

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

105457

BAKTERİ HEMOGLOBİN GENİNİN

*Enterobacter aerogenes*'İN

FİZYOLOJİK VE METABOLİK AKTİVİTELERİ

ÜZERİNE ETKİLERİ

ŞEBNEM ÖZALP ERENLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA - 2001

105457  
T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMAN İSYON BİRİMİ



**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir

  
.....

(İmza)

Prof.Dr. Eşref YÜKSEL

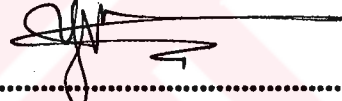
Başkan

  
.....

(İmza)

Yrd.Doç.Dr. Hikmet GEÇKİL

Üye

  
.....

(İmza)

Doç.Dr. Muhittin YÜREKLİ

Üye

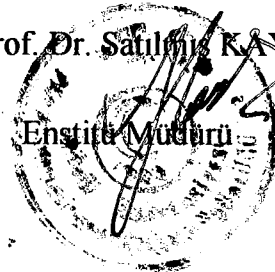
ONAY.....

Yukarıda ki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

22 / 02 /2001

Prof. Dr. Safiye KAYA

Enstitü Müdürü



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

# BAKTERİ HEMOGLOBİN GENİNİN *E.aerogenes*' İN FİZYOLOJİK VE METABOLİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Şebnem ÖZALP ERENLER

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

2001

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Hikmet Geçkil

Hemoglobinler genellikle ökaryotik orjinli proteinler olarak kabul edilmişlerdir. Ancak, son yıllarda gram negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla*'nın doğal olarak hemoglobin sentezlediği saptanmıştır. Önceki çalışmalar heterolog mikroorganizmalarda (*Vitreoscilla* dışındaki) bu hemoglobinin, kritik oksijen seviyelerinde bu organizmaların daha iyi büyümesini sağladığını ve bazı rekombinant yan ürünlerinin sentezini arttırdığını göstermiştir.

Bu çalışmada bakteri hemoglobin geninin, klonlandığı *Enterobacter aerogenes* bakterisinin fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma ile, bakteri hemoglobininin farklı mikroorganizmalarda farklı etkiler gösterebileceği saptanmıştır. Örneğin *E.coli*'de bu proteinin bakteri büyümesini ve rekombinant ürün üretimini arttırabildiği halde, *Enterobacter aerogenes*'de en azından bakteri büyümesi üzerine bu etki saptanamamıştır. Bu da bir çok faktörün yanısıra hemoglobin geninin regülasyonunun farklı olmasından kaynaklanabilir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri hemoglobini, *Vitreoscilla* hemoglobini, *Enterobacter aerogenes*



## ABSTRACT

# THE EFFECT OF BACTERIAL HEMOGLOBINE GENE ON PHYSIOLOGICAL AND METABOLIC AKTIVITIES FROM *Enterobacter aerogenes*

Şebnem ÖZALP ERENLER

İnönü University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

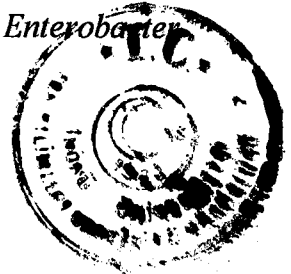
2001

Supervisor: Assistant Profesör Hikmet Geçkil

Hemoglobins were generally considered to be proteins of only eucaryotic origin. However, in recent years it has been found that a gram negative bacterium, *Vitreoscilla*, produces hemoglobin naturally. Previous studies showed that when present in heterologous organisms, *Vitreoscilla* hemoglobin helps the cells to grow better under limited oxygen concentrations and also increase some recombinant protein production under these circumstances.

In this study, the effect of this hemoglobin on metabolic and physiologic characteristics of *Enterobacter aerogenes* was investigated. Here, it was determined that the effect of bacterial hemoglobin can be varied from microorganism to microorganism. For example, while the expression of this protein in *E.coli* causes an increase in both cell growth and in production of recombinant proteins, the some effect was not observed for *Enterobacter aerogenes*, at least at the level of cell growth. Besides many factors cotributing to this effect, the differantial regulation of hemoglobin gene might be one of them.

**KEYWORDS:** Bacterial hemoglobine, *Vitreoscilla* hemoglobine, *Enterobacter aerogenes*



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Yardım ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Eşref YÜKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazımı esnasında bilgisayarla ilgili her konuda gösterdiği yardımlardan dolayı Ümit KALAYCIOĞLU'na teşekkür ederim.

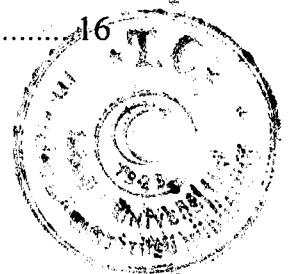
Çalışmalarım boyunca destek ve ilgileriyle bana güç veren ailem, Muazzez-Ali-Korkut ÖZALP'e teşekkür ederim.

Çalışmamın tüm aşamalarında bütün sabrı ve desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Nüvit Eray ERENLER'e teşekkür ederim.

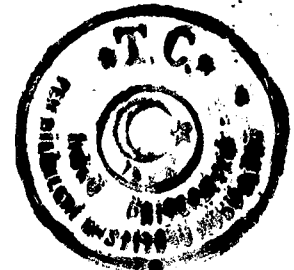


# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler.....	1
2. MATERYAL VE METOD.....	15
2.1. Bakteri Suşları, Plazmidler ve Besi Ortamları.....	15
2.2. Kimyasallar ve Enzimler.....	15
2.3. Kullanılan <i>Enterobacter aerogenes</i> Klonları.....	16
2.4. Plazmidlerin İzolasyonu.....	16
2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	16



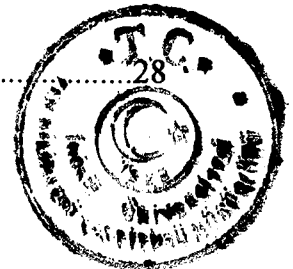
<b>2.6. Kùltürdeki Canlı Hücre Sayısının ve Hücre Kùtlesinin</b>	
Belirlenmesi.....	17
<b>2.7. Kùltürlerin Asit Üretimi.....</b>	<b>18</b>
<b>3. SONUÇLAR.</b>	
<b>3.1 <i>E.aerogenes</i> ve Rekombinant Suşlarının Plazmid İzolasyonu</b>	
ve AgaroZ Jel Elektroföresi Sonuçları.....	19
<b>3.2 LB ortamında <i>E.aerogenes</i> ve Rekombinant Suşlarının</b>	
Büyüme ve Spektrofotometrik Analizleri.....	22
<b>3.3 LB Ortamında <i>E.aerogenes</i> ve Rekombinant Suşlarının</b>	
pH Değerlerinin Analizi.....	25
<b>3.4 LBG Ortamında <i>E.aerogenes</i> ve Rekombinant Suşlarının</b>	
Büyüme ve Spektrofotometrik Analizleri.....	27
<b>3.5. LBG Ortamında <i>E.aerogenes</i> ve Rekombinant Suşlarının</b>	
pH Değerlerinin Analizi.....	29
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
<b>5.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>36</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

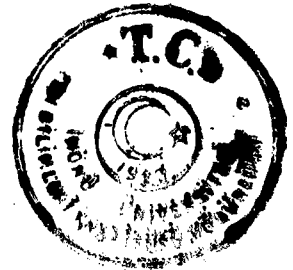
- Şekil 1.1. pUC8 plazmidinin kısmi genetik haritası.....10
- Şekil 1.2. pUC 8:15 plazmidinin pUC 8:16 plazmidine dönüştürülmesini gösteren şekil.....11
- Şekil 1.3. pUC 8:15 plazmidinin 2.3 kb'lık *Vitreoscilla* fragmenti üzerindeki Haritası.....12
- Şekil 3.4. *E.aerogenes* ve rekombinant suşların agaroz jel elektroforezi sonrası çekilmiş jel fotoğrafı .....20
- Şekil 3.5. (a) LB ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının kültürdeki canlı hücre sayısını gösteren grafik.....24
- Şekil 3.5. (b) LB ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının 600 nm dalga boyunda ki OD değerlerini gösteren grafik.....24
- Şekil 3.6. LB ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının pH değerlerini gösteren grafik.....26
- Şekil 3.7. (a) % 1 glikozlu LBG ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının kültürde ki canlı hücre sayılarını gösteren grafik.....





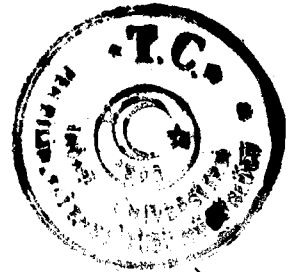
**Şekil 3.7. (b)** % 1 glikozlu LBG ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının 600 nm dalga boyundaki OD değerlerini gösteren grafik.....28

**Şekil 3.8.** % 1 glikozlu LBG ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının pH değerlerini gösteren grafik.....30



## KISALTMALAR

- VtHb** : *Vitreoscilla* Hemoglobini
- vgb** : *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni
- LB** :Luria Broth Besiyeri
- LBG** :Glükoz içeren Luria Broth Besiyeri
- Amp** : Amfisilin
- Ea** : *Enterobacter aerogenes*
- Ea pUC8** : pUC8 plazmidini içeren *Enterobacter aerogenes*
- Ea pUC8:15** : pUC8:15 plazmidini içeren *Enterobacter aerogenes*
- Ea pUC8:16** : pUC8:16 plazmidini içeren *Enterobacter aerogenes*



# 1. GİRİŞ

## 1.1 GENEL BİLGİLER

Hemoglobin son yıllara kadar ökaryotik orjinli bir protein olarak bilinmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada Gram (-) bir bakteri olan *Vitreoscilla*'nın doğal olarak (VtHb) hemoglobin içerdiği saptanmıştır (Wakabayashi, 1986). Son yıllarda VtHb geni (*vgb*) saptanmış ve baz dizisi tanımlanarak (Khosla , 1988), *E.coli* (Khosla 1988; Bailey 1988; Khosravi 1990; Dikshit 1988; Ryan 1990; Khosla 1990; Hart, 1994), *Enterobacter aerogenes* (Geçkil, 1995) *Serratia marcescens* gibi heterolog prokaryot ve *Saccharomyces cerevisiae* (Chen, 1994), tütün bitkisi (Holmberg, 1997) gibi oldukça farklı sistemlere klonlanarak, hemoglobinin bu organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

*Vitreoscilla* obligat aerob, gram negatif, filamentli bir bakteri olup *Beggiotaceae* familyasındandır. Bu bakteri oksijeni düşük ortamlarda bulunur ve *Vitreoscilla* veya bakteriyel hemoglobin denilen eriyebilir bir hemoprotein sentezler.

### **Vitreoscilla'nın Sınıflandırması**

Prokaryota

Grotobacteria

Scotobacteria

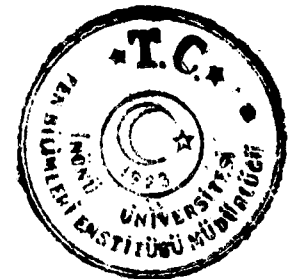
Nanphotosynthetic

Nanfruitingliding

Beggiotoaceae

*Vitreoscilla*

(Khosla, 1988; Khosla, 1986; Wakabayashi, 1986)



## Vgb/VHb'nin Bazı Özellikleri ( Swiss-Prot )

### BAKTERİYEL HEMOGLOBİN

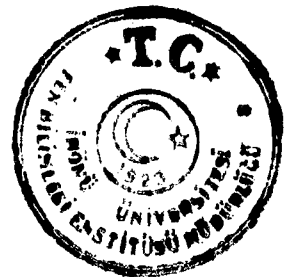
- Sinonim(leri) : Soluble cytochrome o  
Gen adı : VHB  
Organizma : *Vitreoscilla stercoraria*  
Taksonomi : Bacteria; Proteobacteria; beta subdivision; Neisseriaceae;  
*Vitreoscilla*  
Fonksiyon : Bu protein bir terminal oksidaz gibi davranır.  
Alt ünite yapısı : Homodimer.  
Benzerlik : Globin ailesi proteinler.

Uzunluk: 146 aa (amino asit)

Moleküler ağırlık: 15774 Da

#### AA Dizisi:

10 20 30 40 50 60  
| | | | | |  
MLDQQTINII KATVPVLKEH GVTITTTFYK NLFAXHPEVR PLFDMGRQES  
LEQPKALAMT  
70 80 90 100 110 120  
| | | | | |  
VLAAAQNIEN LPAILPAVKK IAVKHCQAGV AAAHYPIVGQ ELLGAIKEVL  
GDAATDDILD  
130 140 146  
| | |  
AWGKAYGVIA DVFIQVEADL YAQAVE



Bu hemoglobin ilk keşfinde yanlış olarak sitokrom o tipi bir terminal oksidaz olarak adlandırılmış, ancak spektral karakteristiklerinin ve aminoasit dizisinin ökaryotik hemoglobine % 25'e varan benzerliğinden dolayı, hemoglobin olarak adlandırılmıştır. *Vitreoscilla* gibi mikroaerobik bir organizmada bu hemoglobin molekülünün oksijen depolama ve oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda bunu terminal oksidazlara transfer etme gibi bir rolü olduğu sanılmaktadır. VtHb proteini homodimerik bir protein olup her alt ünitesi 146 amino asit uzunluğunda olup bir protoheme IX molekülünü içermektedir ve her alt ünitenin molekül kütlesi 15,775 Da büyüklüğündedir (Webster ve ark, 1985). Her alt ünite 2 hem grubu içerir. Hem grubu ökaryotik hemoglobininde olduğu gibi demir içeren porfirin yapısındadır ve demir hem molekülünde iki farklı formda bulunabilir. Ferrus (+2) ve ferrik (+3) formunda bunlardan sadece +2 değerlikli ferrus form oksijen bağlayabilir. Bakteride hem grubu sentezini aminolevulinik asit sentaz sağlarken, methemoglobin redüktaz aktif ferrus formun oluşumunu sağlar.

