

Bakteri ve Archaea'ların Genetiđi

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Mikrobiyoloji

Bölüm 11

Vibrio cholerae'nin İki Yaşam Tarzı

- *V. cholerae* hem deniz ortamlarında hem de besin açısından zengin insan bağırsağında yaşamaya uyum sağlayan bir bakteri olarak karşımıza çıkar.
- Bu patojen, toksin salgılayarak yeni konaklara geçişini sağlayan şiddetli ishal tablolarına yol açar.
- İnsan dışı ortamlarda ise *V. cholerae* besin rekabetini azaltmak için komşu mikropları öldüren proteinlerden oluşan güçlü bir cephanelik kullanır.
- Bu saldırgan strateji bakterinin hem çevrede hem de konak içinde başarılı olmasını destekler.

T6SS: Mikrobiyal Bir Mızrak

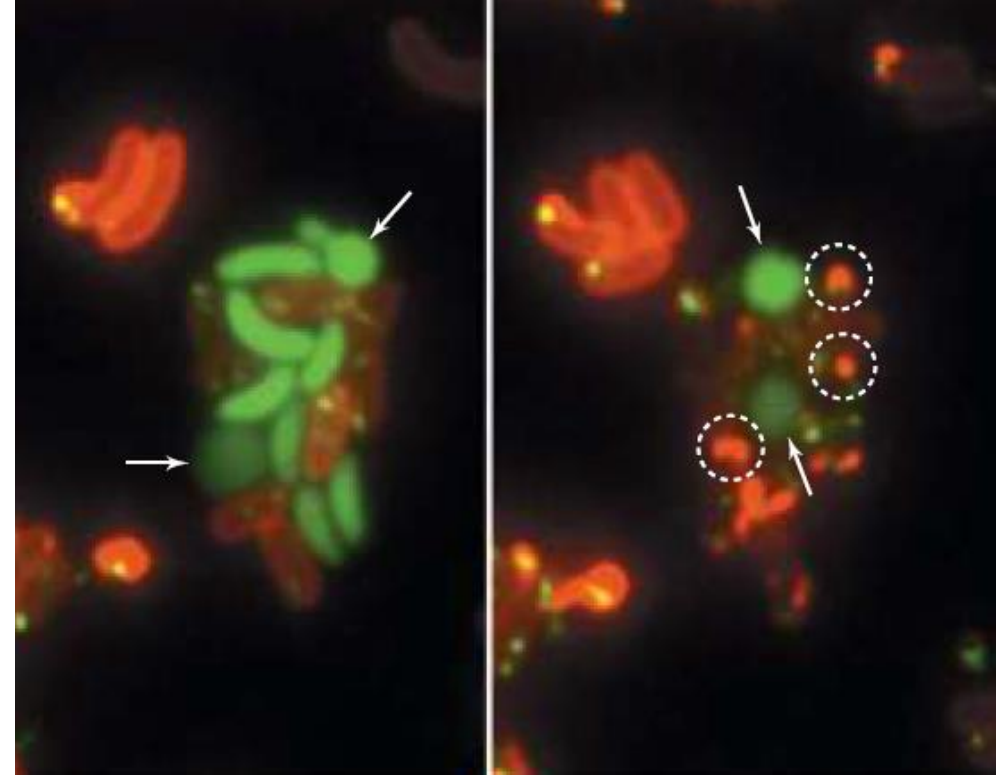
- *V. cholerae* komşu hücrelere toksik “effektör” moleküller enjekte etmek için tip VI salgı sistemi olarak bilinen kontraktıl bir yapıyı kullanır.
- T6SS ile hedeflenen hücreler, bu toksinlere karşı bağışık değillerse parçalanarak içeriklerini ortama salar.
- Av hücrelerinin parçalanması hem rekabeti azaltır hem de ortama yeni besinler bırakır.
- Bu mekanizma bakterinin doğal ekosistemlerde üstünlük sağlamasını mümkün kılar.

