizi ile OL 'in Tanımlanması.....	68
3.2.16. "Pulse-chase" İşaretleme ve İmmunopresipitasyon.....	69
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....</b>	<b>71</b>
4.1. MR2, IJ1 ve AYG4 Mutantlarındaki Mutasyon Taşıyan Gen(ler)in Belirlenmesi.....	71
4.2. Null (Knock-out) Mutant Eldesi ve Mutantların Fenotipik Karakterizasyonu.....	72
4.3. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Genlerinin Dizi Analizi.....	76
4.4. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Null Mutantlarının C-tipi Sitokrom Protein Profili.....	78
4.5. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Null Mutantlarının Zengin Besi Ortamındaki (MPYE) Sıcaklığa Bağlı Fenotipi.....	80
4.6. <i>RRC00139</i> , <i>RRC00138</i> Geninin İşleyişinde Polar Etki Göstermez.....	82
4.7. <i>RRC00138</i> Geninin <i>E. coli plsC(Ts)</i> Mutant Fenotipini Tamamlama Yeteneği.....	83
4.8. <i>RRC00138</i> Gen Ürününün <i>R. capsulatus</i> 'daki İşlevselliği.....	86
4.9. <i>RRC00138</i> Null Mutantında <i>In vitro</i> GPAT+AGPAT Aktivite Testi.....	87
4.10. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Aminoasit Dizilerinin Ornitin Lipid Biyosentezini Katalizleyen Gen Ürünlerin Dizileri ile Homolojisi.....	88
4.11. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Null Mutantlarının Membran Polar Lipid Profili.....	91
4.12. <i>R. capsulatus</i> da OL Biyosentezi Fosfat Miktarıyla İlgili Değildir.....	97
4.13. <i>R. capsulatus</i> ve <i>S. meliloti</i> Türleri Arasında Heterolog Tamamlama Testi.....	100
4.14. <i>R. capsulatus</i> OL 'in Kimyasal Yapısı.....	102
4.15. OL 'in Yokluğunda Minimal Besi Ortamında (MedA) 35°C Sıcaklıkta Sitokrom <i>c<sub>y</sub></i> 'in Üretimi ve Yıkımı.....	106
4.16. <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> Mutantlarında Membran Protein Profili.....	108
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>109</b>

<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>116</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>133</b>
<b>8. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>139</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>141</b>

## SİMGELER DİZİNİ

μ	: mikro
Δ	: delta
aa	: amino asit
ACP	: açil taşıyıcı protein
AGPAT	: 1-açil- <i>sn</i> -gliserol-3-fosfat açiltransferaz
APS	: amonyum per sülfat
ATP	: adenzin trifosfat
bç	: baz çifti
CDP	: sitidin difosfat
CL	: kardiyolipin
CMP	: sitidin monofosfat
COG	: ortolog gen sınıfı
CPA	: siklopropanoik asit
Cpm	: sayım/dakika
CoA	: koenzim A
CTP	: sitidin trifosfat (fosfatidat sitidiltransferaz)
Da	: dalton
DAB	: diaminobenzidin
DAG	: diaçilgliserol
DMPD	: <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilen diamin
DMPE	: dimetilfosfatidilethanolamin
dNTP	: deoksinükleozit trifosfat
ETZ	: enerji transfer zinciri
g	: relatif santrifüj kuvveti (RCF)
G3P	: gliserol-3-fosfat
GPAT	: gliserol-3-fosfat açiltransferaz
GTA	: gen transfer ajanı
Kbç	: kilo baz çifti
Kda	: kilo dalton
LPA	: lisofosfatidik asit



LPE	: lisofosfatidiletanolamin
LOL	: liso ornitin lipid
LPS	: lipopolisakkarit
MedA	: minimal besi ortamı
MPYE	: zenginleştirilmiş besi ortamı
MS	: kütle spektrometri
<i>m/z</i>	: iyon ağırlığının birleşmiş atomik ağırlık ünitesine oranı
Nadi	: sitokrom <i>c</i> oksidaz aktivitesini gösteren bir boyama reaksiyonu ( $\alpha$ -naftol+dimetilfenil diamin+O <sub>2</sub> →indofenol mavisi+ H <sub>2</sub> O)
OL	: ornitin lipid
ORF	: açık okuma bölgesi
PA	: fosfatidik asit
PAGE	: poliakrilamid jel elektroforezi
PC	: fosfatidilkolin
PE	: fosfatidiletanolamin
Pfam	: çok sayıda protein familyasını içeren data bankası
PG	: fosfatidilgliserol
PGP	: fosfatidilgliserol fosfat
PlsC	: 1-açıl- <i>sn</i> -gliserol-3-fosfat açıltransferaz
PP <sub>i</sub>	: pirofosfat iyon
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamin
TLC	: ince tabaka kromatografisi
TMBZ	: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
Ts	: sıcaklığa duyarlı
v	: hacim
2D	: iki boyutlu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>R. capsulatus</i> sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> oksidaz mutantlarında <i>c</i> -tipi sitokrom protein profili.....	3
Şekil 1.2.	Kromozomal DNA parçalarını taşıyan plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.....	5
Şekil 2.1.	Hem kofaktörünün (demir protoporfirin IX) apositokromdaki korunmuş hem bağlanma motifine (-Cys-Xaa-Yaa-Cys-His-) kovalent olarak bağlanması.....	7
Şekil 2.2.	Gliserofosfolipidlerin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.3.	Ornitin lipidlerin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.4.	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 'de ornitin lipid biyosentez yolu.....	22
Şekil 2.5.	<i>Rhodobacter capsulatus</i> 'un elektron mikroskopik görüntüsü.....	26
Şekil 2.6.	<i>R. capsulatus</i> 'da aerobik ve fotosentetik elektron transfer (ET) yolları.....	27
Şekil 2.7.	<i>R. capsulatus</i> 'da <i>c</i> -tipi sitokrom proteinlerinin biyogenesiz yolu..	30
Şekil 2.8.	<i>R. capsulatus</i> sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> oksidaz enziminin biyogenesizinde <i>ccoGHIS</i> gen ürünlerinin rollerini özetleyen model.....	33
Şekil 2.9.	<i>R. capsulatus</i> 'da öngörülen gliserofosfolipid biyosentez yolu.....	36
Şekil 3.1.	pHP45 omega plazmit haritası.....	49
Şekil 3.2.	pMRC2 türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.....	50
Şekil 3.3.	pMRC türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.....	53
Şekil 3.4.	pSEM5 türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.....	54
Şekil 3.5.	pBAD/ <i>Myc</i> -HisA vektörü ve türevinin fiziksel ve genetik haritası.	61
Şekil 3.6.	pSEM18 plazmitinin fiziksel ve genetik haritası.....	63
Şekil 4.1.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının sıcaklık ve besi yerine bağlı üreme fenotipleri.....	75
Şekil 4.2.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> amino asit dizisinin diğer organizmalardaki homologları ile karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.3.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının <i>c</i> -tip sitokrom protein profili.....	79
Şekil 4.4.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> null mutantının (SA4) 25 °C sıcaklıkta MPYE veya MedA besiyerlerinde aerobik koşullarda üreyen hücrelerinden izole edilen intrasitoplazmik membran vesiküllerindeki <i>c</i> -tip sitokrom profili.....	82
Şekil 4.5.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> gen ürününün <i>E. coli</i> 'deki işleyişi ve <i>E. coli</i> <i>plsC</i> ve <i>plsB-plsX</i> mutantlarının üreme fenotipini tamamlama yeteneği.....	85
Şekil 4.6.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> gen ürününün <i>R. capsulatus</i> 'daki işleyişinin immunoblot tekniği ile analizi.....	86
Şekil 4.7.	<i>R. capsulatus</i> yaban soy ve <i>RRC00138</i> null mutantının <i>in vitro</i> koşullardaki GPAT+AGPAT aktivite testi.....	87
Şekil 4.8.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00138</i> 'in amino asit dizisi ile <i>S. meliloti</i> <i>OlsA</i> 'in amino asit dizisinin karşılaştırılması.....	89
Şekil 4.9.	<i>R. capsulatus</i> <i>RRC00139</i> 'in amino asit dizisi ile <i>S. meliloti</i> <i>OlsB</i> 'in amino asit dizisinin karşılaştırılması.....	90
Şekil 4.10.	<i>S. meliloti</i> yaban soy ve <i>OlsB</i> mutantının membran lipid profili.....	91

<b>Şekil 4.11.</b>	<i>R. capsulatus</i> yaban soy, <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarında serbest amino grubuna sahip lipidlerin ninhidrin boyama ile tanımlanması.....	93
<b>Şekil 4.12.</b>	Minimal MedA besi yerinde [ <sup>14</sup> C]-asetat varlığında üreyen <i>R. capsulatus</i> yaban soy, <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının membran polar lipid profili.....	94
<b>Şekil 4.13.</b>	Zenginleştirilmiş MPYE besi yerinde [ <sup>14</sup> C]-asetat varlığında üreyen <i>R. capsulatus</i> yaban soy, <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının membran lipid profili.....	95
<b>Şekil 4.14.</b>	25°C sıcaklıkta MPYE besi yerinde üreyen <i>RRC00138</i> null mutantının membran polar lipid profili.....	97
<b>Şekil 4.15.</b>	Farklı fosfat konsantrasyonları içeren besi ortamlarında üreyen <i>R. capsulatus</i> yaban soyunun hücrel lipid profili.....	99
<b>Şekil 4.16.</b>	<i>R. capsulatus</i> ve <i>S. meliloti</i> türleri arasında heterolog tamamlama testleri ve transkonjugantların polar lipid profili.....	101
<b>Şekil 4.17.</b>	<i>R. capsulatus</i> ve <i>S. meliloti</i> bakterilerindeki OL 'in kütle spektrometre tekniği ile analizi.....	103
<b>Şekil 4.18.</b>	<i>S. meliloti</i> ve <i>R. capsulatus</i> türlerinde bulunan OL 'in kimyasal yapısı.....	105
<b>Şekil 4.19.</b>	35°C sıcaklıkta minimal MedA besi yerinde üreyen OL 'den yoksun mutantta gözlenen sitokrom <i>c<sub>y</sub></i> proteinin üretimi ve yıkımı.....	107
<b>Şekil 4.20.</b>	Yaban soy ve OL 'den yoksun mutantın membran protein profilinin SDS-PAGE ile karşılaştırılması.....	108

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b>Çizelge 3.1.</b>	Çalışmada kullanılan bakteri soyları, plazmitler ve elde edilen rekombinant plazmit ve null mutantları.....	38
<b>Çizelge 4.1.</b>	Delesyon-insersiyon alleli taşıyan rekombinant plazmitlerin MR2, IJ1 ve AYG4-25 mutantların Nadi fenotiplerini tamamlama yetenekleri.....	73
<b>Çizelge 4.2.</b>	<i>R. capsulatus</i> null mutantlarının farklı besi ortamlarında mikroaerofilik ve anaerobik fotosentetik koşullar altında üreme özellikleri ve Nadi reaksiyonunu katalizleme yetenekleri.....	74
<b>Çizelge 4.3.</b>	<i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının farklı sıcaklık ve besi ortamlarında fotosentetik üreme özellikleri ve Nadi fenotipleri.....	81
<b>Çizelge 4.4.</b>	MedA besi yerinde üretilmiş <i>R. capsulatus</i> yaban soy, <i>RRC00138</i> ve <i>RRC00139</i> null mutantlarının ve transkonjugantların membran polar lipid kompozisyonu.....	96

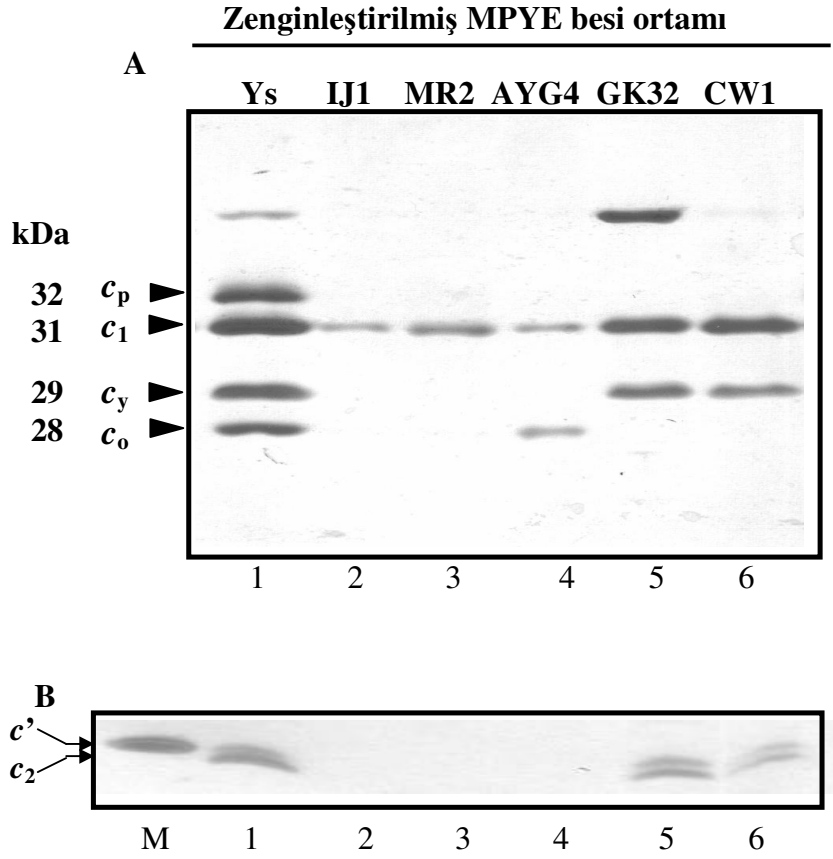
## 1. GİRİŞ

Biyolojik membranlar, kovalent olmayan etkileşimler ile birarada tutunan yüzlerce farklı protein moleküllerinden ve ince lipid tabakasından oluşur. Sitokromlar; fotosentez, aerobik ve anaerobik solunum yollarında önemli işlevleri olan proteinlerdir. Bu proteinlerden *c*-tipi sitokromlar, hem prostetik grubunun bu proteinlere kovalent olarak bağlı olmasıyla diğer sitokromlardan ayrılırlar (Pettigrew ve Moore, 1987). *C*-tipi sitokromlar küçük, periplazmik veya membrana bağlı proteinlerdir. Bu proteinler ayrıca elektron transfer zincirinde yer alan sitokrom *bc<sub>1</sub>* ve sitokrom *c* oksidaz gibi pek çok alt birimden oluşmuş protein komplekslerinin alt birimlerini oluştururlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sitokrom *c* proteinlerinin mitokondriden salındıklarında ökaryotlardaki programlı hücre ölümünü (apoptoz) uyardıkları da belirlenmiştir (Martinou ve ark., 2000; Jiang ve Wang, 2004). *C*-tipi sitokromlar; kofaktörün proteine yerleşimi, protein katlanması ve membrana transferi gibi çalışmalarda model olarak kullanılırlar.

Fotosentetik fakültatif fototrof *Rhodobacter capsulatus* yüksek ve düşük oksijen konsantrasyonlarında aktif hale geçebilen tek tip sitokrom *c* oksidaz (sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz) enzimi içerir. Membrana bağlı *c*-tipi sitokrom proteinlerini içeren kompleks bir yapıya sahip olan bu enzimin biyogenesizine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda (Koch ve ark., 1998; 2000) kimyasal (EMS, Etil methane sülfanat) mutagenезden sonra elde edilen mutant populasyondan sonra oksidaz aktivitesi göstermeyen (Nadi<sup>-</sup>) mutanlar izole edildi ve mutasyonların bir kısmının enzimin yapısal genlerini kodlayan *ccoNOQP* operonunda, diğer bir kısmının ise operonun hemen üst tarafında yer alan *ccoGHIS* genlerinde yer aldıkları genetik tamamlama testleri ile tespit edildi. Bu mutantlara ek olarak, *ccoNOQP* genleri bakımından haploid (MT1131) ve diploid (MT1131/pOX15) soylarından elde edilen MR2, IJ1 (Koch ve ark., 1998) ve AYG4 (Aygün, 1999) isimli Nadi<sup>-</sup> mutantlar ise *ccoNOQP* ve *ccoGHIS* genleri ile yaban soy fenotipine tamamlanmadı. Diğer yandan bu mutantlar diğer sitokrom oksidaz mutantlarından farklı olarak besi yerine bağlı farklı fotosentetik (F) üreme fenotipi gösterdi. Buna göre, mutantlar minimal (MedA) besi yerinde Nadi<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>, zenginleştirilmiş (MPYE) besiyerinde ise Nadi<sup>-</sup>/F<sup>-</sup> fenotipi

gösterir. MPYE besi yerinde aerobik koşullarda üreyen mutantların intrasitoplazmik membran vesiküllerindeki (kromotofor) membrana bağlı ve çözünür kısımda ise periplazmik *c*-tipi sitokrom proteinlerin varlığı TMBZ/SDS-PAGE tekniği ile incelendi (Koch ve ark., 1998; Aygün, 1999). Mutantların kromotofor membranları incelendiğinde her üçünün de sadece sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksinin *c*-tipi alt birimi olan sitokrom *c*<sub>1</sub> proteinini içerdikleri görüldü (Şekil 1.1A). Buna karşılık, mutantlar solunum zincirinde sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksi ile sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enzimi arasında elektron taşıyıcısı olarak görev yapan sitokrom *c*<sub>γ</sub> proteinini içermezler. Yine sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın *c*-tipi sitokrom proteinleri (sitokrom *c*<sub>p</sub> ve sitokrom *c*<sub>o</sub>) MR2 ve IJ1 mutantlarında gözlenmezken, AYG mutantı taşıdığı *ccoNOQP* genleri sayesinde yaban soya kıyasla az miktarda olmakla beraber sitokrom *c*<sub>o</sub> proteinini ürettiği gözlemlendi (Şekil 1.1, 2.-4. kuyular). Mutantların çözünür formdaki periplazmik sitokrom *c*<sub>2</sub> proteinin varlığı incelendiğinde ise her üç mutantta bu proteinin sentezlenmediği görüldü (Şekil 1.1B, 2.-4. kuyular). Diğer yandan, GK32 (Koch ve ark., 1998) ve CW1 (Koch ve ark., 2000) gibi yapısal ve biyogenesiz oksidaz mutantlarında ise, sitokrom *c*<sub>p</sub> ve sitokrom *c*<sub>o</sub> proteinleri haricinde diğer sitokrom *c* proteinlerinin yaban soy oranında üretildiği gözlemlendi (Şekil 1.1A ve 1.1B 5.-6. kuyular). Elde edilen bu bulgular, MR2, IJ1 ve AYG4 mutantlarında sadece sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz aktivitesinin etkilenmediğini, aynı zamanda *c*-tipi sitokromların biyogenesizinin de etkilendiğini gösterdi. Mutantlar bu özellikleri ile literatürde yayınlanmış oksidaz mutantlarından farklılık gösterir.

Diğer yandan MR2 ve IJ1 mutantlarındaki *c*-tipi sitokromların yokluğunun transkripsiyonel-translasyonel ya da sekresyonal bir hatadan kaynaklanıp kaynaklanmadığı da test edildi (Aygün-Sunar ve ark., 2006). Bu amaçla *ccoN::lacZ*, *cycY::lacZ* ve *cycY::phoA* füzyonlarını taşıyan plazmitler mutantlara aktarılmış ve elde edilen transkonjugantların β-galaktosidaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri incelendi. MPYE besiyerinde solunumla üretilmiş transkonjugantların β-galaktosidaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri incelendiğinde, mutantların yaban soy oranında enzim aktivitelerine sahip oldukları görüldü. Bu da, *c*-tipi sitokromların yokluğunun, transkripsiyonel, translasyonel veya sekresyonal bir hatadan kaynaklanmadığını gösterdi.



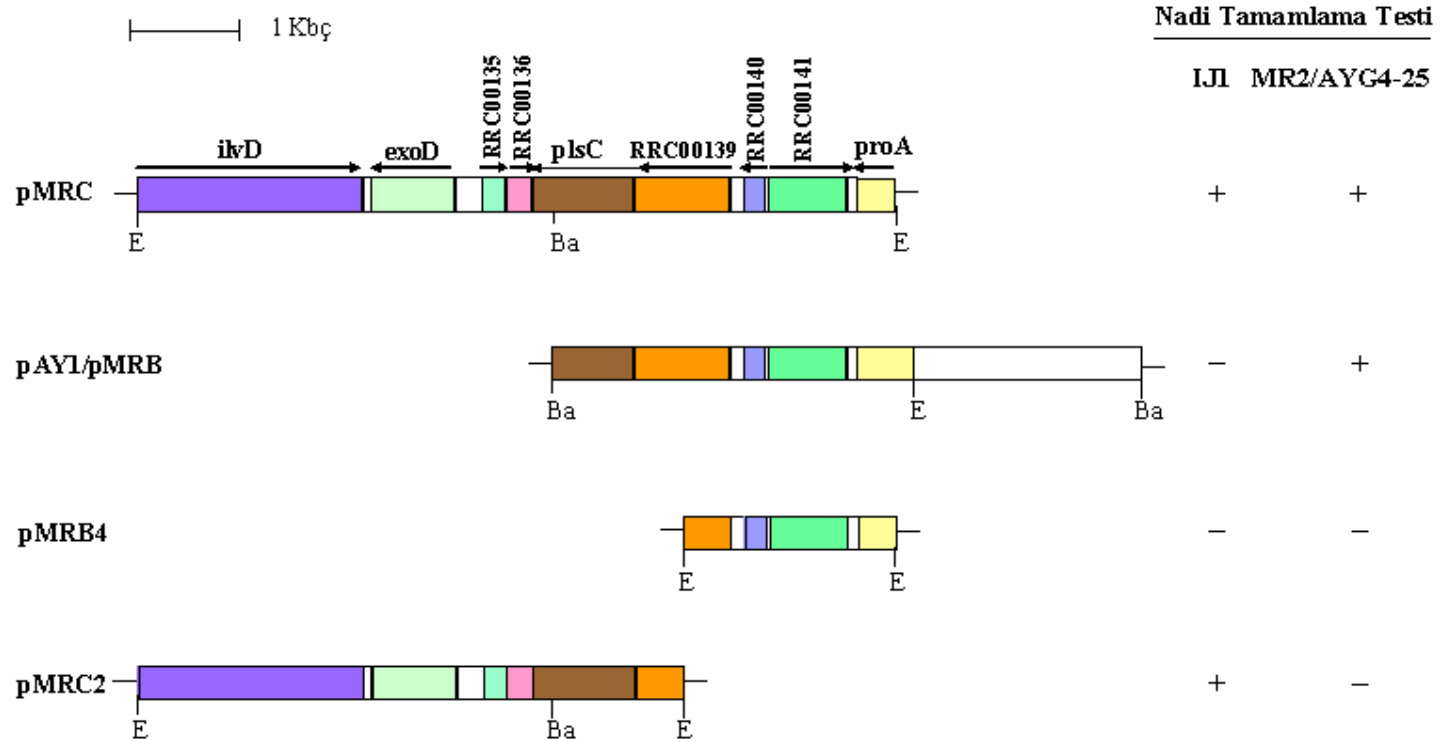
Şekil 1.1. *R. capsulatus* sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz mutantlarında *c*-tipi sitokrom protein profili.

Zenginleştirilmiş MPYE besi yerinde aerobik koşullarda üreyen oksidaz mutantlarının membrana bağlı (A) ve çözünür formdaki (B) *c*-tip sitokrom protein profilleri gösterilmiştir. İntrasitoplazmik membran vesikülleri veya çözünür kısım %16.5 'luk Trisin-SDS-PAGE 'de (Schägger ve von Jagow, 1987) ayrıştırıldı ve peroksidaz aktivitesine sahip *c*-tipi sitokrom proteinlerini gözlemek için jel, TMBZ (3'3, 5' 5-tetrametilbenzidin) ile boyandı (Thomas ve ark., 1976).  $c_p$  ve  $c_o$ , sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın alt birimleri;  $c_1$ , sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksinin alt birimi;  $c_y$ , membrana bağlı elektron taşıyıcı protein;  $c_2$ , periplazmik elektron taşıyıcı protein, Ys, *R. capsulatus* yaban soyu (MT1131), GK32 ( $\Delta ccoNO::kan$ , Koch ve ark., 1998) ve CW1 ( $\Delta ccoGHIS::spe$ , Koch ve ark., 2000) sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın yapısal ve biyogenesisiz mutantları, (B) de M isimli kuyuya sitokrom *c* markır olarak yüklenmiştir.

Üreme fenotipi, *c*-tipi sitokrom profili ve genetik tamamlanma özellikleri ile diğer oksidaz mutantlarından farklılık gösteren bu mutantların Nadi fenotipinden sorumlu gen(ler)i taşıyan DNA parçası araştırıldı. Bu amaçla, farklı *R. capsulatus* kromozomal kütüphaneleri mutant bakterilere aktarıldı ve transkonjugantlar arasından Nadi<sup>+</sup> fenotipini kazananlar seçildi. Her üç mutantın da oksidaz fenotipini yaban soy oranında tamamlayabilen pMRC plazmiti (Koch ve ark., 1998) ve sadece MR2/AYG4-25 mutantlarını tamamlayabilen pMRB (Koch ve ark., 1998) ve pAY1 (Aygün, 1999) plazmitleri izole edildi (Şekil 1.2). Restriksiyon endonükleaz ile kesimler yapıldı ve analizler pMRC plazmitinin 5.9 kbç uzunluğunda *EcoRI* kromozomal DNA parçasını; pMRB/pAY1 plazmitlerinin ise 7 kbç uzunluğunda *BamHI* kromozomal DNA parçasını taşıdıklarını gösterdi. Daha sonra izole edilen kromozomal DNA parçalarının 5' ve 3' uçlarının dizi analizi yapıldı ve bu diziler *R. capsulatus* genom dizileriyle (<http://ergo.integratedgenomics.com>) karşılaştırıldı. Buna göre pMRC plazmitinin iki adet yarı [RRC00132 (*ilvD*; dihidroksi asit dehidrataz) ve RRC00143 (*proA*, gamma glutamil fosfat redüktaz-GPR)] ve yedi adet tam protein kodlayıcı bölge (ORF) [RRC00133 (*exoD*; ekzopolisakkarit sentez proteini), RRC00135, RRC00136, RRC00138 (*plsC*; 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferaz-AGPAT), RRC00139, RRC00140 ve RRC00142] içerdiği belirlendi. Diğer yandan, pMRB/pAY1 klonlarının 5' ucunda bulunan genlerin de, pMRC plazmitindeki genlerin bir bölümü ile örtüştüğü görüldü. Yapılan genetik tamamlama testleri ve dizi analizleri sonunda, pMRB/pAY1 plazmitleri üzerinde yer alan genler tarafından Nadi fenotipi tamamlanan MR2 ve AYG4-25 mutantlarının, IJ1 mutantından farklı olabileceğini gösterdi (Aygün, 1999).

Bu tez çalışmasında, sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz aktivitesinden yoksun ve farklı *c*-tipi sitokromları üretemeyen MR2, IJ1 ve AYG4 mutantlarının detaylı genetik ve biyokimyasal analizleri yapılarak, mutantların fenotipinden sorumlu henüz tanımlanmamış gen(ler)in belirlenmesi ve fonksiyonlarının aydınlatılması amaçlandı.





Şekil 1.2. Kromozomal DNA parçalarını taşıyan plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.

Farklı büyüklükteki kromozomal DNA parçalarını taşıyan pAY1 (Aygün, 1999), pMRB, pMRC ve pMRC2 (Koch ve ark., 1998) plazmitlerinin IJ1 ve MR2/AYG4-25 mutantlarının sitokrom *c* oksidaz aktivitelerini (Nadi fenotipi) tamamlama özellikleri sağ tarafta gösterilmiştir. *Bam*HI (Ba) ve *Eco*RI (E) restriksiyon endonükleazları gösterilmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Sitokromlar

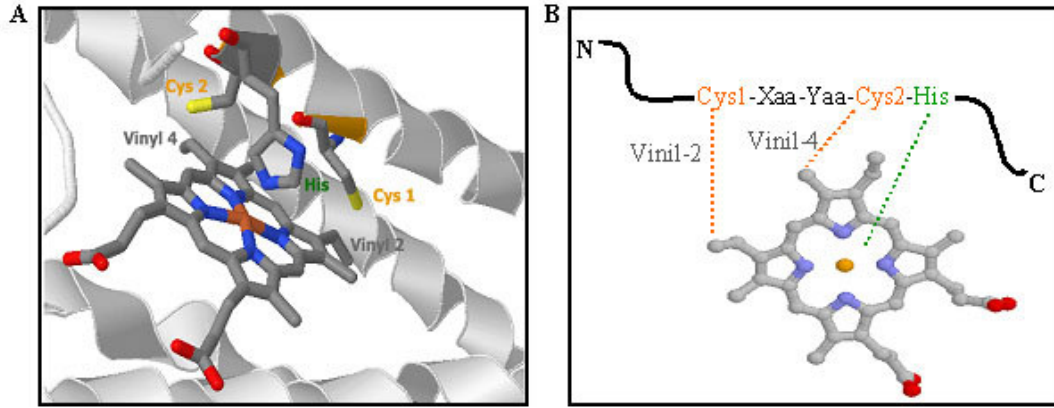
Sitokromlar, prostetik grup olarak bir veya birden fazla hem molekülü içeren elektron taşıyıcı proteinlerdir. Hem prostetik grubu, merkezde demir atomu ile çevrelenmiş protoporfirin halkasından oluşur. Demir atomu, oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerinde  $Fe^{+3}$  ve  $Fe^{+2}$  arasında değiştiğinden, hem molekülü elektron transfer sistemlerinde redoks aktif elektron vericisi ve alıcısı olarak görev yapar. Bu sistemler, elektrokimyasal proton gradientini oluşturan protonların membranın diğer tarafına geçişlerinde kullanılır. Proton gradienti daha sonra membrana bağlı  $H^+$ -ATPaz (ATP sentez) enzimi tarafından, adenzin difosfat (ADP) 'ın  $\gamma$ -fosforilasyonu ile adenzin trifosfat (ATP) 'ın sentezinde kullanılır. Birçok hücrede ATP oksidatif fosforilasyon veya fotofosforilasyon yoluyla sentezlenir. ATP, biyosentez, taşıma, signal transferi, kemotaksis ve fototaksis gibi çok sayıda enerji gerektiren hücresel süreçlerde kullanılır (Lemberg ve Barrett, 1973).

Sitokromlar, membrana bağlı veya hareketli çözünebilir elektron taşıyıcıları ya da redoks aktif enzim komplekslerinin bir parçası olarak görev yaparlar. Prokaryotlarda, sitokromlar sitoplazmik membranın dışında; ökaryotlarda ise, mitokondri ya da kloroplastlarda yer alırlar. Bu proteinler gerek prokaryotik gerekse ökaryotik organizmalarda aerobik ve anaerobik solunum ve/veya fotosentezde görev alırlar (Lemberg ve Barrett, 1973). Sitokromlar, içerdikleri prostetik grubundaki hem molekülünün tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, sitokrom *a*, sitokrom *d* ve sitokrom *o* proteinleri sırasıyla hem A, hem D ve hem O içerirken, sitokrom *b* ve sitokrom *c* proteinleri ise hem B içerir.

#### 2.1.1. C-Tipi Sitokromlar

C-tipi sitokromlar, apoprotein evrim boyunca korunmuş (-Cys-Xaa-Yaa-Cys-His-) motifinde yer alan sistein (Cys) amino asidine kovalent olarak bağlı bir veya daha fazla hem grubu (protohem IX, hem *b*) içeren elektron transfer proteinleridir (Şekil 2.1).

Hem molekülünün vinil yan zincirleri ile proteinin sistein amino asitleri arasındaki tiyoeter bağları kovalent olarak bağlıdır ve bu bağlar stereo-özgündür (Moore ve Pettigrew, 1990). Apoprotein ve hem molekülü sitoplazmada sentezlenir ve bu iki bileşen birbirinden bağımsız olarak membrandan periplazmaya geçerler. Daha sonra bu bileşenler sitokrom *c* biyogenesisiz proteinleri aracılığıyla kovalentli bağlanarak işlevsel *c*-tipi sitokromlar oluşur.



Şekil 2.1. Hem kofaktörünün (demir protoporfirin IX) apositokromdaki korunmuş hem bağlanma motifine (-Cys-Xaa-Yaa-Cys-His-) kovalent olarak bağlanması.

Hem molekülünün vinil yan zincirleri (vinil-2 ve vinil-4) ile apositokromdaki sistein (Cys) amino asitleri arasındaki tiyoeter bağları kovalent ve stereo-özgündür. Histidin (His) amino asiti, hem molekülüne beşinci aksiyal bağ (yeşil renkte kesikli çizgi) ile bağlanır (A) ve (B). Hem molekülünde demir, kavuniçi; pirol nitrojen halkası ise mavi renkte gösterilmiştir (<http://chemistry.jcu.edu/dmascotti/images/heme.gif> ve S. Turkarlan 'dan temin edilmiştir).

*C*-tipi sitokromlar genellikle membranın *p*-tarafında (pozitif yüklü) yer alırlar. Prokaryotlarda *c*-tipi sitokromlar hücresel yerleşimlerine göre ayrılırlar. Buna göre ya periplazmada çözünür formda ya da sitoplazmik membrana yerleştiklerinde periplazmaya doğru yönelmiş yani membrana bağlı olarak bulunurlar. Gram-negatif bakterilerde çözünür ya da membrana bağlı olarak periplazmada; gram-pozitif bakterilerde ise hidrofobik bağlar veya kovalent olmayan protein-protein etkileşim yoluyla sitoplazmik membranın dış tarafında yer alırlar. Çok nadir olarak, sitokrom *c* proteinleri gram-negatif bakterinin dış membranında da bulunmaktadır (Myers ve Myers, 1992). Ökaryotik organizmalarda ise mitokondri membran arası boşluğunda ve

kloroplast tilakoid membran lümeninde yer alırlar. *C*-tipi sitokromlar, ATP üretimi için gerekli fotosentetik ve solunum enerji transdüksiyon kompleksleri arasında elektron transferi gibi farklı hücresel süreçlerin elzem molekülleri olarak işlev yaptıklarından bakterilerin farklı üreme koşulları için oldukça önemlidir.

#### 2.1.1.1. *C*-tipi Sitokromların Biyogenesizi

*C*-tipi sitokromların biyogenesizi ya da *in vivo* *c*-tipi sitokrom proteinlerin olgunlaşması, posttranslasyonel yani protein sentez sonrası süreçleri kapsar. Buna göre, kovalent hem bağının oluşumu, sitokrom polipeptidin (apoprotein) membrana transferinden sonra sitokrom *c* proteinin tümünden katlanması (holositokrom *c*) gibi süreçler için biyogenesiz yani olgunlaşma terimleri kullanılmaktadır. Gram-negatif bakteriler apositokrom *c* ve hem molekülünü sitoplazmada sentezler ancak doğal holositokrom *c* 'lerin katlanması için gerekli hem ligasyon formasyonunu periplazmada oluştururlar. Böylece *c*-tipi sitokromların olgunlaşması, posttranslasyonel protein modifikasyonlarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar için iyi bir örnek teşkil eder.

Bakterilerde yapılan genetik çalışmalar sonunda *c*-tipi sitokromların olgunlaşma sürecinde birçok bileşenin yer aldığı ve bu sürecin organizmadan organizmaya farklılık gösterdiği belirlendi (Kranz ve ark., 1998). Örneğin, özgün üreme koşullarında sadece az sayıda *c*-tipi sitokrom içeren *Escherichia coli* gibi gram-negatif bakterilerde bile, posttranslasyonel süreçler çok bileşenli birden fazla yol içerir (Crooke ve Cole, 1995; Eaves ve ark., 1998). Bugüne kadar prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda holositokrom *c* formasyonunda üç farklı posttranslasyonel sürece rastlanılmış ve bu süreçler sistem-1 (Ccm), sistem-2 ve sistem-3 olarak adlandırılmıştır (Kranz ve ark., 1998; Page ve ark., 1998). Buna göre, bitki ve protozoal mitokondri, arkea, birçok gram-negatif bakteri sistem-1 olarak adlandırılan biyogenesiz sürecini kullanırlar. Sistem-2  $\delta$ -,  $\epsilon$ - ve bazı  $\beta$ -proteobakterilerde, arkealarda, birçok gram-pozitif bakteri, bitki, siyanobakteriler ve alglerde bulunur. Sistem-3 ise mantar, vertebrate ve invertebrate mitokondrilerinde bulunur (Bernard ve ark., 2003). Bu farklı biyogenesiz sistemlerinden sistem-3 membran arası boşluğunda yer alan sitokrom *c* hem liyaz (CCHL) olarak isimlendirilen en az iki enzim tarafından sitokrom *c* biyogenesizini

gerçekleştiren en küçük komplekstir (Zollner ve ark., 1992). Buna karşılık sistem-1 ve sistem-2 daha kompleks olup, hem *b* 'nin apositokroma bağlanmasını düzenleyen çok sayıda bileşene gereksinim duyar. Bazı organizmalarda birden fazla farklı biyogenesiz süreçleri de yer almaktadır. Örneğin,  $\beta$ -proteobakterilerden *Bordetella bronchispetica* ve *B. parapertussis* ve gram-pozitif bakterilerden *Desulfitobacterium hafniense* genomlarında sistem-1 ve sistem-2 'ye ait genler bulunmuştur (Stevens ve ark., 2004).

*E. coli*, *R. capsulatus* ve *Bradyrhizobium japonicum* gibi gram-negatif model bakterilerinde *c*-tipi sitokromlar, özgün olgunlaşma bileşenleri ve sitoplazma dışındaki tiyoredüksiyon ve tiyooksidasyon yollarını kapsayan posttranslasyonel süreçler (Ccm-sistem 1) aracılığıyla üretilir (Porat ve ark., 2004; Turkarslan ve ark., 2006). Ccm-sistem 1, *ccmABCDEFGHI* ve *ccdA* olarak tanımlanmış en az on genden oluşur. Bu genler, membran proteinlerini ve periplazmik çözümlü proteinleri kodlarlar. Bu proteinlerin bir kısmı, *c*-tipi apositokromların sitoplazmik membrana geçişlerinden sonra şaperon görevi yaparlar. Diğer proteinler ise, periplazmadaki hem kofaktörlerinin dağıtılmasında ve hem molekülünün kovalent ve stero-özgünlüğü ile apositokroma bağlanmasında görev alır (Kranz ve ark., 1998; Page ve ark., 1998; Thöny-Meyer, 2002; Allen ve ark., 2003).

## 2.2. Solunum Oksidazları

Solunum oksidazları, mitokondri ve aerobik bakterilerin oksijenli solunumun elektron taşıma zincirinde son elektron alıcısı olarak yer alan ve moleküler oksijenin suya dönüşüm reaksiyonunu katalizleyen çok alt birimli membran bileşenleri olup, demir-bakır oksidazlar alt grubunun bir üyesidirler. Solunum oksidazları, oksijenin suya indirgendiği hem ve bakır atomlarını içeren bimetalik aktif bölgeye sahiptir (Garcia-Horsman ve ark., 1994a; Richter ve Ludwig, 2003). Solunum oksidazların büyük bir çoğunluğunda substrat, oksijen eğilimleri, hem tipleri ve metal kompozisyonlarında farklılıklar gözlenir. Bu enzimler elektron vericisi olarak hidrokinon veya sitokrom *c* kullanmalarına bağlı olarak kinol (QH<sub>2</sub>) oksidaz ve sitokrom *c* oksidaz olarak adlandırılmış olan iki alt familyaya ayrılırlar. Bu iki oksidaz arasındaki en önemli fark, sitokrom *c* oksidazın ikinci alt biriminin hidrofilik bölgesinde binükleer bakır

merkezinin ( $Cu_A$ ) bulunması, diğer yandan  $QH_2$  oksidazda ise  $Cu_A$  'nın bulunmamasıdır. Sitokrom *c* oksidazın bir alt sınıfı olan  $aa_3$ -tip oksidaz mitokondri ve kloroplastta bulunurken (Saraste, 1990),  $cbb_3$ -tip oksidaz ise proteobakteriler ve Cytophaga, Flexibacter ve Bacteroides 'de bulunur (Pitcher ve Watmough, 2004; Cosseau ve Batut, 2004). Bazı aerobik bakteriyel türlerde değişik fizyolojik koşullarda aktif hale geçebilen birden fazla farklı oksidaz tipi bulunur. Bu özellik, bakterilerin hücre yaşam döngüsü boyunca değişen çevresel oksijen konsantrasyonlarına uyumunu sağlar. Örneğin, *E. coli* iki farklı tipte kinol oksidaz enzimi (sitokrom  $bo_3$  ve sitokrom  $bd$ ) içerirken (Anraku ve Gennis, 1987), *Paracoccus denitrificans* ise üç farklı oksidaz enzimine ( $aa_3$ - ve  $cbb_3$ -tip sitokrom *c* oksidaz ve  $bb_3$ -tip kinol oksidaz) sahiptir (de Gier ve ark., 1996). Yine, yüksek oksijen içeren ortamlarda üreyen *R. sphaeroides* hücrelerinin membranlarında  $aa_3$ -tip oksidaz enzimi sentezlenirken (Shapleigh ve ark., 1992), mikroaerobik ve anaerobik koşullarda ise  $cbb_3$ -tip oksidaz enzimi sentezlenir (Garcia-Horsman ve ark., 1994b).

Solunum oksidazların I. alt biriminde bulunan hem ve bakır atomundan oluşan özgün binükleer merkez oldukça korunmuştur (Saraste, 1990; Pereira ve ark., 2001). Herbir oksidaz, I. alt biriminde A-, O- ve B-tip gibi farklı hem kofaktörü içerir. Mitokondriyel oksidazlarda sadece hem A bulunmasına karşılık, bakteriyel oksidazlarda A, O veya B-tip hem grupları bulunur (Calhoun ve ark., 1994). I. alt birim iki hem molekülü içerir. Bunlardan biri kimyasal ve spektroskopik özelliklerinden dolayı yüksek devirli hem (örneğin, hem  $a_3$  veya hem  $b_3$ ) olarak isimlendirilir. Bu hem molekülü beş-bağa sahiptir ve bakır atomu ( $Cu_B$ ) ile birlikte oksijen bağlanma bölgesini oluşturur. İkinci hem molekülü ise altı-bağa sahiptir ve düşük devirli hem olarak isimlendirilir. Oksidaz enzimleri, sitokrom *c* veya kinoldan gelen elektronları I. alt birimindeki binükleer merkeze iletir. Sitokrom *c* oksidaz ve kinol oksidaz enzimleri arasındaki yapısal farklılıklar II. alt biriminde gözlenir. Sitokrom *c* oksidazın II. alt birimi sitokrom *c* bağlanma bölgesi ve redoks aktif binükleer bakır merkezi ( $Cu_A$ ) içerirken, kinol oksidazlar ise aktif  $Cu_A$  merkezi içermez (Fukaya ve ark., 1993; Lauraeus ve ark., 1991; Matsushita ve ark., 1990; Minghetti ve ark., 1992).

### 2.2.1. Sitokrom *cbb*<sub>3</sub> Oksidaz Enzimi

Sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enzimi, hem-Cu<sub>B</sub> binükleer merkezinde hidroksietil farnesil yan zincirinden yoksun hem B molekülü içermesiyle hem O veya hem A içeren diğer solunum oksidazlarından ayrılır (Wu ve ark., 1992). Ancak bu yan zincirinin oksidaz enziminin fonksiyonu için gerekli olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gray ve ark., 1994; Garcia-Horsman ve ark., 1994b; Wang ve ark., 1995). *Cbb*<sub>3</sub> oksidaz enzimi substrat olarak sitokrom *c* 'yi kullanır ve diğer oksidazlardan farklı olarak Cu<sub>A</sub>-içeren alt birimin yerine membrana bağlı *c*-tipi sitokrom alt birimleri (sitokrom *c*<sub>p</sub> ve sitokrom *c*<sub>o</sub>) içerir (Gray ve ark., 1994; Garcia-Horsman ve ark., 1994b).

*cbb*<sub>3</sub>-tip sitokrom *c* oksidaz yüksek oksijen konsantrasyonlarına karşı eğilim gösterdiğinden patojenik ve patojenik olmayan bakterilerde mikroaerobik koşullar altında solunumla üremeyi desteklemektedir (Pitcher ve ark., 2002). Sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enzimi *P. denitrificans* (de Gier ve ark., 1996), *R. sphaeroides* (Garcia-Horsman ve ark., 1994b), *R. capsulatus* (Gray ve ark., 1994), *Bradyrhizobium japonicum* (Preisig ve ark., 1996) ve *Pseudomonas stutzeri* (Urbani ve ark., 2001) gibi bazı proteobakter türleri, *Cytophaga*, *Flexibacter* ve *Bacteroides* 'lerde bulunmaktadır (Pitcher ve Watmough, 2004; Cosseau ve Batut, 2004).

### 2.3. Membran Lipidleri

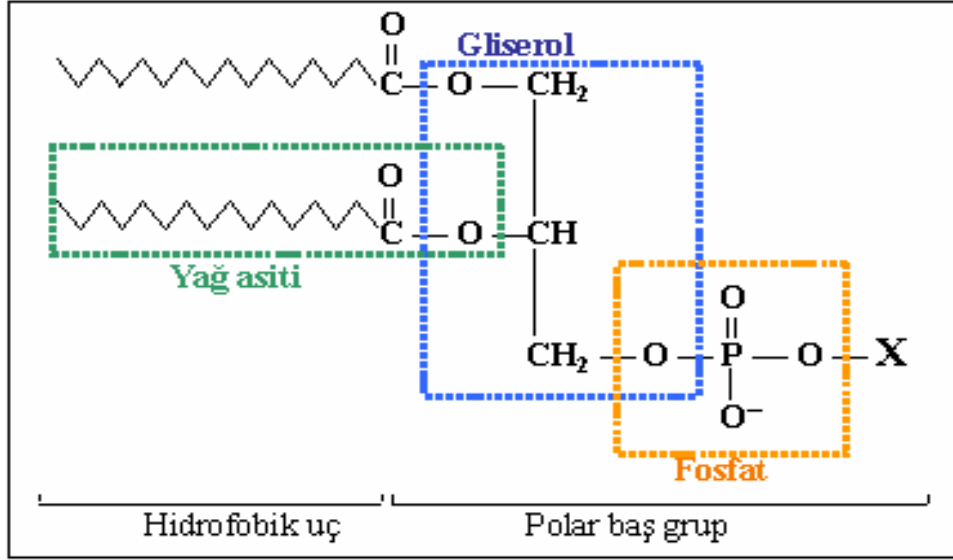
Membran lipidleri, lipid çift tabakasını oluşturan amfipatik moleküller olup, kovalent olmayan etkileşimler ile stabilize olurlar. Hücre membranlarındaki lipidlerin dinamikliği, membran proteinlerin fonksiyonunu da etkilemektedir. Lipid çift tabakası asimetrik olup, tabakanın her bir yarısının lipid kompozisyonu diğer yarısından farklıdır. Bakteriden insana kadar tüm organizmaların membranları değişik lipid kompozisyonlarına sahiptir ve genelde yaygın olan membran lipidleri; gliserofosfolipidlerdir. Çoğu bakteri türünde lipid çift tabakası genellikle fosfatidilgliserol (PG), fosfatidiletanolamin (PE) ve kardiyolipin (difosfatidilgliserol, CL) 'den oluşur. Bu lipidlere ek olarak, bakteriyel membranlarda bazıları daha fazla, bazıları ise daha az miktarda ama oldukça çeşitlenmiş lipidler de yer almaktadır. Bu tür

lipidler grubunda, PE 'nin metillenmiş türevleri [monometilfosfatidiletanolamin (MMPE), dimetilfosfatidiletanolamin (DMPE)] ve fosfatidilkolin (PC) yer alır. Oldukça seyrek bulunan diğer gliserofosfolipidler ise fosfatidilserin (PS) ve fosfatidilinositol (PI) 'dir. Fosfor içeren lipidlerden başka, birçok bakterinin membranları genellikle amino asit türevi olan ve fosfat grubu taşımayan lipidler de içerir. Belirli büyüme koşulları altında gözlenebilen bu tür lipidler; hopanoidler, glikolipidler, sülfür içeren lipid (sülfokuinovosil diaçilgliserol, SL), betain lipid (diaçilgliseril *N,N,N* trimetilhomoserin, DGTS) ve ornitin amino asiti türevi lipidler (ornitin lipid, OL) olarak rapor edilmişlerdir (Lopez-Lara ve ark., 2003; Sohlenkamp ve ark., 2003).

### **2.3.1. Gliserofosfolipidler**

Gliserofosfolipidler, hidrofilik (suyu seven) polar baş kısım ve hidrofobik (suyu sevmeyen) kuyruk kısmından meydana gelir. Hidrofilik polar baş kısmı, bir ya da daha fazla fosfat grubunu; hidrofobik kuyruk kısmı ise gliserol molekülüne bağlı iki yağ asiti zincirinden oluşur (Şekil 2.2). Birçok gliserofosfolipid molekülleri suda yer aldıkları zaman, hidrofilik kısımları su ile temas ederken, hidrofobik uçları ise birlikte yapışmaya zorlanır ve böylece lipid çift tabakası oluşur. Yağ asitlerinin doymunluğu ve uzunluğu da gliserofosfolipid moleküllerinin membran çift tabakasındaki paketlenme yeteneğini ve membranın akışkanlığını etkiler (Goldfine, 1984).





Şekil 2.2. Gliserofosfolipidlerin kimyasal yapısı.

Gliserolün iki alkol grubunun birer yağ asidi ve diğer alkol grubunun ise bir fosforik asit ile esterleşmesiyle gliserofosfolipidler oluşur.

