



**SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 GLUKOZ-
6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
IŞIĞA BAĞLI DÜZENLENMESİNDE
DİSÜLFİT BAĞLARININ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

MELİKE ÇEBİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

136003

**SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN IŞIĞA BAĞLI DÜZENLENMESİNDE DİSÜLFİT BAĞLARININ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

MELİKE ÇEBİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. HAYDAR KARAKAYA

SAMSUN 2003

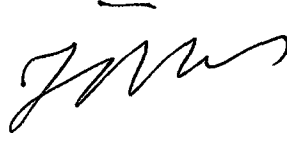
TC YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
EDÜKASYON MURAKAZI

136003

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 08/ 09/ 2003 tarihinde yapılan sınavla Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ



Üye: Doç. Dr. Ahmet OKUMUŞ



Üye: Yrd. Doç. Dr. Haydar KARAKAYA



ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

/ / 2003



Prof. Dr. Nur ONAR
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN IŞIĞA BAĞLI DÜZENLENMESİNDE DİSÜLFİT BAĞLARININ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada *Synechococcus* sp. PCC7942 glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) enziminin ışığa bağlı düzenlenmesinde disülfid bağlarının rolünün araştırılması için in vitro enzim analizleri ve Δzwf mutant hücre elde edilmesi hedeflenmiştir.

Öncelikle enzimin düzenlenmesinde disülfid bağlarının rolünün olup olmadığını anlaşılması hedeflendi. In vitro enzim analizleri için *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinden elde edilen süpernatantın DTT varlığında ve yokluğunda G6PDH aktivitesi gözlemlendi. Bunun için farklı DTT konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak nasıl değişiklik gösterdiği takip edildi. Analizler sonucunda DTT'nin enzim aktivitesini etkilediği ve bu etkinin 50 mM konsantrasyonda 30 dk sonunda maksimuma ulaşarak %51.22'lik bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. In vitro enzim analizleri sonucunda *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH aktivitesinin DTT'den etkilendiğine ve dolayısıyla disülfid bağlarının enzimin ışığa bağlı düzenlenmesinde rolü olabileceği hipotezinin bu organizma için de geçerli olduğuna karar verildi.

Synechococcus sp. PCC7942 *zwf* geni içinde yer alan iki sistein kodonunu değiştirmek üzere yürütülecek çalışmalarda gerekli bir Δzwf mutant elde etmek için çalışmalar yürütüldü. Öncelikle pUC18 klonlama vektörünün *SphI* bölgesi silinerek *NruI* ve *SphI* tanıma bölgesi taşımayan bir vektör (pUC181) elde edildi. Bu vektör içine 2.9 kb'lık *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmenti bağlanarak pSG11 vektörü elde edildi. Bu vektörün *NruI/SphI* kesimi ile iki adet sistein kodonunu da içeren *zwf* gen bölgesi vektörden uzaklaştırılabilecektir. Uzaklaştırılan bölgeye interpozon omega (Ω)'nın ligasyonu çalışmaları yürütüldü. Muhtemelen yapışkan *SphI* ucunun etkili olarak doldurulamaması nedeniyle kabul edilebilir bir sürede bu ligasyon gerçekleştirilemedi. Bu zorluğu aşmak üzere *SphI* tanıma bölgesinin yanına oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle ikinci bir *NruI* tanıma bölgesi eklenmesi stratejisi geliştirildi. Halen bu çalışmalar devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Synechococcus* sp., *zwf*, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, disülfid bağları

ABSTRACT**AN INVESTIGATION ON THE ROLE OF DISULPHIDE BONDS IN THE LIGHT-DEPENDENT REGULATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE OF *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC7942**

In this study, in vitro enzyme analyses and production of a Δzwf mutant was aimed for understanding the role of disulphide bonds in the light-dependent regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme of *Synechococcus* sp. PCC7942.

Initially it was aimed to understand whether disulphide bonds have a role in the regulation of the enzyme. For in vitro enzyme analyses, G6PDH activity was assayed with or without DTT using supernatants from the cells of *Synechococcus* sp. PCC7942. For this, how the enzyme activity was changed in different DTT concentrations were observed applying various time courses. Results of the analyses showed that DTT affected the activity and this effect reached a maximum rate at 50 mM DTT in 30 minutes resulting a decrease of 51.22%. This result implied that the G6PDH of *Synechococcus* sp. PCC7942 affected by DTT, and consequently the hypothesis suggesting that disulphide bonds have a role in the light-dependent regulation of the G6PDH was also applicable for this strain.

Studies to produce a Δzwf mutant *Synechococcus* sp. PCC7942 needed for the studies to change two cysteine codons of the *zwf* gene of the strain were conducted. Firstly, a vector, pUC181, which does not have *Nru*I and *Sph*I recognition sites, was produced by deleting the *Sph*I site of the cloning vector pUC18. A 2.9 kb *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragment was ligated into the vector pUC181 yielding the pSG11. The *zwf* region carrying two cysteine codons could be removed digesting the vector pSG11 with *Nru*I/*Sph*I. Studies carried out to ligate the Ω interposon into the removed region of pSG11. This ligation could not be achieved in an acceptable time probably because of ineffective end filling of the *Sph*I site. To overcome this difficulty an alternative strategy was applied involving the addition of a second *Nru*I site next to *Sph*I site by oligonucleotide-directed mutagenesis. This study is continued.

Keywords: *Synechococcus* sp., *zwf*, glucose-6-phosphate dehydrogenase, disulphide bonds.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince danışmanlığımı üstlenen, sürekli ilgi ve denetimi ile her türlü yardımlarını esirgemeyen, fikirleriyle çalışmalarına yön veren Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Haydar Karakaya'ya ,

TBAG-1985 nolu proje ile bu araştırmayı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na,

pNUT1 için İngiltere Warwick Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü'nden sayın Dr. D. J. Scanlan ve Dr. N. Fuller'e, pUC18 için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden sayın Doç. Dr. Ali Osman Kılıç ve Dr. Osman Özgümüş'e,

Jel görüntüleme birimini kullanmama izin veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Hasan Bağcı, Yrd. Doç. Dr. Nurten Kara ve Yrd. Doç. Dr. Sezgin Güneş'e

Ayrıca bölüm hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bana her zaman destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Siyanobakterilerin Genel Özellikleri	2
1.2. Siyanobakterilerde Fotosentez	4
1.3. Siyanobakterilerde Karbon Metabolizması	5
1.3.1. İndirgeyici Pentoz Fosfat Döngüsü ile CO ₂ İndirgenmesi	5
1.3.2. Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) Döngüsü ile Karbonhidrat Yıkımı	7
1.4. Fotosentetik Organizmalarda Işık ve Metabolizma İlişkisi	8
1.5. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (G6PDH)	10
1.5.1. Enzimin Yapısı	11
1.5.2. G6PDH Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	11
1.5.3. Disülfit Bağlarının Oluşum ve Yıkımı	16
1.6. Siyanobakteriyel <i>zwf</i> Genleri	18
1.7. <i>zwf</i> Mutasyon Çalışmaları	19
1.8. Araştırmanın Amacı	21
1.9. Genel Bilgiler	22
1.9.1. Omega İnterpozonu	22
1.9.2. pUC Klonlama Vektörleri	23
1.9.3. Oligonükleotit-yönlendirilmiş Mutasyon	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Kullanılan Plazmidler	28
2.2. Bakteriyel Şuşlar	28
2.3. Kullanılan Kültür Ortamları ve Bakteriyel Şuşların Üretimi	29
2.4. Antibiyotik Stoklarının Hazırlanması ve Saklanması	31
2.5. <i>E. coli</i>'den Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu	31
2.6. DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi	33
2.7. Restriksiyon Endonükleaz Uygulaması	33
2.8. DNA'ya Alkalen Fosfataz Uygulaması	34

2.9. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol Uygulaması ve Etanol Çöktürmesi.....	34
2.10. Agaroz Jel Elektroforez	34
2.10.1. Agaroz Jel Hazırlanması.....	35
2.11. DNA'nın Agaroz Jelde Gözlenmesi.....	35
2.12. Agaroz Jel ve Çözeltiden DNA İzolasyonu	35
2.13. Uç Doldurma	36
2.14. Ligasyon Reaksiyonları.....	36
2.15. Alıcı (Kompotent) Hücre Oluşturma	37
2.16. E. coli İçine Plazmid DNA Transformasyonu	38
2.17. Enzim Analizleri için Süpernatant Hazırlanması.....	38
2.18. G6PDH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	39
2.19. Protein Miktar Tayini	39
2.20. Enzim Çözeltisine Ditiotreitol (DTT) Uygulanması	40
2.21. Oligonükleotit-yönlendirilmiş Mutasyon için Kalıp DNA izolasyonu	40
2.22. Oligonükleotitlerin Fosforlanması	41
2.23. Mutageniz İşlemleri	41
3. BULGULAR.....	43
3.1. Synechococcus sp. PCC7942 Hücrelerinin Gelişmesinin İzlenmesi.....	43
3.2. Yabani tip Synechococcus sp. PCC7942 hücrelerinde DTT'nin G6PDH Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	44
3.3. zwf Geni Silinmiş Synechococcus sp. PCC7942 Mutant Oluşturulması.....	50
3.3.1. pUC18 Klonlama Vektörünün SphI Tanıma Bölgesinin Silinmesi.....	52
3.3.2. Synechococcus sp. PCC7942 zwf Fragmentinin pUC181 İçine Nakli.....	54
3.3.3. Synechococcus sp. PCC7942 zwf Geni içine İnterpozon Ω'nın Ligasyonu.....	57
3.3.4 Synechococcus sp. PCC7942 zwf Geni İçine İkinci NruI Tanıma Dizisinin Eklenmesi.....	59
4. TARTIŞMA.....	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65

6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	74



SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

<i>aadA</i>	Streptomisin ve spektinomisin direnç geni
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
Amp	Ampisilin
<i>bla</i>	β -laktomaz geni
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H'dan elde edilen bir restriksiyon endonükleaz
bp	Baz çifti
CIAP	Dana bağırsak alkalen fosfataz
<i>colEI</i>	pUC vektörleri replikasyon orijini
Cys	Sistein
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
<i>fbp</i>	Fruktoz-1,6- bisfosfataz geni
GOGAT	Glutamik asit sentetaz
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi
<i>HincII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rc. 'den elde edilen bir restriksiyon endonükleaz
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd. 'dan elde edilen bir restriksiyon endonükleaz
kb	Kilobaz
<i>lacI</i>	<i>lac</i> operonunda represör proteini kodlayan gen
<i>lacZ</i>	<i>lac</i> operonunda β -galaktosidaz enzimini kodlayan gen
LPS	Lipopolisakkarit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen
<i>NruI</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 15906 (<i>Nocardia rubra</i>)'dan elde edilen bir restriksiyon endonükleaz.
<i>O_{lac}</i>	<i>lac</i> operonunun operatör bölgesi
<i>opcA</i>	Siyanobakteriyel genomların <i>zwf</i> bölgesinde bir gen

OpcA	<i>opcA</i> geni tarafından kodlanan polipeptit
OPP	Oksidatif pentoz fosfat döngüsü
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
PCC	Pasteur kültür koleksiyonu
PGA	Fosfogliserat
6PGDH	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
<i>P_{lac}</i>	<i>lac</i> operonunun promotor bölgesi
PS I	Fotosistem I
PS II	Fotosistem II
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i> 'den elde edilen bir restriksiyon endonükleaz
RPP	İndirgeyici pentoz fosfat döngüsü
Rubisco	Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz
RuBP	Ribuloz-1,5-bisfosfat
Sm	Streptomisin
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i> 'den elde edilmiş bir restriksiyon endonükleaz
Spc	Spektinomisin
<i>SphI</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> 'den elde edilen bir restriksiyon endonükleaz
<i>tal</i>	Transaldolaz geni
TBE	Tris-borat-EDTA tamponu
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
TE	Tris-EDTA
<i>zwf</i>	G6PDH enzimini kodlayan gen
Zwf	<i>zwf</i> geni tarafından kodlanan polipeptit
Δzwf	<i>zwf</i> silinme mutanı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	İndirgeyici pentoz fosfat (RPP) döngüsü (Calvin döngüsü).....	6
Şekil 1.2.	Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) döngüsü.....	8
Şekil 1.3.	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve laktonaz reaksiyonları.....	10
Şekil 1.4.	Ω fragmentinin fiziksel haritası.....	23
Şekil 1.5.	Klonlama vektörü pUC18'in fiziksel haritası ve çoklu klonlama bölgesi...	24
Şekil 1.6.	Bu çalışmada uygulanan oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon işlemlerinin temeli.....	27
Şekil 3.1.	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 hücrelerinin gelişme eğrisi.....	44
Şekil 3.2.	5 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	47
Şekil 3.3.	25 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	48
Şekil 3.4.	50 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	48
Şekil 3.5.	Belli zaman aralıklarında farklı DTT konsantrasyonlarında G6PDH aktivitesindeki azalma.....	49
Şekil 3.6.	pNUT1 plazmitinin restriksiyon haritası.....	51
Şekil 3.7.	pUC18 vektörünün <i>Hind</i> III ile <i>Sma</i> I restriksiyon endonükleaz tanıma bölgeleri arasında kalan bölgenin nükleotit dizisi ve tanıma bölgelerinin konumu.....	52
Şekil 3.8.	pUC181'in restriksiyon analizi.....	53
Şekil 3.9.	pSG11'in fiziksel haritası.....	55
Şekil 3.10.	PSG11'in restriksiyon analizi.....	56
Şekil 3.11.	<i>Nru</i> I/ <i>Sph</i> I ile kesilmiş pSG11'in 4.6 kb büyüklüğündeki fragmentin doğrusal haritası.....	58
Şekil 3.12.	Mutajenik oligonükleotit zwfn'in nükleotit dizisi.....	60

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. .Bu çalışmada kullanılan plazmitler.....	28
Tablo 2.2. Bu çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar.....	28
Tablo 3.1. Farklı DTT konsantrasyonlarında zamana bağlı olarak G6PDH aktivitesinde meydana gelen değişim.....	46



1. GİRİŞ

Fototrofik organizmalar fotosentez ile güneş enerjisini canlılar için kullanılabilir hale getirerek canlılığın devamının sağlanmasında hayati bir işlev görmektedirler. Dolayısıyla bu organizmalarda gündüz ışıktan alınan enerji ATP ve NADP üzerinden İndirgeyici Pentoz Fosfat döngüsü (RPP döngüsü, Calvin döngüsü) ile organik moleküllere dönüştürülürler. Gece ise bu organizmalar canlılıklarını devam ettirebilmek için Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) döngüsüyle depolanmış karbonhidratları yıkarlar. Dolayısıyla fotosentetik organizmaların karbon metabolizmalarının düzenlenmesinde ışık temel metabolik düzenleyici olarak rol oynamaktadır (Buchanan, 1980).

Siyanobakterilerde OPP yolunun ilk enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) karbon metabolizmasının düzenleyici enzimlerinden biridir (Stanier ve Cohen-Bazire, 1977). Enzimin aktivasyonu ve deaktivasyonuna göre karbon metabolizması bir metabolik yoldan diğerine (OPP-RPP) kaydırılır. Karbon metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan diğer enzimler ise ribuloz-1,5-bisfosfat-karboksilaz/oksijenaz (Rubisco), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGDH) ve 5-fosforibulokinazdır. Bu enzimlerden G6PDH ve 6PGDH karanlıkta aktifken rubisco ve 5-fosforibulokinaz ışıktaki aktiftir (Smith, 1982; Stanier ve Cohen-Bazire, 1977; Tabita, 1987, 1994; Copeland ve Turner, 1987). Bu enzimlerin ve genel olarak karbon metabolizmasının düzenlenme mekanizmaları üzerine moleküler seviyede çalışmalar devam etmektedir.

Fotosentetik organizmaların karbon metabolizmasında görev alan enzimlerinin karanlık ve ışıktaki aktivitelerinin nasıl düzenlendiği konusunda günümüze kadar pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Schaeffer ve Stanier, 1978; Steawart, 1980; Cossar ve ark., 1984; Udvardy ve ark., 1984; Scanlan ve ark., 1992; Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995). Enzimin düzenlenme mekanizması ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Düzenlenme mekanizmalarından biri enzimin redoks modülasyonudur. Siyanobakterilerde redoks modülasyonunun enzimin yapısında yer alan sistein amino asitlerinin sülfhidril grupları (-SH) arasında disülfid bağlarının oluşması veya bu bağların indirgenmesiyle gerçekleştiği hipotezi ileri sürülmüştür. (Anderson ve ark., 1978). *Solanum tuberosum*'un plastitik ve sitozolik G6PDH formu

ile yapılan oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları sonucunda enzimin sadece plastik formunun 149 (Cys¹⁴⁹) ve 157 (Cys¹⁵⁷) pozisyonlarındaki sisteinlerin redoks düzenlemesine tabi olduğu belirlenmiştir (Wenderoth ve ark., 1997). Sitozolik formda böyle bir düzenlenme gözlenmemiştir.

In vitro çalışmaların sonuçlarına dayanarak, in vivo'da ferrodoksin-tioredoxin oksidoredüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu tioredoksinin indirgendiği ve indirgenmiş tioredoksinin elektronlarının disülfid bağlarının indirgenmesine ve dolayısıyla enzimin (G6PDH) inaktif forma dönüşmesine neden olduğu görüşü ileri sürülmektedir. In vitro araştırmalarda ise ditiotritol (DTT) elektron vericisi olarak kullanılmaktadır (Cossar ve ark., 1984; Yee ve ark., 1981; Anderson ve ark., 1978)

Bu çalışmada G6PDH enziminin düzenlenme mekanizması üzerine yapılan araştırmalara katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçlardan biri *Synechococcus* sp. PCC7942 glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin in vitro'da indirgeyici ajanlardan etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesidir. Diğer bir amaç da *zwf* geni silinmiş (Δzwf) bir *Synechococcus* sp. PCC7942 mutanını üretmektir. Bu mutanta siyanobakterilerde disülfid bağlarının gerçekten ışık modülasyonuna dahil olup olmadığının gösterilmesi için yapılacak çalışmalarda gereksinim vardır (bakınız Bölüm 1.7).

1.1. Siyanobakterilerin Genel Özellikleri

Siyanobakteriler öbakteriler grubunun üyesidirler ve diğer tüm bakteriler gibi prokaryotik hücresel organizasyona sahiptirler. Siyanobakteriler diğer bakterilerin aksine klorofil içermektedirler ve enerji kaynağı olarak da güneş enerjisini kullanmaktadırlar. Fotosentez yapabilmelerinden dolayı 1970'lere kadar mavi-yeşil alg olarak adlandırılmış ve bitkiler aleminin bir grubu olarak kabul edilmişler, sonra Bacteria grubuna dahil edilmişlerdir (Stanier ve ark., 1978). Siyanobakteriyel hücre duvarı temel yapısal ve kimyasal özellikleri bakımından incelendiğinde diğer Gram negatif prokaryotlarınkine benzer olduğu rapor edilmiştir (Stanier ve Cohen-Bazire, 1977; Castenholz ve Waterbury, 1989a; Gant, 1994). Siyanobakteriler diğer Gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında benzer özelliklerinin yanı sıra bazı farklılıklara da sahiptir. Daha ileri çalışmalarda siyanobakterilerin lipopolisakkarit (LPS) yapısının Gram negatiflerden farklı olarak az miktarda ketodeoksioktonat içerdiği belirlenmiştir (Hoiczkyk ve Hansel, 2000). Siyanobakterilerin dış zarları Gram negatif bakterilerde

bulunmayan yapılar içerir. Bu yapılar arasında, karotenoidler, nadir yağ asitleri, lipit A'nın yapısında bulunan β -hidroksipalmitik asit yer alır.

Siyanobakteriler yapısal ve gelişme özelliklerine göre beş bölüme ayrılmıştır ve bu beş bölüme ait 22 cins tanımlanmıştır (Rippka ve ark., 1979). 1. Bölüm Chroococcales (Waterbury ve Rippka, 1989), 2. Bölüm Pleurocapsales (Waterbury 1989), 3. Bölüm Oscillatoriales (Castenholz, 1989a), 4. Bölüm Nostocales (Castenholz, 1989b) ve 5. Bölüm Stigonematales (Castenholz, 1989c) olarak adlandırılmıştır.

Siyanobakterilerin büyük çoğunluğu zorunlu fototroflar olup sadece fikse ettikleri organik bileşikleri kullanırlar. Buna rağmen bazı siyanobakteriler ışıkta CO₂ kullanarak gelişimlerini sürdürmekle kalmazlar aynı zamanda dış kaynaklı organik bileşikler de kullanabilirler (Buchanan, 1980). Bu heterotrofik gelişimin iki farklı tipi mevcuttur. Bunlardan biri fotoheterotrofidir. Fotoheterotroflar ışıkta CO₂ fiksasyonunun yeterli olmadığı durumlarda organik bir bileşiği kullanarak gelişmeyi sürdürebilirler. İkincisi kemoheterotroflardır. Bunlar tamamen karanlık bir habitatta bulduklarında, organik bir substratı kullanabilirler. Bu organik bileşikler hücrelerin karbon ve enerji ihtiyaçlarını karşılamaktadır (Buchanan, 1980).

Siyanobakterilerin karakteristik yapısı vejetatif hücreler şeklindedir. Bu hücreler merkez kısmında genetik materyeli taşır. Bunun dışında sitoplazmanın çoğu, üzerinde fotosentetik sistemleri taşıyan tilakoit zarlardan meydana gelmiştir. Bazı organizmalarda hücreler filamentler şeklinde organize olmuştur. Bu hücrelerin farklılaşmış formları heterosistler, akinetler ve hormogoniumlardır. Heterosistler N₂ fiksasyonunu gerçekleştiren özelleşmiş hücrelerdir. Kullanılabilir azotun yokluğunda veya belli bir seviyenin altına düştüğünde her 10 ila 20 vejetatif hücreden biri heterosistlere dönüşür. Küçük hücrelerden oluşmuş filamentler ise hormogonium adını alır. Akinetler fosfor eksikliğinde hayatta kalmayı sağlayan geçici yapılardır. (Stanier ve Cohen-Bazire, 1977; Golden ve ark. 1985; Wolk ve ark., 1994; Wolk, 1996)

Heterosistler, siyanobakterilerde ortamda kullanılabilir azot sınırlandığında vejetatif hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan ve O₂'li habitatlarda azot fiksasyonunun gerçekleştirildiği özelleşmiş yapılardır. Vejetatif hücrelerin tersine, heterosistlerde fotosistem II (PS II) aktif değildir. Bu O₂ duyarlı nitrojenazın fonksiyonu için gerekli düşük O₂ basıncının sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Heterosist duvarları boyunca O₂ difüzyonu sınırlandırılmıştır. PS II aktivitesinin bulunmaması heterosist içinde O₂

üretmesini engeller, mevcut O_2 ise yüksek solunum oranıyla azaltılmaktadır (Buchanan, 1980)

N_2 'nin NH_3 'a indirgenmesi metabolik olarak pahalı bir süreç olup her bir reaksiyon için en azından sekiz e^- ve onaltı ATP gerekmektedir. Bu değerler farklı organizmalarda değişiklik gösterebilmektedir (Buchanan, 1980). N_2 dış ortamdan heterosist içerisine girdikten sonra nitrojenaz enzim sisteminin yardımıyla NH_3 'a dönüştürülmektedir. NH_3 hücre içinde bu şekilde kalmayıp glutamik asite bağlanarak glutamin sentaz enziminin yardımıyla glutaminin yapısına katılır. Glutamin daha sonra vejetatif hücreye geçerek glutamik asit sentetaz (GOGAT) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla glutamik asite dönüşürken fikse edilmiş azotun metabolizmaya geçişi sağlanmış olur. Azot metabolizması oldukça fazla enerji ve indirgeyici güç gerektirmektedir. Heterosistlerde PS II'de fonksiyonel olmadığı için önemli bir enerji ve indirgeyici güç açığı vardır. Metabolik bakımdan bu kadar pahalı olan bu sürecin enerji ve indirgeyici güç açığının kapatılması için heterosistlerde OPP döngüsü önemli bir indirgeyici güç kaynağı olarak gündüz de aktiftir ve NADPH ihtiyacını karşılamaktadır (Apte ve ark., 1978; Wolk ve ark., 1994). Bu nedenle heterosistlerde ışıқта G6PDH hala aktiftir. Vejetatif hücrelerde ise gündüz G6PDH aktivitesi gözlenmez, OPP döngüsü inaktiftir.