Avdan Gelen DNA: Doğal Transformasyon

- Araştırmacılar, *V. cholerae*'nin T6SS ile öldürdüğü av hücrelerinden açığa çıkan DNA'yı doğal kompetens sistemiyle alabildiğini göstermiştir.
- Bu DNA alım sistemi, bir seferde yaklaşık 40 gene kadar genetik materyalin hücre içine taşınmasına izin verir.
- Alınan DNA parçaları kromozomla birleştğinde *V. cholerae* popülasyonuna seçim avantajı kazandırabilir.
- Böylece predasyon sadece besin elde etme yöntemi değil, aynı zamanda genetik çeşitlenme aracı hâline gelir.

Hücresel Görüntülerde Av ve Avcı

- Yandaki görüntülerde kompetens sistemine ait DNA alım proteinleri kırmızı, T6SS proteinleri ise yeşil floresan işaretleyicilerle gösterilmiştir.
- Bu nedenle avcı *V. cholerae* hücreleri kırmızı görünürken, içlerinde yeşil “yay-kırbaç” benzeri T6SS yapıları seçilir.
- T6SS ve bağışıklık sisteminden yoksun av hücreleri ise tekdüze yeşil renkte görülür.
- Görüntünün sol panelinde avcıların av hücrelerine saldırdığı; sağ panelde ise 30 dakika sonra DNA alım bölgelerinin belirginleştiği gözlenir.



Genetik Hırsızlığın Sonuçları

- *V. cholerae*'nin avdan DNA çalabilmesi, antibiyotik direnci veya yeni virölans faktörleri gibi değerli özellikleri kazanmasını mümkün kılar.
- Bu yatay gen transferi biçimi bakterinin ekolojik rekabet gücünü artırır.
- Predasyon böylece hem besin kazanımı hem de genetik gelişim için çift yönlü bir strateji hâline gelir.
- Bu durum mikrobiyal savaşın evrimsel sonuçlarını anlamamız açısından önemlidir.

Tarihsel Bir Atılım: Lederberg'in Keşfi

- Joshua Lederberg 1946 yılında bakterilerin de tıpkı bitkiler ve hayvanlar gibi gen alışverişi yapabildiğini keşfederek bilimde çığır açmıştır.
- Bu keşif kendisine Nobel Ödülü kazandırmış ve moleküler biyoloji alanının şekillenmesinde önemli rol oynamıştır.
- Bakterilerde genetik rekombinasyonun gösterilmesi, gen işleyişini anlamak için bakterilerin model organizma olarak kullanılmasını sağlamıştır.
- Böylece mikrobiyal genetik çeşitliliğin kaynağına ilişkin temel sorular yanıt bulmaya başlamıştır.