### 2.3.1.1. Gliserofosfolipidlerin Biyosentezi

Membran gliserofosfolipidlerin biyosentez ve fonksiyonları hakkındaki bilgiler, lipid biyokimyası ve moleküler genetik çalışmalar için elverişli *E. coli* 'de yapılan çalışmalar sonucunda elde edildi. *E. coli* 'de bulunan gliserofosfolipidler PE, PG ve CL 'dir. Buna karşılık, PC, PI veya sfingomiyelin bulunmaz (Raetz, 1986; Cronan ve Rock, 1996). *E. coli*, membran iç katmanında %40 oranında gliserofosfolipid içerir iken, membran dış katmanında ise yaklaşık %25 oranında gliserofosfolipid içerir (DiRusso ve ark., 1999). *E. coli* 'de gliserofosfolipidler genellikle *sn-1* pozisyonunda doymuş açil zinciri (C16:0) ve *sn-2* pozisyonunda ise doymamış yağ asiti zincirlerini (C16:1 veya C18:1) içerirler (Cronan ve Rock, 1996).

Gliserofosfolipidlerin biyosentez yolu ilk kez Kennedy ve arkadaşları tarafından açıklandı (Kanfer ve Kennedy, 1964). Gliserofosfolipidlerin *de novo* biyosentezinin ilk basamağı, iç membranın sitoplazmik kısmında gliserol-3-fosfat (G3P) ve yağ asiti substratlarının kullanımıyla gerçekleşir (Cronan ve Rock, 1996).

Buna göre peş peşe gerçekleşen iki açiltransferaz reaksiyonu açil grubunu açil vericisinden G3P 'a transfer eder. *E. coli* açil vericisi olarak hem açil-açil taşıyıcı proteini (ACP) hem de açil-koenzim A (CoA) 'yı kullanabilir (Ailhaud ve Vagelos, 1966; Van den Bosch ve Vagelos, 1970; Goldfine ve Ailhaud, 1971). Buna karşılık, *R. sphaeroides* (Lueking ve Goldfine, 1975) ve *Clostridium butyricum* (Goldfine ve ark., 1967; Goldfine ve Ailhaud, 1971) gibi bazı bakteriler ise açil vericisi olarak sadece açil-ACP 'yi kullanmaktadırlar. İlk açiltransferaz reaksiyonu *sn*-G3P açiltransferaz enzimi (GPAT, PlsB [E.C.2.3.1.15]) tarafından katalizlenir. GPAT enzimi, açil zincirini *sn*-1 pozisyonundaki *sn*-G3P 'a transfer ederek 1-açil-*sn*-G3P (lisofosfatidik asit, LPA) 'un oluşumunu sağlar (Rock ve ark., 1981). Biyosentez yolunun ikinci basamağı ise 1-açil-*sn*-G3P açiltransferaz (AGPAT, PlsC [E.C.2.3.1.51]) tarafından gerçekleşir. AGPAT enzimi, GPAT tarafından katalizlenen birinci basamağa benzer şekilde görev alır (Kessels ve ark., 1983) ve açil zincirini *sn*-2 pozisyonundaki LPA 'ya transfer ederek, 1,2-diaçil-*sn*-G3P (fosfatidik asit, PA) ara ürününün oluşumunu sağlar (Coleman, 1990; 1992).

PA daha sonra CdsA enzimi tarafından aktif CDP-diaçilgliserol (DAG) ara ürününe dönüşür. PA, CTP (fosfatidat sitidiltransferaz) 'nin alfa fosforil grubuna hücum ederek, CDP-DAG ve  $PP_i$  oluşur. CDP-DAG ise daha sonra PE veya PG ve CL 'in sentezinde kullanılır. PE sentez yolundaki ilk enzim fosfatidilserin (PS) sentaz (*pssA* gen ürünü); ikinci enzim ise PS dekarboksilaz enzimi (Psd) 'dir. Buna göre, PS sentaz enzimi CDP 'yi serine dönüştürerek PS 'nin oluşumunu; Psd enzimi ise zwitterionik PE 'nin üretimini sağlar.

PG ve CL oluşumunu sağlayan gliserofosfolipid biyosentez yolunun diğer bir dalı fosfatidil-gliserofosfat sentaz enzimi (*pgsA* gen ürünü) ile başlar. PgsA enzimi CDP-DAG 'dan fosfatidilgliserofosfat (PGP) 'ın sentezini katalizler. Daha sonra PGP 'den fosforil grubunun hidroliziyle PG 'nin sentezi gerçekleşir. Bu hidrolitik basamağı en az üç farklı enzimin (PgpA, PgpB ve henüz bilinmeyen bir protein) katalizlediği düşünülmektedir (Dillon ve ark., 1996). En son aşamada ise iki PE molekülü biraraya gelerek CL ve gliserol oluşur. Kardiyolipin sentaz (*cls* gen ürünü) enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyon basamağı tersiniridir (Tropp, 1997).

### 2.3.1.2. Gliserofosfolipidlerin Hücre Fonksiyonundaki Rollerini

*E. coli* gliserofosfolipid biyosentez yolunda yer alan PssA dışındaki tüm enzimler membrana bağlıdır. PssA ise sitozolik bir enzim olmakla beraber, fonksiyon halindeyken membrana bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu enzimlerin aktif bölgelerini G3P, CTP ve ACP 'nin açillenmiş türevleri gibi suda çözünür öncüllere sahip olduklarından, gliserofosfolipid sentezi iç membran lipid tabakasının iç yaprakçığında gerçekleştiği sanılmaktadır. *İn vitro* (Huijbregts ve ark., 1996) ve *in vivo* (Langley ve ark., 1982) işaretleme çalışmaları bu görüşü desteklemektedir. Buna göre, lipid tabakasında yeni sentezlenmiş gliserofosfolipid moleküllerinin membranın iç yaprakçığından dış yaprakçığına hareket ve rotasyonu ("flip") için bir mekanizma görev alır.

Gliserofosfolipidler tüm canlı organizmalarda membranı şekillendiren en önemli bileşenlerdir. Lipidler, membran lipid çift tabakasının fiziksel organizasyonunda, proteinlerin membrana transferlerinde, sinyal transdüksiyon yolunda ve hücre bölünmesinin başlangıç aşamasında ve membranlar aracılığıyla gerçekleşen iyon ve metabolit transferinde görev alırlar. Ayrıca, moleküler şaperon olarak membran proteinlerinin katlanması ve yerleşimine yardım ederler. Membran lipid kompozisyonu proteinlerin yapı ve fonksiyonunu değiştirmekte olup, lipid kompozisyonunda gözlenen geçici ya da bölgesel değişikliklerin hücrenel süreçlerin potansiyel düzenleyicileri olduğu düşünülmektedir.

Bazı membran gliserofosfolipidlerin fonksiyonlarını ve hücre için gerekliliğini örneklemek gerekirse, PG, CL ve PE gibi iyonik olmayan gliserofosfolipidler DnaA proteinine bağlı DNA replikasyonun başlangıç aşamasında gereklidir (Xia ve Dowhan, 1995). Yine, PG ve CL oksidatif fosforilasyon ve membran geçirgenliği gibi normal mitokondriyel fonksiyonlar için önemlidir. Oksidatif fosforilasyon ve fotofosforilasyonda yer alan birçok protein komplekslerinin (sitokrom *aa*<sub>3</sub> oksidaz (Robinson, 1993), F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sentez (Eble ve ark., 1990) ve sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksi (Yu ve ark., 1978)) dördüncül yapılarında CL 'in bulunduğu ve bu proteinlerin fonksiyonel aktiviteleri için CL 'e gereksinim duyduğu yapılan birçok çalışma ile gösterildi. Diğer

yandan, PE ise laktoz permeaz enziminin (LacY) fonksiyonel katlanmasında moleküler şaperon görevi (Bogdanov ve Dowhan, 1998; Bogdanov ve ark., 1999) üstlenmekte olup, ayrıca kemotaksis ve bakterinin hareketliliği gibi birçok yaşamsal faaliyetler için de gereklidir. Yine asidik lipidlerin sekretör proteinleri (SecA, SecY ve SecE) kapsayan translokasyon sisteminin membrana yerleşiminde gerekliliği bilinmektedir (van Klompenburg ve de Kruijff, 1998).

### 2.3.1.3. 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferazlar (AGPAT)

Fosfatidik asit (PA), hücre membran gliserofosfolipid biyosentezinde çok önemli bir ara üründür (Coleman, 1990; 1992). *E. coli* 'de bu ürün *plsC* geni tarafından kodlanan AGPAT enziminin (EC 2.3.1.51) aracılığında üretilir. *E. coli* 'de tek bir AGPAT enzimi bulunmakta olup, *plsC* mutanlığı [*plsC*(Ts)] yüksek sıcaklıkta (42°C) ölümcüldür. Buna karşılık, bazı bakterilerde birden fazla fonksiyonel AGPAT enzimi bulunmaktadır. Örneğin, patojenik *Neisseria* türlerinde (*N. meningitidis* ve *N. gonorrhoeae*) *in vitro* koşullarda AGPAT aktivitesi gösteren iki enziminin (NlaA ve NlaB) varlığı belirlendi (Shih ve ark., 1999; Swartley ve ark., 1995). Bu enzimleri kodlayan *nlaA* ve *nlaB* genleri *E. coli plsC*(Ts) mutantına aktarıldığında bu iki genin mutantın üreme fenotipini tamamladığı görüldü. Genomda birbirinden farklı bölgede yer alan bu iki genin inaktivasyonu da membran gliserofosfolipid kompozisyonunda değişikliklere sebep olmuştur. Gliserofosfolipid profilinde gözlenen bu değişiklikler aynı zamanda kapsül ve pili oluşumu gibi hücre yüzeyi bileşenleri üzerinde de pleiotrofik etkilere neden olmuştur. Örneğin, NlaA mutantında ekstraselüler kapsüller polisakkarit ve pili ifadesinde artma gözlenmiştir. Açıltransferaz enzim aktivitesi *N. gonorrhoeae* NlaA mutantında azalırken, *N. meningitidis* NlaA mutantında ise artma göstermiştir. Bununla beraber, NlaA ve NlaB mutantları birbirinden farklı fenotip göstermişler ve böylece NlaA ve NlaB 'nin *in vivo* koşullarda farklı biyokimyasal fonksiyonlara sahip olduğu görülmüştür.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise bir gram-pozitif bakteri olan *Pseudomonas fluorescens* 'de AGPAT enzimini kodlayan *plsC* geni ile homolojiye sahip üç gen (*hdtS*, *patB* ve *olsA*) tanımlanmış ve bu genler detaylı olarak karakterize

edilmiştir (Cullinane ve ark., 2005). Buna göre, sadece *hdtS* knock-out mutantında yaban soya kıyasla üreme eksikliği görülmüştür. Yine *hdtS* mutantında *patB* mutantına kıyasla daha düşük AGPAT aktivitesi gözlenmiş ve bu da *hdtS* geninin hücrede birinci derecede fonksiyonel AGPAT enzimini kodladığını göstermiştir. *HdtS* geni *E. coli plsC(Ts)* mutantının üreme kusurunu tamamen; *PatB* geni ise kısmen tamamlamıştır. Ancak *olsA* geni *E. coli plsC* mutantını tamamlayamamıştır. *HdtS* mutantı hücresel yağ asiti kompozisyonundaki C16:C18 oranını değiştirirken, *patB* ve *olsA* mutantlarında ise yağ asiti profilinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Mutantlarda tanımlanmış bir diğer farklılık ise, *hdtS* mutantında kamçı aracılığındaki harekette kusur gözlenirken, *patB* mutantında ise bakteriyel hareketlilikte herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Bakterilerde çok geniş bir dağılım göstermekle beraber, AGPAT homologları ökaryotik organizmalarda da bulunmaktadır. Birkaç bitki ve hayvandaki AGPAT homologlarının işleyişi, *E. coli plsC(Ts)* mutantının üremesini sağlamıştır (Brown ve ark., 1994; Hanke ve ark., 1995; West ve ark., 1997). Bir kültür bitkisi olan *Limnanthes douglasii* de iki adet AGPAT homologu protein belirlenmiş ve tek bir proteinin tohum gelişimini sınırladığı gözlenmiştir (Brown ve ark., 1995).

*E. coli*, *Salmonella typhimurum*, *Borrelia burgdorferi*, *Saccharomyces cerevisiae*, mısır ve hindistan cevizi gibi farklı prokaryotik ve ökaryotik organizmalardaki AGPAT homologlarının amino asit dizileri karşılaştırıldığında NHQS ve PEGTR peptid dizilerinden oluşan iki bölgenin tüm AGPAT türlerinde korunmuş olduğu görülmüştür (Coleman, 1990; Nagiec ve ark., 1993; Brown ve ark., 1994; Ojaimi ve ark., 1994; Knutzon ve ark., 1995). IPB002123A ve IPB2123B olarak isimlendirilmiş bu korunmuş diziler AGPAT enziminde açıl-CoA ve/veya açıl-ACP bağlanma bölgesini oluşturduğu düşünülmektedir (Shih ve ark., 1999; West ve ark., 1997). AGPAT 'daki diğer homoloji gösteren bölgelerin de enzimin aktivite ya da özgünlüğü için önemli olduğu düşünülmektedir. Nagiec ve arkadaşları (1993) *S. cerevisiae plsC* homologunda (*SLC1*) tek bir amino asit değişikliğinin (Gln-44→Leu-44) uzun zincirli açıl-CoA için enzimin özgünlüğünü değiştirmede yeterli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Heat ve Rock (1998) birçok gliserofosfolipid açiltransferaz enzimlerinde (GPAT ve AGPAT) HX<sub>4</sub>D peptid motifinin korunmuş olduğunu

göstermiştir. Buna göre, *E. coli* GPAT 'daki motifde yer alan korunmuş histidin (H306) ve aspartik asit (D311) amino asitlerine yönlendirilmiş mutagenез yapılarak elde edilen mutasyonlar *E. coli* GPAT aktivitesinden yoksun mutant (SJ22) bakteriye aktarılmıştır. Buna göre açıl-CoA vericisi kullanılarak yapılan GPAT aktivite testinde H306A (His-306→Ala-306) mutasyonunu taşıyan mutant membranında enzimin inaktif olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde D311A (Asp-311→Ala-311) mutasyonunu taşıyan bakteride enzim inaktif iken, D311E (Asp-311→Glu-311) mutasyonunu taşıyan bakteride ise %10 oranında enzim aktivitesi gözlenmiştir. Böylece, amino asit dizisindeki değişiklikler AGPAT enzim aktivitesini ve özgünlüğünü değiştirmede yeterli görülmektedir.

*E. coli plsB* geni tarafından kodlanan protein az çok korunmuş olup, bu proteinin homologları  $\alpha$ - ve  $\beta$ -proteobakterilerde ve mikobakteriler ile sınırlı kalmaktadır. PlsC homologlarının bakterilerdeki varlığı, PlsB gibi olmakla beraber daha fazla sınırlıdır ve mikobakterilerle daha zayıf bir homoloji gösterirler. *E. coli* 'de *plsB* ve *plsC* gen ürünlerinin kısmi amino asit dizisi birbirleriyle homoloji gösterir ve bu iki enzimin birlikte koordinasyonlu fonksiyon gösterdikleri düşünülmektedir (Cronan ve Rock, 1996). Buna karşılık, bazı bakteri genomları bir ya da birden fazla *plsC* gen homologuna sahip iken, *plsB* gen homologu içermemektedirler. *Clostridium butyricum* bakterisinde *plsD* geni tarafından kodlanan proteinin dizisi GPAT 'dan daha çok AGPAT 'ın dizisine benzerlik göstermiştir. Yine, ifade olan PlsD proteininde açıltransferaz enzim aktivitesi gözlenmemesine karşın, *plsD* geninin *E. coli plsB26-plsX50* mutantının büyüme fenotipini tamamladığı gözlenmiştir (Heath ve ark., 1997).

### 2.3.2 Fosfat Grubu İçermeyen Lipidler

Hücre membranının lipid kompozisyonu organizmanın fizyolojik koşullarına bağlı olarak değişebilir (López-Lara ve ark., 2003). Bazı bakterilerde sınırlı fosfat koşulları altında fosfat grubu içermeyen lipidlerin bazı membran fosfolipidlerin kısmen yerini aldığı gözlenmiştir. Örneğin, *B. subtilis* (Minnikin ve ark., 1972), *P. diminuta*, *P. fluorescens* (Minnikin ve Abdolrahimzadeh, 1974), *R. sphaeroides* (Benning ve ark., 1995) ve *S. meliloti* (Geiger, 1998; Geiger ve ark., 1999) bakterilerinde fosforsuz

lipidler olarak diaçiltrimetilhomoserin (DGTS), sülfolipid (sulfoküinovosil diaçilgliserol, SL) ve ornitin lipid (OL) tespit edilmiştir.

DGTS bazı basit ökaryotlarda ve birçok bakteride bulunmaktadır. DGTS yapı olarak PC ile benzerlik gösterdiğinden, bakterilerde sınırlı fosfat koşullar altında DGTS, kısmen PC 'nin yerini alır (Benning ve ark., 1995; Geiger ve ark., 1999). SL 'ler tüm yüksek yapılı bitkilerin ve birçok fotosentetik bakterinin membranlarında bulunur. Bu lipidlerin genelde fotosentetik üreme için önemli olmadığı bilinmekle beraber, sınırlı fosfat koşulları altında ise *R. sphaeroides* ve siyanobakterilerin fotosentetik üremelerinde mutlak gerekli olduğu gözlenmiştir (Benning ve ark., 1993; Güler ve ark., 1996). Diğer yandan SL 'ler *S. meliloti* ve *Rhizobium leguminosarum* gibi bazı fotosentetik olmayan bakterilerde de bulunurken (Benning, 1998), *E. coli* ve *Agrobacterium* türlerinde ise bulunmaz. Diğer bir fosforsuz lipid olan OL 'ler ise yaygın olarak bakterilerde bulunmakta olup, ökaryotlarda ve arkealarda ise bulunmamaktadır (López-Lara ve ark., 2003).

### **2.3.2.1. Ornitin Lipidler**

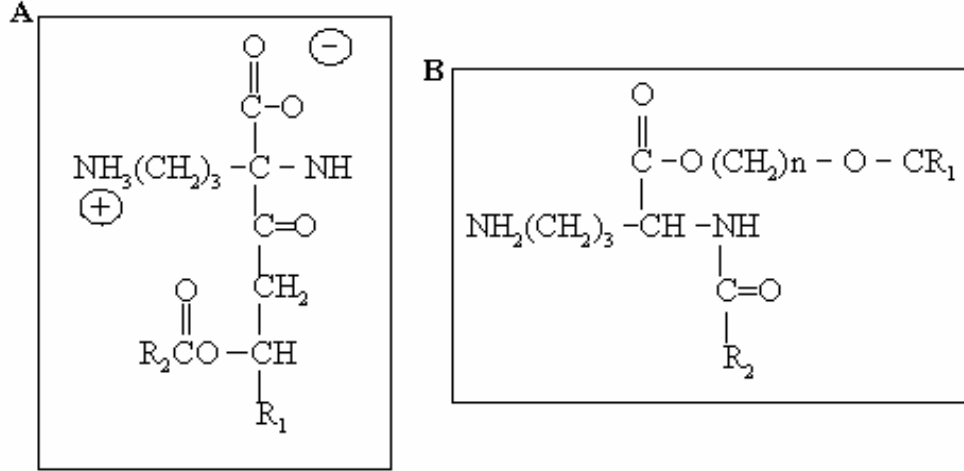
OL 'ler birçok gram-negatif bakteri (Ratledge ve Wilkinson, 1988; Asselineau, 1991) ve *Mycobacterium* ve *Streptomyces* gibi (Lanéelle ve ark., 1990) gram-pozitif bakterilerde bulunmaktadır. Ayrıca, patojen *Flavobacterium* (Kawai ve ark., 1988a) ve *Burkholderia* (Phung ve ark., 1995) türlerinde OL, temel lipid olarak rapor edilmiş ve bu tür bakterilerin patojenitelerinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan OL 'ler arkea ve ökaryotik organizmalarda ise bulunmamaktadır. Yine, gliserofosfolipid biyosentez mekanizması en çok çalışılan *E. coli* ise OL 'nden yoksundur.

### 2.3.2.1.1. Ornitin Lipidlerin Kimyasal Yapısı

OL 'lerin kimyasal yapısı birçok organizmada tanımlanmış olup, üç farklı OL sınıfının bulunduğu bilinmektedir (Goldfine, 1982). Birçok gram negatif bakteride gözlenen OL 'ler zwitterionik olup, genellikle  $\alpha$ -N-(açiloksiaçil)-ornitin yapısındadır (Knoche and Shively, 1972). Bu yapıda, 3- (veya 2-) hidroksi yağ asiti ornitin amino asitinin  $\alpha$ -amino grubuna amid bağı ile bağlanır ve ikinci yağ asiti ise birinci yağ asitin hidroksil grubuna ester bağı ile bağlanır (Şekil 2.3A). Örneğin, *S. meliloti* de ester bağı ile bağlı yağ asitinin hidroksil grubu üçüncü pozisyonda yer alırken (Geiger ve ark., 1999), *Burkholderia cepacia* (Taylor ve ark., 1998) ve *Flavobacterium* türlerinde (Asselineau, 1991) ise ikinci pozisyonda yer alır. Bu tip zwitterionik OL 'ler genellikle az ya da hiç PE içermeyen *Streptomyces* türlerinde ya da diğer türlerde ise sınırlı fosfat koşullarında baskın olarak bulunurlar (Batrakov ve Bergelson, 1978).

İkinci yapıda ornitinin karboksil grubu  $\alpha$ -hidroksi yağ asiti ile ester bağı ile bağlanırken, ornitinin  $\alpha$ -amino grubu ise 3-hidroksi yağ asitine bağlıdır (Şekil 2.3B). Bu tip OL lere *Actinomyces* türlerinde (Batrakov ve Bergelson, 1978) rastlanılmaktadır. Üçüncü OL yapısında ise iki yağ asitinden birincisi ester bağı ile etilen glikole; ikinci yağ asiti ise amid bağı ile ornitinin  $\alpha$ -amino grubuna bağlanır. Bu OL yapısı *Mycobacterium bovis* (Prome ve ark., 1969), *Brucella melitensis B. abortus*, *Bordetella pertussis* (Thiele ve Schwinn, 1973) bakterilerinde yer alır. Bazı türlerde farklı kromatografik mobilitelere sahip birkaç OL bulunmaktadır. Örneğin; *Burkholderia cepacia* ester-bağlı 2-hidroksi yağ asitinin varlığı ve yokluğuna bağlı iki farklı OL içerir (Kawai ve ark., 1988b; Cox ve Wilkinson, 1989; Taylor ve ark., 1998).





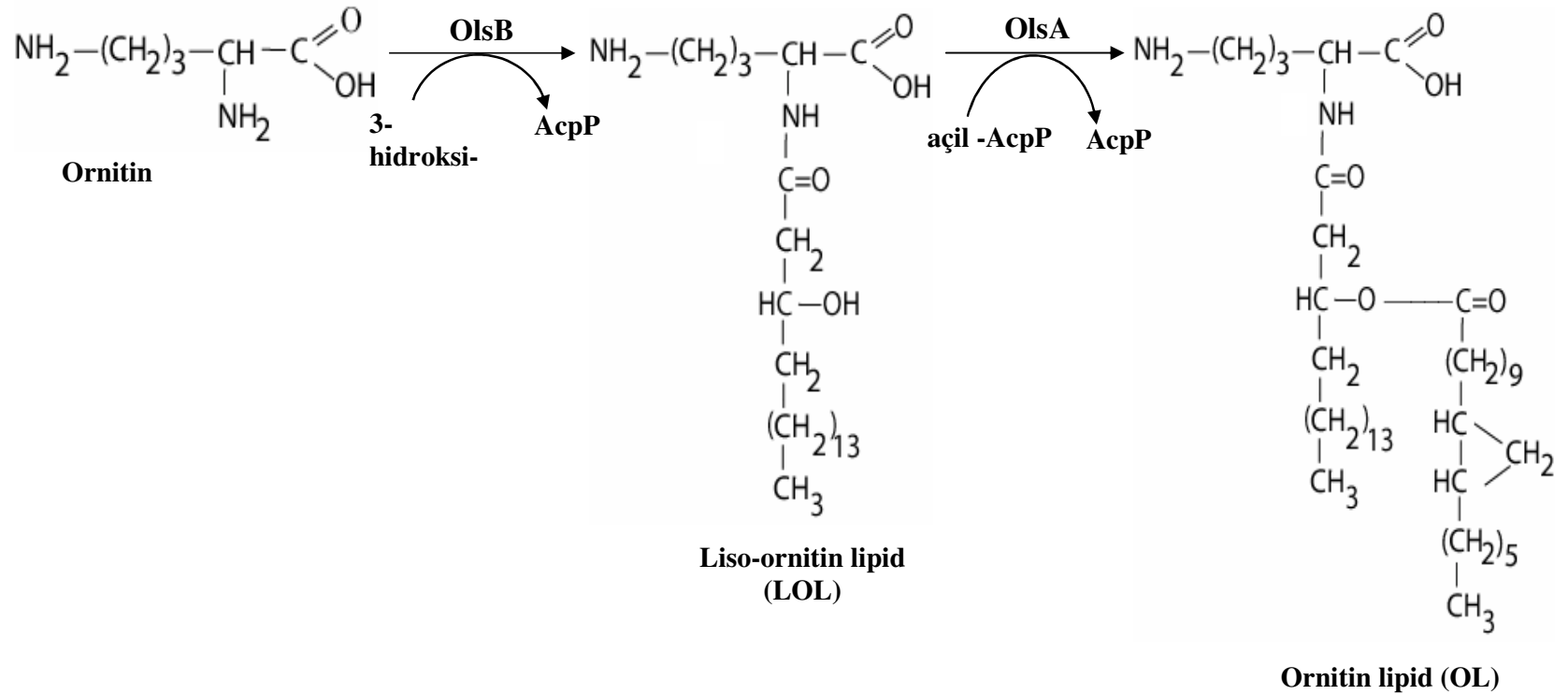
Şekil 2.3. Ornitin lipidlerin kimyasal yapısı.

(A) 3-hidroksi yağ asiti ornitinin  $\alpha$ -amino grubuna amid bağıyla; ikinci yağ asiti ise birinci yağ asitin hidroksil grubuna ester bağı ile bağlanır.

(B) ornitinin karboksil grubu  $\alpha$ -hidroksi yağ asiti ile ester bağı ile bağlanırken, ornitinin  $\alpha$ -amino grubu ise 3-hidroksi yağ asitine bağlıdır.

### 2.3.2.1.2. Ornitin Lipidlerin Biyosentezi

Geiger ve arkadaşları, ilk kez *S. meliloti* 'de OL biyosentezinin iki farklı enzimatik aktiviteyle gerçekleştiğini gösterdi (Weissenmayer ve ark., 2002; Gao ve ark., 2004) (Şekil 2.4). Buna göre  $\alpha$ -*N*-(açiloksaçil)-ornitin yapısında gözlenen *S. meliloti* OL biyosentezinde rol alan ilk enzim OlsB olarak tanımlanmış olup, bu enzim ornitin amino asitinin  $\alpha$ -amino grubu ile birinci yağ asiti arasında amid bağının (*N*-açiltransferaz) oluşumu için gereklidir. OlsB enzimi 3-hidroksiaçil-ACP 'ye gereksinim duyar ve ornitinden OL biyosentezinin ara ürünü olan liso ornitin lipid (LOL) 'in oluşumunu sağlar. OlsA olarak isimlendirilmiş OL biyosentezinde yer alan ikinci enzim ise birinci yağ asitin 3-hidroksil grubu ile ikinci yağ asitin karboksil grubu arasında ester bağının (*O*-açiltransferaz) oluşumundan sorumlu olup, LOL 'in OL 'e dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Her iki enzimde açil vericisi olarak sadece açil-ACP proteinini kullanır.



Şekil 2.4. *Sinorhizobium meliloti* 'de ornitin lipid biyosentez yolu (Gao ve ark., 2004).

### 2.3.2.1.3. Ornitin Lipidlerin Üretimi

Genel olarak, birçok organizma çevresindeki kimyasal ve fiziksel değişikliklere cevap verebilmek için membran lipid kompozisyonlarını değiştirebilir ve böylece uygun olmayan koşullarda yaşamlarını sürdürebilirler (Los ve Murata, 2004). Sınırlı fosfat içeren üreme ortamlarının, bakterilerin lipid kompozisyonuna olan etkilerine yönelik pekçok çalışma yapılmıştır. Özellikle *B. subtilis* (Minnikin ve ark., 1972), *P. diminuta*, *P. fluorescens* (Minnikin ve Abdolrahimzadeh, 1974), *Burkholderia cepacia* (Taylor ve ark., 1998), *R. sphaeroides* (Benning ve ark., 1995), *Hypomicrobium* (Batrakov ve Nikitin, 1996) ve *S. meliloti* (Geiger ve ark., 1999) bakterileri sınırlı fosfat içeren besi ortamlarında üretildiklerinde OL 'in, bazı membran gliserofosfolipidlerinin kısmen yerini aldığı görüldü. Bu bakterilerde OL ve PE zwitterionik yapıya sahip olduklarından bakteri membranında dönüşümlü olarak yer aldığı gözlenmiştir (Wilkinson, 1972).

Diğer yandan, *P. fluorescens* 'de sınırlı magnezyum içeren bazı üreme kültürlerinde ise OL 'nin üretilmediği görüldü (Minnikin ve Abdolrahimzadeh, 1974). Yine, *P. rubescens* 'in katı ve sıvı besi ortamlarında üreyen hücrelerinden izole edilen lipid kompozisyonunda da bazı farklılıklar gözlenir. Buna göre katı besi ortamında üreyen bakteride OL temel lipid iken, sıvı ortamda üreyenlerden elde edilen lipid izolatlarında ise OL 'e rastlanılmamıştır (Wilkinson, 1972). *P. denitrificans* 'de ise düşük divalent katyon konsantrasyonları içeren kompleks besi ortamlarında üretildiğinde ise zwitterionik OL 'i daha fazla miktarda ürettiği görülmüştür. *R. sphaeroides* 'de ise OL 'nin aerobik üreme koşullarında metabolik olarak sabit olması ve daha sonrasında da fotosentetik üreme koşullarına adaptasyon göstermesi nedeniyle, OL 'nin membranda yapısal bir bileşen olarak rol oynadığını düşündürmüştür (Gorchein, 1968). Diğer yandan, OL 'ler *P. rubescens* ve *Thiobacillus thiooxydans* bakterilerinde fermentasyon ile üretilmektedir (Wilkinson, 1972).

#### 2.3.2.1.4. Ornitin Lipidlerin Biyolojik Aktiviteleri

OL 'ler amid ve ester bağlarıyla bağlı yağ asitleri içerdiklerinden bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) endotoksin aktivitesinden sorumlu lipid A ile yapı olarak benzerlik gösterir (Kawai ve Akagawa, 1989). Diğer yandan, iki molekül arasında hidrofilik kısım, yağ asitlerinin karbon zincir uzunluğu ve moleküler büyüklük gibi farklılıklarda gözlenir. Lipid A gibi bazı bakteriyel lipidlerin ökaryotik organizma ile temasa geçtiklerinde güçlü reaksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. Bakteriyel endotoksinler, tümör nekrosis faktör (TNF)  $\alpha$ , interlökin (IL)-1  $\beta$ , prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ve koloni-uyarıcı faktör gibi immün düzenleyici bileşenleri üretmek için makrofajları aktive ederler (Galanos ve ark., 1985; Kotani ve ark., 1985; Rietschel ve ark., 1980; 1982; Sibley ve ark., 1988). Bu bilgiler ışığı altında OL 'nin immün düzenleyici aktivitelerinin LPS ile kısmen farklı olmakla beraber benzer olacağı düşünülmüş ve OL 'lerin biyolojik aktivitelerine yönelik pekçok çalışma yapılmıştır. OL 'ler tıpkı LPS 'ler gibi Toll-benzeri reseptör-CD14 'e bağlı yol aracılığında (Kawai ve ark., 2000a) PGE<sub>2</sub> ve IL-1 $\beta$  üreten makrofaj hücrelerini aktive ettikleri gözlenmiştir. Buna ilaveten, güçlü B-lenfosit çoğalımı göstermişlerdir. TNF- $\alpha$  indüklenme aktivitesi karın zarı makrofajlarında daha zayıf olmasına karşılık (Kawai ve Akagawa, 1989), makrofaj-benzeri hücrelerde daha güçlü olduğu görülmüştür (Kawai ve ark., 2000b). TNF- $\alpha$  'nin tavşan endotoksin vücut sıcaklığında (Michie ve ark., 1988; Kawasaki ve ark., 1989) ve endoksin fare hipotermik yanıtta (Bauss ve ark., 1987) önemli rol aldığı tahmin edilmektedir. OL 'ler oldukça zayıf TNF- $\alpha$  indükleyici aktivite gösterdiklerinden farelerde zayıf hipotermik yanıtı sebep olurlar (Kawai ve ark., 1996). Lipid A molekülleri toksik olmasına karşılık, OL 'ler toksik değildir (Kawai ve Akagawa, 1989). Bu nedenle OL 'ler toksik olmayan aşı adjuvantları olarak da kullanılabilirler (Kawai ve Akagawa 1989; Kato ve Goto 1997; Kawai ve ark., 1999).

Zayıf TNF- $\alpha$  indükleyici aktivitesinden kaynaklanarak OL 'nin toksik özellikte olmaması OL 'in sadece immün düzenleyicisi olarak değil aynı zamanda endoksin antagonistleri olarak da kullanılmasında avantaj sağlamaktadır. Farelere endotoksin lipid A 'dan önce OL verildiğinde, OL 'lerin fareleri letal endotoksinemiden koruduğu gözlenmiştir (Kawai ve ark., 1991). Bu durumun iki molekül arasında gözlenen yapısal

benzerlikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna göre OL, lipid A'nın neden olduğu olaylara antagonistik bloklayıcı olarak fonksiyon gösterebilmektedir.

OL'nin birçok *Bordetella* (Kawai ve Yano, 1983), *Flavobacterium* (Kawai ve ark., 1988a) ve *Pseudomonas* türlerinde (Kawai ve ark., 1988b) lipid interaksiyonlarıyla insan ve tavşan eritrositlerinde hemagglütinasyona neden oldukları belirlenmiştir. OL'ler reaktif oksijen radikallerinin üretilmesinde öncü konakçı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan insan polimorfonükleer lökosit (PMN) kemotaksisleri uyarmakta ve fonksiyonlarını aktive etmektedir (Miyazaki ve ark., 1993; Kawai ve ark., 2000a).

Membran lipidlerinin simbiyosiz oluşumunda bazı etkilerinin olduğu bilinmektedir (de Rudder ve ark., 1997). Ancak *S. meliloti*'de OL biyosentezinde yer alan genlere ait mutantlar karakterize edildiğinde yonca bitkisiyle olan simbiyotik interaksiyonlarda OL'nin önemli olmadığı görülmüştür (Weissenmayer ve ark., 2002).

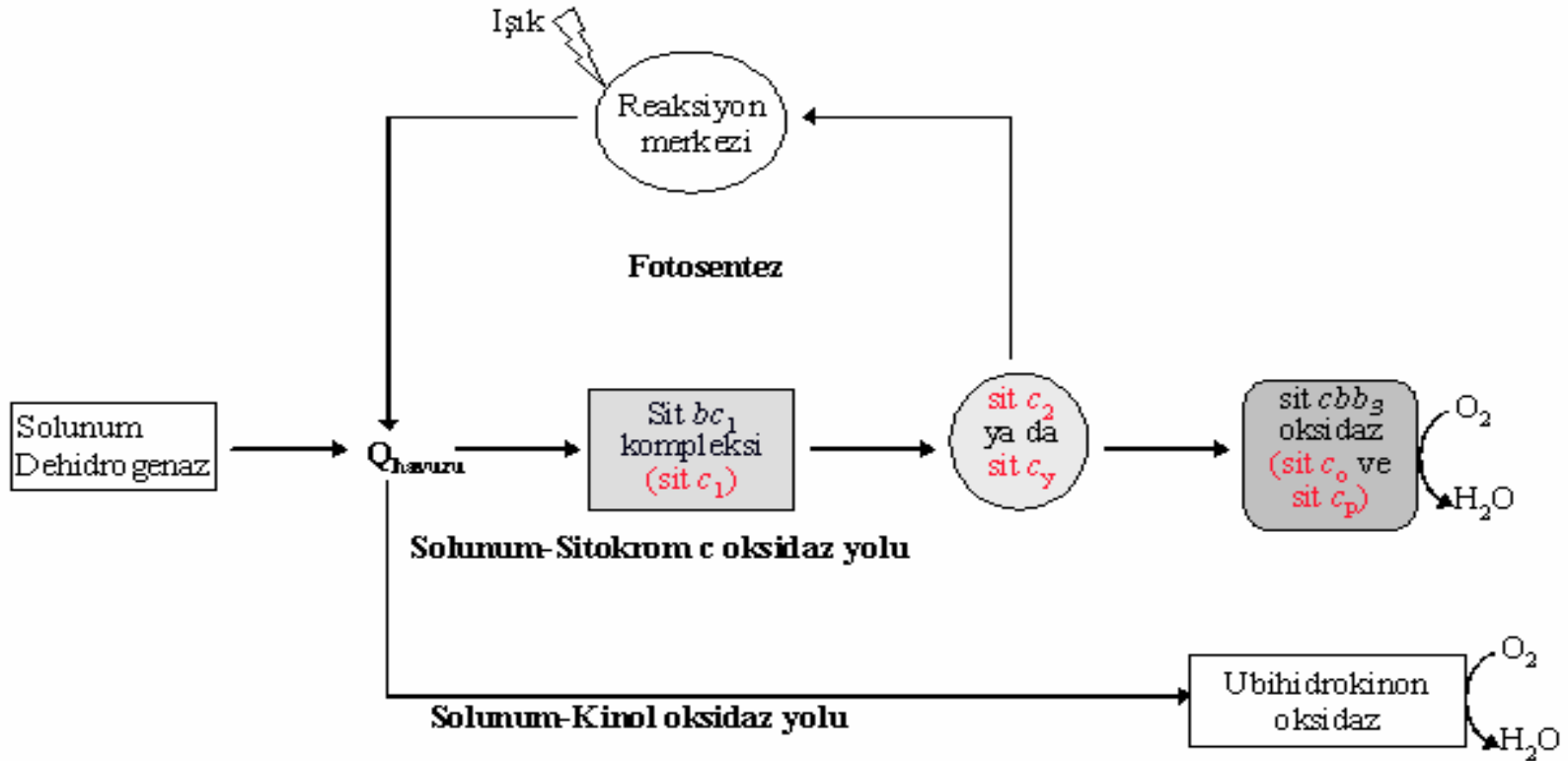
#### **2.4. Model Organizma *Rhodobacter capsulatus***

*R. capsulatus* mor bakterilerin alt şubesinin bir üyesidir. Bu alt şube, genellikle ökaryotik hücrelerle yakın ortaklıklar kuran ve mitokondrilerin endosimbiyont ataları olduğu düşünülen toprak bakterilerinden oluşur (Woese, 1987). *R. capsulatus* mor-sülfürsüz, gram-negatif fakültatif bir fototroftur. *R. capsulatus* intraselüler fotosentetik membrana sahiptir (Cohen-Bazire ve ark., 1957) ve membranlar, bakteriyoklorofil ve hücrenin ışık-toplayıcı pigmentlerini içeren kromotofor olarak isimlendirilen vesiküller şeklinde görünürler (Gorchein ve ark., 1968) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *Rhodobacter capsulatus* 'un elektron mikroskopik görüntüsü.

*R. capsulatus* oldukça dallanmış elektron transfer (ET) yollarına sahip olduğundan farklı büyüme koşullarında üreyebilme yeteneğindedir (Zannoni, 1995) (Şekil 2.6). Buna göre, anaerobik fotosentetik yolu, kinol havuzu ( $Q_{\text{havuzu}}$ ) ve farklı elektron taşıyıcı proteinler (sitokrom  $c_2$  ve sitokrom  $c_y$ ) ile birbirine bağlı reaksiyon merkezi ve sitokrom  $bc_1$  kompleksi arasında devirsel gerçekleşir. Solunum ET yolu ise,  $Q_{\text{havuzu}}$  'ndan sonra iki kola ayrılır. Sitokrom  $cbb_3$  oksidaz enziminin kullanıldığı solunum yolu mitokondriyel solunum zincirindeki proteinlere yapı ve işlev bakımından benzer proteinler içermektedir. Alternatif solunum yolunda ise yaygın bir şekilde prokaryotlarda bulunan  $QH_2$  oksidaz enzimi bulunur (La Monica ve Marrs, 1976; Zannoni ve ark., 1976; Lang ve ark., 1996). Bu solunum yolu tüm  $c$ -tipi sitokrom proteinlerinden yoksun olup,  $b$ - ve  $d$ -tipi sitokromlar içermektedir. *R. capsulatus* ayrıca dimetil sülfoksit (DMSO), trietilamin oksit veya nitroz oksit gibi elektron alıcılarını kullanarak anaerobik karanlık koşullarda da üreyebilmektedir.



Şekil 2.6. *R. capsulatus* 'da aerobik ve fotosentetik elektron transfer (ET) yolları.

Fotosentetik ET yolunda, elektron akışı devirseldir. Işıkla aktifleşen reaksiyon merkezinden gelen elektronlar, sırasıyla ubikinon havuza ( $Q_{havuz}$ ), sitokrom  $bc_1$  kompleksine ve elektron taşıyıcı  $c$ -tipi sitokrom proteinlerine (sitokrom  $c_2$  veya sitokrom  $c_y$ ) iletilir ve tekrar reaksiyon merkezine geri dönerler. Solunum ET yolunda ise farklı solunum dehidrojenazlardan (NADH, süksinat ve malat dehidrojenazlar) gelen elektronlar  $Q_{havuz}$  'una iletilir. Elektronlar bu aşamadan sonra, tercihe göre iki farklı solunum yolundan birine geçer. Mitokondriyel ET zincirine benzeyen yol, sitokrom  $bc_1$  kompleksi, sitokrom  $c_2$  ya da sitokrom  $c_y$  ve sitokrom  $cbb_3$  oksidaz enzimlerini içerir. Diğer solunum yolu ise,  $c$ -tipi sitokrom proteinlerinden yoksun olup, ubihidrokinon oksidaz ( $QH_2$ ) enzimi içerir. Fotosentez ve solunum yolunda bulunan  $c$ -tipi sitokrom içeren proteinler (sit  $c_1$ , sit  $c_2$ , sit  $c_y$ , sit  $c_0$  ve sit  $c_p$ ) kırmızı renkte gösterilmiştir.

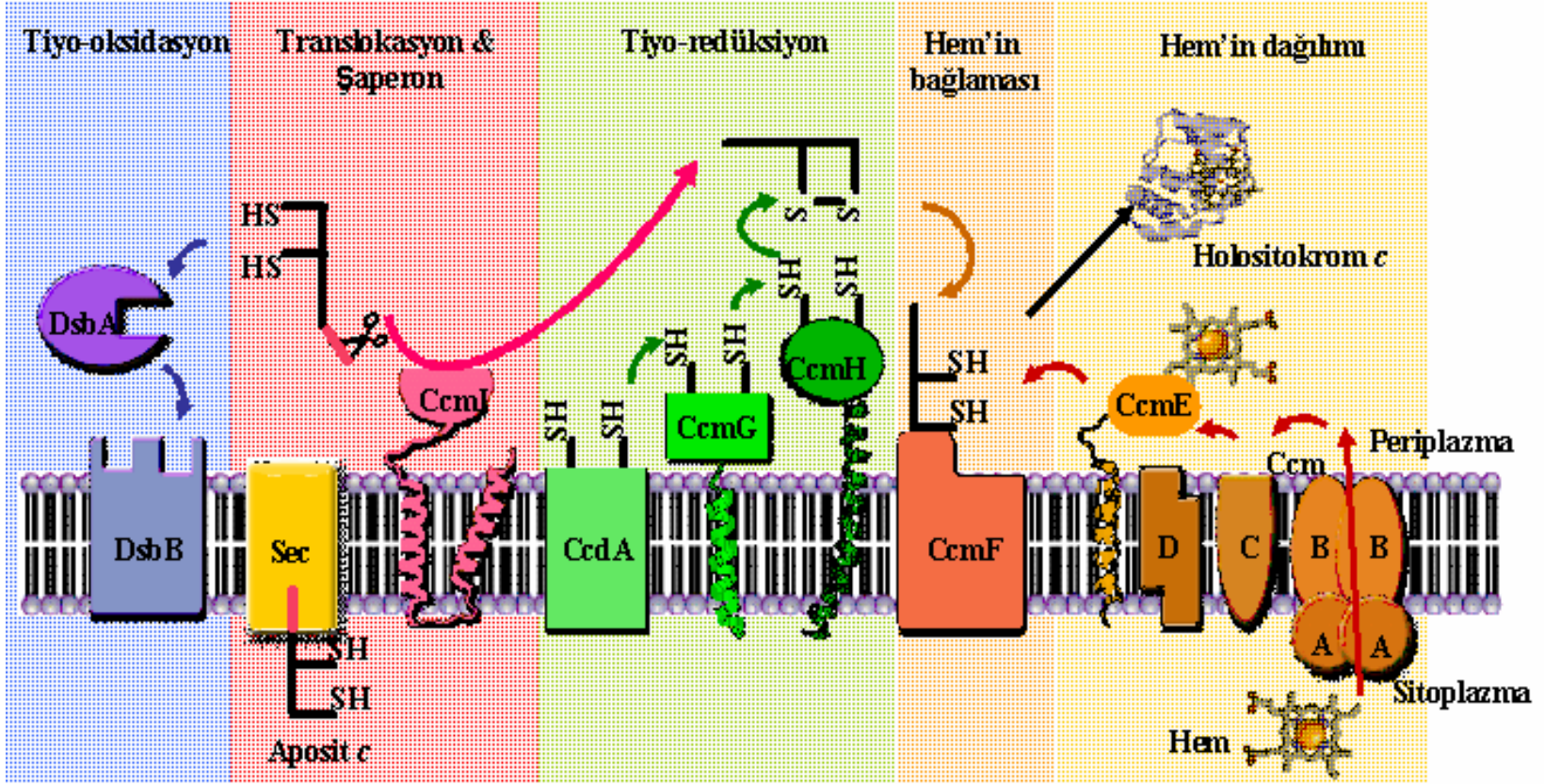
#### 2.4.1. *R. capsulatus* 'da C-tipi Sitokromların Biyogenesi

*R. capsulatus* farklı üreme yollarına sahip olması, moleküler ve genetik yönden analizlere elverişli olması nedeniyle c-tipi sitokromların aydınlatılmasında (Zannoni, 1995) ve sitokromların biyogenesiz çalışmaları için de iyi bir model olmaktadır. *R. capsulatus* farklı üreme koşulları altında sistem-1 biyogenesiz yolunu kullanarak birçok c-tipi sitokrom proteinini üretir. Buna göre, *R. capsulatus* anaerobik fotosentetik üreme koşullarında sitokrom  $c_1$  ve sitokrom  $c_2$  veya sitokrom  $c_y$  proteinlerine gereksinim duyar (Zannoni ve Daldal, 1993). Benzer şekilde, mitokondri-benzeri solunumla üremede ise sitokrom  $c_1$ , sitokrom  $c_2$  veya sitokrom  $c_y$  'den başka sitokrom  $cbb_3$  oksidaz enziminin alt birimleri olan sitokrom  $c_o$  ve sitokrom  $c_p$  proteinleri gereklidir (Gray ve ark., 1994; Koch ve ark., 1998). *R. capsulatus* 'un içerdiği c-tipi sitokrom proteinleri ( $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_y$ ,  $c_o$ ,  $c_p$  ve  $c'$ ) topolojik olarak birbirinden farklılık gösterir. Buna göre, sitokrom  $c_y$ , sitokrom  $c_o$  ve sitokrom  $c_p$  amino-ucundan, sitokrom  $c_1$  ise karboksil-ucundan sitoplazmik membrana bağlıdır. Diğer yandan, sitokrom  $c_2$  ve sitokrom  $c'$  ise sinyal dizilerine sahip olup, çözümlü periplazmik proteinlerdir (Moore ve Pettigrew, 1990).

*R. capsulatus* 'da sitokrom c eksikliği gözlenen mutantlar üzerindeki çalışmalar ile c-tipi sitokromların olgunlaşmasında en az on bileşenin (ccmABCDEFGH ve ccdA) gerekli olduğu gösterilmiştir (Lang ve ark., 1996; Monika ve ark., 1997; Goldman ve ark., 1997; Deshmukh ve ark., 2000; Turkarlan ve ark., 2006). Apositokromlar, sitoplazmada üretilir ve sekretör proteinlerinin aracılığında (Sec-bağımlı yol) membrandan periplazmaya geçer (Helde ve ark., 1997). Apositokromların sinyal peptidleri ya işlenilir ya da amino-uç membran çapası olarak kullanılır. Disülfit bağ formasyonu (oksitleme) apositokromdaki korunmuş hem bağlanma motifinde (-CXYCH-) yer alan sistein amino asitleri arasında DsbA/DsbB proteinleri aracılığında gerçekleşir (Metheringham ve ark., 1995; Missiakas ve Raina, 1997; Setterdahl ve ark., 2000). Biyogenesiz yolunun tiyoredüksiyon kısmında yer alan CcdA (Deshmukh ve ark., 2000), CcmG (Beckman ve Kranz, 1993) ve CcmH (Beckman ve ark., 1992) proteinleri, hem bağı oluşmadan önce apositokromun sistenil yan zincirini indirger. Diğer yandan, hem kofaktörleri sitoplazmada sentezlenir ve CcmABCD'den oluşan kompleks yardımıyla periplazmaya geçer. CcmE proteini tarafından taşınan hem



molekölü, CcmF ve CcmH proteinlerinin yardımıyla apositokroma kovalent olarak bağlanır. CcmI proteinin de DsbA/DsbB yolu aracılığıyla oksitlenen apositokrom *c* 'leri hem ligasyon bölgelerine ve devamında da periplazmaya translokasyonlarında şaperonluk görevi yaptığı ileri düşünülmektedir (Lang ve ark., 1996; Sanders ve ark., 2005). Şekil 2.7 'de *R. capsulatus* 'da Ccm-sistem 1 sitokrom *c* biyogenesisiz modeli şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *R. capsulatus* 'da c-tipi sitokrom proteinlerinin biyogenesiz yolu.