1.2. Siyanobakterilerde Fotosentez

Canlı sistemlere birincil enerji girişi fotosentez ile gerçekleşir. Az sayıda litotrofik organizma hariç dünya üzerindeki bütün canlılar hayatsal faaliyetleri için gerekli enerjiyi fotosentez aracılığıyla güneş enerjisinden sağlamaktadırlar. Her gün güneş tarafından dünyaya ulaşan ışık miktarının %1 kadarı fotosentezde kullanılmaktadır. Fototrofik organizmalar fotosentez işlemi ile güneş enerjisini canlılar için kullanabilir hale getirerek canlılığın devamını sağlamaktadır.

Siyanobakterilerde de temel karbon ve enerji girişi fotosentez ile sağlanır. Bu organizmalar oksijenik fotosentez yapan Gram negatif bakterilerdir. Oksijenik fotosentetik organizmalar iki aşamalı ışık merkezli bir fotosentetik sisteme sahiptir. Bunlar fotosistem I (PS I) ve fotosistem II (PS II) olarak isimlendirilir. PS I ve PS II tilakoit membranlar üzerinde bulunurlar. Tilakoit membranlar yüksek bitkilerde kloroplastlarda yerleşirken fototrofik organizmalar olan siyanobakterilerde hücre

sitoplazmasında yer almaktadır. Tilakoitler üzerinde ışık emici pigmentler bulunur. Dünya yüzeyine ulaşan fotonlar fotosentetik sistemin bu ışık emici molekülleri tarafından yakalanır. Bu moleküller yüksek bitkilerde klorofil a ve klorofil b iken siyanobakterilerde klorofil a ve fikobilinlerdir (Glazer, 1987).

İlk olarak PS II'de foton enerjisi elektronlara (e^-) verilerek yüksek enerji seviyesine çıkmaları sağlanmaktadır. Bu e^- 'lar tilakoit lümen boyunca PS I'e taşınırken proton pompalarını harekete geçirir ve ATP oluşumu sağlanır. Aynı zamanda PS II'de H_2O 'dan sağlanan e^- 'lar PS I'e verilir ve bu arada H_2O , H_2 ve O_2 'ne parçalanır (Kallas, 1994). Bu esnada PS II'de bir foton absorbe edilerek bir e^- yüksek enerji seviyesine çıkar. PS II bu e^- 'nunu sitokrom b'ye vererek bu molekülün indirgenmesini sağlar. PS I'e taşınan bu e^- indirgeyici güç (NADPH) üretiminde kullanılır. Bu e^- öncelikle ferrodoksin'e verilerek indirgenmesi sağlanır. İndirgenmiş ferrodoksin, ferrodoksin-NADP-oksidoredüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla iki e^- 'nunu $NADP^{+}$ 'ye verir ve NADPH oluşumunu sağlar (Morand ve ark., 1994). İndirgenmiş ferrodoksin e^- 'lerini bu şekilde NADPH üretiminde kullanabildiği gibi ferrodoksin-tioredoksin oksidoredüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla tioredoksin'e vererek tioredoksinin indirgenmesini de sağlamaktadır (Kallas, 1994).

Sonuçta PS II'deki ilk ışık etkinliğinde üretilen enerji, ATP sentezi için ve PS I'deki ikinci ışık etkinliğinde üretilen enerji ise indirgeyici güç (NADPH ve indirgenmiş tioredoksin) üretiminde kullanılmaktadır.

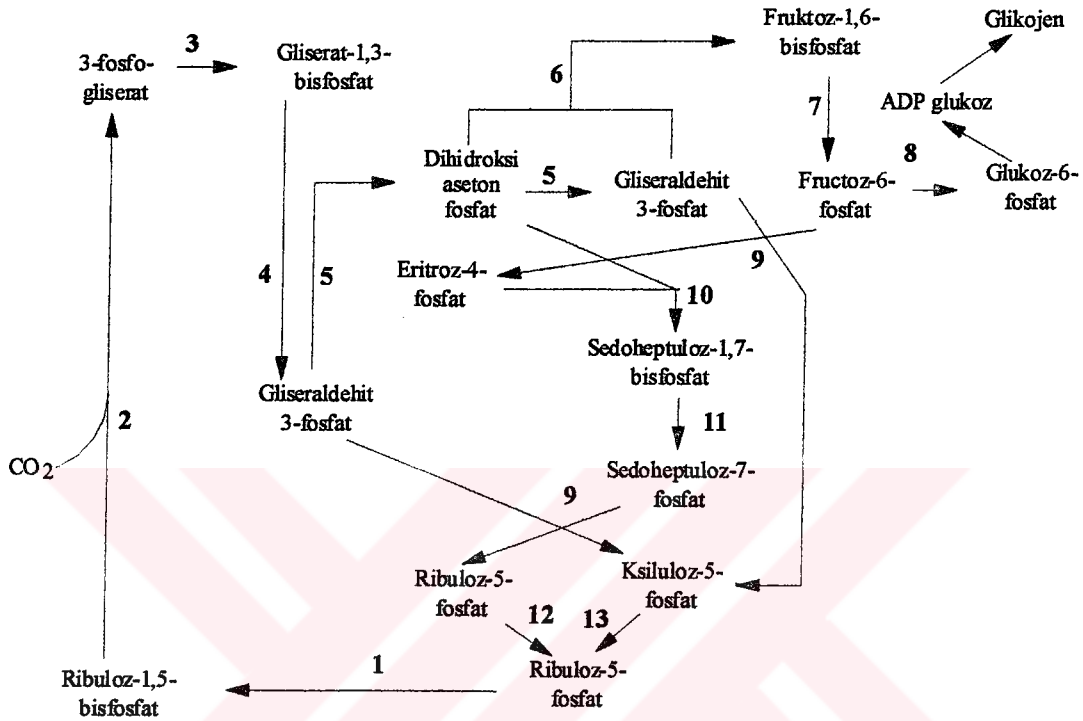
1.3. Siyanobakterilerde Karbon Metabolizması

Fototrofik organizmaların karbon metabolizması iki temel metabolik süreci içermektedir. Bu süreçler İndirgeyici Pentoz Fosfat döngüsü (RPP döngüsü yada Calvin döngüsü) ile CO_2 indirgenmesi ve Yükseltgeyici Pentoz Fosfat döngüsü (OPP döngüsü) ile karbonhidrat yıkımını içerir.

1.3.1. İndirgeyici Pentoz Fosfat Döngüsü ile CO_2 İndirgenmesi

Işık reaksiyonlarında ışık enerjisi, ATP formunda metabolik enerji ve NADPH formunda indirgeyici güç üretmek üzere kullanılır. Ancak bu fotosentezin yalnızca bir yarısıdır. Fotosentetik organizmalar ışık reaksiyonlarıyla ürettikleri ATP ve NADPH'yi

kullanarak atmosferik CO₂'ten organik moleküllerin üretimini gerçekleştirmektedir. Reaksiyonlar sistemde yeterli ATP ve NADPH ve CO₂ bulunduğu sürece devam etmektedir (Şekil 1.1).



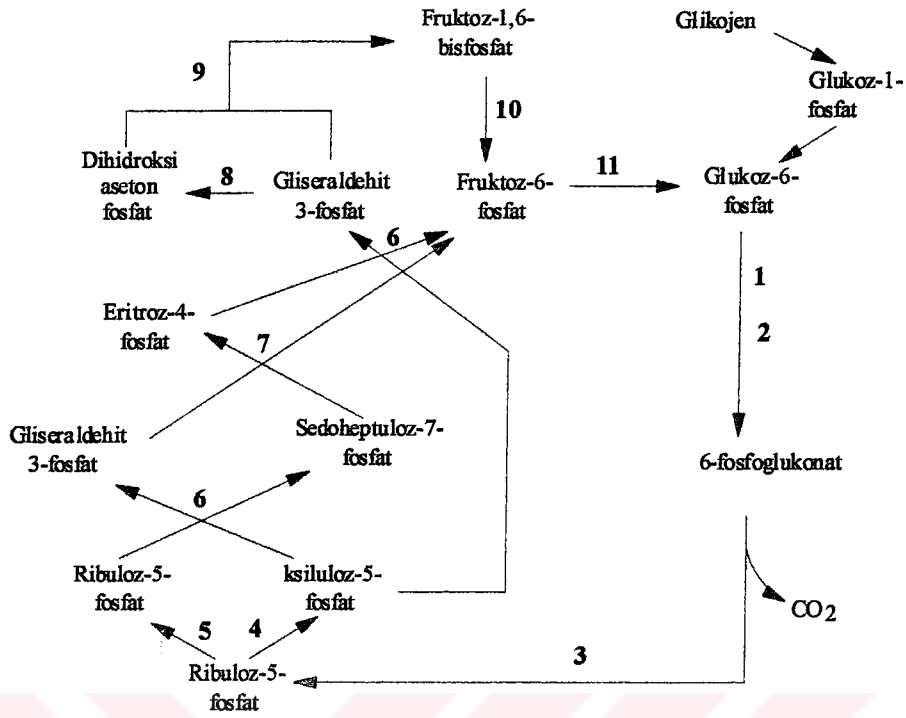
Şekil 1.1. İndirgeyici pentoz fosfat (RPP) döngüsü (Calvin döngüsü). Enzimler: 1) 5-Fosforibulokinaz, 2) Rubisco, 3) 3-Fosfogliserat kinaz, 4) Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz, 5) Trios fosfat izomeraz, 6) Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz, 7) Fruktoz-1,6-bisfosfat fosfataz, 8) Heksoz-6-fosfat izomeraz, 9) Gliseraldehit transferaz (transketolaz), 10) Aldolaz, 11) Sedoheptuloz-1,7-bisfosfat fosfataz, 12) Riboz-5-fosfat izomeraz ve 13) Riboz-5-fosfat 3-epimeraz.

CO₂ fiksasyonu, metabolizma sırasında CO₂'nin bağlanabileceği bir molekülün varlığına bağlıdır. Bu molekül metabolik reaksiyonlarda üretilen ve bir ara ürün olan ribuloz-1,5-bisfosfat (RuBP)'tır (Tabita, 1994). Calvin döngüsünün düzenlenmesinde rolü olan iki reaksiyon 5-fosforibulokinaz ve ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) tarafından katalizlenmektedir. Bu nedenle rubisco CO₂ fiksasyonunun düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Döngü CO₂'nin 5C'lu molekül RuBP'a

bağlanmasıyla başlar ve rubisco enziminin katalizlediği bir reaksiyonla RuBP, 3C'lu iki fosfogliserat (PGA) molekülüne dönüşür. Daha sonra reaksiyonlar devam ederek PGA, gliseraldehit fosfat moleküllerine dönüştürülür. Bu 3C'lu bileşiklerin bir kısmı 4C'lu 5C'lu, 6C'lu ve 7C'lu ara bileşikler üzerinden glukoza dönüştürülürken bir kısmı da yeniden RuBP yapımında kullanılır (Şekil 1.1). Döngünün her bir tam devrinde bir molekül CO₂ döngüye katılır ve bir molekül RuBP üretilir. Altı CO₂ molekülü ile döngünün altı defa devri, glukoz gibi bir 6C'lu şekerin üretimini sağlar (Stanier Cohen-Bazire, 1977; Smith, 1982; Tabita, 1994). Bu olaylar karanlık reaksiyonları olarak da isimlendirilmektedir ancak fotosentezin devam ettiği periyotlar boyunca yani gündüz RPP döngüsü devam eder.

1.3.2. Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) Döngüsü ile Karbonhidrat Yıkımı

Gündüz ışıktan alınan enerji ATP ve NADPH üzerinden organik moleküllere dönüştürülmektedir. Gece ise bu organizmalar hayatta kalabilmek için gerekli minimum enerjiyi depo karbonhidratlarının farklı bir metabolik yolda yıkımı ile sağlamaktadırlar. Bu yol Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) döngüsüdür. OPP döngüsünde CO₂ fiksasyonu sonucu oluşan karbonhidratların yıkımı gerçekleştirilmektedir. Buna bağlı olarak hücrenin gece boyu canlılığının devamı sağlanırken aynı zamanda indirgeyici güç (NADPH) üretimi de sağlanmaktadır (Stanier ve Cohen-Bazire, 1977). G6PDH OPP döngüsündeki ilk enzimdir ve bu metabolik yolun en önemli düzenleyicisidir (Smith, 1982; Copeland ve Turner, 1987). Işık periyodu boyunca sentezlenen glikojen OPP döngüsüyle CO₂'e kadar parçalanır. Bu yolla bir glukozun ribuloz-5-fosfata parçalanmasıyla iki NADPH molekülü üretilirken bir ATP molekülü harcanır. Ribuloz-5-fosfat daha sonra bir seri reaksiyonla 4C'lu ve 7C'lu şeker ara ürünlerine daha sonra da 3-fosfogliserat ve fruktoz-6-fosfata dönüştürülmektedir (Şekil 1.2) (Smith, 1982). Döngünün her devrinde bir CO₂ açığa çıkar, altı devir sonunda bir glukoz molekülü tamamen parçalanır.



Şekil 1.2. Yükseltgeyici Pentoz Fosfat (OPP) döngüsü. Enzimler: 1) Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 2) Fosfoglukonolaktonaz, 3) Fosfoglukonat dehidrogenaz, 4) Riboz-5-fosfat izomeraz, 5) Riboz-5-fosfat 3-epimeraz, 6) Gliseraldehit transferaz (transketolaz), 7) Dihidroksi aseton transferaz (transaldolaz), 8) Trioz fosfat izomeraz, 9) Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz, 10) Fruktoz-1,6-bisfosfat fosfataz ve 11) Heksoz-6-fosfat izomeraz

1.4. Fotosentetik Organizmalarda Işık ve Metabolizma İlişkisi

Siyonabakteriler ışıkta indirgeyici pentoz fosfat (RPP) döngüsü ile CO_2 'i asimile ederler. Asimilasyonun son ürünü glikojendir. Gece boyunca, gündüz ışıkta sentez edilen enerjice zengin bileşikler kullanılarak enerji sağlanmaktadır. Glikojen, alt birimleri olan glukoz moleküllerine yıkılır. Glukoz molekülleri OPP döngüsünde CO_2 'e kadar yıkılarak enerji elde edilir. Bir çok çalışmada OPP döngüsünün ilk enzimi olan G6PDH'nin inhibisyonun hedefi olduğu ileri sürülmektedir. G6PDH, *in vivo*'da ışıkta her iki fotosistem de faal durumda iken şiddetli bir şekilde inhibe olur (Schaeffer ve Stanier, 1978).

Karanlıktan ışığa geçişte metabolik havuzda RPP döngüsüne bağlı olarak RuBP miktarı artmaktadır. Ayrıca sitoplazmik pH'da artışlar meydana gelir (Falkner ve Horner, 1976). Fotosentezle birlikte NADPH ve ATP miktarında artış olur. Bu faktörlerin tamamı G6PDH aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Bu faktörler deaktivasyon etkilerini ya enzimin moleküler (oligomerik) formları arasındaki dengeyi değiştirerek (bakınız Bölüm 1.5.1) ya da direk olarak enzimin katalitik fonksiyonunu etkileyerek gerçekleştirmektedir (Schaeffer ve Stanier, 1978; Falkner ve Horner, 1976; Grossman ve McGowan, 1975) (bakınız Bölüm 1.5.2).

Işıktan karanlığa geçişte ise pH azalır, NADPH ve ATP seviyesi düşer ve bunu metabolik havuzda RuBP'ın azalması takip eder. Tüm bu değişiklikler G6PDH aktivitesinin artmasına yol açmaktadır. Diğer bir metabolik değişiklik ise G6PDH aktivitesinin artmasıyla glikojen rezervlerinden enzim için pozitif efektör olarak rol oynayan G6P miktarının metabolik havuzda artırılmasıdır.

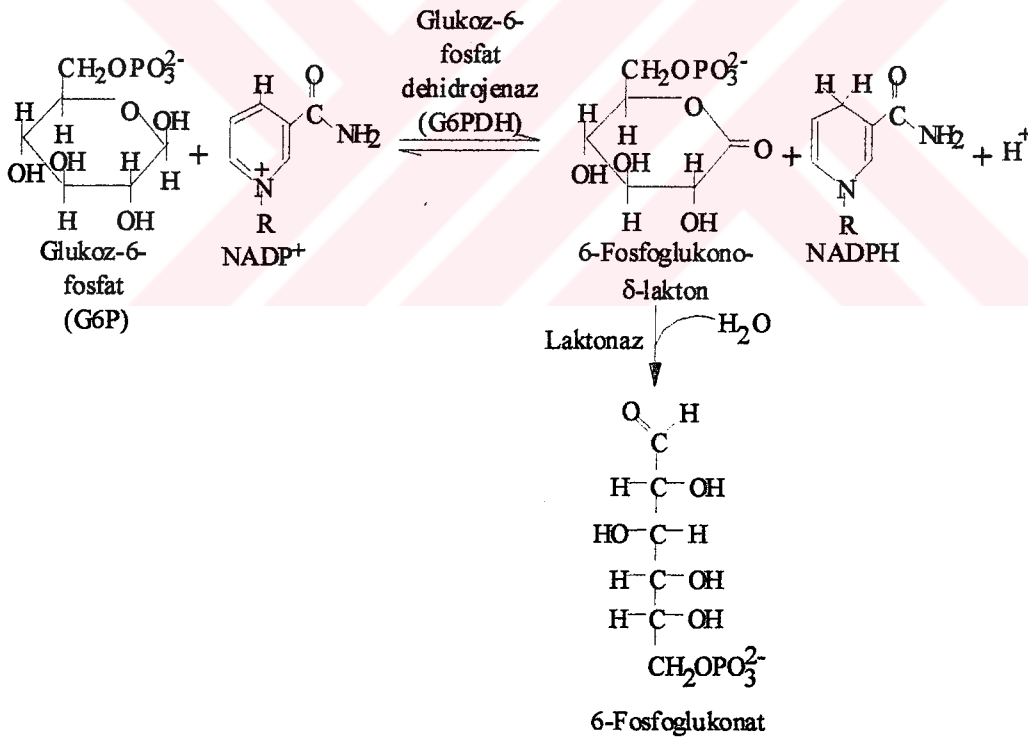
Sonuç olarak G6PDH'ın ışıkta inhibisyonunda üç mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan biri, fotosentetik ATP ve NADPH ışıkta G6PDH için negatif efektör olarak rol oynar (Stanier ve Cohen-Bazire, 1977) (bakınız Bölüm 1.5.2). Diğer mekanizmada enzimin yapısal özellikleri rol alır. G6PDH yüksek ve düşük aktivitede farklı formlara dönüşebilen oligomerik bir enzimdir. Bu formlar arasındaki geçişte pH da etkilidir. Işıktaki pH artar (Kallas ve ark., 1994) ve buna bağlı olarak da enzim düşük aktivite gösteren formlara dönüşür (Schaeffer ve Stanier, 1978) (bakınız Bölüm 1.5.1). Son olarak, G6PDH fotosentetik elektron transport zinciri ile ışıkta indirgenerek deaktivite olan bir redoks proteindir (bakınız Bölüm 1.5.3). Bu üç mekanizmanın enzimin regülasyonunda birbiriyle ilişkili olarak çalıştığı ileri sürülmüştür (Udvardy ve ark., 1982).

Hücrede ışık ve karanlık metabolizması enzimleri ayrı bölmelerde yer almaz. Glikolitik yol, OPP döngüsü ve RPP döngüsü enzimleri bir arada bulunurlar. Bu nedenle ışık ve karanlık periyotlarda doğru enzimin ve dolayısıyla doğru metabolik yolun etkinliğinin sağlanabilmesi için düzenlenmenin olması gerekmektedir. Işık, fotosentezdeki rolü ile bu mekanizmaların temel belirleyicisidir. Bu rol protein seviyesinde enzimlerin aktif ve inaktif formlara dönüşümünü sağlamak ve/veya ekspresyon seviyesinde enzim miktarını ayarlamak şeklinde gerçekleşir (Min ve Golden, 2000; Yang ve ark., 2002). Bu düzenlenme mekanizmaları fotosentez

ürünlerinin metabolik havuzdaki düzeylerine ve dolayısıyla fotosentezin işleyip işlemediğine bağlı olarak çalışmaktadır.

1.5. Glukoz-6-fosfat Dehidrojenaz (G6PDH)

Siyanobakterilerde OPP döngüsü karbonhidrat yıkımı için esas metabolik yoldur. G6PDH bu yolun ilk enzimidir. G6PDH, G6P'ın NADP varlığında 6-fosfoglukono- δ -laktona yıkımını gerçekleştirir. 6-fosfoglukono- δ -laktone kararlı bir bileşik değildir ve hücrede bu şekilde kalmayıp laktonaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla 6-fosfoglukonata dönüştürülür. İlk reaksiyon termodinamik bir şekilde geri dönüşümlü olmasına rağmen, ikinci reaksiyon yani laktonaz reaksiyonu dönüşümsüzdür (Levy, 1979). Bu şekilde G6PDH reaksiyonunun geri dönüşümü laktonaz tarafından engellenmiş olur.



Şekil 1.3. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve laktonaz reaksiyonları.

ekspresyonunu etkileyerek hem de ekspresyonu yapılan proteinleri modüle ederek etkisini gösterir (Gleason, 1994). Işığın bu etkisi sıklıkla doğrudan gerçekleşmemektedir. Fotosentetik organizmalarda metabolik aktiviteleri etkileyen ışık, hücre içi bazı değişikliklere neden olur. Fotosentetik elektron taşınmasına bağlı olarak, NADP ve tioredoksin indirgenir, RuBP seviyesi artar, pH'da yükselme olur.

G6PDH'nin regülasyonunda etkisi olan faktörlerden biri pH'dır. pH enzimin hem katalitik aktivitesini hem de az aktif oligomerik formu M_1 ile normal aktif oligomerik M_2 formu arasındaki dengeyi etkilemesinden dolayı oldukça karmaşık bir etkiye sahiptir (Schaeffer ve Stanier, 1978; Gleason, 1996). *Anabaena* sp. PCC7120 ile yapılan çalışmada sulandırılmış enzim solüsyonunda pH 6.5'de enzim aktivitesinin on beş dakika boyunca sabit kaldığı gözlenmiş fakat pH 7.9'a çıkarılınca aktivitenin on saniye içinde başlangıç değerinin yarısına indiği belirlenmiştir. Buna göre hafif asit koşullarda yani pH 6.5-6.9 civarında iken enzimin normal aktif formu M_2 , pH 7'nin üzerinde iken ise enzimin en az aktif formu olan M_1 yönünde denge söz konusudur. *Anabaena* sp. PCC7120'den izole edilen enzimin katalitik aktivitesi için optimal pH değeri 7.4'dür (Schaeffer ve Stanier, 1978). Optimum pH değeri *Synechococcus* sp. PCC6307 ve *Synechococcus* sp. PCC6716 için 7.2 olmasına rağmen pH 7'nin üzerinde iken enzimin oligomerik dengesi M_1 yönündedir. Bu durum pozitif efektör yokluğunda aktivitenin azalmasına neden olmaktadır (Gleason, 1996; Stanier ve Cohen-Bazire, 1977).

NADPH ve ATP siyanobakteriyel G6PDH'nin negatif efektörleridir yani enzim aktivitesini inhibe ederler. Bu metabolitler enzimin katalitik aktivitesini azaltırken enzimin M_1 ve M_2 formları arasındaki dengede etkileri önemsizdir. Katalitik fonksiyonu ise direk olarak etkilerler (Grossman ve ark., 1975). *Anacystis nidulans* ve *Anabaena* sp.'den izole edilen enzimle yapılan çalışmalarda, G6PDH aktivitesinin NADPH tarafından G6P ile kompetitif olarak inhibe edildiği rapor edilmiştir. (Grossman ve McGowan, 1975). Aynı çalışmada ATP'nin de NADP ile rekabete girerek enzimi inhibisyona uğrattığı gözlenmiştir. Bu inhibisyon şekilleri, NADPH için pH 6.5'de enzimin sadece süper aktif formu için geçerli iken, ATP inhibisyonu enzimin her üç formu için de etkilidir. ATP ve NADPH enzimin katalitik fonksiyonunu etkiler (Schaeffer ve Stanier, 1978). Enzim aktivitesine NADPH/NADP oranı da etki etmektedir. Işıktaki yüksek NADPH/NADP oranı enzim aktivitesini inhibe ederken aynı zamanda OPP döngüsünün akış hızını yavaşlatır. Karanlıkta ise düşük NADPH/NADP

oranı enzimin aktif hale geçmesini sağlar. *Anacystis nidulans* ile yapılan bir çalışmada NADP seviyesi karanlıkta (0.19 mM, ışıkta 0.17 mM) az çok sabit kalırken, NADPH seviyesinin ışıkta 0.23 mM iken karanlık koşullarda 0.04 mM seviyelerine kadar düştüğü rapor edilmiştir (Ihlenfelt ve Gibson, 1975). Bu sonuçlar enzimin aktif formunun korunması için NADPH/NADP oranının düşük olması gerektiğini göstermektedir.