1986'da bakteri hemoglobinini kodlayan genin dizisi belirlenmiştir. Bu, bugüne kadar bilinen tek prokaryotik hemoglobindir (Wakabayashi ve ark. 1986). Bu protein genellikle oksijene formda bulunur ve spektral karakteristikleri oksihemoglobin ve oksimiyoglobine benzer. Özellikle aerobik (oksijenli) solunum sırasında bu oksijene olmuş formu predominant formudur (Webster, 1987).

Bu hemoglobinin *Vitreoscilla*'daki fonksiyonu henüz tam olarak anlayamamıştır. Önceki çalışmalar *Vitreoscillada* hem konsantrasyonu oksijenin belli kritik seviyelerin altına düştüğünde veya organizma böyle hipoksik şartlara maruz bırakıldığında 20-40 kat artış olduğunu göstermektedir. Bu artışın çoğu VtHb konsantrasyonunun artışından kaynaklanmaktadır (Dikshit., Webster 1998). Bu nedenle, bu proteine düşük oksijenli ortamlarda bir oksijen yakalayıcı ajan olarak bakılabilir.

VtHb homodimerik bir protein olup bazı hayvansal ve bitkisel globinlere önemli benzerlik taşımaktadır. (Dikshit,1991;Webster. 1987)Bakteriyel hemoglobine



diğer hemoglobinler arasında özellikle korunmuş bölgelerde aminoasit benzerliği vardır. En büyük benzerlik % 24 amino asit dizisi benzerliği ile leghemoglobinleri iledir (Wakabayashi ve ark.1986).

VtHb'nin globin kısmı, *Vitreoscilla* kromozomu üzerinde tek bir kopya halinde bulunan ve 500-600 nükleotid uzunluğundaki bir gen tarafından kodlanmaktadır.

VtHb proteini bir terminal oksidaz gibi davranır. Bakteri hemoglobinin düşük oksijenli ortamlarda bakteri gelişimini desteklediği düşünülmektedir, fakat bunun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. *Vitreoscilla* zorunlu aerobik olduğu halde, düşük oksijenli çevrelerde yaşamaya uyum sağlamıştır, yani mikroaerofiliktir. Atmosferik normal oksijen miktarının %10'u kadar oksijen içeren ortamlarda hemoglobin sentezinin 5-10 kat arttığı görülmüştür. Daha kritik oksijen konsantrasyonlarında ise VtHb hücre içi konsantrasyonlarının 40-50 kat arttığı gözlenmiştir (Dikshit ve ark. 1988).

VtHb'nin yarısının sitoplazmada ve diğer yarısının periplazmik bölgede olduğu saptanmıştır. VtHb sentezinde önemli rolleri olan iki enzim olan aminolevulinik asit sentaz ve methemoglobin redüktaz oksijenle regüle olurlar. VtHb'nin promotörü oksijene duyarlıdır. VtHb üretiminde olduğu gibi, o da mikroaerobik şartlarda maksimum derecede uyarılır (Dikshit,1990). mRNA seviyesindeki artışın gösterdiği gibi oksijene bağlı regülasyon transkripsiyon seviyesinde meydana gelir, anaerobik şartlar ise promotör aktivitesini baskılamaktadır. Güçlü bir promotör olmasına rağmen vgb promotörü - 35 korunmuş dizisi taşımaz. Ancak pribnov kutusundan 20 nükleotid geride katabolit aktivatör protein bağlama bölgesine benzer bir bölge vardır. Karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığı zaman süksinat, laktat, gliserol gibi aerobik substratlara göre 4-5 kat daha az VtHb sentezi görülmüştür. Yani glikozun VtHb sentezi üzerine baskılayıcı bir etkisi vardır (Dikshit 1989, Khosla ve ark. 1989; Dikshit 1990)

VtHb'nin sentezinin regülasyonunu ve fonksiyonunu anlamak için bu proteini kodlayan gen (*vgb*) *E.coli* ve diğer bazı gram negatif bakterilere klonlanmıştır. Bu



çalışmalar göstermiştir ki; *vgb* içeren plazmidlerin aktarıldığı hücreler, *vgb* içermeyenlere göre daha iyi büyüme göstermişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'da *vgb* içeren suş *vgb* içermeyen konakçı hücreye göre daha yüksek canlı hücre sayısı ve oksijen alımı göstermiştir (Geçkil,2001). Ayrıca, *vgb* içeren *Xanthomonas maltophilia*'nın daha etkili bir şekilde benzoik asidi dönüştürdüğü saptanmıştır (Liu, 1995)

*vgb* promotörünün *Ea*'da aktif olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir *Enterobacteriaceae* bakterileri sporsuz, Gram(-) çomakçıklardır ve aside dirençli değildirler. Bazılarında kapsül bulunur. Bu ailedeki bakteriler kemo-organatrodur, peptonlu suda ve diğer adi besiyerlerinde ve genellikle en iyi olarak 37°C' de ürerler. (Geçkil, 1995)

Primer olarak insan ve hayvanların kalınbağırsağında ve vücuttaki birçok yerin normal florasında bulunan Gram(-) basillerin oluşturduğu büyük aileye *Enterobacteriaceae* denir. Bu heterojen familya elemanlarının hepsinde hem anatomik lokalizasyon hem de aşağıdaki 4 metabolik proses ortaktır.

- 1) Hepsi fakültatif aerobdur.
- 2) Hepsi glikozu fermente eder (Diğer şekerlerin fermantasyonu farklıdır).
- 3) Hiçbirinde sitakrom oksidaz yoktur.
- 4) Nitratları, nitrite indirger ve bu yolla enerji sağlarlar.

*E.aerogenes* çoğunlukla hareketli, az mukoid üreme gösteren, küçük kapsülüdür. Serbest olarak bulunabildiği gibi, barsaklarda da bulunabilir ve idrar yolu enfeksiyonları ile sepsisten sorumlu olabilir. *Ea*, asetoin ve 2.3 bütandiol ürünlerinin fermantasyonunu yaptığı iyi bilinen organizmalardandır. 2.3 bütandiol endüstriyel olarak önemli kimyasallardandır ve *E a*, anaerobik metabolik yolunda son üründür. Sentetik lastik üretiminden gıda sanayine kadar birçok endüstriyel alanda bütandiol kullanır (Geçkil, 1995).

Hipoksik ortamlarda hemoglobin sentezi artmaktadır, çünkü *Vitruvella* hemoglobin geni (*vgb*) oksijenle regüle edilen bir genidir ve *vgb*



şartlarda maksimum derecede uyarılmaktadır ve hücre içi konsantrasyonu 40-50 kat artmaktadır (Boerman, 1982, Kroneck, 1991). *vgb* içeren *E.coli* atmosferik şartların % 2-5'i oksijen içeren ortamlarda büyütüldüğü zaman *vgb*'nin spesifik transkriptlerinde yani mRNA ve VtHb seviyelerinde 40-50 kat artış olmaktadır. Böyle şartlar altında VtHb'nin ortam oksijen değişimlerine karşı bir tampon görevi görerek mikroorganizmanın büyüme ve çoğalmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. (Georgiou, 1987; Joshi, 1994 ; Dikshit. 1992)

Bir çok mikroorganizma için belli oksijen konsantrasyonu, ortam oksijen değişimlerinin algılanması ve bu değişimlere uyum sağlaması onların büyüme ve çoğalması için oldukça önemlidir. Bu açıdan *vgb* promotorunun oksijene duyarlı bir promotor olduğu saptanmıştır (Dikshit, 1990). Oksijen konsantrasyonu belli sınırlar altına düştüğü zaman, bütün hücrelerin fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde önemli değişimler olur ve çoğu zaman hücrelerin büyümesi durur ve hücre parçalanması olur. Bu şartlar altında, VtHb'nin hücrelerin daha iyi büyümelerini sağladığı ve metabolik aktivitelerini düzenlediği görülmüştür (Hart, 1994; Geckil, 1995). Gerçektende iyi bir oksijen taşıyıcı olan VtHb'nin sadece doğal konakçığı olan *Vitreoscilla*'da değil klonlanmış olduğu rekombinant organizmada da hem rekombinant proteinlerin sentezini arttırdığı (Khosravi, 1991) ve hem de organizmanın metabolik aktivitesini düzenleyerek büyümesine katkıda bulunduğu saptanmıştır (Khosla, 1989 ; Mei, 1997).

Esasen keşfinden beri VtHb ile ilgili çalışmaların çoğu *E.coli* ile yapılmıştır. Terminal oksidazlar bakımından mutant *E.coli*'de VtHb'nin aerobik büyümeyi sağladığı görülmüştür. VtHb taşıyan rekombinant *E.coli*'nin süksinat ve laktat gibi aerobik substratların bulunduğu ortamda büyüebildiği gözlenmiştir. VtHb'nin terminal oksidaz gibi hareket edebilmesinin mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır.

Bir çok organizma için çevredeki oksijen değişimlerine uyum sağlanması önemli bir gereksinimdir. Çalışmalar göstermiştir ki *E.coli*'de *fnr* gen ürünü (fumarat nitrat redüktaz) anaerobik birçok genin uyarılmasından sorumludur.





ortamda). *fnr* bakımından mutant *E.coli* anaerobik elektron alıcıları olan fumarat, nitrit ve nitratı kullanamaz. *fnr* DNA'ya bağlanan bir protein olup, regülatör bölgede korunmuş bölgelere bağlanarak bir çok genin transkripsiyonunu regüle eder. *E.coli*'de *fnr*'nin oksijenin olmadığı durumlarda bazı ilgili genleri regüle ettiği gösterilmiştir. Burada *fnr* hem aktivatör hemde represör gibi hareket etmektedir. Örneğin, *E.coli* aerobik şartlardan anaerobik şartlara transfer edilirse, sitokrom o ve d redüktaz genleri baskılanırken nitrat ve fumarat redüktaz gibi anaerobik terminal oksidazlar aktive olur. *E.coli*'nin *fnr* mutantlarında *vgb* promotorunun mikroaerobik şartlar altında uyarılmadığı görülmüştür. Bu nedenle anaerobik şartlar altında *fnr*'nin promotoru üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olduğu sanılmaktadır (Joshi, 1994).

Bakteriyel hemoglobin, optimal eldeleri belli bir oksijen seviyesine ihtiyaç duyan önemli bir çok fermantasyon ürününün üretiminde önemli bir avantaj sağlayabilir. Her ne kadar fermantasyon bir anaerobik metabolik yol ise de, bir çok fermantasyon ürününün optimal eldesinin belli bir kritik oksijen konsatrasyonu gerektirdiği bilinmektedir (Crow, 1990; Serebnikov, 1992).

Rekombinant DNA teknolojisi moleküler genetik çalışmalarında gen yapısının belirlenmesi, ifadesi ve özellikle plazmidlerle aktarılan genlerin mikroorganizmalarda yüksek miktarlarda ürünlerinin yapılabildiği önemli bir teknolojidir.

Plazmidler tarafından kodlanan gen ürünlerinin eldesi genellikle mikroorganizmaların fizyolojik şartları, plazmidin kararlılığı, plazmid kopya sayısı ve de plazmidsiz hücrelerin rekombinant hücrelere nazaran daha iyi büyüme avantajlarına sahip olması gibi nedenlerden etkilenmektedir. Genellikle plazmid içeren hücreler, plazmidsiz hücrelere göre daha düşük büyüme avantajlarına sahiptirler (Seo ve ark 1985; Seo ve ark. 1987). Hatta plazmid kopya sayısı hücrede yükseldikçe büyüme oranı daha da azalır (Cheah ve ark. 1987). Bu durum, konakçı hücrenin kendi rezervlerini (hem enerji hemde metabolik olarak) rekombinant molekülün ( plazmid gibi ) replikasyonu, gen transkripsiyonu ve translokasyonunda kullanmasından kaynaklanır. Ayrıca, rekombinant hücrelerin diğerlerine göre



fazla oksijene ihtiyaç duyduğu ve dolayısı ile rekombinant hücrelerin oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda zayıf büyüme gösterdikleri bildirilmiştir (Khosravi ve ark. 1990).

Plazmid büyüklüğü de rekombinant hücrelerin büyüme ve oksijen alımları üzerine etki eden diğer önemli bir faktördür. Araştırmalar göstermiştir ki plazmidin büyüklüğü arttıkça bakteri büyümesindeki azalma ve oksijen alımında ki artış önemli derecede yüksek olmaktadır. Ayrıca plazmidin büyüklüğünün artması ile hücre içinde ki kopya sayısının azalması arasında bir paralellik olduğu görülmüştür (Cheah ve ark. 1987). Plazmidlerin rekombinant hücrelerin büyümeleri üzerine olumsuz etkisi ve ilgili gen ürününün plazmidlerin kararsızlığı sebebiyle azalması rekombinant DNA teknolojisinin en önemli sorunlarından biridir. Rekombinant DNA teknolojisinin uygulandığı pek çok çalışmada vektör olarak kullanılan plazmidlerin genel özellikleri kısaca şöyledir; plazmidler bakterilerin sitoplazmasında yaşayan ve replike olan oldukça basit nükleer materyallerdir. İçinde buldukları bakterinin kromozomu ile bütünleşmeleri halinde epizom adını alırlar. Plazmidler bakteriler arasında antibiyotik direnci transfer eden araçlar olarak bilinirler, ve çift sarmal dairesel DNA'ya sahiptirler.. Ayrıca antibiyotikleri inaktive eden, toksin üreten ve doğal maddeleri yıkan, metabolize eden genlere sahiptirler.