Sitokromlar preapositokromlar olarak sitoplazmada üretilir ve sekretör (Sec) proteinleri yoluyla membrana geçerler. Daha sonra sinyal dizilerin işlenmesiyle apositokromlar oluşur. Periplazmada, hem bağlanma bölgesindeki sisteinler DsbA /DsbB proteinleri tarafından disülfidlere oksitlenir. Apositokromlar CcmI tarafından hem bağlanma bölgesine geçer ancak apositokromlar hem kofaktörüne bağlanmadan önce disülfidlere indirgenir. Sitoplazmada sentezlenen hem molekülü de CcmABCD kompleksi aracılığıyla periplazmaya geçer ve CcmE, CcmF ve CcmH proteinleri aracılığıyla apositokroma kovalent olarak bağlanır (S.Turkarıslan 'dan temin edilmiştir).

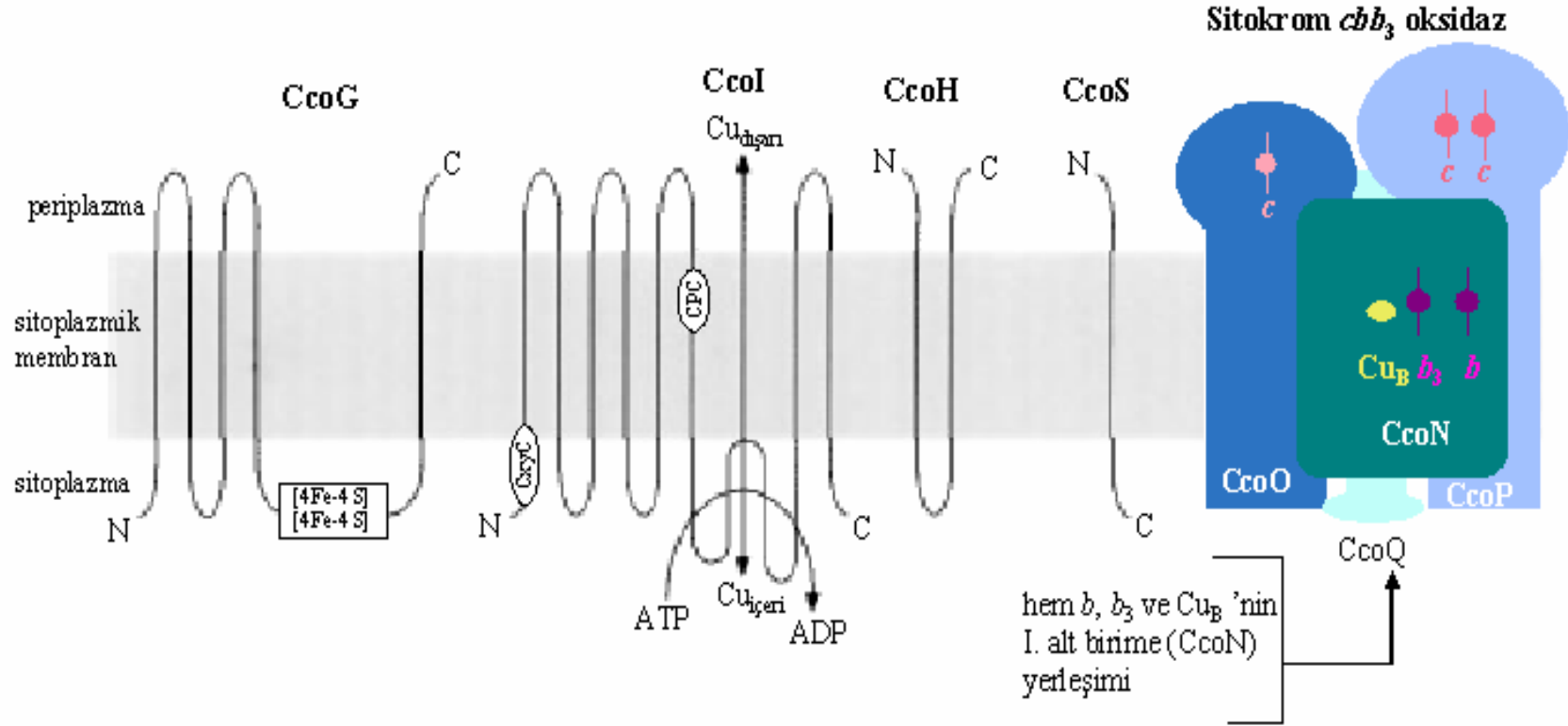
#### 2.4.2. *R. capsulatus* 'da Sitokrom *cbb*<sub>3</sub> Oksidaz ve Enzimin Biyogenesizi

*R. capsulatus*, *R. sphaeroides* ve *P. denitrificans* gibi yakın akrabalarına kıyasla, düşük ve yüksek oksijen konsantrasyonlarında aktif hale geçebilen tek tip oksidaz enzimine (sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz) sahiptir. *R. capsulatus* sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enziminin izole edilen örneklerinde üç büyük alt ünite elde edilmiştir (Gray ve ark., 1994). I. alt birim (CcoN) integral membran proteini olup bakır-oksidadz enzim ailesinde tanımlanmış altı adet korunmuş histidin amino asiti içerir (Pitcher ve Watmough, 2004; Hosler ve ark., 1993). *CcoN*, tahmini moleküler ağırlığı 58 kDa olan 532 amino asitlik polipeptidi kodlar. Bu alt birimde, düşük devirli hem *b* ile oksijenin suya indirgendiği yüksek devirli hem *b*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> bimetallik merkez bulunmaktadır. *Rhizobia* türlerinde FixN nin sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın fonksiyonu ve yerleşimi için gerekli olduğu belirlenmiştir (Zufferey ve ark., 1996). II. ve III. alt birimler ise membrana bağlı *c*-tipi sitokromlar içerir ve sitokrom *c* den alınan elektronların CcoN nin katalitik binükleer merkezine transferinde gereklidir. CcoO, II. alt birime karşılık gelir, membrana bağlıdır ve bir adet sitokrom *c* proteini (sitokrom *c*<sub>o</sub>) içerir. CcoO, 242 amino asitlik bir polipeptidi kodlar ve moleküler ağırlığı 28 kDa dır. CcoP, moleküler ağırlığı 32 kDa olan 288 amino asit peptidi kodlar. *CcoQ* geni küçük, membrana bağlı bir polipeptid kodlar. *B. japonicum* (Zufferey ve ark., 1996) bakterisinde *CcoQ* geninin delesyonunun sitokrom *c* miktarında bir azalmaya neden olmasına rağmen, oksidaz enziminin aktivitesi ya da yerleşiminde belli bir etki göstermemiştir. *CcoQ* enzim aktivitesi için gerekli olmamasına rağmen, sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın aerobik koşullar altında düzenlenmesi ilgili olduğu düşünülmektedir (Oh ve Kaplan, 2002).

Sitokrom *c* oksidaz gibi çok alt birimli membran protein komplekslerinde; polipeptidlerin şifrenmesi ve katlanması, prostetik grubların ve pigmentlerin bağlanması, alt birimlerin olgunlaşması ve fonksiyonel membran kompleksleri arasındaki etkileşimleri kapsayan biyogenesiz işlemleri ve polipeptitlerin membrana yerleşim süreçleri gibi posttranslasyonel modifikasyon basamakları birden fazla protein tarafından desteklenmektedir (Merchant ve Dreyfuss, 1998). Genel olarak bu süreçler hakkında bilgiler sınırlıdır. Rhizobial türlerde *ccoGHIS* gen ürünlerinin sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidazın biyosentez için gerekli olduğu belirlenmiştir (Batut ve Boistard, 1994; Preisig

ve ark., 1996). Koch ve arkadaşları (2000), *R. capsulatus* 'da, aktif sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz enziminin formasyon ve kararlılığının *ccoGHIS* gen ürünlerinin yokluğundan etkilendiğini ve bundan dolayı *ccoGHIS* gen ürünlerinin enzimin biyogenesizinde ilgili olduklarını göstermiştir (Şekil 2.8). Diğer yandan, *S. meliloti* (Kahn ve ark., 1989) ve *B. japonicum* (Preisig ve ark., 1996) bakterilerinde *ccoGHIS* homologlarının operon oluşturduklarını buna karşılık *R. capsulatus* 'da *ccoG*, *ccoH*, *ccoI* ve *ccoS* genlerinin herbirinin kendi promotorları olduğu ve bağımsız olarak ifade edildikleri belirlenmiştir (Koch ve ark., 2000). *R. capsulatus* 'da dahil birçok bakteride *ccoNOQP* ve *ccoGHIS* genlerinin hemen üst tarafında FNR-bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Koch ve ark., 1998). FnrL, *R. sphaeroides* 'de *ccoNOQP* in pozitif regülatörü olup, fotosentez ve DMSO varlığında anaerobik koşullarda karanlık büyümede gereklidir (Mouncey ve Kaplan, 1998). *R. capsulatus* 'da ise sadece sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz enzimi bulunduğu ve de bu enzim farklı oksijen konsantrasyonlarında aktif olduğundan, FnrL nin solunumla üreme sırasındaki işleyişinin diğerlerinden farklı olduğu düşünülmektedir.

CcoG nin inaktivasyonu ile elde edilen null mutantı sitokrom oksidaz aktivitesi gösterebildiğinden, *ccoG* geninin enzim aktivitesi için gerekli olmadığı görülmüştür. Buna karşılık, *CcoG* geninin yokluğunun telürit azalmasında etkili olduğu redoks reaksiyonları ile ilişkili ferrodoksin motifi içerdiği belirlenmiştir (Koch ve ark., 2000). CcoH ve CcoI null mutantlarında ise oldukça az miktarda sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz aktivitesi görülmüş ve bu durumun ise bakteride bu genlerin yokluğunda oksidaz enziminin çabucak yıkıma uğrayabilme ihtimalini düşündürmüştür. *CcoI* geni ise CPx-tip ATP-bağımlı taşıyıcılarla homoloji göstermektedir. Diğer yandan *ccoS* geninin yokluğunda ise enzimin I. alt birimde yer alan Cu ve *b*-tip hem gruplarının bulunmadığı görülmüştür. Yakın bir zamanda yapılan bir çalışma ise, sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz enziminin alt birimlerinin sabit fakat aktif olmayan CcoNOQ (210 kDa) alt kompleksinin CcoNOQP (230 kDa) aktif kompleksine geçişi aracılığıyla membrana yerleştiklerini gösterdi (Kulajta ve ark., 2006).



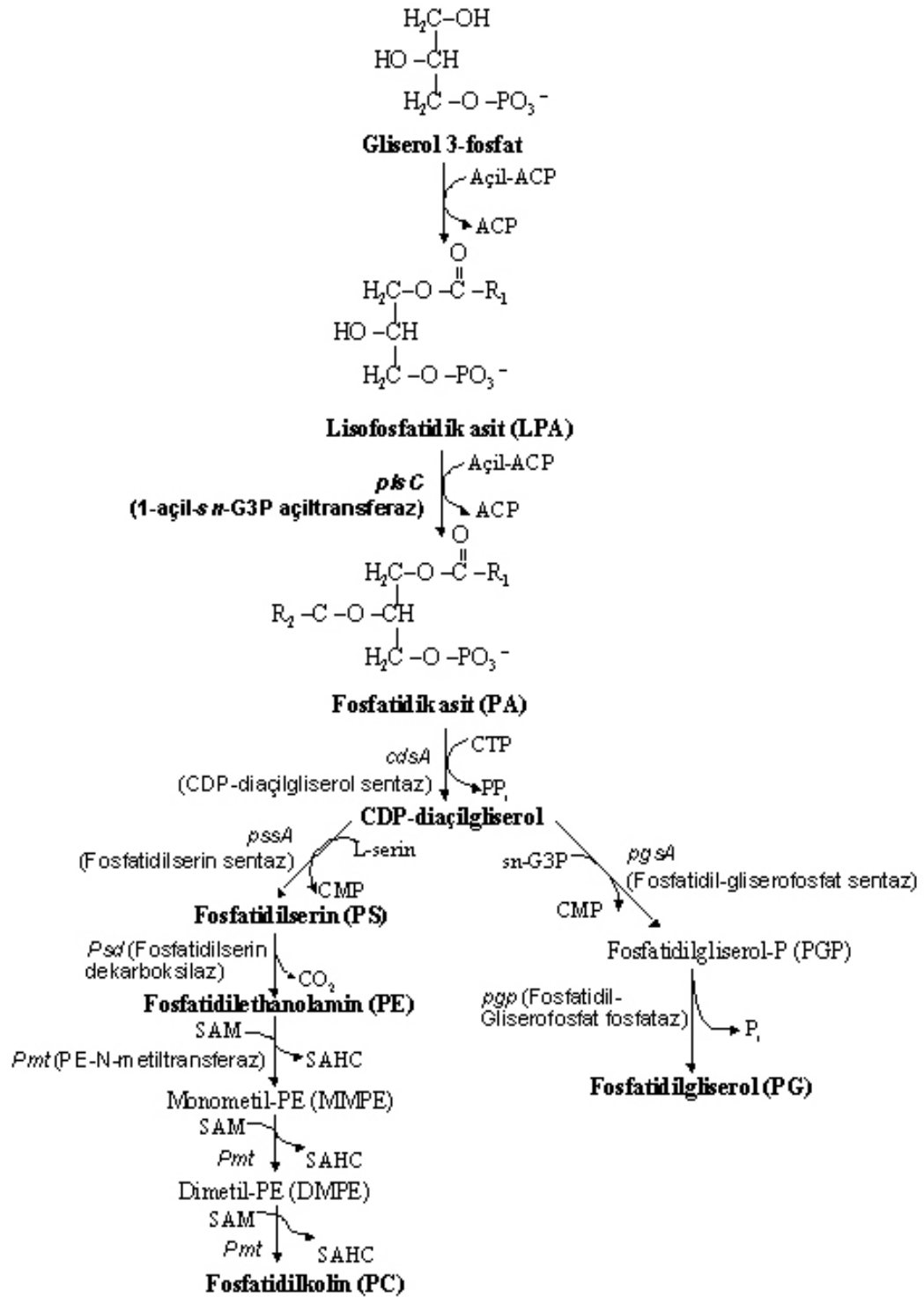
Şekil 2.8. *R. capsulatus* sitokrom *cb<sub>b</sub>* oksidaz enziminin biyogenesizinde *ccoGHIS* gen ürünlerinin rollerini özetleyen model (Koch ve ark., 2000).

Fonksiyonel *c*-tipi sitokromların varlığı, hücrelerin fotosentetik üreme ve aktif sitokrom *c* oksidaz aracılığıyla Nadi reaksiyonunu (Keilin, 1966) katalizleyebilme yetenekleri (Nadi<sup>+</sup>) ile gözlemlenir. Nadi reaksiyonu, sitokrom *c* oksidaz aktivitesine özgü bir indikatör olup aktif oksidaz enzimine sahip yaban soy hücreleri, O<sub>2</sub>' nin ve elektron taşıyıcıların varlığında α-naftol 'ü indolfenol mavisine dönüştürerek (α-Naftol+ DMPD+O<sub>2</sub>=indolfenol mavisi+H<sub>2</sub>O) mavi renk alırlar (Nadi<sup>+</sup>). Buna karşılık enzim aktivitesi göstermeyen mutant bakteriler ise boyanmadan kalırlar (Nadi<sup>-</sup>). Buna göre, tüm *c*-tipi sitokromlardan yoksun *R. capsulatus* mutantları fotosentez ile üreyemez ve sitokrom *c* oksidaz aktivitesi gösteremezler (Nadi<sup>-</sup>). Ancak bu tip mutantlar, *b*-tipi sitokrom içeren QH<sub>2</sub> enzimini kullanan alternatif solunum yolu ile aerobik koşullarda üreyebilirler.

#### 2.4.3. *R. capsulatus* 'da Membran Polar Lipidleri

*R. capsulatus* 'da başlıca membran polar lipidleri PE, PG ve PC 'dir. Bu önemli gliserofosfolipidlere ilaveten OL ve DGTS gibi fosfat grubu içermeyen lipidler de (Asselineau, 1991) yer alır. Diğer yandan *R. capsulatus* 'un toplam hücre ekstraktlarında SL ve CL 'e rastlanılmamıştır (Imhof ve Imhoff, 1995). Bakteri membranındaki lipidler çoğunlukla *cis*-vaccenic asit (*cis*-11-18:1) yağ asitini içerirler (Smith, 1988). *R. capsulatus* 'da öngörölmüş tahmini gliserofosfolipid biyosentez yolu Şekil 2.9 'da şematize edilmiştir. *E. coli* ve *R. capsulatus* bakterilerinin gliserofosfolipid biyosentez yolu bazı yönlerden farklılık göstermektedir. Buna göre ilk olarak, *E. coli* GPAT ve AGPAT 'ın katalizlediği açiltransferaz reaksiyonlarında farklı açil vericileri kullanırken, *R. capsulatus* ise tıpkı yakın akrabası olan *R. sphaeroides* (Lueking ve Goldfine, 1975) gibi sadece açil-ACP 'ye karşı özgünlük gösterir. İkinci fark ise, diğer intrasellüler membran sistemine sahip gram-negatif bakterilerde olduğu gibi *R. capsulatus* PE 'nin metillenmiş türevlerini [monometil-PE (MMPE) ve dimetil-PE (DMPE)] ve fosfatidilkolin (PC) içermektedir (Goldfine, 1984). *E. coli* 'de ise PC ya da PE ile PC arasında herhangi bir N-metillenmiş ara ürün bulunmamaktadır. PC, ökaryotik organizmalarda başlıca membran fosfolipidi olup, PC 'nin biyosentezi CDP-kolin yolu ve metilasyon yolu olmak üzere iki alternatif yoldan gerçekleşir. Ancak bakterilerde bulunan PC 'nin biyosentezi ise metilasyon yolu gerçekleşmektedir. MMPE

ve DMPE, PC biyosentez yolunun ara ürünleridir. Buna göre *Rhodobacter* türlerinde PE 'nin PC 'ye dönüşümü PE-N-metiltransferaz enziminin (*pmt*), metil vericisi olarak kullanılan S-adenosil-L-metiyoninden metil grublarını peşpeşe üç basamakta transfer etmesiyle gerçekleşir. Diğer yandan, *S. meliloti* bakterisinde PC 'nin biyosentezi ökaryotik organizmalarda olduğu gibi iki farklı yoldan gerçekleşir. Üçüncü bir fark ise, iki PG molekülünün bir araya gelmesi ile oluşan CL 'nin *E. coli* 'de sentezlenmesine karşılık, *R. capsulatus* 'da üretilmemesidir



Şekil 2.9. *R. capsulatus* da öngörülen gliserofosfolipid biyosentez yolu. SAM, S-adenosilmetiyonin; SAHC, S-adenosilhomosistein.



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3. 1. Materyal**

##### **3.1.1. Bakteri Soyları ve Plazmitler**

Çalışmada kullanılan bakteri soyları, null mutantlar ve plazmitler Çizelge 3.1 'de gösterildi.

##### **3.1.2. Kimyasallar ve Enzimler**

Miniprep DNA izolasyon (Qiagen, 27106) ve agaroz jel izolasyon (QIAquick gel extraction kit, 28706) kitleri Qiagen 'den, restriksiyon enzimleri ve DNA modifikasyon enzimleri New England Biolab (NEB) 'dan temin edildi. Radyoaktif kimyasallar ([1-<sup>14</sup>C]-asetat ve L-[<sup>14</sup>C(U)]-gliserol-3-fosfat disodium salt (G3P)) ise Perkin Elmer ve NEN™ Life Science Products 'dan alındı. Tüm antibiyotikler Sigma Chemical Co. 'dan, oligonükleotid primerler ve anti-Myc1-9E10 antikorunu Pennsylvania Üniversitesi 'nin Cell Center biriminden temin edildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri soyları, plazmitler ve elde edilen rekombinant plazmit ve null mutantları.

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
<b><i>E. coli</i></b>			
HB101	F <sup>-</sup> , $\Delta(gpt-proA)62$ <i>leuB6 supE44 ara-14 galK2 lacY1</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ <i>rpsL20 (Str<sup>R</sup>) xyl-5 mtl-1 recA13</i>	Str <sup>R</sup> ; r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup>	Sambrook ve ark. (1989)
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 deoR araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Klonlamada konakçı soy	Invitrogen
SM2-1	<i>plsC1 metC162::Tn10 thr-1 ara-14</i> $\Delta(gal-att\lambda)99$ <i>hisG4</i> <i>rpsL136 xyl-5 mtl-1 lacY1 tsx-78 eda-50 rfbD1 thi-1</i>	PlsC <sup>-</sup> , sıcaklığa duyarlı mutant	Coleman (1990)
SJ22	<i>plsB26 plsX50 panD2 zac-220::Tn10 glpD3 glpR2 glpKi</i> <i>relA1 spoT1 pit-10 phoA8 ompF627 fluA22 fadL701</i>	PlsB <sup>-</sup> , G3P oksotrofik mutant	Rock ve Jackowski (1982)
<b><i>R. capsulatus</i></b>			
MT1131 <sup>a</sup>	<i>crtD121 Rif<sup>R</sup></i>	Yaban soy, Nadi <sup>+</sup> , F <sup>+</sup>	Scolnik ve ark. (1980)
MT1131/pOX15 <sup>b</sup>	<i>crtD121 Rif<sup>R</sup>, ccoNOQP</i> diploid soyu	Tet <sup>R</sup> , Nadi <sup>+</sup> , F <sup>+</sup>	Koch ve ark. (1998)
IJ1	Sitokrom <i>cbb<sub>3</sub></i> oksidaz mutanı	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> / MPYE, F <sup>+</sup> / MedA	Koch ve ark. (1998)

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
MR2	Sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> oksidaz mutanı	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Koch ve ark. (1998)
Y262		Gen Transfer Ajan (GTA) partiküllerini fazla miktarla üreten soy	Yen ve ark. (1979)
GK32	$\Delta(ccoNO::kan)$	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>+</sup>	Koch ve ark. (1998)
CW1	$\Delta(ccoGHIS::spe)$	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>+</sup>	Koch ve ark. (2000)
AYG4	Sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> oksidaz mutanı	Tet <sup>R</sup> , Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Aygün (1999)
AYG4-25	pOX15 plazmiti çıkartılmış AYG4 mutanı	Tet <sup>S</sup> , Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Aygün (1999)
SA1	<i>RRC00138::spe</i>	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Bu çalışma
SA2	<i>RRC00136::spe</i>	Nadi <sup>+</sup> , F <sup>+</sup>	Bu çalışma
SA3	$[\Delta(ilvD-ExoD)::spe]$	Nadi <sup>+</sup> , F <sup>+</sup>	Bu çalışma

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
SA4	[ $\Delta(RRC00138)::spe$ ]	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Bu çalışma
SA5	[ $\Delta(RRC00140)::spe$ ]	Nadi <sup>+</sup> , F <sup>+</sup>	Bu çalışma
SA6	[ $\Delta(RRC00139)::spe$ ]	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Bu çalışma
SA8	$\Delta[(RRC00139-RRC00138)::spe]$	Nadi <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> /MPYE, F <sup>+</sup> /MedA	Bu çalışma
<b><i>S. meliloti</i></b>			
Sm 1021		Yaban soy	Weissenmayer ve ark. (2002)
ORLD1	<i>olsA::kan</i>	Kan <sup>R</sup>	Weissenmayer ve ark. (2002)
AAK1	<i>olsB::kan</i>	Kan <sup>R</sup>	Gao ve ark. (2004)

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
<b>Plazmitler</b>			
pRK2013	<i>tra</i> <sup>+</sup> (RK2)	Kan <sup>R</sup> , konjugatif yardımcı plazmit	Ditta ve ark. (1985)
pRK404/ pRK415	RK2	Tet <sup>R</sup> , konakçı sınırı geniş vektör	Ditta ve ark. (1985)
pBR322		Tet <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup> , klonlama vektörü	Sambrook ve ark. (1989)
pHP45Ω	Spektinomisin antibiyotik kaseti ( <i>Ωspe</i> ) pHP45 vektöründe	Spe <sup>R</sup> Str <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Prentki ve Krisch (1984)
pOX15	Sitokrom <i>cbb</i> <sub>3</sub> oksidaz enziminin <i>ccoNOQP</i> yapısal genleri pRK404 vektöründe	Tet <sup>R</sup>	Koch ve ark. (1998)
pMRC	5.6 kbç lik kromozomal <i>EcoRI</i> DNA parçası pLAFR1 vektöründe	Tet <sup>R</sup>	Koch ve ark. (1998)
pMRC2	4.5 kbç lik kromozomal <i>EcoRI</i> DNA parçası pRK415 vektöründe	Tet <sup>R</sup>	Koch ve ark. (1998)
pMRB/pAY1	7 kbç lik kromozomal <i>BamHI</i> DNA parçası pRK404 vektöründe	Tet <sup>R</sup>	Koch ve ark. (1998), Aygün (1999)

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
pMRB4	1.5 kbç lik kromozomal <i>EcoRI</i> DNA parçası pRK415 vektöründe	Tet <sup>R</sup>	Koch ve ark. (1998)
pSEM1	pMRC2 plazmitin <i>BamHI</i> enzimi ile kesilmesi ve uçların birleşmesi (1200 bç lik delesyon)	Tet <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM2	pSEM1 plazmiti üzerindeki <i>RRC00136</i> genine özgü <i>XhoI</i> dizisinden <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM3	pSEM1 plazmiti üzerindeki <i>ilvD-ExoD</i> genlerindeki 1365 bç lik <i>BstEII</i> DNA parçasının çıkarılıp, <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM4	pMRC plazmiti üzerindeki <i>RRC00138</i> genine özgü <i>BamHI</i> enzim dizisinden, <i>spe</i> kasetini içeren 2.0 kbç lik DNA parçasının klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM5	pMRC plazmit üzerindeki 5.3 kbç lik <i>EcoRV-HindIII</i> DNA parçasının, pBR322 vektörüne aynı enzim dizilerinden klonlanması	Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM6	pSEM5 plazmitindeki <i>RRC00140</i> genine ait 19 bç lik <i>HpaI</i> DNA parçasının çıkarılıp, yerine <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Spe <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM7	pSEM6 plazmitindeki 2.6 kbç lik <i>PstI</i> DNA parçasının pRK415 vektörüne <i>PstI</i> enzim dizisinden klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
pSEM8	pSEM5 plazmitindeki <i>RRC00139</i> genine ait 313 bç lik <i>RsrII</i> DNA parçasının çıkarılıp, yerine <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Spe <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM9	pSEM8 plazmitindeki 2.7 kbç lik <i>XhoI-Bsu36I</i> DNA parçasının, <i>BamHI</i> restriksiyon enzim dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM10	pSEM5 plazmitindeki <i>RRC00138</i> genine ait 522 bç lik <i>BstXI-NotI</i> DNA parçasının çıkarılıp, yerine <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM11	pSEM10 plazmitindeki 5.3 kbç lik <i>EcoRV-EcoRI</i> DNA parçasının, <i>BamHI</i> restriksiyon enzim dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM12	pSEM5 plazmitinde <i>RRC00138-RRC00139</i> genlerini içeren 2.0 kbç lik <i>MluI</i> DNA parçasının çıkarılıp, yerine <i>spe</i> kasetini taşıyan 2.0 kbç lik <i>SmaI</i> DNA parçasının yerleştirilmesi	Spe <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM13	pSEM12 plazmitindeki 5.0 kbç lik <i>EcoRV-Bsu36I</i> DNA parçasının, <i>BamHI</i> restriksiyon enzim dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma

Çizelge 3.1 (Devam)

Soy	Genotip	Fenotip <sup>c</sup>	Kaynak
pSEM16	pSEM10 plazmitindeki 5.6 kb'lık <i>EcoRV-HpaI</i> DNA parçasının, <i>BamHI</i> restriksiyon enzim dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Spe <sup>R</sup>	Bu çalışma
pBAD/ <i>Myc</i> -HisA		Amf <sup>R</sup> , P <sub>BAD</sub> promotörü kontrolünde arabinoz ile indüklenen dozaja bağlı vektör	Invitrogen
pSEM17	<i>RRC00138</i> genini içeren 828 bp'lık PZR ürününün <i>NcoI-EcoRI</i> dizilerinden pBAD/ <i>Myc</i> -HisA vektörüne klonlanması	Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM18	pSEM17 plazmitinin <i>NsiI</i> restriksiyon enzim dizisinin, <i>PstI</i> restriksiyon dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM19	<i>RRC00139</i> genini içeren 777 bp'lık PZR ürününün <i>NcoI-ScaI</i> dizilerinden pBAD/ <i>Myc</i> -HisA vektörüne klonlanması	Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pSEM20	pSEM19 plazmitinin <i>NsiI</i> dizisinin, <i>PstI</i> restriksiyon dizisinden pRK415 vektörüne klonlanması	Tet <sup>R</sup> Amf <sup>R</sup>	Bu çalışma
pBW51	<i>S. meliloti</i> <i>olsA</i> geni	Tet <sup>R</sup>	Weissenmayer ve ark. (2002)



Çizelge 3.1 (Devam)

<b>Soy</b>	<b>Genotip</b>	<b>Fenotip<sup>c</sup></b>	<b>Kaynak</b>
pJG21	<i>S. meliloti</i> <i>olsB</i> geni	Tet <sup>R</sup>	Gao ve ark. (2004)

*R. capsulatus* <sup>a</sup>MT1131, üreme özellikleri ve *c*-tipi sitokrom profilleri nedeniyle yaban soy olarak tanımlanmıştır. Y262 ve AYG4 soyları dışında diğer tüm *R. capsulatus* soyları MT1131 soyu türevidir. <sup>b</sup>MT1131/pOX15, yaban soya (MT1131) kıyasla beş kat daha fazla sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enzimini üretir (Koch ve ark., 1998). <sup>c</sup>F, fotosentetik üremeyi; Nadi, sitokrom *c* oksidaz aktivitesine bağlı  $\alpha$ -naftol 'ün indofenol mavisine dönüşüm reaksiyonunu; Amf<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>, Spe<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup> ve Tet<sup>R</sup> sırasıyla amfisilin, kanamisin, rifampisin, spektinomisin, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençliliği; Tet<sup>S</sup>, tetrasikline duyarlılığı; tra<sup>+</sup>, transfer genlerinin varlığını gösterir.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Bakteri Soylarının Üreme Koşulları

*R. capsulatus* soyları fotosentetik ve aerobik üreme koşullarında zenginleştirilmiş besi ortamında (MPYE) (Daldal ve ark., 1986) ya da karbon kaynağı olarak süksinat içeren minimal besi ortamında (MedA) (Sistrom, 1960) (Ek-1) üretildi. Gerekliğinde antibiyotikler belirli konsantrasyonlarda (tetrasiklin, 2.5 µg/ml; kanamisin, 10 µg/ml; spektinomisin, 10 µg/ml) (Jenney ve Daldal, 1993) besi ortamına ilave edildi. Bakteriler karanlıkta aerobik koşullar altında 35 ya da 25°C 'de petri kabında 2-3 gün veya çalkalayıcı inkübatörde (150-200 devir/dakika) sıvı kültürde 18-24 saat süreyle üretildi. Fotosentetik koşullarda ise bakteriler, 35 ya da 25°C sıcaklıkta ışık varlığında (tungsten lambası, 60W) petri kabında hidrojen ve karbondioksit üreten gaz paketleri (BBL Microbiology systems, Cockeysville, MD) ile üç gün süreyle inkübe edildi.

*E. coli* konakçı soyları ve plazmit içeren hücre soyları aerobik üreme koşullarında zengin Luria-Bertani (LB) besi ortamında (Miller, 1972) (Ek-1) gerektiğinde uygun antibiyotikler (50 µg/ml kanamisin, 12.5 µg/ml tetrasiklin, 100 µg/ml amfisilin, 50 µg/ml spektinomisin) ilave edilerek üretildi. *E. coli* soyları petri kabında veya sıvı kültürde yüksek devirli çalkalayıcı inkübatörde 37°C 'de yaklaşık 16 saat süreyle inkübe edildi (Sambrook ve ark., 1989). *E. coli* 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferaz (AGPAT) mutantları (*plsC*(Ts), Coleman, 1990) LB besi ortamında 28°C sıcaklıkta; *sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferaz (GPAT) (PlsB-G3P oksotrofik, Rock ve Jackowski, 1982) mutantı ise G3P içeren minimal besi yerinde (MedE) (Ek-1) (Miller, 1972) 37°C sıcaklıkta üretildi.

#### 3.2.2. Standart DNA Manipulasyonları

5-10 ml 'lik *E. coli* kültürlerinden plazmit DNA izolasyonu QIAprep® Spin Miniprep kiti kullanılarak yapıldı. Restriksiyon enzim kesimleri, klonlama, transformasyon ve agaroz jel elektroforezi gibi moleküler genetik teknikler standart

protokollerden (Sambrook ve ark., 1989) yararlanılarak gerçekleştirildi. Restriksiyon endonükleazlarla kesim sonunda elde edilen DNA parçalarının agaroz jelden izolasyonu QIAquick gel extraction kit kullanılarak yapıldı. Gerektiğinde yapışkan DNA uçları (örneğin, plazmit DNA 'sının *Bam*HI veya *Eco*RI gibi restriksiyon endonükleazlar ile kesimi), Klenow fragmenti ve deoksiniükleozit trifosfat (dNTP) (Amersham) karışımı ile 37°C 'de 1 saat ve 75°C 'de 10 dakika 'lık inkübasyonlar sonunda küt uç haline getirildi. Klonlama da, vektör/insört oranı 1:1, 1:2 ya da 1:3 olacak şekilde DNA uçları T4 DNA ligaz enzimi aracılığında 4°C 'de 16 saatlik inkübasyon ile birleştirildi. Klonlama ürünleri ve plazmit DNA 'ları kompatent *E. coli* soylarına (HB101, TOP10, SM2-1 veya SJ22) elektrotransformasyon (MicroPulser™, Biorad) yöntemiyle aktarıldı. DNA dizilerinin amplifikasyonu *Pfu* DNA polimeraz enziminin (Stratagene) varlığında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılarak (GeneAmp 9600, Perkin Elmer Cetus) gerçekleştirildi.

### 3.2.3. DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Analizler

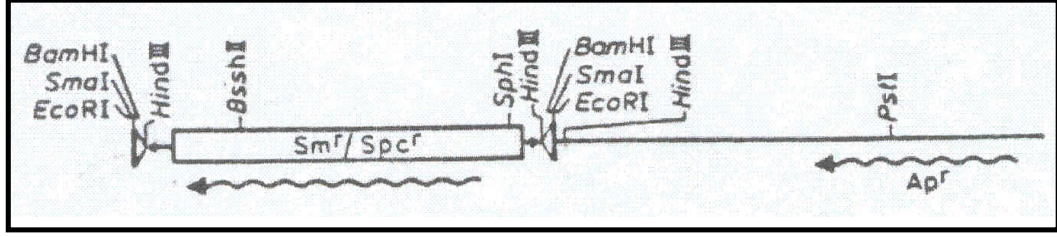
Otomatik DNA dizi analizleri, Big-dye terminator cycle sequencing kit (AmpliTaQ FS', Applied Biosystems) ve oligonükleotidler kullanılarak Pennsylvania Üniversitesi 'nin Dizi Analiz biriminde yaptırılmıştır. Elde edilen DNA dizilerindeki restriksiyon endonükleaz kesim noktalarının belirlenmesinde MacVector™ 7.2.3 programından (IBI, Kodak) yararlanıldı. Homoloji araştırmalarında BLAST2 (tblastn) programı (Altschul ve ark., 1990) ve amino asit dizi karşılaştırmalarında ise CLUSTALW programı (Thompson ve ark., 1994) kullanıldı.

### 3.2.4. Gen İnaktivasyonu (İnterpozon Mutagenesi)



MR2, IJ1 ve AYG4 mutantlarının Nadi fenotipinden sorumlu dokuz protein kodlayıcı bölge (ORF) içeren 5.6 kbç 'lik pMRC insörtünün restriksiyon enzim haritası MacVector™ 7.2.3 programı kullanılarak elde edildi. Böylece kromozomal DNA parçası üzerinde yer alan ORF 'leri bir ya da birden fazla noktadan kesen ve hiç kesmeyen restriksiyon endonükleaz enzimleri belirlendi. Daha sonra 'Knock-out' yönteminden (interpozon mutagenesi) yararlanılarak, insört üzerinde yer alan genlerin

fonksiyonları tamamen elimine edildi. Bunun için, pHP45omega plazmitindeki (Prentki ve Krisch, 1984) spektinomisin antibiyotik direnç (*spe*) kaseti (Şekil 3.1) insört üzerindeki genlere yerleştirilerek delesyon-insersiyon allel inaktivasyonu ile gen etkisiz hale getirildi.

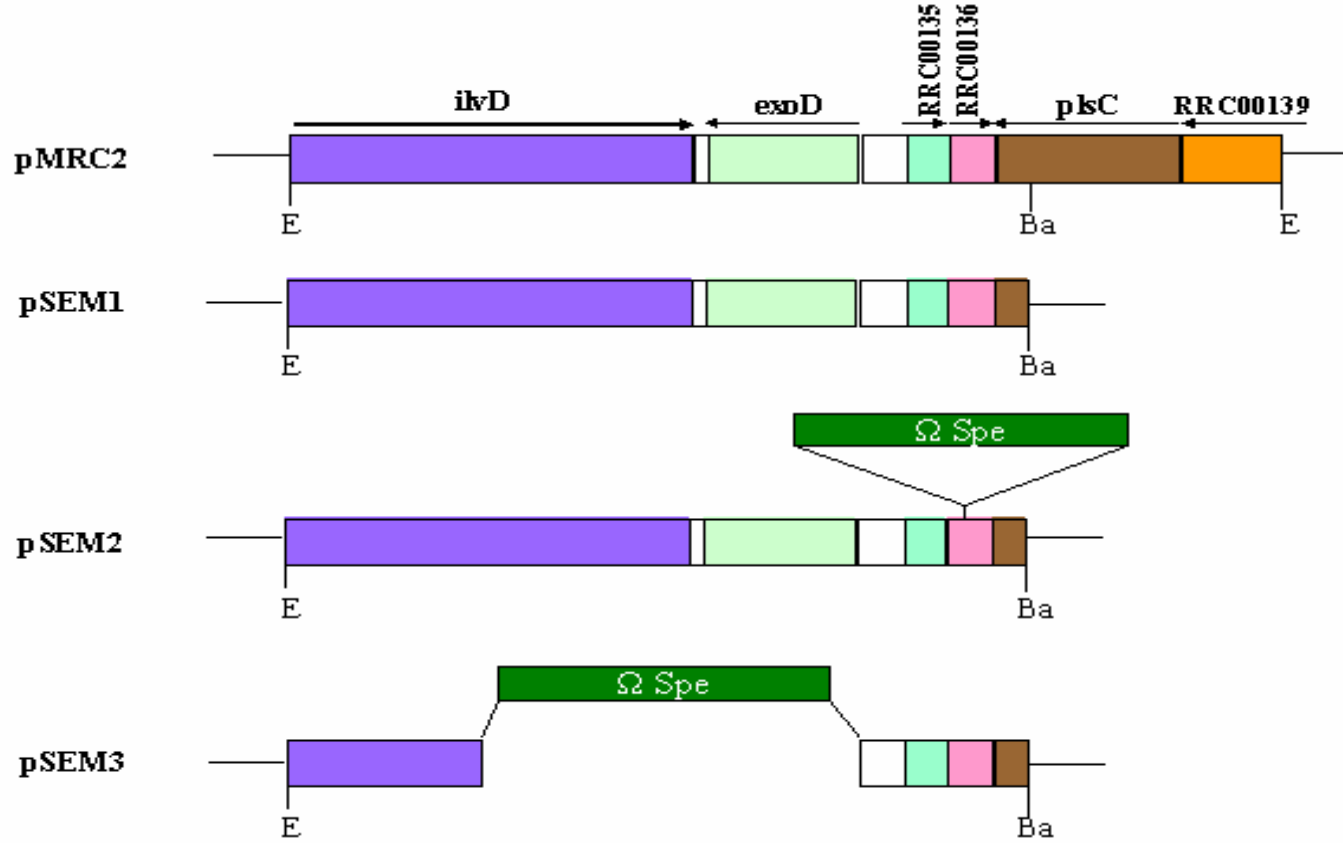
pMRC2 plazmit (Şekil 3.2) DNA 'sı, klonu iki noktadan kesen *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutuldu ve 13.8 ve 1.3 kbç 'lik kesim ürünleri elde edildi. 13.8 kbç 'lik DNA parçası agaroz jelden izole edilerek, DNA fragmentleri ligaz enzimi ile birleştirildi. Elde edilen pSEM1 plazmiti (Şekil 3.2) üzerinde yer alan ORF lerin bir kısmı delesyon-insersiyon allel inaktivasyonu ile inaktive edildi. Buna göre, *RRC00136* geninin insersiyonel mutagenezi için; pSEM1 plazmit DNA 'sı üzerinde taşıdığı 215 bç uzunluğundaki *RRC00136* genini tek noktadan kesen *Xho*I restriksiyon enzimi ile kesildi. Linear hale getirilen pSEM1 plazmit DNA 'sı daha sonra küt uç haline getirildi. Diğer yandan, pHP45omega plazmiti *Sma*I ve *Pst*I enzimleri ile kesildi ve elde edilen 2 kbç 'lik *spe* kasetini içeren *Sma*I-*Sma*I DNA parçası jelden izole edildi. Küt uç *Sma*I restriksiyon enzim dizilerine sahip *spe* kasetini taşıyan DNA parçası ile pSEM1 plazmit DNA sı birleştirildi ve pSEM2 plazmiti (*RRC00136::spe*) elde edildi (Şekil 3.2). *RRC00132* ve *RRC00133* genlerinin birlikte delesyonu için, pSEM1 plazmit DNA 'sı, *Bst*EII restriksiyon enzimi ile kesilerek, 12.5 ve 1.3 kbç 'lik kesim ürünleri elde edildi. 12.5 kbç 'lik DNA parçası agaroz jelden izole edildi ve küt uç haline getirildi. Daha sonra *Sma*I restriksiyon enzim dizilerine sahip 2 kbç 'lik *spe* kaseti ile birleştirilerek pSEM3 [ $\Delta$ (*RRC00132-RRC00133::spe*)] plazmiti elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. pHP45 omega plazmit haritası (Prentki ve Krisch, 1984).

Sm, streptomisin; Spc, spektinomisin ve Ap, amfisilin antibiyotik direnç genini; (  ) transkripsiyon yönünü; (  ) ise translasyon ve sonlanma sinyallerini gösterir.

pMRC plazmit DNA 'sı *EcoRV* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek 5.3 kbç 'lik DNA parçası aynı enzim dizileri ile kesilmiş 4.3 kbç 'lik alt klonlamalara elverişli olan pBR322 vektörüne (Sambrook ve ark., 1989) klonlandı ve pSEM5 plazmiti elde edildi. Daha sonra pSEM5 plazmitinin üzerinde yer alan ORF 'ler inaktive edildi. Buna göre, *RRC00140* geninin delesyonu için, pSEM5 plazmit DNA 'sı, geni iki noktadan kesen *HpaI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonunda *RRC00140* geninden çıkan 19 bç 'lik DNA parçasının yerine *SmaI* enzimi ile kesilmiş 2 kbç 'lik *spe* kaseti yerleştirildi. Elde edilen klon pSEM6 [ $\Delta(RRC00140::spe)$ ] olarak isimlendirildi. *RRC00139* geninin delesyonu için, pSEM5 plazmit DNA 'sı, *RRC00139* genini iki noktadan kesen *RsrII* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonunda *RRC00139* 'dan çıkan 313 bç 'lik DNA parçasının yerine *SmaI* enzimi ile kesilmiş 2 kbç 'lik *spe* kaseti yerleştirildi. Elde edilen klon pSEM8 [ $\Delta[RRC00139::spe]$ ] olarak isimlendirildi. *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin birlikte delesyonu için; pSEM5 plazmit DNA sı, üzerinde yer alan *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin ikisini de kesen *MluI* restriksiyon enzimi ile kesimle tabi tutuldu. Elde edilen 7.5 ve 2 kbç 'lik kesim ürünlerinden 7.5 kbç 'lik DNA parçası agaroz jelden izole edildi. Uçlar küt uç haline getirildikten sonra 2 kbç 'lik *SmaI* dizisine sahip *spe* kaseti ile birleştirilerek pSEM12 plazmiti [ $\Delta[RRC00138-RRC00139::spe]$ ] elde edildi.



Şekil 3.2. pMRC2 türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.

Plazmit üzerinde yer alan ORF lerin transkripsiyon yönleri oklarla;  $\Omega$ -spe kaseti, çapraz çizgili kutu ve restriksiyon endonükleazlar (BamHI ve EcoRI) ise Ba ve E şeklinde gösterilmiştir.

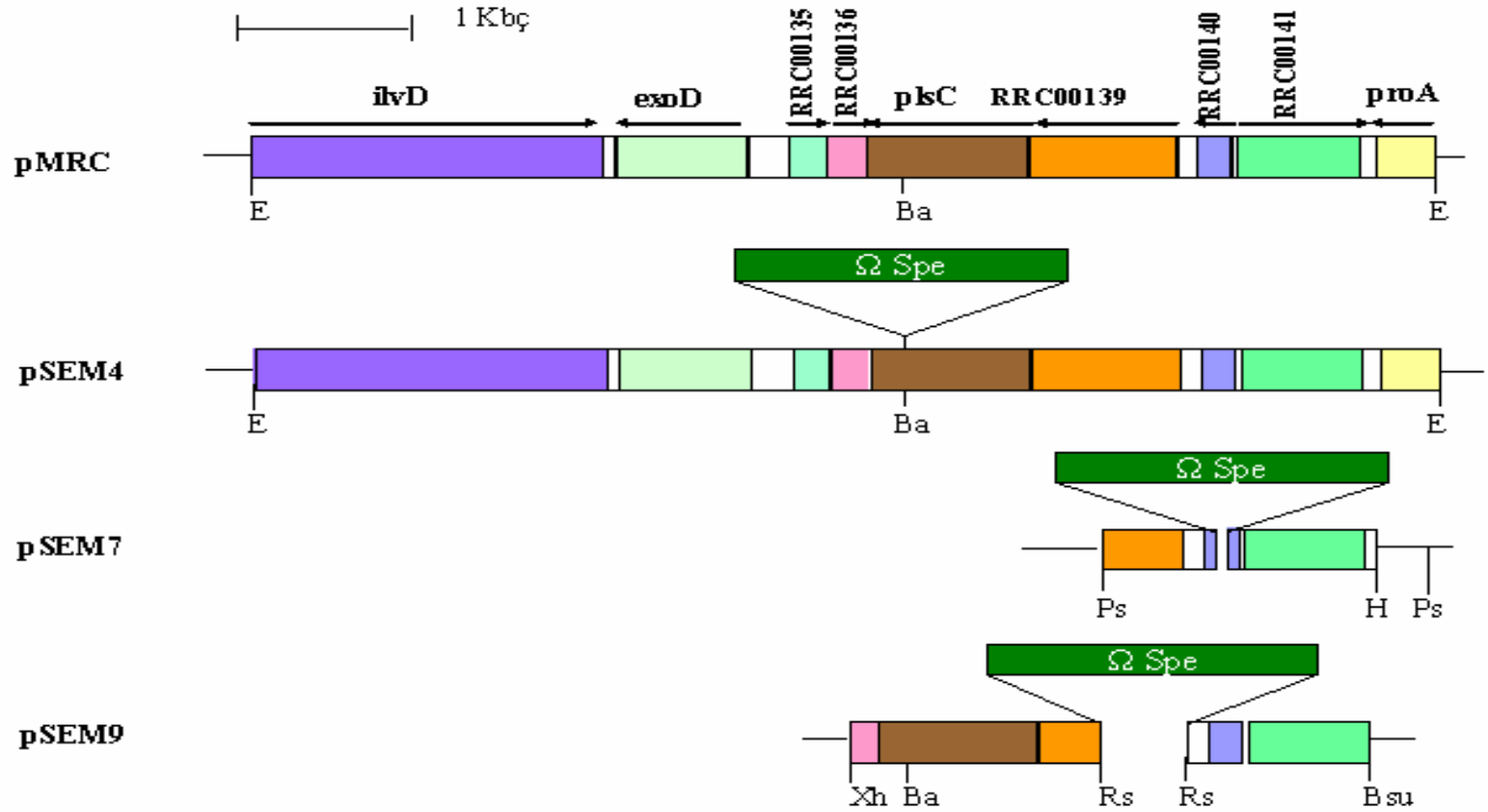
*RRC00138* geninin insersiyonu için, pMRC plazmit DNA 'sı *RRC00138* genini tek noktadan kesen *Bam*HI enzimi ile kesildi. Linear hale getirilen pMRC plazmit DNA 'sı, *Bam*HI enzimi ile kesilmiş 2 kbç 'lik *spe* kasetini veren diziler ile birleştirilerek pSEM4 plazmiti (*RRC00138::spe*) elde edildi (Şekil 3.3). *RRC00138* geninin delesyonu için ise, pSEM5 plazmiti DNA 'sı, *RRC00138* genini kesen *Bst*XI ve *Not*I enzimleri ile kesildi ve 9.1 ve 0.5 kbç 'lik DNA parçaları elde edildi. Agaroz jelden izole edilen 9.1 kbç 'lik DNA parçası küt uç haline getirildi ve *Sma*I dizilerine sahip 2 kbç 'lik *spe* kaseti ile birleştirildi. Elde edilen klon pSEM10 [ $\Delta$ (*RRC00138::spe*)] olarak isimlendirildi.