Ribuloz-1,5-bisfosfat (RuBP)'ın enzimin düzenlenmesinde negatif efektör olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (Schaeffer ve Stanier, 1978). RuBP enzimin en az aktif formu olan M_1 formundan normal aktif form olan M_2 formuna dönüşmesinde negatif efektör olarak iş görür (Grossman ve McGowan, 1975). Işıktaki RPP döngüsüne bağlı olarak metabolik havuzda RuBP miktarı artmaktadır. Bu durum enzim aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Buna karşın Schaeffer ve Stanier (1978) RuBP'nin enzimin normal ve süper aktif formlarının aktivitesine herhangi bir etkide bulunmadığını söylemektedir.

Enzim aktivitesinde etkisi olan diğer bir metabolit ise glutamindir. Pozitif efektör olarak iş görerek enzimi aktive eder. Özellikle *Anabaena* sp. heterosistlerinde enzim aktivitesinin yüksek seviyede tutulmasına yardımcı olur (Stanier ve ark., 1977). Glutamin enzimin substratı olmamasına rağmen glukoz-6-fosfat (G6P) ile birlikte dengeyi M_2 yönünde (normal aktif form) değiştirme yeteneğindedir. Fakat enzimin süper aktif ve normal formunda enzim kinetikleri üzerine herhangi bir etkisi yoktur (Schaeffer ve Stanier, 1978). Benzer sonuçlar *Anabaena variabilis*'de de gözlenmiştir (Cossar ve ark., 1984). Ayrıca glutaminin pH 8'de aktivatör olarak görev yaptığı ve enzim süper aktif formda iken enzim-substrat affinitesini değiştirmediği bildirilmiştir (Gleason, 1996; Schaeffer ve Stanier, 1978).

Glukoz-6-fosfat (G6P) ise pozitif efektör olarak görev yapmaktadır. Karanlıkta OPP döngüsünün aktivitesine bağlı olarak glikojen rezervlerinden enzimin substratı olan G6P'ın ayrışması metabolik havuzda G6P konsantrasyonunu arttırmaktadır. Bu durum karanlıkta aktivitenin korunmasına yardımcı olur (Schaeffer ve Stanier, 1978).

İndirgenmiş tioredoksin enzimin indirgenmesinde önemli bir rol oynar. Tioredoksinler diğer proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesine neden olan redoks proteinleridir. Bu proteinler diğer proteinlerin içerdiği ve yapısal açıdan önemli olan disülfid bağlarını indirgeyerek enzim aktivitesinde modülatör olarak görev yaparlar.

Öbakterilerin aksine siyanobakteriler iki farklı tioredoksine sahiptir: tioredoksin m ve tioredoksin f. Bunlar amino asit seviyesinde %39 benzerlik gösterirler. Tioredoksin f hem yapı hem de genel redoks aktivitesi bakımından bakteriyel tioredoksinlere benzer. Diğerleri, tioredoksin m ise siyanobakterilere özgüdür ve f tipine nazaran daha az stabildir (Gleason, 1994, 1996). Siyanobakterilerde karbon metabolizması ve azot metabolizmasında görev alan bir çok enzim, disülfid bağlarının indirgenmesi/yükseltgenmesiyle düzenlenir. Bu enzimlerden biri de G6PDH'dır. Bu düzenlemede tioredoksin f veya tioredoksin m etkili olabilir. Tioredoksinler PS I'de üretilen ürünler ile indirgenirler. Bu yüzden G6PDH ve ışık reaksiyonları arasında önemli bir biyokimyasal ilişki mevcuttur (Fickenscher ve Scheibe, 1986). G6PDH'ın düzenlenmesi redoks modülasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Anderson ve ark., 1978; Cossar ve ark., 1984; Udvardy ve ark., 1984; Rowel ve ark., 1988; Graeve ve ark., 1994). In vitro'da *Anacystis nidulans* ile yapılan bir çalışmada güçlü bir indirgeyici olan ditiotreitöl (DTT) kaba özüt içinde G6PDH'ın aktivitesini azaltmaktadır (Cseke ve ark., 1981). Buna rağmen DTT *Anabaena variabilis* ATCC29413 ve *Anabaena* sp. PCC7120 hücrelerinden saflandırılmış enzim üzerinde bu etkiyi göstermemiştir (Cossar ve ark., 1984; Udvardy ve ark., 1984). Bu saflandırılmış enzim çözeltisine tioredoksin ilave edildiğinde DTT varlığında enzim aktivitesi azalmaktadır. Bu sonuçlar tioredoksinin siyanobakteriyel G6PDH için in vivo'da indirgeyici bir ajan olduğunu desteklemektedir. Tioredoksin, in vivo'da ferrodoksin-tioredoksin oksidoredüktaz tarafından indirgenir (Crawford ve ark., 1979; Yee ve ark., 1981). Işıқта fotosentez gerçekleşirken PS I'de e⁻lar ya NADP'ye yada tioredoksine iletilir. Tioredoksine e⁻ iletiminde ferrodoksin-tioredoksin oksidoredüktaz görev alır. İndirgenmiş tioredoksin de elektronunu G6PDH'a vererek enzimin yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma dönüşümünü katalizler. Karanlıkta ise indirgenmiş tioredoksin seviyesi düşük olduğundan enzim yükseltgenerek aktive olur. Biyokimyasal analizlere dayalı çalışmalar ışık/karanlık ve karanlık/ışık geçişlerinde enzimin yükseltgenmesiyle ve indirgenmesiyle aktivitenin kontrol edildiğini desteklemektedir (Udvardy ve ark., 1983; Cossar ve ark., 1984; Gleason, 1994).

Bu yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının enzimin yapısında bulunan sistein amino asitlerinin sülfhidril grupları arasındaki disülfid bağlarının yapımı ve yıkımı şeklinde gerçekleşebileceği hipotezi ileri sürülmüştür (Anderson ve ark., 1978).

Daha sonra yapılan moleküler genetik analizler biokimyasal analizleri destekler niteliktedir. Siyanobakterilerin G6PDH genlerinin (*zwf*) en az iki sistein kodonu içerdiği ve bunların gen içindeki konumlarının korunduğu belirlenmiştir (bakınız Bölüm1.6) (Scanlan ve ark., 1992; Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995a).

Yapılan moleküler genetik analizler sonucunda G6PDH geninin hemen aşağısında bir *opcA* geni bulunduğu belirlenmiştir (Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995a; Sundaram ve ark., 1998). *Nostoc* sp. ATCC29133 ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda *zwf* mutantlarda G6PDH'ın spesifik aktivitesi tamamen kaybolmayıp yabani tip aktivitenin %5'i seviyesinde olduğu buna rağmen *opcA* mutantlarda G6PDH aktivitesinin %2 oranında olduğu belirlenmiştir (Summers ve ark., 1995b). Görüldüğü gibi G6PDH aktivitesi *opcA* mutantlarında *zwf* mutantlarındakinden daha fazla etkilenmiştir. Bu sonuçlar *opcA*'nın G6PDH aktivitesinde dikkate değer bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Summers ve arkadaşları (1995b) tarafından *Nostoc* sp.ATCC29133 *zwf* gen bölgesinin transkript analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrenin ihtiyacına göre hangi enzime ihtiyaç varsa bu bölgede bulunan ilgili genin ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. Burada karışık bir operon düzenlenmesi söz konusudur. Dikkati çeken en önemli nokta *opcA* ve *zwf*'nin ekspresyonunun daima birlikte gerçekleştiriliyor olmasıdır. Bu analizler ışığında *opcA*'nın ikinci bir G6PDH geni olduğu konusunda düşünceler ileri sürülmüştür (Butler ve ark., 2002).

opcA ve *zwf* gen bölgeleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için çalışmalar yapılmıştır (Sundaram ve ark., 1998; Summers ve ark., 1995; Min ve Golden, 2000; Hagen ve Meeks, 2001). *Nostoc punctioforme* hücrelerinde *OpcA*'nın enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olduğu ve *OpcA* varlığında enzimin G6P'a affinitesinin fizyolojik değer olarak otuz kat arttığı gözlenmiştir (Summers ve ark., 1995b). Yine bu çalışmada *OpcA*'nın G6PDH sentezine veya katalitik aktivitesine bilinmeyen bir mekanizma ile etki ettiği bildirilmiştir. Sundaram ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada *OpcA* proteininin G6PDH'ın aktif oligomerik yapıya dönüşmesine yardım ettiğini ve *opcA* geninin direk yada indirek bir şekilde G6PDH monomerlerinin katalitik olarak aktif multimerik formlara dönüşmesinde rolü olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmalar *opcA* mutantlarında G6PDH aktivitesinin tamamına yakınının neden kaybolduğunu açıklamaktadır. Min ve Golden'in yaptıkları çalışmada (2000) *OpcA*'nın G6PDH aktif

formunun oluşturulması ve katalitik aktiviteye etkisinin ötesinde, sirkadien gen ekspresyonunun düzenlenmesinde de rol oynadığı ileri sürülmüştür. G6PDH karanlıkta aktif ışıktaki inaktif bir enzimdir. Bu da enzimin sentezinin muhtemelen sirkadien kontrol altında olduğunu göstermektedir. OpcA'nın G6PDH'nin katalitik aktivitesi için gerekli olduğu ve enzimin redoks modülasyonunda bir rolü olabileceği de diğer bir çalışmada ileri sürülmüştür (Hagen ve Meeks, 2001). Bu çalışmada redoks modülatörlerinin sadece OpcA varlığında G6PDH aktivitesini etkileyebileceği rapor edilmiştir.

1.5.3. Disülfit Bağlarının Oluşum ve Yıkımı

Fotosentetik organizmaların karbon metabolizmalarında işlev gören enzimlerin ışık/karanlık geçişlerinde aktivitelerinin nasıl düzenlendiklerinin anlaşılması için günümüze kadar birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Schaeffer ve Stanier, 1978; Steawart, 1980; Cossar ve ark., 1984; Udvardy ve ark., 1984, Scanlan ve ark., 1992; Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995a). Üzerinde durulan G6PDH regülasyon mekanizmalarından biri de enzimin yapısında bulunan sistein amino asitlerinin sülfhidril (-SH) grupları arasında disülfit bağlarının oluşumu ve yıkımıyla gerçekleştirilen düzenlenmedir (Anderson ve ark., 1978). Biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalarda ışıktaki enzimin indirgenmesi ile aktivitenin durdurulduğu, karanlıkta ise yükseltgenerek aktivitenin tekrar kazanıldığı gözlenmiştir. (Udvardy ve ark., 1984; Cossar ve ark., 1984; Gleason, 1994). Ayrıca enzimin moleküler analizleri de bu mekanizmayı destekleyici niteliktedir (Scanlan ve ark., 1992; Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995b; Scanlan ve ark., 1995; Wenderoth ve ark., 1997)

Tioredoksinler diğer proteinlerin disülfit bağlarının indirgenmesine neden olan redoks proteinleridir. Tioredoksinler, proteinin içerdiği ve yapısal açıdan önemli olan disülfit bağlarını indirgiyerek enzim aktivitesinde modülatör olarak görev yapar. Tioredoksinler PS I'den gelen e⁻larla indirgenmiş ferrodoksin tarafından indirgenir. Bu yüzden regülasyon mekanizması ve ışık reaksiyonları arasında önemli bir biyokimyasal ilişki mevcuttur (Gleason, 1994).

PS I'de yüksek enerji düzeyine çıkan e⁻lar ferrodoksin ile iletilip indirgenmesine neden olurken indirgenmiş ferredoksin de e⁻larını NADP'ye iletmektedir; yada alternatif olarak ferrodoksin-tioredoksin oksidoredüktaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla tioredoksinde vermekte ve onun indirgenmesine neden olmaktadır.

İndirgenmiş tioredoksinin e^- larını yükseltgenmiş durumda iken aktif olan G6PDH'a vererek indirgenmesine dolayısıyla da inaktif forma dönüşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Gleason, 1994; Cossar ve ark., 1984). In vivo çalışmalarda tioredoksinin ferrodoksin-tioredoksin oksidoredüktaz tarafından indirgendiği rapor edilmiştir (Yee ve ark., 1981). İndirgenen tioredoksinin enzimin yapısında bulunan disülfid bağlarının indirgenmesine neden olduğu ileri sürülmektedir (Anderson ve ark., 1978).

Enzim aktif durumda iken sistein amino asitleri arasında disülfid bağları bulunduğu ancak indirgenmiş tioredoksin varlığında bu disülfid bağlarının indirgendiği ve dolayısıyla enzimin inaktif forma dönüştüğü ileri sürülmüştür (Cossar ve ark., 1984). Aynı çalışmada indirgenmiş tioredoksinin bu etkisinin G6P ve glutamin gibi bazı pozitif efektörlerin varlığında azaldığı rapor edilmiştir. G6PDH'ın redoks modülasyonu oldukça güçlüdür; eğer G6P konsantrasyonu düşükse bu geçerlidir. Oligomerik bir enzim olan G6PDH'ın yüksek ve düşük aktivite gösteren formları farklı redoks özellikleri gösterir. Işık altındaki hücrelerde hipoaktif form, enzim aktivitesinin yüksek olduğu bir pH'da yükseltgenerek kolayca aktive olur. Fakat hiperaktif form daha düşük bir pH'da indirgenerek kolayca deaktive olur. Fotosentetik elektron taşıma sistemi de bileşikleri indirgeyen güçlü bir sistemdir ve enzimin hipoaktif formda kalmasını (inaktif) sağlar. Dolayısıyla ışığın fotosentetik organel yada hücrelerdeki redoks durumunu etkilediği açıktır. Işık indirgenmiş ferrodoksin oranını ve NADPH miktarını artırır. Redoks durumundaki bu değişiklikler, tioredoksinin indirgenmesine ve diğer enzimlere de bu değişikliklerin iletilmesine neden olur (Gleason, 1994). Bu indirgenmeden G6PDH ve dolayısıyla OPP döngüsü de etkilenir. Bu metabolik şartlarda ışıpta ekonomik olmayan oksidatif metabolik yollarla karbon akışı engellenmiş olur. Enzimin okside formunun kolayca indirgenmesi ve ışıpta inaktif hale dönüşmesi onu fizyolojik açıdan önemli kılar. Enzime e^- akışı durur durmaz indirgenmiş formdan, yüksek aktivite gösterdiği yükseltgenmiş forma kolaylıkla geçiş yapabilir (Udvardy ve ark., 1982). G6PDH'ın redoks özellikleri, farklı oligomerik özellikleriyle beraber enzimin bu hassas metabolik kontrolünde alışılmışın dışında bir mekanizmanın ortaya çıkmasını sağlar (Cseke ve ark., 1981).

Bütün bu verilerin ışığı altında G6PDH'ın tioredoksin tarafından enzimin yapısında bulunan spesifik düzenleyici sistein amino asitleri arasında oluşan disülfid bağlarının redoks modifikasyonu ile inaktive edildiği ileri sürülmüştür (Anderson ve

ark., 1978). Yapılan biyokimyasal ve moleküler genetik analizler bu hipotezi destekleyici niteliktedir. DNA dizileme çalışmaları *Synechococcus* sp. PCC7942 suşunun G6PDH enziminin 187 ve 445 pozisyonlarında iki sistein amino asiti içerdiğini göstermiştir (Scanlan ve ark., 1992). *Anabaena* sp. PCC7120 *zwf* geni de 101-187-265 ve 445 pozisyonlarında dört sistein amino asiti içermektedir (Newman ve ark., 1995). *Nostoc* sp. ATCC29133 G6PDH geninde ise 187, 265 ve 445 pozisyonlarında üç sistein amino asiti bulunmaktadır (Summers ve ark., 1995a). Bu veriler karanlık/ışık geçişinde enzimin yapısında yer alan sisteinlerin sülfhidril gruplarının arasında disülfid bağ oluşumu ve yıkımıyla enzim aktivitesinin düzenlenebileceği hipotezini desteklemektedir.

1.6. Siyanobakteriyel *zwf* Genleri

Synechococcus sp. PCC7942 G6PDH enzimini kodlayan *zwf* geni ilk klonlanan siyanobakteriyel *zwf* genidir (Scanlan ve ark., 1992). Prob olarak *Zymomonas mobilis* *zwf* geni kullanılarak sonuçta *zwf* geni 2.9 kb'lık *Hind*III fragmenti şeklinde klonlanmış ve baz dizisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geninin 1572 nükleotit ve 524 amino asitten oluştuğu ve 187 ve 445 pozisyonlarında olmak üzere iki sistein amino asiti içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geninin nükleotid dizisi *Eschereschia coli* *zwf* nükleotid dizisiyle karşılaştırıldığında amino asit seviyesinde % 41, nükleotit seviyesinde %60 benzerlik olduğu görülmektedir. Daha sonra *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geni prob olarak kullanılarak *Anabaena* sp. PCC7120 (Newman ve ark., 1995) ve *Nostoc* sp. ATCC29133 *zwf* genleri (Summers ve ark., 1995a) klonlanmış ve baz dizisi belirlenmiştir. Yapılan nükleotit dizi analizleri sonucunda *Synechococcus* sp. PCC7942 ve *Anabaena* sp. PCC7120 *zwf* genlerinin amino asit seviyesinde %69, nükleotit seviyesinde %82 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Anabaena* sp. PCC7120 ve *Nostoc* sp. ATCC29133 *zwf* genleri ise amino asit seviyesinde %94, nükleotit seviyesinde ise %96 benzerlik göstermektedir (Newman ve ark., 1995; Summers ve ark., 1995a).

Newman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1995) *Synechococcus* sp. PCC7942 ve *Anabaena* sp. PCC7120 *zwf* bölgesinin organizasyonu karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* gen bölgesinin yukarısında (upstream) fruktoz-1,6-bisfosfatazi kodlayan gen *fbp* geni ve aşağısında (downstream)

opcA geni yer alır. *Anabaena* sp. PCC7120 suşunun *zwf* gen bölgesi incelendiğinde ise *zwf* geninin yukarısında transaldolazı kodlayan *tal* geninin ve onun yukarısında *fbp* geninin yer aldığı görülmektedir (Newman ve ark., 1995). Son çalışmalarda bu organizmanın *zwf* geninin aşağısında bir *opcA* geninin mevcut olduğu belirlenmiştir (Kaneko ve ark., 2001). *Nostoc* sp. ATCC29133 ile yapılan *zwf* gen bölgesinin organizasyonunun belirlenmesiyle ilgili bir çalışmaya göre *Anabaena* sp. PCC7120 ile benzer organizasyona sahip olduğu anlaşılmaktadır (Summers ve ark., 1995a). Ayrıca *Nostoc* sp. ATCC29133 gen bölgesinin transkript analizleri de gerçekleştirilmiştir (Summers ve ark., 1995b). Bu organizmada *fbp* ile başlayan ve *opcA* ile biten yapısal genlere sahip bir operon olduğu kabul edilmiştir. Bu genler kompleks bir operon düzenlenmesine sahiptir. Üç farklı noktadan transkripsiyon sinyalleri oluşabilmektedir. Bu sinyaller *fbp* geninin yukarısında, *tal* geninin yukarısında ve *tal* geninin içinde yer alır. Organizmanın fizyolojik durumuna göre hangi enzime veya enzimlere ihtiyaç varsa sadece o enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. Dikkat çeken diğer bir önemli durum ise diğer genlerin aksine *opcA* ve *zwf* genlerinin ekspresyonunun daima birlikte gerçekleştiriliyor olmasıdır.

Yapılan klonlama ve dizileme analizleri sonucunda dikkati çeken önemli noktalardan biri de *Synechococcus* sp. PCC7942, *Anabaena* sp. PCC7120 ve *Nostoc* sp. ATCC29133 suşlarının *zwf* genlerinin 187 ve 445 pozisyonlarındaki sistein amino asitlerinin konumlarının korunduğudur. Bu sonuçlar diğer araştırmalarda ileri sürülen enzimin düzenlenme mekanizmasında disülfit bağlarının oluşum ve yıkımı ile ilgili hipotezi destekler niteliktedir (Anderson ve ark., 1978; Cossar ve ark., 1984).

1.7. *zwf* Mutasyon Çalışmaları

zwf gen bölgelerinin klonlanması ve dizi analizlerinin ışığında *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geninin insersiyonel (interpozon eklenerek) inaktivasyonu gerçekleştirilmiş ve mutant organizmanın özellikleri araştırılmıştır (Scanlan ve ark., 1995). Bu mutantta *zwf* geni kesintiye uğratılmıştır yani *zwf* geninin içine Ω fragmenti yerleştirilmiştir (Ω fragmenti için bakınız Bölüm 1.9.1). Sonuçta bu mutant bir Δzwf mutanti değildir. Bu mutantta G6PDH aktivitesi görülmemiştir ve diğer enzimlerdeki değişiklikler de belirlenmiştir. Yabani tip ile karşılaştırıldığı zaman G6PDH spesifik

aktivitesi yabancı tiplerde 256 ünite/mg protein iken mutant organizmalarda aktivite gözlenmemiştir. Bu mutantın karanlıkta yaşayabilirlik oranları incelendiğinde 96 saatten sonra neredeyse sıfır yaşayabilirlik oranı gösterdiği yabancı tiplerde ise %60 lık yaşayabilirliğin olduğu saptanmıştır (Scanlan ve ark., 1995). Mutantlarla yapılan Western blot analizleri sonucunda Zwf proteininin üretiminin olmadığı da belirlenmiştir.

Nostoc sp. ATCC29133 ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda *zwf* mutantlarda G6PDH'nin spesifik aktivitesi tamamen kaybolmazken (%5) *opcA* mutantlarda bu değer (%2) *zwf* mutasyonundakine nazaran daha fazla etkilendiği gözlenmiştir (Summers ve ark., 1995b)

Ökaryotlarda ve yüksek bitkilerde enzimle ilgili moleküler genetik çalışmaların zorluğundan dolayı genellikle prokaryotik organizmaların enzimleriyle ilgili genetik çalışmalar daha yaygındır. Buna rağmen yüksek bitkilerden *Solanum tuberosum*'da yapılan çalışmalarda enzimin kloroplastta ve sitozolde olmak üzere iki farklı formu olduğu belirlenmiştir. Bunlardan kloroplastlarda bulunan enzimin plastitik formu, sitoplazmada bulunan ise sitozolik formudur. Plastitik form redoks modülasyonuna tabi olmasına rağmen sitozolik form için bu durum söz konusu değildir (Fickenscher ve ark., 1986). Sitozolik formun aktivitesinin düzenlenmesi birkaç efektör tarafından gerçekleştirilir. Bunlardan en güçlüsü NADPH'dır. Buna ilave olarak nükleotit trifosfat, asetil CoA ve CoA enzim aktivitesinde önemli birer efektördür.

Solanum tuberosum plastitik *zwf* geni altı sistein içermektedir. Bu amino asitlerden hangilerinin redoks modülasyonuna tabi olduğunu anlamak için yapılan yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarıyla sistein amino asitleri serin amino asitine dönüştürülmüş ve enzimin yapısındaki Cys¹⁴⁹ ve Cys¹⁵⁷ pozisyonlarındaki sisteinlerin redoks düzenlemesine katıldığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada yapılan kristallografik analizlerde bu iki sisteinin pozisyonlarının bu duruma uygun nitelikte olabileceği bildirilmiştir (Wenderoth ve ark., 1997).