Genetik klonlamada kullanılan plazmidler, genellikle doğal plazmidlerden genetik manipulasyona tabi tutularak boyları kısaltılmış ve birkaç plazmidten parçalar kapsayan plazmidlerdir. Örneğin pBR322 plazmidini pSC101, Pme ve RSF:124 plazmidlerinin bazı kısımlarından oluşmaktadır.

Bazı plazmidler bakteriler arasında transfer edilebilir. Bir plazmidin bir bakteriden diğerine aktarılabilmesi için *tra* genlerine yani transfer genlerine sahip olması gerekir. Bu tür plazmidlere konjugatif plazmidler, *tra* genleri bulunmayan plazmidlere nonkonjugatif plazmidler denir. Nonkonjugatif plazmidler konjugatif plazmidlerin yardımı ile transfer edilebilir

Plazmidlerin vektör olarak kullanılmasında aranan başlıca özellikler şunlardır:

- 1) Konjugatif olmalı hem kısa (1-10 kb) hemde hücre içindeki sayıları çok olmalı, 10-50 kadar.

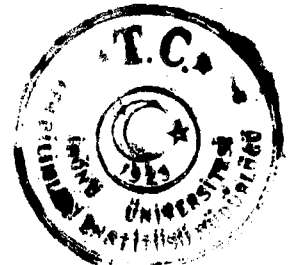


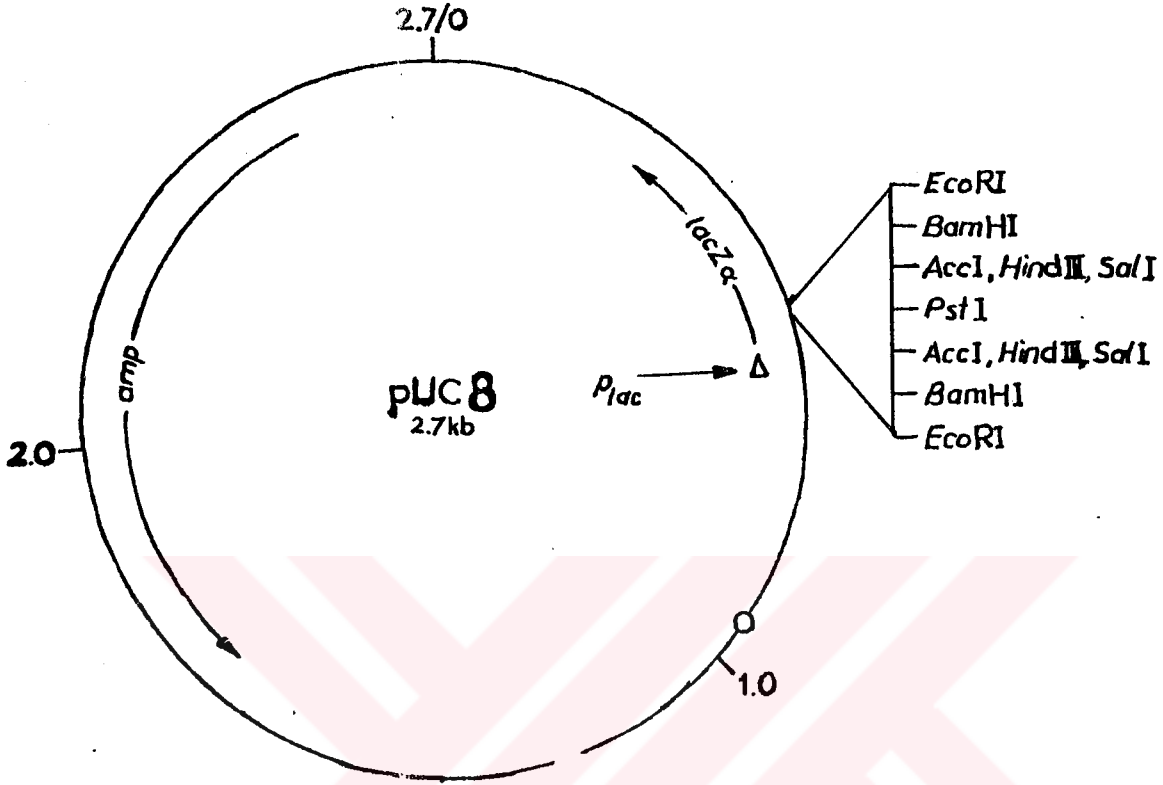
- 2) Konak hücre spektrumu geniş olmalı.
- 3) Restriksiyon enzim tanıma bölgeleriyle, antibiyotik direnç gösteren genleri bulunmalı.
- 4) Kararlılık ve devamlılık göstermeli.
- 5) Büyük DNA segmentleri alabilmeli.
- 6) Birden fazla gen alabilmeli.
- 7) İnfeksiyöz ve onkojenik olmamalıdır ( Grinsted, 1988).

VtHb sistemi plazmid vektörler aracılığı ile çeşitli ökaryotlara da (özellikle funguslara) klonlanmış ve üretimi belli oksijene gerek duyan antibiyotikler gibi yan metabolitlerin sentezini arttırıcı yönde etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Demodera,1993; Minas 1998).

Bu çalışmada ; hücre içinde 100-500 kopyası bulunan çoklu kopya plazmid olarak iyi bilinen ve pUC8 plazmidi ve onun vgb içeren rekombinantları kullanılmıştır. pUC8 plazmidi kullanışlı bir plazmid olup, Lac Z- $\alpha$  bölgesindeki çoklu klonlama bölgesine yerleştirilecek yabancı genin lac<sup>-</sup> fenotipine sahip transformantları vermesi ile fenotipinin belirlenmesi mümkündür. Bu çeşit plazmidleri içinde bulunduran bakteriler, indikatör (Xgal) içeren besiyerlerinde mavi koloniler verirken; rekombinant plazmidler beyaz koloniler verirler. pUC8 plazmidleri lac Z başlama kodonundan ileride birkaç adet özel restriksiyon bölgeleri içerirler ki; bu bölgeler klonlama çalışmalarında yabancı genin klonlandığı bölgelerdir.

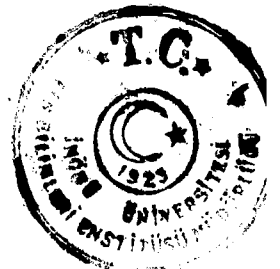
Çalışmamızda kullandığımız rekombinant plazmidlerde 2.3 ve 1.4 kb'lık ve üzerinde vgb taşıyan Vitreoscilla genomik fragmentleri bu lac Z- $\alpha$  bölgesinde, Hind III bölgesine yerleştirilmişlerdir. pUC8 plazmidinin diğer bir özelliği de lac promotoruna göre klonlama bölgesine yabancı fragmentler her iki yönde de yerleştirilebilirler. Yani her iki yönde de genin genin transkripsiyonu mümkündür. (Şekil 1)



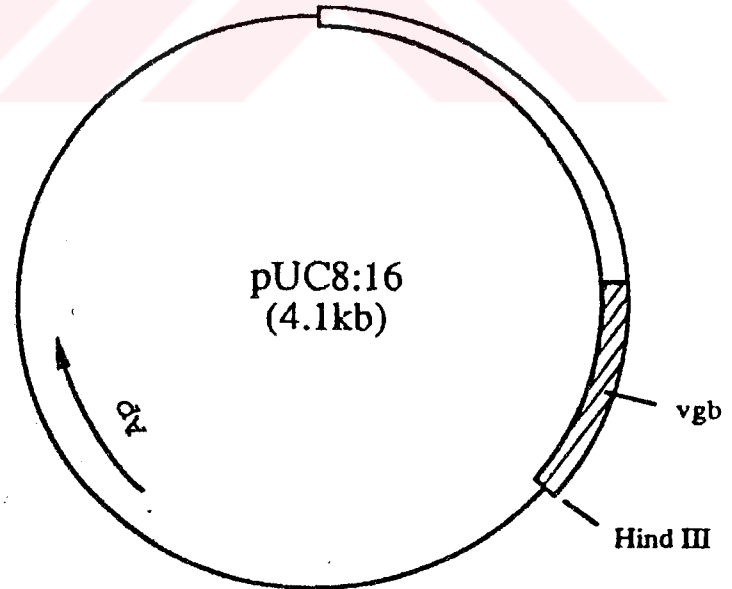
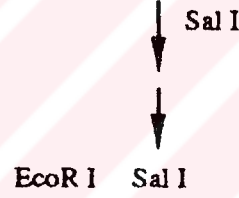
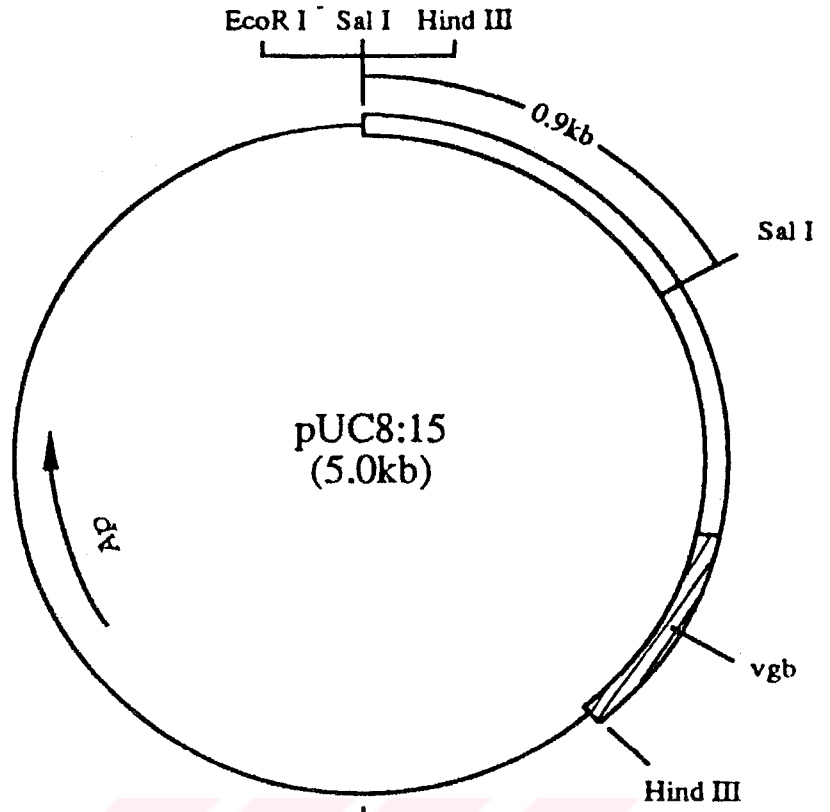


Şekil.1.1. pUC8 plazmidinin kısmi genetik haritasıdır.

Bu plazmidin replikonu pMB1 plazmidinden olup plazmidin büyüklüğü 2.7 kb ve ayırtedilebilir fenotipi amp<sup>r</sup> dir.

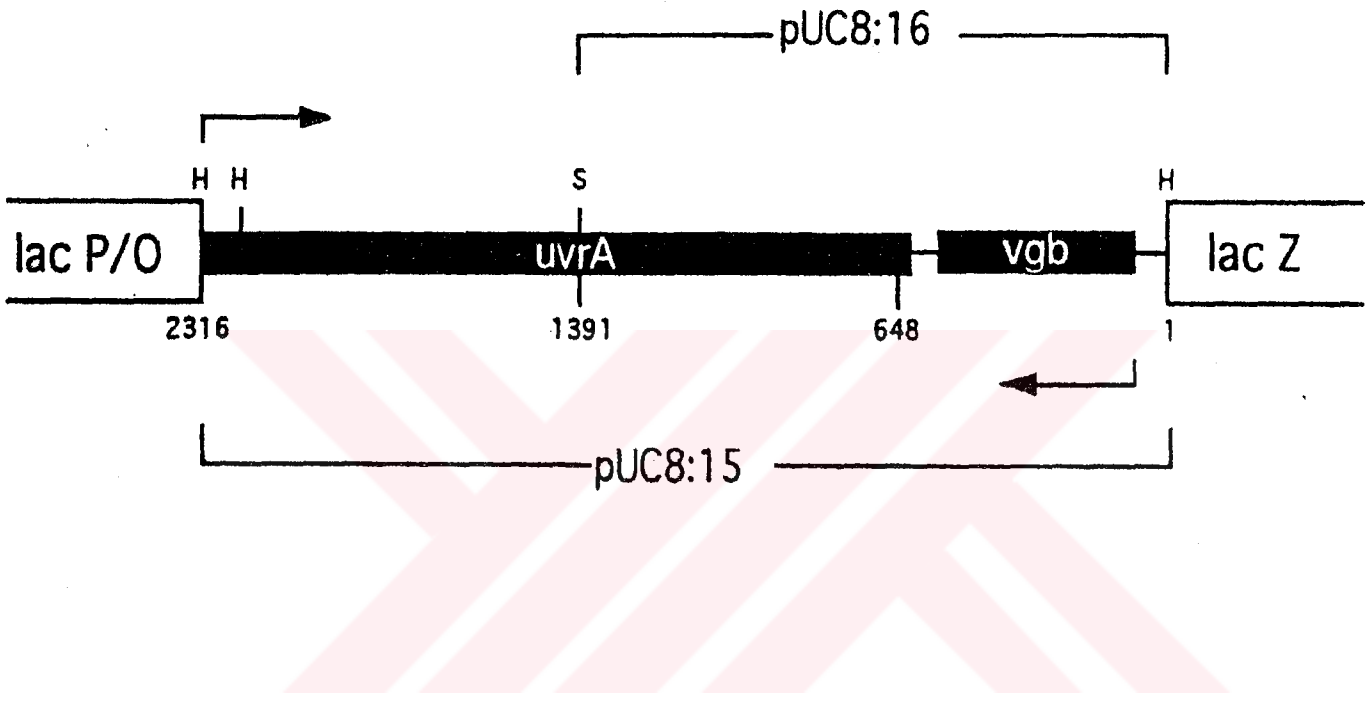


- = pUC8  
▨ = *Vitreoscilla*  
▨ = *Vitreoscilla* hemoglobin



Şekil 1. 2. pUC 8:15 plazmidinin pUC 8:16'ya dönüştürülmesi.