Elde edilen pSEM2, pSEM3, pSEM4, pSEM6, pSEM8 ve pSEM12 plazmitleri restriksiyon enzim kesimleri ve üzerinde taşıdıkları gen(ler)e özgü primerler kullanılarak dizi analizi ile doğrulandı.

pSEM5 plazmiti pBR322 vektör türevidir olduğundan, pSEM5 plazmiti üzerinde yer alan inaktif genleri *R. capsulatus* bakterisine aktarabilmek için, bu genleri taşıyan DNA fragmentleri konjugatif özellikteki RK2 türevidir pRK415 vektörüne klonlandılar. Buna göre, *Pst*I enzimi ile kesilerek pSEM6 plazmit DNA 'sından elde edilen 2627 bç 'lik DNA parçası, *Pst*I enzimi kesilerek linear hale getirilmiş 10.6 kbç 'lik pRK415 vektörüne klonlandı ve pSEM7 plazmiti [ $\Delta$ (*RRC00140::spe*)] elde edildi (Şekil 3.3). Diğer yandan, pSEM8 plazmit DNA 'sının *Xho*I ve *Bsu*36I enzimleri ile kesildi ve elde edilen DNA parçası küt uç haline getirildi ve *Bam*HI enzimi ile kesilmiş ve devamında küt uç hale getirilmiş pRK415 vektörüne klonlandı. Elde edilen yeni klon pSEM9 [ $\Delta$ (*RRC00139::spe*)] olarak isimlendirildi (Şekil 3.3). Yine, pSEM10 plazmit DNA 'sı *Eco*RV-*Eco*RI enzimleri ile kesilerek elde edilen 5321 bç 'lik DNA parçası jelden izole edildi ve küt uç hale getirildi. Daha sonra *Bam*HI enzimi ile kesilmiş ve küt uç haline getirilmiş pRK415 vektör DNA 'sı ile birleştirilerek pSEM11 plazmiti [ $\Delta$ (*RRC00138::spe*)] elde edildi (Şekil 3.4). pSEM10 plazmit DNA 'sı *Eco*RI-*Hpa*I enzimleri ile kesildi ve elde edilen 5321 bç 'lik DNA parçası jelden izole edilerek devamında küt uç haline getirildi. Daha sonra *Bam*HI enzimi ile kesilmiş ve küt uç haline getirilmiş pRK415 vektör DNA 'sı ile birleştirildi ve elde edilen yeni klon pSEM16 [ $\Delta$ (*RRC00138::spe*)] olarak isimlendirildi (Şekil 3.4). pSEM12 plazmit DNA

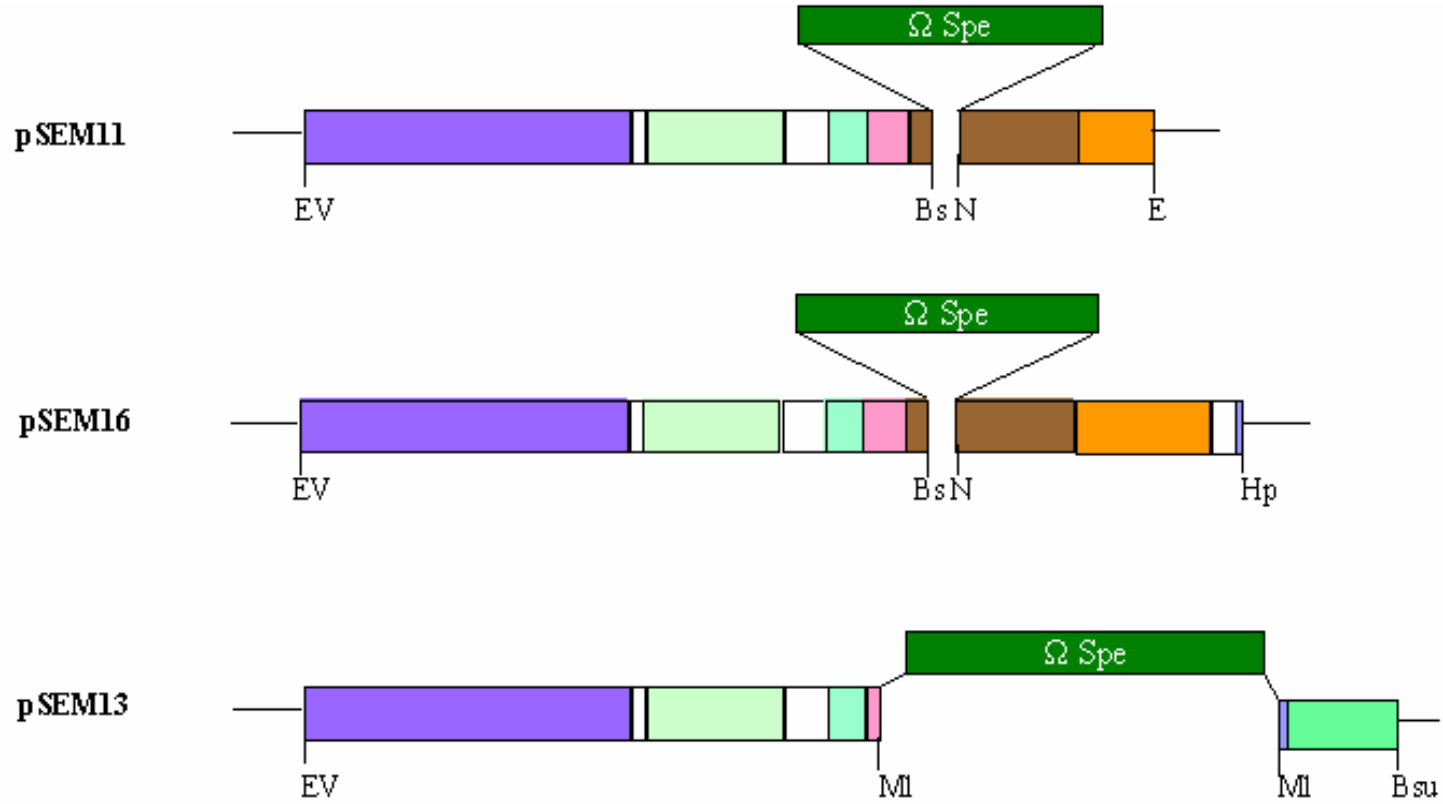
sının ise *EcoRV* ve *Bsu36I* enzimleri ile kesilmesiyle elde edilen 4.9 kbç lik kesim ürünü jelden izole edildi ve uçlar küt uç hale getirildi. *BamHI* enzimi ile kesilerek linear hale getirilen ve devamında uçları küt uç haline getirilen pRK415 vektör DNA 'sı ile birleştirilerek pSEM13 [ $\Delta(RRC00138-RRC00139)::spe$ ] olarak isimlendirilen yeni bir klon elde edildi (Şekil 3.4).





Şekil 3.3. pMRC türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.

Plazmit üzerinde yer alan ORF lerin transkripsiyon yönleri oklarla;  $\Omega$ -spe kaseti, çapraz çizgili kutu ve restriksiyon endonükleazlar (*Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Rsr*II ve *Xho*I) ise Ba, E, Ps, Rs ve Xh şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 3.4. pSEM5 türevi plazmitlerin fiziksel ve genetik haritası.

Plazmit üzerinde yer alan ORF lerin transkripsiyon yönleri oklarla;  $\Omega$ -spe kaseti, çapraz çizgili kutu ve restriksiyon endonükleazlar (*Bst*XI, *Bsu*36I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Mlu*I ve *Not*I) ise Bs, Bsu, E, EV, Ml ve N şeklinde gösterilmiştir

### 3.2.5. Konjugasyon (Üçlü Eşleşme)

RK2 türevi pRK415 plazmiti üzerinde yer alan genler, pRK2013 yardımcı plazmit (Ditta ve ark., 1985) aracılığında üçlü eşleşme (konjugasyon) yöntemiyle *R. capsulatus* mutant soylarına aktarıldı. Bunun için, *R. capsulatus* soylarının 10 ml 'lik MedA sıvı besiyerinde; yardımcı veya verici plazmit içeren hücreler ise uygun antibiyotik içeren 5 'er ml sıvı LB besiyerlerindeki kültürleri hazırlandı. *R. capsulatus* soylarının 630 nm, *E. coli* soylarının ise 600 nm dalga boyundaki hücre yoğunlukları ölçüldü. Daha sonra *R. capsulatus* ve *E. coli* soylarına ait hücreler santifüjle çöktürüldü (oda sıcaklığı, 2500xg, 10 dakika) ve antibiyotikten arındırılmak için hücreler üç kez sıvı MedA içerisinde süspanse edildi. *R. capsulatus*:  $OD_{630nm}=1$  'de  $7.5 \times 10^8$  hücre/ml ve *E. coli*:  $OD_{600nm}=1$  'de  $5.0 \times 10^8$  hücre/ml formülünden yararlanılarak hücreler MedA besiyerinde süspanse edildi. Alıcı *R. capsulatus* hücrelerin, verici *E. coli* hücrelerine oranı 1/5 olacak şekilde MedA petri kabının ortasına 100 µl alıcı hücreler, diğer iki yanına da 20 'şer µl yardımcı ve verici hücreler konuldu. Hücreler petri kabının ortasında cam çubuğun köşesi ile iyice karıştırılarak 35°C sıcaklıkta gece boyu üremeye bırakıldı. Daha sonra hücreler üzerine 1 ml sıvı MedA eklenerek, hücreler cam çubuk yardımıyla petri kabının kenarına toplatıldı ve eppendorf tüplerine aktarıldı. Hücreler santrifüjle çöktürülerek üç kez MedA ile yıkandı ve en son aşamada hücreler 400 µl MedA 'de süspanse edildi. Hücre süspanسیونları, aktarılan verici plazmitin taşıdığı antibiyotik markırına bağlı olarak uygun antibiyotik içeren seçici MedA-agar petri kaplarına 5, 10 ve 50 'şer µl olacak şekilde yayıldı. Hücreler 3-4 gün süreyle 35°C 'lik inkübatörde üremeye bırakıldı.

### 3.2.6. Null ('Knock-out') Mutantların Eldesi

Kromozomal (knock-out veya null) mutantların eldesi, *R. capsulatus* bakterisine özgü Gen Transfer Ajanı (GTA) aracılığında homolog rekombinasyon yoluyla (Yen ve ark., 1979) gerçekleştirildi. GTA, kültür içinde diğer hücelere genetik bilgi aktaran bir vektör olarak iş görmekte olup, transdüksiyona benzeyen bir genetik aktarım gerçekleştirir. Buna göre, rasgele üretilen hücre genomunun yaklaşık 4.5 kbç 'lik DNA parçası homolog rekombinasyon yolu ile alıcı bakteriye aktarılır.

Delesyon-insersiyon alleli taşıyan plazmitler (pSEM2, pSEM3, pSEM4, pSEM7, pSEM9, pSEM11, pSEM13 ve pSEM16; bkz. Bölüm 3.2.4) *R. capsulatus* bakterisinin GTA 'yı fazla miktarda üreten Y262 soyuna konjugasyon yöntemi ile aktarıldı. Transkonjugantlar, plazmitlerin taşıdığı spektinomisin (Spe) antibiyotik kasetinden dolayı MedA+Spe besi yerinde seçildiler. Daha sonra 50 transkonjugant, iki farklı MedA+Spe petri kabına kısa çizgiler halinde çizilerek 35°C 'de bir gün süreyle inkübe edildi. GTA ek vitaminlere gereksinim duyduğundan, bu aşamadan sonra zenginleştirilmiş besi yeri (MPYE) kullanıldı. Hücrelerin üzerine 1-2 ml sıvı MPYE besiyeri konularak, hücreler petri kabından toplandı ve santrifüjle çöktürüldü. Hücreler iki kez 1 ml MPYE besi yerinde süspansiyon edilip, santrifüjle çöktürüldü. En son aşamada hücreler 1 ml MPYE 'de süspansiyon edilip ağzı sıkı kapanan 14 ml 'lik cam tüplerine aktarıldı ve bir gün süreyle 35°C 'de anaerobik fotosentetik şartlarda üretildiler. Ertesi gün, tüp ağzına kadar MPYE besi yeri ile doldurularak hücreler lizis aşamasına gelinceye kadar (3-5 gün) fotosentetik şartlarda üretilmeye devam edildi. GTA partiküllerini taşıyan transkonjugantlar lizis aşamasına ulaştıktan sonra 3-5 dakika süreyle santrifüjle çöktürüldü (800xg). Üst fazdan yaklaşık 3-4 ml alınarak önce 0.45 µm daha sonra da 0.2 µm 'lik filterdan geçirildi. Diğer yandan çaprazlamadan bir gün önce hazırlanan alıcı yaban soyunun (MT1131) 10 ml 'lik MPYE sıvı kültürü de santrifüjle çöktürüldü (2.500xg, 10 dakika). Hücreler daha sonra üç kez 3 ml GTA tamponu [10 mM Tris-HCl (pH:7.8), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl ve 500 µg/ml BSA (Sigma fraction V)] ile yıkanarak santrifüj ile çöktürüldü. En son aşamada da hücreler 1 ml GTA tamponunda süspansiyon edilerek çaprazlamada kullanılmaya hazır hale getirildi. GTA çaprazlama; 100 µl alıcı, 100 µl GTA ve 100 µl GTA tampon çözeltisi içeren 4.5 ml 'lik kültür tüplerinde gerçekleştirildi. Kontrol olarak, sadece GTA ve GTA tamponu veya sadece alıcı soy ve GTA tamponu içeren çaprazlama tüpleri de hazırlandı. Tüpler önce 37°C 'de 10 dakika, daha sonra da 35°C 'de 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, tüplere 3 ml %0.7 'lik agar içeren MPYE eklenerek, transdüktantlar MPYE+Spe petri kaplarına döküldü. Petriler 3-4 gün süreyle 35°C 'de inkübe edildi. Elde edilen null mutantlar MPYE+Spe içeren petrilere çizildi ve Nadi reaksiyonunu katalizleyebilme yetenekleri test edildi.

### 3.2.7. Sitokrom *c* Oksidaz Aktivite Testi (Nadi Reaksiyonu)

Knock-out mutantların ve inaktif genleri taşıyan plazmitlerin mutantları tamamlama yetenekleri Nadi reaksiyonu ile test edildi. Bunun için, sitokrom *c* oksidaza özel elektron vericisi olan DMPD (*N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin) (Sigma, D-5004) ve  $\alpha$ -Naftol (Sigma, N-1000) kullanımıyla reaksiyon ( $\text{DMPD} + \alpha\text{-Naftol} + \text{O}_2 \rightarrow \text{indofenol mavisi} + \text{H}_2\text{O}$ ) gerçekleştirildi (Keilin, 1966). 0.1 gr  $\alpha$ -Naftol, 10 ml etanol içerisinde (35 mM); 0.1 gr DMPD de 10 ml suda (30 mM) çözülerek 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı ve aerobik koşullarda büyümüş bakterilerin üzerine döküldü. Aktif sitokrom *c* oksidaz enzimine sahip koloniler 30 sn içinde mavi renge dönüşürken ( $\text{Nadi}^+$ ), oksidaz aktivitesinden yoksun koloniler ise Nadi boyası ile reaksiyon vermezler ( $\text{Nadi}^-$ ). Nadi reaksiyonu sadece sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enziminin sitokrom *c*<sub>o</sub> ve sitokrom *c*<sub>p</sub> proteinlerine gereksinim duyduğundan, sitokrom *c*<sub>1</sub>, sitokrom *c*<sub>y</sub> veya sitokrom *c*<sub>2</sub> 'nin eksikliği Nadi reaksiyonunu etkilemez.

### 3.2.8. İntrasitoplazmik Membran Vesiküllerinin (Kromotofor Membran) Eldesi

İç-dış membran vesikülleri (intrasitoplazmik membran vesikülleri ya da kromotofor) yüksek basınç altında hücrelerin parçalanması ile izole edildi (Gray ve ark., 1994). Bunun için, öncelikle *R. capsulatus* 'un yaban soy (MT1131) ve knock-out mutantlarının 1 'er litrelik MPYE veya MedA sıvı besiyerlerinde 35° veya 25°C sıcaklıkta aerobik (ve MedA besi yerinde 35° C de fotosentetik) koşullardaki kültürleri hazırlandı. Hücreler logaritmik üreme fazına ( $\text{OD}_{630} \sim 0.6$ ) ulaştıklarında santrifüje çöktürüldü (2500xg, 4°C, 30 dakika). Daha sonra hücreler MOPS (morpholine propanesulfonic acid) tamponu (50 mM MOPS, pH:8 /1 mM KCl) ile iki kez yıkanarak üst sıvılar tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml MOPS tamponu ile buzda süspanse edildi ve 1 mM PMSF, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 mg/ml RNAz ve 0.05 mg/ml DNAz ilave edildi. Hücreler 18,000 psi 'lik yüksek basınçta (French pressure cell press, SLM Aminco) iki kez parçalandı ve hücrelere 10 mM EDTA (pH.8) ilave edildi. Parçalanmamış hücreleri ve büyük membran parçalarını elimine etmek için hücreler 25.000xg 'de 4°C 'de 45 dakika süreyle çöktürüldü (Beckmann J2-21). Tüpteki üst sıvı bir pipetle alınarak ultrasantrifüj tüpüne aktarıldı ve 4°C 'de 2 saat süreyle (150.000xg,

Sorvall Ultracentrifuge, Beckmann L8-70M) çöktürüldü. Oluşan üst sıvı, suda çözünen *c*-tipi sitokromları; pellet ise kromatofor membranlarını içerir. Kromatofor membran eldesi için pelet 10 ml MOPS/KCl içerisinde çözülerek bir kere daha ultrasantrifüjle çöktürüldü (150.000xg, 4°C, 1 saat). Böylece oluşan pelletin üst sıvısı tamamen uzaklaştırılarak, oluşan pelet 200-500 µl MOPS/KCl içerisinde çözüldü ve kullanıncaya kadar -85°C 'de saklandı. Çözünür formdaki proteinleri membran parçacıklarından ayırmak için üst sıvı 150.000xg 'da 4-8 saat süreyle çöktürüldü. Daha sonra üst sıvı kolondan (YM-10, Milipore) geçirilerek konsantre edildi ve -85°C 'de saklandı. Protein konsantrasyonu, standart olarak sığır serum albumü (BSA) kullanılarak Lowry metoduna (Lowry ve ark., 1951) göre belirlendi.

### 3.2.9. Hem Boyama ile C-Tipi Sitokromların Analizi

Membrana bağlı ya da çözünür formdaki sitokrom *c* proteinlerini gözlemek için öncelikle, 100 µg kromatofor membranı ya da çözünür fraksiyon 1:1 oranında 1X SDS-jel yükleme boyası (75 mM Tris (pH.7), %6 SDS, %15 gliserol (w/v), %0.025 bromofenol mavisi ve %3 β-merkaptolanol) ile karıştırıldı ve 37°C 'de 10 dakika süreyle ısıtılarak proteinler denatüre edildi. Daha sonra 28-32 kDa moleküler ağırlığı arasındaki *c*-tipi sitokromları iyi ayırabilmek için, proteinler %16.5 akrilamid ve %3 kross-linker içeren Trisin-SDS-PAGE (Schägger ve von Jagow, 1987) (Ek-2) 'de ayrıştırıldı. Protein bandların iyi ayrılması için kullanılan büyük jel sisteminde (Bio-Rad) örnekler kuyudan çıkıncaya kadar 30V 'da yaklaşık 30-40 dakika daha sonra da 90V 'da 16-20 saat süreyle yürütüldüler.

Proteinler Trisin-SDS-PAGE 'de yürütüldükten sonra, sülfhidril grubu içeren β-merkaptolanol ün jelden uzaklaştırılması için, jel 1 saat süre ile 4-5 kez değiştirilmek suretiyle ön yıkama solüsyonunda [0.25M Sodyum Asetat (pH:5/Asetik asit)] inkübe edildi. Daha sonra membrana bağlı veya çözünür formdaki *c*-tip sitokromlar, kovalent olarak bağlı hem gruplarının endojenik peroksidaz aktivitelerine sahip olmaları özelliğiyle 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMBZ) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Thomas ve ark., 1976) kullanarak gözlendi. Buna göre jel, 40 ml TMBZ boyası [(3:7) 6.3 mM TMBZ:0.25M Sodyum asetat (pH:5/Asetik asit)] içerisinde karanlık bir ortamda 1 saat

süreyle inkübe edildi. 18 mg TMBZ (Aldrich Chemical Co., 86,033-6) 12 ml metanolde alüminyum folye ile muhafaza edilmiş bir kab içerisinde boya tamamen çözününceye kadar 20-30 dakika süreyle karıştırıldı. Daha sonra üzerine 28 ml sodyum asetat solüsyonu eklendi ve karışım jel üzerine döküldü. Bir saatlik inkübasyon sonrasında jele %30 'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> den mikropipetle eklendi. Protein bandları belirdikten sonra jele geri yıkama solüsyonu [(3:7) 3 ml isoproponol:7 ml Na-Asetat] veya dH<sub>2</sub>O ya alındı ve resimlendi.

### 3.2.10. *RRC00138* Gen Ürününün Kontrollü İşleyişi

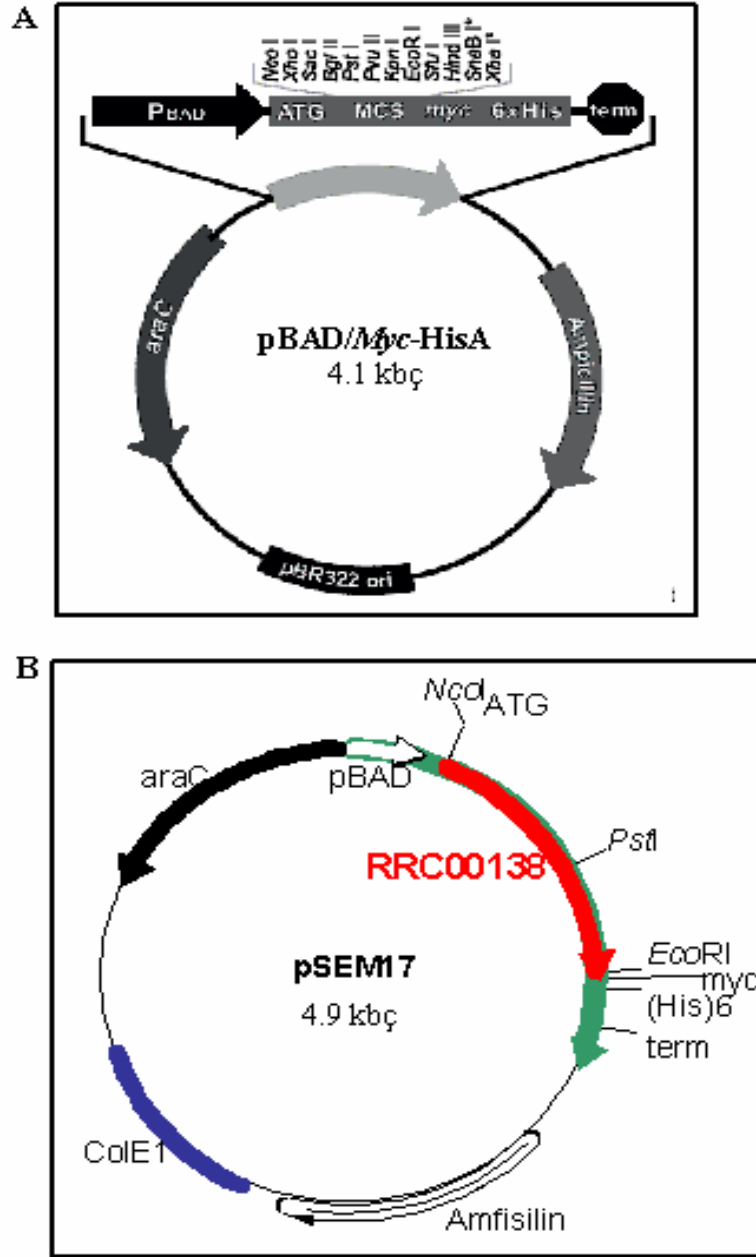
#### 3.2.10.1. *RRC00138* Geninin Klonlanması

*RRC00138* geni kalıp DNA olarak pMRC plazmit DNA 'sı ve *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon enzim dizileri içeren oligonükleotidler (*RRC00138-NcoI* 5'-GGACG CCCATGGCACGACCGATCTGG-3' ve *RRC00138-EcoRI* 5'-CTGCGCGAATTCCGCGACCGCTGACC-3') kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği ile çoğaltıldı. Buna göre, %15 (v/v) gliserol, 0.1 mM dNTP, 100 pmol oligonükleotid, 100 ng pMRC plazmit DNA 'sı ve 2.5 U *Pfu* DNA polimeraz enziminden (Stratagene) oluşan PZR reaksiyon tüpü hazırlandı. *R. capsulatus* genomu guanin ve sitozin nükleotidleri açısından oldukça zengin olduğundan, reaksiyon tüplerine gliserol eklenmesine ilaveten reaksiyon tüpleri PZR döngüsünden önce 98°C 'de 10 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra 98°C 'de 30 saniye, 62°C 'de 20 saniye ve 72°C 'de 2 dakikadan oluşan 30 devirlik PZR programı kullanıldı. En son aşamada ise PZR tüpleri 72°C 'de 10 dakika ve 4°C 'de gece boyu inkübe edildi.

*RRC00138* genini içeren PZR ürünü P<sub>BAD</sub> promotörü ve AraC regülatör proteininin kontrolünde L-arabinoz ile indüklenebilen pBAD/*Myc*-HisA vektörüne (Invitrogen, Şekil 3.5A) klonlandı. Bunun için, 828 bp 'lik PZR ürünü *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve aynı enzimler ile kesilmiş pBAD/*Myc*-HisA vektör DNA 'sının uçları ile birleştirildi. Böylece elde edilen yeni klon pSEM17 olarak isimlendirildi (Şekil 3.5B). pSEM17 plazmiti üzerinde yer alan *RRC00138* geninin nükleotid dizileri pBAD-Seq-F (5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC-3') ve pBAD-Seq-

R (5'-GATTTA ATCTGTATCAGG-3') oligonükleotidleri kullanılarak her iki uçtan okundu. DNA dizi analizi ile vektörün translasyon başlama ve sonlanma dizilerinin doğru bir şekilde yer aldığı doğrulanmış oldu.





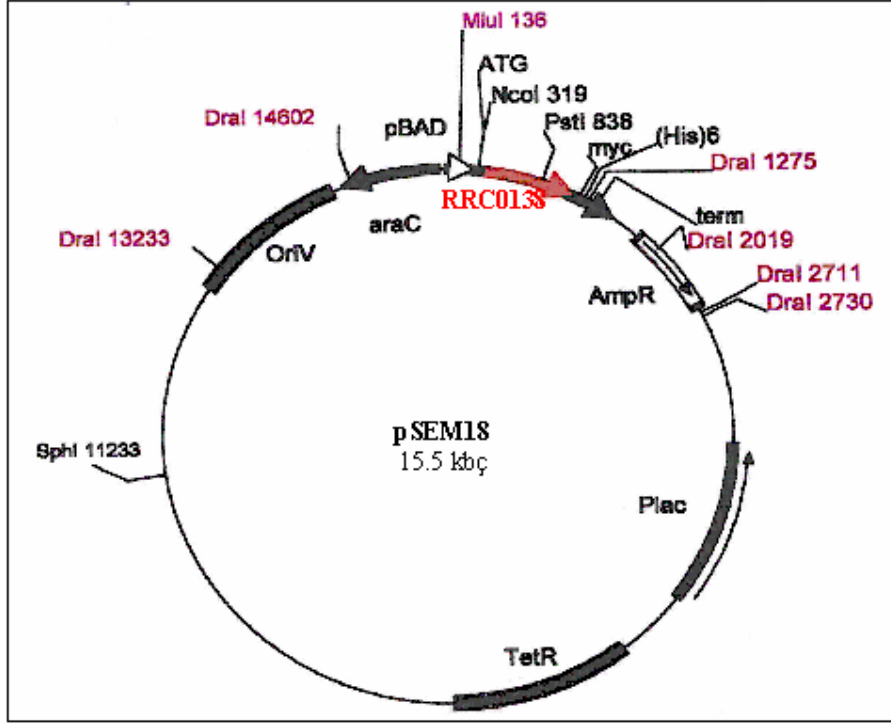
Şekil 3.5. pBAD/*Myc-HisA* vektörü (A) ve türevinin (B) fiziksel ve genetik haritası. L-arabinoz ile indüklenen pBAD/*Myc-HisA* vektörü (Invitrogen) üzerinde yer alan PBAD (*araBAD* promotör), heterolog gen işlevselliğinin dozaja bağlı regülasyonunu sağlar. ATG (Başlama kodonu), translasyonel başlama bölgesini temin eder. MCS (Çoklu klonlama bölgesi), genin vektöre insersiyonu için elverişli restriksiyon enzim dizilerini içerir. C-uç myc epitop kuyruğu (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) proteinin işlevselliğinin Anti-*myc* antikoruyla; C-uç polihistidin bölgesi ise protein işlevselliğinin Anti-His antikoruyla gözlenmesini sağlar. *araC* geni, PBAD promotörün regülasyonu için gerekli regülatör proteinini kodlar. Term, *rmB* transkripsiyon terminasyon bölgesini; pBR322 ori (ColE1) ise düşük oranda replikasyonu ve *E. coli* 'de çoğalmayı sağlar.

### 3.2.10.2. *RRC00138* Gen Ürününün *E. coli* 'deki İşleyişi

*RRC00138* geninin P<sub>BAD</sub> promotörü kontrolünde *E. coli* 'deki işleyişi için öncelikle pSEM17 plazmiti *E. coli* *plsC*(Ts) mutantına transfer edildi ve SM2-1/pSEM17 transformantı 28°C sıcaklıkta amfisilin (Amf) antibiyotiği içeren LB besiyerinde seçildi. Daha sonra gece boyu üremiş transformanta ait sıvı kültürden beş kez 100 'er µl alınarak 10 ml LB+Amf içeren 100 'er ml lik erlenmayerlere inoküle edildi. Hücreler 600 nm 'de ~0.5 hücre yoğunluğu gösterinceye kadar 28°C 'lik çalkalayıcı inkübatörde üremeye bırakıldı. Daha sonra farklı erlenmayerlerde üretilen hücrelere %0 'dan % 2 (w/v) 'ye kadar değişen konsantrasyonlarda (%0.0002, %0.002, %0.02, %0.2 ve %2) L-arabinoz eklenerek, hücreler 4 saat süreyle üretilmeye devam ettiler. Arabinoz ile indüksiyondan sonra hücrelerden 1 'er ml alınarak, santrifüjle (13.000 devir/dakika, 3 dakika) çöktürüldü. Pelletler kullanılıncaya kadar -20 °C 'de saklandı.

### 3.2.10.3. *RRC00138* Gen Ürününün *R. capsulatus* 'daki İşleyişi

*RRC00138* geninin *R. capsulatus* 'deki işleyişi için öncelikle pBAD promotörü, AraC proteini ve *RRC00138* genini içeren pSEM17 plazmiti pRK415 vektörüne klonlandı. Bunun için, *NsiI* restriksiyon enzimi ile kesilerek linear hale getirilen pSEM17 plazmiti, *NsiI* dizisine tamamlayıcı diziye sahip *PstI* enzimi ile kesilmiş pRK415 vektör dizisi ile birleştirildi ve pSEM18 plazmiti (Şekil 3.6) elde edildi. Daha sonra pSEM18 plazmiti SA1 (*RRC00138::spe*) mutantına konjugasyon ile aktarıldı. SA1/pSEM18 transkonjugantı, %2 L-arabinoz içeren veya içermeyen MPYE besi yerinde aerobik koşullarda 16 saat süreyle üretildi ve intrasitoplazmik membran vesikülleri izole edildi.



Şekil 3.6. pSEM18 rekombinant plazmitin fiziksel ve genetik haritası. pBAD/Myc-HisA vektörü üzerinde yer alan pBAD, araC ve Amp kısaltmaları Şekil 3.6 da açıklanmıştır. Plac, pRK415 plazmit promotörü; Tet, tetrasiklin; OriV ise replikasyon orjini olarak gösterilmiştir.

#### 3.2.10.4. RRC00138 Protein İşlevselliğinin İmmunoblot (Western blot) Analizi ile Gözlenmesi

*RRC00138* gen ürününün *E. coli* veya *R. capsulatus* 'daki işlevselliği immunoblot analizi ile gözlendi. *RRC00138* gen ürününün *E. coli* 'deki işlevselliğini gözlemek için öncelikle pellet haline getirilen L-arabinoz ile indüklenen hücre ekstraktları 100 ml 1X SDS-jel yükleme boyasında süspanse edilerek, 95°C 'de 4-5 dakika süreyle inkübe edilerek denatüre edildi. Daha sonra 10 ml 'lik protein ekstraktları %12 'lik sodyum dodesil sulfat-poliakrilamit jel elektroforezinde (SDS-PAGE) (Läemmlı, 1970) (Ek-2) ayrıştırıldıktan sonra proteinler PVDF (Polivinildifluorid, Bio-Rad) membranına bir dakika süreyle %100 'lük metanol

içerisinde bekletildi. Daha sonra PVDF membranı, dört adet 3 MM Whatman kağıdı ve jel transfer tamponu (12 mM Tris, 96 mM Glisin, %10 Metanol) içinde 10-15 dakika süreyle inkübe edildiler. Whatman kağıdı (2)/membran/jel/whatman kağıdı (2) sandviçi hazırlanarak elektroforetik transfer sistemine (Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad) yerleştirildi. 15 volt 'da 30 dakika transfer işlemi gerçekleşti. Blot daha sonra metanol içerisinde 1 dakika bekletildi ve 20 ml bloklama çözeltisi (%5 Süt tozu, %0.1 Tween-20, 1X TBS (TBS: 50 mM Tris-pH.7.4, 150 mM NaCl) içerisine alınarak düşük devirli çalkalayıcı üzerinde gece boyu 4°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında blot iki kez 5 dakika süreyle 1X TBS-T (TBS-Tween 20) tamponu ile yıkandı ve daha sonra birincil antikorda (anti-Myc1-9E10, 1:250 dilusyonda TBS+ %2 süt tozu) üç saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 5 'er dakika süreyle üç kez TBS-T tamponu ile yıkamalardan sonra, blot ikincil antikorla (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (1:1000 dilusyonda, Amersham Pharmacia Biotech)) bir saat oda sıcaklığında muamele edildi. 5 'er dakika süreyle üç kez TBS-T tamponu ile yıkamalardan sonra, NiCl<sub>2</sub> ile aktivitesi arttırılan diaminobenzidin (DAB) boyası (Hsu ve Soban, 1982) ile protein gözlemlendi. Boyama solüsyonu için, 12.6 mg DAB, 18 ml 50 mM Tris/HCl (pH:8) solüsyonunda çözüldü ve karışıma 2 ml %0.3 'lük NiCl<sub>2</sub> ilave edildi. Protein bantlarının gözlenmesi için boyama solüsyonuna 5-10 µl hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak 5-10 dakika süreyle bekletildi. Bandlar belirdikten sonra reaksiyon dH<sub>2</sub>O eklenerek durduruldu.

*RRC00138* geninin *R. capsulatus* 'deki işleyişini gözlemek için, SA1/pSEM18 transkonjugantının %2 L-arabinoz varlığında veya yokluğunda üretilmiş hücrelerine ait kromotofor membran proteinleri (100 µg) 1:1 oranında 2X SDS-jel yükleme boyası ile karıştırıldı. Tüpler 37°C 'de 10 dakika süreyle inkübe edilerek proteinler denatüre edildi. Membran proteinleri %12 'lik SDS-PAGE 'de ayrıştırıldı ve daha sonra PVDF membranına transfer edildi. Blot, anti-Myc1-9E10 antipadisi (1:1000), AP-conjugated goat anti-mouse (1:1000, Biorad) ve 4-nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP, Sigma Inc.) ile muamele edildi.

### 3.2.11. Fenotip Tamamlama Testleri

*RRC00138* gen ürünün *E. coli* 'deki işleyişini immunoblot analizi ile gözlemlendikten sonra, *RRC00138* geninin *E. coli* mutasyonunu tamamlama yeteneği test edildi. SM2-1/pSEM17 ve negatif kontrol olarak kullanılan SM2-1/pBAD-*Myc*-HisA transformantları 28°C sıcaklıkta gece boyu inkübe edildiler. Daha sonra transformantlar farklı L-arabinoz konsantrasyonları (%0.0002, %0.002, %0.02, %0.2 ve %2) içeren LB+Amf petri kaplarına iki set halinde çizildi. Bir set 28°C 'lik inkübatörde, diğer set ise 42°C 'lik inkübatörde gece boyu bırakılarak transformantların üreme fenotipleri gözlemlendi.

Diğer yandan, *RRC00138* geninin *E. coli* G3P oksotrofik mutant soyunu (SJ22, *plsB26-plsX50* (Rock ve Jackowski, 1982)) tamamlama yeteneği de testi edildi. Bunun için, pSEM17 ve pBAD/*Myc*-HisA plazmitleri SJ22 mutantına aktarıldı ve transformantlar 37°C sıcaklıkta inkübatörde gece boyu inkübe edildi. *RRC00138* geninin *E. coli* mutasyonunu tamamlama yeteneği için transformantlar farklı konsantrasyonlardaki L-arabinoz (%0.0002, %0.002, %0.02, %0.2, %2) varlığında G3P içeren veya içermeyen MedE besisi ortamına çizildi ve 37°C 'lik inkübatörde gece boyu bırakılarak transformantların üreme fenotipleri gözlemlendi.

### 3.2.12. *In vitro* GPAT+AGPAT Aktivite Testi

*R. capsulatus* yaban soyu (MT1131) ve *RRC00138* null mutantının [SA1; (*RRC00138::spe*)] G3P açıltransferaz (GPAT) ve 1,2 diaçil G3P açıltransferaz (AGPAT) enzim aktivite testi, intrasitoplazmik membran partikülleri kullanılarak *in vitro* koşullarda, Goldfine (1969) 'nın "filter paper" metoduna göre yapıldı. Buna göre, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.6 mM G3P, 29 µM *cis*-18:1-(Δ11)ACP (vassenil-açıl taşıyıcı protein) ve 0.3 µCi [<sup>14</sup>C]-G3P 'dan oluşan 150 µl 'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon, 1.25-2.5 µg kromotofor membran partiküllerinin reaksiyon karışımına eklenmesi ile başladı ve reaksiyon tüpleri 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon başladıktan 0., 1., 2. ve 4. dakikalarda tüpler inkübatörden alındı ve reaksiyon karışımı Whatmann 3MM kağıdına konularak reaksiyon durduruldu.

Daha sonra filter kağıt %10, 5 ve 1 'lik trikloroasetik asit (TCA) ile beşer dakika sürelerle yıkandı ve kurutuldu. Radyoaktivite miktarı (cpm) sintilasyon sayım cihazında ölçüldü.

### **3.2.13. [<sup>14</sup>C]-G3P ile *In vitro* Koşullarda İşaretlenmiş Kromotofor Membranından Lipid İzolasyonu ve Ayrışımı**

Bölüm 3.2.11 'de açıklandığı gibi reaksiyon karışımı hazırlandı ve reaksiyon tüpü 37°C 'de dört dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra tüplere 1.6 ml kloroform:metanol (1:1 v/v) karışımı, 151 µl H<sub>2</sub>O ve 800 µl 0.1 N HCl eklenerek reaksiyon durduruldu. Karışım santrifüj ile çöktürüldü (1.200 devir/dakika, 7 dakika) ve iki faz elde edildi. Lipid bileşenlerini içeren kloroform fazı (alt faz) yeni bir tüpe aktarıldı ve argon gazı altında buharlaştırıldı. Lipidler 200 µl kloroform 'da çözüldü ve 10 µl lipid ekstraktı 10x10 cm<sup>2</sup> boyutundaki silika tabakaya (Silica Gel H plate) yüklendi. Ayrıca silika tabakanın diğer tarafına işaretlenmemiş lisofosfatidik asit (10 µg) ve fosfatidik asit (10 µg) standartları da yüklendi. TLC tabaka kloroform:metanol:asetik asit (39:9:3 v/v/v) içeren solvent sisteminde ayrıştırıldı. Silika tabaka daha sonra fosfoimager (Kodak) içinde gece boyu bekletildi ve radyoaktif lekeler, IMAGEQUANT programı (v. 3.30) kullanılarak Molecular Dynamics Phosphoimager (Storm 860) 'de tanımlandı. Diğer yandan, silika tabakaya iyodin boyası püskürtülerek LPA ve PA standartlarının silika tabakadaki lokalizasyonu belirlendi ve radyoaktif lekeler ile karşılaştırıldı.

### **3.2.14. Total Hücre Membran Lipidlerin İzolasyonu**

#### **3.2.14.1. *In vivo* Koşullarda [<sup>14</sup>C]asetat ile İşaretlenmiş Hücrelerden Lipid İzolasyonu**

*R. capsulatus* yaban soy, null mutantları ve transkonjugantların MPYE veya MedA besi yerlerinde 35 ya da 25 °C sıcaklıktaki gece boyu kültürleri hazırlandı. Gece boyu kültüründen 100 µl, 1 ml uygun besiyerine inoküle edildi ve tüplere 2 µl [<sup>14</sup>C]-asetat (60 mCi/mmol) eklendi. Bakteriler MedA besi yerinde 24 saat; MPYE

besiyerinde ise 30 saat süreyle inkübe edildi. Diğer yandan, benzer şekilde *S. meliloti* yaban soy, null mutantları ve transkonjugantların da sıvı MedA besiyerinde 30 °C sıcaklıkta [1-<sup>14</sup>C]-asetat varlığında kültürleri hazırlandı. Hücreler santrifüj ile çöktürüldü (4.000 devir/dakika, 5 dakika) ve 500 µl dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak tekrar çöktürüldü. Lipidler Bligh ve Dyer (1959) 'in metoduna göre izole edildi. Bunun için, hücreler önce 100 µl dH<sub>2</sub>O 'da çözüldü. Daha sonra 100 µl kloroform:200 µl metanol hücrelere eklendi ve hücreler iki dakika süreyle vortekslendi. Karışıma önce 100 µl kloroform eklenerek 30 sn, daha sonra 100 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek 30 sn daha vorteksle karıştırıldı ve hücreler santrifüjle çöktürüldü. Oluşan iki fazdan kloroform içeren alt faz yeni bir tüpe transfer edildi ve argon gazı altında buharlaştırıldı. Lipidler 100 µl kloroformda çözüldü ve sintilasyon sayım cihazında radyoaktivitesi (cpm) ölçüldü.

### 3.2.14.2. Radyoaktif ile İşaretlenmemiş Hücrelerden Lipid İzolasyonu

50 ml 'lik hücre kültürlerinden lipidlerin izolasyonu Benning ve Somerville (1992) metoduna göre gerçekleştirildi. Buna göre, *R. capsulatus* yaban soy ve null mutantları 50 ml MPYE ya da MedA sıvı besiyerlerinde 35°C sıcaklıkta; *S. meliloti* yaban soy ve OlsB mutanı 50 ml MedA besiyerinde 30°C sıcaklıkta eksponensiyonel faza ( $A_{630nm} = 0.7-0.8$ ) kadar üretildi. Hücreler daha sonra santrifüj ile çöktürüldü ve dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Hücreler 0.5 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde süspanse edilerek Corex cam tüpüne transfer edildi. Tüplere 4 ml kloroform:metanol (1:1 v/v) karışımı eklendi ve karışım 4-5 dakika süreyle vortekslenerek lipidler izole edildi. Karışıma daha sonra 1 M KCl-0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 'dan 1.3 ml eklenerek vortekslenmeye devam edildi. Santrifüj ile çöktürme (8.000 devir/dakika, 15 dakika) sonunda iki faz oluştu. Lipidleri içeren alt klorofom fazı bir tüpe aktarılarak argon gazı altında buharlaştırıldı ve lipid konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde lipidler kloroformda çözüldü.

### 3.2.14.3. Lipid Ekstraktların İki Boyutlu İnce Tabaka Kromatografisinde Ayrışımı ve Lipidlerin Gözlenmesi

[1-<sup>14</sup>C]-asetat ile işaretlenmiş (60.000 cpm) ya da işaretlenmemiş (10 ng) lipid ekstraktları 10x10 cm<sup>2</sup> boyutunda analitik TLC silika gel 60 F254 tabakta (Sigma-

Aldrich) iki boyutlu ince tabaka kromatografi (2D-TLC) yöntemiyle ayrıştırıldı. Bunun için, silika tabaka önce 120°C 'de 30 dakika süreyle inkübe edilerek aktive edildi. Lipidler silika tabakanın sağ-alt köşesine yüklendi. Tabaka, kloroform-metanol-dH<sub>2</sub>O (14:6:1, vol/vol/vol) 'dan oluşan solvent içeren tankın içine yerleştirildi. Kapiler olarak solvent silika tabakanın üst kısmına ulaştığı zaman, tabaka tanktan çıkarılarak vakum desikatöründe 45 dakika süreyle kurutuldu. Daha sonra tabaka saat yönünde 90° döndürülerek kloroform-metanol-glasiyel asetik asit (13:5:2, vol/vol/vol) 'den oluşan solvent sisteminde ikinci kez ayrıştırıldı (de Rudder ve ark. 1997).

Radyoaktif ile işaretlenmemiş *R. capsulatus* hücrelerden izole edilen lipidler özgün lipid boya spreyleri kullanarak, renk reaksiyonları ile gözlemlendi. Buna göre, serbest amino grubu içeren lipidler (PE ve OL) ninhidrin boya ve ısıyla kırmızı-mor renk vermesiyle diğer polar lipidlerinden ayırt edilir. Bunun için, silika tabakaya önce %0.3 'lük ninhidrin boyası (Sigma, N-1286) püskürtüldü ve daha sonra tabaka 120 °C 'de 5-10 dakika süreyle ısıtılarak kırmızı-mor renk oluşumu gözlemlendi (Dawson, 1967). Fosfolipidleri (PE, PG, PC ve DMPE) gözlemek için silika tabakaya %0.3 (w/v) 'lük ammonium molibdenum mavi spreyi (Sigma, M-1942) püskürtüldü (Dittmer ve Lester, 1964). Bakteri soylarının lipid profilleri PE (Dr. Norah Jonston-UPENN 'dan temin edildi), PG (Sigma-Aldrich) ve PC (Sigma-Aldrich, P7443) referans substratlarıyla karşılaştırılarak tanımlandı. Radyoaktif lipid lekeleri ise Molecular Dynamics phosphoimager ve IMAGEQUANT programı ile gözlemlendi.

### 3.2.15. Kütle Spektrometri Analizi ile OL in Tanımlanması

*R. capsulatus* ve *S. meliloti* bakterilerindeki OL in kütle spektroskopik analizi Pennsylvania Üniversitesi-Farmakoloji Bölümü-Kütle Spektroskopi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Buna göre öncelikle, *R. capsulatus* MT1131 yaban soyu ve *RRC00139-RRC00138* ikili mutanti (SA8), *S. meliloti* de Sm-1021 yaban soyu ve OlsB mutantına (ORLD1) ait lipidler (10 ng) 20x20 cm<sup>2</sup> boyutundaki silika tabakaya yüklendi. Tüm lipid profilini herhangi bir boya kullanmadan gözlemek içinde aynı tabakaya yaklaşık 10.000 cpm [1-<sup>14</sup>C]asetat ile işaretlenmiş lipid ekstraktları da yüklendi. Lipidler 2D-TLC 'de ayrıştırıldı ve fosfoimager ile tüm membran polar lipidlerinin yerleri belirlendi.



Daha sonra yaban soylarda OL içeren leke, mutantlarda ise PE nin hemen altında OL lekesine karşılık geldiği bilinen bölge tabakadan kazınarak çıkarıldı. OL içeren (ve içermeyen) silika partikülleri 500 µl kloroform:metanol (30:70, vol/vol) ve 0.1% formik asit (pH 5.6) içerisinde çözülerek, santrifüj edildi (9.000 devir/dakika, 2 dakika). Elde edilen üst sıvı elektrospray iyonizasyon kütle spektrometre (MS/MS) (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA) tekniği ile analiz edildi.