Her ne kadar daha önce siyanobakteriyel *zwf* mutantları elde edilmişse de bunlar *zwf* silinme mutantları değildir. Yani sistein kodonlarının bulunduğu gen bölgesi silinmemiştir. Sistein kodonları değiştirilmiş *zwf* geninin genoma transferi için bu kodonları içeren gen bölgesi silinmiş bir mutanta gereksinim vardır. Bundan dolayı bu çalışmaya uygun mutantlar değildir. Bu çalışmanın amaçlarından biri *zwf* geni silinmiş

Synechococcus sp. PCC7942 mutanıtı elde etmektir. Bu silinme sistein kodonlarının bulunduğu bölgeyi de içine alması gerekmektedir. Bunun nedeni de amino asit değişikliğinin bu bölgede yapılacak olmasından dolaydır.

1.8. Araştırmanın Amacı

G6PDH enziminin ışığa bağlı regülasyonu ile ilgili bir hipotez ileri sürülmüştür. Bu hipotez enzimin yapısında yer alan sistein amino asitlerinin sülfhidril (-SH) grupları arasında oluşan disülfit bağlarının redoks modülasyonu ile indirgenme ve yükseltgenmesi sonucu enzim aktivitesinin düzenlendiğini ileri sürer (Anderson ve ark., 1978; Udvardy ve ark., 1984; Cossar ve ark., 1984; Gleason, 1994). Bu hipotez sülfhidril grupları taşıyan sistein amino asitlerinin enzim yapısında yer aldığı temel line dayanır. DNA dizileme çalışmalarında elde edilen bilgilere göre siyanobakteriyel genomların 187 ve 445. pozisyonlarda olmak üzere en az iki sistein amino asiti içerdiği belirlenmiştir.

G6PDH'nin düzenlenmesinde böyle bir redoks modülasyonunun gerçek mekanizmasını, biyokimyasal analizlere dayalı olarak elde edilen dolaylı verilerin ötesinde anlamının tek yolu *zwf* geninin yapısındaki sistein kodonlarının değiştirilmesidir. Böyle bir değişim oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonla *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geninin 187 ve 445 pozisyonlarındaki iki adet sistein amino asitinin diğer bir amino asite dönüştürülmesi ile gerçekleşebilir. Fakat bunun için öncelikli olarak *zwf* geni silinmiş *Synechococcus* sp. PCC7942 mutanıtının üretilmesi gerekmektedir. Bu temel hedefe yönelik olarak bu araştırmada iki amaç güdülmüştür.

Bunlardan birincisi bazı siyanobakteriyel suşlarda tanımlanmış olan indirgeyici ajanlar varlığında *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinde enzim aktivitesinin etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesidir. Bunun için *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinden elde edilmiş süpernatantlar kullanılarak enzim aktivitesine DTT'nin etkisi incelenecektir.

İkinci olarak sistein içermeyen mutant G6PDH enziminin ışık regülasyon modundaki değişimi belirlemeye yönelik bir çalışmada kullanımı olacak olan bir silinme *zwf* (Δzwf) *Synechococcus* sp. PCC7942 elde etmektir. Bunun için daha önce klonlanmış *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmenti kullanılarak bir seri

manipulasyon sonucu bir Δzwf mutasyonu elde etmek ve sonra bu mutant geni yabancı tip *Synechococcus* sp. PCC7942 genomuna nakletmek gerekmektedir.

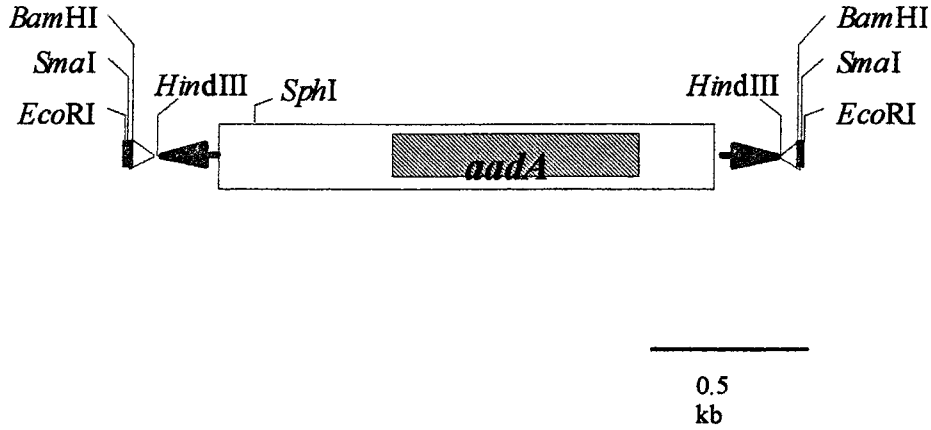
Patates plastitik G6PDH enziminde sisteinlerden ikisinin böyle bir mekanizmanın işleyişinde rol aldığı gösterilmiş olsa da (Wenderoth ve ark., 1997) bu güne kadar siyanobakteriyel G6PDH'da böyle bir mekanizmanın işleyip işlemediğini gösteren bir çalışma yapılmamıştır.

1.9. Genel Bilgiler

1.9.1. Omega İnterpozonu

Omega (Ω) fragmenti 2.1 kb'lık (2082 bp) bir DNA parçası olup streptomisin (Sm) ve spektinomisin (Spc) direncini kodlayan bir geni (*aadA*) taşır (Şekil 1.4). Aynı zamanda simetrik sentetik çoklu klonlama bölgeleri, translasyon ve transkripsiyon sonlanma sinyalleri içerir. Kodladığı Sm ve Spc direnci sayesinde bağlı bulunduğu rekombinant DNA moleküllerini taşıyan hücrelerin ayırt edilmesine izin verir. Ω fragmenti RNA ve protein sentezini erken safhada sonlandırır ve bu sayede hem transkripsiyon hem de translasyon ünitelerinin haritanlanmasına ve tanımlanmasına yardım eder. Ω fragmentinin durdurma sinyallerinin simetrik yapısından dolayı aynı etki her iki yöndeki insersiyonda da elde edilmektedir. Fragment, pHP45 vektörüne bağlı durumdadır, vektör seçici karakter olarak ampisilin direnç genini (*bla*) taşır. Ω fragmentiyle beraber toplam büyüklük 4.3 kb'dır (Prentki ve ark., 1991).

Ω fragmentinin mutagenizde kullanılması bazı avantajlar sağlar. Bunlardan biri seçiciliktir. Ω fragmentine bağlı bir rekombinant vektör Spc ve Sm direnci kazanır. İkincisi, içine yerleştiği genetik ünitenin ekspresyonunu taşıdığı simetrik transkripsiyon ve translasyon durdurma sinyalleriyle durdurur. Diğer avantaj ise taşıdığı polilinker bölgesi sayesinde istenilen bölgeye bağlanma seçeneği sunmasıdır.



Şekil 1.4. Ω fragmentinin fiziksel haritası. Her iki uçta koyu oklar şeklinde T4 transkripsiyon terminasyon sinyalleri, boş üçgenler şeklinde translasyon durdurma kodonları ve koyu kutular şeklinde polilinker bölgesi görülmektedir. *aadA* geni streptomisin ve spektinomisin direncini kodlar (Prentki ve ark., 1991)

pHP45 Ω 'nın oluşturulması için bir seri işlem gerçekleştirilmiştir. pHP45 Ω 'nın yapısında dört DNA fragmenti bulunur. Bunlardan biri *aadA* genidir. Bu antibiyotik direnç geni R100.1 plazmitinden alınmış 1.7 kb'lık *PvuII-HindIII* fragmentidir. Sm ve Spc antibiyotiklerine karşı direnç sağlayan gen, her iki yönde de transkripsiyon ve translasyon sonlandırma dizisi içerir. İkinci fragment transkripsiyon sonlandırma dizisidir. Bu dizi T₄ bakteriyofaj geninin karboksi-terminal parçasını taşıyan pMJK4-18 plazmitinden elde edilmiştir. pHP45 Ω 'nın yapısında bulunan bir diğer fragment translasyon sonlandırma dizisidir. Bu dizi 21 bp'lik *BamHI-HindIII* fragmenti şeklindedir ve pKTH604 plazmitinden elde edilmiştir. Bu fragment ayrıca translasyon durdurma (TGA) kodonlarını da içerir. Diğer fragment ise Ω fragmentini taşıyan replikon pHP45 dir.

1.9.2. pUC Klonlama Vektörleri

pUC grubu vektörler klonlama vektörleri olmalarına rağmen bir ekspresyon vektörünün gerektirdiği tüm yapılara sahip olduğundan klonlamanın yanı sıra rekombinant proteinlerin ekspresyonunda da yaygın olarak kullanılmaktadır. pUC ailesi vektörleri oldukça yüksek bir kopya sayısına ve replikasyon orijini olarak *colE1*'e sahiptir. Ancak replikasyon düzenleyici bölgesi silinmiştir. Bu vektörler ampisilin direncini sağlayan ve

Bu vektörün içerdiği diğer yapılardan biri *lacI* gen bölgesidir. Bu gen *lac* represör proteini kodlar. *lacZ* geni ise *lac* promotordan transkribe edilir ve β -galaktosidaz proteinin bir amino terminal parçasını (α -polipeptiti) üretir. Bu protein laktozu glukoz ve galaktoz birimlerine parçalayan β -galaktosidazın bir mutant formunun tamamlanmasını sağlar. Vektörün sahip olduğu diğer önemli bir özellik çoklu klonlama bölgesine sahip olmasıdır. Bu kısa DNA bölgesi *lac* promotorunun aşağısından (downstream) başlar ve *lacZ* geninin ilk bir kaç kodonunu da içine alır. Bu bölgeye bir DNA'nın bağlanmasıyla *lacZ'* geni mutasyona uğratıldığından β -galaktosidaz enzimi tamamlanamaz hale gelir. Bu bölge bir grup restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesini de içerir. Bu tanıma bölgeleri farklı restriksiyon enzimleriyle elde edilmiş fragmentlerin klonlanmasına izin verir.

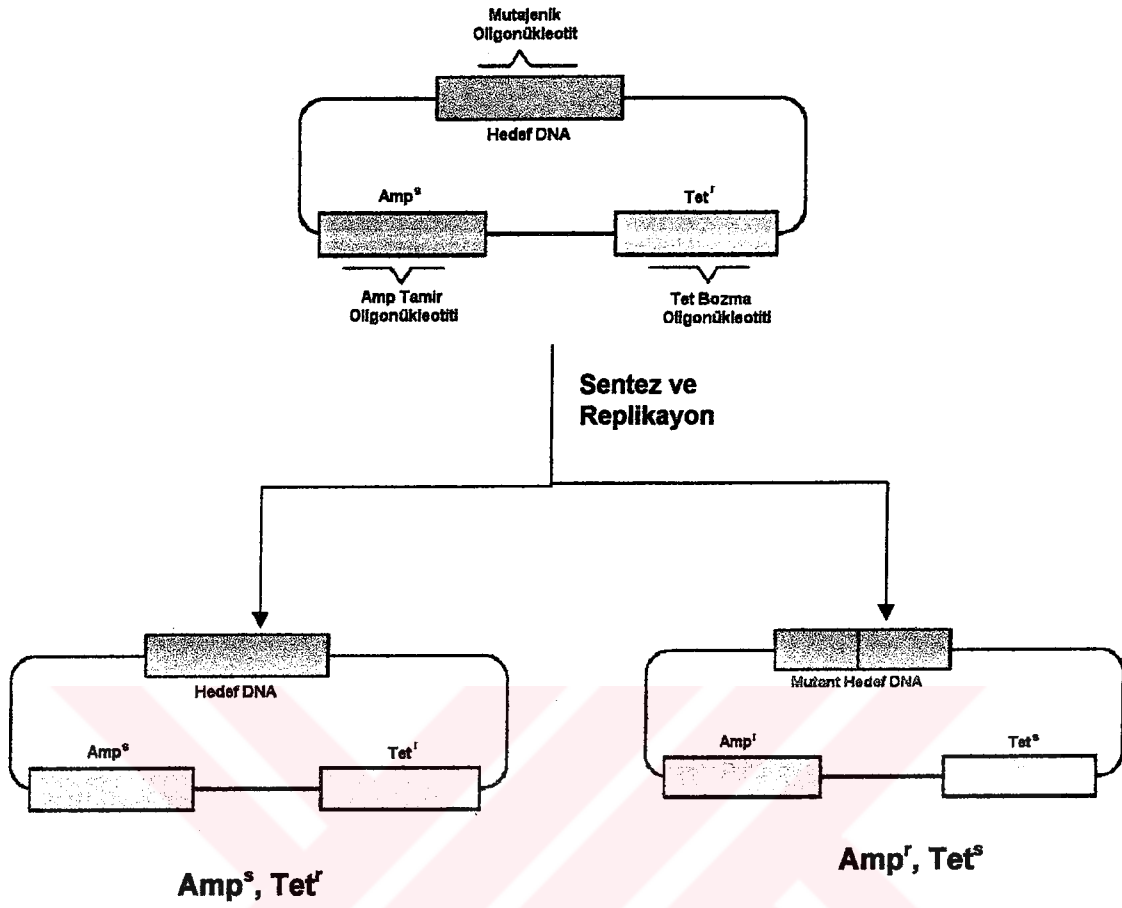
1.9.3. Oligonükleotit-yönlendirilmiş Mutasyon

Bir proteinin içindeki bir aminoasiti değiştirmek, uzaklaştırmak veya bir bölgeye eklemek için o proteini kodlayan gen üzerindeki ilgili kodonların değiştirilmesi gerekir. Bunu gerçekleştirmek için en gelişmiş yöntem oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyondur (Carter, 1991). Bu yöntemde gen üzerindeki sınırlı bir bölge mutasyona uğratıldığı için bu tip mutasyona nokta mutasyon denir.

Oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonun gerçekleştirilebilmesi için öncelikle mutasyona uğratılacak genin klonlanmış ve baz dizisinin belirlenmiş olması gerekir. İlgili gen tek zincirli veya çift zincirli formdaki bir vektör içine klonlanmalıdır. Bu aşamadan sonra genin değiştirilecek bölgesine homolog bir oligonükleotit sentezlenir. Bu oligonükleotit klonlanmış genin nokta mutasyon yapılacak bölgesiyle homolog olmalı ancak istenen değişikliği de içermelidir. Bu oligonükleotit primer olarak kullanılıp DNA replikasyonu gerçekleştiğinde, meydana gelecek çift zincirli vektörün zincirlerinden biri yabancı tip geni diğeri ise mutant geni içerecektir. Bu vektörün alıcı hücreye transferinden sonra DNA replikasyonu ile molekülün çok sayıda kopyası üretilmiş olacaktır. Oluşacak kolonilerin yarısı orjinal DNA'yı diğer yarısı ise mutasyona uğramış şeklini içeriyor olacaktır. Hangi koloninin hangi molekülü içerdiği koloni hibridizasyonu yada antibiyotik direnç genlerinden yararlanılarak

belirlenebilmektedir. Mutant kopyaları içeren hücre belirlendikten sonra hedef proteinin fonksiyonları incelenebilmektedir (Dalbadie-McFarland ve ark., 1983)

Son zamanlarda bu yönteme alternatif olarak daha kullanışlı yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri antibiyotik direnç genlerinin modifikasyonu ile mutant gen kopyasını ilişkilendirme esasına dayanır (Altered-site II in vitro Mutagenesis System, Promega). Bu yöntemde hedef gene homolog mutajen primerin yanı sıra standart antibiyotik geni nakavt ve tamir primerleri kullanılarak mutagenizasyonları gerçekleştirilir (Şekil 1.6). Mutajen oligonükleotit ve standart antibiyotik nakavt ve tamir primerleri ile mutagenizasyonları başlatılır. Yeni sentezlenecek zincirlerden biri genin mutant kopyasını diğeri de yabancı tip kopyasını taşır. Bu rekombinant vektör *mutS* bir hücreye transfer edildiğinde yanlış eşleşmiş bazlar tamir edilmez. Replikasyon sonucunda teorik olarak yeni vektörlerin yarısı yabancı tip geni diğeri yarısı mutant geni taşır. Mutant geni taşıyan vektörü bulunduran hücreler farklı antibiyotik direnç ve duyarlılıklarına göre seçilebilir. Mutajen oligonükleotitle beraber eklenen standart primerler yeni sentezlenen zincirde yabancı tip kopyada fonksiyonel olan antibiyotik direnç genini inaktive ederken mutant antibiyotik direnç genini tamir ederek fonksiyonelleşmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla yabancı tip geni taşıyan plazmidin fenotipik özellikleri (Amp^s/Tet^r) mutant kopyanın fenotipinden (Amp^r/Tet^s) farklı olacaktır. Bu farklılığa uygun olarak besin ortamına uygun antibiyotikler eklenerek mutant kopyayı taşıyan koloniler doğrudan seçilebilmektedir. Bu yöntem uygulanarak bir mutagenizasyon çalışmasında %95'e kadar etkili mutant izolasyonları sağlanabilmektedir (Technical Manual TM001 Promega, 2003)



Şekil 1.6. Bu çalışmada uygulanan oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon işlemlerinin temeli. Sistem pALTER fajemid vektörlerinin (Promega) kullanımı esasına dayanır. Sentez ve replikasyon sonrasında yabancı tip Amp^s/Tet^r ve mutant Amp^r/Tet^s plazmidler oluşur.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Plazmidler

Bu çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bu çalışmada kullanılan plazmitler

Plazmit	Karakterizasyon	Direnç	Referans
pUC18	Klonlama vektörü	Ap ^r	Yanisch-Peron ve ark., 1985
pNUT1	pUC19 içinde 2,9 kb <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>zwf</i> fragmenti	Ap ^r	Scanlan ve ark., 1992
pUC181	<i>SphI</i> bölgesi silinmiş pUC18	Ap ^r	Bu çalışma
pSG11	2,9 kb <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>zwf</i> fragmenti içeren pUC181	Ap ^r	Bu çalışma
pHP45Ω	Klonlanma vektörü	Sm ^r -Sp ^c	Prentki ve Krisch, 1984

2.2. Bakteriyel suşlar

Bu çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bu çalışmada kullanılan plazmitler

Suş	Karakterizasyon	referans
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Yabani tip	Grigorieva ve Shestakov, 1976
<i>E.coli</i> JM109	<i>EndA1, recA1, gyrA96, thi, HsdR17, (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F⁺, traD36, proAB, lacIqZΔM</i>	Yanisch-Peron ve ark., 1985
<i>E.coli</i> ES1301	<i>lacZ53, mutS201::Tn5, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE)</i>	Promega TM001, 2003

2.3. Kullanılan Kültür Ortamları ve Bakteriyal Suşların Üretimi

Synechococcus sp. PCC7942 100 ml BG11 besiyerinde, çalkalamalı inkübatörde, 30°C'de üretilmiştir. İnkübatörün yüzeyindeki ışık şiddeti 1,452 joul m⁻² olarak belirlenmiştir. Ayrıca 1 lt'lik büyük kültürler 3.059 joul m⁻² ışık şiddetinde optik yoğunluk 1.000 absorbans civarına gelene kadar sürekli havalandırılarak oda sıcaklığında üretildi. Besiyerini katılaştırmak için %1 (w/v) agar kullanıldı (Castenholz, 1988; Rippka, 1988).

Synechococcus sp. PCC7942 suşu için kullanılan BG11 besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir (Rippka, 1988).

Kimyasal	Miktar (gr)
NaNO ₃	1.500
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.040
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ .2H ₂ O.	0.036
Sitrikasit	0.006
Fe NH ₄ sitrat	0.006
EDTA.Na ₂ Mg	0.001
NaCO ₃	0.002

Bu karışıma 1 ml iz element eklendi ve hacim 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7.4'e ayarlandı. İz elementler aşağıdaki miktarlarda alınarak 1000 ml saf suda çözülerek 121°C'de 20 dk sterilizasyon geçirilmiştir.

İz elementler	Miktar (gr)
H ₃ BO ₃	2.860
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.810
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
NaMoO ₄ .H ₂ O	0.391
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
Ca (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049

Katı BG11 besiyeri hazırlanırken ayrı kaplarda 2xBG11 ve 2x %1(w/v) distile suda çözülmüş agar (Oxoid) ayrı ayrı 121⁰C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra birbirine karıştırıldı. Sıcaklık su banyosunda 50⁰C'ye düşürüldükten sonra gerekli antibiyotikler ilave edilip besiyeri steril plastik petrilere veya tüplere döküldü.

E.coli suşlarının üretimi için kültür ortamı olarak 2xYT besiyeri (Bankier ve ark., 1987) ve Luria-Bertani (LB) (Maniatis ve ark., 1982) besiyerleri kullanıldı. Sıvı besiyerindeki *E.coli* suşları inkübatörde 250 rpm çalkalama hızında 37⁰C'de gelişimini tamamladıktan sonra +4⁰C'de muhafaza edildi. *E.coli* suşlarının üretimi için kullanılan 2xYT (Bankier ve ark., 1987) ve Luria-Bertani (Maniatis ve ark., 1982) besiyerlerinin içerikleri aşağıdaki gibidir.

İçerik	2xYT Besiyeri	LB Besiyeri
Tripton	10 gr.	10 gr.
Maya Özütü	10 gr.	5 gr.
NaCl	5 gr.	10 gr.
Oxoid Agar	%1.5	%1.5

Besiyeri içerikleri eritildikten sonra besiyerlerinin pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Katı besiyeri hazırlanırken %1.5 agar, pH ayarlandıktan sonra besiyerine ilave edildi. Besiyerleri 121⁰C'de 15 dk. otoklavlandı, sıcaklık su banyosunda 50⁰C'ye düşürüldükten sonra gerekli antibiyotikler ilave edilerek steril petrilere ve tüplere döküldü. Sıvı besiyerleri ise 50 ml'lik hacimlerde 200 ml'lik erlenlerde otoklavlandıktan sonra kullanıma hazır hale geldi.

SOC Besiyeri

SOC besiyeri rekombinant vektörün alıcı hücreye transferinden sonra fenotipik ekspresyona izin vermek için bir süre üretildiği besiyeridir.

Kimyasal	Miktar
Bacto tripton	2 gr.
Bacto Maya Özütü	0.5 gr.
1 M NaCl	1 ml.
1 M KCL	0.25 ml.
2 M Mg ⁺² stok	1 ml
2 M Glukoz	1 ml

Tripton, maya özütü, 1 M NaCl, 1 M KCl distile su ile 97 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Oda sıcaklığına geldiğinde filtre ile sterilize edilmiş 2 M Mg⁺² ve 2 M glukoz (her birinin son konsantrasyonu 20 mM) ilave edildi ve besiyeri karışımı filtre ile sterillendi. Bu besiyerinin pH'sı 7 olmalıdır.

2 M Mg⁺² Stok

Mg Cl ₂	20.33 gr.
Mg SO ₄	24.65 gr.

Bu miktarlar distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve filtre sterilizasyonu yapıldı.

2.4. Antibiyotik Stoklarının Hazırlanması ve Saklanması

E. coli için antibiyotikler Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından belirtilen konsantrasyonda kullanıldı.

Antibiyotikler	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon
Ampisilin	25 mg/ml	50 µg/ml
Spektinomisin	5 mg/ml	50 µg/ml

Stoklar filtre ile steril edilerek -20⁰C'de saklandı.

2.5. *E. coli*'den Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu

E. coli'den küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu için kullanılan metotlardan biri alkali lizizdir (Maniatis ve ark.,1982). Bu yöntem şu şekilde uygulandı:

Kullanılan Çözeltiler

Çözelti I	Miktar
Glukoz	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH:8)	25 mM

Çözelti II	Miktar
NaOH	0.2 M
SDS	%1(w/v)

Çözelti III	Miktar
Potasyum asetat 5 M	60 ml
Glasiyel asetik asit	11.5 ml
Distile su	25.5 ml

Çözelti III'ün pH'sı 4.8'e ayarlandı.

10 ml'lik 2xYT veya LB besiyerinde inoküle edilen tek bir koloni çalkalayıcı bir inkübatörde 250 rpm'de 37⁰C'de gece boyu üremeye bırakıldı. Gerekli antibiyotikler besiyerine ilave edildi. Gece boyu üreyen hücreler 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne transfer edilerek 12000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerdeki besiyeri çökeltiden uzaklaştırıldıktan sonra içine 5 mg ml⁻¹ lizozim eklenmiş 150 µl çözelti I ile çökelti süspanse edildi ve buzda 5 dk bekletildi. Daha sonra 200 µl çözelti II ilave edildi ve içerik 4-5 defa altüst edilerek karıştırıldı ve buzda 5 dk bekletildi. Ardından 150 µl çözelti III ilave edilip hafifçe vortekslendikten sonra buzda 5 dk bekletildi. 12000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım steril tüpe alınarak fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) uygulandı ve etanolde çöktürüldü (bakınız Bölüm 2.9), alkol uzaklaştırıldı ve %70'lik alkolle yıkandı ardından 12000 x g'de 5 dk. santifürüj edildi ve alkol uzaklaştırılarak DNA desikatörde 30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 30 µl TE'de çözüldü ve -20⁰C'de saklandı.