**Şekil 1. 3. pUC 8:15 plazmidinin 2.3 kb'lık *Vitreoscilla* fragmenti üzerindeki haritası.**



Önceki sayfalarda açıklandığı gibi, son yıllarda yapılan rekombinant DNA teknolojisi alanındaki çalışmaların çoğunda, sahip oldukları bir çok özelliğten dolayı klonlama vektörü olarak plazmidler kullanılmaktadır. Bu çalışmada da klonlama vektörü olarak pUC serisi plazmidleri kullanılmıştır. Bu plazmidler daha önce değinildiği gibi kararlılıklarından dolayı tercih edilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi denildiğinde çeşitli materyallerden genlerin izole edilmesi, değişik manipulasyonlara tabi tutulması, klonlanması ve daha sonrada elde edilen rekombinantların temel ve uygulamalı araştırmalarda kullanılması akla gelmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinde uygulanan bütün yöntemlerin temeli olan klasik yöntem 5 aşamada gerçekleşmektedir.

- 1) Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA fragmentlerinin elde edilmesi.
- 2) Elde edilen bu fragmentlerin yine aynı enzimle kesilmiş uygun bir taşıyıcı vektöre aktarılması.
- 3) Fragment + vektör kompleksinin konakçı organizmaya aktararak çoğaltılması (Klonlama).
- 4) Spesifik DNA fragmenti içeren klonların seçimi.
- 5) Klonlanan spesifik DNA fragmentlerinin tanımlanması.

Bilimsel alanda nispeten yeni sayılabilecek bir konu olan bakteri hemoglobin geni, araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir. VtHb olarak sembolize edilen bu proteinin vektörler aracılığı ile çeşitli ökaryotlara klonlandığında antibiyotikler gibi bazı yan metabolitlerin sentezini arttırıcı yönde etkiye sahip oldukları saptandığı bilinmektedir (Demodera,1993; Minas 1998). *E.coli* bakterisine klonlandığında, bu bakterinin üreme ve büyümesi üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Yine, *Pseudomonas aeroginase* bakterisine klonlandığında hücre metabolit üretimini arttırıcı yönde etkisinin olduğu görülmüştür (Geçkil H, 2001). Ayrıca, *Xanthomonas maltophilia*'nın metabolik aktiviteleri üzerine olan etkileri de yapılan bir çalışma ile saptanmıştır (Liu, 1995).

Bu çalışmada daha önce klonlandığı farklı organizmaların fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerinde farklı etkileri olduğu gözlenen



*Enterobacter aerogenes* bakterisinin fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine olan etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu bakteri fermantatif ürünleri itibariyle endüstriyel önemi olan bir bakteridir. Bu tezde söz konusu olan çalışma bu bakterinin metabolik yolundaki ürünlerin arttırımı ile ilgili yapılabilecek diğer çalışmalara zemin niteliğindedir. VtHb'nin *E. aerogenes*'in fizyolojik ve metabolik aktiviteleri üzerine olan etkilerinin araştırılması ile bu bakteriden daha yüksek bir verim elde edilmesinin yöntemleri tespit edilmeye çalışılmaktadır. VtHb'nin bahsedilen konuda olumlu bir etkisi olabileceği düşüncesi bu çalışmanın başlangıç noktası olmuştur. Bu konuda yapılmış olan diğer çalışmalar, daha önce *vgb* geninin klonlandığı organizmalar üzerindeki VtHb etkilerinin çeşitli olduğunu göstermiştir.

*E.coli*'ye benzer bir bakteri olan *Enterobacter aerogenes*'in endüstriyel alanda ki kullanımı daha fazladır. Bu bakteri petrokimya ve polimer üretiminde önemli yer tutan bütandiol ve asetoin fermantasyonu yapabilmektedir. Dolayısı ile fakültatif aerobik olan böyle bir organizmada hemoglobinin sentezi çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılabilir. Örneğin, bu çeşit bakterilerin fermantasyon ürünlerinin üretimi için azda olsa belli bir konsantrasyonda oksijene ihtiyaç vardır. Bu çalışmada VtHb'nin büyüme, bölünme ve asit üretimine olan etkisi araştırılmıştır. Bilindiği gibi bu parametrelerin uygunsuzluğu halinde (örneğin, asit üretiminin yani asetatin üretiminin artması, büyüme ve bölünme sürelerinin azalması) yukarıda bahsedilen *Enterobacter aerogenes*'in endüstriyel amaçlı kullanımını olumsuz etkilemektedir.





## 2. MATERYAL-METOD

### 2.1. Bakteri suşları, Plazmidler ve Besi Ortamları

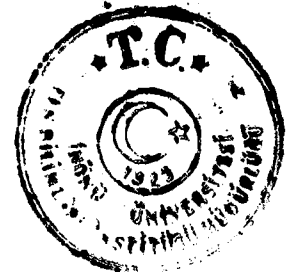
Bu çalışma da *Enterobacter aerogenes* (USDA B427) bakterisi kullanıldı. pUC8:15 ve pUC8:16 plazmidlerinin oluşturulması daha önceki çalışmada verilmiştir (Dikshit, Webster, 1988). Bu plazmidler sırası ile 2.3 kb ve 1.4 kb *Vitreoscilla* kromozomal DNA fragmenti içermektedir. *vgb* genini de içeren bu fragmentler pUC8 standart plazmidine yerleştirilerek bu adlar verilmiştir. Her üç plazmid amfisiline direnç sağlayan  $\beta$ -laktamaz'ı kodlayan bir gen içermektedir.

Luria Broth (LB ) besi ortamının hazırlanışı Miller (1972)'e göre yapılmıştır. Bir litre distile suya 10 g baktopepton, 10 g NaCl ve 5 g yeast ekstresi eklenerek, 1 N NaOH ile pH'sı 7.5'e ayarlanmıştır. Rekombinant suşların besi ortamlarına ayrıca 100µg/ml konsantrasyonda amfisilin eklenmiştir. Ancak, bu antibiyotik steril edilmiş sıvı ve katı besiyeri ortamlarına, besi ortamının ısı 50 °C'nin altına düşünce eklenmiştir. LBG besi ortamı da yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır ve ayrıca % 1 glikoz içermektedir. Glikoz konsantre (% 20) halde hazırlanmış ve otoklav edilerek LB'ye sonradan eklenmiştir.

### 2.2. Kimyasal Malzemeler ve Enzimler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden sağlanmıştır. Bunlar; NaCl, pepton, agar , yeast extract, amfisilin, glüköz, tris HCl, EDTA, NaOH, SDS, potasyum asetat, etanol, glasiel asetik asit , tris base, etidyum bromid, agaroz ve KOH'dir.

Restriksiyon enzimleri Hind III ve EcoRI ve ayrıca  $\lambda$ -DNA belirleyicisi de aynı firmadan sağlanmışlardır.



### 2.3. Kullanılan *Enterobacter aerogenes* Klonları

Bu çalışmada kullanılan *Ea* ve onun rekombinant suşları (*Ea* puc 8, *Ea* puc 8 : 15, *Ea* puc 8 : 16) H.Geçkil (1995) tarafından sağlanmıştır.

### 2.4. Plazmidlerin izolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

Plazmid taşıyan *Enterobacter aerogenes*'in üç suşundan plazmid izolasyonu alkali-lizis metodu ile (Ausubel ve ark. 1992) yapılmıştır. Bunun için taze kolonilerden bir adet 10 ml LB- amp ortamına inoküle edilmiş ve 37 °C çalkalamalı etüvde gece boyunca 200 rpm'de kültürler inoküle edilmişlerdir. Bu kültürlerden 1,5 ml eppendorf tüplerine alınarak mikrosantrifüjde 5000 rpm'de 3 dk. Santrifüj edilmiş ve sıvı kısmı atılarak peletlere 150 µl GTE tamponu (50mM glukoz, 25mM Tris HCl ve 10mM EDTA, pH 8.0) eklenerek, vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir. Bu süspansiyona 200µl NaOH/ SDS solüsyonu (0.2 N NaOH, % 1 SDS) eklenerek çalkalandı ve buz üzerinde 5 dk. inkübe edilmiş, daha sonra 150 µl potasyum asetat (pH 4.8) ilave edilip ve 5 dk. oda sıcaklığında tutulmuştur. Karışım 5dk. 5,000 rpm'de santrifüj edildikten sonra peletler steril kürdanlarla atılarak süpernatantların üzerine 800 µl % 95'lik etanol ilave edildi ve 30 dk. 25 °C oda sıcaklığında tutulduktan sonra 3 dk. 15000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Pelet iki defa % 70'lik etanol ile yıkandı ve havada kurutuldu. Kurumuş pelet 100 µl TE tamponu (steril 50mM Tris base, 0,5 mM EDTA pH 9.0) içinde ve bu şekilde -20 °C'de saklanmıştır.

### 2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi rutin olarak agarozun % 1'lik konsantrasyonda 40 defa dilüsyon edilmiş 40 kat konsantre jel tamponu (1.6 M Tris base, 0.78 M sodyum asetat, 0.72 M NaCl ve 8.8 mM EDTA, glasiel asetik asit ile pH'sı 8.0'ayarlandı) ile hazırlanmıştır.

60 ml 1X jel tamponuna 0.6 g agaroz jel eklenerek mikrodalga fırında homojenize edilmiş ve agaroz jel kalıbına dökülerek katı hale getirilmiştir.

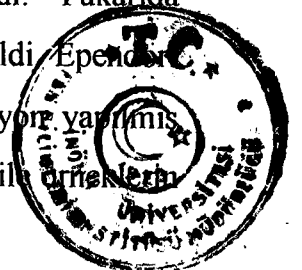


DNA örnekleri (50.500 µg DNA) 10-15 µl solüsyonda dişecek şekilde restriksiyon enzimleri ile 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildikten sonra, Lambda DNA markırı ve izleme boyası ( % 4 sükröz, %0.02 brom fenol blue) jelin tarak dişleri boşluklarına uygulanarak, boya jelin 1 cm ucuna gelinceye kadar yürütölmüşlerdir. Jele, mikrodalgada homojenize edildikten sonra, kalıba dökölmeden 1 damla etidyum bromid (10mg/ml) ilave edilmiş ve bu sayede boyanarak, UV lambası üzerinde (360 nm) fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 1). Markırların yürüme mesafeleri ve moleköl ağırlıklarından elde edilen standart eğri sayesinde, bilinmeyen fragmantların moleköl ağırlıkları saptanmıştır.

## **2.6. Kültürdeki Canlı Hücre Sayısının ve Hücre Kütlesinin (OD 600) Belirlenmesi.**

Her bakteri suşu için 250 ml'lik erlenlere 20'şer ml LB konuldu. Besi yerinin otoklavda steril edilmesinden sonra, rekombinant suşlar için besi ortamlarına 100µg/ml amp olacak şekilde stok antibiyotik solüsyonundan (100mg/ml) eklendi. Ancak, bu ekleme besi ortamının ısısı 50 °C'nin altına düştükden sonra yapıldı. Glikoz içeren ortamlarda ise konsantre (% 20) steril glikoz solüsyonundan son konsantrasyon % 1 olacak şekilde glüköz eklendi. Glikozun besi ortamı ile beraber sterilizasyonu karamelizasyona sebep olduğu için, glikoz eklenmeside besi ortamının sterilizasyonundan sonra yapıldı.

1:10 dilüsyon yapılarak, 4 suşun da OD600'de absorbanları okundu ve yeni besi ortamlarına eşit OD600 verecek şekilde, yaklaşık 1:20 oranında ekim yapıldı. Kültürlerin 37 °C'de 1 saat inkübasyonundan sonra her erlenden 1 ml alındı ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. ~16.000 g'de 10-15 sn. santrifüj edildi. Süpernatant dököldü. Ortamda olabilecek az miktarda ki antibiyotiğide uzaklaştırmak için peletinin üstüne 1 ml taze LB eklendi ve vortekslendi. Bakteri büyüme çalışması, 20 ml LB (antibiyotiksiz) içeren 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirildi. Yukarıda anlatılmış olan vortekslenmiş kültürden 200'er µl alınarak inkoküle edildi. Ependorftüpünden erlenlere 200 µl kültür inoküle edildi. Böylece 1:100 dilüsyon yapılmış oldu. Sıfırncı (inoküle edilen zaman ) saatten başlanarak 2'şer saat ara ile

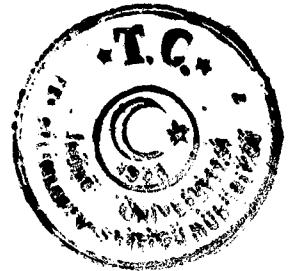


uygun dilüsyonları yapılarak ayrı petri kaplarına ekim yapıldı. Ayrıca, ikinci saatten başlanarak her iki saatde bir bu kültürlerin optik densiteleri 600nm dalga boyunda kaydedildi . OD600 > 0.5 olduğu zaman kültürler LB içinde uygun şekilde sulandırım yapılarak absorsansları okundu.

Canlı hücre sayımı için kültürler uygun şekilde seyreltildi. Bu şekilde 50-100 hücre/petri olacak şekilde kaloni sayısı elde edildi. Bunun için uygun miktarlarda alınan bakteri kültürleri, hazırlanan % 0.85'lik fizyolojik tuz çözeltisi içinde uygun sulandırım yöntemleri uygulandıktan sonra , her suş için iki'şer petriye ekim yapıldı Petriler 18-20 saat 37°C ye ayarlanmış etüvde bekletildi ve sonra oluşan koloniler çıplak gözle sayıldı ve not edildi. Çalışma 5 tekrarlı yapılmıştır.