### 3.2.16. “Pulse-chase” İşaretleme ve İmmunopresipitasyon

Fonksiyonel sitokrom  $c_y$  proteinin (Myllykallio ve ark., 1997) minimal MedA besi yerinde 35°C sıcaklıktaki üretimi ve yıkım oranı “pulse-chase” işaretleme ve immunopresipitasyon yöntemleri kullanılarak incelendi. Bu amaçla, karboksil ucu FLAG oktapeptid dizisine (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) bağlı sitokrom  $c_y$  genini (sit  $c_y$ -FLAG) taşıyan pHM7 plazmiti (Myllykallio ve ark., 1997) yaban soy (MT1131) ve *RRC00139-RRC00138* ikili mutantına (SA8) aktarıldı. Elde edilen transkonjugantlar MedA besi yerinde 35°C sıcaklıkta eksponensiyonel faza kadar ( $A_{630}=0.75$ ) üretildi. Hücreler, son konsantrasyonu 1 mCi/ml olacak şekilde [ $^{14}$ C]amino asit karışımı ile beş dakika süreyle inkübe edildi ve protein sentez inhibitörü kloramfenikol (200 mg/ml) varlığında veya yokluğunda kasamino asit (%0.1) eklenerek reaksiyon durduruldu. Belli zaman noktalarında (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 240 ve 480 dakika), 1 ml 'lik hücreler alınarak, buzda bekletildi. Hücreler daha sonra santrifüjle çöktürüldü ve DNaz (50 mg/ml), RNaz (50 mg/ml), fenilmetilsülfonik asit (1 mM) ve  $\epsilon$ -amino-n-kaproik asit (0.1 mM) içeren 100 µl lizis tamponunda (CellLytic™ B 2X Cell lysis reagent, Sigma B7310) çözüldü. Hücreler iki dakika süreyle vortekslenerek lizis edildi. 0.2 mg/ ml lizozim hücrelere eklendikten sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra tüplere 10 mM EDTA eklendi ve hücreler 13.000 devir/dakika da 15 dakika süreyle çöktürüldü. Herbir zaman noktası için, toplam  $1.25 \times 10^6$  cpm üst sıvı alındı ve 40 µl Anti-Flag M2 affinity jel (Sigma A2220) içeren eppendorf tübüne aktarıldı. Karışım, 4°C 'de üç saat süreyle çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. İmmunokompleks daha sonra santrifüj ile çöktürüldü ve beş kez %0.01 dodesilmaltosit içeren 1X TBS tamponunda yıkandı. Pelletler 1X SDS-örnek yükleme tamponunda çözülerek, 95°C 'de 4-5 dakika süreyle inkübe ederek proteinler

denatüre edildi. Proteinler %15 lik SDS-PAGE 'de ayrıştırıldı. Elektroforez sonrasında jel, %25 metanol – %10 asetik asit içerisinde 20 dakika bekletildi ve sonrasında kurutularak fosfoimager kasetine yerleştirildi. Radyoaktif protein bantları Molecular Dynamics phosphoimager ve IMAGEQUANT programı ile analiz edildi.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### 4.1. MR2, IJ1 ve AYG4 Mutantlarındaki Mutasyon Taşıyan Gen(ler)in Belirlenmesi

Önceki çalışmalarda, *R. capsulatus* MR2, IJ1 ve AYG4 isimli mutantların sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz negatif (Nadi<sup>-</sup>) fenotiplerinin enziminin yapısal (*ccoNOQP*) ve bilinen biyogenesiz (*ccoGHIS*) genleri ile Nadi pozitif fenotipe tamamlanmadığı gösterilmiştir. *R. capsulatus*' un kromozomal DNA kütüphaneleri kullanılarak yapılan tamamlama testleri sonucunda, bu mutantların oksidaz fenotipini tamamlayabilen kromozomal DNA parçaları (pMRC, pMRB/pAY1) izole edildi (Koch ve ark., 1998; Aygün, 1999). Bu çalışmada, ilgili fenotipten sorumlu gen(ler)in belirlenebilmesi için kromozomal DNA parçaları üzerinde yer alan genlerin aktiviteleri bozularak elde edilen null (knock-out) mutantlarının genetik ve biyokimyasal analizleri yapıldı.

MR2, IJ1 ve AYG4 mutantlarında Nadi fenotipini yaban soy oranında tamamlayan 5600-bç 'lik *EcoRI-EcoRI* DNA parçasını (pMRC) tek bir noktadan kesen veya hiç kesmeyen restriksiyon endonükleaz enzim haritası MacVector<sup>TM</sup> 7.2.3. programı kullanarak tespit edildi. Daha sonra Materyal ve Yöntem 'de ayrıntılı şekilde açıklandığı gibi, kromozomal DNA parçaları üzerinde yer alan birçok açık okuma bölgesi delesyon-insersiyon yapılarak bozuldu ve böylece pSEM2 [ $\Delta(RRC00132-RRC00133::spe)$ ], pSEM3 (*RRC00136::spe*), pSEM4 (*RRC00138::spe*), pSEM11 [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ], pSEM16 [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ], pSEM7 [ $\Delta(RRC00142::spe)$ ], pSEM9 [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] ve pSEM13 [ $\Delta(RRC00138-RRC00139::spe)$ ] isimleri verilen rekombinant plazmitler elde edildi (Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4). Bu plazmitler daha sonra MR2, IJ1 ve AYG4-25 (pOX15 plazmiti çıkartılmış AYG4 mutant soyu; Aygün, 1999) mutantlarına çaprazlamayla aktarıldı ve plazmitlerin mutantların Nadi fenotiplerini tamamlama yetenekleri test edildi. Buna göre, pSEM2, pSEM3 veya pSEM7 plazmitini taşıyan her üç mutant Nadi<sup>-</sup> fenotipini korudu (Çizelge 4.1). Buna karşılık, (*RRC00138::spe*) mutasyonuna sahip pSEM4 veya pSEM16 plazmitini taşıyan IJ1 Nadi<sup>-</sup> fenotipini korurken, AYG4-25 ve MR2 ise Nadi<sup>+</sup> fenotipi gösterdi (Çizelge 4.1). Diğer yandan [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] mutasyonuna sahip pSEM9 plazmitini taşıyan

IJ1 mutan $t$ ı Nadi $^{+}$  fenotipi gösterirken, AYG4-25 ve MR2 mutantları ise Nadi $^{-}$  fenotiplerini korudular (Çizelge 4.1). *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin birlikte delesyonunu [ $\Delta(RRC00139-RRC00138::spe)$ ] taşıyan pSEM13 veya pSEM11 plazmitinin varlığında da doğrulayıcı biçimde mutantların yine Nadi $^{-}$  fenotipi taşıdıkları görüldü (Çizelge 4.1). Bu sonuç, *RRC00138* geninin IJ1 mutantının; *RRC00139* geninin de MR2 ve AYG4-25 mutantlarının fenotipinden sorumlu olduklarını gösterdi.

#### 4.2. Null Mutant Eldesi ve Mutantların Fenotipik Karakterizasyonu

Genetik tamamlama testleri sonunda *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz enziminin aktivitesi için gerekli yeni genler olabilecekleri sonucuna varıldı. Ancak hem elde edilen bu sonucu doğrulamak hem de kromozomal DNA parçası üzerinde yer alan diğer genlerin verdiği fenotipik özellikleri belirlemek için genlere ait null mutantları oluşturuldu. Bunun için, ‘Knock-out’ yöntemiyle elde edilen [ $\Delta(RRC00132-RRC00133::spe)$ ], (*RRC00136::spe*), [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ], (*RRC00138::spe*), [ $\Delta(RRC00142::spe)$ ], [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] ve [ $\Delta(RRC00139-RRC00138::spe)$ ] insersiyon-delesyon alleleri *R. capsulatus* ’un MT1131 yaban soy kromozomuna GTA partikülleri aracılığında homolog rekombinasyon yoluyla aktarıldı (Yen ve ark., 1979). Böylece sırasıyla SA2 [ $\Delta(RRC00132-RRC00133::spe)$ ], SA3 (*RRC00136::spe*), SA4 [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ], SA1 (*RRC00138::spe*), SA5 [ $\Delta(RRC00142::spe)$ ], SA6 [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] ve SA8 [ $\Delta(RRC00139-RRC00138::spe)$ ] null mutantları elde edildi. Mutantların farklı besi ortamlarındaki (zenginleştirilmiş MPYE ve minimal MedA) Nadi reaksiyonunu katalizleyebilme yetenekleri ile üreme özellikleri incelendi (Çizelge 4.2). SA2, SA3 ve SA5 mutantları farklı besi yerlerinde aerobik ve fotosentetik koşullarda üreyebilme yeteneği ve Nadi $^{+}$  fenotipi gösterdi. Buna karşılık, SA1, SA4, SA6 ve SA8 mutantları ise optimal inkübasyon sıcaklığında (35°C) her iki besi yerinde de sitokrom *c* oksidaz aktivitesinden yoksun olup, Nadi $^{-}$  fenotipi verdi (Çizelge 4.2; Şekil 4.1). Ayrıca bu null mutantları fotosentetik koşullarda besi ortamına bağlı farklı üreme fenotipi gösterdi. Buna göre mutantlar MedA besiyerinde fotosentez ile üreyebilirken, MPYE besi yerinde ise üreyemedi (Çizelge 4.2; Şekil 4.1). Böylece SA1, SA4, SA6 ve SA8 null

mutantlarında gözlenen Nadi fenotipi ve fotosentetik koşullardaki üreme özellikleri kimyasal mutagenез sonunda elde edilen MR2, IJ1 ve AYG4 mutantlarının fenotipi ile aynı olduğu görüldü.

Çizelge 4.1. Delesyon-insersiyon alleli taşıyan rekombinant plazmitlerin MR2, IJ1 ve AYG4-25 mutantların Nadi fenotiplerini tamamlama yetenekleri.

Plazmitler	Genotip	Nadi fenotipleri		
		IJ1	MR2	AYG4-25
pMRC2	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , RRC00138 <sup>+</sup> , RRC00139 <sup>-</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	+	-	-
pSEM1	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , RRC00138 <sup>-</sup> , RRC00139 <sup>-</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-
pSEM2	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , ΔRRC00136, RRC00138 <sup>-</sup> , RRC00139 <sup>-</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-
pSEM3	Δ(ilvD-exoD), RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , RRC00138 <sup>-</sup> , RRC00139 <sup>-</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-
pMRC	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , RRC00138 <sup>+</sup> , RRC00139 <sup>+</sup> , RRC00140 <sup>+</sup> , RRC00142 <sup>+</sup> , proA <sup>-</sup>	+	+	+
pSEM4	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , RRC00138 <sup>-</sup> , RRC00139 <sup>+</sup> , RRC00140 <sup>+</sup> , RRC00142 <sup>+</sup> , proA <sup>-</sup>	-	+	+
pSEM7	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>-</sup> , RRC00135 <sup>-</sup> , RRC00136 <sup>-</sup> , RRC00138 <sup>-</sup> , RRC00139 <sup>-</sup> , Δ(RRC00140), RRC00142 <sup>+</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-
pSEM9	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>-</sup> , RRC00135 <sup>-</sup> , RRC00136 <sup>-</sup> , RRC00138 <sup>+</sup> , Δ(RRC00139), RRC00140 <sup>+</sup> , RRC00142 <sup>+</sup> , proA <sup>-</sup>	+	-	-
pSEM11	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , Δ(RRC00138), RRC00139 <sup>-</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-
pSEM16	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>+</sup> , Δ(RRC00138), RRC00139 <sup>+</sup> , RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>-</sup> , proA <sup>-</sup>	-	+	+
pSEM13	ilvD <sup>-</sup> , exoD <sup>+</sup> , RRC00135 <sup>+</sup> , RRC00136 <sup>-</sup> , Δ(RRC00138-RRC00139), RRC00140 <sup>-</sup> , RRC00142 <sup>+</sup> , proA <sup>-</sup>	-	-	-

Çizelge 4.2. *R. capsulatus* null mutantlarının farklı besi ortamlarında aerobik ve anaerobik fotosentetik koşullar altındaki üreme özellikleri ve Nadi reaksiyonunu katalizleme yetenekleri.

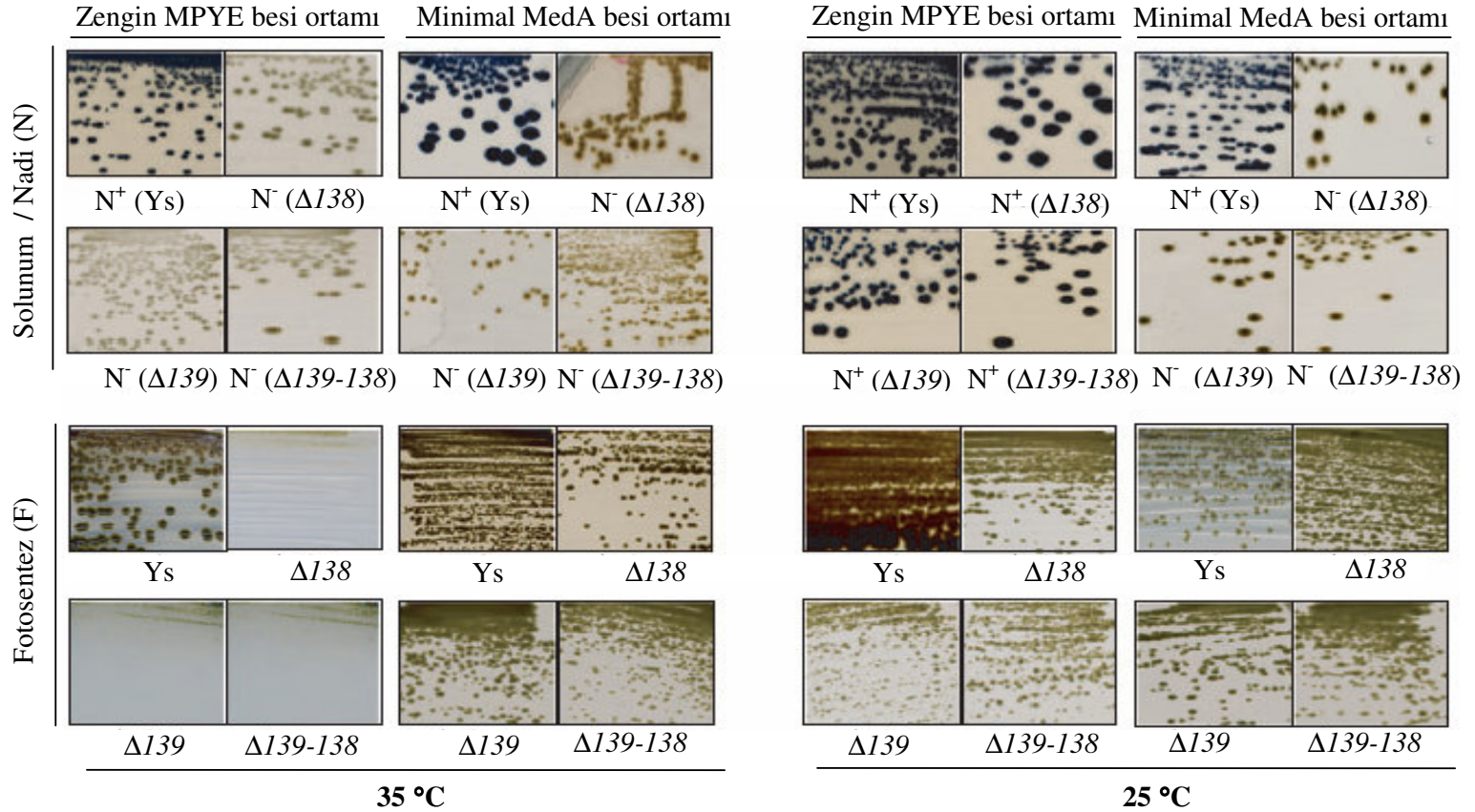
Soylar	Genotip	MedA <sup>a</sup>		MPYE <sup>a</sup>	
		S <sup>b</sup> /Nadi <sup>c</sup>	F <sup>b</sup>	S/Nadi	F
MT1131	Yaban soy	+/+	+	+/+	+
SA1	( <i>RRC00138::spe</i> )	+/-	+	+/-	-
SA2	( <i>RRC00136::spe</i> )	+/+	+	+/+	+
SA3	[ $\Delta$ ( <i>ilvD-ExoD</i> ):: <i>spe</i> ]	+/+	+	+/+	+
SA4	[ $\Delta$ ( <i>RRC00138</i> ):: <i>spe</i> ]	+/-	+	+/-	-
SA5	[ $\Delta$ ( <i>RRC00140</i> ):: <i>spe</i> ]	+/+	+	+/+	+
SA6	[ $\Delta$ ( <i>RRC00139</i> ):: <i>spe</i> ]	+/-	+	+/-	-
SA8	[ $\Delta$ ( <i>RRC00139-RRC00138</i> ):: <i>spe</i> ]	+/-	+	+/-	-

<sup>a</sup> MedA, minimal besi yeri; MPYE, zengin besi yeri.

<sup>b</sup> S, aerobik koşullarda üremeyi; F, fotosentez ile üremeyi; + ve - ise belirtilen koşullar altında *R. capsulatus* soylarının üreme yeteneğini gösterir.

<sup>c</sup> Nadi<sup>+</sup> veya Nadi<sup>-</sup>, sitokrom *c* oksidaz aktivitesinin varlığını veya yokluğunu gösterir.

Diğer yandan, MR2, IJ1 ve AYG4-25 mutantlarının Nadi fenotipini tamamlayan pMRC plazmiti SA1, SA4, SA6 ve SA8 null mutantlarına aktarıldığında, beklenildiği gibi mutantlar her iki besi yerinde de Nadi<sup>+</sup> fenotipi gösterdiler ve zenginleştirilmiş MPYE besi ortamında fotosentez ile üreyebilme yeteneğini geri kazandılar. Genomda *RRC00138* veya *RRC00139* geninin inaktivasyonu, sitokrom *cbb<sub>3</sub>* oksidaz aktivitesinin eksikliğine neden olduğundan, bu genlerin enzim aktivitesi için gerekli, daha önce rapor edilmemiş ve oksidaz biyogenesisizde rol alan yeni genler olduğunu doğruladı.



Şekil 4.1. *R. capsulatus* *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının sıcaklık ve besi yerine bağlı üreme fenotipleri. *R. capsulatus* soyları solunum (üstteki iki sıra) ya da fotosentetik (alttaki iki sıra) üreme koşullarında MPYE veya MedA besi yerlerinde 35°C (soldaki iki sütun) ya da 25°C sıcaklıkta (sağdaki iki sütun) inkübe edildi. Solunumla üreyen koloniler daha sonra Nadi (N) reaksiyonu ile boyandılar. Mutantlar, MPYE besi ortamında 35°C 'de F<sup>-</sup>/N<sup>-</sup>, 25°C 'de F<sup>+</sup>/N<sup>+</sup>; MedA besi ortamında ise 35 ve 25°C 'de F<sup>+</sup>/N<sup>-</sup> fenotipi gösterdiler. Ys, Yaban soy; Δ138, *RRC00138* null mutanı (SA4); Δ139, *RRC00139* null mutanı (SA6), Δ139-138, *RRC00139-138* ikili mutanı (SA8).

#### 4.3. *RRC00138* ve *RRC00139* Genlerinin Dizi Analizi

*R. capsulatus* *RRC00138* ve *RRC00139* genleri genomda 2G06-2D11 isimli DNA parçası üzerinde yer alır. Buna göre, *RRC00139* geni 123.579-122.803 pozisyonunda, *RRC00138* geni ise 122.803-121.976 pozisyonunda bulunur. *RRC00139*, 777 bç uzunluğunda olup, 259 amino asitten oluşur ve tahmini 29.315 Da moleküler ağırlığına sahiptir. *RRC00138* ise 828 bç uzunluğunda olup, 276 amino asitten oluşur ve tahmini 30.718 Da moleküler ağırlığındadır.

*R. capsulatus* genom bilgi bankasında (<http://www.ergo-light.com/ERGO/CGI/>) *RRC00138* gen ürününün membran gliserofosfolipid biyosentezinde gerekli 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açiltransferaz (PlsC, AGPAT) enzimini kodladığı bildirilmiştir. Gerçekten de genom bilgi bankasından elde edilen *RRC00138* amino asit dizisinin BLAST analizleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi/>) yapıldığında, bu protein dizisinin pek çok prokaryotik ve ökaryotik organizmaların AGPAT dizisi (COG0204 ortolog grubu, pfam01553) ile yüksek derecede benzerliğe sahip olduğu görüldü (Şekil 4.2). Örneğin; *RRC00138* amino asit dizisi *E. coli* PlsC dizisi ile %26 oranında aynı ve %39 oranında benzer amino asit içerir. Yine, *RRC00138* dizisi *Saccharomyces cerevisiae* 'nın PlsC dizisi ile %33 oranında aynı ve %48 oranında benzer amino asite sahiptir. *RRC00138*, tıpkı *E. coli* ve diğer organizmalardaki AGPAT 'lar gibi gliserol açiltransferazlara özgün korunmuş dizilere sahiptir. *E. coli* 'de AGPAT enzimi, açil zincirini açil-açil taşıyıcı protein (ACP) ya da açil-koenzim A (CoA) 'dan alarak 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat (lisofosfatidik asit, LPA) 'a transfer ederek, membran gliserofosfolipidlerin öncü bileşeninin (1,2 diaçıl-*sn*-gliserol-3-fosfat (fosfatidik asit, PA)) oluşumunu sağlar (Rock ve ark., 1981).

Diğer yandan *R. capsulatus* genom bankasında *RRC00139* gen ürünü hipotetik sitozolik protein olarak tanımlanmıştır. *RRC00139* hakkında detaylı bilgiye ulaşabilmek için genom bankasından elde edilen *RRC00139* un amino asit dizisi diğer prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genomları ile karşılaştırıldı (BLAST analizi) ve *RRC00139* dizisinin hemolisin fonksiyonuna sahip protein ailesiyle (COG3176 ortolog grubu; Tatusov ve ark., 2001) homolojiye sahip olduğu görüldü.



```

E.coli_PlsC      1  -----MLYIFR-LIITVIYSILVCFVFGSTY----CLFSPRNPK
R.caps_138      1  MTRPIWMGDEPPPPDRPPTLAGRGRRLALRGGAMALVLMAGLTLHLAVRLTERPLHGGRPW
N.meni_NlaA     1  -----MSSNKASFFTR---LRRRLCRLTVWLFKTGKNLRGIDGGCPESR
S.cere_PlsC     1  -----MSVIGRFLLYYLR-SVLVVLALAGCGFYGVFIASLTLCTLIGKQHLA

E.coli_PlsC     34  HVATFGHMFGR LAPLFGLKVECRKPTDAESYGNATYIANHQNNYDMVTASNIIVQPPTVTV
R.caps_138     61  TPAITPVVCRICVAAILGLRYSVRGRPMQHIG---AVVANHTGWLDIFTLN--ACQRLYFV
N.meni_NlaA    41  NRAVIELGRGVLAALDIGLEVGRPAPEHPNG--VLEVAANHVSWLDIFAMS--AVYPSSFIF
S.cere_PlsC    44  QWITARCFYHVMKLMGLDVKVVVEENLAKKP-YIMIANHQSTLDFMLGRIFPPGCTVT

E.coli_PlsC     94  GKKSLLWIPFFGQLYWLTGNLLIDRNNRTKAHGTTAEVNVHFKKRRI SIWMPPEGTRSRG
R.caps_138    116  SKDEVADWPFIFGWLARATGTVFIRRDPRE--AKAQQALLEDRIRDGHHLFFPEGTSTDG
N.meni_NlaA    97  AKQEIKSWPVLGKMGQONAGTVFINRNSRRD-IEPINRAVCETLQRCQNVSFFPEARTSSG
S.cere_PlsC   103  AKKSLKYVPFLGWFMALSGTYFLDRSKRQEAIDTLNKGLENVKKNKRALWVPEGTRSYT

E.coli_PlsC    154  --RGLLPFKTGAFHAAIAAGVPIIPVCVSTTSNKIN--LNRLHNGLVIVEMLPPIDVSQY
R.caps_138    174  --LQVLPFKTTLFAAFYTHGLDRVMQIQPVTVNYTAP-EGEDPRFYGWWRDMPFATHLAK
N.meni_NlaA   156  --LGLLPFKAALFQSAIDAGAKVLAVALRYDETG-----KRTARPSYADVGLPTCLW
S.cere_PlsC   163  SELTMLPFFKKGAFHLAQOGKIPIVPVVVSNTSTLVS PKYGVFNRCMIVRILKPISTENL

E.coli_PlsC    210  GKDQVRELAAHCRSIMEQKIAEL-----DKEVAEREAAGKV-
R.caps_138    231  VLSVARQGAAEVVVFHPPLDVSDFP-----SRKDLAAACEAAVRS
N.meni_NlaA   207  RIVSMKKLTIKVDVFCVADAASE-----DRYALKDKIESIRA
S.cere_PlsC   223  TKDKIGEFAEKVRDQMVDTLKEIGYSPAINDTTLPPQAI EYAALQHDKKVKKIKNEPVP

E.coli_PlsC    -----
R.caps_138    270  GMGQRSR-----
N.meni_NlaA   246  VVADDADI AV-----
S.cere_PlsC   283  SVSISNDV NTHNEGSSVKKMH

```

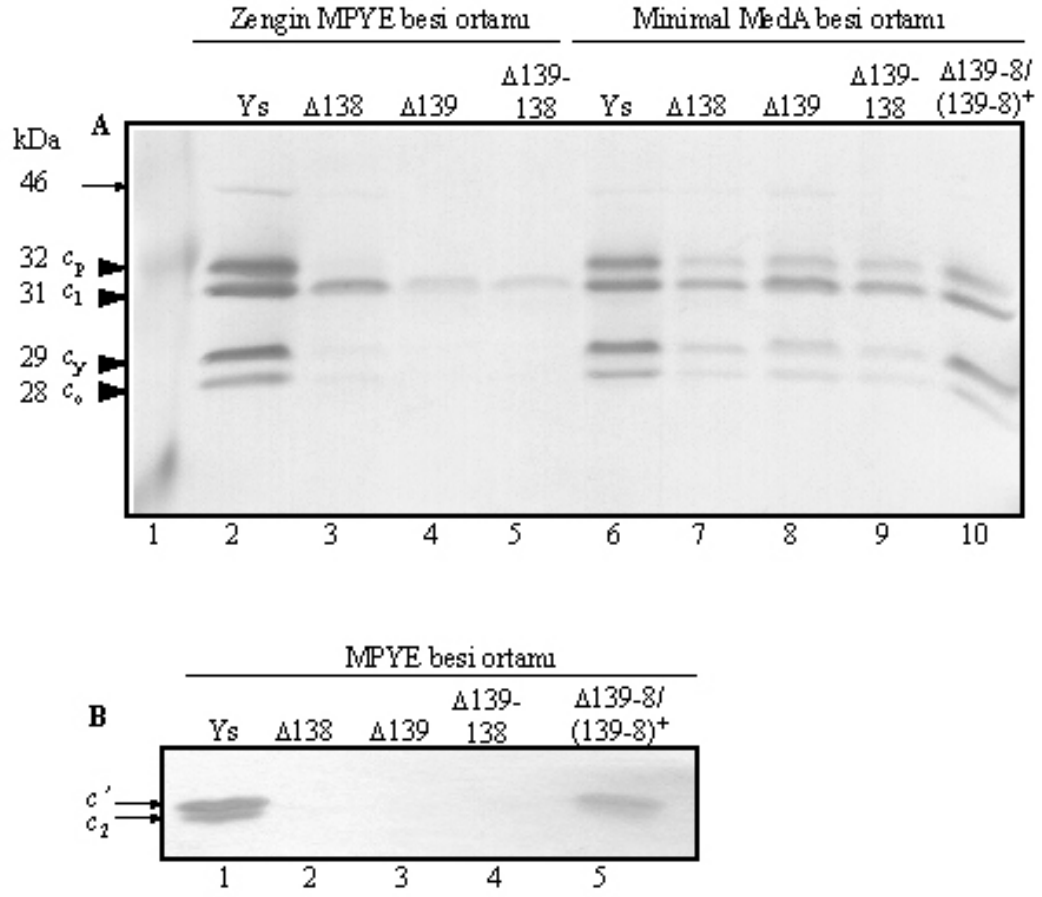
Şekil 4.2. *R. capsulatus* RRC00138 amino asit dizisinin diğer organizmalardaki homologları ile karşılaştırılması.

RRC00138 dizisi (R.caps\_138); *E. coli* (E.coli\_PlsC), *S. cerevisiae* (S.cere\_PlsC) ve *N. meningitidis* (N.meni\_NlaA) bakterilerindeki AGPAT dizileri ile CLUSTAL W programı kullanılarak karşılaştırıldı. BOXSHADE programı kullanarak tam korunmuş amino asit dizileri siyah kutu, kısmen korunmuş diziler ise gri kutu içerisinde gösterildi. Gliserol açıltransferazlarda korunmuş HX4D motifi ise (\*) ile gösterilmiştir.

#### 4.4. *RRC00138* ve *RRC00139* Null Mutantlarının C-tipi Sitokrom Protein Profili

SA4 [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ], SA6 [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] ve SA8 [ $\Delta(RRC00139-RRC00138::spe)$ ] null mutantlarının c-tipi sitokrom içeriği TMBZ/SDS-PAGE (Schägger ve von Jagow, 1987; Thomas ve ark., 1976) analizi ile incelendi (Şekil 4.3-A ve B). Zenginleştirilmiş (MPYE) veya minimal (MedA) besiyerlerinde solunumla üreyen null mutantlarının intrasitoplazmik membran vesikülleri (kromotofor membranı) ve çözünür kısımları Materyal ve Yöntem 'de açıklandığı gibi izole edildi ve proteinler Trisin-SDS-PAGE sisteminde elektroforez ile ayrıştırıldı. C-tipi sitokromlar, içerdikleri kovalent bağlı hem gruplarının peroksidaz aktivitelerinden yararlanılarak, TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığında gözlemlendi.

*R. capsulatus* yaban soyu (MT1131) solunumla üretildiğinde; hücrenin intrasitoplazmik membran vesiküllerinde, 32, 31, 29 ve 28 kDa moleküler ağırlıklarında membrana bağlı dört farklı c-tipi sitokrom proteinleri gözlenir (Şekil 4.3-A; 2. ve 6. kuyular). 31 kDa moleküler ağırlığındaki protein, sitokrom  $bc_1$  kompleksinin  $c_1$  alt birimi (Gray ve ark., 1994; Jenney ve ark., 1994), 29 kDa ağırlığındaki protein ise, membrana bağlı elektron taşıyıcı görevi yapan sitokrom  $c_y$  proteinidir (Jenney ve Daldal, 1993; Jenney ve ark., 1994; Myllykallio ve ark., 1999). 32 ve 28 kDa moleküler ağırlığındaki proteinler ise, sitokrom  $cbb_3$  oksidaz 'ın sitokrom  $c_o$  ve  $c_p$  alt birimleridir (Gray ve ark., 1994; Koch ve ark., 1998). Suda çözünür formda ise yaban soy yaklaşık 14 kDa moleküler ağırlığındaki sitokrom  $c_2$  ve sitokrom  $c'$  proteinlerini içerir (Şekil 4.3-B; 1. kuyu).



Şekil 4.3. *R. capsulatus* *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının *c*-tip sitokrom protein profili.

Zenginleştirilmiş MPYE veya minimal MedA besi ortamında optimal sıcaklıkta (35°C) aerobik koşullarda üreyen yaban soy ve null mutantlarından izole edilen intrasitoplazmik membran vesikülleri (A) ve 35°C sıcaklıkta MPYE besi ortamında üreyen hücrelerden izole edilen çözünür kısım (B) %16.5'luk Trisin-SDS-PAGE 'de ayrıştırıldı (Schägger ve von Jagow, 1987). Elektroforezden sonra, TMBZ (3',3',5',5-tetrametilbenzidin) boyama (Thomas ve ark., 1976) ile *c*-tipi sitokromların varlığı gözlemlendi.  $c_p$  ve  $c_o$ , sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enziminin alt birimleri;  $c_1$ , sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksinin alt birimi;  $c_y$ , membrana bağlı elektron taşıyıcı protein;  $c_2$ , periplazmik elektron taşıyıcı protein. Ys, Yaban soy (MT1131);  $\Delta 138$ , *RRC00138* null mutantı (SA4);  $\Delta 139$ , *RRC00139* null mutantı (SA6),  $\Delta 139-138$ , *RRC00139-138* ikili mutantı (SA8);  $\Delta 139-8/(139-8)^+$ , kromozomal DNA parçasını taşıyan *RRC00139-138* ikili mutantı (SA8/pMRC).

*RRC00139* ve *RRC00138* null mutantları optimal sıcaklıkta (35°C) aerobik koşullarda üretildiklerinde besi yerine bağlı farklı *c*-tipi sitokrom profili içerdikleri görüldü. Buna göre, zengin MPYE besi ortamında üreyen mutant hücrelerden izole edilen intrasitoplazmik membran vesiküllerinde yaban soya kıyasla az miktarda olmakla beraber sadece sitokrom  $c_1$  proteini gözlemlendi (Şekil 4.3-A; 3-5. kuyular). Çözünür kısım incelendiğinde ise mutantların sitokrom  $c_2$  proteinini üretmedikleri görüldü (Şekil 4.3-B; 2-4. kuyular). Buna karşılık, minimal MedA besi yerinde üreyen mutantlardan elde edilen intrasitoplazmik membran vesikülleri ve çözünür kısım incelendiğinde ise yaban soya kıyasla az miktarda olmakla beraber tüm *c*-tipi sitokromları içerdikleri görüldü (Şekil 4.3-A; 3-5. kuyular ve data gösterilmemiştir). SA4, SA6 ve SA8 null mutantlarının Nadi fenotipini tamamlayabilen pMRC plazmiti aktarıldığında ise elde edilen transkonjugantların beklenildiği gibi tüm *c*-tipi sitokrom proteinleri yaban soy oranında üretebildikleri görüldü (Şekil 4.3-A; 10. kuyu).

Fotosentetik koşullarda minimal MedA besi ortamında üreyen SA4, SA6 ve SA8 null mutantlarından izole edilen intrasitoplazmik membran vesikülleri incelendiğinde mutantların yaban soyda olduğu gibi sitokrom  $c_1$  ve sitokrom  $c_y$  proteinlerini içerdikleri görüldü. Ancak mutant hücrelere ait çözünür kısım incelendiğinde ise mutantların periplazmik sitokrom  $c_2$  'yi sentezlemediği belirlendi (data gösterilmemiştir).

#### **4.5. *RRC00138* ve *RRC00139* Null Mutantlarının Zengin Besi Ortamındaki (MPYE) Sıcaklığa Bağlı Fenotipi**

*RRC00139* ve *RRC00138* null mutantlarının optimal sıcaklıkta (35°C) besi yerine bağlı farklı fenotipik özellikleri dikkate alınarak, mutantların düşük sıcaklıkta gösterdikleri fenotipler de incelendi. Buna göre null mutantları farklı besi ortamında 25°C sıcaklıkta üretildi ve mutantların Nadi fenotipleri, fotosentetik üreme özellikleri ve *c*-tipi sitokrom profili irdelendi (Çizelge 4.3; Şekil 4.1 ve Şekil 4.4). *RRC00138* (SA4), *RRC00139* (SA6) ve *RRC00139-RRC00138* (SA8) mutantlarının 35°C sıcaklıkta MPYE besiyerinde gösterdikleri Nadi<sup>-</sup> fenotipinin aksine, 25°C 'de mutantlar sitokrom *c* oksidaz aktivitelerini geri kazandılar (Nadi<sup>+</sup>). Ayrıca, mutantların 25°C 'de oksijensiz fotosentetik koşullarda MPYE besi ortamında üreme yeteneklerini geri kazandıkları da

gözlendi (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1). Bundan başka, SA4 mutantının 25°C sıcaklıkta MPYE besiyerinde üreyen hücrelerinden izole edilen kromotofor membranları incelendiğinde de mutantın yaban soya kıyasla az olmakla beraber membrana bağlı tüm *c*-tipi sitokrom proteinlerini içerdiği görüldü (Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının farklı sıcaklık ve besi ortamlarında fotosentetik üreme özellikleri ve Nadi fenotipleri.

Mutant	35 °C				25 °C			
	MedA <sup>a</sup>		MPYE <sup>a</sup>		MedA		MPYE	
	Nadi <sup>b</sup>	F <sup>c</sup>	Nadi	F	Nadi	F	Nadi	F
SA4 ( $\Delta RRC00138::spe$ )	-	+	-	-	-	+	+	+
SA6 ( $\Delta RRC00139::spe$ )	-	+	-	-	-	+	+	+
SA8 [ $\Delta(RRC00138-139)::spe$ ]	-	+	-	-	-	+	+	+

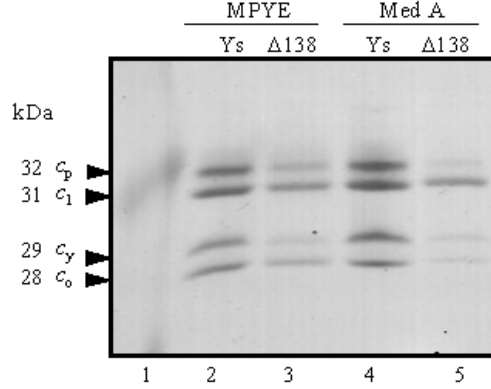
<sup>a</sup>MedA, minimal besi yeri; MPYE, zenginleştirilmiş besi yeri;

<sup>b</sup>Nadi<sup>+</sup> ya da Nadi<sup>-</sup>, sitokrom *c* oksidaz aktivitesinin varlığını ya da yokluğunu;

<sup>c</sup>F, fotosentez ile üremeyi; + ve - ise belirtilen koşullar altında soyların üreme yeteneğini gösterir.

Mutantların sıcaklığa bağlı MPYE besiyerinde gösterdikleri farklı fenotiplerinin aksine mutantlar 25°C sıcaklıkta MedA besiyerinde tıpkı 35°C sıcaklıkta olduğu gibi Nadi<sup>-</sup> fenotipi gösterdi (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1). Diğer yandan, 25°C sıcaklıkta MedA besiyerinde üreyen SA4 mutantının intrasitoplazmik vesikülleri incelendiğinde 35°C 'de gösterdikleri protein profilinin aksine birçok *c*-tipi sitokrom proteinlerini daha düşük miktarda içerdiği görüldü (Şekil 4.4). Mutanlarda gözlenen sıcaklığa bağlı bu fenotip değişikliklerini anlamak için sıcaklık-değişim deneyi yapıldı. Buna göre, mutantlar MPYE besiyerinde 25°C sıcaklıktaki inkübatörde 2-3 gün süreyle üretildi ve daha sonra 35°C 'lik inkübatöre transfer edilerek 1-2 gün daha üremeye bırakıldı. Mutantların Nadi fenotipleri incelendiğinde ise sitokrom oksidaz aktivitelerini

kaybettikleri görüldü ( $\text{Nad}^-$ ). Bunun aksine,  $35^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki inkübatörde iki gün süreyle üretildikten sonra  $25^\circ\text{C}$  'lik inkübatörde 1-2 gün üremeye bırakıldıklarında ise oksidaz aktivitelerini geri kazandıkları ve böylece  $\text{Nad}^+$  fenotipi gösterdikleri görüldü.



Şekil 4.4. *R. capsulatus* *RRC00138* null mutantının (SA4)  $25^\circ\text{C}$  sıcaklıkta MPYE veya MedA besi ortamında aerobik koşullarda üreyen hücrelerinden izole edilen intrasitoplazmik membran vesiküllerindeki *c*-tip sitokrom profili.

#### 4.6. *RRC00139* Geni *RRC00138* 'in İşlevselliğinde Polar Etki Göstermez

Genetik tamamlama testleri ile *RRC00138* genini içeren pMRC2 plazmitinin IJ1 ve SA4/SA1 mutantlarını; *RRC00139* genini içeren pMRB/pAY1 plazmitlerinin de MR2/AYG4-25 ve SA6 mutantlarının  $\text{Nad}^-$  fenotiplerini tamamladığı görüldü. *RRC00139* geninin, *RRC00138* geninin işlevselliğinde herhangi bir polar etkisinin olup olmadığını anlamak için detaylı genetik tamamlama testleri yapıldı. Buna göre, pSEM4 (*RRC00138::spe*) plazmiti SA6 mutantına [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ]; pSEM9 [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ] plazmiti ise SA4 [*RRC00138::spe*] mutantına aktarıldı ve elde edilen transkonjugantların  $\text{Nad}^-$  fenotipleri incelendi. SA6/pSEM4 ([ $\Delta(RRC00139::spe)$ ]/(*RRC00138::spe*)) ve SA4/pSEM9 ([ $\Delta(RRC00138::spe)$ ]/ [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ]) transkonjugantları sitokrom *c* oksidaz aktivitelerini geri kazanarak  $\text{Nad}^+$  fenotipi gösterdi. Bu sonuç, *RRC00139* genindeki interpozon mutagenesizin *RRC00138* geninin işlevselliğinde herhangi bir polar etkisinin olmadığını gösterdi.

#### 4.7. *RRC00138* Geninin *E. coli plsC(Ts)* Mutant Fenotipini Tamamlama Yeteneği

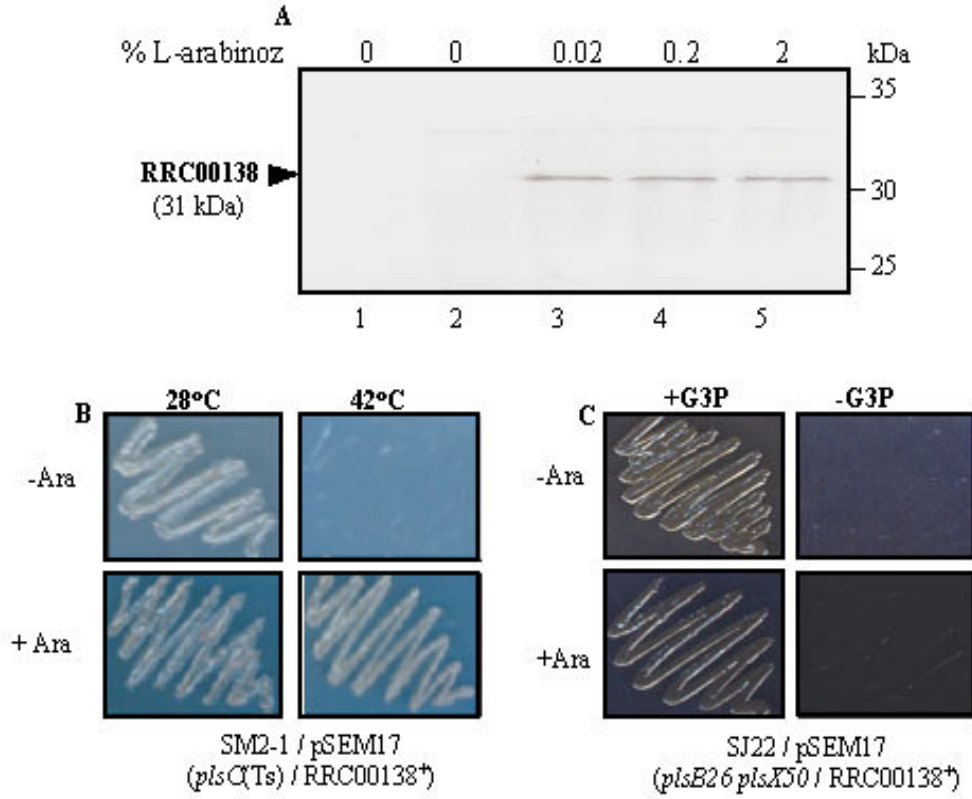
*RRC00138* 'in amino asit dizisi AGPAT ailesi ile yüksek derecede benzerlik gösterdiğinden, *RRC00138* geninin AGPAT aktivitesine sahip bir enzim kodlayıp kodlamadığı incelendi. Bu amaçla, *RRC00138* geni *E. coli plsC(Ts)* mutantına (SM2-1) aktarılarak, genin mutasyonu tamamlama yeteneği test edildi. SM2-1 mutanı *plsC* 'nin sıcaklığa duyarlı (Ts) allelini taşır ve 42°C sıcaklıkta üreyemez (Coleman, 1990). *RRC00138* geninin tamamlama yeteneğini test edebilmek için, öncelikle *RRC00138* geni P<sub>BAD</sub> promotörü altında L-arabinoz ile indüklenebilen pBAD/*Myc*-HisA vektörüne klonlandı (pSEM17 plazmiti, Şekil 3.5B). *RRC00138* geninin SM2-1 mutantındaki işleyişi L-arabinozun indüksiyonu ile gerçekteşi ve genin işlevselliği Anti-*myc* antikoru varlığında immunoblot analizi ile gözlemlendi. Buna göre, %0.02, 0.2 ve 2 'lik L-arabinoz ile indüklenen SM2-1/pSEM17 transformant hücrelerinden izole edilen protein ekstraktlarında, yaklaşık 31 kDa büyüklüğünde bir protein bandı gözlemlendi (Şekil 4.5-A, 3-5. kuyu). Bu değer, *RRC00138* gen ürünü için hesaplanan 30.718 Da moleküler ağırlığına denk gelmektedir. Bu protein bandı, L-arabinoz ile indüklenmeyen hücrelerden elde edilen protein ekstraktlarında ise gözlenmedi (Şekil 4.5-A, 2. kuyu).

Genetik tamamlama testi için, SM2-1/pSEM17 transkonjugantı farklı L-arabinoz konsantrasyonlarında hazırlanan LB petri kabına çizilerek, 42°C 'lik inkübatörde üretildi. %2 ve %0.2 'lik L-arabinoz içeren besi ortamında tam (Şekil 4.5-B); %0.02 'lik L-arabinoz içeren besi ortamında ise az bir üreme gözlemlendi. Negatif kontrol olarak çizilen SM2-1/pBAD-*Myc*-HisA transkonjugantında ise herhangi bir üreme gözlenmedi.

*R. capsulatus* 'da bugüne kadar henüz tanımlanmış *plsB* homologu bulunmadığından *RRC00138* geninin AGPAT ile birlikte GPAT aktivitesini de kodlayıp kodlamadığı test edildi. *In vivo* koşullarda *RRC00138* gen ürününün GPAT aktivitesini test etmek için, *RRC00138* genini taşıyan plazmit *E. coli plsB26*, *plsX50* G3P oksotrofik mutantına (SJ22; Rock ve Jackowski, 1982) aktarılarak, genin mutasyonu tamamlama yeteneği incelendi. *E. coli* SJ22 mutantında, *plsB26* alleli mutant proteinin kararlılık özelliğini ve enzimin kinetiğini değiştiren missense mutasyonu taşır. Diğer yandan

*plsX50* alleli ise missense mutasyonu taşımakta olup, *plsB* mutantının G3P oksotrofik özellik göstermesi için mutlak gereklidir. pSEM17 plazmitinin SJ22 mutantına aktarılmasıyla elde edilen transformant G3P 'dan yoksun ancak farklı L-arabinoz konsantrasyonlarına sahip minimal besi yeri (MedE) içeren petri kaplarında optimal üreme sıcaklığında (37°C) üretildi. SJ22/pSEM17 transformantı yüksek L-arabinoz (%2) içeren besi ortamında bile herhangi bir üreme göstermedi (Şekil 4.5-C). Tüm bu sonuçlar bize *R. capsulatus RRC00138* geninin özgün AGPAT aktivitesiyle *E. coli plsC* geninin fonksiyonel homoloğu olduğunu gösterdi.





Şekil 4.5. *R. capsulatus* RRC00138 gen ürününün *E. coli* 'deki işleyişi ve *E. coli* *plsC* ve *plsB-plsX* mutantlarının üreme fenotipini tamamlama yeteneği.

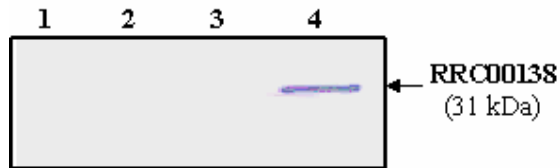
(A) İmmunoblot analizi. (1), L-arabinoz ile indüksiyondan önceki; (2), indüklenmemiş total; (3), %0.02 'lik L-arabinoz ile indüklenmiş; (4) %0.2 'lik L-arabinoz ile indüklenmiş ve (5), %2 'lik L-arabinoz ile indüklenmiş hücre ekstraktları %12 'lik SDS-PAGE de ayrıştırıldı ve PVDF membranına transfer edilerek RRC00138 proteini Anti-myc antikoru ile gözlemlendi.

(B) RRC00138 genini taşıyan *E. coli* sıcaklığa duyarlı mutantın (*plsC(Ts)*) %2 'lik L-arabinozun varlığında veya yokluğunda üreyebilme yeteneği.

(C) RRC00138 genini taşıyan *E. coli* gliserol-3-fosfat oksotrofik mutantın %2 'lik L-arabinozun varlığında veya yokluğunda üreyebilme yeteneği.

#### 4.8. *RRC00138* Gen Ürünün *R. capsulatus* 'daki İşlevselliği

*RRC00138* gen ürününün *R. capsulatus* 'daki işleyişini gözlemek için öncelikle pBAD promotörü tarafından kontrol edilen *RRC00138* genini taşıyan plazmit pRK415 plazmitine klonlanarak pSEM18 plazmiti (Şekil 3.6) elde edildi ve rekombinant plazmit SA1 (*RRC00138::spe*) mutantına çaprazlamayla aktarıldı. SA1/pSEM18 transkonjugantı ve negatif kontrol olarak kullanılan SA1 mutanı %2 L-arabinoz içeren veya içermeyen MPYE besiyerinde üretildi ve hücrelerden izole edilen kromotofor membranlarındaki *RRC00138* proteinin işleyişi immunoblot tekniği ile incelendi. Beklenildiği gibi yaklaşık 31 kDa moleküler ağırlığındaki protein bandı %2 L-arabinoz içeren besi ortamında üreyen SA1/pSEM18 transkonjugantında gözlemlendi (Şekil 4.6, 4. kuyu). Diğer yandan, SA1/pSEM18 transkonjugantının L-arabinoz içeren veya içermeyen MPYE besiyerlerindeki Nadi fenotipi ve *c*-tipi sitokrom profili de incelendi. L-arabinozun varlığı veya yokluğunda transkonjugantın Nadi reaksiyonunu katalizleyebildiği ve tüm *c*-tipi sitokrom proteinlerini yaban soy oranında üretebildiği gözlemlendi (data gösterilmemiştir).