Bu yöntemden farklı olarak Promega tarafından sağlanan Wizard Plus Minipreps DNA purification System kit ile de plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu uygulama için gece boyu üreyen kültürlerden 1.5 ml alınarak Eppendorf tüplere nakledildi ve 10.000 x g'de 2 dk santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökelti 200µl resüpsansiyon solüsyonu ile süspanse edildi ve üzerine 200 µl lizis solüsyonu ilave edilerek dört kez altüst edildi. Daha sonra bu karışıma 200 µl nötralizasyon solüsyonu eklenerek dört kez altüst edildi ve 10.000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlemler devam ederken temiz bir şırınganın pompa kısmı çıkarılarak içine 1 ml resin

ilave edildi ve üzerine santrifüj sonrası sıvı kısım eklendi. Bu esnada şırınganın ucunda minikolon takılı durumdaydı, bu işlemlerden sonra şırınganın pompası takılarak içerisindeki sıvının minikolondan geçişi sağlandı. Daha sonra önce minikolon sonra şırınganın pompası çıkarıldı ve 2 ml kolon yıkama solusyonu ilave edildi ve minikolon takılarak içindeki sıvının kolondan geçişi sağlandı. Daha sonra minikolon temiz bir Eppendorfa nakledildi ve 10.000 x g'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra minikolon yeni bir Eppendorf tüpüne nakledilerek üst açıklığından 50 µl steril çift distile H₂O eklendi ve 2 dk beklemeden sonra 10.000 x g'de 20 sn santrifüj edildi. Sıvı kısım plazmit DNA stoku olarak kullanıldı.

2.6. DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi

DNA miktarının belirlenmesinde spektrofometrik yöntem kullanıldı (Maniatis ve ark., 1982). 1 OD biriminin 50 µg/ml DNA'ya karşılık gelmesinden hareketle stokların 260 nm'deki OD değerleri kullanılarak DNA miktarı hesaplandı. 260 nm'deki OD değerininin 280 nm'deki değere oranınının 1.8 olması DNA stoklarının saf olduğunu göstermektedir.

2.7. Restriksiyon Endonükleaz Uygulaması

Restriksiyon endonükleaz uygulanırken belli bir miktar DNA alınıp 1/10 hacim ilgili enzim tamponu, 1/10 hacim spermidin (Stok 40 mg ml⁻¹) ve uygun hacime tamamlanacak şekilde saf su ilave edildi. Önerilen miktarda enzim ilave edilerek enzim aktivitesi için uygun sıcaklıkta su banyosunda iki saat boyunca kesildi. Daha sonra fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) uygulandı ve etanolde çöktürüldü. 20 µl'lik tipik bir restriksiyon endonükleaz reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlandı.

Hedef DNA	10 µl
Spermidin	2 µl
10X Enzim Tamponu	2 µl
Enzim	2 µl
Su	4 µl
Toplam	20 µl

2.8. DNA'ya Alkalen Fosfataz Uygulaması

Alkalen Fosfataz uygulamasındaki amaç endonükleaz ile kesilmiş plazmid DNA'sının 5' fosfat uçlarının koparılmasını sağlamak ve böylece vektörün tekrar kendi üzerine bağlanıp halkasal yapı oluşturulmasının yani self ligasyonunun engellenmesidir.

Toplam 20 µl hacimlik bir karışıma 2.5 µl 10 x tampon çözeltisi ve 2 µl CIAP (Dana bağırsak alkalen fosfataz) ilave edildi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 2 µl daha CIAP ilave edilip 30 dk 37°C de inkübe edildi. Ardından fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) uygulaması ve etanol çöktürmesi yapıldı. Bu DNA, ligasyon reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.9. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol Uygulaması ve Etanol Çöktürmesi

Bu çalışmanın amacı saf olmayan DNA örneklerinin saflandırılmasıdır. Kromozomal veya plazmit DNA örnekleri steril 1.5 ml'lik Eppendorfa alındı. DNA örnekleri eğer az miktarda ise TE tamponu ile belli bir hacime tamamlandı ve üzerine 1:1 oranında (v/v) Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklendi ve vortekslendi. 12.000 x g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst tabaka dikkatli bir şekilde yeni bir Eppendorf tüpüne alındı. 1/10 oranında 3 M sodyum asetat ve 4.5 kat mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de 15 dk ya da gece boyu bekletildi. Daha sonra 12.000 x g'de 20 dk santrifüj edildi ve alkol uzaklaştırıldı. Kalan çökelti %70'lik alkolde yıkandı ve 12.000 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra desikatörde yaklaşık 30 dakika kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruma sağlandıktan sonra DNA 30 µl TE tamponunda çözüldü ve -20°C'de saklandı (Maniatis ve ark., 1982).

2.10. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentlerini ayırmak için uygulanan bir yöntemdir. Bu işlem için %0.7'lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jel hazırlanırken 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) stoktan elde edilen 1 x TBE tamponu kullanıldı.

10 x TBE

İçerik	Miktar
Tris baz	108 gr.
Borikasit	55 gr.
0.5MEDTA (pH:8)	40 µl

Bu miktarda kimyasal 1000 ml’de çözüldü otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

2.10.1. Agaroz Jel Hazırlanması

0.35 gr agaroz, 50 ml 1 x TBE tamponu içinde alev üzerinde tamamen berrak bir görüntü elde edinceye kadar ısıtıldı. Sıcaklık 50⁰C’ye düşünce 2.5 µl etidyum bromid (Stok konsantrasyon 10 µg/ml, son konsantrasyon 0.5 µg/ml) ilave edilip taraklı elektroforez tablasına döküldükten sonra soğumaya bırakıldı. Jel soğuduktan sonra içinde 1 x TBE tamponu bulunan elektroforez set içine yerleştirildikten sonra taraklar çıkarıldı. DNA örneklerine 1/10 oranında yükleme tamponu (%0.25 ksilensiyanol, %0.25 bromofenol mavisi ve % 40 sükroz) ilave edildi. DNA örnekleri jeldeki oyuklara yüklendikten sonra 70-80 mA’de 2-3 saat yürütüldü.

2.11. DNA’nın Agaroz Jelde Gözlenmesi

Etidyum bromid ile boyanan DNA Vilber Lourmat marka bir transillüminatör kullanarak UV (ultravirole) ışık altında gözlendi (Maniatis ve ark., 1982). DNA bantlarının fotoğrafları UVI model görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

2.12. Agaroz Jel ve Çözeltiden DNA İzolasyonu

Çözeltiden ve agaroz jelden DNA izolasyonu BIO 101 Gene Clean II Kit (QBIAGEN) kullanarak gerçekleştirildi. Agaroz jelden izalasyon yapılırken jel üzerindeki istenilen bantlar DNA’daki kırılmaları engellemek amacıyla %70 yoğunluktaki UV ışığı altında belirlenerek kesilip 1.5 ml’lik eppendorf tüplerine alındı. Her bir tüpteki jel ağırlıkların 0.4 g’ın altında olmasına dikkat edilerek üzerlerine Gene Clean II kitinde önerildiği gibi

½ hacim TBE modifier eklendi ve 2.5 hacim NaI ilave edilerek 55°C'deki su banyosunda jel eriyene kadar yaklaşık 5 dk bekletildi. Üzerlerine 10 µl glassmilk adı verilen DNA'nın tutunabileceği cam parçacıkları ilave edildi. Dakikada bir alt üst edilerek 5 dk bekletildi. Daha sonra 15.000 x g'de santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kalan çökelti dikkatli bir şekilde kitin bir parçası olan 'new wash' ile üç kez yıkandı ve her seferinde 15.000 x g'de 5 sn santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kalan çökelti kurutulduktan sonra 10 µl TE tamponu ilave edilerek 55°C su banyosunda 2-5 dk bekletilerek DNA'nın tampona karışması için çökeltinin erimesi sağlandı. 15.000 x g'de 30 sn santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı DNA çözeltisi olarak yeni bir eppendorf tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

Agaroz jelden farklı olarak çözüldü DNA izole edilirken TBE modifier ilave edilmeden doğrudan NaI basamağına geçildi ve işleme yukarıda anlatıldığı gibi devam edildi.

2.13. Uç Doldurma

Tek zincirli uçlara sahip olan DNA fragmentlerinin bu kısımlarının doldurularak çift zincirli hale getirilmesi gerekir. Bu nedenle T₄ DNA polimeraz kullanılarak 5'-3' yönünde sentez gerçekleştirerek 3' yapışkan uçları dolduruldu. Bu işlem için ilgili DNA fragmentine 2 µl sentez tamponu ve 1µl T4 DNA Polimeraz ilave edilerek 37°C'de bir saat bekletildi ve fenol:kloform:izoamilalkol (25:24:1) uygulandı ve etanolde çöktürüldü.

2.14. Ligasyon Reaksiyonları

T4 DNA ligaz Sigma, Fermentas ve Promega tarafından sağlandı ve önerilen miktarlarda kullanıldı. Tüm ligasyon reaksiyonları 15°C'de gece boyu gerçekleştirildi. Ligasyon şartlarını optimize edebilmek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda vektör ve DNA fragmenti kullanıldı. Aşağıda tipik bir ligasyon karışımı verilmiştir.

İçerik	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3
Vektör	4 µl	4 µl	4 µl
DNA fragmenti	10 µl	4 µl	-
10 x Ligaz tamponu	3 µl	3 µl	3 µl
PEG (% 5) (Kör uç ligasyonunda)	3 µl	3 µl	3 µl
T4 DNA ligaz	2 µl	2 µl	2 µl
Su	8 µl	14 µl	18 µl
Toplam	30 µl	30 µl	30 µl

2.15. Alıcı (Kompotent) Hücre Oluşturma

Katı besiyerinde üreyen *E.coli* hücrelerinden tek bir koloni alınarak 10 ml'lik sıvı besiyerine ekildi ve 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm'de gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi gün üremeye bırakılan bu kültürden 500 µl kültür alınarak 50 ml'lik sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 250 rpm'de üremeye bırakıldı. Belli aralıkta orta logaritmik fazı belirlemek için 595 nm'de absorbans değeri 0.4-0.6 oluncaya kadar üretmeye devam edildi. Kültür bu değere ulaştığında soğutulmuş steril santrifüj tüplerine alınarak 20 dk. buz içinde bekletildi. Bu sürenin sonunda 5500 x g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökelti 10 ml 0.1 M MgSO₄ çözeltisinde süspanse edilerek 10 dk aynı şartlarda santrifüj edildi. Santrifüjden sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı ve tekrar 10 ml 0.1 M MgSO₄ içinde çözülen hücreler 20 dk buz içinde bekletildikten sonra santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 10 ml 0.1 M CaCl₂ içinde süspanse edildi ve 10 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökelti tekrar 10 ml. CaCl₂ içinde süspanse edilerek buz içinde 20 dk bekletildi. Aynı koşullarda 10 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı. Sonra hücreler 1 ml 0.1 M CaCl₂ içinde çözüldü ve buz içinde 1 saat bekletildi (Maniatis ve ark., 1982).

2.16. *E. coli* İçine Plazmid DNA Transformasyonu

Bir saat boyunca buzda bekletilen alıcı hücrelerden 100'er µl alınarak eppendorf tüplere konuldu. İlgili plazmit DNA'dan tüplere eklendi ve alıcı hücrelere transfer edilecek plazmit DNA'nın ortama homojen şekilde yayılması için tüpler hafifçe karıştırıldı. Bu karışım buz içinde 45 dk bekletildikten sonra 42⁰C'lik su banyosunda 2 dk boyunca sıcaklık şokuna tabi tutuldu. Transformasyon karışımı buz içinde birkaç dakika bekletildi. Rekombinant vektörün alıcı hücreye transferinden sonra fenotipik ekspresyona izin vermek için antibiyotiksiz ortamda (SOC besiyeri) bir süre üretildi. Daha sonra uygun antibiyotik içeren 2xYT veya LB katı besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilerek 37⁰C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı (Maniatis ve ark., 1982).

2.17. Enzim Analizleri için Süpernatant Hazırlanması

Synechococcus sp. PCC7942 hücrelerinden enzim denemeleri için gerekli süpernatant Schaeffer ve Stanier (1978) tarafından tanımlanan metoda göre hazırlandı. Süpernatant preparasyonu için tampon A kullanıldı. Tampon A; 0.05 M tris-malat, %0.1 (v/v) β-merkaptöetanol ve 0.01 M glukoz-6-fosfat kullanılarak hazırlandı. PH, 0.5 M'lık malaik asit kullanılarak 6.5'a ayarlandı.

Taze hazırlanmış *Synechococcus* sp. PCC7942 kültürü steril santrifüj tüplerine nakledildi. 15.000 x g'de 4⁰C'de 10 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. ökelti taze hazırlanmış 40 ml tampon A içinde süspanse edildi ve 15.000 x g'de 4⁰C'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki defa tekrarlandı. Kalan ökelti 4.5 ml tampon A içinde çözüldü ve sonikatörde parçalanmak üzere farklı tüplere alındı. Çözelti yirmi defa 30 saniye süreyle 15 mikronluk ses dalgasına tabi tutularak hücre duvarı ve hücre zarının parçalanması sağlandı ve mikroskopik inceleme ile hücrelerin parçalanma oranları gözlemlendi. Parçalanan hücre süspansiyonu Eppendorf tüplerine alındı ve 45.000 x g'de 30 dk santrifüj edilerek membran parçaları uzaklaştırıldı. Sıvı kısım dikkatli bir şekilde steril bir Eppendorf tüpe alındı. Kalan ökelti 1 ml tampon A içinde çözüldü tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi ve sıvı kısım steril bir Eppendorf tüpe alındı. Süpernatant G6PDH enzim çözeltisi olarak kullanıldı.

2.18. G6PDH Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Synechococcus sp. PCC7942 G6PDH enzim aktivitesinin takibi Schaeffer ve Stanier (1978) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirildi. Bu metoda göre test tamponu (tampon D) pH 7.4 tris-malat tamponuna, %0.1 (v/v) β -merkaptöetanol ve 10 mM $MgSO_4$ ilave edilerek hazırlandı.

Kör tüp ve test tüpünün içeriği aşağıdaki gibidir.

Tüp içeriği	Test	Kör
Tampon D	770 μ l	800 μ l
NADP ⁺ (50 mM)	30 μ l	-
Enzim çözeltisi	50 μ l	50 μ l
G6P (100 mM)	150 μ l	150 μ l

340 nm'de 5 dakika boyunca absorbans değişimi takip edildi. Son absorbans ölçümüyle ilk absorbans ölçümü arasındaki fark toplam absorbans olarak, toplam absorbansın toplam süreye oranı ise Δ_{rate} olarak alındı. 1 dakikada 1 μ mol ürün oluşumunun katalizlenmesi bir enzim aktivite ünitesi olarak tanımlandı. Bir mg proteine denk gelen enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak hesaplandı.

2.19. Protein Miktar Tayini

Protein miktarının tayininde Micro Protein 1 Kit (Sigma Diagnostic) kullanıldı. Standart eğri oluşturmak için, 5 mg ml^{-1} BSA (bovin serum albumin) stokundan seri sulandırmalar yapılarak 595 nm'deki absorbans değerleri belirlenerek standart grafik oluşturuldu. Belli bir karışımdaki protein miktarını belirlemek için aşağıdaki karışım hazırlanarak 595 nm' deki absorbans değeri standart eğri ile karşılaştırılarak protein miktarı belirlendi.

Tüp içeriği	Test	Kör
Tampon A	-	100
Enzim	100	-
Protein Dye Reagent	200	200
Su	700	700

2.20. Enzim Çözeltisine Ditiotreitol (DTT) Uygulanması

Enzim aktivitesine DTT' nin etkisini belirlemek üzere bu uygulama yapıldı. 5 mM, 25 mM ve 50 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda DTT ile çalışıldı. Belli miktardaki enzim çözeltisine sırasıyla farklı konsantrasyonda DTT ilave edildi ve tüp karıştırıldı. DTT ilavesi yapıldığı andan itibaren belli aralıklarla ölçüm yapıldı. Absorbans değişimleri 340 nm'de 5 dk boyunca takip edildi. Test tüpünün içeriği aşağıda verilmiştir.

İçerik	Test	Kör
Tampon D	770 µl	820 µl
Enzim+DTT	50 µl	-
G6P	150 µl	150 µl
NADP ⁺	30 µl	30 µl

2.21. Oligonükleotit-yönlendirilmiş Mutasyon için Kalıp DNA izolasyonu

Plazmit pSG11 kalıcı olarak denatüre edildikten sonra kalıp DNA olarak kullanıldı. Kalıp DNA denatürasyonu için öncelikle pSG11'in miktarı elektroforez yöntemiyle 620.3 ng/µl olarak belirlendi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

İçerik	Miktar
PSG11	3.5 µl
2 M NaOH, 2 mM EDTA	2 µl
Su	14.5 µl

Reaksiyon karışımı beş dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 µl 2 M amonyum asetat ilave edilerek karıştırıldıktan sonra 75 µl mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de gece boyu bekletildi. Sonra 15.000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırıldı ve 200 µl %70 alkol ilave edildi ve 15.000 x g'de 15 dk santrifüj edildi ve alkol uzaklaştırılarak kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra 100 µl TE'de çözüldü.

2.22. Oligonükleotitlerin Fosforlanması

Bu işlemde için IDT firması tarafından sağlanan oligonükleotit zwfn fosforlandı. T₄ polinükleotit kinaz Promega tarafından sağlandı. Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

İçerik	Miktar
zwfn Oligonükleotit	1.5 µl
10 x kinaz tamponu	2.5 µl
T ₄ polinükleotit kinaz	1 µl
10 mM ATP	2.5 µl
Su	17.5 µl

Reaksiyon 37°C'de 30 dakika devam etti. Reaksiyon karışımı enzimin inaktive edilmesi için 10 dk boyunca 70°C'de bekletildi.

2.23. Mutageniz İşlemleri

Kalıp DNA'nın denatürasyonu ve oligonükleotitin fosforlanması tamamlandıktan sonra mutageniz reaksiyonları başlatıldı. Bu işlemler için Promega Altered Sites II in vitro Mutagenesis System kit kullanıldı. Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

Mutagenез Reaksiyonu

İçerik	Miktar
Kalıp DNA pSG11 (0.008pmol)	10 µl
Oligo zwfn	1 µl
10 x annealing tamponu	2 µl
Su	7 µl

Reaksiyon karışımı 75°C'de 5 dakika bekletildi ve reaksiyon tüpleri 75°C su içeren 500 ml'lik bir behere alındı. Sıcaklığın dakikada bir derece azalarak 45°C'ye inmesi sağlandıktan sonra beher buz üzerine alınarak içindeki suyun oda sıcaklığına inmesi sağlandı. Bu işlemlerden sonra oda sıcaklığına inen reaksiyon karışımları ile sentez reaksiyonlarına devam edildi. Sentez reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

İçerik	Miktar
Reaksiyon karışımı	20 µl
Sentez Tamponu	3 µl
T4 DNA polimeraz	1 µl
T4 DNA ligaz	1 µl
Su	5 µl

Sentez reaksiyon karışımları 90 dk 37°C'de bekletildikten sonra tamir mekanizması mutant *E. coli* ES1301 alıcı hücrelerine transformasyon ile nakledildi. Gece boyunca üremeye bırakılan hücrelerden DNA izolasyonu yapılarak *E. coli* JM109 alıcı hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

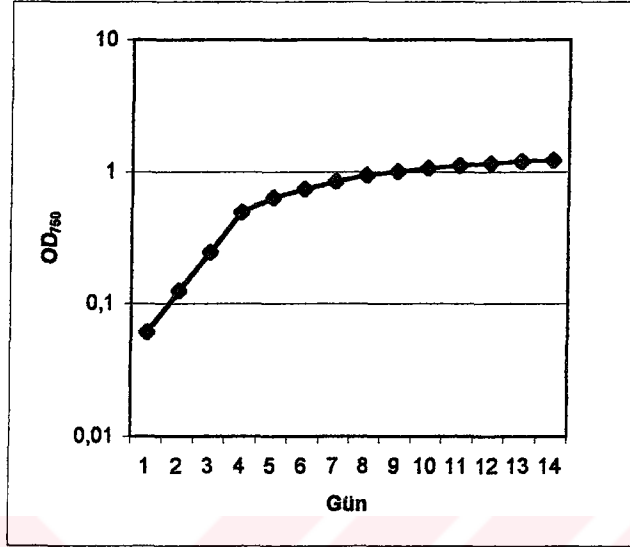
3.1. *Synechococcus* sp. PCC7942 Hücrelerinin Üretilmesi ve Gelişmesinin İzlenmesi

Pasteur Kültür Koleksiyonundan (PCC) sağlanan *Synechococcus* sp. PCC7942 hücreleri BG11 katı besiyerinde doğal fotoperiyotta oda sıcaklığında üretildi. Sonra 50 ml'lik erlenler içindeki 25 ml sıvı BG11 besiyerine nakledilerek azaltılmış ışık altında oda sıcaklığında ve doğal fotoperiyotta üretildi. Bu kültürler stok kültür olarak kullanıldı. Stok kültürlerden 100 ml BG11 besiyerlerine transfer edilen hücreler üremeye bırakıldı. İlk inokülasyon sonrası kültürlerin optik yoğunluğu 0.040 ila 0.080 civarına ayarlandı. Sonra 1,452 joul m⁻² ışık yoğunluğunda 28°C'de üremeye bırakıldı. Yeterli homojenite sağlanması amacıyla 120 rpm hızda çalkalandı. On beş gün süreyle üremelerine izin verildi. Bu kültürler stok sıvı kültürler olarak kullanıldı. Stok kültürlerden belli bir miktar hücre, sürekli havalandırılan 1lt veya 500 ml'lik sıvı BG11 besiyerlerine transfer edildi ve 3.059 joul m⁻² ışık şiddetinde üremeye bırakıldı. Kültür yoğunlukları 24 saat arayla spektrofotometrik olarak izlendi. Elde edilen 750 nm'deki optik yoğunluk değerleri kullanılarak gelişme eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.1).

Gelişme eğrisinin incelenmesi sonucunda kültürün tanımlanan şartlar altında 7 gün civarında durgunluk evresine geçtiği gözlenmektedir. Siyanobakteriyel G6PDH enziminin aktivitesinin logaritmik fazdan durgunluk fazına geçerken önemli oranda arttığı bilinmektedir (Broedel ve Wolf, 1991). Geçiş fazının 750 nm'deki optik yoğunluğunun yaklaşık 1.000 olduğu kabul edildi. Enzim çözeltisi elde etmek üzere kullanılacak 1 lt'lik kültürler bu verilerin ışığında uygun evreye kadar üremeye bırakıldı. 1 lt'lik kültürlerin 0.5 lt'lik kültürlere göre bu evreye daha yavaş ulaştıkları gözlemlendi. Küçük kültürlerin 10. günde bu yoğunluğa ulaşmasına rağmen büyük kültürlerin 13. günde geçiş fazına ulaşabildiği gözlemlendi. Bunun olası nedeni büyük kültürlerde kültürün iç kısımlarına ulaşan ışığın daha fazla engellenmesidir.

Enzim çözeltisi olarak kullanılacak süpernatant eldesi için kullanılacak hücreler 1 litrelik kültürler olarak üretildi. Yeterli CO₂ dönüşümünü sağlamak amacıyla bir pompa yardımıyla kültür içine hava pompalandı. Hava 45 µm por çapında filtreden geçirilerek sterillenmesi sağlandı. Bu kültürler 3.059 joul m⁻² ışık şiddetinde optik

yoğunluk 1.000 civarına gelene kadar üremeye bırakıldı. Bu kültürler süpernatant elde etmek üzere kullanıldı.