## 2.7. Kültürlerin Asit Üretimi

Yukarıda anlatılan deneysel aşamalarda, ikinci saatten itibaren her iki saatte bir, her bir bakteri suşu için 1'er ml kültür alınarak; pH metre yardımı ile asit üretimlerinin ölçümü yapılmıştır.



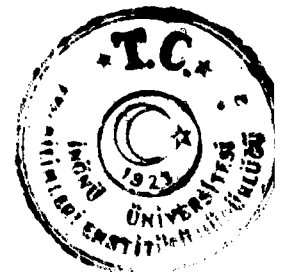
### 3. SONUÇLAR

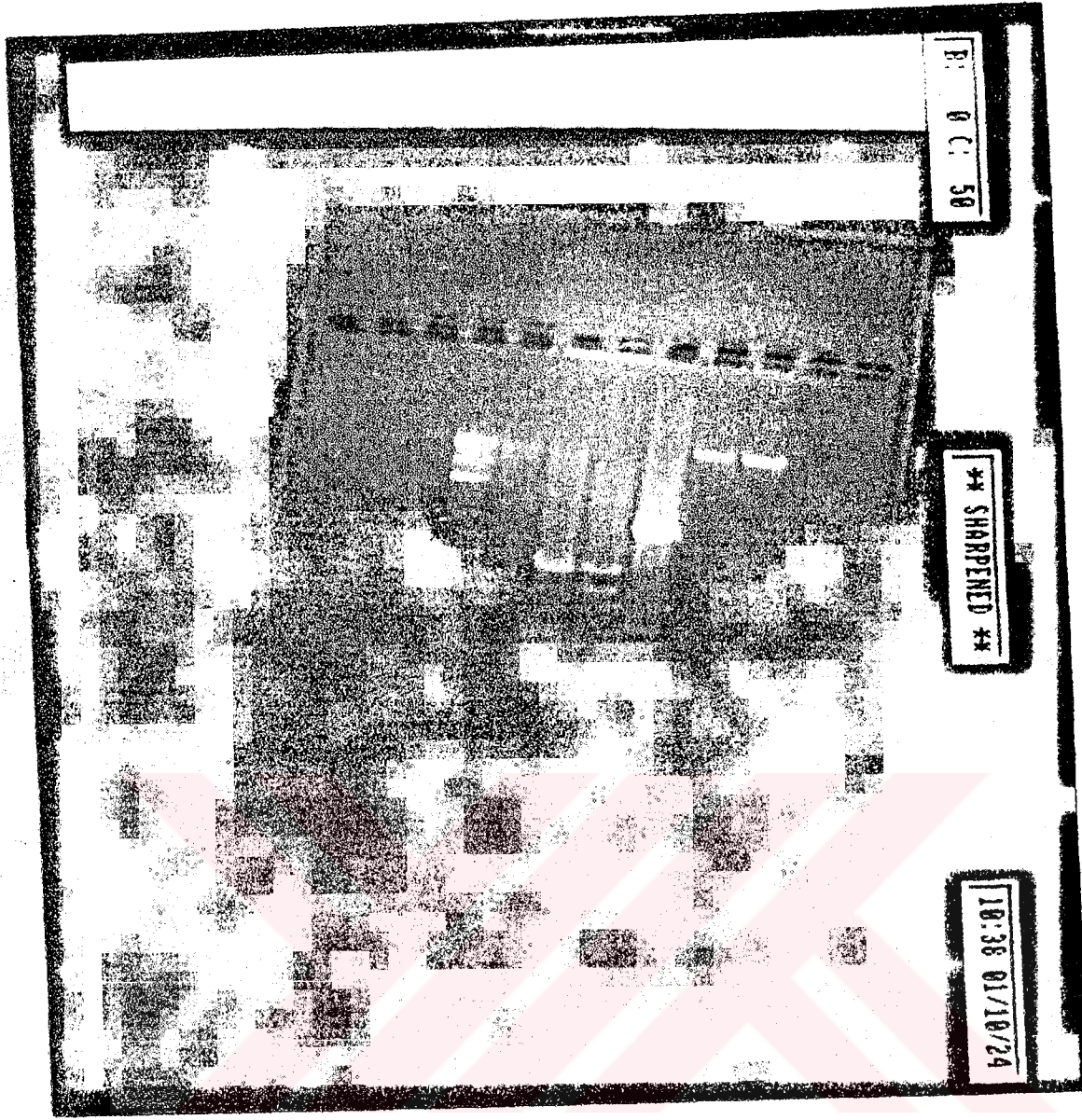
#### 3.1. *E.aerogenes* ve Rekombinant Suşlarının Plazmid İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları

Plazmidler genellikle hücre içi kararsız yapılar olduklarından ve seleksiyon baskısı kaldırıldığında hücreden kolayca kaybolduklarından, plazmid içeren *Enterobakter aerogenes* suşlarının ilgili plazmidleri içerip içermedikleri için plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Seleksiyon baskısı bu suşların ampisilin içeren besi ortamlarında ekimlerinin yapılması ile sağlanmıştır. Çünkü, her üç tip plazmid üzerinde bu antibiyotige dirençliliği sağlayan gen ürünü kodlanmaktadır (Amp<sup>r</sup>).

*E.aerogenes*'e pUC8, pUC8:15 ve pUC8:16 plazmidlerinin transformasyonunda yaygın olarak kullanılan CaCl<sub>2</sub> yüksek şok metodu başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bununla beraber, *E.coli* de plazmid izolasyonu için kullanılan bir metod vardır. Boiling lysis metodu *P.aeroginase* ve *E.coli*'den plazmid izolasyonu için kullanılmıştır, fakat *E.aerogenes*'de başarı ile çalışılmamıştır. Alternatif bir yöntem olan alkaline lysis metodu *E. aerogenes*'de kullanılmış, başarı ile uygulanmıştır. Aşağıda plazmid izolasyonundan elde edilen jel fotoğrafı bulunmaktadır.





**Şekil 3.4. *E. aerogenes* ve *Ea* pUC 8, *Ea* pUC 8:15, *Ea* pUC 8:16 rekombinant suşlarının agaroz jel elektroforezi sonrası çekilmiş jel fotoğrafıdır.**

Hat 1,  $\lambda$  DNA/Hind III; 2, *Ea*; 3, *Ea* pUC8; 4, *Ea* pUC8:15; 4, *Ea* pUC8:16; 6ve 7 pHG1 kozmidi (25.2 kb). Plazmidlerin hepsi Hind III restriksiyon enzimi ile kesilmişlerdir. 3. hatta 2.7 kb büyüklüğünde ki fragment pUC8'in Hind III ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan tek fragmenti verirken 4 ve 5. hatlarda sırası ile pUC8:15 ve pUC8:16'nın aynı enzim ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan fragmentleri vermektedir. pUC8:15'in üzerinde iki Hind III bölgesi bulunduğundan iki fragment açığa (2.7 ve 2.3) çıkarken, pUC8:16'da sahip olduğu bir adet Hind III bölgesinden dolayı enzim kesilmesi sonucu 4.1 kb'lık tek bir fragment görülmektedir.



Şekil 3.4'de de görüldüğü gibi pUC8, pUC8:15 ve pUC8:16'nın ilgili suşlardan izolasyonu saflaştırılması ve restriksiyon enzim kesimlerini gösteren agaroz jel elektroforezi ile elde edilen DNA fragmentleri bu plazmidlerin varlığını kanıtlamaktadır. Burada pUC plazmidini içeren ve yabancı tip *Enterobakter aerogenes* kontrol suşları olarak kullanılmışlardır. pUC8:15 ve pUC8:16 plazmidlerinin her ikisi üzerinde *vgb* bulunmaktadır. Ancak, pUC8:15'de bu gen 2,3 kb ve pUC8:16 plazmidinde ise 1,4 kb büyüklüğünde bir fragment üzerinde bulunmaktadır. *Vitreoscilla* hemoglobin geni her iki plazmid üzerinde hem yapısal ve hemde kontrol (promotor/operatör) bölgelerine sahiptir (Şekil 1.3). Ancak, her iki ucuda ekstradan kromozomal DNA ile kuşatılmıştır. pUC8 plazmidinden orjin alan her iki *vgb* içeren plazmidde de bu gen Hind III restriksiyon bölgesinden eklenmiştir. (Şekil 1.2). Dolayısı ile her üç plazmidin Hind III restriksiyon enzimi muamelesi ile pUC8'de bir adet 2,7 kb fragment, pUC8:15 için 2.7 kb ve 2.3 kb ve pUC8:16 için ise 2.7 kb ve 1.4 kb 'lık fragmentler gözlenmiştir.

.Bakteriyel hemoglobinin *Enterobakter aerogenes*'in bazı metabolik ve fizyolojik parametreleri üzerine etkisi araştırıldı. Bunun için glikoz içeren (LBG ) ve bu karbonhidrattan yoksun zengin besiyeri LB ( Luria Broth ) kullanılmıştır.



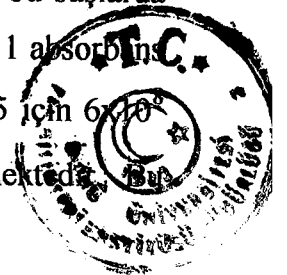
### 3.2. LB ortamında *E.aerogenes* ve Rekombinant Suşlarının Büyüme ve Spektrofotometrik Analizleri.

Şekil 4’de görüldüğü gibi *Vthb*’nin bu bakterilerin büyümesi üzerine olumlu etkisi ileri logaritmik faz ve durağan fazda daha iyi görülmektedir. Bu fazlarda *vgb* içeren ve *VtHb* sentezleyen özellikle kontrol plazmidi içeren *Ea* pUC 8 suştan 10 katı kadar daha yüksek hücre yoğunluklarına sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak, bu hücre yoğunluklarının OD<sub>600</sub>’deki (hücre kütlesi ölçümleri) değerlerle direkt bir paralellikte olduğu görülmemiştir. Glikozun bu genin ifadesinde etkili rol oynadığı ve onu baskıladığı bilinmektedir. LB besiyerinde, *vgb* içeren suşlar geç logaritmik fazda (bu deneylerde 4. saatten sonra) kararlı bir artış gösterirken, kontrol plazmidini içeren *Ea* pUC8’de inkübasyon boyunca hücre yoğunluğu diğer üç suştan daha düşük seviyede gözlenmiştir. Konakçı hücrenin plazmidsiz suşu *Ea*’nın ise ileri inkübasyon periyotlarında (6. saatten sonra ) hücre yoğunluğunda düşüş gözlemlenmiştir

Suşlar arasında bir kıyaslama yaparsak;

Şekil 3.5 (b)’de görüldüğü gibi 600nm dalga boyundaki absorbanslarda 6. saate kadar bir artış görülmüş ve daha sonra durağan bir yapı göstermiştir. Bu şekil bir oluşum canlı hücre sayımında görülse de (şekil 3.5. (a)), canlı hücre yoğunluğu ile optik yoğunluk arasında direkt bir ilişki gözlenememiştir. İleri inkübasyon periyotlarında (6. Saatten sonra) ana konakçı hücrelerin OD<sub>600</sub> değerleri sabit bir durum arz ederken, kontrol plazmidini içeren *Ea* pUC8’in absorbansında nisbi bir azalma görülmektedir. Ancak, *vgb* içeren her iki suşta nisbi artışlar gözlemlenmiştir.

Literatürde genellikle hücre kültürlerini ifade eden kültür OD’si ile kültürdeki canlı hücre sayısının ifadesi söz konusudur. Yani, 1 absorbans birimi hücrenin özelliğine bağlı olmak kaydı ile (büyüklük, renk, vs ) belli sayıda hücreyi ifade etmek için kullanılır. Bizim çalışmamızda görüldüğü gibi 1 OD ünitesi bu suşlarda aynı sayıda hücreye denk gelmemektedir. Örneğin, aktif logaritmik fazda 1 absorbans *Ea* için  $8 \times 10^8$  hücre/ml; *Ea* pUC8 için  $3.9 \times 10^8$  hücre/ml; *Ea* pUC8:15 için  $6.7 \times 10^8$  hücre/ml; *Ea* pUC 8:16 için  $7.9 \times 10^8$  hücre/ml kültüre denk gelmektedir.