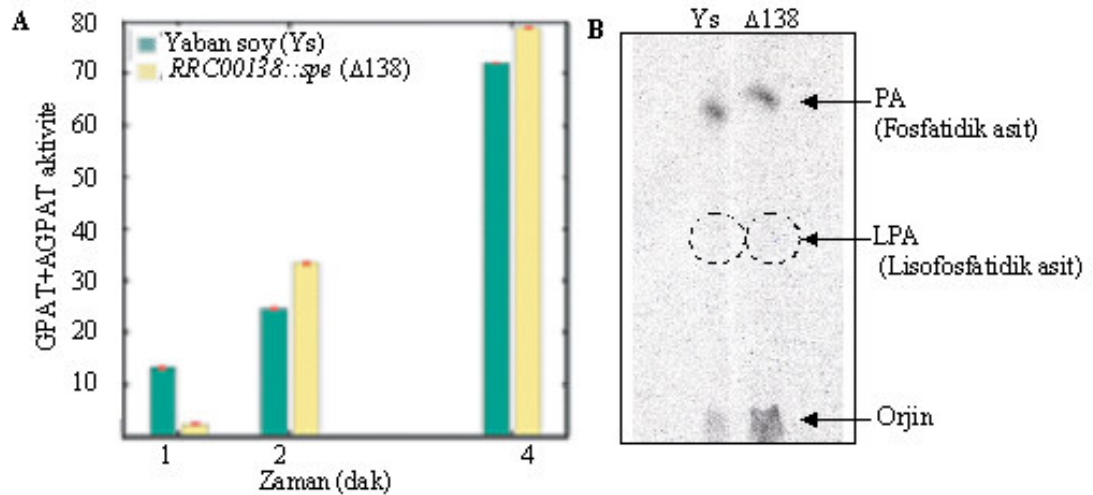


Şekil 4.6. *R. capsulatus* *RRC00138* gen ürününün *R. capsulatus* 'daki işleyişinin immunoblot tekniği ile analizi.

(1), (*RRC00138::spe*) mutantının indüklenmemiş; (2), (*RRC00138::spe*) mutantının %2 'lik L-arabinoz ile indüklenmiş; (3) (*RRC00138::spe*)/(*RRC00138*)+ transkonjugantının indüklenmemiş; (4), (*RRC00138::spe*)/(*RRC00138*)+ transkonjugantının %2 'lik L-arabinoz ile indüklenmiş hücrelerinden izole edilen kromotofor membranları immünoblot tekniği ile incelendi.

#### 4.9. *RRC00138* Null Mutantında *İn vitro* GPAT+AGPAT Aktivite Testi

*RRC00138* ile diğer AGPAT homologlarının protein düzeyinde gösterdikleri homoloji, *RRC00138* gen ürününün *R. capsulatus* 'da AGPAT olarak görev alabileceği ihtimalini getirdi. Bu nedenle, *in vitro* koşullar altında açıl vericisi olarak *cis*-vasenil-ACP ve açıl alıcısı olarak [ $^{14}\text{C}$ ]-G3P kullanılarak *R. capsulatus* yaban soy (MT1131) ve *RRC00138* null mutantının (SA1) intrasitoplazmik membran vesiküllerinde GPAT+AGPAT aktiviteleri Materyal ve Yöntemde açıklandığı gibi "filter-disk" testi (Goldfine, 1969) ile incelendi. Buna göre, *RRC00138* mutantının yaban soy oranında G3P açıltransferaz aktivitesi gösterdiği görüldü (Şekil 4.7A). Ayrıca, her iki soya ait reaksiyon karışımı silika tabakada ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemiyle ayrıştırıldığında da *RRC00138* mutantının yaban soy ile benzer oranda PA 'yı üretebildiği gözlemlendi (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7. *R. capsulatus* yaban soy ve *RRC00138* null mutantının *in vitro* koşullardaki GPAT+AGPAT aktivite testi.

A) MPYE besi ortamında solunumla üreyen yaban soy ve *RRC00138* mutantına ait intrasitoplazmik membran vesikülleri  $^{14}\text{C}$ -G3P ile işaretlendi ve farklı zaman noktalarında alınan örneklerdeki enzim aktivitesi ölçüldü.

B)  $^{14}\text{C}$ -G3P ile işaretlenen intrasitoplazmik membran vesiküllerindeki lipidler izole edildi ve TLC tabakada ayrıştırıldı. LPA, lisofosfatidik asit; PA, fosfatidik asit; Ys, yaban soy;  $\Delta$ 138, *RRC00138* null mutantı (SA1).

*R. capsulatus* 'da *RRC00138* geninin inaktivasyonun letal olmaması, mutantların yaban soy oranında G3P açıltransferaz aktivitesi göstermesi ve PA 'yı üretebilmesi bize c-tipi sitokrom proteinlerinin yokluğunun gliserofosfolipid biyosentez yolundaki bir eksiklikten kaynaklanmadığını göstermektedir. Ayrıca bu sonuç *R. capsulatus* 'un *E. coli* 'den farklı olarak gliserofosfolipid biyosentezi için alternatif AGPAT enzim(ler)ini de kullanabileceğini gösterdi. Biyoinformatik analizlerle *R. capsulatus* genomunda AGPAT protein dizisi ile homoloji gösteren iki açık okuma bölgesi (*RRC00316* ve *RRC03498*) tespit edildi. *RRC00316* geni, genomda *RRC00138* ile aynı bölgede yer alırken, *RRC03498* geni ise genomda bu iki genden farklı bir bölgede yer almaktadır.

#### **4.10. RRC00138 ve RRC00139 Aminoasit Dizilerinin Ornitin Lipid Biyosentezini Katalizleyen Gen Ürünlerin Dizileri ile Homolojisi**

Yeni yapılan biyoinformatik analizlerle, *RRC00138* geninin amino asit dizisinin bitkilerde nodül oluşturan *Sinorhizobium meliloti* OlsA protein dizisi ile yüksek derecede homoloji gösterdiği görüldü (%29 oranında aynı ve %25 oranında benzer amino asit) (Şekil 4.8). Benzer şekilde, *RRC00139* amino asit dizisi de aynı bakterinin OlsB dizisi ile yüksek derecede benzerlik gösterdi (%34 oranında aynı ve %28 oranında benzer amino asit) (Şekil 4.9). *olsA* ve *olsB* gen ürünleri *S. meliloti* 'de ornitin lipid (OL) biyosentez yolunda gerekli genlerdir (Gao ve ark., 2004; Weissenmayer ve ark., 2002). *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin protein düzeyinde OlsA ve OlsB dizileriyle homoloji göstermesi, bize *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin *R. capsulatus* 'da OL biyosentezinden sorumlu genler olabileceği ihtimalini getirdi. Bu nedenle, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarındaki membran polar lipid profilleri incelenerek, bu iki genin OL biyosentezinde gerekli genler olup olmadığı araştırıldı.

```

R.caps_138      MTRPIWMGDEPP PDRP PTLA GRGRLALRGGAMALVLMAGL TLHLAVRL IERP LHGGHRPW
S.meli_olsA     MIN--WV-----RVALCG---MLLVMVSLVL-MPVQILCLWLDLKPRRW
* . *:          *: ** *   *: *. *. * :. *: : : * . * *

R.caps_138      TPAITPVVCRICVAILGLRYSVRGRP-MQHIGAVVANHTGWLDIFTLNACQRLYFVSKDE
S.meli_olsA     LPRHWHRV--ACL-LLGLRVRVHGELDRRPLLLSANHVSWKDILVLS SVADVVFVAKSD
*   *   *: :**** *:*.  ::   : ***..* **:..* : : **:*.:

R.caps_138      VADWPFIGWLARATGTVFIRRD-PREAKAQQALLEDRI RDGHHL LFFPEGTSTDGLQVLP
S.meli_olsA     VKSWPIFGLLARLQASVFVEREQKRTTGHQVNDIGRRLADGEIVVLFPEGTTSDGNRLLD
* .**::* *** .:***.*: * : * : * : ** . : :*****:*** ::*

R.caps_138      FKITL F---AAFYTHGLDKVMQIQPVTVNYT---APEGEDPR-FYGWWRDMPFATHLAK
S.meli_olsA     IKTSLFGAAASAVPQSPTGVVHVQPLAISYTG IHGMPMGRYHRPIAAWPGDIGLVPHLLG
:***:** *:  ..  *::**::*.** * *. * : .* *: :..**

R.caps_138      VL-----SVARQGAAEVV FHP-PLDVS-----D-FPSRKDLAA-----AC
S.meli_olsA     VLREGALEVDVD FGEAVDYDRHANRKEVSR LI GQRIRKMLSDRLRGRSRSAAKGEPA PAC
**          .*   *.:  *.   :**          * : .*  **      **

R.caps_138      EAA--VRS GMGQRSR---
S.meli_olsA     SAAPDIPSDA-QRSRLAP
.*. : * . *****

```

Şekil 4.8. *R. capsulatus* RRC00138 'in amino asit dizisi ile *S. meliloti* OlsA 'in amino asit dizisinin karşılaştırılması. (\*), her iki proteinde de korunmuş amino asitleri; (:) ve (.) ise her iki proteinde bulunan benzer amino asitleri gösterir.

```

R.caps_139 -----MAAAPLS-----YEIRLARDAQE IRAS QRLRYAVFV
S.meli_olsB MTIELLDSMGVVDTSNAYIRKAVAAPA SDVL GRIANLETRLAR SAAE IDAA QAVRYRVFV
                .*** *                * ****.* ** *:* :** ***

R.caps_139 EELGG-AGPLIDHENRLEADEFDPLYDHLVL IDATKPEEDLDRVVAAYRLLRS DRAAEI G
S.meli_olsB EEMKAQVAPEAGRKR-DID S WDAICDHLVLDTSIEGDAEEQIVGTYRLLRQDVAERTG
** : . . .* . : : * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

R.caps_139 RFYCDAEYDLTPL--RASGRLLLE LGRS CVHPDHRGGAAMLMLWNALADYVLAHE IEIL F
S.meli_olsB GFYSASEFAIGE LLSRHPGKRFMELGRSCVL PEYR TKRTVELLWQGNWAYALKHG IDAMF
** . : * : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

R.caps_139 GVASFHGTDVAALQQPLAWLHHHHLAPEG LRP RAR-QFQR-MD LVAKEALDRRAALDAMP
S.meli_olsB GCGS FPGVVPEEHALALSFLHNVVRDEWAVSARPELYRTMD LMPPEAINPKKALAALP
* . ** * . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

R.caps_139 NLIKAYLRLGGFVGE GAFVDRPFNTTDVMLLMDTQAMSEKHRE FYTRRVEGRG
S.meli_olsB PLIKGYMRLGAMVGDGAVVDQAFRTTDVLIVLP IGTKISGRYLNYY----GAD
***.* : ***.* : ** : **.* : * . ***** : : : * : : : * * .

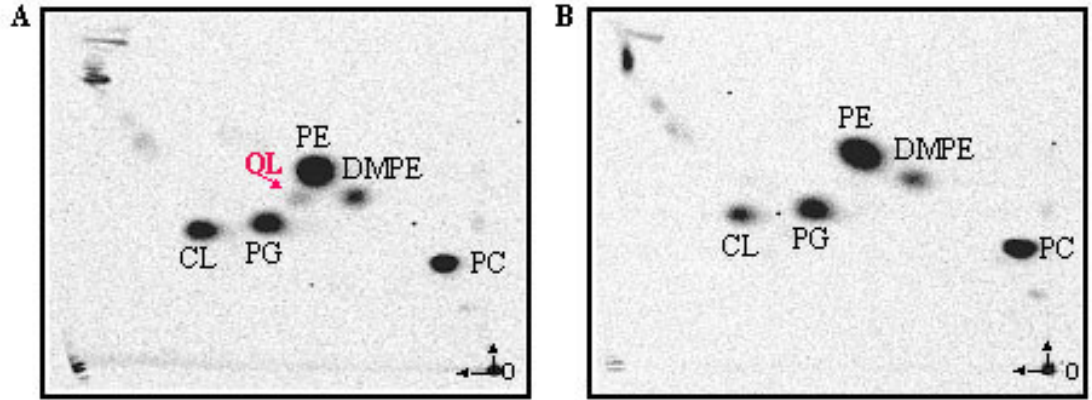
```

Şekil 4.9. *R. capsulatus* RRC00139 'in amino asit dizisi ile *S. meliloti* OlsB 'in amino asit dizisinin karşılaştırılması.

(\*), her iki proteinde de korunmuş amino asitleri; (:) ve (.) ise her iki proteinde bulunan benzer amino asitleri gösterir.

#### 4.11. *RRC00138* ve *RRC00139* Null Mutantlarının Membran Polar Lipid Profili

*R. capsulatus* MT1131 yaban soy, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarına ve transkonjugantlara ait [ $^{14}\text{C}$ ]asetat ile işaretlenmiş veya işaretlenmemiş hücrelerden toplam hücresel lipidleri Materyal ve Yöntem 'de açıklandığı gibi izole edildi. Membran polar lipidleri [fosfatidilethanolamin (PE), dimetilfosfatidilethanolamin (DMPE), diaçilgliseril trimetilhomoserin (DGTS), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilkolin (PC) ve ornitin lipid (OL)] relatif mobiliteleri (RF), uygun referans kimyasal ve özgün bileşiklerden yararlanılarak ve *S. meliloti* yaban soyunun (Sm-1021) lipid profili (Weissenmayer ve ark., 2002; Gao ve ark., 2004) (Şekil 4.10) ile karşılaştırılarak tanımlandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. *S. meliloti* yaban soy ve *OlsB* mutantının membran polar lipid profili. Minimal MedA besi yerinde [ $^{14}\text{C}$ ]asetat varlığında üreyen *S. meliloti* 1021 yaban soyu (A) ve *OlsB* null mutantının [ $\Delta(olsB::kan)$ , AAK1] (B) lipid ekstraktları iki boyutlu ince tabaka kromatografi (2D-TLC) tekniği ile ayrıştırıldı. Membran lipidleri, fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil ethanolamin (PE), dimetilfosfatidilethanolamin (DMPE), fosfatidil kolin (PC), kardiolipin (CL) ve ornitin lipid (OL) TLC kromatogramında gösterilmiştir. Solvent sistemi olarak birinci boyut ( $\uparrow$ ) için kloroform/metanol/ $\text{dH}_2\text{O}$  (14:6:1, v/v/v) ve ikinci boyut ( $\leftarrow$ ) için ise kloroform/metanol/glasiyal asetik asit (13:5:2, v/v/v) kullanıldı (de Rudder ve ark., 1999). O, orjin.

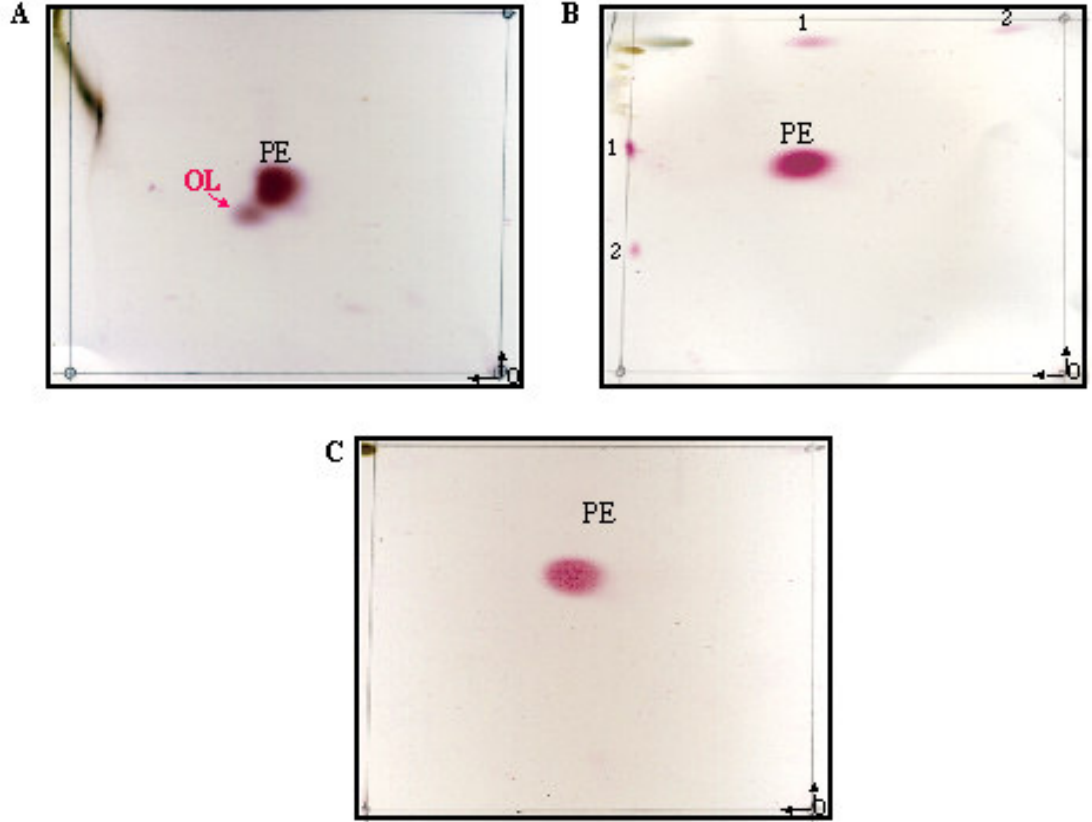
*R. capsulatus* MT1131 yaban soyuna ait toplam lipid ekstraktı [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat ile işaretlenmiş veya işaretlenmemiş hücrelerden izole edildi ve iki boyutlu ince tabaka kromatografi (2D-TLC) tekniği ile ayrıştırıldı (Şekil 4.11A, 4.12A, 4.13A). Radyoaktif ile işaretlenmemiş toplam hücre lipid ekstraktları kromatogramda ayrıştırıldıktan sonra serbest amino gruplarını taşıyan lipidleri (PE ve OL) gözlemek için kromatograma ninhidrin boyası püskürtüldü. Boyama sonunda sadece iki lipid lekesi ninhidrin boyası ile reaksiyon göstererek kırmızı-mor renk verdi (Şekil 4.11A). Daha sonra membran gliserofosfolipidlerini gözlemek için kromatograma molibdenum mavisi püskürtüldü. Fosfat grubu içeren lipidlere ait spotlar molibdenum boyası ile mavi renk verdi (örneğin, PE, PG, PC, data gösterilmemiştir). Ninhidrin-pozitif ve molibdenum mavisi-pozitif gösteren lipid lekesi kromatograma yüklenen farklı ticari lipid markırların yardımıyla PE olarak tanımlandı. Ancak PE nin hemen altında yer alan diğer ninhidrin-pozitif lekesi ise molibdenum mavisi ile reaksiyon göstermedi. *S. meliloti* de aynı 2D-TLC solvent sistemi kullanıldığında gözlenen bu ninhidrin-pozitif ve molibdenum mavisi-negatif lekenin kütle spektrometrik analizler ile OL olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.11A ve Geiger ve ark., 1999). Yine kullanılan lipid markırları sayesinde molibdenum mavisi-pozitif fakat ninhidrin-negatif lipid lekelerin de PC ve PG 'ye karşılık geldiği görüldü (data gösterilmemiştir).

MT1131 yaban soyunun [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat ile işaretlenmiş hücrelerinden izole edilen lipidler 2D-TLC 'de ayrıştırıldı ve radyoaktif lipid lekeleri *S. meliloti* yaban soy hücrelerine ait lipid profili (Şekil 4.10A) ile karşılaştırıldı. Buna göre, PE, PG, PC, DMPE ve OL 'nin varlığı diğer yandan CL 'nin yokluğu *R. capsulatus* yaban soyunda gözlemlendi (Şekil 4.12A ve Şekil 4.13A).

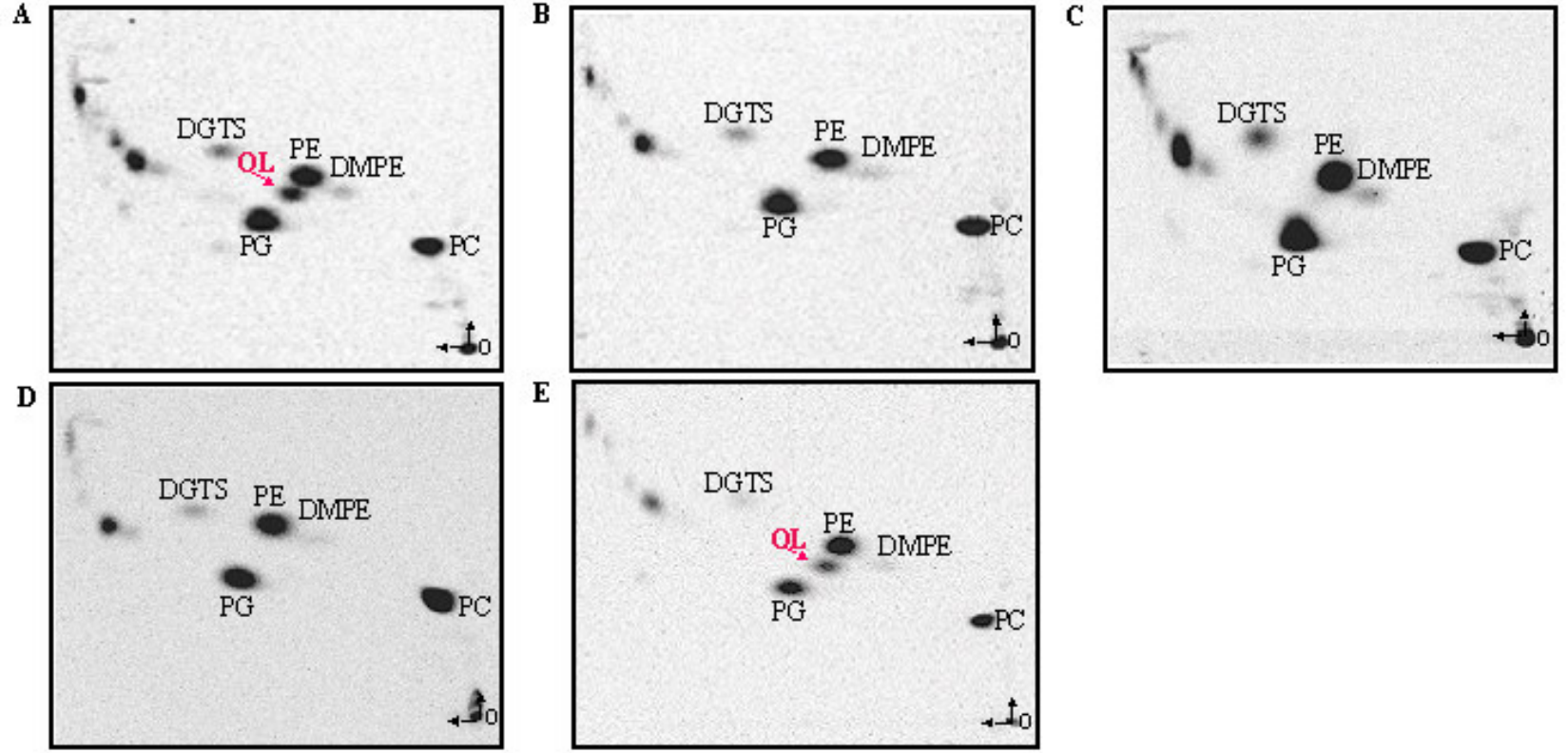
MPYE veya MedA besiyerlerinde [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat varlığında ya da yokluğunda üreyen SA4, SA6 ve SA8 null mutantlarına ait hücresel lipidler analiz edildiğinde, mutantların yaban soy oranında membran fosfolipidlerini (PE, PC, PG ve DMPE) üretebildikleri gözlemlendi (Şekil 4.12B, C ve D, Şekil 4.13B ve C). Ancak OL 'e karşılık gelen lipid lekesi hem ninhidrin boyamayla (Şekil 4.11B ve C) hem de fosfoimager da görülmedi (Şekil 4.12B, C ve D; Şekil 4.13B ve C). Ayrıca farklı besi ortamlarında (MPYE veya MedA) üreyen mutantlarda OL 'nin gözlenmemesi OL 'nin yokluğunun



besi ortamında bağlı olmadığını gösterdi (Şekil 4.12B, C ve D; Şekil 4.13B ve C). Diğer yandan, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının Nadi fenotipini tamamlayan pMRC plazmitini taşıdıklarındaki OL 'i üretebilme yeteneği incelendiğinde ise transkonjugantların OL 'i yaban soy oranında üretebildikleri gözlemlendi (Şekil 4.12D).

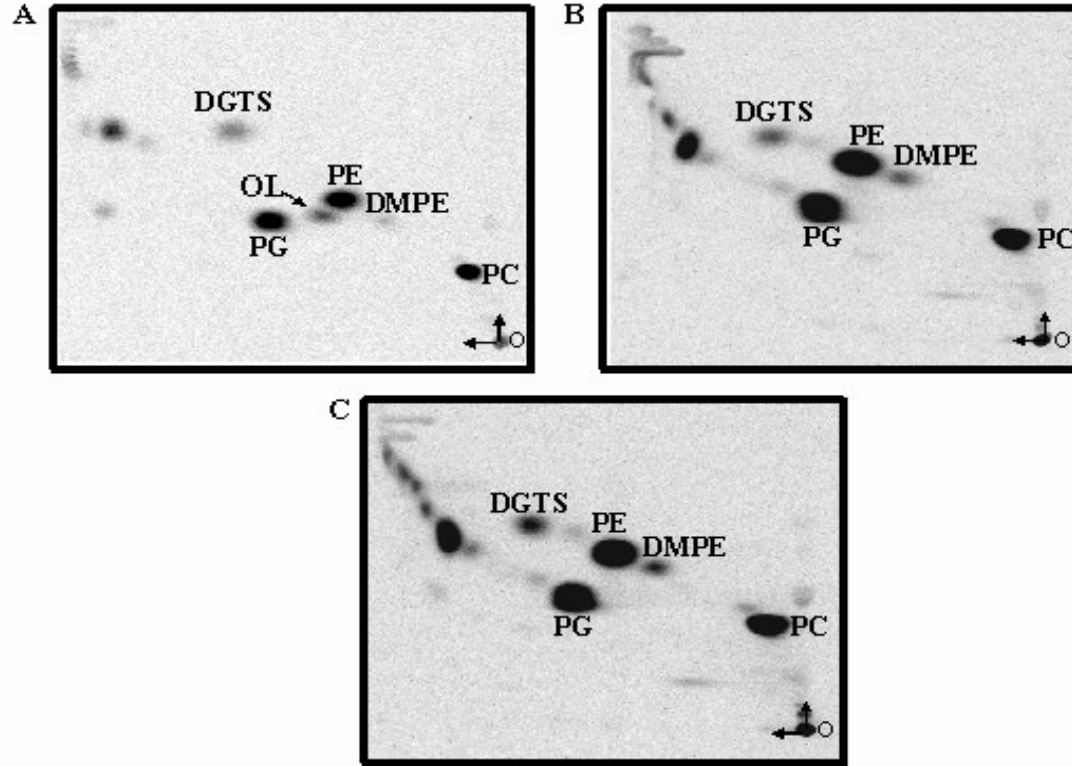


Şekil 4.11. *R. capsulatus* yaban soy, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarında serbest amino grubuna sahip lipidlerin ninhidrin boyama ile belirlenmesi. Minimal MedA besi yerinde optimal sıcaklıkta üreyen *R. capsulatus* MT1131 yaban soyu (A), *RRC00139* null mutantı [ $\Delta(RRC00139::spe)$ , SA6] (B) ve *RRC00138-RRC00139* ikili mutantına [ $\Delta(RRC00138-RRC00139::spe)$ , SA8] (C) ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve kromotograma ninhidrin boyası püskürtüldü. Serbest amino grubu içeren lipidlerin (fosfatidil etanolamin (PE) ve ornitin lipid (OL)) 'in kromotogramdaki lokalizasyonları gösterilmiştir. 1, PE standartını; 2, Lisofosfatidiletanolamin (LPE) standartını; O ise orjini gösterir.



Şekil 4.12. Minimal MedA besi yerinde [ $^{14}\text{C}$ ]asetat varlığında büyütülmüş *R. capsulatus* yaban soy, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının membran polar lipid profili.

MedA besi yerinde [ $^{14}\text{C}$ ]asetat ile işaretlenmiş *R. capsulatus* MT1131 yaban soyu (A), *RRC00138* null mutantı [ $\Delta(RRC00138::spe)$ , SA4] (B), *RRC00139* null mutantı [ $\Delta(RRC00139::spe)$ , SA6] (C), *RRC00138-139* ikili mutantı [ $\Delta(RRC00138-RRC00139::spe)$ , SA8] (D) ve pMRC plazmitini taşıyan *RRC00138* mutantına [SA4/pMRC] (E) ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve fosfoimager da radyoaktif lipid lekeleri tarandı. Membran lipidlerin (PG, PE, DMPE, PC ve OL) kromotogram üzerindeki lokalizasyonları gösterilmiştir. O, orjin.



Şekil 4.13. Zenginleştirilmiş MPYE besi yerinde [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat varlığında büyütülmüş *R. capsulatus* yaban soy, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının membran lipid profili.

MPYE besi yerinde optimal sıcaklıkta [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat ile işaretlenmiş *R. capsulatus* MT1131 yaban soyu (A), *RRC00138* null mutantı [ $\Delta(RR00C138::spe)$ , SA4] (B), *RRC00139* null mutantına [ $\Delta(RRC00139::spe)$ , SA6] (C) ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve fosfoimager da radyoaktif lipid lekeleri tarandı.

*R. capsulatus* yaban soy, null mutantları ve transkonjugantlarda gözlenen polar lipidlerin total yüzdesi incelendiğinde, OL 'den yoksun null mutantlardaki PE, PG ve PC miktarlarının yaban soy oranında olduğu gözlemlendi. Ancak mutanların Nadi fenotipini tamamlayan pMRC plazmitini taşıyan transkonjugantlardaki OL miktarının yaban soya kıyasla iki kat arttığı gözlemlendi. Yine transkonjugantlardaki PE miktarında mutantlara kıyasla artma buna karşılık PC miktarında ise azalma görüldü (Çizelge 4.4).

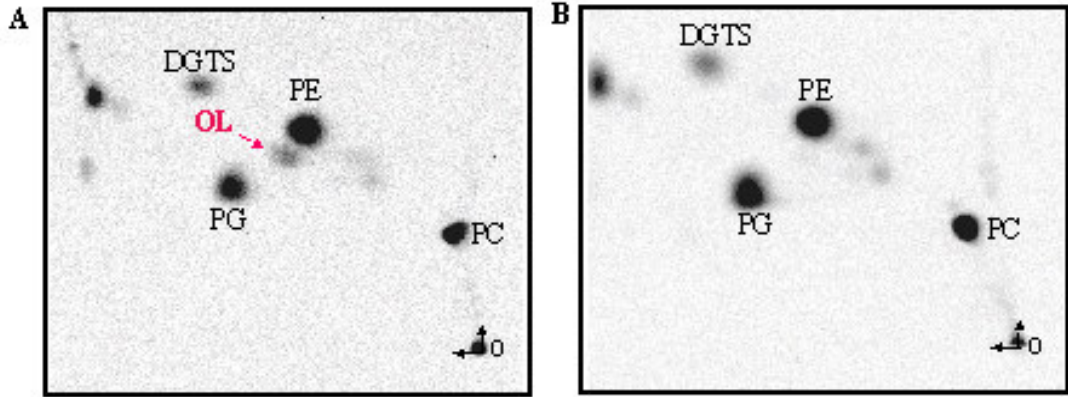
Çizelge 4.4. MedA besi yerinde üreyen *R. capsulatus* yaban soy, *RRC00138* ve *RRC00139* null mutantlarının ve transkonjugantların membran polar lipid kompozisyonu.

	Lipid kompozisyonu (Toplam <sup>14</sup> C 'in % 'si)			
	PE	PG	PC	OL
<b>Yaban soy</b>	19.1 ± 0.6	20.1 ± 0.3	45.4 ± 0.2	4.3 ± 0.2
<b>Mutantlar</b>				
SA4 [ $\Delta(RRC00138::spe)$ ]	21.2 ± 0.1	22.9 ± 0.2	41.9 ± 0.4	n.d.
SA6 [ $\Delta(RRC00139::spe)$ ]	17.4 ± 0.5	18.6 ± 0.3	56.2 ± 0.8	n.d.
SA8 [ $\Delta(RRC00139-138::spe)$ ]	18 ± 0.6	20.5 ± 0.4	49.5 ± 0.7	n.d.
<b>Transkonjugantlar</b>				
SA4/pMRC	33.3 ± 0.3	19.3 ± 0.2	23.7 ± 0.3	9.7 ± 0.7
SA6/pMRC	30.7 ± 0.5	18.6 ± 0.3	33.9 ± 0.4	9.2 ± 0.5
SA8/pMRC	32.0 ± 0.7	23.0 ± 0.4	24.3 ± 0.6	9.4 ± 0.5

n.d. gözlenmeyenler

*RRC00138* ve *RRC00139* mutantlarının MPYE besiyerinde sıcaklığa bağlı gösterdikleri fenotip değişiklikleri göz önüne alınarak SA4 mutantının 25°C sıcaklıktaki polar lipid kompozisyonu yaban soy ile karşılaştırılarak incelendi (Şekil 4.14). Buna göre SA4 mutantının 25°C 'de MPYE besiyerinde üreyen hücrelerinden izole edilen

lipid ekstraktları analiz edildiğinde mutantın OL dışında tüm fosfolipidleri yaban soy oranında üretebildiği gözlemlendi (Şekil 4.14B). Böylece, OL 'in farklı sıcaklık ve besiyerlerinde yokluğuna rağmen, hücreler ancak belli sıcaklık ve besiyeri kombinasyonlarında farklı *c*-tipi sitokrom proteinlerini üretebildiği görüldü. Bu da bize, OL 'in bakterilerdeki rolünün fizyolojik üreme koşullarıyla sıkıca bağlantılı olma olasılığını düşündürdü.



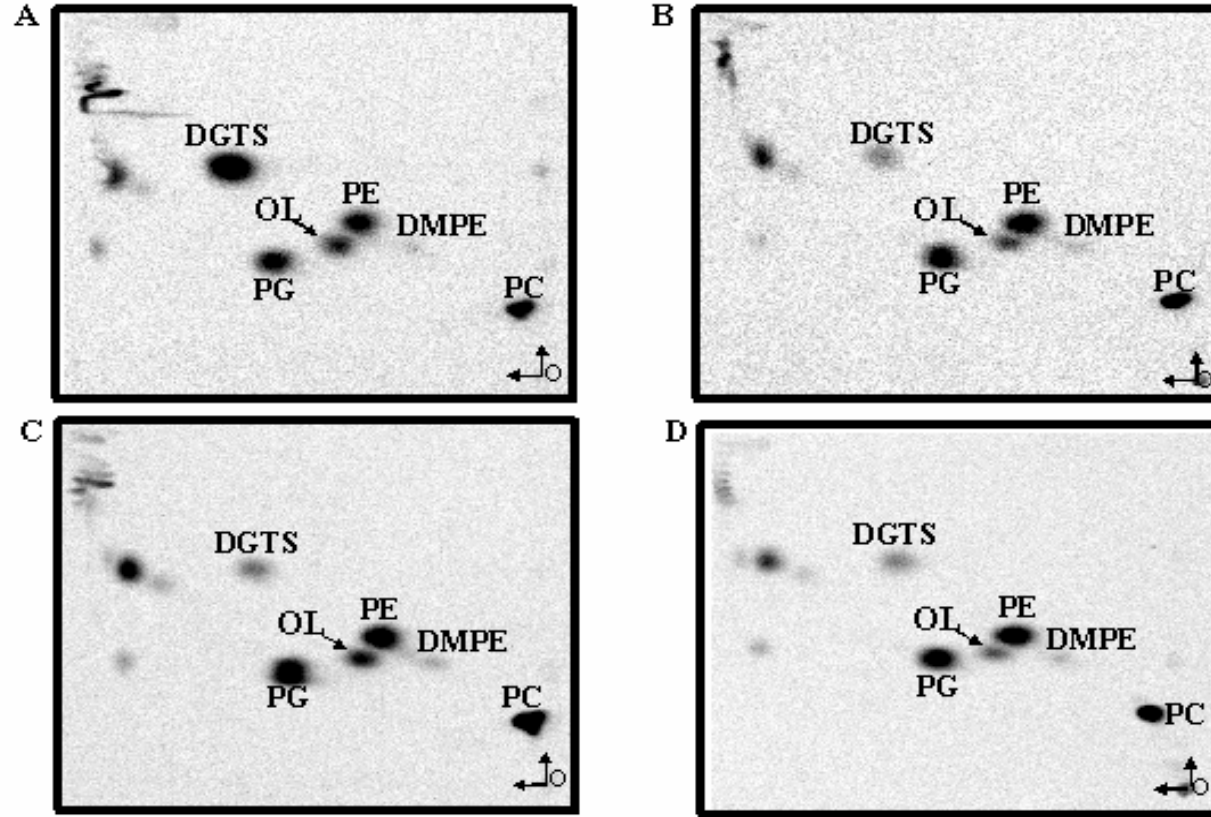
Şekil 4.14. 25°C sıcaklıkta MPYE besi yerinde üreyen *RRC00138* null mutantının membran polar lipid profili.

25°C sıcaklıkta MPYE besi yerinde [<sup>14</sup>C]-asetat varlığında üreyen MT1131 yaban soyu (A) ve SA4 mutantına (B) ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve fosfoimager da radyoaktif lipid lekeleri tarandı.

#### 4.12. *R. capsulatus* 'da OL Biyosentezi Fosfat Miktarıyla İlgili Değildir

Genellikle OL, bakteriyel total lipidlerin oldukça küçük bir kısmını oluşturur. Ancak bazı türlerde ortamdaki sınırlı fosfat varlığında PE 'nin miktarında azalma buna karşılık OL 'nin miktarında ise artma gözlenir (Minnikin ve Abdolrahimzadeh, 1974; Benning ve ark., 1995; Geiger ve ark., 1999). Bu nedenle, *R. capsulatus* 'daki OL miktarının da ortamdaki fosfat miktarıyla bir ilişkisi olup olmadığı incelendi. MedA minimal besi yeri 20 mM fosfat içerirken, MPYE besi yeri sınırlı miktarda (yaklaşık 1-3 mM) fosfat içermektedir. Buna göre, MT1131 yaban soyu 0.1 mM, 1 mM veya 20 mM fosfat içeren minimal MedA besi yeri veya zenginleştirilmiş MPYE besi yerinde [<sup>14</sup>C]-

asetat varlığında üretildi ve total hücre lipidleri 2D-TLC tekniği ile ayrıştırıldı (Şekil 4.15A, B, C ve D). MedA besi ortamındaki fosfat konsantrasyonu 20 mM (ya da 1 mM) 'dan 0.1 mM 'a düştüğünde fosfat grubundan yoksun diaçilgliseril trimetilhomoserinin (DGTS, Benning ve ark., 1995; Geiger ve ark., 1999) miktarında gözlenen artış ile yaban soydaki total lipid kompozisyonu değişti (Şekil 4.15A). Ancak OL miktarının farklı fosfat konsantrasyonlarında benzer oranda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15A, B, C ve D). Böylece, yaban soyunun yüksek fosfat (1 mM ya da 20 mM) içeren MedA ve MPYE besi yerlerinde benzer lipid profiline sahip olması bize *R. capsulatus* 'daki OL sentezinin ortamdaki fosfat miktarı ile düzenlenmediğini gösterdi.



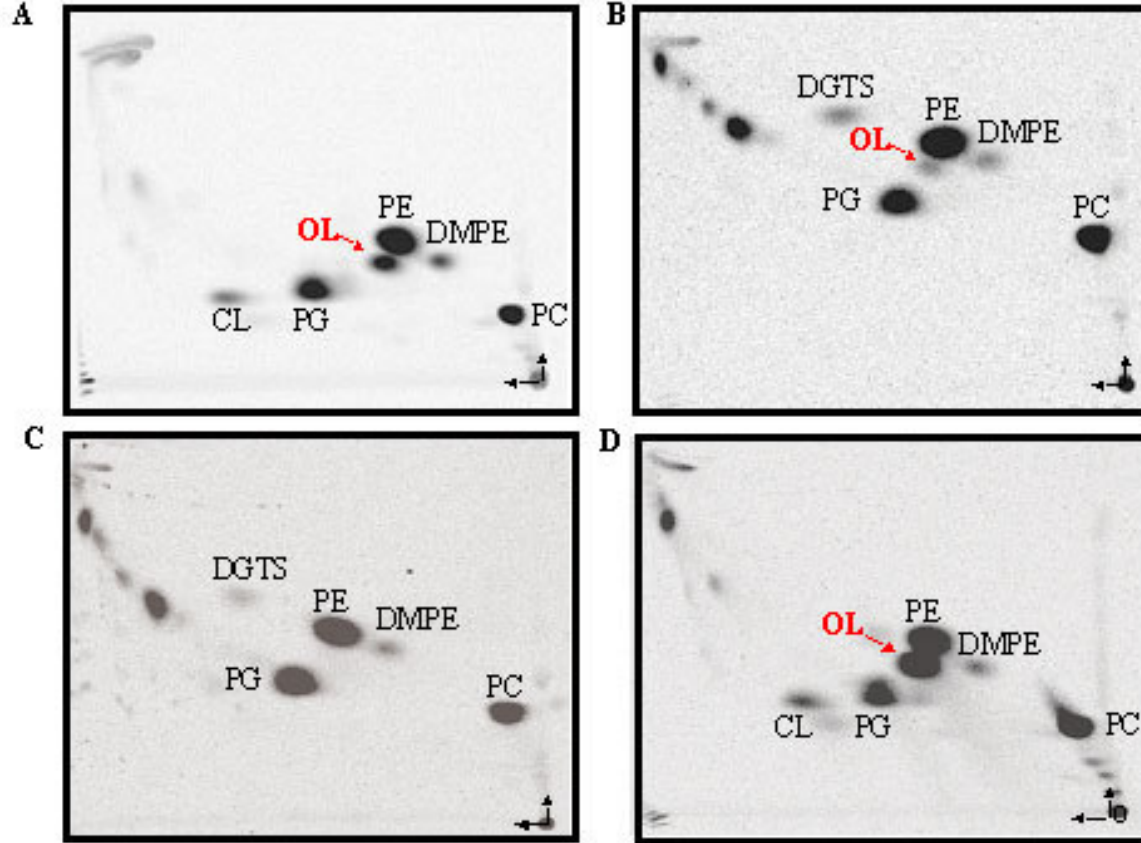
Şekil 4.15. Farklı fosfat konsantrasyonları içeren besi ortamlarında üreyen *R. capsulatus* yaban soyunun hücresel lipid profili. 0.1 mM fosfat (A), 1 mM fosfat (B) ya da 20 mM fosfat (C) içeren minimal Med A besiyerinde ya da zenginleştirilmiş MPYE besi yerinde (D) [ $^{14}\text{C}$ ]-asetat varlığında üreyen *R. capsulatus* MT1131 yaban soyuna ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve fosfoimager da radyoaktif lipid lekeleri tarandı.

#### 4.13. *R. capsulatus* ve *S. meliloti* Türleri Arasında Heterolog Tamamlama Testi

*RRC00138* ve *RRC00139* genleri *S. meliloti* 'deki OL biyosentez yolunda gerekli genler ile homoloji gösterdiklerinden, *R. capsulatus* genlerinin *S. meliloti* genlerinin fonksiyonel homoloğu olup olmadıklarını anlamak için iki tür arasında tamamlama testi yapıldı. Buna göre, *S. meliloti* *olsB* genini taşıyan plazmit (pJG21, Gao ve ark., 2004) *R. capsulatus* *RRC00139* null mutantına (SA6); diğer yandan *R. capsulatus* *RRC00139* genini taşıyan plazmit (pSEM20) ise *S. meliloti* *OlsB*<sup>-</sup> mutantına (AAK1, Gao ve ark., 2004) çaprazlama ile aktarıldı. SA6/pJG21 ve AAK1/pSEM20 transkonjugantlarının MedA besi yerinde [<sup>14</sup>C]asetat varlığında üreyen hücrelerinden izole edilen lipid ekstraktları analiz edildiğinde her iki heterolog transkonjugantın da OL 'i üretebildiği gözlemlendi (Şekil 4.16B). Ayrıca, SA6/pJG21 transkonjugantının farklı besi ortamlarındaki Nadi fenotipi ve *c*-tipi sitokrom profilleri de incelendiğinde, transkonjugantın Nadi<sup>+</sup> fenotipini geri kazandığı ve tüm *c*-tipi sitokrom proteinlerini yaban soy oranında üretebildiği gözlemlendi (data gösterilmemiştir).

Diğer yandan, *R. capsulatus* *RRC00139-RRC00138* genlerini taşıyan plazmit (pMRC) *S. meliloti* *OlsA*<sup>-</sup> mutantına (ORLD1, Weissenmayer ve ark., 2002); *S. meliloti* *olsA* genini taşıyan plazmit (pBW51) de *R. capsulatus* *RRC00138* null mutantına (SA4) aktarıldı. SA4/pBW51 transkonjugantı OL 'i üretemezken (Şekil 4.16C), ORLD1/pMRC transkonjugantı ise oldukça yüksek oranda OL 'i üretebilme yeteneği kazandığı görüldü (Şekil 4.16D). Tüm genetik ve biyokimyasal tamamlama testleri, *R. capsulatus* *RRC00138* ve *RRC00139* genlerinin *S. meliloti* *olsA* ve *olsB* genlerinin fonksiyonel homoloğları olduklarını gösterdi.





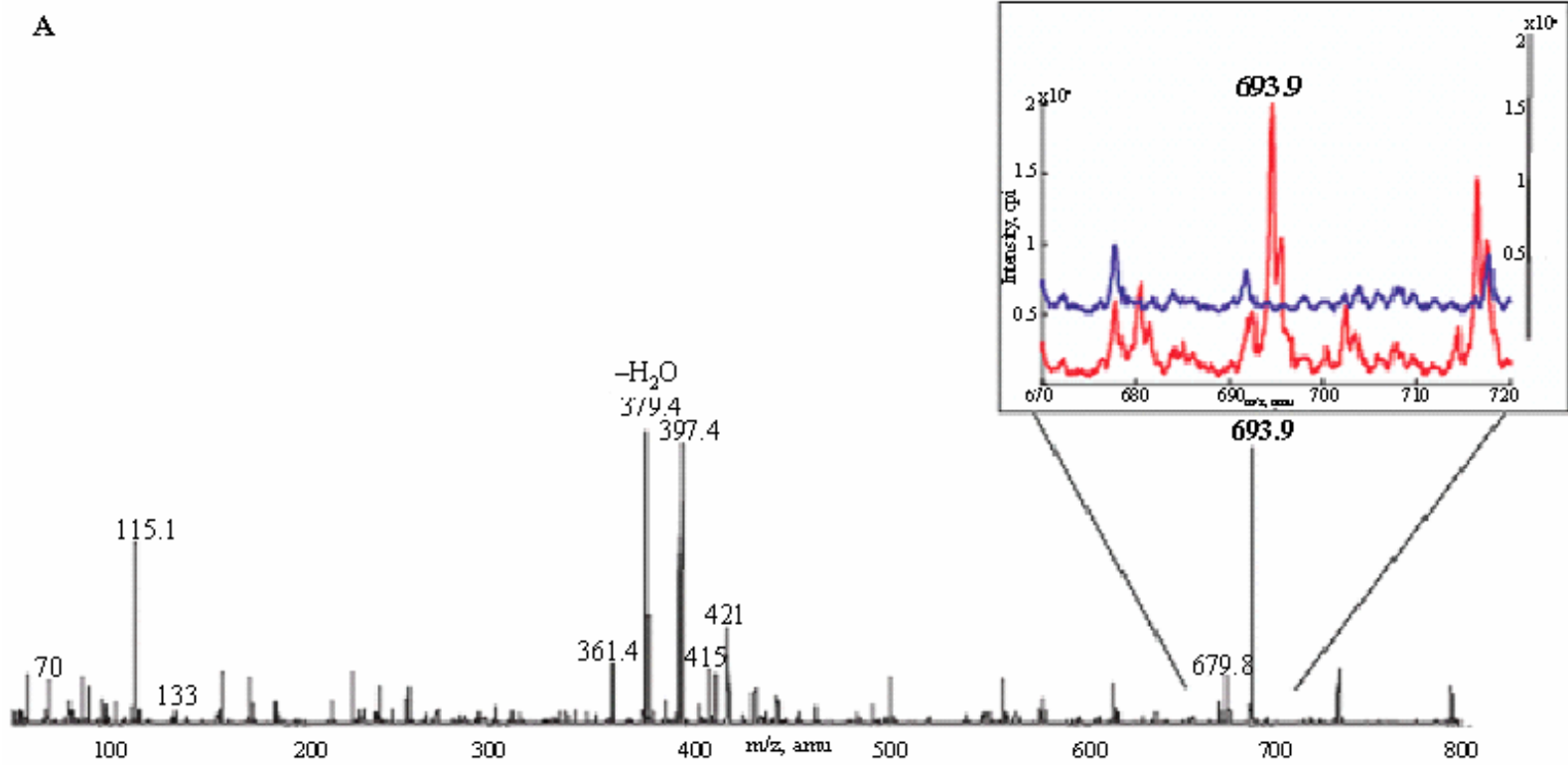
Şekil 4.16. *R. capsulatus* ve *S. meliloti* türleri arasında heterolog tamamlama testleri ve transkonjugantların polar lipid profili. *R. capsulatus* RRC00139 genini taşıyan *S. meliloti* OlsB mutantı (AAK1/pSEM20) (A), *S. meliloti* *olsB* genini taşıyan RRC00139 null mutantı (SA6/pJG21) (B), *S. meliloti* *olsA* genini taşıyan RRC00138 null mutantı (SA4/pBW51) (C) ve *R. capsulatus* RRC00138-139 genlerini taşıyan *S. meliloti* OlsA mutantına (ORLD1/pMRC) (D) ait lipid ekstraktları Şekil 4.10 'da açıklandığı şekilde ayrıştırıldı ve fosfoimager da radyoaktif lipid lekeleri taran

#### 4.14. *R. capsulatus* OL 'in Kimyasal Yapısı

*R. capsulatus* OL 'in kimyasal yapısı kütle spektrometre analizi ve *S. meliloti* OL 'in kimyasal yapısı ile karşılaştırılarak incelendi. *R. capsulatus* ve *S. meliloti* bakterilerinin yaban soylarına ait hücresel membran lipidleri 2D-TLC 'de ayrıştırıldı ve OL 'e karşılık gelen leke silika tabakadan kazınarak kütle spektrometre tekniği kullanılarak analiz edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. meliloti* OL ekstraktı için kütle spektrumun 600-800  $m/z$  'lik bölgesi tarandığında literatürde gösterildiği gibi (Geiger ve ark., 1999) 694  $m/z$  'de güçlü bir iyon  $[M + H]^+$  gözlendi (Şekil 4.17A). Ayrıca, 694  $m/z$  'lik bu iyonun MS/MS analizi yapıldığında ise sırasıyla protonlanmış ornitin ( $[Orn + H]^+$ ), ornitin B ve ornitin immonium iyonlarına karşılık gelen 415, 397, 379, 361, 133, 115 ve 70  $m/z$  'lik fragment ürünleri elde edildi. Buna karşılık, *R. capsulatus* yaban soyuna (MT1131) ait OL ise 680  $m/z$  'de güçlü bir iyon verirken, aynı iyon *RRC00139-RRC00138* ikili mutantında (SA8) ise gözlenmedi (Şekil 4.17B). *R. capsulatus* yaban soyunda gözlenen 680  $m/z$  'lik iyonun MS/MS ve devamındaki fragmentasyon analizi, spektrumun düşük kütle bölgesinde (400  $m/z$  'e kadar) tıpkı *S. meliloti* OL 'de gözlenildiği gibi 397, 380, 361, 133, 115 ve 70  $m/z$  'lik ürünlerin varlığını gösterdi.