Şekil 3.1. *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinin gelişme eğrisi. Optik yoğunluk logaritmik olarak gösterilmiştir. Ölçümler her 24 saatte bir gerçekleştirilmiştir. Kültür yoğunlukları 750 nm'deki absorpsiyon değeri olarak belirlenmiştir.

3.2. Yabani tip *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinde DTT'nin G6PDH Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

Yapılan bir çok araştırmada G6PDH aktivitesinin indirgenme/yükseltgenme yoluyla düzenlenebileceğini destekleyen sonuçlara ulaşılmıştır (Anderson ve ark., 1978; Cossar ve ark., 1984; Udvardy ve ark., 1984). Enzim karanlıkta okside formda ve aktif durumdadır. Işık periyodunda ise enzim deaktive durumdadır. Bu şartlar altında enzimin indirgenmediği ve buna bağlı olarak aktivitenin hızla azaldığı ileri sürülmektedir. İndirgenmenin enzimin yapısında bulunan sistein amino asitleri arasında oluşmuş olan disülfid bağlarının yıkılmasıyla gerçekleştiğini destekleyen veriler mevcuttur (bakınız, Bölüm 1.5.3). *In vivo*'da indirgeyici güç fotosentetik sistemden sağlanır. İndirgeyici elektronlar fotosistem I'de üretilir, ancak doğrudan enzime aktarılamaz. Bu elektronlar özel bir mekanizma ile tioredoksine aktarılır; indirgenmiş tioredoksinin elektronu enzim yapısındaki disülfid bağlarının indirgenmesinde kullanılır. Böylece fotosentez devam

ederken OPP döngüsünün ilk enzimi inaktive edilerek gereksiz karbonhidrat yıkımı engellenmiş olur. In vitro'da diğer indirgeyici ajanlar disülfid bağlarının indirgenmesi amacıyla kullanılabilir. Bu ajanlardan en etkili ve kullanışlı olanı ditioneitol (DTT)'dür ve spesifik olarak disülfid bağlarının indirgenmesini sağlar.

Siyanobakteriyel suşların bazılarında farklı saflıktaki enzim çözeltileri kullanılarak DTT'nin G6PDH aktivitesine etkisi daha önce incelenmiştir. *Anabaena variabilis* hücrelerinde yapılan çalışmalarda 25mM DTT'nin enzim aktivitesini 15 dk süre sonunda %96 oranında azalttığı belirlenmiştir (Udvardy ve ark., 1984). Yine tek hücreli ve *Synechococcus* suşlarına yakın akraba olan *Anacystis nidulans* hücrelerinde 5mM DTT'nin enzim aktivitesini 15 dk. sonunda %53 oranında azalttığı gözlenmiştir. Saf enzim çözeltilerinde bu etkinin gözlenmemiş olması, kısmi saflandırılmış veya süpernatant şeklindeki enzim çözeltilerindeki tioredoksinin DTT'den enzime elektron taşınmasında aracılık ettiğini göstermektedir. Bu veriler göz önünde bulundurularak *Synechococcus* sp. PCC7942 suşunun G6PDH enziminin aktivitesine DTT'nin etkisi incelenmiştir. Bu ön çalışmalar sonucunda, karanlık/ışık ve ışık/karanlık geçişlerinde enzim aktivitesinin düzenlenmesinde disülfid bağlarının rol oynayabileceği hipotezinin bu suшта da desteklenip desteklenmediği anlaşılacaktır.

Çalışma için öncelikle üssel gelişme fazının sonlarına kadar (13. gün, OD₇₅₀ 1.000) 1 lt'lik kültür şeklinde *Synechococcus* sp. PCC7942 hücreleri üretildi (bakınız, Bölüm 3.1). Bu kültürden elde edilen hücreler sonikasyonla parçalanarak 45.000 g'de döndürüldü ve elde edilen 6 ml süpernatant enzim çözeltisi olarak kullanıldı (Bakınız, Bölüm 2.17). Protein miktarı daha önce anlatıldığı gibi tayin edildi (Bölüm 2.19). Süpernatant protein miktarının 15 mg ml⁻¹ olduğu belirlendi. Enzim aktivitesi NADP indirgenmesinin spektrofotometrik takibi ile belirlendi. 340 nm'de 5 dakika boyunca 30 saniyede bir absorbans okundu ve değerlerin doğrusal bir dağılım gösterip göstermediği kontrol edildi. Doğrusal değişimin gözlemlendiği belirlendikten sonra dakikadaki toplam absorbans değişimi belirlendi ve Δ-oran (rate) (Δ-absorbans dk⁻¹) olarak alındı. Bu Δ-oran aktivite ünitesinin hesaplanmasında kullanıldı. (Bölüm 2.18). Aşağıdaki formül uygulanarak aktivite ünite sayısı belirlendi, aktivite ünite sayısı spesifik aktivitenin belirlenmesi için kullanıldı.

$$\text{Aktivite ünitesi (mMol dk}^{-1}\text{ml}^{-1}) = \frac{\text{Rate}(\Delta\text{Adak}^{-1})}{\text{NADP}^+ \text{EmMol}(6.22)} \times 20$$

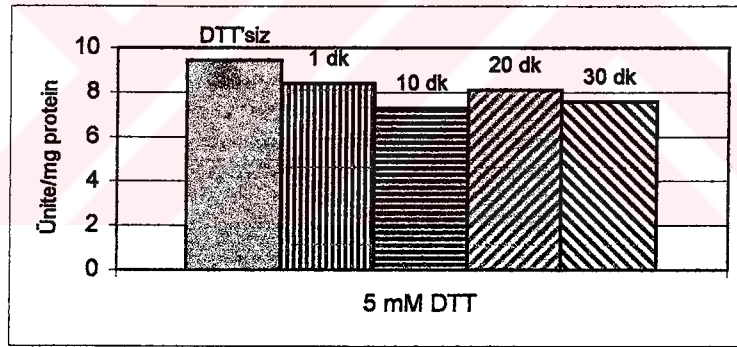
Aktivite ölçümü Bölüm 2.18'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzim çözeltisi içinde mevcut olabilecek olan okside formdaki NADP'den kaynaklanan aktiviteyi belirlemek için NADP içermeyen bir reaksiyon karışımı hazırlanarak 5 dk. boyunca absorbands izlendi. Yapılan gözlemlerde bir absorbands değişimi gözlenemedi. Dolayısıyla normal reaksiyon karışımlarında gözlenen absorbands değişiminin tamamı aktivitenin belirlenmesinde kullanıldı. Aktivite ölçümünde reaksiyon NADP eklenmesiyle başlatıldı ve 30 sn. ara ile 5 dk. boyunca absorbands değişimi takip edildi. Sonra Δ -oran değeri hesaplandı. Her reaksiyon üç defa tekrarlandı ve değerlerin istatistiksel ortalamaları alındı (Tablo 3.1). DTT uygulamaksızın yapılan ölçümlerde ortalama enzim aktivitesi 9.44 ünite/mg protein olarak belirlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Farklı DTT konsantrasyonlarında zamana bağlı olarak G6PDH aktivitesinde meydana gelen değişim.

DTT miktarı	DTT Uygulama zamanı (dk)	Ölçüm Sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
DTT yok	-	3	9,4400	0,3772	0,217
5 mM DTT	1	3	8,3967	0,5781	0,333
	10	3	7,3067	0,7600	0,438
	20	3	8,1267	0,4619	0,266
	30	3	7,5767	0,8784	0,507
25 mM DTT	1	3	8,3300	1,0368	0,598
	10	3	6,3333	0,4163	0,240
	20	3	5,7067	0,7332	0,423
	30	3	5,6000	0,3464	0,200
50 mM DTT	1	3	9,1067	0,8429	0,486
	10	3	6,7767	0,3656	0,211
	20	3	5,8400	0,0346	0,019
	30	3	4,5967	0,2902	0,167

Normal enzim aktivitesi belirlendikten sonra DTT'nin aktiviteye etkisini belirlemek için bir seri deneme gerçekleştirildi. Öncelikle uygulanacak DTT miktarı ve süreleri kararlaştırıldı. *Anacystis nidulans*'da yapılan denemelerde saf enzim çözeltisine 30 dk boyunca tioredoksinle beraber 5 mM DTT uygulanmıştır (Udvardy ve ark., 1984). *Anabaena variabilis*'de ise 10 ila 12 dk boyunca 25mM DTT'nin etkisi süpernatantlarda incelenmiştir (Cossar ve ark., 1984). Bu araştırmalar göz önünde bulundurularak 5 mM, 25 mM ve 50 mM DTT konsantrasyonları denendi. Her konsantrasyonun etkisi 1., 10., 20. ve 30. dakikalarda aktivite ölçülerek belirlendi.

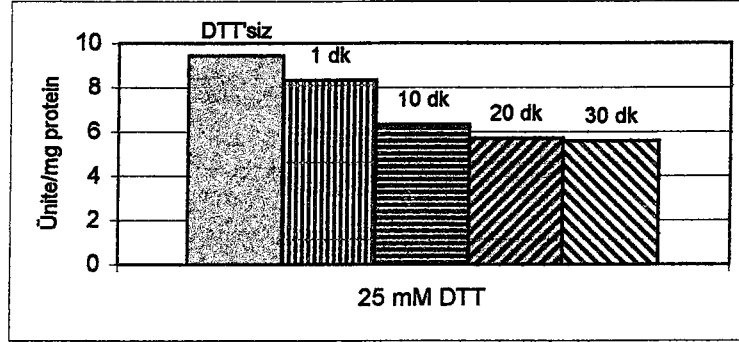
5 mM DTT uygulanan enzim çözeltilerinde aktivitenin 1. dakikadan 30. dakikaya doğru sırasıyla %11.02, %22.56, %13.88 ve %19.7 oranında azaldığı görülmektedir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.2). Görüldüğü gibi bu konsantrasyonda DTT'nin enzim aktivitesine etkisi çok fazla değildir. Ayrıca zamana bağlı olarak düzenli bir düşüşün de gerçekleşmediği görülmektedir. Dolayısıyla 5 mM DTT enzim aktivitesini önemli oranda etkilememiştir.



Şekil 3.2. 5 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi. İlk sütunda DTT uygulanmamış enzim aktivitesi görülmektedir. Diğerleri sırasıyla 1., 10., 20. ve 30. dakikalardaki enzim aktivitelere aittir.

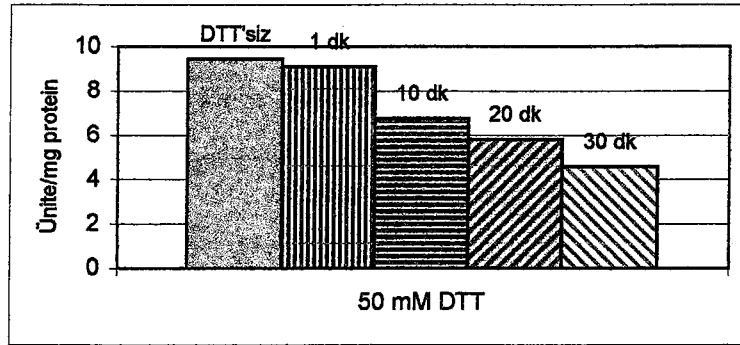
25 mM DTT uygulamasında zamana bağlı aktivite azalma oranları sırasıyla %11.76, %32.94, %39.51 ve %40.68 olarak belirlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.3). Bu konsantrasyonda enzim aktivitesinin önemli oranda azaldığı görülmektedir. Azalma zamana bağlı olarak 20. dakikaya kadar hızlı bir şekilde devam etmiştir. Ancak 20. dakika ile 30. dakika arasında önemli bir değişimin olmadığı görülmektedir (değişim %1.17 kadardır). Sonuç olarak 25 mM DTT 20 dakika içinde enzim aktivitesini

yaklaşık %40 azaltmakta bu süreden daha uzun sürelerde bu konsantrasyonlarda DTT uygulaması önemli oranda etki etmemektedir.



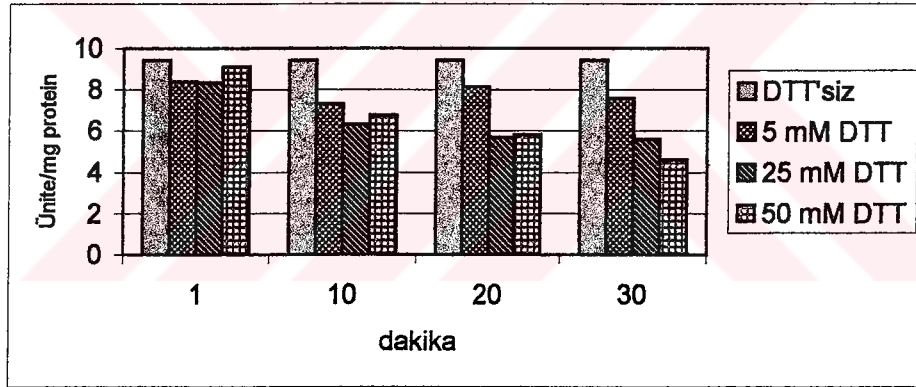
Şekil 3.3. 25 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi. İlk sütunda DTT uygulanmamış enzim aktivitesi görülmektedir. Diğerleri sırasıyla 1., 10., 20. ve 30. dakikalardaki enzim aktiviteleridir.

50 mM DTT uygulamasında ise zamana bağlı olarak sırasıyla %3.5, %28.28, %38.14 ve %51.27 oranında aktivite azalmasının gerçekleştiği gözlemlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.4). Enzim aktivitesini en fazla etkileyen konsantrasyonun 50 mM olduğu görülmektedir. Ayrıca zamana bağlı olarak aktivite azalması düzenli bir şekilde devam etmiştir. Dikkate değer bir sonuç 1. dakika değeridir. 5mM ve 25 mM konsantrasyonlara göre daha yüksek bir aktivite değeri görülmektedir. Fakat devam eden zamanlarda aktivite hızla %48.73'e düşmüştür.



Şekil 3.4. 50 mM DTT varlığında G6PDH aktivitesinin zamana bağlı değişimi. İlk sütunda DTT uygulanmamış enzim aktivitesi görülmektedir. Diğerleri sırasıyla 1., 10., 20. ve 30. dakikalardaki enzim aktiviteleridir.

Belli bir zaman aralığında farklı DTT konsantrasyonlarının enzimin aktivitesine etkisinin farklılık gösterdiği de bu verilerden ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.5). 1. dakikada DTT konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir azalma gözlenmemektedir. Bu sonuç ilk dakika içinde enzimin yeterince indirgenmediğini göstermektedir. 10. dakikada genel aktivite daha fazla azalmış olmasına rağmen konsantrasyona bağlı düzenli bir azalış görülmemektedir. Dolayısıyla 10 dakikalık süre de DTT'nin enzimi indirgemesi için yeterli görülmemektedir. 20. dakikada 5 mM ve 25 mM konsantrasyonlardan önemli bir aktivite değişimi vardır ancak 25 mM ile 50 mM arasında bir azalma ilişkisi yoktur, 50 mM konsantrasyonda bir miktar aktivite artışı gözlenmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak en düzenli aktivite azalması 30. dakikada gerçekleşmektedir. 5 mM'da spesifik aktivite 7.58, 25 mM'da 5.60 ve 50 mM'da 4.6'dır. Yüzde aktivite değerleri sırasıyla 80.3, 59,32 ve 48.73 kadardır. Görüldüğü gibi 30. dakikada DTT konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak enzim aktivitesi azalmıştır.



Şekil 3.5. Belli zaman aralıklarında farklı DTT konsantrasyonlarında G6PDH aktivitesindeki azalma. Her grubun ilk çubuğu DTT uygulanmamış enzim aktivitesini göstermektedir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde DTT'nin *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH enzim aktivitesini etkilediği görülmektedir. 5 mM DTT konsantrasyonunun önemli sayılabilecek bir etkisinin olmadığı söylenebilir. 25 mM ve 50 mM konsantrasyonların her ikisinin de enzimi önemli oranda etkilediği belirlenmişse de 50 mM DTT konsantrasyonunun daha etkili ve dengeli bir şekilde enzim aktivitesini azalttığı açıktır. En etkili DTT uygulama süresinin 30. dakika olduğu anlaşılmaktadır.

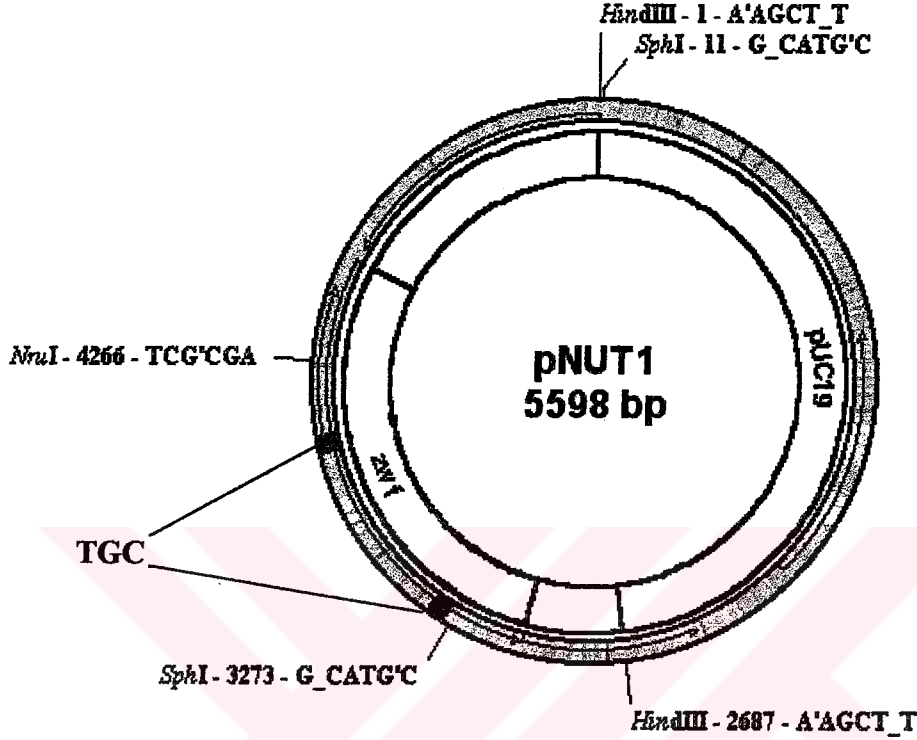
30 dakikalık DTT uygulamasında artan konsantrasyonla beraber enzim aktivitesi de azalmaktadır (Şekil 3.5).

Yukarıdaki sonuçlar *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH enziminin DTT'den etkilendiğini göstermektedir. Bu sonuç, G6PDH enziminin disülfid bağı oluşumu/yıkımı yoluyla düzenlenebileceği hipotezinin bu organizma için de geçerli olabileceğini desteklemektedir. Biyokimyasal ve fizyolojik gözlemlere dayanan bu hipotezin gerçekleştirilmesi için enzim yapısındaki sistein amino asitlerinin değiştirilmesi ve elde edilecek mutant enzimin aktivitesinde değişim olup olmadığının gösterilmesi gerekmektedir. Bunun için klonlanmış bir gen üzerinden sistein kodonlarının değiştirilmesi ve sonra bu mutant genin yabancı tip genle değiştirilmesi gerekmektedir. Bu değişimin gerçekleştirilebilmesi için en azından sistein kodonlarının bulunduğu bölgesi silinmiş *zwf* mutant bir suşa ihtiyaç vardır. Böyle bir mutant suş elde etmek üzere çalışmalar yürütüldü.

3.3. *zwf* Geni Silinmiş *Synechococcus* sp. PCC7942 Mutant Oluşturulması

Yukarıda söz edildiği gibi ışık/karanlık ve karanlık/ışık geçişlerinde sistein amino asitlerinin rolünün belirlenmesi için yapılacak araştırmalarda silinmiş *zwf* (Δzwf) mutant bir suşa ihtiyaç vardır. Böyle bir mutant, sistein kodonları değiştirilmiş *zwf* geninin *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinin genomlarına transferi için gereklidir. Böyle bir Δzwf mutant elde etmek üzere çalışmalar planlandı ve yürütüldü. Mutant eldesi için öncelikle klonlanmış bir *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmentine gereksinim vardır. Bu organizmanın *zwf* bölgesi 2.9 kb bir fragment şeklinde klonlanmış ve dizilenmiş (Scanlan ve ark., 1992) ve mutasyon çalışmaları yürütülmüştür (Scanlan ve ark., 1995). Ancak elde edilen mutasyon bir insersiyon mutasyonu olduğu için mutant gen her iki sistein kodonlarını da içermekte olup değiştirilmiş kodonların genoma nakli için kullanılabilir değildir. Bu nedenle bir silinme mutasyonunun oluşturulması gerekmektedir. Bunun için en azından iki adet sistein kodonunu da içeren genin ilgili bölgesinin uzaklaştırıldığı bir mutasyonun oluşturulması gerekmektedir. Bunun için her iki sistein kodonunun dış tarafından *zwf* geninin kesilmesi gerekmektedir. Yapılan restriksiyon analizleri gen içinde bunun için kullanışlı olan iki enzim tanıma bölgesinin olduğunu göstermektedir. Bu enzimlerden biri *NruI* ve diğeri de *SphI* enzimleridir. Bu

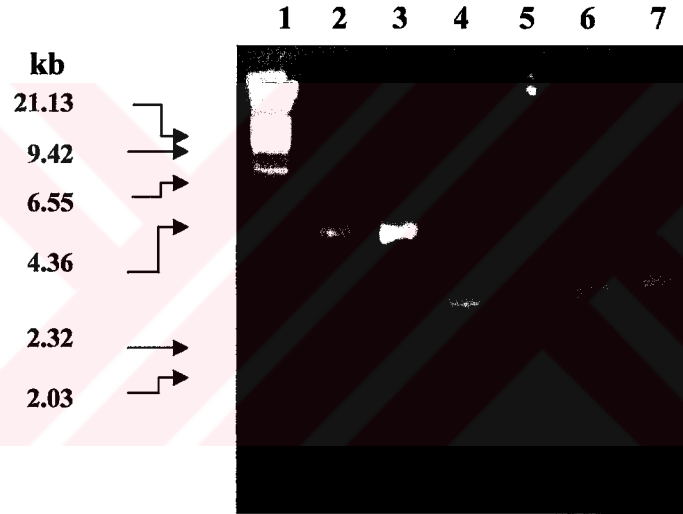
iki enzimle kesildiği takdirde *zwf* geninin sistein kodonlarını içeren kısmı hariç tutulabilecektir (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. pNUT1 plazmitinin restriksiyon haritası. İç halkada vektör ve *zwf* fragmenti ve *zwf* geninin pozisyonu görülmektedir. Dış halkada analizlerde kullanılan enzimlerin tanıma bölgeleri ve pozisyonları gösterilmiştir. Ayrıca *zwf* geninin yapısında yer alan iki adet TGC sistein kodonunun pozisyonu da gösterilmiştir.

Sadece *zwf* fragment bölgesi incelendiğinde fragment *NruI/SphI* ile kesildiğinde sistein kodonlarını taşıyan gen bölgesi uzaklaştırılabilir. Ancak bu enzimlere ait tanıma bölgesi fragmenti taşıyan vektör üzerinde bulunmaması gerekir. Yaygın kullanılan klonlama vektörlerinde bu iki enzimden en azından birinin tanıma bölgesi mevcuttur. Özellikle *SphI* tanıma bölgesi incelenen bütün klonlama vektörlerinde mevcuttur. Bu nedenle öncelikle *SphI* bölgesi taşımayan bir vektörün oluşturulması gerekmektedir. Bunun için en uygun vektör pUC serisi vektörlerden biridir. Bu vektör ailesi *NruI* tanıma bölgesine sahip değildir. Çoklu klonlama bölgesi içinde bir adet *SphI* tanıma bölgesi vardır. Eğer çoklu klonlama bölgesi içindeki *SphI* tanıma bölgesi silinirse pUC

bağlar. Ancak fragmentlerin halkasallaşmasının nispeten daha etkili bir şekilde gerçekleşiyor olması ve reaksiyon şartlarında karışımdaki tek zincirli bölgelerin çok az da olsa bir kısmının kopabildiği göz önünde bulundurularak fragment kendi kendine ligasyona zorlandı. Ligasyon karışımı alıcı *E. coli* JM109 hücrelerine transforme edildikten sonra (Bölüm 2.16) transformantlar ampisilin içeren besiyerlerinde üretildi. Elde edilen kolonilerin öncelikle dördü plazmit DNA izolasyonu (Bölüm 2.5) için üretildi. Yapılan restriksiyon endonükleaz analizleri sonucunda bu kolonilerden ikisinin taşıdığı rekombinant plazmitin *Sph*I ile kesilemediği belirlendi. Bu klonlardan biri pUC181 olarak isimlendirildi ve daha öte restriksiyon analizleri uygulandı (Bakınız Sekil 3.8).