Çeşitliliğin Kaynağı: Gen Değişimi ve Mutasyon

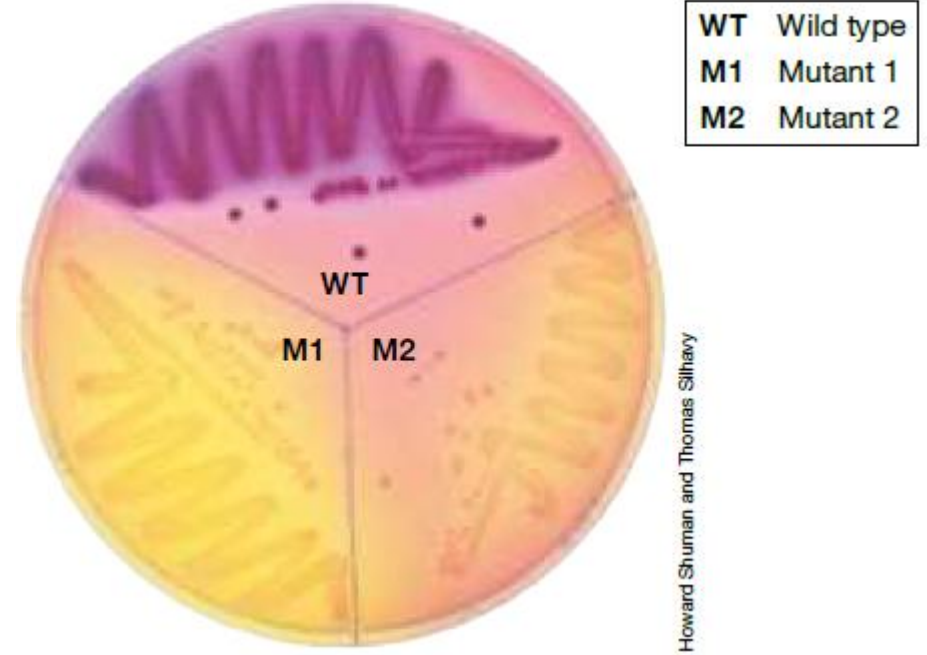
- Bakteri ve Archaea türlerinin eşeyssel çoğalmadan yoksun olmalarına rağmen büyük bir çeşitlilik göstermesinin nedeni gen değişimi ve rastlantısal genetik yeniliklerdir.
- Gen alışverişi ve mutasyon birlikte çalışarak yeni özelliklerin seçimle yayılmasına zemin hazırlar.
- Bu süreçler mikroorganizmaların farklı habitatlara uyumunu mümkün kılar.
- Genomdaki değişimler kadar genom kararlılığı sağlayan mekanizmalar da evrimsel başarı için önem taşır.

Mutasyon Kavramının Temelleri

- Mutasyon, bir hücrenin genomundaki baz dizisinin nesilden nesle aktarılabilir şekilde değişmesi anlamına gelir.
- Mutasyonların bazıları yararlı, bazıları zararlı, büyük çoğunluğu ise nötr olup belirgin bir etki oluşturmaz.
- Prokaryot hücrelerin hızlı bölünme hızları mutasyonların popülasyonda beklenenden çok daha hızlı birikmesini sağlar.
- Ancak mutasyonlar genellikle küçük değişimler yaratırken, gen alışverişi çok daha büyük ölçekte farklılık oluşturabilir.

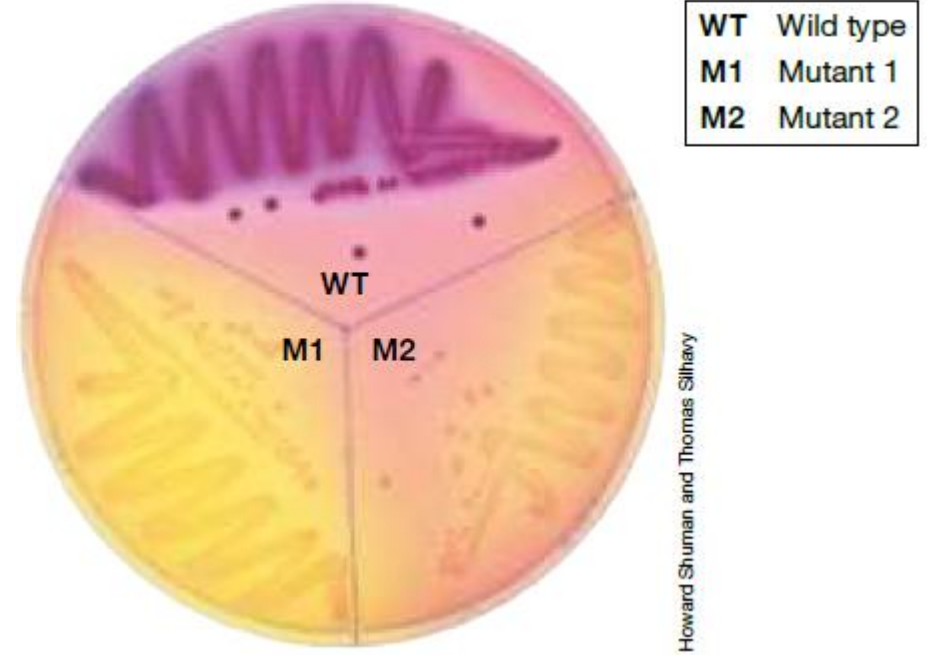
Mutasyonların Mekanizması ve Mutantların Özellikleri