*S. meliloti* 'deki OL 'nin 694  $m/z$  olmasına karşılık, *R. capsulatus* OL 'in 680  $m/z$  olması iki farklı bakteri soylarındaki OL 'ler arasında 14  $m/z$  'lik bir farka sebep olmuştur. Lisoornitin lipide (LOL)  $[M + H]^+$  karşılık gelen 415  $m/z$  'lik değere kadar fragmentasyon profili (Geiger ve ark., 1999; Gao ve ark., 2004) iki bakteride de aynı olup (Şekil 4.17A ve B), bu da iki farklı OL arasındaki farklılığın LOL düzeyinde olamayacağını gösterdi. *S. meliloti* OL 'in ikinci açıl zincirinin 14  $m/z$  'lik 19 karbon-siklopropen yağ asit zinciri içerdiği bilinmektedir (Geiger ve ark., 1999). Ancak, *R. capsulatus* genomunda siklopropen yağ asiti sentez enzimini (cfa) kodlayan herhangi bir gen bulunmadığından, OL 'nin ikinci yağ asiti zincirinde siklopropen halkasının bulunamayacağı (Grogan ve Cronan, 1997), buna karşılık *Rhodobacter* türlerinde oldukça baskın olan 18:1-( $\Delta$ 11) doymamış yağ asitinin bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle Şekil 4. 18B 'de *R. capsulatus* 'daki OL 'in kimyasal yapısı tahmini olarak çizilerek, *S. meliloti* OL ile karşılaştırılmıştır.

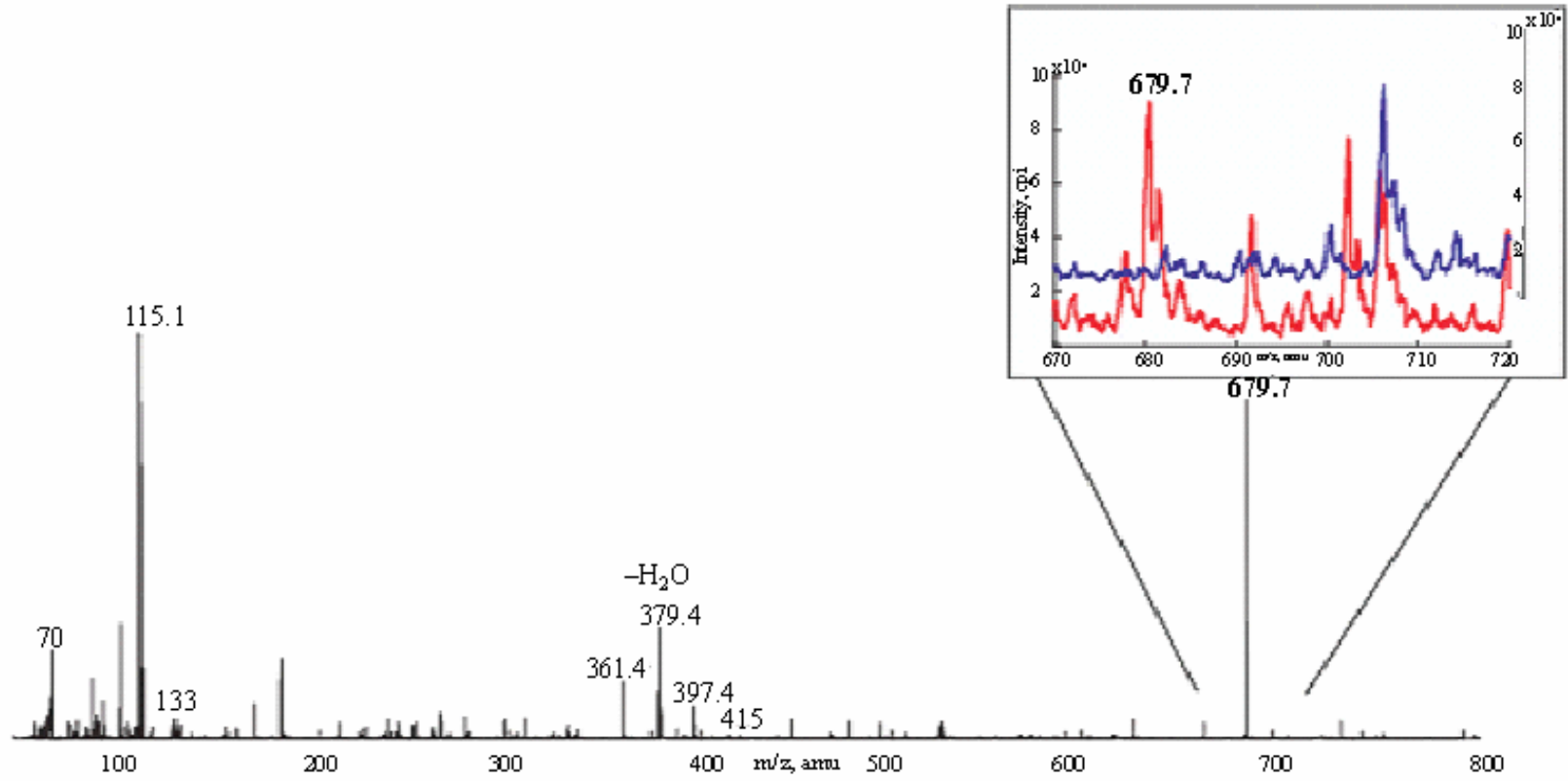
A



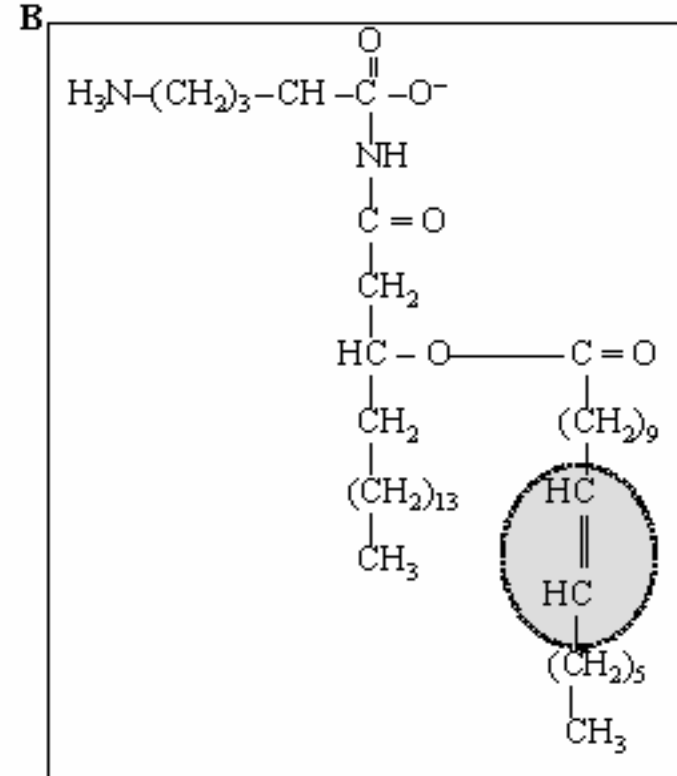
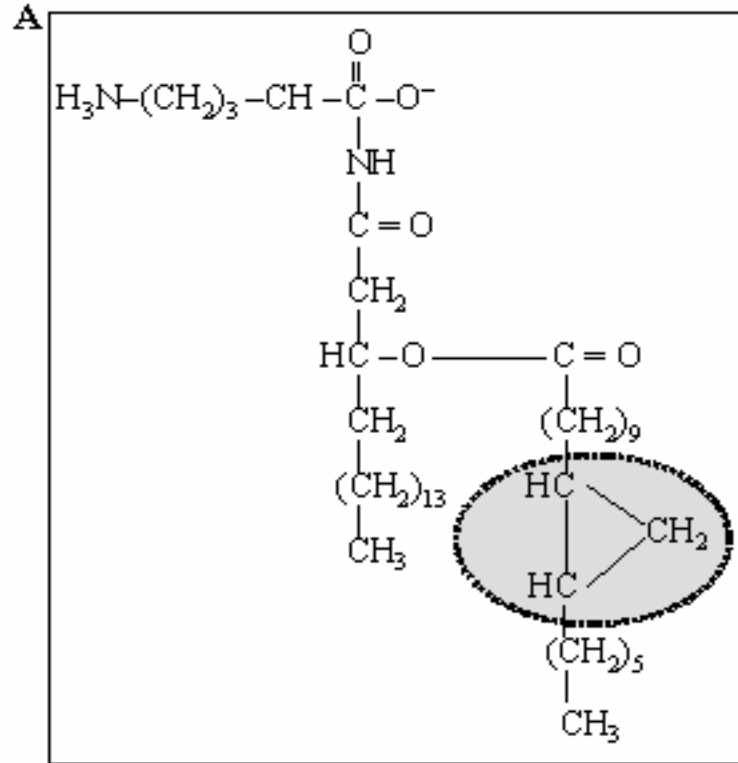
Şekil 4.17. *R. capsulatus* ve *S. meliloti* bakterilerindeki OL 'in kütle spektrometre tekniği ile analizi.

Kontrol örnek olarak hazırlanan *S. meliloti* yaban soy (1021) ve OlsA mutanlığı (A), *R. capsulatus* yaban soy (MT1131) ve *RRC00139-138* ikili mutanlığına (SA8) (B) ait OL 'e karşılık gelen kromatografideki leke MS ve MS/MS analizine tabi tutuldu. Sağ tarafta yer alan kutu, 670-720 m/z 'lik bölgede OL 'e karşılık gelen büyük iyonun yaban soydaki varlığını buna karşılık mutanlıkta ise yokluğunu gösterir. Yaban soya ait bölge kırmızı renkte, mutanlıkta ait bölge ise mavi renkte gösterilmiştir.

B



Şekil 4.17. (Devam)

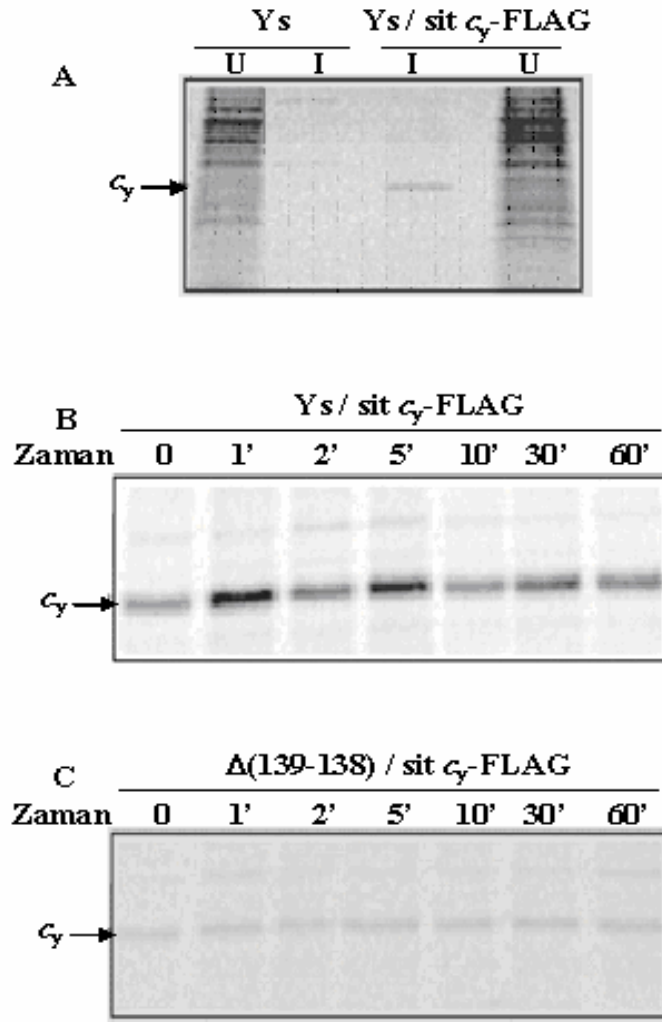


Şekil 4.18. *S. meliloti* ve *R. capsulatus* türlerinde bulunan OL 'in kimyasal yapısı.

(**A**), *S. meliloti* 'de tanımlanmış (Geiger ve ark., 1999) ve (**B**) *R. capsulatus* 'da ise tahmini OL 'in kimyasal yapısı. İki farklı türdeki OL 'ler arasında ikinci yağ asitinde gözlenen fark elips içerisine alınmıştır. *S. meliloti* OL 'in ikinci yağ asitinde siklopropen halkasının varlığı kesin olarak bilinmekte olup, *R. capsulatus* OL 'de ise siklopropen halkası bulunmamaktadır.

#### 4.15. OL 'in Yokluğunda Minimal Besi Ortamında (MedA) 35°C Sıcaklıkta Sitokrom $c_y$ 'in Üretimi ve Yıkımı

OL 'den yoksun mutantlarda gözlenen  $c$ -tip sitokrom proteinlerinin miktarlarındaki azalmanın, az miktarda üretilmelerinden mi yoksa çabucak yıkıma uğramalarından mı kaynaklandığını anlamak için “pulse-chase” deneyi yapıldı. Buna göre, karboksil ucu FLAG epitopuna bağlı sitokrom  $c_y$  proteinini taşıyan pHM7 plazmiti (sitokrom  $c_y$ -FLAG) yaban soy ve *RRC00139-RRC00138* ikili mutantına (SA8) aktarıldı. Daha sonra, MedA besi yerinde 35°C sıcaklıkta SA8 mutantında gözlenen sitokrom  $c_y$  proteininin miktarı sitokrom  $c_y$ -FLAG plazmitini taşıyan ve taşımayan MT1131 yaban soyu ile karşılaştırıldı (Şekil 4.19). Bu amaçla MedA besi yerinde üreyen SA8/pHM7 ve MT1131/pHM7 transkonjugantları ve MT1131 soyu beş dakika süreyle [ $^{14}$ C]-amino asit karışımı ile inkübe edildi. İşaretlenen hücelere %0.1 kasamino asit eklenerek reaksiyon durduruldu. Farklı zaman aralıklarında (0., 1., 2., 5., 10., 30., 60., 120. ve 480. dakikada) örnekler alınarak hücreler lizis tamponu ile parçalandı ve hücre ekstraktları anti-FLAG antikoruyla bağlı agaroz jel (Anti-FLAG M2 Affinity gel) ile muamale edildi. Jele bağlanmış immunokompleksler (I) ve üst sıvılar (U) SDS-PAGE 'de ayrıştırıldı ve radyoaktif protein bantları fosfoimager da incelendi. Buna göre FLAG epitopuna taşıyan plazmite sahip yaban soy hücrelerindeki (MT1131/pHM7) sitokrom  $c_y$  'in varlığı ve değişen zaman aralıklarındaki sabitliği gözlemlendi (Şekil 4.19A ve B). Ancak OL 'den yoksun mutantlar incelendiğinde ise mutantın sitokrom  $c_y$  proteinini yaban soya kıyasla daha az ürettiği görüldü (Şekil 4.19C). Diğer yandan, hem yaban soy hem de mutantaki sitokrom  $c_y$  proteinin yıkım oranının 480. dakikaya kadar benzer kaldığı görüldü (data gösterilmemiştir). Böylece, MedA besi yerinde 35°C sıcaklıkta, OL 'in yokluğunun sitokrom  $c_y$  'in yıkımından ziyade proteinin üretimi üzerinde etkili olduğu belirlendi. Bu bulgular bize OL 'in en azından membrana bağlı sitokrom  $c_y$  proteinin biyogenesiz sürecinde bir şekilde gerekli olabileceğini gösterdi.

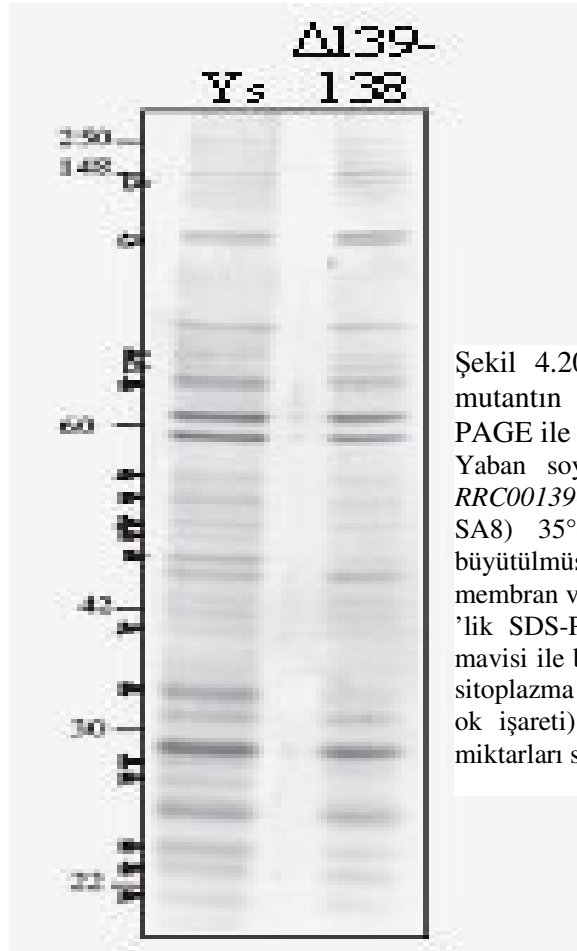


Şekil 4.19. 35°C sıcaklıkta minimal MedA besi yerinde üreyen OL 'den yoksun mutantta gözlenen sitokrom  $c_y$  proteinin üretimi ve yıkımı.

Karboksil-uca bağlı FLAG epitopuna sahip pHM7 plazmitini taşıyan *R. capsulatus* yaban soy (Ys, MT1131) (A ve B) ve *RRC00139-138* ikili mutantı ( $\Delta 139-138$ , SA8) (C) beş dakika süreyle [ $^{14}C$ ]amino asit karışımı ile işaretlendi ve reaksiyon %0.1 kasmino asit eklenmesiyle durduruldu. Farklı zaman noktalarında alınan örneklerdeki sit  $c_y$ -FLAG 'ın miktarı anti-FLAG antikoruna ile gözlemlendi.

#### 4.16. *RRC00138* ve *RRC00139* Mutantlarında Membran Protein Profili

Zenginleştirilmiş MPYE besi ortamında optimal sıcaklıkta (35°C) üreyen *RRC00139-RRC00138* ikili mutantı (SA8) ve yaban soyun kromotofor membran proteinleri SDS-PAGE analizleriyle karşılaştırıldı. OL 'den yoksun SA8 null mutantında henüz bilinmeyen farklı membrana bağlı proteinlerin miktarlarında önemli değişiklikler gözlemlendi. SA8 mutantında bazı membran proteinlerin miktarında yaban soya kıyasla azalma, buna karşılık bazı proteinlerin miktarında ise önemli ölçüde artma gözlemlendi (Şekil 4.20). Bu durum, hücrelerin 35°C 'de MPYE besi yerinde üretildiklerinde OL yokluğunun *c*-tipi sitokrom proteinlerinden başka birçok sitoplazma dışı proteinlerini de etkilediğini gösterdi.



Şekil 4.20. Yaban soy ve OL 'den yoksun mutantın membran protein profillerinin SDS-PAGE ile karşılaştırılması.

Yaban soy (Ys, MT1131) ve OL üretemeyen *RRC00139-RRC00138* ikili mutantı ( $\Delta$ 139-138, SA8) 35°C sıcaklıkta MPYE besi ortamında büyütülmüş hücrelerinden intrasitoplazmik membran vesikülleri izole edildi. 50  $\mu$ g protein %15 'lik SDS-PAGE de ayrıştırıldı ve jel Coomassie mavisi ile boyandı. OL 'den yoksun mutantta farklı sitoplazma dışı proteinlerin yükselen (beyaz renkte ok işareti) ve azalan (siyah renkteki ok işareti) miktarları sol tarafta gösterilmiştir.



## 5. Tartışma

Fakültatif fototrof *R. capsulatus* 'da *c*-tipi sitokrom proteinleri, elektron transfer zincirinde bağımsız ya da enzim komplekslerinin (sitokrom *bc*<sub>1</sub> kompleksi ve sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz) bir alt birimi olarak yer alan membrana bağlı veya periplazmada çözünür proteinlerdir. *R. capsulatus* 'da *c*-tipi sitokrom proteinlerinin yapımı ve işlevsel hale gelmesi sırasında mutlak gerekli en az on adet gen (*ccmABCDEFGHI* ve *ccda*) tanımlandı (Kranz ve ark.,1998; Thöny-Meyer, 2002; Allen ve ark., 2003). Bakterinin solunum zincirinin en son elektron alıcı proteini olan sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz enziminin posttranslasyonel sürecinde ise *ccoGHIS* genlerin önemli rol aldığı belirlenmiştir (Koch ve ark., 2000). Fakat, daha önceki çalışmalarla izole edilen *R. capsulatus* 'da sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz aktivitesinden yoksun (Nadi<sup>-</sup>) besi ortamına bağlı farklı fotosentetik üreme ve *c*-tipi sitokrom protein profili gösteren IJ1, MR2 (Koch ve ark., 1998) ve AYG4 (Aygün, 1999) mutantları, *c*-tipi sitokrom proteinlerin ve *cbb*<sub>3</sub> oksidazın biyogenesizi ile ilgili bilinen genleri ile Nadi fenotipleri tamamlanmadı. Buna karşılık, *R. capsulatus* kromozomal kütüphaneleri kullanılarak yapılan tamamlama testleri ile her üç mutantın da Nadi fenotipini tamamlayan kromozomal DNA parçası (pMRC) izole edildi ve klon üzerindeki ORF ler belirlendi (Koch ve ark., 1998; Aygün, 1999). Bu çalışmada ise kromozomal DNA parçasında yer alan ORF lerin detaylı genetik ve biyokimyasal analizleri ile sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz mutantlarının Nadi fenotipinden sorumlu gen(ler)in tanımlanması ve bu yeni genlerin fonksiyonlarının aydınlatılması amaçlandı.

Interpozon mutagenesi tekniği ile inaktif hale getirilmiş pMRC klonu üzerinde bulunan ORF ler mutantlara aktarıldığında, RRC00138 delesyonunu taşıyan plazmit IJ1 mutantının; RRC00139 delesyonunu taşıyan plazmit ise MR2 ve AYG4-25 mutantlarının Nadi<sup>-</sup> fenotipini korudu. *RRC00139* ve *RRC00138* genlerinin inaktivasyonu ile elde edilen null mutantlarının (SA1, SA4, SA6 ve SA8) da oksidaz aktivitesi göstermemesi (Nadi<sup>-</sup>), *R. capsulatus* 'daki sitokrom *cbb*<sub>3</sub> oksidaz ve *c*-tipi sitokrom biyogenesizinden sorumlu yeni genlerin *RRC00139* ve *RRC00138* olduğunu gösterdi. Null mutantları sıcaklığa bağlı Nadi fenotipi ve besi ortamı ve sıcaklığa bağlı farklı fotosentetik üreme özelliği gösterdiler (Çizelge 4.2; Şekil 4.1). Buna göre, optimal üreme sıcaklığında zenginleştirilmiş MPYE besi ortamında üreyen mutantların

intrasitoplazmik membran vesikülleri ve periplazmik çözünür kısımları incelendiğinde mutantların sitokrom  $c_1$  dışındaki diğer tüm  $c$ -tipi sitokromları üretemedikleri gözlemlendi (Şekil 4.3). Diğer yandan minimal MedA besi ortamında büyüyen hücrelere ait ekstraktlarda ise yaban soya kıyasla daha düşük miktarda olmakla beraber mutantların tüm  $c$ -tipi sitokrom proteinleri üretebildikleri görüldü (Şekil 4.3). Düşük sıcaklıkta MPYE besi ortamında ise mutantlar  $\text{Nad}^+$  fenotipini ve fotosentetik büyüme yeteneğini geri kazandı ve yaban soya oranla düşük miktarda olmakla beraber tüm  $c$ -tipi sitokromları üretebildiler (Şekil 4.1, Şekil 4.4). Ancak MedA besi ortamında düşük sıcaklıkta üreyen mutantların  $\text{Nad}^-$  fenotipini korudukları ve tüm  $c$ -tipi sitokrom proteinlerini de optimal sıcaklıkta üreyen hücrelere kıyasla daha az ürettikleri görüldü. Mutantlar zenginleştirilmiş MPYE besi ortamında sıcaklığa bağlı olarak gösterdikleri farklı Nadi fenotipi, fotosentetik büyüme özelliği ve  $c$ -tipi sitokrom protein profili ile oldukça ilgi çekici bir fenotip taşımaktadırlar (Şekil 4.1, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

*RRC00139* ve *RRC00138* genlerinin başlangıçtaki biyoinformatik analizleri, *RRC00139* gen ürününün hipotetik sitozolik proteini; *RRC00138* gen ürününün ise tahmini AGPAT enzimini kodladığını gösterdi. Gerçekten, *RRC00138* 'in amino asit dizisi, *E. coli plsC* gen ürününün (Coleman, 1992) dizisi ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. *PlsC* geni membran gliserofosfolipid biyosentezinde gerekli 1-açıl-*sn*-gliserol-3-fosfat açıltransferaz (AGPAT) enzimini kodlar. *RRC00138* dizisi ile *E. coli* 'nin AGPAT dizisi arasında görülen homolojiden yararlanılarak yapılan genetik tamamlama testi sonunda *RRC00138* 'in *E. coli plsC*(Ts) mutantına yüksek sıcaklıkta üreme yeteneği kazandırdığı görüldü (Şekil 4.5). Ancak, *RRC00138* gen inaktivasyonunun mutantın G3P açıltransferaz enzim aktivitesini değiştirmemesi ve PA 'yı yaban soy oranında üretebilmesi (Şekil 4.7), *R. capsulatus* 'da PA sentez yolunda birden fazla enzimin olabileceği ihtimalini getirmektedir. *E. coli* 'de fonksiyonel bir AGPAT enziminin bulunmasına karşın, birçok bakteri ve ökaryotik organizmalarda birden fazla AGPAT aktivitesine sahip enzim tanımlandı. *R. capsulatus* genomunda yapılan detaylı biyoinformatik analizler (<http://www.integratedgenomics.com>) *RRC00138* 'den başka AGPAT enzimini kodladığı tahmin edilen iki ORF (*RRC00316* ve *RRC03498*) 'nin varlığını gösterdi. Bu ORF 'lerden *RRC00316*, genomda *RRC00138* ile aynı bölgede (2G06-2D11) yer almakta olup, *RRC00316* 'nın amino asit dizisi *E. coli* AGPAT dizisi

ile %19 oranında aynı ve %32 oranında ise benzer amino asit içerir. RRC03498 geni ise bu iki ORF den farklı bir bölgede (1A01-1C09) yer alır ve *E. coli* AGPAT ile %19 oranında aynı ve %26 oranında da benzer amino asite sahiptir. Bazı bakterilerde PA oluşumunu katalizleyen birden fazla AGPAT enziminin varlığı merak edilen bir konudur. Yapılan bazı çalışmalar, birden fazla AGPAT 'ın varlığının membran gliserofosfolipidlerin sentez ve regülasyonuna olanak sağladığını göstermiştir (Brown ve ark., 2002; Shih ve ark., 1999). Yine birden fazla bulunan AGPAT enzimleri değişik çevresel koşullarında fonksiyon gösterebildiklerinden, bakterinin yaşamını sürdürmesi açısından oldukça önemlidir.

Son zamanlarda yapılan biyoinformatik analizler RRC00139 ve RRC00138 amino asit dizilerinin *S. meliloti* 'de OL biyosentezini katalizleyen *olsB* ve *olsA* gen ürünlerinin dizileri ile yüksek derecede homolojiye sahip olduğunu gösterdi. Homoloji bilgisinden yararlanılarak *R. capsulatus* genlerinin OL biyosentezinde gerekli genler olup olmadığı incelendi. Buna göre *RRC00139* ve *RRC00138* null mutantlarının hücresel polar lipid bileşenleri incelendiğinde mutantların temel gliserofosfolipidleri (PE, PG ve PC) yaban soy oranında içerdikleri buna karşılık fosfat grubu içermeyen lipid grubunda yer alan ornitin lipidi (OL) ise üretmedikleri gözlemlendi (Şekil 4.11A ve B; Şekil 4.12B, C ve D; Şekil 4.13B ve C). Mutantların *RRC00139* ve/veya *RRC00138* genlerini taşıyan plazmitlerle genetik tamamlama testleri, protein ve lipid eksikliğini gidermektedir (Şekil 4.3A-10. kuyu; Şekil 4.3B-5. kuyu; Şekil 4.12E). Böylece, birbiriyle çokta ilişkisi olduğu hemen anlaşılamayan bakteriyel iki farklı sürecin, uygun fizyolojik koşullar altında aslında birbiriyle oldukça ilgili olduğu görüldü.

*S. meliloti* ve *R. capsulatus* türleri arasında heterolog tamamlama testleri yapıldığında *RRC00139* ve *RRC00138* gen ürünlerinin *S. meliloti* 'de OL biyosentezini katalizleyen *olsB* ve *olsA* genlerinin fonksiyonel homologları olduğunu gösterdi (Şekil 4.16). Diğer yandan kütle spektrometrik analizler, lisoornitin lipid (LOL) 'in kimyasal olarak her iki bakteri türünde aynı olduğunu ancak OL ürünün farklı olduğunu gösterdi (Şekil 4.17). Buna göre, *R. capsulatus* bakterisindeki OL 'in, *S. meliloti* 'de gözlenen OL 'in aksine, ikinci yağ asiti zincirinde siklopropan halkasını içermediği belirlendi (Şekil 4.18). Kütle spektrometre analizleri ile gözlenen bu sonuç, biyoinformatik

analizler sonunda *R. capsulatus* genomunda siklopropen sentaz enzimini kodlayan *cfA* geninin bulunmaması ile doğrulandı. *OlsA* geninin yokluğunda hem *S. meliloti* hem de *R. capsulatus* mutantlarında LOL 'in birikmediği ve *RRC00139* ve *RRC00138* genlerinin ise *S. meliloti* 'de OL 'i fazla miktarda ürettiği gözlenmiştir. *OlsB* geninin aksine *S. meliloti* *olsA* geninin *R. capsulatus* *RRC00138* knock-out mutant fenotipini tamamlama yeteneğinden yoksun olması, bu türler arasındaki *OlsA* enzimlerinin farklı olabilme olasılığını artırmıştır. Gerçekten, *S. meliloti* ve *P. fluorescens* bakterilerinde bulunan *olsA* genleri *E. coli* *plsC* geniyle oldukça yüksek homoloji gösterir. Ancak, bu genler *E. coli* *plsC(Ts)* mutantlarının büyüme fenotipini tamamlama yeteneğinden yoksundur (Weissenmayer ve ark., 2002; Cullinane ve ark., 2005). *olsA* gen aktivitesine sahip *RRC00138* geni *plsC(Ts)* mutant fenotipini tamamladığından, *R. capsulatus* *olsA* geni diğer bakterilerdeki *olsA* genlerinden farklı görünmektedir. Ancak diğer yandan, *RRC00138* 'ın *R. capsulatus* 'daki temel AGPAT olmaması nedeniyle, bakteride bulunan alternatif AGPAT enzimlerini kodlayan genlerin genetik ve biyokimyasal yönden karakterizasyonlarına başlanılmış olup (Aygün-Sunar ve ark.-hazırlık aşamasında), elde edilecek sonuçlar ile bu genlerin membran gliserofosfolipid biyosentezindeki rolleri aydınlatılacaktır.

OL 'ler, gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler, *Pseudomonads*, *Mycobacteria*, *Streptomyces* ve *Rhizobia* (Asselineau, 1991) türlerini kapsayan insan patojenleri ve bitki simbiyontları arasında oldukça yaygındır. OL 'ler, memelilerde güçlü bir konakçı bağışıklık yanıtı sağlar. Böylece OL 'ler, B-lenfositlerin çoğalması, hemagülitinasyon, adjuvantisiti, hipotermiya (Kawai ve ark., 1996), reaktif oksijen radikallerinin üretimi (Kawai ve ark., 2000b), Toll-benzeri reseptör CD14-bağlı yol aracılığında makrofajların aktivasyonu ve interlökin-1 ve prostaglandin E2 'nin üretimini (Kawai ve ark., 2000a) gerçekleştirir. Bakterilerde ise OL, ortamda sınırlı fosfat varlığında fosfolipidlerin yerini alır, ancak OL 'lerin bu özgün fonksiyonu hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır (López-Lara ve ark., 2005; Rojas-Jimenez ve ark., 2005).

*R. capsulatus* *RRC00139* ve *RRC00138* genlerinin fonksiyonlarını aydınlatmaya yönelik yapılan detaylı genetik ve biyokimyasal analizler bu genlerinden herhangi birindeki mutasyonun OL sentezini engellediği ve özellikle zenginleştirilmiş besi

ortamında (MPYE) optimal üreme sıcaklığında (35°C) bazı *c*-tip sitokromların üretilmedikleri gözlenmiştir. OL 'in yokluğunun, 35°C 'de minimal besiyerinde (MedA) üreyen hücrelerde örneğin sitokrom *c<sub>y</sub>* proteininin üretimini etkilediği ve bu nedenle sitokrom *c<sub>y</sub>* 'in az miktarda sentezlediği belirlendi. (Şekil 4.19). MPYE besi yerinde 35°C sıcaklıkta üreyen mutantlarda ise, *c*-tipi sitokrom proteinlerinden başka diğer bazı sitoplazma dışı proteinlerin de miktarlarında yaban soya kıyasla bir azalma görüldü (Şekil 4.20). Değişik fizyolojik koşullar altında, OL 'in yokluğunda bazı *c*-tipi sitokromların ve diğer bazı membran proteinlerin eksikliğine hangi bileşenlerin neden olduğu oldukça merak uyandırmaktadır. Olasılıklardan birisi; 35°C sıcaklıkta MedA besi ortamında üreyen hücrelerde OL, membran protein üretiminin henüz bilinmeyen basamak ya da bileşen(lerin)e doğrudan ya da dolaylı olarak gereksinim duyuyor olabilir. OL 'nin yokluğunda bu bileşenlerdeki aksaklıklar farklı *c*-tipi sitokromların ve diğer membran proteinlerin üretilmelerini azaltabilir. Bu durum *c*-tipi sitokrom proteinlerin olgunlaşmasındaki eksikliklerden dolayı mutantlarda gözlenen kompleks fotosentetik üreme ve Nadi fenotiplerine benzer bir durum olabilir (Lang ve ark., 1996; Sanders ve ark., 2005). Diğer bir olasılık ise, OL 'in yokluğunda *c*-tipi sitokromların ve diğer membran proteinlerin normal miktarlarda üretilmelerine karşın farklı üreme koşulları ve membran lipid kompozisyonundaki değişmelerin neden olabileceği membrana bağlı streslerden (Raivio, 2005) dolayı çabucak yıkıma uğrayabilirler. Zenginleştirilmiş MPYE besiyerinde 35°C sıcaklıkta üreyen OL içermeyen *R. capsulatus* hücrelerinde bazı *c*-tipi sitokromların düşük miktarlarda gözlenmesi bu olasılığı güçlendirmektedir. Sıcaklık, osmatik stress gibi farklı çevresel faktörlerin membran lipidlerin fiziksel özelliklerinde değişimlere neden oldukları ve özgün lipidlerin genellikle bakterilerin optimum üreme sıcaklığını etkiledikleri bilinmektedir (Cronan, 2003; Los ve Murata, 2004). *R. capsulatus* 'da dahil olmak üzere birçok bakteride yüksek üreme sıcaklığı, şaperon ve proteaz aktivitesi gösteren ısı-şok proteinlerini indüklemektedir. Örneğin, sitoplazma dışı protein yıkımına neden olan periplazmik serin proteaz (DegP) sıcaklığa bağlı olarak aktive göstermektedir. *R. capsulatus* 'da disülfid bağının oluşumundan sorumlu DsbA proteinin yokluğunda mutantlarda üreme kusurları gözlenmiş ve bu mutantlardaki DegP protein aktivitesinin yaban soya kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Onder ve ark.,-yazım aşamasında).

Bakteri membranında fosfolipidlere kıyasla daha az miktarda gözlenen OL 'lerin rolü ne olabilir sorusuna cevap verebilmek için öncelikle fosfolipidlerin rollerinin anlaşılması gerekir. Genel olarak, biyolojik membranlardaki polar lipidler, permeabilite bariyeri ve membrana bağlı proteinler için destek görevi yapan akışkan yapıyı sağlama görevini yaparlar (Raetz ve Dowhan, 1990; Cronan, 2003). Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı bazı lipidler hücre bölünmesi veya DNA replikasyonu gibi kritik fonksiyonlara sahip özgün proteinlerin membrana yerleşmelerine yardım ederler (Dowhan ve ark., 2004). Yine birçok bakteri ve mitokondride yapılan çalışmalar ile membran proteini-fosfolipid interaksiyonlarının proteinlerin fonksiyonlarına olan etkileri gösterilmiştir (Dowhan ve ark., 2004; van dalen ve Kruijff, 2004). Örneğin; membran proteinleri genellikle kardiyolipin (CL) ve sülfolipidler gibi özgün lipidler ile birlikte kristalize edilmektedirler (Roszak ve ark., 2003; Lange ve ark., 2001). Böylece protein-lipid interaksiyonları, proteinlerin membrandaki yerleşimleri, katlanmaları, enzimatik aktivite sabitliğinde önemlidir (Bogdanov ve Dowhan, 1999; Sedlak ve Robinson, 1999). Fosfolipidler ayrıca solunum ve fotosentetik elektron zincirlerinde fonksiyon yapan membran proteinlerinin çok moleküllü bir yapı oluşturmalarını da sağlar (Zhang ve ark., 2002). Tüm bu bilgiler ve OL 'in yokluğunda gözlenen üreme koşullarına bağlı kompleks fenotipler, OL 'nin yokluğunun hücre membranların özelliklerinde değişikliklere neden olabileceğini bize düşündürmektedir. Bu değişikliklerin temelinde yatan mekanizmalar henüz bilinemediğinden, OL 'den yoksun mutantlarda fenotiplerin dolaylı olarak görüldüğü ve bunun ilave bazı hücrenel bileşenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

OL 'den yoksun *R. capsulatus* mutantlarının besi ortamı ve üreme sıcaklığına bağlı gösterdikleri karmaşık ve değişken fenotiplerin anlaşılması oldukça önemlidir. Bu nedenle gelecekte, farklı fizyolojik koşullarda OL 'in yokluğunun özgün membran proteinlerin sadece üretim oranını mı yoksa sentez sonrası yıkım oranını mı ya da her iki faktöründe mi etkilediği ve gözlenen bu değişikliklerin temelinde yatan moleküler mekanizma(ların)nın neler olduğu açıklanması gereken önemli sorulardır. OL içermeyen *R. capsulatus* mutantlarında gözlenen bu önemli değişikliklerin araştırılması, OL 'in başta bu bakteri olmak üzere diğer birçok bakterideki öneminin anlaşılmasını sağlayacaktır.

*R. capsulatus* 'un, OL içeren *S. meliloti* ve *R. sphaeroides* gibi bazı bakterilerden farklı olarak CL içermediği 2D-TLC analizi ile belirlendiği gibi, *E. coli* bakterisinde CL 'i kodlayan *cls* geni ile homolojiye sahip bir gene *R. capsulatus* genomunda rastlanılmamıştır. Mikrobiyal genom bilgi bankasından yararlanılarak, bakterilerin %15 'inin OL içerdiği buna karşılık CL içermediği, yine benzer yüzde de CL 'i içerdiği ancak OL 'i içermediği gözlenmiştir. *S. meliloti* bakterisinde OL 'den yoksun mutantların herhangi bir fenotip göstermemesi, makromoleküler kompleks oluşumu sırasında özgün membran protein-lipid interaksyonlarında OL ve CL 'in birbirinin yerine geçerek görev yapabilecekleri olasılığını düşündürmektedir. Bu nedenle devam etmekte olan yeni deneyler ile CL 'in varlığında veya yokluğunda OL 'i üretemeyen mutantların detaylı analizlerine başlanılmış olup, bu iki farklı lipid türünün protein aktiviteleri üzerinde benzer veya farklı rolleri aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- AILHAUD, G. P. ve P. R VAGELOS. 1966. Palmityl-acyl Carrier Protein as Acyl Donor for Complex Lipid Biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 241: 3866-3868.
- ALLEN, J. W., P. D. BARKER ve S. J. FERGUSON. 2003. A Cytochrome *b*<sub>562</sub> Variant With a *c*-type Cytochrome CXXCH Heme-binding Motif as a Probe of the *Escherichia coli* Cytochrome *c* Maturation System. J. Biol. Chem., 278: 52075–52083.
- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MEYERS ve D. J. LIPMAN. 1999. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol., 215: 403-410.
- ANRAKU, Y. ve R. B. GENNİS. 1987. The Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli*. Trends Biochem. Sci., 12: 262-266.
- ASSELINÉAU, J. 1991. Bacterial Lipids Containing Amino Acids or Peptides Linked by Amide Bonds. Fortschr. Chem. Org. Natur., 56: 1-85.
- AYGÜN, S. 1999. *Rhodobacter capsulatus* Bakterisinde Sitokrom *c* Oksidaz Mutantlarının Eldesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, BaÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir. 104 s.
- AYGUN-SUNAR, S., S. MANDACI, H.-G. KOCH, I. V. J. MURRAY, H. GOLDFINE ve F. DALDAL. 2006. Ornithine Lipid is Required for Optimal Steady-state Amounts of *C*-type Cytochromes in *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Microbiol., 61(2): 418–435.
- BATRAKOV, S. G. ve L. D. BERGELSON. 1978. Lipids of the *Streptomyces* Structural Investigation and Biological Interrelation. Chem. Phys. Lipids, 21: 1-29.
- BATRAKOV, S. G. ve D. I. NIKITIN. 1996. Lipid Composition of the Phosphatidylcholine-producing Bacterium *Hyphomicrobium vulgare* NP-160. Biochim. Biophys. Acta., 1302(2): 129-137.
- BATUT, J. ve P. BOISTARD. 1994. Oxygen Control in *Rhizobium*. Antonie van Leeuwenhoek, 66: 129-150.
- BAUSS, F., W. DRÖGE ve D. N. MÄNNEL. 1987. Tumor Necrosis Factor Mediates Endotoxic Effects in Mice. Infect. Immun., 55(7): 1622–1625.
- BECKMAN, D. L., D. R. TRAWICK ve R. G. KRANZ. 1992. Bacterial *c* Cytochrome Biogenesis. Genes Dev., 6: 268-283.
- BECKMAN, D. L. ve R. G. KRANZ. 1993. Cytochromes *c* Biogenesis in a Photosynthetic Bacterium Requires a Periplasmic Thioredoxin-like Protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2179-2183.



- BENNING, C. ve C. R. SOMERVILLE. 1992. Isolation and Genetic Complementation of a Sulfolipid-deficient Mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol., 174: 2352-2360.
- BENNING, C., J. T. BEATTY, R. C. PRINCE ve C. R. SOMERVILLE. 1993. The Sulfolipid Sulfoquinovosyldiacylglycerol is not Required for Photosynthetic Electron Transport in *Rhodobacter sphaeroides* but Enhances Growth Under Phosphate Limitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1561-1565.
- BENNING, C., Z. H. HUANG ve D. A. GAGE. 1995. Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betaine Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown Under Phosphate Limitation. Arch. Biochem. Biophys., 317: 103-111.
- BENNING, C. 1998. Biosynthesis and Function of the Sulfolipid Sulfoquinovosyl diacylglycerol. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 53-75.
- BERNARD, D. G., S. T. GABILLY, G. DUJARDIN, S. MERCHANT, P. P. HAMEL. 2003. Overlapping Specificities of the Mitochondrial Cytochrome *c* and *c*<sub>1</sub> Heme Lyases. J. Biol. Chem., 278: 49732-49742.
- BLIGH, E. G. ve J. W. DYER. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917.
- BROWN, A. P., J. COLEMAN, A. M. TOMMEY, M. D. WATSON ve A. R. SLABAS. 1994. Isolation and Characterization of a Maize cDNA That Complements a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase Mutant of *Escherichia coli* and Encodes a Protein which has Similarities to Other Acyltransferases. Plant Mol. Biol., 26: 211-223.
- BROWN, A. P., C. L. BROUGH, J. T. KROON ve A. R. SLABAS. 1995. Identification of a cDNA that Encodes a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase from *Limnanthes douglasii*. Plant Mol. Biol., 29: 267-278.
- BROWN, A. P., S. CARNABY, C. L. BROUGH, M. BRAZIER ve A. R. SLABAS. 2002. *Limnanthes douglasii* Lysophosphatidic Acid Acyltransferases: Immunological Quantification, Acyl Selectivity and Functional Replacement of *Escherichia coli plsC* Gene. Biochem J., 364:795-805.
- BOGDANOV, M. ve W. DOWHAN. 1998. Phospholipid-assistant Protein Folding: Phosphatidylethanolamine is Required at a Late Step of the Conformational Maturation of the Polytopic Membrane Protein Lactose Permease. EMBO J., 17: 5255-5264.
- BOGDANOV, M., M. UMEDA ve W. DOWHAN. 1999. Phospholipid-assisted Refolding of an Integral Membrane Protein. Minimum Structural Features for Phosphatidylethanolamine to Act as a Molecular Chaperone. J. Biol. Chem., 274: 12339-12345.

- CALHOUN, M. W., J. W. THOMAS ve R. B. GENNIS. 1994. The Cytochrome Oxidase. Superfamily of Redox-driven Proton Pumps. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 325-330.
- COHEN-BAZIRE, G., W., R. SISTROM ve R. Y. STANIER. 1957. Kinetic Studies on Pigment Synthesis by Nonsulfur Purple Bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49:25-68.
- COLEMAN, J. 1990. Characterization of *Escherichia coli* Cells Deficient in 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase Activity. *J. Biol. Chem.*, 265: 17215-17221.
- COLEMAN, J. 1992. Characterization of the *Escherichia coli* Gene for 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase (*plsC*). *Mol. Gen. Genet.*, 232:295-303.
- COSSEAU, C. ve J. BATUT. 2004. Genomics of the CcoNOQP-encoded *cbb<sub>3</sub>* Oxidase Complex in Bacteria. *Arc. Microbiol.*, 181(2): 89-96.
- COX, A. D. ve S. G. WILKINSON. 1989. Polar Lipids and Fatty Acids of *Pseudomonas cepacia*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1001: 60-67.
- CROOKE, H. ve J. COLE. 1995. The Biogenesis of *c*-type Cytochromes in *Escherichia coli* Requires a Membrane-bound Protein, DipZ, with a Protein Disulphide Isomerase-like Domain. *Mol. Microbiol.*, 15: 1139–1150.
- CRONAN, J. E. JR. ve C. O. ROCK. 1996. Biosynthesis of Membrane Lipids. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, p.612-636. Edited by F. C. Neidhardt ve ark. Washington, DC:American Society for Microbiology.
- CRONAN, J. E., Jr. 2003. Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 203–224.
- CULLINANE, M., C. BAYSSE, J. P. MORRISSEY ve E F. O'GARA. 2005. Identification of Two Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Genes With Overlapping Function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 151: 3071-3080.
- DALDAL, F., S. CHENG, J. APPLEBAUM, E. DAVIDSON ve R. PRINCE. 1986. Cytochrome *c<sub>2</sub>* is not Essential for Photosynthetic Growth of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2012-2016.
- DAWSON, R. M. C. 1967. Analysis of Phosphatides and Glycolipids by Chromatography of Their Partial hydrolysis of Alcoholysis Products, p. 163-189. In G. Marinetti (ed.), *Chromatographic Analysis of Lipids*, vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.
- DE GIER, J.-W. L., M. SCHEPPER, W. N. M. REJINDERS ve ark. 1996. Structural and Functional Analysis of *aa<sub>3</sub>*-type and *cbb<sub>3</sub>*-type Cytochrome *c* Oxidases of *Paracoccus denitrificans* Reveals Significant Differences in Proton-pump Design. *Mol. Microbiol.*, 20: 1247-1260.