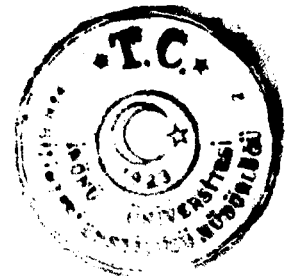


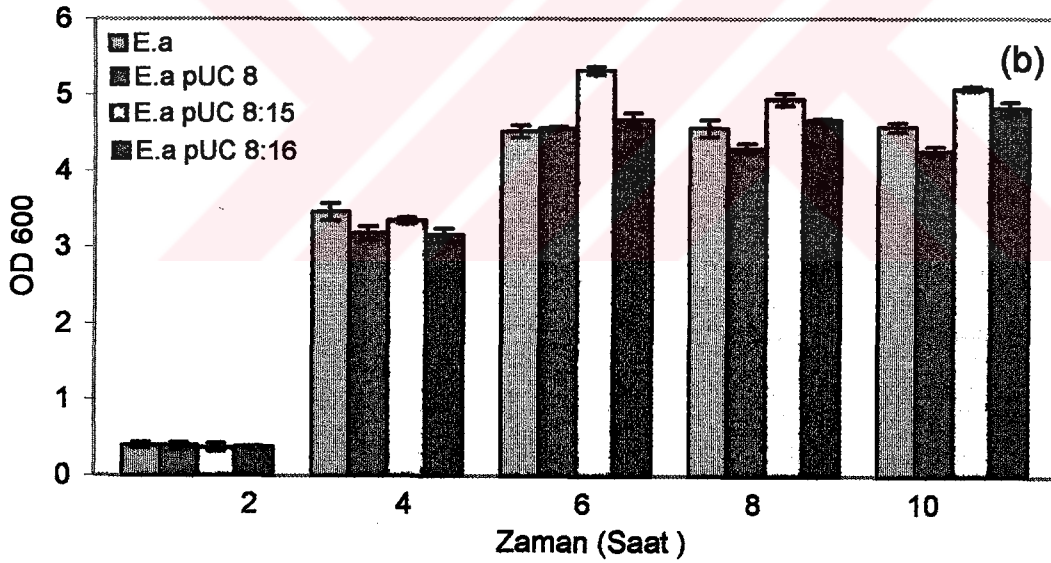
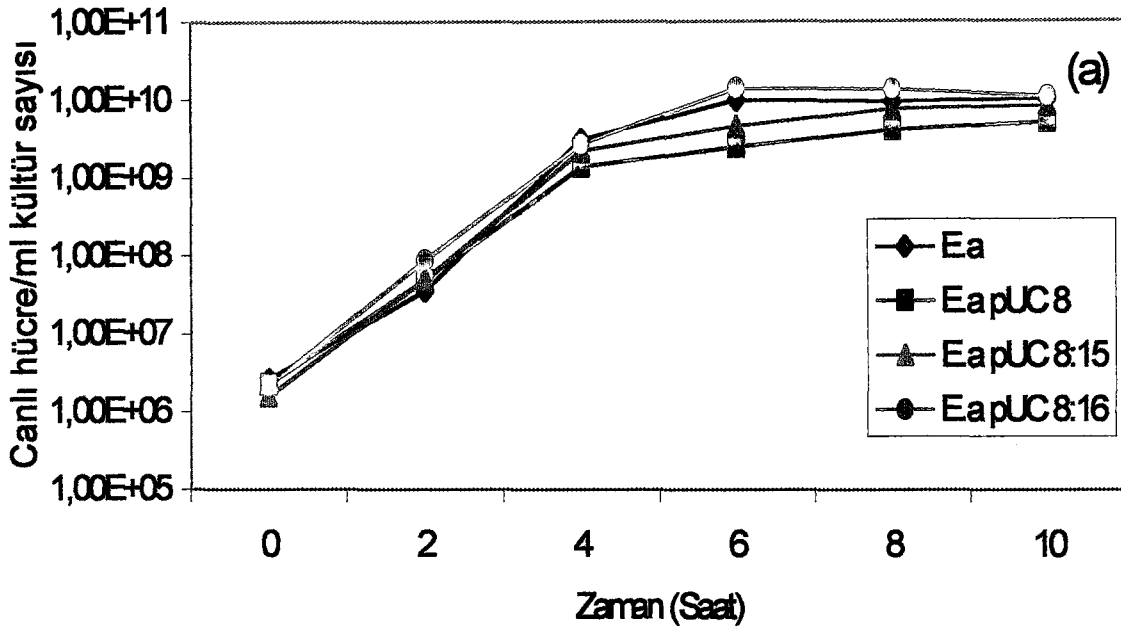
sonuçlarda LB besi ortamında *Ea*'nın 3.16 (19 dk./jenerasyon), *Ea* pUC8'in 2.4 (25 dk./jenerasyon), *Ea* pUC8:15'in 2.86 (21 dk./jenerasyon) ve *Ea* pUC8:16'nin 2.5 (24 dk./jenerasyon) büyüme oranlarına sahip olduklarını göstermektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi canlı hücre yoğunluğu ile optik yoğunluk arasında direkt bir ilişki gözlenememiştir. Bunun en önemli nedeni bakteri hücresinde VtHb'nin çoğunlukla periplazmik bölgede toplanmasıdır. Bu sebepten hücre yoğunluğunun düşük olduğu periyotlarda vgb içeren suşlarda daha yüksek OD yoğunluğu görülmüş olabilir.

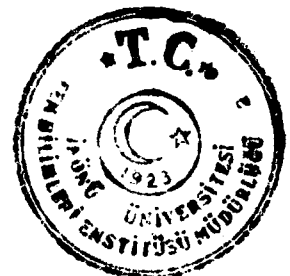


T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI  
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI





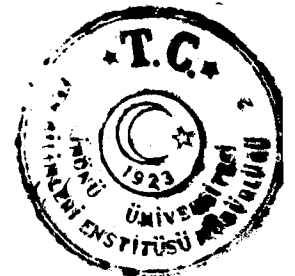
Şekil 3.5. LB ortamında *E. aerogenes* ve rekombinant suşlarının kültürdeki canlı hücre sayısı (a) ve 600 nm deki OD değerleri (b)

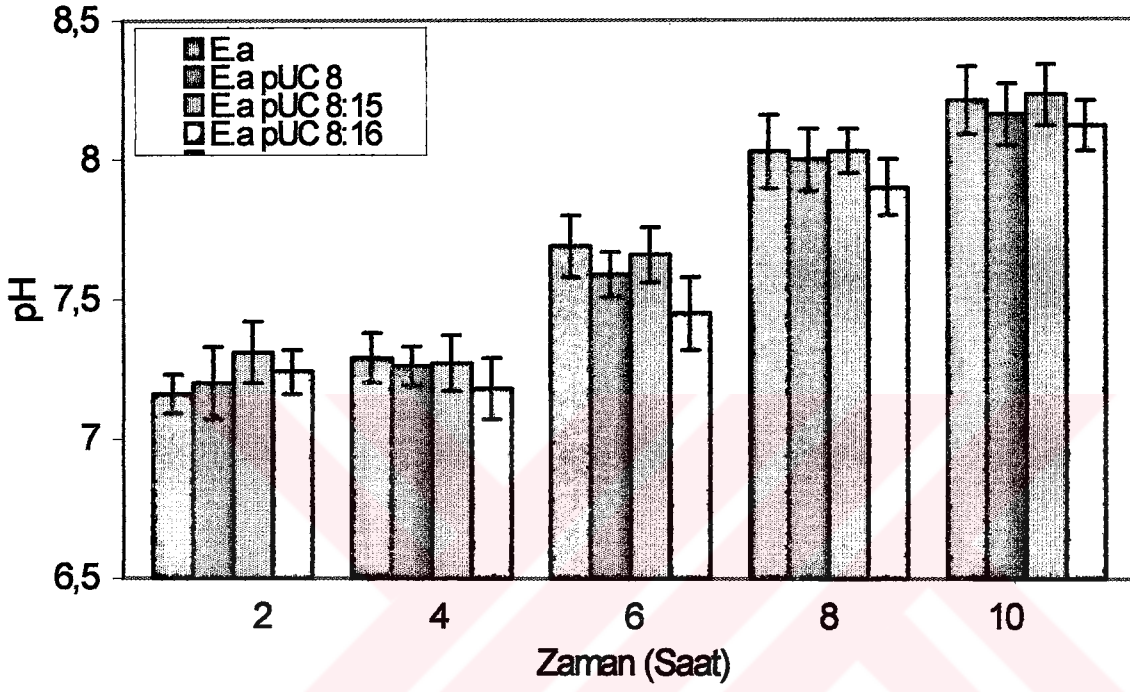


### 3.3. LB Ortamında *E.aerogenes* ve Rekombinant Suşlarının pH değerlerinin Analizi

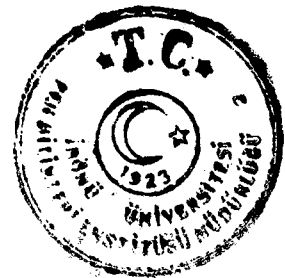
LB kültür ortamında bakterilerin asit üretimi onların kültür pH'larının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı 7.5 olan bu kültürlerde, aktif logaritmik faz boyunca ( 0-4 saat ) her 4 suş için pH 7.17'ye kadar bir pH düşüşü gözlenmiştir. Ancak 6. saatten sonra kültür pH'sı tekrar 7.5 ve üzerine çıkarak bu artış kültür periyodu boyunca devam etmiştir. (Şekil 3.6 )

Burada görüldüğü gibi hücre kültürlerinde en düşük ve en yüksek pH'larda 10 kat kadar bir hidrojen iyon konsantrasyon farkı görülmektedir. Kültürlerin erken inkübasyon periyodunda (0-4 saat ) asidik karakter taşıırken, geç kültür periyotlarında bazik oldukları saptanmıştır. Her suş için ayrı bir analiz yaparsak; *Ea*'nın 2. saatte ki 7.16 olan pH değeri 10. saatte 8.21 olmuştur. *Ea* pUC8'in 2. saatte 7.2 olan pH değeri 10. saatte 8.16 olmuştur. *Ea* pUC8:15' in ilk ölçümü 8.23 iken 10. saatte ki son ölçümü 8.23 olmuştur. *Ea* pUC8:16'nın ilk ölçümü 7.24 iken son ölçümü 8.12'dir. Bilindiği gibi mikroorganizmaların buldukları ortamlarda ki pH değerleri özellikle enzimatik etkinlikler için önem taşır. Ortamın pH derecesi, ayrıca bakterilerin bazı metabolizma ürünlerinin az veya çok oluşması üzerinde etkili olur. Bu sonuçlarda ise matabolit üretiminin ortam pH'sı üzerine olan etkisi açık olarak görülmektedir.





Şekil 3.6. LB ortamında büyütülen *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının pH değerleri.

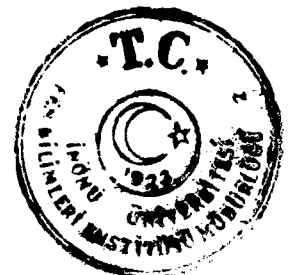


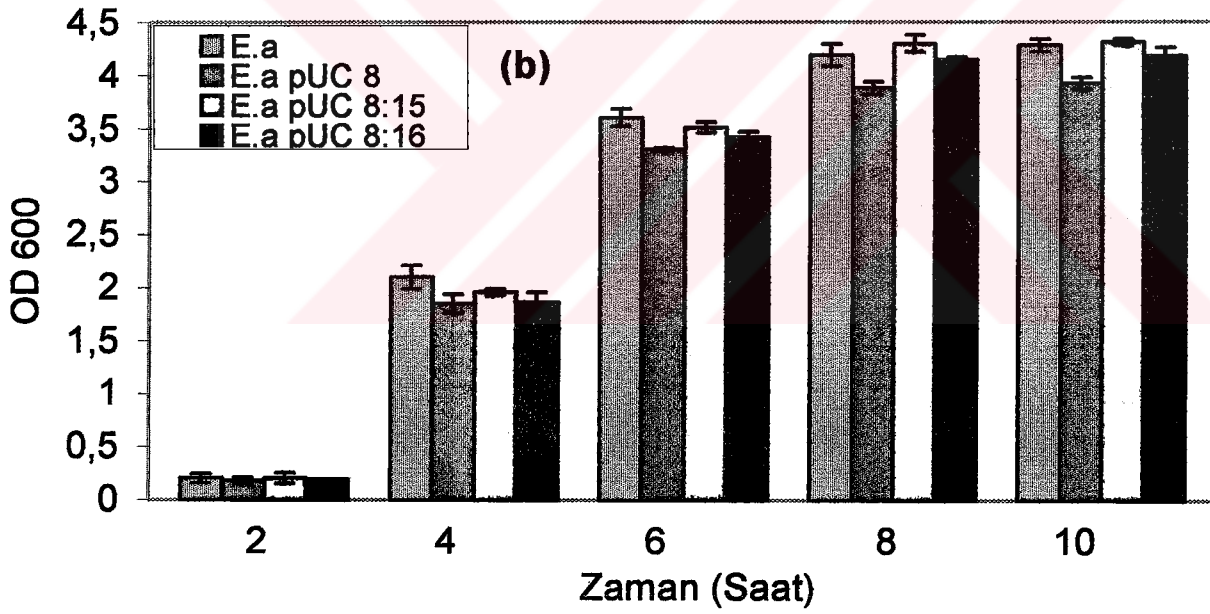
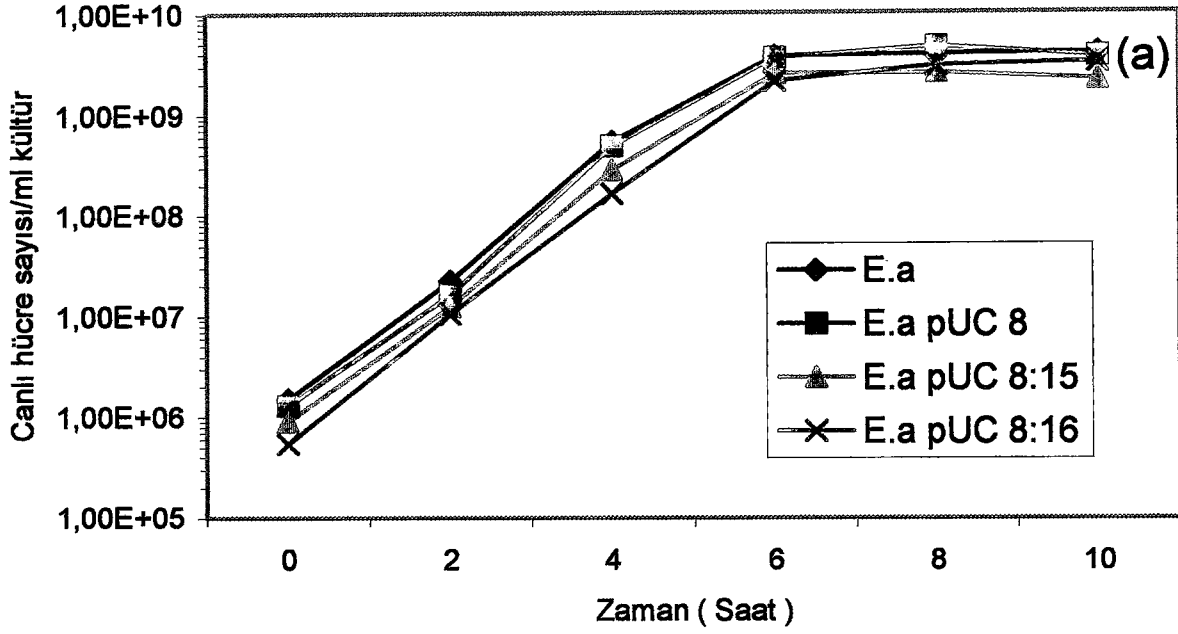
### 3.4. LBG ortamında *E.aerogenes* ve Rekombinant Suşlarının Büyüme ve Spektrofotometrik Değerlerinin Analizi.