Şekil 3.8. pUC181'in restriksiyon analizi. Yol 1 λ *Hind*III işaretleyici, yol 2 kesilmemiş pUC181, yol 3 pUC181/*Sph*I, yol 4 pUC18/*Sph*I, yol 5 kesilmemiş pUC18, yol 6 pUC181 *Hind*III ve yol 7 pUC18/*Hind*III. Sol tarafta λ *Hind*III işaretleyicilerinin büyüklükleri görülmektedir.

*Sph*I uygulanan ve uygulanmayan pUC181 aynı büyüklükte bantlar şeklinde görülmektedir (Yol 2 ve 3). Bu yollarda görülen DNA halkasal yapıyı ifade etmekte olup aynı büyüklükte görülmeleri *Sph*I enziminin pUC181'i kesmediğini göstermektedir. Yol 4'de pUC18 *Sph*I ile kesilmiştir. Oluşan bant 2.686 kb doğrusal pUC18 fragmentine denk gelmektedir. Dolayısıyla enzimin pUC18'i kestiği halde pUC181'i kesmediği sonucuna varıldı. Yol 5'de restriksiyon endonükleaz

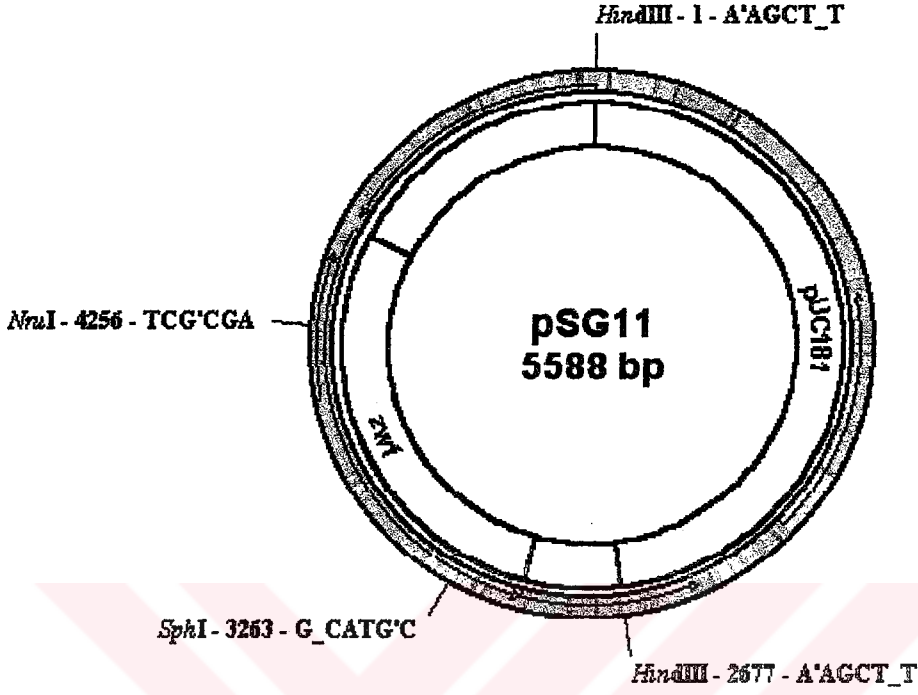
uygulanmamış pUC18 süpersarılı formda görülmektedir. Yol 6 ve 7'de pUC181 ve pUC18 her iki molekülde de bir adet tanıma bölgesine sahip *HindIII* enzimi ile kesilmiştir. Bu iki yolda birbirinin aynı büyüklükte tek bantlar görülmektedir. Bu iki bandın karşılaştırılmasıyla, pUC181'in beklenen büyüklükte bir bant oluşturduğu ve istenmeyen bir DNA kaybının veya eklenmesinin olmadığı sonucuna ulaşıldı.

SphI tanıma bölgesi silinmiş bir vektör, pUC181, elde edildikten sonra 2.9 kb *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmentinin bu vektöre nakledilmesi çalışmalarına geçildi.

3.3.2. *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* Fragmentinin pUC181 İçine Nakli

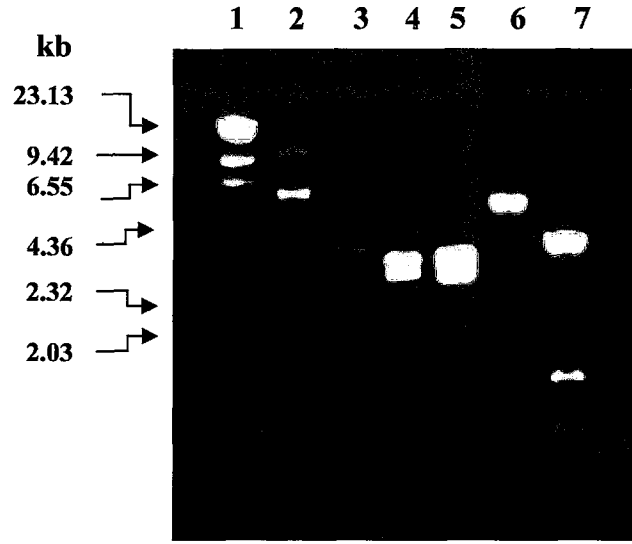
SphI bölgesi silinmiş bir vektör elde edildikten sonra, *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmentinin bu vektöre transferi çalışmaları yürütüldü. *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* geni daha önce 2.9 kb büyüklüğünde bir *HindIII* fragmenti olarak pUC19 içine klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır (Scanlan ve ark., 1992). pNUT1 ismi verilen bu klonda biri *zwf* fragmenti ve diğeri de vektörün çoklu klonlama bölgesinde olmak üzere iki *SphI* tanıma bölgesi vardır. Bu enzimle kesildiğinde fragmentin kaybedilmesi istenmeyen bir bölgesi de kaybedilmektedir (Bakınız Şekil 3.6). Bu da mutant genin genoma transferi sırasında rekombinasyon gerçekleşecek bölgenin kaybedilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle vektör üzerinde bulunan tanıma bölgesinin silinmesinden sonra *zwf* fragmentinin bu vektöre nakledilmesi gerekmektedir. Bu gerçekleştirildiği takdirde sadece *zwf* geninin silinmek istenen bölgesi, yani sistein kodonlarını taşıyan bölgesi yapıdan uzaklaştırılabilecektir. Bunu gerçekleştirmek için pNUT1'den elde edilecek *zwf* fragmentinin pUC181 vektörüne transferi çalışmaları gerçekleştirildi.

pNUT1 *HindIII* enzimi ile kesildikten ve agaroz jelde fragmentler ayrıldıktan sonra (Bölüm 2.11) 2.9 kb fragment GeneClean II kit kullanılarak saflandırıldı (Bölüm 2.12). Bu fragment yine *HindIII* enzimi ile kesilip 5' uçları defosforile edilen (Bölüm 2.8) pUC181 ile karıştırılarak ligasyon gerçekleştirildi (Bölüm 2.14). *E. coli* JM109 alıcı hücrelerine transformasyon sonrasında ampisilin içeren besiyerinde gelişen kolonilerden dördü sıvı besiyerinde üretilerek plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Yapılan ilk analizlerde kolonilerden ikisinin 2.9 kb fragmenti taşıdığı belirlendi. Bu rekombinant vektörlerden birine pSG11 ismi verildi (pSG11 halkasal haritası için bakınız Şekil 3.9) Sonra daha öte restriksiyon analizleri gerçekleştirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. pSG11'in fiziksel haritası. İç halkada vektör ve 2.9 kb *zwf* fragmenti görülmektedir. *zwf* geni de ayrıca gösterilmiştir. Dış halkada analizlerde kullanılan restriksiyon endonükleaz tanıma bölgeleri görülmektedir. Ayrıca bu bölgelerin konumları da gösterilmiştir.

Öncelikle bu klonda gerçekten tek bir *SphI* tanıma bölgesinin olup olmadığına bakıldı. Bunun için pSG11 ve pNUT1 *SphI* ile kesildi. 2.9 kb *zwf* fragmentinin pNUT1 içindeki oryantasyonu gereği 2370 bp ve 3230 bp büyüklüğünde iki fragmentin görülmesi gerekmektedir (bakınız Şekil 3.6). pSG11 içinde ise sadece bir *SphI* bölgesi olduğundan bütün rekombinant vektör doğrusallaşmış bir DNA'yı temsilen tek bir bant şeklinde görülmelidir. Agaroz jel elektroforez analizlerinde bu bulgu gerçekleşmiştir. Şekil 3.10'da Yol 2 ve 3'de sırasıyla *SphI* ile kesilmiş pSG11 ve pNUT1 görülmektedir. Yine bu iki rekombinant plazmit *HindIII* ile kesilerek her ikisinin de aynı fragmenti taşıdığı belirlenmiştir. Yol 4 ve 5'de sırasıyla *HindIII* ile kesilmiş pSG11 ve pNUT1 yürütülmüştür. 2.9 kb *zwf* fragmenti ve 2.7 kb vektör her ikisinde de aynı büyüklükte görülmektedir.



Şekil 3.10. pSG11'in restriksiyon analizi. Yol 1 λ *Hind*III işaretleyici, yol 2 pSG11/*Sph*I, yol 3 pNUT1/*Sph*I, yol 4 pSG11/*Hind*III, yol 5 pNUT1/*Hind*III, yol 6 pSG11/*Nru*I/*Sph*I ve yol 7 pNUT1/*Nru*I/*Sph*I. Sol tarafta λ /*Hind*III işaretleyicilerinin büyüklükleri görülmektedir.

Asıl amaç *zwf* geninin *Sph*I ile *Nru*I tanıma bölgesi arasındaki kısmının pSG11'den uzaklaştırılmasıdır. Bunun gerçekleştirilebilirliğinin sağlanıp sağlanmadığı pSG11'in bu iki enzim ile kesilmesiyle gözlemlendi. Eğer bu mümkün olursa 1020 bp büyüklüğünde silinmek istenen gen bölgesini temsil eden bir bant ve bir de vektör (pUC181) ve *zwf* fragmentinin silinen bölgenin her iki tarafında yer alan kısmını temsil eden 4.6 kb büyüklüğünde diğer bir fragmentin görülmesi gerekir (Şekil 3.10). Yol 6'da *Nru*I/*Sph*I enzimleriyle kesilmiş pSG11 görülmektedir. Beklenen yaklaşık 1 kb ve 4.6 kb büyüklüğünde iki bant görülmektedir. Ayrıca pNUT1 de bu iki enzim *Nru*I/*Sph*I ile kesilmiştir (Yol 7). 1 kb bandın yanı sıra yaklaşık 1.4 kb (1370 bp) diğer bir bant da görülmüştür. Bu bant klonun vektör kısmında yer alan ikinci *Sph*I tanıma bölgesinin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bant pSG11'de görülmez ve 4.6 kb büyüklüğündeki bant içinde yer alır. Mutasyon sonrasında genoma integrasyon için bu bölge vazgeçilmezdir.

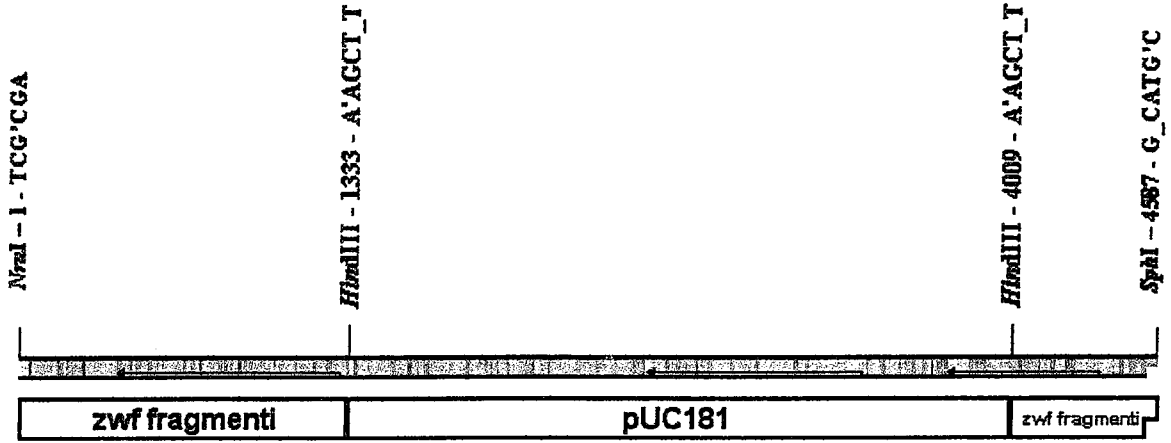
pSG11 üzerinden klonlanmış *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmentinin sistein kodonlarını taşıyan 1.05 kb büyüklüğündeki bölgesinin silinmesi

gerçekleştirilebilir durumdadır. Bu rekombinant vektör kullanılarak Δzwf mutasyon oluşturma çalışmaları yürütüldü.

3.3.3. *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* Geni içine İnterpozon Ω 'nın Ligasyonu

Bir mutasyonun gerek mutagenез sırasında ve gerekse genoma transfer işlemleri sırasında seçilebilir fenotiplere sahip olması son derece hayati bir özelliktir. Bir gen mutasyona uğratılırken genellikle mutasyon noktasına seçilebilir bir fenotip kodlayan bir gen eklenir. Bu genler genellikle antibiyotik direnç genleridir. Mutasyon noktasına bu antibiyotik direnç geni eklendiğinde mutasyonun belli bir hücredeki varlığı o antibiyotiğe direnci ile doğrudan belirlenebilir. Böyle bir seçim kolaylığı sağlamak üzere *zwf* geninin silinen bölgesi yerine interpozon Ω (omega) eklenecektir (İnterpozon Ω 'nın özellikleri için bakınız Bölüm 1.9.1). Ω fragmenti her iki ucunda transkripsiyon ve translasyon durdurma sinyalleri taşır. Bu özellik mutant genin ekspresyonunun tamamen durdurulmasını sağlar. Ayrıca fragmentin orta kısmında bulunan *aadA* geni spektinomisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı direnci kodlamaktadır. Dolayısıyla bu fragment mutasyon bölgesine nakledildiğinde bu antibiyotik direncini taşıyan hücrelerin mutasyonu da taşıdığına karar verilebilecek ve karışık popülasyonlardan mutant geni taşıyan hücrelerin ayırt edilmesi sağlanacaktır. Çalışmalar pSG11 rekombinant vektörünün *SphI/NruI* enzimleriyle kesilmesi ve kaybedilen 1.05 kb gen bölgesi yerine Ω interpozonunun ligasyonu üzerine yönlendirildi.

Öncelikle pSG11 *SphI/NruI* enzimleriyle kesildi ve elektroforetik olarak fragmentler ayrıldı. 1 kb ve 4.6 kb büyüklüğündeki iki banttın büyük olanı agaroz jelden alınarak GeneClean II kit (BIO101) kullanılarak saflandırıldı. Elde edilen bu fragmentin bir ucu *NruI* tarafından oluşturulmuş kör uç iken diğeri *SphI* tarafından oluşturulan yapışkan bir uçtur (Şekil 3.11). Diğer taraftan Ω fragmenti bu iki enzimden hiç biri kullanılarak izole edilememektedir (bakınız Şekil 1.4). Dolayısıyla Ω fragmenti kör uç oluşturan *SmaI* enzimi ile kesilerek elde edilebilir. Bu durumda da 4.6 kb büyüklüğündeki pSG11 fragmentinin *SphI* yapışkan ucu kör uç haline getirilmelidir. Bunun için uç doldurma işleminin yürütülmesi gerekmektedir.



Şekil 3.11. *NruI/SphI* ile kesilmiş pSG11'in 4.6 kb büyüklüğündeki fragmentin doğrusal haritası. pSG11'in *NruI/SphI* ile kesilmesinden sonra 1 kb büyüklüğündeki *zwf* gen bölgesinin her iki tarafında kalan kısımları şeklin her iki ucunda görülmektedir. Orta kısımda vektör pUC181 görülmektedir. Restriksiyon endonükleaz bölgeleri ve konumları üstte gösterilmektedir.

Yapışkan uçları kör uçlu hale getirmek için ya tek zincirli uç bölgesi yıkılır yada bu tek zincirin komplementeri sentezlenir. Bir sentez stratejisi ile *SphI* yapışkan ucunun doldurulması için işlemler yürütüldü. *SphI* enzimi 6 bp büyüklüğündeki tanıma bölgesini 3' tarafından kestiğinden 3' yapışkan bir yapı oluşur. Biraz daha iç kısımdan kesilen komplementer zincirin ucu 5' yönündedir. Bu durumda tek zincirli bölge kalıp olarak kullanılarak komplementerinin sentezlenmesi mümkündür. Ancak hücrel DNA polimeraz enzimleri 5'-3' yönünde sentez gerçekleştiremezler. Bu durumda 5'-3' yönünde sentez gerçekleştirebilen viral bir polimeraz enzimi, T4 DNA polimeraz kullanılarak tek zincirli uç doldurulma çalışmaları yapıldı. Bunun için izole edilmiş ve saflandırılmış 4.6 kb pSG11 fragmentine dNTP'lerin varlığında T4 DNA polimeraz uygulandı. Sonra bu fragment saflandırılarak kendi kendine halkasallaşmasını önlemek amacıyla alkalin fosfat uygulandı. Bu fragmente bağlanacak Ω fragmentini elde etmek üzere, pHP45 Ω *SmaI* ile kesildi ve elektroforetik ayırım ile 2.1 kb büyüklüğündeki Ω fragmenti daha önce belirtildiği gibi (Bölüm 2.12) agaroz jelden izole edildi.

Bu iki fragment, (*SphI* ucu doldurulmuş ve alkalin fosfat uygulanmış 4.6 kb pSG11 ve 2.1 kb *SmaI* Ω fragmenti) ligasyon ile bağlanma çalışmalarında kullanıldı. Ω

fragmentinin pSG11 fragmentine bağlanması durumunda silinen 1 kb'lık *zwf* bölgesinin yerini 2.1 kb büyüklüğündeki Ω fragmenti alacaktır. Bu durumda bu rekombinant vektör pUC181'den gelen ampisilin direncine ve Ω fragmentinden gelen spektinomisin ve streptomisin direncine sahip olacaktır. Böyle bir rekombinant DNA'yı taşıyan klonlar bu üç antibiyotiğe dirençli olacaklardır. Bu temel özellikten hareketle ligasyon karışımları *E. coli* JM109 alıcı hücrelerine transforme edilerek ampisilin ve spektinomisin içeren besiyerinde üremeye bırakıldılar. Yapılan birkaç denemede besiyerinde herhangi bir üreme belirlenmedi. Yapılan ligasyon kontrollerinde yeterli klon elde edilmiş olması bu iki fragmentin bir birine bağlanmadığını göstermektedir. Bunun için bir çok neden olabilir. Bunlar arasında en muhtemel iki nedenden biri kör uç ligasyonlarının yapışkan uç ligasyonlarından önemli oranda daha az verimli bir şekilde çalışıyor olmasıdır. İkinci neden ise 4.6 kb *SphI* fragmentinin uç doldurma reaksiyonunun tam verimlilikte çalışmamış olmasıdır. Sonuç olarak, hem uç doldurma işleminden ve hem de kör uç ligasyonundan gelen zorluklardan dolayı bu ligasyonun gerçekleşmemiş olma olasılığı yüksektir.

3.3.4. *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* Geni İçine İkinci *NruI* Tanıma Dizisinin Eklenmesi

En azından uç doldurma reaksiyonundan kaynaklanan zorluğu aşmak üzere pSG11 vektörünün *SphI* tanıma bölgesine yakın bir bölgeye diğer bir *NruI* bölgesinin eklenmesi çalışmaları yürütüldü. Bunun için belirlenen bölgedeki bir nükleotit dizisi iki adet bazın değiştirilmesiyle *NruI* tanıma bölgesine farklılaştırıldı. Bunun için değiştirilen bazlar tam ortada olacak şekilde 30 baz uzunluğunda bir mutajen primer (oligo *zwfn*) tasarlandı (bakınız Şekil 3.12). Tek zincirli bir kalıp DNA veya kalıcı olarak denatüre edilmiş çift zincirli DNA ile mutajenik oligonükleotit hibritleştirilip kalıbın komplementeri oluşturulduğunda komplementer zincir üzerinde yanlış eşleşmiş bazlar olacaktır. Bir zinciri yabancı tip diğer zinciri mutant olan bu molekül tamir fonksiyonu bakımından mutant olan bir konak hücreye transfer edildiğinde yeni oluşacak plazmitlerin yarısı mutant diğer yarısı yabancı tip olacaktır.

- a) Yabani tip dizi 5' GTGGACTGCATGCTTCGGCGATTCAGACGCTG 3'
 b) zwfn mutajenik oligo 5' GTGGACTGCATGCTTCGGCGATTCAGACGCTG 3'

Şekil 3.12. Mutajenik oligonükleotit zwfn'in nükleotit dizisi. a) Mutajenik oligonükleotitin tasarlandığı genom bölgesinin orijinal dizisi, b) mutajenik oligonükleotit zwfn. *SphI* tanıma dizisi (GCATGC) ve *NruI* tanıma dizisi (TCGCGA) koyu görülmektedir. Değiştirilen iki nükleotitin altı çizilidir.

Mutajenik oligonükleotit ligasyon reaksiyonunun etkili bir şekilde oluşması için fosforlandı (bakınız Bölüm 2.22). pSG11 kalıcı olarak denatüre edildi (bakınız Bölüm 2.21.1). Denatüre edilmiş pSG11 kalıp olarak kullanıldı. Kalıp ve fosforlanmış mutajenik oligonükleotit hibridize edildi (bakınız Bölüm 2.23). Hibridizasyondan sonra dNTP'ler, T4 DNA polimeraz ve T4 DNA ligaz eklenerek komplementer zincir sentezi ve yeni sentezlenen zincirin uçlarının ligasyonu sağlandı. Bu mutagenез karışımı tamir fonksiyonunu gerçekleştiremeyen *E. coli* ES1301 alıcı hücrelerine transforme edildi. Fenotipik ekspresyona izin vermek üzere antibiyotiksiz besiyerinde yarım saat üretildikten sonra ampisilin eklenerek gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi gün antibiyotiğe karşı gelişen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu plazmit alıcı *E. coli* JM109 hücrelerine transforme edildi.

Eğer mutasyon reaksiyonları istenen şekilde gerçekleştiyse bu transformasyon sonrası ampisilin içeren besin ortamında kolonilerin gelişmesi beklenirdi. Ampisilin içeren besiyerlerinde bu üreme gerçekleşmemiştir. Transformasyon pozitif kontrolünün etkili bir şekilde çalıştığından hareketle mutagenез reaksiyonlarının çalışmadığı sonucuna varılmıştır. Yeniden denemeler için daha fazla zamana ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın devam ettirilmesiyle ikinci bir *NruI* bölgesinin eklenmesi olasıdır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinde glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enziminin ışık modülasyonunun gerçek mekanizmasının anlaşılması nihai hedefine yönelik bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bir çok siyanobakteriyel suşa ait G6PDH in vitro'da indirgeyici ajan DTT'den etkilenmekte ve aktivite farklı oranlarda azalmaktadır. Bu sonuçlara dayanarak, in vivo'da sistein amino asitleri arasında oluşan disülfid bağlarının indirgenmiş tioredoksinin tarafından yıkılarak enzimin deaktive olduğu ileri sürülmektedir. Bu hipotezin doğruluğunun anlaşılmasının tek yolu *zwf* geninin yapısında bulunan iki adet sistein kodonunun değiştirilmesi ve bunun sonucunda in vitro ve in vivo'da meydana gelecek aktivite değişikliklerini gözlemektir. Bu temel hedefe ulaşmaya yardımcı olmak üzere iki çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH enziminin in vitro'da DTT'den etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi, diğeri de bir *Δzwf* mutant *Synechococcus* sp. PCC7942 suşu elde etmektir.