- DESHMUKH, M., G. BRASSEUR ve F. DALDAL. 2000. Novel *Rhodobacter capsulatus* Genes Required for the Biogenesis of Various *c*-type Cytochromes. *Mol. Microbiol.*, 35: 123-138.
- DILLON, D. A., W. I. WU, B. RIEDEL, J. B. WISSING, W. DOWHAN ve G. M. CARMAN. 1996. The *Escherichia coli* *pgpB* Gene Encodes for a Diacylglycerol Pyrophosphate Phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 271: 30548-30553.
- DiRusso, C. C., P. N. Black ve J. D. Weimar. 1999. Molecular Inroads into the Regulation and Metabolism of Fatty Acids, Lessons From Bacteria. *Prog. Lipid Res.*, 38: 129-197.
- DITTA, G., T. SCHMIDHAUSER, E. YACOBSON ve diğerleri. 1985. Plasmids Related to the Broad Host Range Vector, pRK290, Useful for Gene Cloning and for Monitoring Gene Expression. *Plasmid*, 13: 149-153.
- DITTMER, J. C. ve R. L. LESTER. 1964. A Simple Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-layer Chromatograms. *J. Lipid Res.*, 5: 126-127.
- DOWHAN, W. E. MILEYKOVSKAYA ve M. BOGDANOV. 2004. Diversity and Versatility of Lipid-Protein Interactions Revealed by Molecular Genetic Approaches. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1666: 19-39.
- EAVES, D. J., J. GROVE, W. STAUDENMANN ve diğerleri. 1998. Involvement of Products of the *nrfEFG* Genes in the Covalent Attachment of Haem *c* to a Novel Cysteine-lysine Motif in the Cytochrome *c*<sub>552</sub> Nitrite Reductase From *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 43: 205-216.
- EBLE, K. S., W. B. COLEMAN, R. R. HANTGAN ve C. C. CUNNINGHAM. 1990. Tightly Associated Cardiolipin in the Bovine Heart Mitochondrial ATP Synthase as Analyzed by 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 265: 19434-19440.
- FUKAYA, M., K. TAYAMA, T. TAMAKI ve diğerleri. 1993. Characterization of a Cytochrome *a*<sub>1</sub> that Functions as a Ubiquinol Oxidase in *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.*, 175(14): 4307-4314.
- GALANOS, C., O. LÜDERITZ, E. T. RIETSCHKE ve diğerleri. 1985. Synthetic and Natural *Escherichia coli* Free Lipid A Express Identical Endotoxic Activities. *Eur. J. Biochem.*, 148(1): 1-5.
- GAO, J., B. WEISSENMAYER, A. M. TAYLOR, J. THOMAS-OATES, I-M. LOPEZ-LARA ve O. GEIGER. 2004. Identification of a Gene Required for the Formation of Lyso-ornithine Lipid, an Intermediate in the Biosynthesis of Ornithine-containing Lipids. *Mol. Microbiol.*, 53: 1757-1770.

- GARCIA-HORSMAN, J. A., B. BARQUERA, J. RUMBLEY, J. MA ve R. B. GENNIS. 1994a. The Superfamily of Heme-copper Respiratory Oxidases. *J. Bacteriol.*, 176: 5587-5600.
- GARCIA-HORSMAN, J. A., E. BERRY, J. P. SHAPLEIGH, J. O. ALBEN ve R. B. GENNIS. 1994b. A Novel Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that Lacks Cu<sub>A</sub>. *Biochemistry*, 33: 3113–311.
- GEIGER, O. 1998. Phospholipids and Alternative Membrane Lipids. *In The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated bacteria*. Spaink, H.P. Kondorosi, A., ve Hooykaas, P.J.J. (eds). Dordrecht, the Netherlands:Kluwer Academic Publishers. Pp. 55-80.
- GEIGER, O., V. ROHRS, B. WEISSENMAYER, T. M. FINAN ve J. THOMAS-OATES. 1999. The Regulator Gene *phoB* Mediates Phosphate Stress-controlled Synthesis of the Membrane Lipid Diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol. Microbiol.*, 32: 63–73.
- GOLDFINE, H., G. P. AILHAUD ve P. R. VAGELOS. 1967. Involvement of Acyl Carrier Protein in Acylation of Glycerol 3-Phosphate in *Clostridium butyricum*. Evidence for Participation of Acyl Thioesters of Acyl Carrier Protein. *J. Biol. Chem.*, 242: 4466-4475.
- GOLDFINE, H. 1969. Filter Paper Disk Assay for Lipid Synthesis. *Methods in Enzymology*, 14: 649-651.
- GOLDFINE, H. ve G. P. AILHAUD. 1971. Fatty Acyl-acyl Carrier Protein and Fatty Acyl-CoA in the Biosynthesis of Phosphatidic Acid in *Clostridium butyricum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45: 1127-1133.
- GOLDFINE, H. 1982. Lipids of Prokaryotes-structure and Distribution. *Curr. Topics Membr. Trans.*, 17: 1-43.
- GOLDFINE, H. 1984. Bacterial Membranes and Lipid Packing Theory. *J. Lipid Res.*, 25: 1501-1507.
- GOLDMAN, B. S., D. L. BECKMAN, A. BALI, E. M. MONIKA, K. K. GABBERT ve R. G. KRANZ. 1997. Molecular and Immunological Analysis of an ABC Transporter Complex Required for Cytochrome *c* Biogenesis. *J. Mol. Biol.*, 268: 724–738.
- GORCHEIN, A., A. NEUBERGER ve G. H. TAIT. 1968. The Isolation and Characterization of Subcellular Fractions From Pigmented and Unpigmented Cells of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 170: 229-246.
- GORCHEIN, A. 1968. Studies on the Structure of an Ornithine-Containing Lipid from Non-Sulphur Purple Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 152: 358-367.

- GRAY, K. A., M. GROOMS, H. MYLLYKALLIO, C. MOOMAW, C. SLAUGHTER ve F. DALDAL. 1994. *Rhodobacter capsulatus* Contains a Novel *cb*-type Cytochrome *c* Oxidase without a Cu<sub>A</sub> Center. *Biochemistry*, 33: 3120-3127.
- GROGAN, D. W. ve J. E. JR. CRONAN. 1997. Cyclopropane Ring Formation in Membrane Lipids of Bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 61: 429-441.
- GÜLER, S., A. SEELIGER, H. HARTEL, G. RENGER ve C. BENNING. 1996. A Null Mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 Deficient in the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *J. Biol. Chem.*, 271 (13): 7501-7507.
- HANKE C., F. P. WOLTER, J. COLEMAN, G. PETEREK ve M. FRENTZEN. 1995. A Plant Acyltransferase Involved in Triacylglycerol Biosynthesis Complements an *E. coli sn*-1-acylglycerol-3-phosphate Acyltransferase Mutant. *Eur. J. Biochem.*, 232: 806-810.
- HEATH R. J., H. GOLDFINE ve C.O. ROCK. 1997. A gene (*plsD*) from *Clostridium butyricum* that Functionally Substitutes for the *sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase Gene (*plsB*) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179: 7257-7263.
- HEATH, R. J. ve C. O. ROCK. 1998. A Conserved Histidine is Essential for Glycerolipid Acyltransferase Catalysis. *J. Bacteriol.*, 180: 1425-1430.
- HELDE, R., B. WIESLER, E. WACHTER ve diğerleri. 1997. Comparative Characterization of SecA From the  $\alpha$ -subclass Purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli* Reveals Differences in Membrane and Precursor Specificity. *J. Bacteriol.*, 179: 4003-4012.
- HOSLER, J. P., S. FERGUSON-MILLER, M. W. CALHOUN ve diğerleri. 1993. Insight into the Active-site Structure and Function of Cytochrome Oxidase by Analysis of Site-directed Mutants of Bacterial Cytochrome *aa*<sub>3</sub> Oxidase and Cytochrome *bo*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 25: 121-136.
- HSU, S. M. ve E. SOBAN. 1982. Color Modification of Diaminobenzidine (DAB) Precipitation by Metallic Ions and Its Application for Double Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 30:1079-1082.
- HUIJBREGTS, R. P., A. I. DE KROON ve B. DE KRUIJFF. 1996. Rapid Transmembrane Movement of C6-NBD-labeled Phospholipids Across the Inner Membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1469: 43-61.
- IMHOFF, J. F. ve U. BIAS-IMHOFF. 1995. in Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE editors. Anoxygenic photosynthetic bacteria. Dordrecht:Kluwer Academic Publishers. 10, Lipids, quinones and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. P. 179-205.

- JENNEY, F. E. JR. ve F. DALDAL. 1993. A Novel Membrane-associated C-type Cytochrome, Cytochrome  $c_y$ , can Mediate the Photosynthetic Growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.*, 12: 1283-92.
- JENNEY, F. E. JR, R. C. PRINCE ve F. DALDAL. 1994. Roles of the Soluble Cytochrome  $c_2$  and Membrane-associated Cytochrome  $c_y$  of *Rhodobacter capsulatus* in Photosynthetic Electron Transfer. *Biochemistry*, 33(9): 2496–2502.
- JIANG, X. ve X. WANG. 2004. Cytochrome-c-mediated Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 87–106.
- KAHN, D., M. DAVID, O. DOMERGUE, M.-L. DAVERAN, J. GHAI, P. R. HIRSCH ve J. BATUT. 1989. *Rhizobium meliloti fixGHI* Sequence Predicts Involvement of a Specific Cation Pump in Symbiotic Nitrogen Fixation. *J. Bacteriol.*, 171: 929-939.
- KANFER, J. ve E. P. KENNEDY. 1964. Metabolism and Function of Bacterial Lipids. II. Biosynthesis of Phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 239: 1720-1726.
- KATO, H. ve N. GATO. 1997. Adjuvanticity of an Ornithine-containing Lipid of *Flavobacterium meningosepticum* as a Candidate Vaccine Adjuvant. *Microbiol. Immunol.*, 41(2): 101-106.
- KAWAI, Y. ve I. YANO. 1983. Ornithine-containing Lipid of *Bordetella pertussis*, a New Type of Hemagglutinin. *Eur. J. Biochem.*, 136(3): 531–538.
- KAWAI, Y., I. YANO ve K. KANEDA. 1988a. Various Kinds of Lipoamino Acids Including a Novel Serine-containing Lipid in an Opportunistic Pathogen *Flavobacterium*. Their Structures and Biological Activities on Erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 171: 73–80.
- KAWAI, Y., I. YANO, K. KANEDA ve E. YABUUCHI. 1988b. Ornithine-containing Lipids of Some *Pseudomonas* Species. *Eur. J. Biochem.*, 175: 633–641.
- KAWAI, Y. ve K. AKAGAWA. 1989. Macrophage Activation by an Ornithine-containing Lipid or a Serine-containing Lipid. *Infect. Immun.*, 57(7): 2086–2091.
- KAWAI, Y., K. KANEDA, Y. MORISAWA ve K. AKAGAWA. 1991. Protection of Mice From Lethal Endotoxemia by Use of an Ornithine-containing Lipid or a Serine-containing Lipid. *Infect. Immun.*, 59: 2560–2566.
- KAWAI, Y., N. TAKASUKA, K. AKAGAWA ve S. NAITO. 1996. Hypothermic Response of Mice to Ornithine-containing Lipids and to Endotoxin. *Infect. Immun.*, 64: 2101–2105.
- KAWAI, Y. Y. NAKAGAWA, T. MATUYAMA ve diğerleri. 1999. A Typical Bacterial Ornithine-containing Lipid N<sup>α</sup>-(D)-[3 (hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a Strong Stimulant for Macrophages and a Useful Adjuvant. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 23: 67-73.

KAWAI, Y., N. TAKASUKA, K. INOUE, K. AKAGAWA ve M. NISHIJIMA. 2000a. Ornithine-containing Lipids Stimulate CD14-dependent TNF-alpha Production From Murine Macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 Cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 28: 197–203.

KAWAI, Y., A. I. OKAWARAB, H. OKUYAMA, F. KURA ve K. SUZUKI. 2000b. Modulation of Chemotaxis, O(2)(-) Production and Myeloperoxidase Release From Human Polymorphonuclear Leukocytes by the Ornithine-containing Lipid and the Serine Glycine-Containing Lipid of *Flavobacterium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 28: 205–209.

KAWASAKI, H., M. MORIYAMA, Y. OHTANI, M. NAITOH, A. TANAKA ve H. NARIUCHI. 1989. Analysis of Endotoxin Fever in Rabbits by Using a Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor (cachectin). *Infect. Immun.*, 57: 3131–3135.

KEILIN, D. 1966. *The History of Cell Respiration and Cytochromes*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

KESSELS, J. M. M., H. OUSEN ve H. VAN DEN BOSCH. 1983. Facilitated Utilization of Endogenously Synthesized Lysophosphatidic Acid by 1-acylglycerophosphate Acyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 753: 227–235.

KNUTZON, D. S., K. D. LARDIZABAL, J. S. NELSEN, J. L. BLEIBAUM, H. M. DAVIES ve J. G. METZ. 1995. Cloning of a Coconut Endosperm cDNA Encoding a 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase that Accepts Medium-chain-length Substrates. *Plant Physiol.*, 109: 999–1006.

KNOCHE, H. W. ve J. M. SHIVELY. 1972. The Structure of an Ornithine-containing Lipid From *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem.*, 247: 170.

KOCH, H.-G., O. HWANG ve F. DALDAL. 1998. Isolation and Characterization of *Rhodobacter capsulatus* Mutants Affected in Cytochrome *cbb*<sub>3</sub> Oxidase Activity. *J. Bacteriol.*, 180:969-978.

KOCH, H.-G., C. WINTERSTEIN, A. S. SARIBAS, J. O. ALBEN ve F. DALDAL. 2000. Roles of the *ccoGHIS* Gene Products in the Biogenesis of the *cbb*<sub>3</sub>-type Cytochrome *c* Oxidase. *J. Mol. Biol.*, 297: 49-65.

KOTANI, S., H. TAKADA, M. TSUJIMOTO ve diğerleri. 1985. Synthetic Lipid A With Endotoxic and Related Biological Activities Comparable to Those of a Natural Lipid A From an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect. Immun.*, 149(1): 225–237.

KRANZ, R, R. LILL, B. GOLDMAN, G. BONNARD ve S. MERCHANT. 1998. Molecular Mechanisms of Cytochrome *c* Biogenesis: Three Distinct Systems. *Mol. Microbiol.*, 29: 383-396.

- KULAJTA, C., J. O. THUMFART, S. HAID, F. DALDAL ve H-G. KOCH. 2006. Multi-step Assembly Pathway of the *cbb<sub>3</sub>*-type Cytochrome *c* Oxidase Complex. *J. Mol. Biol.*, 355: 989-1004.
- LA MONICA, R. F. ve B. L. MARRS. 1976. The Branched Respiratory System of Photosynthetically Grown *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 423: 431-439.
- LAEMMELI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LANÈELLE, M.-A., D. PROMÈ, G. LANÈELLE ve J.-C. PROMÈ. 1990. Ornithine Lipid of *Mycobacterium tuberculosis*: Its Distribution in Some Slow- and Fast-growing Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 773-778.
- LANG, S. E., F. E. JENNEY ve F. DALDAL. 1996. *Rhodobacter capsulatus* C<sub>ycH</sub>: a Bipartite Gene Product with Pleiotropic Effects on the Biogenesis of Structurally Different *c*-type Cytochromes. *J. Bacteriol.*, 178: 5279-5290.
- LANGE, C., J. H. NETT, B. L. TRUMPOWER ve C. HUNTE. 2001. Specific Roles of Tightly Bound Phospholipids in the Yeast Cytochrome *bc<sub>1</sub>* Complex Structure. *EMBO J.*, 20: 6591-6600.
- LANGLEY, K. E., E. HAWROT ve E. E. P. KENNEDY. 1982. Membrane Assembly: Movement of Phosphatidylserine Between the Cytoplasmic and Outer Membranes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152: 1033-1041.
- LAURAEUS, M., T. HALTIA, M. SARASTE ve M. WIKSTROM. 1991. *Bacillus subtilis* Expresses Two Kinds of Haem-A-containing Terminal Oxidases. *Eur. J. Biochem.*, 197(3): 699-705.
- LEMBERG, R. ve J. BARRETT. 1973. *Cytochromes*. Academic Press, New York.
- LÓPEZ-LARA, I. M., C. SOHLENKAMP ve O. GEIGER. 2003. Membrane Lipids in Plant-associated Bacteria: Their Biosynthesis and Possible functions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16: 567-579.
- LÓPEZ-LARA, I. M., J.-L. GAO, M. J. SOTO ve diğerleri. 2005. Phosphorus-free Membrane Lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not Required for the Symbiosis With Alfalfa But Contribute to Increased Cell Yields Under Phosphorus Limiting Conditions of growth. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18: 973-982.
- LOS, D.A. ve N. MURATA. 2004. Membrane Fluidity and its Roles in the Perception of Environmental Signals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1666: 142-157.
- LOWRY, O. ve N. ROSEBROUGH. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.



- LUEKING, D. R. ve H. GOLDFINE. 1975. *Sn*-glycerol-3-phosphate Acyltransferase Activity in Particulate Preparations from Anaerobic, Light-grown Cell of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. The Involvement of Acyl Thiolester Derivatives of Acyl Carrier Protein in Complex Lipid Synthesis. *J. Biol. Chem.*, 250: 8530-8535.
- MARRS, B. L. ve H. GEST. 1973. Genetic Mutations Affecting the Respiratory Electron-Transport System of the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, 114:1045-1051.
- MARTINO, J. C., S. DESAGHER ve B. ANTONSSON. 2000. Cytochrome *c* Release From Mitochondria: All or Nothing. *Nat. Cell Biol.*, 2(3): E41-E43.
- MATSUSHITA, K., E. SHINAGAWA, O. ADACHI ve M. AMEYAMA. 1990. Cytochrome *a*<sub>1</sub> of *Acetobacter acetii* is a Cytochrome *ba* Functioning as Ubiquinol Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9863–9867.
- MERCHANT, S. ve B. W. DREYFUSS. 1998. Posttranslational Assembly of Photosynthetic Metalloproteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 25-51.
- METHERINGHAM, R., L. GRIFFITHS, H. CROOKE, S. FORSYTHE ve J. COLE. 1995. An Essential Role for DsbA in Cytochrome *c* Synthesis and Formate-dependent Nitrite Reduction by *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.*, 164(4): 301–307.
- MICHIE, H. R., K. R. MANOGUE, D. R. SPRIGGS ve diğerleri. 1988. Detection of Circulating Tumor Necrosis Factor After Endotoxin Administration. *N. Engl. J. Med.*, 318(23): 1481–1486.
- MILLER, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MINGHETTI, K. C., V. C. GOSWITZ, N. E. GABRIEL ve diğerleri. 1992. Modified, Large-scale Purification of the Cytochrome *o* Complex (*bo*-type oxidase) of *Escherichia coli* Yields a two Heme/one Copper Terminal Oxidase With High Specific Activity. *Biochemistry*, 31: 6917–6924.
- MINNIKIN, D. E., H. ABDOLRAHIMZADEH ve J. BADDILEY. 1972. Variation of Polar Lipid Composition of *Bacillus subtilis* (Marburg) With Different Growth Conditions. *FEBS Lett.*, 27: 16–18.
- MINNIKIN, D. E. ve H. ABDOLRAHIMZADEH. 1974. The Replacement of Phosphatidyl-ethanolamine and Acidic Phospholipids by an Ornithine-amide Lipid and a minor Phosphorous free Lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS Lett.*, 43: 257–260.
- MISSIAKAS, D. ve S. RAINA. 1997. Protein Folding in the Bacterial Periplasm. *J. Bacteriol.*, 179: 2465–2471.

- MIYAZAKI, Y., S. OKA, H. HOTTA ve I. YANO. 1993. Stimulation and Inhibition of Polymorphonuclear Leukocytes Phagocytosis by Lipoamino Acids Isolated From *Serratia marcescens*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6: 265–272.
- MONIKA, E. M., B. S. GOLDMAN, D. L. BECKMAN ve R. G. KRANZ. 1997. A Thioreduction Pathway Tethered to the Membrane for Periplasmic Cytochromes *c* Biogenesis; *in vitro* and *in vivo* Studies. J. Mol. Biol., 271: 679-692.
- MOORE, G. R. ve G. W. PETTIGREW. 1990. Cytochrome *c*. Evolutionary, Structural and Physiological Aspects. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- MOUNCEY, N. J. ve S. KAPLAN. 1998. Oxygen Regulation of the *ccoN* Gene Encoding a Component of the *cbb<sub>3</sub>* oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: Involvement of the FnrL Protein. J. Bacteriol., 180: 2228-2231.
- MYERS, C. R. ve J. M. MYERS. 1992. Localization of Cytochromes to the Outer Membrane of Anaerobically Grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol., 174: 3429-3438.
- MYLLYKALLIO, H., F. E. JR JENNEY, C. R. MOOMAW, C. A. SLAUGHTER ve F. DALDAL. 1997. Cytochrome *c<sub>y</sub>* of *Rhodobacter capsulatus* is Attached to the Cytoplasmic Membrane by an Uncleaved Signal Sequence-like Anchor. J. Bacteriol., 179: 2623–2631.
- MYLLYKALLIO, H., D. ZANNONI ve F. DALDAL. 1999. *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome *c<sub>y</sub>* is a Membrane-attached Electron Carrier That is Deficient in Photosynthesis but Proficient in Respiration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4348–4353.
- NAGIEC, M. M., G. B. WELLS, R. L. LESTER ve R. C. DICKSON. 1993. A Suppressor Gene That Enables *Saccharomyces cerevisiae* to Grow Without Making Sphingolipids Encodes a Protein that Resembles an *Escherichia coli* Fatty Acyltransferase. J. Biol. Chem., 268(29): 22156-22163.
- OH, J.-I. ve S. KAPLAN. 2002. Oxygen Adaptation. The Role of the CcoQ Subunit of the *cbb<sub>3</sub>* Cytochrome *c* Oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Biol. Chem., 277(18): 16220-16228.
- OJAIMI, C., B. E. DAVIDSON, I. SAINT GIRONS ve I. G. OLD. 1994. Conservation of Gene Arrangement and an Unusual Organization of rRNA Genes in the Linear Chromosomes of the Lyme Disease Spirochetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. Microbiology, 140: 2931-2940.
- PAGE, M. D., Y. SAMBONGI ve S. J. FERGUSON. 1998. Contrasting Routes of *c*-type Cytochrome Assembly in Mitochondria, Chloroplasts and Bacteria. Trends Biochem. Sci., 23: 103-108.

- PEREIRA, M., M. SANTANA ve M. TEIXEIRA. 2001. A Novel Scenario for the Evolution of Haem-copper Oxygen Reductases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1505: 185-208.
- PETTIGREW, G. W. ve G. R. MOORE. 1987. *Cytochromes c: Biological Aspects*. Springer-Verlag, New York.
- PHUNG, L. V., T. T. B. CHI, H. HOTTA, E. YABUUCHI ve I. YANO. 1995. Cellular Lipid and Fatty Acid Compositions of *Burkholderia pseudomallei* Strains Isolated From Human and Environment in Viet Nam. *Microbiol. Immunol.*, 39: 105-116.
- PITCHER, R. S., T. BRITTAIN ve N. J. WATMOUGH. 2002. Cytochrome *cbb*<sub>3</sub> Oxidase and Bacterial Microaerobic Metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 30: 653-658.
- PITCHER, R. S. ve N. J. WATMOUGH. 2004. The Bacterial Cytochrome *cbb*<sub>3</sub> Oxidases. *Biochim. Biophys. Acta. (Bioenergetics)*, 1655: 388–399.
- PORAT, A., S. H. CHO ve J. BECKWITH. 2004. The Unusual Transmembrane Electron Transporter DsbD and its Homologues: a Bacterial Family of Disulfide Reductases. *Res. Microbiol.*, 155: 617–622.
- PREISIG, O., R. ZUFFEREY ve H. HENNECKE. 1996. The *Bradyrhizobium japonicum fixGHIS* Genes are Required for the Formation of the High-affinity *cbb*<sub>3</sub>-type Cytochrome Oxidase. *Arch. Microbiol.*, 165: 297-305.
- PRENTKI, P. ve H. M. KRISCH. 1984. *In vitro* Insertional Mutagenesis with a Selectable DNA Fragment. *Gene*, 29: 293-303.
- PROME, J.-C., C. LACAVE ve M.-A. LANEELLE. 1969. Sur les structures de lipide a ornithine de *Brucella melitensis* et de *Mycobacterium bovis* (B. C. G.) C. R. Acad. Sci. Ser. C. 269:1664-1667.
- RAETZ, C. R. H. 1986. Molecular Genetics of Membrane Phospholipid Synthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 20: 253-295.
- RAETZ, C. R. H. ve W. DOWHAN. 1990. Biosynthesis and Function of Phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 265: 1235–1238.
- RAIVIO, T. L. 2005. Envelope Stress Responses and Gram-negative Bacterial Pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 56: 1119–1128.
- RATLEDGE, C. ve S. G. WILKINSON. 1988. Fatty Acids, Related and Derived Lipids. In *Microbial Lipids*, Vol. 1. Ratledge, C. ve S. G. Wilkinson (eds). London: Academic Press, pp. 23–53.
- RICHTER, O. ve B. LUDWIG. 2003. Cytochrome *c* Oxidase-Structure, Function, and Physiology of a Redox-driven Molecular Machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*,

147: 47-74.

RIETSCHER, E. T., U. SCHADE, O. LÜDERDITZ, H. FISCHER ve B. A. PESKAR. 1980. Prostaglandins in Endotoxycosis. In: Schlessinger D (ed) Microbiology. Am Soc Microbiology, Washington DC.

RIETSCHER, E. T., U. SCHADE, M. JENSEN, H. W. WOLLENWEBER, O. LUDERITZ ve S. G. GREISMAN. 1982. Bacterial Endotoxins: Chemical Structure, Biological Activity and Role in Septicaemia. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 31: 8-21.

ROBINSON, N. C. 1993. Functional Binding of Cardiolipin to Cytochrome *c* Oxidase. J. Bioenerg. Biomembr., 25(2): 153-63.

ROCK, C. O., J. E. CRONAN, JR. ve I. M. ARMITAGE. 1981. Molecular Properties of Acyl Carrier Protein Derivatives. J. Biol. Chem., 256: 2604-2674.

ROCK, C. O. ve S. JACKOWSKI. 1982. Regulation of Phospholipid Synthesis in *Escherichia coli*. Composition of the Acyl-acyl Carrier Protein Pool *in vivo*. J. Biol. Chem., 257: 10759-10765.

ROJAS-JIMENEZ, K., C. SOHLENKAMP, O. GEIGER, E. MARTINEZ-ROMERO, D. WERNER ve P. VINUESA. 2005. A CIC Chloride Channel Homolog and Ornithine-containing Membrane Lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are Involved in Symbiotic Efficiency and Acid Tolerance. Mol. Plant Microbe Interact., 18: 1175–1185.

ROSZAK, A. W., T. D. HOWARD, J. SOUTHALL, A. T. GARDINER, C. J. LAW, N. W. ISAACS ve R. J. COGDELL. 2003. Crystal Structure of the RC-LH1 Core Complex From *Rhodospseudomonas palustris*. Science, 302: 1969–1972.

DE RUDDER, K. E. E, J. E. THOMAS-OATES ve O. GEIGER. 1997. *Rhizobium meliloti* Mutants Deficient in Phospholipids *N*-methyltransferase Still Contain Phosphatidylcholine. J. Bacteriol., 179: 6921-6928.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH ve T. MANIATIS. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANDERS, C., M. DESHMUKH, D. ASTOR, R. G. KRANZ ve F. DALDAL. 2005. Overproduction of CcmG and CcmFHRC Fully Suppresses the *c*-type Cytochrome Biogenesis Defect of *Rhodobacter capsulatus* CcmI-null Mutants. J. Bacteriol., 187: 4245–4256.

SARASTE, M. 1990. Structural Features of Cytochrome Oxidase. Q. Rev. Biophys., 23: 331-366.

SCHÄGGER, H. ve G. VON JAGOW. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range From 1 to 100 Kda. Anal. Biochem., 166: 368-379.

- SCOLNIK, P. A., M. A. WALKER ve B. L. MARRS. 1980. Biosynthesis of Carotenoids Derived From Neurosporene in *Rhodospseudomonas capsulata*. J. Biol. Chem., 255: 2427-2432.
- SEDLAK, E. ve N. C. ROBINSON. 1999. Phospholipase A2 Digestion of Cardiolipin Bound to Bovine Cytochrome *c* Oxidase Alters Both Activity and Quaternary Structure. Biochemistry, 38: 14966–14972.
- SETTERDAHL, A. T., B. S. GOLDMAN, M. HIRASAWA, P. JACQUOT, A. J. SMITH, R. G. KRANZ ve D. B. KNAFF. 2000. Oxidation-reduction Properties of Disulfide-containing Proteins of the *Rhodobacter capsulatus* Cytochrome *c* Biogenesis System. Biochemistry, 39(33): 10172-10176.
- SHAPLEIGH, J. P., J. P. HOSLER, M. M. TECKLENBURG, Y. KIM, G. T. BABCOCK, R. B. GENNIS ve S. FERGUSON-MILLER. 1992. Definition of the Catalytic Site of Cytochrome *c* Oxidase: Specific Ligands of Heme *a* and the Heme  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> Center. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(11): 4786–4790.
- SHIH, G. C., C. M. KAHLER, J. S. SWARTLEY, M. M. RAHMAN, J. COLEMAN, R. W. CARLSON ve D. S. STEPHENS. 1999. Multiple Lysophosphatidic Acid Acyltransferases in *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol., 32: 942–952.
- SIBLEY, C. H., A. TERRY ve C. R. H. RAETZ. 1988. Induction of K Light Chain Synthesis in 70Z/3 B Lymphoma Cells by Chemically Defined Lipid A Precursors. J. Biol. Chem., 263: 5098-5103.
- SIMON, R., U. PRIEFER ve A. PUHLER. 1983. A Broad Host Range Mobilization System For *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis In Gram-Negative Bacteria. Bio. Technology, 1:37-45.
- SISTROM, W. R. 1960. A requirement for Sodium in the Growth Medium of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. Gen Microbiol., 22: 77–85.
- SMITH, P. F. 1988. in Ratledge C., Wilkinson S. G., editors. Microbial Lipids Vol 1. London: Academic Press: 8, Archaeobacteria and Other Specialized Bacteria. P. 489-553.
- SOHLENKAMP, C., I. M. LÓPEZ-LARA ve O. GEIGER. 2003. Biosynthesis of Phosphatidylcholine in Bacteria. Prog. Lipid Res., 42: 115-162.
- STEVENS, J. M., O. DALTROP, J. W. A. ALLEN ve S. J. FERGUSON. 2004. C-type Cytochrome Formation: Chemical and Biological Enigmas. Acc. Chem. Res., 37: 999–1007.
- SWARTLEY, J. S., J. T. BALTHAZAR, J. COLEMAN, W. M. SHAFER ve D. S. STEPHENS. 1995. Membrane Glycerophospholipid Biosynthesis in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Identification, Characterization, and Mutagenesis of a Lysophosphatidic Acid Acyltransferase. Mol. Microbiol., 18: 401-412.

- TATUSOV, R.L., D. A. NATALE, I. V. GARKAVTSEV ve diğerleri. 2001. The COG Database: New Developments in Phylogenetic Classification of Proteins from Complete Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 29: 22-28.
- TAYLOR, C. J., A. J. ANDERSON ve S. G. WILKINSON. 1998. Phenotypic Variation of Lipid Composition in *Burkholderia cepacia*: a Response to Increased Growth Temperature is a Greater Content of 2- hydroxy Acids in Phosphatidylethanolamine and Ornithine Amide Lipid. *Microbiology*, 144: 1737-1745.
- THIELE, O. W. ve G. SCHWINN. 1973. The Free Lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *Eur. J. Biochem.*, 34: 333-344.
- THOMAS, P. E., D. RYAN ve W. LEVIN. 1976. An Improved Staining Procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of Cytochrome *P450* on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, 75: 168-176.
- THOMPSON, J., D. HIGGINS ve T. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighing, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acid Res.*, 22: 4673-4680.
- THÖNY-MEYER, L., C. BECK, O. PREISIG ve H. HENNECKE. 1994. The *ccoNOQP* Gene Cluster Codes for a *cb*-Type Cytochrome *c* Oxidase That Functions in Aerobic Respiration of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.*, 174: 705-716.
- THÖNY-MEYER, L., F. FISCHER, P. KUNZLER, D. RITZ ve H. HENNECKE. 1995. *Escherichia coli* Genes Required for Cytochrome *c* Maturation. *J. Bacteriol.*, 177 (15): 4321-4326.
- THÖNY-MEYER, L. 2002. Cytochrome *c* Maturation: a Complex Pathway for a Simple Task? *Biochem. Soc. Trans.*, 30: 633-638.
- TROPP, B. E. 1997. Cardiolipin Synthase From *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1348:192-200.
- TURKARSLAN, S., C. SANDERS ve F. DALDAL. 2006. Extracytoplasmic Prosthetic Group Ligation to Apoproteins: Maturation of *c*-type Cytochromes. *Mol. Microbiol.*, 60(3): 537-541.
- URBANI, A., S. GEMEINHARDT, A. WARNE ve M. SARASTE. 2001. Properties of the Detergent Solubilised Cytochrome *c* Oxidase (cytochrome *cbb<sub>3</sub>*) Purified from *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Lett.*, 508: 29-35.
- VAN DEN BOSCH H. ve P. R. VAGELOS. 1970. Fatty Acyl-CoA and Fatty Acyl-acyl Carrier Protein as Acyl Donors in the Synthesis of Lysophosphatidate and Phosphatidate in *Escherichia coli*. *Biochim, Biophys. Acta.*, 218:233-248.

- VAN DALEN, A. ve B. DE KRUIJFF. 2004. The Role of Lipids in Membrane Insertion and Translocation of Bacterial proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1694: 97-109.
- VAN DER OOST J., A. P. N. DE BOER, J. W. L. DE GIER ve diğerleri. 1994. The Heme-copper Oxidase Family Consists of Three Distinct Types of Terminal Oxidases and is Related to Nitric Oxide Reductase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 121: 1-10.
- VAN KLOMPENBURG, W. ve B. DE KRUIJFF. 1998. The Role of Anionic Lipids in Protein Insertion and Translocation in Bacterial Membranes. *J. Membr. Biol.*, 162(1): 1-7.
- WANG, J., K. A. GRAY, F. DALDAL ve D. L. ROUSSEAU. 1995. The *cbb<sub>3</sub>*-type Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter capsulatus* Contains a Unique Active Site. *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 9363-9364.
- WEISSENMAYER, B., J.-L. GAO, I. M. LOPEZ-LARA ve O. GEIGER. 2002. Identification of a Gene Required for the Biosynthesis of Ornithine-derived Lipids. *Mol. Microbiol.*, 45: 721-733.
- WEST, J., C. K. TOMPKINS, N. BALANTAC ve diğerleri. 1997. Cloning and Expression of Two Human Lysophosphatidic Acid Acyltransferase cDNAs That Enhances Cytokine-Induced Signaling Responses in Cells. *DNA Cell Biol.*, 16: 691-701.
- WILKINSON, S. G. 1972. Composition and Structure of the Ornithine-containing Lipid From *Pseudomonas rubescens*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 270: 1-17.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- WU, W., C. K. CHANG, C. VAROTSIS, G. T. BABCOCK, A. PUUSTINEN ve M. WIKSTRÖM. 1992. Structure of the Heme o Prosthetic Group from the Terminal Quinol Oxidase of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1182-1187.
- XIA, W. ve W. DOWHAN. 1995. *In vivo* Evidence for the Involvement of Anionic Phospholipids in Initiation of DNA Replication in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 783-787.
- YEN, H. C., N. T. HU ve B. L. MARRS. 1979. Characterization of the Gene Transfer Agent Made by an Overproducer Mutant of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Mol. Biol.*, 131: 157-168.
- YU, C. A., S. NAGAOKA, L. YU ve T. E. KING. 1978. Evidence for the Existence of a Ubiquinone Protein and Its Radical in the Cytochromes *b* and *c<sub>1</sub>* Region in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82: 1070-1078.
- ZANNONI, D., B. MELANDRI ve A. BACCARINI-MELANDRI. 1976. Energy Transduction in Photosynthetic Bacteria: Composition and Function of the Branched

Oxidase System in Wild-type and Respiration Deficient Mutants of *Rhodopseudomonas capsulata*. Biochim. Biophys. Acta., 423:413-430.

ZANNONI, D. ve F. DALDAL. 1993. The Role of *c*-type Cytochromes in Catalyzing Oxidative and Photosynthetic Electron Transport in the Dual Functional Plasma Membrane of Facultative Phototrophs. Arch. Microbiol., 160: 413-423.

ZANNONI, D. 1995. Aerobic and Anaerobic Electron Transport Chains in Anoxygenic Phototrophic Bacteria. p. 949. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (ed). Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

ZHANG, M., E. MILEYKOVSKAYA ve W. DOWHAN. 2002. Cardiolipin is Required for Supercomplex Formation in the Inner Mitochondrial Membrane. J. Biol. Chem., 277: 43553-43556.

ZOLLNER, A., G. RODEL ve A. HAID. 1992. Molecular Cloning and Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 Gene Encoding Cytochrome-*c*<sub>1</sub>-heme lyase. Eur. J. Biochem., 207: 1093-1100.

ZUFFEREY, R., O. PREISIG, H. HENNECKE ve L. THÖNY-MEYER. 1996. Assembly and Function of the Cytochrome *cbb*<sub>3</sub> Oxidase Subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biol. Chem., 271 (15): 9114-9119.



## 7. EKLER

### Ek-1. Bakteri Besiyerleri

#### 1. *E. coli* Soyları İçin Üreme Ortamları

##### a) Sıvı LB-Besiyeri (Laura Bertani, zengin besi ortamı) (Miller, 1972):

###### 1 litre hacim için

Bakto tripton	10 g
Maya özütü	5 g
NaCl	10 g

kimyasalları 800 ml distile suda çözülerek pH NaOH ile 7.5'a ayarlanır. Hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanarak otoklavlanır.

**LB-Agar:** 1 litre sıvı LB-besiyerine 15 g agar (%1.5) (Difco-Bacto agar) ilave edilerek besiyeri otoklavlanır.

##### b) Med E-Besiyeri (Minimal besi ortamı) (Miller, 1972):

###### 100 ml 50X stok için

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
Sitrik asit. H <sub>2</sub> O	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . anhydrous	50 g
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	17.5 g

kimyasalları 100 ml distile suda çözüldü ve stok besiyerinden 20 ml otoklavlanır.

β-alanin (1.5 μM)

kasmino asit (%0.1)

tihamin (%0.001)

D-glukoz (%0.5)

Gliserol-3-fosfat (%0.04)

D-Pantotenik asit (1 μg ml)

L-Methionin (0.025 mg ml)

## 2. *R. capsulatus* Soyları İçin Üreme Ortamları

### a) Sıvı Med A-Besiyeri (Minimal besi ortamı) (Sistrom, 1960):

	<u>1 litre hacim için</u>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [%10]	5 ml
Sodyum (ya da Potasyum) süksinat [%10]	20 ml
NaCl [%10]	5 ml
L-Glutamik asit [%5, pH:7]	2 ml
L-Aspartik asit [%2, pH:7]	2 ml
Solüsyon C	20 ml
Potasyum fosfat [1M, pH:6.8]	20 ml

distile suda karıştırılarak hacim 1 lt'ye tamamlanır. Besi ortamı otoklavlanarak sıcaklığı 50-55°C'ye düştüğünde steril 10 ml 100X Vitamin eklenerek karıştırılır.

### Med A-Agar:

	<u>1 litre hacim için</u>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [%10]	5 ml
Sodyum (ya da Potasyum) süksinat [%10]	20 ml
NaCl [%10]	5 ml
L-Glutamik asit [%5, pH:7]	2 ml
L-Aspartik asit [%2, pH:7]	2 ml

920 ml distile suda karıştırılarak 15 g agar [%1.5] (Difco-Bacto agar) ilave edilerek besiyeri otoklavlanır. Otoklavlanan Med A besiyerinin sıcaklığı 50-55°C'ye düşürüldüğünde steril 20 ml Solüsyon C, 20 ml Potasyum fosfat [1M, pH:6.8] ve 10 ml 100X Vitamin eklenerek karıştırılır.

**Med A Stok Solüsyonları****A) Mikroelementler Solüsyonu**100 mililitre hacim için

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
EDTA	250 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	500 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.4 mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	154 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	39.2 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25 mg

dH<sub>2</sub>O'da çözülerek hacim 1 litreye tamamlanır. Stok solüsyon otoklavlanarak sterilize edilir.

**B) Solüsyon C**1 litre hacim için

Nitritotriasetik asit	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	29.5 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.3 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.99 g
Mikroelementler Solüsyonu	50 ml

800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülerek pH KOH ile 6.8-7'ye ayarlanır. Hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanarak otoklavlanır.

**C) Vitaminler (100X):**1 litre hacim için

Nikotinik asit	100 mg
Thiamin HCl	25 mg
Biotin (40 µg/ml stok)	12.5 ml

dH<sub>2</sub>O çözülerek hacim 1 litreye tamamlanır. 0.22 µm steril filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanır.

**b) Sıvı MPYE-Besiyeri (Zenginleştirilmiş besi ortamı)** (Daldal ve ark., 1986):

1 litre hacim için

Bakto pepton (%0.3)	3 g
Maya özütü (Yeast extract, %0.3)	3 g
MgCl <sub>2</sub> (1,6 mM)	1.6 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 mM)	1 ml

distile suda çözülerek pH NaOH ile 7'ye ayarlanır. MPYE besi ortamı otoklavlanarak sterilize edilir.

**MPYE-Agar:** 1 litre sıvı MPYE besiyeri içeriğine 15 g agar (%1.5) (Difco-Bacto agar) eklenerek besiyeri otoklavlanır.

\* Besi ortamları, solüsyon ve tamponlar 121°C 'de 30 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

## Ek-2 Tampon Çözeltiler

### 1. Agaroz jel elektroforez tampon çözeltisi (TBE:Tris-Borat EDTA) (20X)

#### 1 litre hacim için

Tris (Trizma Base) (1 M)	121 g.
Borik Asit (1M)	61.7 g.
EDTA .2H <sub>2</sub> O (pH:8) (20 mM)	7.44 g.
dH <sub>2</sub> O ile hacim 1 litreye tamamlanarak otoklavlanır.	

### 2. Schägger-tip SDS-Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltiler (Schägger ve Jagow, 1987).

İçerik	Anot Tamponu	Katot Tamponu	Jel Tamponu
Tris-Baz	0.2M	0.1M	3M
Trisin	-	0.1M	-
SDS	-	%0.1	%0.3
pH	pH:8.9 (HCl)	pH:8.25	pH:8.45 (HCl)

### 3. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltiler (Läemmeli, 1960)

İçerik	Elektrot Tamponu (10X)	Ayırma Jel Tamponu (4X)	Yığıma Jel Tamponu (4X)
Tris-Baz	0.25 M	1.5 M	0.5 M
Glisin	1.92 M	-	-
SDS	1 %	-	-
pH	8.3	8.8 (HCl)	6.8 (HCl)

### Ek-3. Protein Jellerinin Hazırlanışı

#### 1. %16.5 luk Trisin-SDS-Poliakrilamit jelin hazırlanışı (Schägger ve Jagow, 1987).

Solüsyonlar	Ayırıcı Jel (%16.5T, %3C, %13 Gliserol)	Yığma Jel
Akrilamit/Bisakrilamit (%49.5T, %3C)	6.65 ml	1 ml
Jel tamponu	6.65 ml	3.1 ml
Gliserol	2.65 g	–
Amonyum per sülfat (APS, %10)	0.100 ml	0.100 ml
Temed	0.010 ml	0.010 ml
dH <sub>2</sub> O	4.5 ml	8.4 ml
Toplam	20 ml	12.5 ml

#### 2. SDS-Poliakrilamit jelin hazırlanışı (Läemmeli, 1960)

Solüsyonlar	Ayırıcı Jel (%15T, %3C)	Ayırıcı Jel (%12T, %3C)	Yığma Jel (%10T, %3C)
Akrilamit/Bisakrilamit (%30) (37.5:1)	10 ml	8 ml	1.3 ml
Ayırma jel tamponu	7.5 ml	5 ml	–
Yığma jel tamponu	–	–	3.15 ml
SDS (%10)	0.200 ml	0.200 ml	0.125 ml
Amonyum per sülfat (APS, %10)	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
Temed	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
dH <sub>2</sub> O	4.7 ml	6.7 ml	7.8 ml
Toplam	20 ml	20 ml	12.5 ml

## 8. TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışması danışmanlığımı üstlenerek çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen ve her türlü kolaylığı sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Rahmi Bilaloğlu 'na teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamda ikinci tez danışmanlığımı üstlenerek proje sonuçlarını teze dönüştürmem konusunda gerekli müsadeleri sağlayan, çalışma süresi boyunca yapıcı eleştiri ve katkılarda bulunan, sekiz yılı aşkın süreden beri her zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Sevnur Mandacı 'ya teşekkür ederim.

Proje kapsamında elde ettiğimiz sonuçların doktora tez çalışması olarak sunulmasında gerekli müsadeleri sağlayan, her daim bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan ve yönlendiren Pennsylvania Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden (ABD) hocam Sayın Prof. Dr. Fevzi Daldal 'a teşekkür ederim

Prof. Dr. Fevzi Daldal 'ın grubunda yer alan eski ve yeni tüm çalışma arkadaşlarıma; Dr. Meenal Deshmukh, Dr. Maria Valkova, Dr. Elisabeth Darrouzet, Dr. Christine Winterstein, Dr. Kai Zhang, Dr. Thomas Bruser, Dr. Carsten Sanders, Dr. Jason Cooley, Serdar Türkarlan, Dr. Özlem Önder, Dr. Dong-Woo Lee ile TÜBİTAK-GMBAE 'deki çalışma arkadaşlarım Dr. Yavuz Öztürk, Dr. Mehmet Öztürk ve Özlem Akkaya 'ya arkadaşlıkları ve bilimsel yardımlaşma ve paylaşımları için teşekkür ederim.

Projeye değerli fikir ve önerileriyle katkı sağlayan, işbirliği içerisinde bulunduğumuz Pennsylvania Üniversitesi'nden Prof. Dr. Howard Goldfine 'a teşekkür ederim.

Tez komite üyelerim, Prof. Dr. Ünal Egeli ve Prof. Dr. Sezai Türkel 'e yapıcı eleştiri ve önerilerinden dolayı teşekkür ederim.

TÜBİTAK-GMBAE nin eski ve yeni Enstitü müdürleri Prof. Dr. Engin Bermek, Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu ve Doç. Dr. Kemal Baysal 'a tez projenin devamlılığı için gerekli müsadeleri tanıdıklarından dolayı teşekkür ederim.

Her zaman ilgi ve sevgilerini esirgemeyen, hedeflerime ulaşmamda destekleyici yol gösterici ve koruyucu olarak sürekli yanımda bulunan, duydukları güvenle bana cesaret veren çok sevdiğim anneme, babama ve ablam Selda 'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak anlayışlı ve destekleyici tutumu ve sorunlara kesin ve kısa yoldan çözüm üreten yaklaşımıyla her zaman yanıbaşımdaymış hissettiğim sevgili eşim Ulaş Sunar 'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması NIH-GM38237 (Prof. Dr. Fevzi Daldal), TBAG-2128 (Doç. Dr. Sevnur Mandacı) ve UNESCO-L'oreal Co-Sponsored Fellowship For Young Women in Life Sciences (Semra Aygün-Sunar) kapsamında gerçekleşen projelerin belli bir bölümünden hazırlanarak sunulmuştur.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

11 Ekim 1973 yılında Yalova 'da doğdu. 1992 yılında Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Eğitimi Bölümünü kazandı ve 1996 yılında bölüm dördüncüsü olarak mezun oldu. Lisans bitirme çalışmasını Prof. Dr. Gülendamar Tümen 'in danışmanlığında Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü 'nde yürütölen projeye katılarak gerçekleştirdi ve "Bitki doku kùltürleri" başlıklı tez çalışmasını hazırladı. Aynı yıl Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Bölümünün yüksek lisans programına başladı. 1997 yılında Prof. Dr. Fevzi Daldal (Pennsylvania Üniversitesi) ve Doç. Dr. Sevnur Mandacı (TÜBİTAK-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü (GMBAE)) 'nın danışmanlıklarında TÜBİTAK-GMBAE-Moleküler Biyoenerjetik laboratuvarında yürütölen projeye katıldı. Proje sonunda elde edilen sonuçlar "*Rhodobacter capsulatus* Bakterisinde Sitokrom *c* Oksidaz Mutantlarının Eldesi ve Karakterizasyonu" başlıklı yüksek lisans tez çalışması olarak hazırladı. 1999 yılında tez çalışmasını Prof. Dr. Gülendamar Tümen ve Doç. Dr. Sevnur Mandacı 'nın danışmanlıklarında sunarak, yüksek lisans derecesini Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 'nden aldı. 2001 Şubat döneminde Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde doktora programına başladı. Doktora tezini Prof. Dr. Fevzi Daldal 'ın laboratuvarında yürütölen ve yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda hazırlanan proje kapsamında gerçekleştirdi. "*Rhodobacter capsulatus* Sitokrom *c* Oksidaz Biyogenesiz 'inde Rol Alan Genlerin Belirlenmesi ve Fonksiyonlarının Tanımlanması" başlıklı doktora tez çalışmasını Prof. Dr. Rahmi Bilaloğlu ve Doç. Dr. Sevnur Mandacı 'nın danışmanlıklarında hazırladı.

Kasım 1997-Mayıs 2005 tarihleri arasında TÜBİTAK-GMBAE 'de araştırmacı olarak çalıştı. Bu süre zarfında 2000 yılında altı aylık süreyle Dünya bankası ve TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi 'nin burs programından yararlanarak "Bakteriyel Moleküler Genetik" konusundaki yeni teknikleri öğrenmek üzere Prof. Dr. Daldal 'ın laboratuvarına gitti. Yine, 2002 yılında dahil olduğu proje kapsamındaki çalışmaların devamlılığı için altı aylık süreyle Prof. Dr. Daldal 'ın laboratuvarında çalışmaya devam etti. 2004 yılında UNESCO-L'oreal Co-Sponsored Fellowship For

Young Women in Life Sciences bursunu “Characterization of Novel Genes Involved in the Biogenesis of Cytochrome *c* Oxidase” başlıklı çalışma ile kazanarak tekrardan Prof. Dr. Daldal ’ın laboratuvarına gitti. Halen aynı laboratuvarında çalışmalarını sürdürmektedir.