Glikoz içermeyen LB besiyeri ortamıyla, kıyaslandığı zaman LBG ortamında VtHb'nin bakteri büyümesine olan etkisinin tüm inkübasyon periyotlarında, *vgb* içermeyenlere göre önemli bir farkgöstermediği belirlenmiştir. Eş zamanlı olarak yapılan ölçümlerde LBG besiyeri ortamında canlı hücre sayısında LB besiyeri ortamındakine göre azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.7).

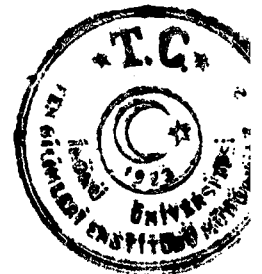
LBG besiyeri ortamında da LB besiyeri ortamı gibi optik densite ile canlı hücre sayısı arasında tam bir ilişki gözlenememiştir. Absorbans artışı 8. saate kadar devam ederken canlı hücre sayısında 6. saatten sonra önemli bir artış olmadığı belirlenmiştir.

LBG besiyeri ortamında 600 nm dalga boyundaki absorbanslarda artış 8. saate kadar sürmüştür sonraki saatte bu artış hemen hemen durmuştur. Bu besi ortamında maksimum hücre yoğunlukları ml kültür başına *Ea* için  $4.1 \times 10^9$ , *Ea* pUC8 için  $4.64 \times 10^9$ , *Ea* pUC8:15 için  $2.52 \times 10^9$  ve *Ea* pUC8:16 için  $3.27 \times 10^9$  hücre olarak saptanmıştır. Büyüme oranları ise *Ea* için 2.31 ( 26dk./jenerasyon); *Ea* pUC8 için 2.5 ( 24 dk./jenerasyon ); *Ea* pUC8:15 için 2.31 ( 26 dk./jenerasyon) ve *Ea* pUC8:16 için 2 ( 30 dk./jenerasyon) olarak belirlenmiştir. Aktif logaritmik fazda 1 OD<sub>600</sub> ise *Ea* için  $2.4 \times 10^8$ , *Ea* pUC8 için  $1.34 \times 10^8$  hücre/ml; *Ea* pUC8:15 için  $1.34 \times 10^8$  hücre/ml; *Ea* pUC8:16 için  $8.4 \times 10^7$  hücre/ml olarak belirlenmiştir.





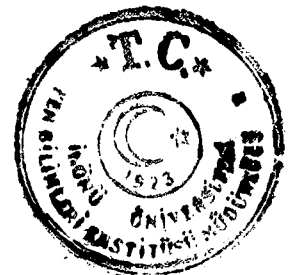
Şekil 3.7. % 1 glikozlu LBG ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının kültürdeki canlı hücre sayıları (a) ve 600 nm deki OD değerleri (b).

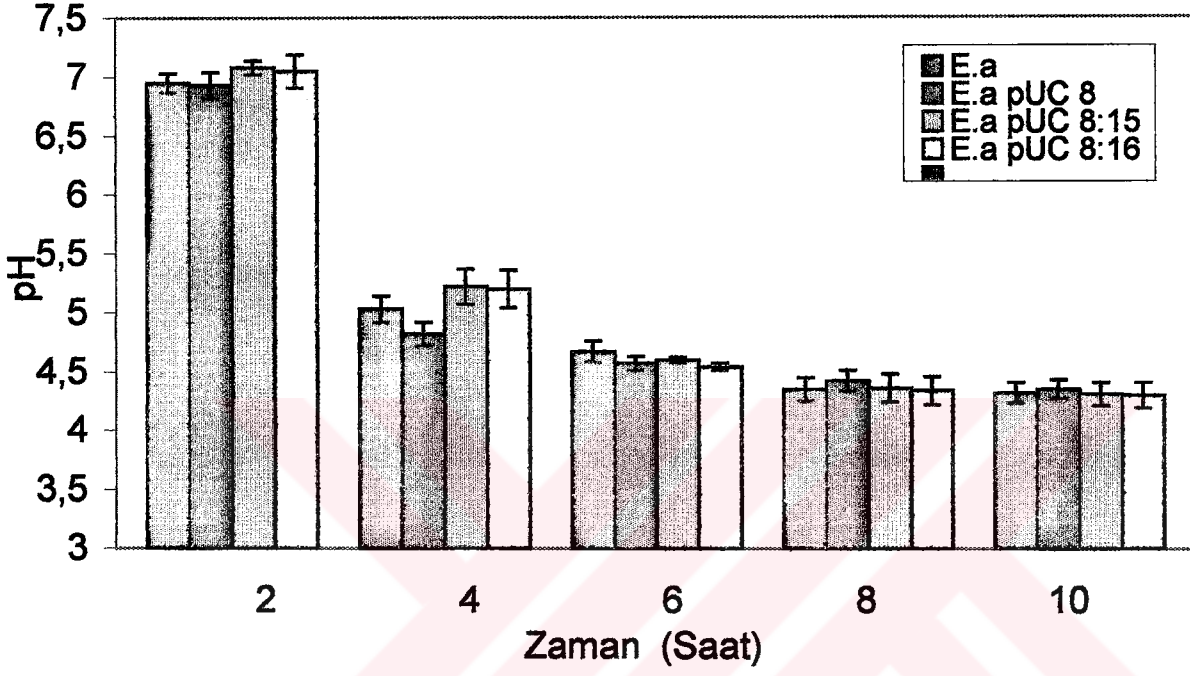


### 3.5. LBG Besi Ortamında *E.aerogenes* ve Rekombinant Suşlarının pH Değerlerinin Analizi.

LBG besiyeri ortamında yapılan ölçümlerde, LB besiyerinde yapılan ölçümlere göre en dikkat çekici fark pH ölçümlerinde gözlenmiştir. Burada glikozun en önemli etkisi, ileri inkübasyon aşamalarında ortamın asiditesinin yükselmesi ile ortaya çıkmıştır. Aktif logaritmik fazda, *vgb* içeren suşların kültür pH'ları diğer iki suştan yaklaşık 0.2-0.5 pH ünitesi arası daha yüksek bulunurken ileri fazlarda 4 suştada benzer pH değerleri ölçülmüştür. Başlangıç pH'sı 7.5'den 4.8-4.5 seviyelerine inmiştir. Yine aktif logaritmik faz boyunca (0-4 saat) ortam asiditesinde hızlı bir artış olurken 6. saatten itibaren bu artış yavaşlamış, ancak devam etmiştir.(Şekil 3.8)

İlginç bulunan bir sonuçta; ortam asiditesindeki büyük artışa rağmen, canlı hücre sayımı değerleri LB besiyeri ortamındaki değerlerle kıyaslandığında az bir oranda düşüş gözlenmiş olmasıdır. LB ortamında 10. saatte pH 8.12-8.20 seviyelerinde iken, LBG besiyerinde 10. saatte pH değeri 4.8-4.5 seviyelerindedir. Aradaki büyük asidite farklılığına rağmen hücre yoğunluğunda fazla bir fark olmaması dikkate değer bir sonuçtur. Her suşun analizini yaparsak *Ea*'nın 2. saatte 6.95 olan pH değeri 10. saat sonunda 4.32 olmuştur. *Ea* pUC8'in pH değeri 2. saatte 6.93 iken 10. saat sonunda 4.35 olmuştur. *Ea* pUC8:15 için 2. saatte 7.08 olan pH değeri 10. saatte 4.31 olmuştur. *Ea* pUC8:16 için 2. saatte 7.05 olan pH değeri son ölçümde 4.30 olmuştur. Genel bilgilerde değinildiği gibi *Enterobacteriaceae* ailesine mensup bakteriler asite karşı dirençli değildirler, buna rağmen hücre yoğunluğunda meydana gelmesi beklenen azalmanın gerçekleşmemesinin nedenlerinden biri *vgb*'nin etkisi olarak düşünülebilir.





**Şekil 3.8. % 1 Glikozlu LBG ortamında *E.aerogenes* ve rekombinant suşlarının pH değerlerini gösteren grafik.**





#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada *vgb* içeren iki rekombinant *Enterobacter aerogenes* suşunun fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin *vgb* içermeyen suşlara göre gösterdikleri farklılıklar araştırılmıştır.

pUC8 plazmidi içine yerleştirilen üzerinde komple *vgb* genini ve onun promotorunu içeren, *Vitreoscilla* kromozomal DNAsından yapılan ve büyüklükleri farklı olan pUC8:15 ve pUC8:16 plazmidlerinin transform edildiği *E.aerogenes*'teki varlıkları, hem bu bakterinin amfisiline olan dirençlerinden ve hem de yapılan plazmid izolasyonu sonucu gösterilmiştir. Ayrıca bu her üç çeşit plazmidin kültür periyodu boyunca kararlı oldukları saptandı. Yapılan plazmid stabilite deneylerinde % 100 plazmid stabilitesinin olduğu görülmüştür. Plazmidlerin bu şekilde stabilitesi yakın bir bakteri olan *Serratia marcescens*'de gözlemlenen durumlarından farklılık arz etmektedir. Daha önce yapılan bir çalışma göstermiştir ki; bu bakteride özellikle pUC8:15 plazmidi oldukça kararsız davranmakta ve stabilitenin sağlanması için aralıklı olarak yeni transformasyonların yapılması gerekmektedir. (Wei ve ark. 1998)

Daha önce yapılan bir çok çalışma; rekombinant proteinlerin plazmid içeren hücreler tarafından sentezlenmesinin, bu hücrelerin plazmid içermeyen hücrelere göre daha düşük bir büyüme oranına sahip olmasına yol açtığını göstermektedir (Georgio, 1988). Ayrıca, büyüme oranı ve maksimum hücre yoğunluğu plazmidin büyüklüğü ile ilişkili olarak etkilenmektedir. Plazmid büyüklüğü arttıkça bu parametrelerde düşüş gözlenmiştir (Cheah, 1987). Bu çalışmada, plazmid içeren *E.aerogenes*'in her üç suşu genel olarak, yabani konakçı hücreye göre daha düşük maksimum hücre yoğunluklarına sahip oldukları görülmüştür. Bu farklılık, *vgb* içeren plazmidi içeren suşun büyüme oranları *Ea* ve *Ea* pUC8'e göre daha büyük görünürken, LBG ortamında VtHb'nin böyle bir etkisi gözlenmemiştir. Bunun bir nedeni; *vgb* promotorunun glukozlu ortamda baskılanmasından kaynaklanabilir. Gerçekten de, önceki çalışmalardan glikozun *vgb* promotoru üzerinde negatif kontrol mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür.



Bu çalışmalar, canlı hücre yoğunlukları ile hücre kütlesi (OD600) arasında tam bir korelasyon olmasa da, her suşun kendi içinde bu değerleri iyi bir şekilde ilişkilendirilebileceğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, bu bakterilerin farklı büyüklükte olmaları ile açıklanabilir. Ayrıca VtHb'nin hücrenin periplazmik bölgesinde yoğun halde bulunduğu ve hücrelerin büyüklüğünü arttırdığı bilinmektedir (Khosla, 1988). Bakteri hemoglobini periplazmik bölgede toplandığı için optik densite değerleri normalden fazla çıkmaktadır. Ancak, bu sonuçlar tam olarak bizim sonuçlar ile paralellik göstermemektedir. Çünkü, örneğin LB besiyeri ortamında *Ea* pUC8:16 aktif logaritmik fazda en yüksek hücre yoğunluğuna sahipken, OD değerlerinde önemli bir fark yoktur. Hatta diğer üç suşa göre daha düşük seviyede OD600 değerlerine sahiptir bu durum *Ea* pUC8:16 hücrelerinin daha büyük değil tam tersi daha küçük olduklarını gösterir. Yine bu besiyeri ortamında *E.a* pUC8:15 ortalama bir hücre yoğunluğuna sahipken, optik yoğunluk olarak en yüksek değerlerde seyrettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, tamamen hücre büyüklüğü ve OD değerleri arasındaki ilişki ile açıklanamamaktadır. Ancak, *vgb*'nin farklı konakçı hücrelerde farklı vektörlerle farklı biyosentezi bu çeşit bir ilişkiye sebep olabilir. Örneğin; VtHb sentezleyen *Ea* pUC8:15 ve *Ea* pUC8:16 suşlarında özellikle LB besiyeri ortamında, bu proteinin hücre içi yoğunluğundan dolayı özellikle ileri inkübasyon periyotlarında besiyeri pembemsi bir renk almaktadır. Bu renk de 600 nm dalga boyunda ışığı absorbe etme özelliği gösterir.

Kültürlerin asit üretimleri LB ve LBG besiyeri ortamlarında tam olarak zıt bir ilişki göstermektedir. LB ortamında başlangıç pH sı olan 7.5'ten aktif logaritmik faz boyunca kısmi bir azalma (pH 7.2'ye kadar) görülmüş ancak, bu fazdan sonra tekrar bir artış gözlemlenmiş ve en son örneklerin alındığı 10. saatte pH değerleri 8-8.2 değerleri arasında gözlenmiştir. Halbuki LBG ortamında başlangıç pH'sı ilk 4 saat içinde pH 7.5'ten pH 5 seviyelerine inmiştir. Buradan sonra pH'nın 4.5 seviyelerinde kararlı kaldığı gözlenmiştir. Bilgilerimize göre; buradaki hücrelere benzer (örneğin *E.coli*) hücreleri kültür ortamındaki pH'sı 4 seviyelerine indiğinde hücrelerin büyümesi durmaktadır.