Öncelikle *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinin sıvı kültürlerde gelişmesi izlendi. İlk inokülasyondan sonraki 5. güne kadar üssel gelişmenin devam ettiği ve bundan sonra bir geçiş fazından sonra gelişme yavaş olarak devam ettiği bir fazın hüküm sürdüğü görülmektedir (bakınız Bölüm 2.1). Bu faz bir durgunluk fazı olarak kabul edilebilir. 750 nm'de toplam kütlenin absorbansı ölçüldüğünden ölü hücresel kütlenin de ölçüme dahil olduğu düşünüldüğünde bu küçük orandaki artışın toplam hücre sayım yönteminin bir sonucu olduğu kabul edilebilir. Enzim aktivitelerinin üssel fazdan durgunluk fazına geçiş sırasında hızla arttığı rapor edilmektedir (Broedel ve Wolf, 1991). Bu nedenle doğru zamanda enzim çözeltisi elde etmek için bir orta geçiş faz değerinin belirlenmesi önemlidir. Veriler incelenerek bu fazın A_{750} 1.000 değerinde sağlandığı kabul edildi. Bu nedenle enzim çözeltileri için kullanılacak kültürleri A_{750} değeri 1.000 olana kadar üretilmiştir. Enzim çözeltisi için kullanılacak kültürler daha büyük hacimde hazırlanmıştır (1 lt). Bu kültürlerin 500 ml kültürlere göre daha yavaş üredikleri görülmektedir. Küçük kültürler 10. günde A_{750} 1.000 değerine ulaşırken büyük kültürlerde bu değere 13. günde ulaşılabilir. Bunun olası nedeni üreme ortam şartlarından ışık şiddeti olabilir. Kültürlere sabit şiddette ışık verilmektedir. Verilen bu ışık kültür geliştikçe kültürün iç kısımlarına daha düşük şiddetlerde

ulaşabilmekte buna bağılı olarak fotosentez ve gelişme oranı azalmaktadır. Kültür hacmi büyüdükçe bu etkinin daha da artması sonucu gelişme nispeten yavaşlayacaktır.

Enzim çözeltisi olarak elde edilen 45 000 g süpernatantta enzimin spesifik aktivitesi 9.44 ünite/mg protein kadardır. Bu enzim çözeltileri farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde DTT ile muamele edilerek aktivitedeki değişmeler belirlendi. Daha önce *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinde bu tip bir ölçüm rapor edilmemiştir. Ancak diğer siyanobakteriyel suşlarda bu tip gözlemler yapılmıştır. *Anabaena varibalis* enzim çözeltisine 25 mM DTT 15 dakika süreyle uygulandığında enzim aktivitesi %96 oranında azalmıştır (Udvardy ve ark., 1984). *Synechococcus* sp. PCC7942 suşuna daha yakın akraba olan *Anacystis nidulans* hücrelerinde yapılan denemelerde enzim aktivitesinin bu kadar büyük oranda etkilenmediği bilinmektedir (Udvardy ve ark., 1984; Cossar ve ark., 1984). Bu organizmada 5 mM DTT 15 dakika sonunda enzim aktivitesini ancak %53 oranında azaltmıştır. Bu durumda suştan suşa DTT'nin etkisinde farklılıkların olabileceği ortadadır. Bu nedenle *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinde G6PDH aktivitesine hangi DTT konsantrasyonunun hangi sürede ne kadar etkili olduğunun araştırılması gerekir. Bunun için yapılan denemelerden birinde 5 mM DTT'nin aktiviteyi önemli oranda etkilemediği belirlendi (Şekil 3.2). 30 dakika sonunda ancak %19.7 oranında bir azalma söz konusudur, ancak 1., 10. ve 20. dakika değerleri bir sürekli azalma eğilimi göstermemektedir. Dolayısıyla bu konsantrasyonun enzim aktivitesinin azalmasında etkili bir konsantrasyon olmadığı görülmektedir. 25 mM DTT uygulamaları daha tedrici bir şekilde enzim aktivitesinin azalmasını sağlamıştır (Şekil 3.3). 30 dakika sonunda aktivite %40.68 oranında azalmıştır ki bu değer *Anacystis nidulans*'taki değere yaklaşan bir değerdir. Ancak bu organizmadaki %53 oranındaki azalma hala sağlanamamış olduğu göz önünde bulundurularak 50mM DTT'nin etkisine de bakıldı (Şekil 3.4). Bu konsantrasyonda aktivite 30. dakika sonunda %51.22 oranında azaldı. Ayrıca 1., 10. ve 20. dakikadaki azalmalar tedricidir. Yani DTT uygulama süresine paralel olarak aktivite de azalmıştır. Sonuç olarak 50mM DTT'nin 30 dakika boyunca süpernatantlara uygulanmasıyla *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH enziminin aktivitesi yaklaşık yarıya inmektedir. Bu sonuç bu organizmada da G6PDH enziminin aktivitesinin karanlık/ışık geçişinde disülfid bağlarının yıkımına bağılı olarak düzenlenebileceği hipotezinin doğru olabileceğini göstermektedir.

Synechococcus sp. PCC7942 hücrelerinde de karanlık/ışık geçişinde disülfid bağlarının bir rolünün olabileceği sonucuna varıldıktan sonra sistein kodonlarının değiştirilerek gerçekten bu mekanizmanın işleyip işlemediğinin anlaşılmasına yönelik çalışmalara devam edildi. Böyle bir çalışmanın yapılabilirliği öncelikle sistein kodonlarını içeren *zwf* bölgesi silinmiş bir *Synechococcus* sp. PCC7942 mutantının varlığına bağlıdır. Daha önce bir *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* mutant oluşturulduysa da (Scanlan ve ark., 1995) bu mutant sistein kodonlarını taşımaktadır ve böyle bir çalışma için kullanılabilir değildir. Bu nedenle bir Δzwf mutan oluşturmak zorunludur. Klonlanan 2.9 kb *zwf* fragmenti üzerinde bulunan *SphI* ve *NruI* enzimleri ile kesildiğinde sistein kodonlarını da içeren bölge fragmentten uzaklaştırılabilecektir, ancak bu vektörün bu iki enzimin tanıma bölgesini içermemesi gerekmektedir. Yaygın kullanılan klonlama vektörlerinde bu iki enzimden en azından birine ait tanıma bölgesi mevcut olduğundan pUC18'in çoklu klonlama bölgesindeki *SphI* tanıma bölgesi silindi (bakınız 3.3.1) ve yeni vektöre pUC181 ismi verildi. pUC181'e 2.9 kb *Synechococcus* sp. PCC7942 *zwf* fragmenti transfer edilerek pSG11 elde edildi (bakınız Bölüm 3.3.2). pSG11 *NruI/SphI* ile kesildiğinde sistein kodonlarını da içeren yaklaşık 1 kb büyüklüğünde bir bölge yapıdan uzaklaştırılabilecektir. Bu uzaklaştırılan bölgeye mutant genin takibini sağlayacak *aadA* geninin ve ekspresyon engelleyici sinyalleri içeren Ω fragmentinin bağlanması gerekmektedir. Ω fragmenti *NruI* veya *SphI* ile izole edilemez. Dolayısıyla *SmaI* enzimi ile kör uçlu olarak elde edilmiş Ω fragmentinin *NruI/SphI* ile kesilmiş 4.6 kb pSG11 fragmentine ligasyonu gereklidir. Bu enzimlerden *NruI* kör uçlu, *SphI* yapışkan uçludur. Mutasyon bölgesine kör uçlu Ω fragmentinin bağlanabilmesi için *SphI* yapışkan ucunun kör uçlu hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için tek zincirli ucun doldurulması çalışmaları yürütüldü ve görünüşe göre her iki ucu da kör olan bu fragmentle Ω fragmentinin ligasyonu çalışmaları yürütüldü. Yapılan çok sayıda deneme sonucunda Ω fragmentinden sağlanan fenotipe (Spc/Sm direnci) sahip klonlar elde edilemedi. Bunun olası nedenlerinden biri kör uç ligasyonunun zorluğudur, ancak zor da olsa kör uç ligasyonun gerçekleşmesi beklenen bir durumdur. İkinci daha olası olan neden uç doldurmada meydana gelen bir zorluktur. Böyle bir zorluğu aşmak üzere *zwf* geni içine *SphI* tanıma bölgesi yakınına bir diğer kör uç oluşturan enzime ait tanıma bölgesi ekleme çalışmaları yürütüldü. Bunun için silinme bölgesinin diğer ucundan kesen *NruI* enziminin seçilmesi uygun görülerek

mutajenik bir oligonükleotit tasarlanarak oligonükleotit-yönlendirilmiş mutagenез stratejisi uygulandı. Ancak bu çalışmanın yeterince denenmesi için zaman yeterli olmamıştır. Sonuç olarak bir Δzwf mutasyonu elde edilemediyse bile önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra ya *SphI* ucunun farklı stratejilerle kör uçlu hale getirilmesiyle veya oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon ile kör uçlar oluşturularak Ω fragmentinin 4.6 kb pSG11 fragmentine ligasyonunun gerçekleştirilmesine yönelik çalışmalar sürdürülmelidir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçta, *Synechococcus* sp. PCC7942 hücrelerinden elde edilen süpernatant içindeki glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) enzim aktivitesine DTT'nin etkisi incelenmiştir. DTT'nin bu suşa ait G6PDH enzimini etkilediğinin gösterilmesi, bu suşta da karanlık/ışık geçişlerinde enzimin disülfid bağlarının yıkımı yoluyla düzenlenebileceği hipotezini desteklemesi bakımından önemlidir. Elde edilen enzim çözeltisinde spesifik aktivite belirlendi. Sonra farklı konsantrasyon ve farklı sürelerle uygulanan DTT'nin enzim aktivitesini yarıya kadar azalttığı belirlendi. 5 mM DTT konsantrasyonunun enzim aktivitesini etkilemesine rağmen farklı uygulama süreleri de göz önünde bulundurulduğunda bu etkinin güvenilir olmadığı görülmüştür. 25 mM ve 50 mM DTT uygulamalarında enzim aktivitesinin uygulama zamanıyla doğru orantılı olarak aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. 25 mM konsantrasyonda 30 dakika sonunda enzim aktivitesi %40.68 iken 50 mM konsantrasyonda bu değer %51.27 olarak tespit edildi. Bu denemeler *Synechococcus* sp. PCC7942 suşunda da enzim aktivitesinin DTT'den etkilendiğini ve dolayısıyla karanlık/ışık geçişinde disülfid bağlarının bu düzenlemede rol alıyor olabileceğini göstermektedir.

Synechococcus sp. PCC7942 *zwf* geni içinde yer alan iki sistein kodonu değiştirilerek gerçekten disülfid bağlarının böyle bir düzenlemede rolü olup olmadığını belirlemek için yürütülecek araştırmalarda kullanılmak üzere bir Δzwf mutant *Synechococcus* sp. PCC7942 suşu elde etmek üzere çalışmalar yürütüldü. Bunun için öncelikle *SphI* bölgesi silinmiş bir vektör oluşturuldu. Bu vektör 2.9 kb *zwf* fragmentinin sistein kodonlarını da içeren bölgesinin silinmesi için yapılacak manipulasyon çalışmaları için gereklidir. Sonra daha önce klonlanmış 2.9 kb *zwf* fragmenti bu vektöre aktarıldı ve yeni klon pSG11olarak isimlendirildi. Bu klon *NruI/SphI* enzimleriyle kesilerek sistein kodonlarını içeren bölgesi yapıdan uzaklaştırıldı. Bu uzaklaştırılan bölgeye kör uç ligasyonu ile Ω fragmentinin bağlanması çalışmaları yürütüldü. Bu çalışmalar muhtemelen 4.6 kb pSG11 fragmentinin *SphI* ucunun doldurulamamasından dolayı sonuçlandırılmamıştır. Alternatif strateji olarak *SphI* bölgesinin hemen aşağısına oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon ile bir *NruI*

tanıma bölgesi ekleme çalışması yürütülmüştür, ancak bu çalışmanın tamamlanması için zaman yeterli olmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada *Synechococcus* sp. PCC7942 G6PDH enziminin DTT'den etkilendiği ve dolayısıyla disülfid bağlarının enzimin düzenlenmesinde rolü olabileceği görülmektedir. Bunu kesin olarak gösterebilmek için sistein kodonu içermeyen bir *zwf* geni taşıyan bir suşta da enzimin böyle bir özellik gösterip göstermediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleştirebilmek için öncelikle gerekli olan bir Δzwf mutanını üretilmesi gerekmektedir. Bu mutant oluşturma işlemlerinin önemli bir kısmı bu çalışmada gerçekleştirilmiş ancak zamanın sınırlı olması nedeniyle bu çalışma tamamlanamamıştır. Bundan sonra bu mutantın elde edilmesi çalışmalarının devam ettirilmesi ve yine sistein kodonları değiştirilmiş *zwf* genlerinin bu mutanta nakli ile disülfid bağı oluşturamayan bu mutant G6PDH enziminin DTT'den etkilenip etkilenmediği ve aktivite düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Böylece fotosentetik organizmalar olan siyanobakterilerin ışık ve karanlık karbon metabolizmalarının düzenlenmesinde anahtar bir mekanizma kesin olarak açıklığa kavuşturulmuş olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Anderson, L. E., Nehrlich, S. C. and Champigny, M., 1978.** Light modulation of enzyme activity. Activation of the light effect mediators by reduction and modulation of enzyme activity by thiol-disulphide exchange? *Plant Physiol.* 61:601-605.
- Apte, S. K., Rowell, P. and Stewart, W. D. P., 1978.** Electron donation to ferredoxin in heterocysts of the N₂-fixing alga *Anabaena cylindrica*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 200:1-25.
- Bankier, A. T., Weston, M. K. and Borrel, B. G., 1987.** Random cloning and sequencing by the M13/ dideoxynucleotide chain termination method. In R Wu (Ed) *Methods in enzymology* 155, San Diego, 51-93
- Broedel S. E. Jr. And Wolf R. E., 1991.** Growth-phase-dependent induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Gene* 109: 71-79
- Buchanan, B. B., 1980.** The role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:341-374.
- Butler M. J., Bruheim P., Jovetic S., Marinelli F., Postma R. W., Bibb M. J., 2002.** Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 4731-4739.
- Carter, P., 1991.** Mutagenesis facilitated by the removal or introduction of unique restriction sites. In: *Directed Mutagenesis A Practical Approach* edited by M. J. McPherson. Oxford University Press, Oxford, 1-9.
- Castenholz, R. W., 1988.** Culturing methods for cyanobacteria. *Methods in Enzymology*. Editors in Chief Abelson, J.N. and Simon, M.I. Academic Press, Inc., San Diego, 68-93.
- Castenholz, R. W. and Waterbury, J. B., 1989a.** Oxygenic Photosynthetic Bacteria. Group 1 Cyanobacteria. Preface. William & Wilkins, In: *Bergley's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3 edited by Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., Baltimore, 1710-1727.
- Castenholz, R. W. and Waterbury, J. B., 1989b.** Taxa of the cyanobacteria. In: JT Staley, MP Bryant, Pfennig N and JG Holt (Ed), *Bergley's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3, 1727-1728. William & Wilkins Publications, Baltimore.

Castenholz, R. W., 1989a. Subsection III. Order Oscillatoriales In: Staley JT Bryant MP, Pfenning N and Holt JG (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 pp. 1771-1780. William & Wilkins publication , Baltimore.

Castenholz, R. W., 1989b. Subsection IV. Order Nostocales. In: Staley JT Bryant MP, Pfenning N and Holt JG (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 pp. 1780-1793. William & Wilkins publication , Baltimore.

Castenholz, R. W., 1989c. Subsection V. Order Stigonematales. In: Staley JT Bryant MP, Pfenning N and Holt JG (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 pp. 1794-1799. William & Wilkins publication , Baltimore.

Copeland, L., Turner, J. F., 1987. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In DD. Davies (ed) The Biochemistry of Plant, Vol. 11, Academic Press, San Diego, 107-128.

Cossar, J. D., Rowell, P. and Stewart, W. P., 1984. Thioredoxin as a modulator of glucose-6-phosphate dehydrogenase in a N₂-fixing cyanobacterium. Journal of General Microbiology 130:991-998.

Crawford, N. A., Yee, B. C., Nishizawa, A. N., Buchanan, B. B., 1979. Occurrence of cytoplasmic-and m-type thioredoxins in leaves, FEBS Letters, 104:141-145.

Cséke, C., Balogh, A. and Farkas, G. L., 1981. Redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans* and its uncoupling by phage infection . FEBS Letters, 126:85-88.

Dalbadie-McFarland, G., Cohen, L. W., Riggs, A. D., Morin, C., Itakura, K, and Richards, J. H., 1982. Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 79, pp. 6409-6413.

Falkner, G., Horner, F., Werdan, K. and Heldt, H. W., 1976. pH changes in the cytoplasm of blue-green alga *Anacystis nidulans* caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. Plant Physiol. 58:717-718.

Fickenscher, K. and Scheibe, R., 1986. Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. Arch. Biochem. and Biophys. 247:393-402.

Gannt, E., 1994. Supramolcular membran organization. In: DA Bryant (Ed) The Molecular Biology of Cyanobacteria,. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 119-138

- Glazer, A. N., 1987.** Phycobilisomes: assembly and attachment. In: P. Fay and C. Van Baalen (Ed) *The Cyanobacteria*, pp. 69-94. Elsevier Science Publisher B. V. (Biomedical Division), Amsterdam.
- Gleason, F. K., 1994.** Thioredoxins in cyanobacteria: Structure and redox regulation of enzyme activity. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gleason, F. K., 1996.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 purification and kinetics of redox modulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 334:277-283.
- Golden, J.W., Robinson, S.J. and Haselkorn, R., 1985.** Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* 314, 413-423.
- Graeve, K., von Schaewen, A. and Scheibe, R., 1994.** Purification, Characterisation and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant Journal*, 5:353-361.
- Grigoriev, G. and Shestakov, S., 1982.** Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 13:367-370.
- Grossman, A. and McGowan, R. E., 1975.** Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in blue-green algae. *Plant Physiol.* 55:658-662.
- Hagen K. D. and Meeks J. C., 2001.** The unique cyanobacterial protein OpcA is an allosteric effector of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC29133 276:11477-11486
- Hoiczky, E. and Hansel, A., 2000.** Cyanobacterial cell walls. News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*: 182, 1191-1199.
- Ihlenfeldt, M. J. A., Gibson, J. 1975.** CO₂ fixation and its regulation in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Arch. Microbiol.* 102:13-21.
- Kallas, T., 1994.** The cytochrome b6/f complex. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

- Kaneko T., Nakamura Y., Wolk C. P., Kuritz T., Sasamoto S., Watanabe A., Iriguchi M., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takazawa M., Yamada M., Yasuda M., Tabata S., 2001.** Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *DNA Res.* 8(5): 205-13; 227-53.
- Levy, H. R., 1979.** Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol.* 48:97-192.
- Lind, L. K., Kallas, S. R., Lonneborg, A., Oquist, G. and Guastafssan, P., 1985.** Cloning of the β -phycocyanin gene from *Anacystis nidulans*. *FEBS Letters* 188, 27-32.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1982.** *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, N.Y.
- Min, H. and Golden, S. S., 2000.** A new circadian class 2 gene, *opcA*, whose product is important for reductant production at night in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Journal of Bacteriology*, p 6214-6222
- Morand, L. Z., Cheng , R. H., Krogmann, D. W. and Ho, K. K., 1994.** Soluble electron transfer catalysts of cyanobacteria . In: DA Bryant (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp. 381-407. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Newman, J., Karakaya, H., Scanlan, D. J. and Mann, N. H., 1995.** A comparison of gene organisation in the *zwf* region of the genomes of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena* sp. PCC7120. *FEMS Letters* 133:187-193.
- Prentki, P. and Krisch, H. M., 1984.** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313
- Rippka, R., 1988.** Isolation and purification of cyanobacteria. In: L Parker and AN Glazer (Ed) *Methods of Enzymology* 167, Cyanobacteria, Academic Press Inc., San Diego, 3-27
- Rippka, R., Deruells, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y., 1979.** Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1,61
- Rowell, P., Darling, A. J., Amla, D. V. and Stewart, W. D. P., 1988.** Thioredoxin and enzyme regulation. In: LJ Roger and JR Gallon (Ed) *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*, Clarendon Press, Oxford, 201-216.

- Scanlan, D. J., Newman, J., Sebaihia, M., Mann, N. H. and Carr, N. G., 1992.** Cloning and sequencing analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 *Plant Molecular Biology* 19:887-880.
- Scanlan, D. J., Sundaram, S., Newman, J., Mann, N. H. and Carr, N. G., 1995.** Characterisation of a *zwf* mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC7942 *Journal of Bacteriology* 177:2550-2553
- Schaeffer, F. and Stanier, R. Y., 1978.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp. Kinetic and molecular properties. *Arch. Microbiol.* 116:9-19.
- Smith, A. J., 1982.** Modes of cyanobacterial carbon metabolism. In: N. G. Carr and B. A. Whitton (Ed) *The Biology of Cyanobacteria*, pp. 47-85. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G., 1977.** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274.
- Stewart, W. D. P., 1980.** Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:497-536.
- Stewart, A. C., 1988.** Molecular Biology of photosynthetic reaction centres. In L.J Roger and J.R. Gallon (Ed), *Biochemistry of the algae and Cyanobacteria*, Clarendon Press, Oxford, 105-120
- Summers, M. L., Meeks, J. C., Chu, S. and Wolf, R. E., 1995a.** Nucleotide sequence of an operon in *Nostoc* sp. strain ATCC29133 encoding four genes of the oxidative pentose phosphate cycle, *Plant Physiol.* 107:267-268
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L. and Meeks, J. C., 1995b.** Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC29133. *Journal of Bacteriology* 177:6184-6194.
- Sundaram, S., Karakaya, H., Scanlan, D. J. and Mann, N. H., 1998.** Multiple molecular forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cyanobacteria and the role of OpcA in the assembly process. *Microbiology* 144:1549-1556.
- Tabita, F. R., 1994.** The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. In: Bryant DA (Ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

- Technical Manual 001, 2003.** Altered Sites II in vitro Mutagenesis System, Promega Corporation.
- Udvardy, J., Gode M. M. and Farkas, G. L., 1982.** Regulatory properties of a fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. 151:203-208
- Udvardy, J., Borbely, G., Juhos, A. and Farkas, G. L., 1984.** Thioredoxins and redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anabaena* sp. strain PCC7120 vegetative cells and heterocysts. J. Bacteriol. 157:681-683.
- Udvardy, J., Juhász, A. and Farkas, G. L., 1983.** Interactions between hysteretic regulation and redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Anacystis nidulans*. FEBS Letters, 152:97-100
- Waterbury, J. B. and Rippka, R., 1989.** Subsection I. Order Chroococales. In: Staley JT Bryant MP, Pfenning N and Holt JG (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 pp. 1728-1746. William & Wilkins publication, Baltimore.
- Waterbury, J. B., 1989.** Subsection II. Order Pleurocapsales In: Staley JT Bryant MP, Pfenning N and Holt JG (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 pp. 1747-1770. William & Wilkins publication, Baltimore.
- Wenderoth, L., Scheibe, R. and von Schaewen, A., 1997.** Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 272:26985-26990
- Wolk, C. P., 1996.** Heterocyst formation. Annu. Rev Genet. 1996. Vol. 30:59-78
- Wolk, C. P., Ernst, A. and Elhai, J., 1994.** Heterocyst metabolism and development. In: DA Bryant (Ed) The Molecular Biology of Cyanobacteria, pp. 769-823. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Yanisch-Peron, C., Vieira, J. And Messing, J., 1985.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33:103-119.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K., 2002.** Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. Applied Microbiology and Biotechnology 58 (6): 813-821.

Yee, B. C., de la Torre, A., Crawford, N. A., Larco, C., Charlson, D. E. and Buchanan, B. B., 1981. The ferredoxin/thioredoxin system of enzyme regulation on a cyanobacterium. Arch. Microbiol, 130:14-18



ÖZGEÇMİŞ

1976 Samsun doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Samsun'da tamamladım. 1995-1996 öğretim yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne kayıt oldum. 1998-1999 öğretim yılında lisans eğitimimi tamamladım. 1999 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimime başladım. 2000 yılında aynı bölümde Fen Bilimleri Enstitüsü kadrosuyla Araştırma Görevliliğine başladım.

Melike ÇEBİ