Ortam pH'sının LBG'li ortamda bu önemli düşüşünün yanında, kültürlerin bu ortamda diğer bir önemli özelliği, vgb içeren suşların *Ea* ve *Ea* pUC8 suşlarına göre canlı hücre yoğunluğunun önemli bir artış göstermesidir. Bu da daha önce bahsedildiği gibi glikozlu ortamda, VtHb tarafından sağlanan pozitif etkinin ortadan kalkmasının bir sonucudur. Çünkü, böyle bir ortamda vgb'nin transkripsiyonu önemli bir ölçüde azalmaktadır. Hatta vgb'nin inhibe edildiği böyle bir ortamda, rekombinant plazmidler konakçı hücreye ekstra bir yük getirmekte ve onların büyüme oranlarını dolayısı ile aynı zaman periyodunda orijinal konakçı hücreye göre hücre sayısının birim kültür ortamında düşüşüne sebep olmaktadır. Yine, bu kültür ortamında da OD600 değerleri ancak her suş için belli sayıda canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilebilir. Bir suş için yapılan genelleme, diğer suşlar için uygulanamaz.

Dolayısı ile bu çalışma göstermiştir ki; VtHb'nin hücrenin fizyolojik parametreleri (hücre sayısı/mlt kültür, büyüme oranı vb.) üzerine etkisi bakteriden bakteriye farklılık göstermektedir. *E.coli*'nin büyümesi üzerine olan pozitif etkisi *E.aerogeneste* tam olarak görülmemektedir; veya en azından aynı seviyede olamamaktadır. Ancak, vgb/VtHb sisteminin farklı ortamlar kullanılması suretiyle (vgb'nin transkripsiyonunu baskılayıcı faktörlerin belirlenmesi ve bunlardan arındırılmış besi ortamlarının kullanılması) amaca uygun kullanımı sağlanabilir.

Yapılan bir çalışma; glikoz konsantrasyonu ayarlanarak vgb/VtHb sistemi ile asetoin ve bütandiol gibi fermantasyon metabolitleri aynı bakteri (*E.a*) tarafından % 50-80 oranlarında arttırılabildiğini göstermiştir (Geçkil, 2001). Bu da göstermektedir ki, canlı hücre yoğunluğu her zaman belli maddelerin sentezi için belirleyici rol oynamayabilir. Hücre sayısı düşük olmakla beraber, hücreler belli bir maddeyi çok daha etkili bir şekilde sentezleyebilirler. Bu çalışma vgb/VtHb sistemi organizmadan organizmaya farklı soruclar verebilmekte olduğunu ve istenen parametrelerin optimisyonunun çalışılan organizmaya göre verilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bir çok mikrobiyal biyoprosesde oksijen, belli bir kritik seviyenin altına düştüğü zaman hücrenin fizyolojik ve metabolik özelliklerinde öyle değişiklikler olur ki; çoğu zaman hücreler bu değişiklikleri kaldıramazlar ve sonuçta büyüme durur.



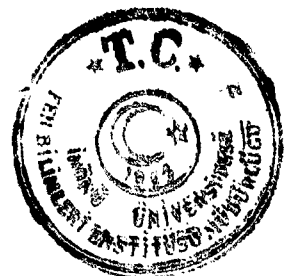
Ayrıca yine bilinmektedir ki rekombinant hücreler, rekombinant olmayan hücelere göre bir büyüme dezavantajına sahiptirler. Vektör hem hücrenin metabolik ve enerji kaynaklarına ortak olur hemde çoğu zaman hücrenin normal metabolik mekanizmalarının değişimine neden olmaktadır. Ayrıca rekombinant hücreler, rekombinant olmayan hücelere göre daha çok oksijene gereksinim göstermekte ve oksijen sınırlı ortamlarda daha zayıf büyümektedirler.

Aynı zamanda, aerobik olarak yapılan hücre kültürlerinde ve çok miktarda mikroorganizma üretimine dayanan çeşitli biyoproseslerde gerekli miktarda oksijen sağlanması önemli problemlerden biridir. Geleneksel olarak bu sorun hücre büyüme ortamlarına dışarıdan oksijen transferiyle giderilmeye çalışılır. Buna alternatif bir yaklaşım ise hücrelerin genetik olarak manipüle edilerek onların oksijen kullanma yeteneklerinin artırılmasıdır.

VtHb'nin iyi bir oksijen taşıma ve bağlama proteini olması sebebi ile böyle bir amaçla kullanılması son yıllarda uygulama alanı bulmuştur. Gerçektende VtHb'nin düşük oksijenli ortamlarda hem toplam hücre proteini hem de rekombinant protein sentezini arttırdığı görülmüştür. Bakteriyel hemoglobin, optimal eldeleri belli bir oksijen seviyesine ihtiyaç duyan önemli bir çok fermantasyon ürününün üretiminde önemli bir ihtiyaç sağlayabilir. Her ne kadar fermantasyon anaerobik bir metabolik yol ise de bir çok fermantasyon ürününün üretimi belli bir kritik oksijen konsantrasyonu gerektirdiği bilinmektedir. Bu mikroorganizmanın reaktör ortamında yaşaması için bir gereksinimdir. VtHb ile sağlanan bu avantaj çeşitli doğal fermantasyon ürünlerinin üretiminin artırılmasında kullanılabilir VtHb'nin organizmalar üzerine olabilecek etkileri araştırmacılar için konu olmuş ve *E.coli*, *E.aerogenes*, *S.marcentens* gibi heterolog organizmaların metabolik ve fizyolojik aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış, bu proteinin rekombinant organizmaların daha iyi büyümesini sağladığı ve metabolit üretimini arttırdığı saptanmıştır. Bir çok bakterinin yaşaması için belirli bir seviyedeki oksijen miktarı önemli rol oynar. Önceki çalışmalar, heterolog (*Vitreoscilla* hariç) bakterilerde VtHb, kritik oksijen seviyelerinde bu bakterilerin daha iyi büyümesini sağladığı ve rekombinant protein üretimini arttırdığını göstermiştir. Aerobik ve fermantatif mikroorganizma



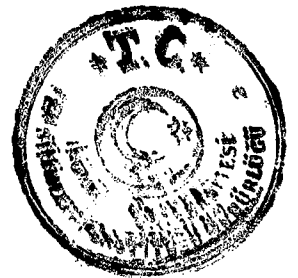
kültürlerine uygun oranlarda oksijen sağlanması, büyük ölçekte üretim yapan biyoprosesler için en önemli sorunlardan birini teşkil eder. Bunun için geleneksel metod, hücre büyüme ortamına dışarıdan oksijen transferidir. Buna alternatif ise, hücrelerin ortam oksijenini daha etkili kullanacak şekilde genetik manipulasyonlarının yapılmasıdır. Bu bağlamda, VtHb'nin *E.coli* dışındaki tarımsal ve endüstriyel olarak önemli organizmalarda kullanılması önemli avantaj sağlayabilir. VtHb ile sağlanan bu avantaj çeşitli doğal fermantasyon ürünlerinin üretiminin arttırılmasında kullanılabilir.



## ÖZGEÇMİŞ

Şebnem ÖZALP ERENLER.

1976 yılında Malatya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Malatya’da tamamladı. 1992 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümüne girdi. 1996 yılında mezun oldu. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programına devam etme hakkını kazandı, 1997 yılında Yüksek Lisans programına devam etmeye başladı. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Yüksek Lisansın ders aşamasından sonra, “Bakteri hemoglobin geninin (VtHb) *Enterobacter aerogenes*’in Fizyolojik ve Metabolik Aktiviteleri Üzerine Etkileri “ konu başlıklı bir tez hazırladı.



## KAYNAKLAR

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1992).** Current Protocols In Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

**Boerman, R.L and Webster, D.A (1982).** Control of heme content in *Vitreoscilla* by oxygen. Journal of General and Applied Microbiology 28:35-43

**Chen, W., Hughes, D.E., and Bailey, J.E. (1994) .** Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnological Progress 10:308-313

**Cheah, U.E., Weigand, W., and Stark, B.C. (1987)** Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *E.coli* Plasmid 18:127-134

**Crow, V.L. (1990).** Properties of 2,3- butanediol dehydrogenases from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* in relation to citrate fermentation. Applied and Environmental Microbiology 56:1656-1665.

**Dikshit, K.L., Dikshit, R.P., Liu, Y. and Webster, D.A. (1992).** The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *E.coli* lacking terminal oxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics 293:241-245.

**Dikshit, K.L., Spaulding , D., Braun A. and Webster, D.A. (1989)** Oxygen inhibition of globilin gene transcription and bacterial hemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*. Journal of General Microbiology 135:2601-2610.

**Dikshit, K.L and Webster, D.A. (1988).** Cloning, characterization and expression of bacterial globilin gene from *Vitreoscilla* in *E.coli*. Nature 331:633-635.



**Dikshit, K.L., Dikshit, R.P., and Webster, D.A.** (1990). Study of *Vitreoscilla* globilin gene (*vgb*) expression and promoter activity in *E.coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Research* 18:4149-4155.

**Dikshit, K.L., Dikshit, R.P., and Webster, D.A.** (1991). Transcriptional control of *Vitreoscilla* hemoglobin synthesis . In “ Structure and Function of Invertebrate Oxygen carries” Springer-Verlag New York. pp.313-321

**Geckil, H.,** (1995). Effect of bacterial hemoglobin on microorganisms and its use for the optimization of aseton and butanediol production by *Enterobacter aerogenes* ( Ph. D. Thesis)

**Geckil, H., Benjamin C. Stark, Dale A. Webster** (2001) Cell growth and oxygen uptake of *E.coli* and *P.aeruginosa* are differently effected by the genetically engineered *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Journal of Biotechnology*. 85:57-66

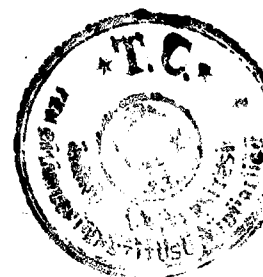
**Georgiou, C.D. and Webster, D.A.** (1987). Identification of b,c, and d cytochromes in the membrane of *Vitreoscilla*. *Archives in Microbiology* 148:328-333

**Grinsted J., Bennett P.M.** (1988) *Plasmid Technology*

**Hart, R.A., Kallio, P.T., and Bailey, J.E** (1994). Effect of biosynthetic manipulation of heme on insolubility of *Vitreoscilla* hemoglobin in *E.coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 7:2431-2437

**Holmberg. N., Lilius, G., Bailey, J.E. and Bulow, L.**(1997). Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nature Biotechnology* 15 (3) : 244-247

**Joshi, M. And Dikshit, K.L.**(1994). Oxygen dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by Fnr. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202:535-542.





**Khosla ,C. and Bailey, J.E. (1989).**Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *E.coli*. *Journal of Molecular Biology* 210:79-89

**Khosla ,C. and Bailey, J.E.(1988).**The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *E.coli*. *Molecular and General Genetics* 214:158-161

**Khosla ,C. and Bailey, J.E.(1988).** Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *E.coli*. *Nature* 331:633-635

**Khosla ,C. and Bailey, J.E.(1988).***Mol Gen Genetic* 214:158-161

**Khosla ,C. and Bailey, J.E.(1989).***J. Bacteriol* 171:5995-6004

**Khosla ,C. Curtis, J.E., DeModena, J.,Rinas, U. and Bailey, J.E.(1990).**Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *E.coli*. *Biotechnology* 8:849-853.

**Khosravi,M. (1991)** Use of genetic engineering to optimize protein production in recombinant *E.coli* .Ph.D.Thesis, Illinois Institute of Technology, Chicaco.

**Khosravi, M., Webster, D.A and Stark, B.C (1990)**Presence of the bacterial hemoglobine improves alpha amylase production of a recombinant *E.coli* strain. *Plasmid* 24:190-194

**Khosravi, M., Ryan W., Webster, D.A and Stark, B.C (1990).**Variation of oxygen requirement with plasmid size in recombinant *E.coli*. *Plasmid* 23:138-143

**Kroneck, P.M.H., Jacob,W.,Webster, D.A. and DeMario, R.(1991).** Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*: redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein. *Bio Metals* 4:11-25



**Mei-Ling Wei, Dale A. Webster, Benjamin C. Stark.** (1997) Genetic engineering of *Serratia marcescens* with Bacterial hemoglobin gene: Effect on Growth, oxygen utilization, and cell size. Biotechnol Bioengineering

**Miller, J.H.**(1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring harbor, N.Y., PP.433.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, J.**(1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour, N.Y.

**Seo, J., and Bailey, J.E.** Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *E.coli*. Biotechnol. Bioeng. 27:1668-1674

**Seo, J., and Bailey, J.E.** Cell cycle analysis of plasmid-containing *E.coli* HB101 population with flow cytometry. Biotechnol. Bioeng. 30:297-305

**Serebnikov, V.M., Novosel'tseva, O.N and Bezborodov, A.M.** (1992). Effect of aeration on acetoin and 2,3-butanediol biosynthesis in *Bacillus polymyxa* cultures. Translated from Prikladnaya Biokhimiya Microbiologiya, Russian Academy of Sciences, Moscow. Plenum Publishing Corporation. Pp.60-68.

**Wakabayashi, S., Matsubara, H. and Webster, D.A.** (1986). Primary sequence of a dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* Nature. 322:481-483

**Webster, D.A.** (1987). Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins. In "Advances in Inorganic Biochemistry". Vol 7, pp.245-265. Elsevier New York

UZBEKISTON RESPUBLIKASI  
TILSHUNOQ-KUTUBXONA MARKAZI