- Genomlar hücrelerde çift sarmallı DNA'dan, bazı virüslerde ise çift ya da tek sarmallı DNA veya RNA'dan oluşur.
- Doğal çevreden izole edilen bir türün referans kalıtımı “wild -type” (yabanıl tip) olarak adlandırılır.
- Yabanıl tip dizideki herhangi bir değişikliği taşıyan hücre veya virüs “mutant” olarak tanımlanır.
- Mutantın genotipi değişirken fenotipi de değişebilir.



Yabanıl Tip, Mutant ve Fenotip İlişkisi

- “Yabanıl tip” terimi tüm organizmayı ya da incelenen belirli bir geni ifade etmek için kullanılabilir.
- Mutantlar doğrudan yabanıl tip suştan ya da daha önce mutasyona uğramış başka bir ebeveyn suştan türetilebilir.
- Yanda, MacConkey agar üzerinde şeker-fermentasyon yeteneği bakımından yabanıl tip *E. coli* ile mutant türevler arasındaki fenotip farkı görülmektedir.
- Bu fenotipik değişim genetik dizideki farklılığın hücredeki işlevsel sonuçlarını yansıtır.



Genotip ve Fenotipin Gösterimi

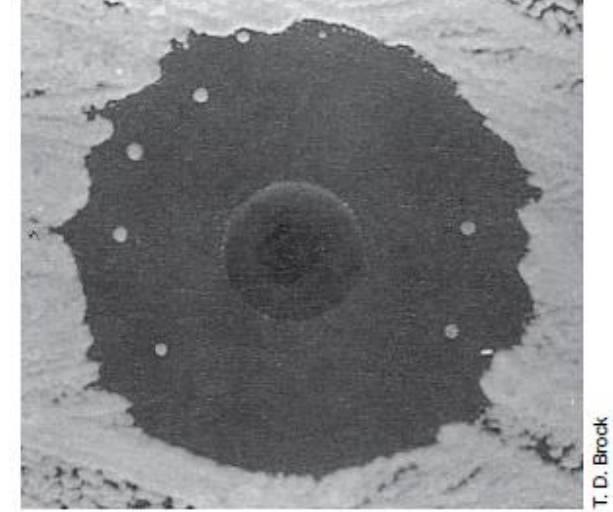
- Bakteriyel genetikte genotip üç küçük harf ve bir büyük harfle (italik) ifade edilir; örneğin *hisC* geni histidin biyosentezinde görev alan HisC proteinini kodlar.
- Aynı genin farklı mutantları *hisC1*, *hisC2* gibi numaralandırılarak tanımlanır.
- Fenotip ise bir büyük harf ve iki küçük harfle, yanı sıra + veya – işareti ile gösterilir.
- Örneğin His⁺ suş histidin sentezlerken, His⁻ suş bu aminoasidi sentezleyemez ve *hisC* mutasyonu işlev kaybına yol açarsa His⁻ fenotipi ortaya çıkar.

Mutant İzolasyonuna Giriş

- Bir organizmanın neredeyse her özelliği mutasyonla değişebildiği için mutant izolasyonu genetik çalışmaların temel bir adımını oluşturur.
- Mutasyonlar bazı durumlarda organizmaya avantaj sağlayarak seçilebilir hâle gelir, bazı durumlarda ise fenotipte belirgin değişiklik oluştursa bile seçilemez nitelikte olur.
- Seçilebilir mutasyonlar, uygun çevresel koşullarda mutant hücrelerin ebeveyn hücreleri geride bırakmasına olanak tanır.
- Bu nedenle seçilebilir mutasyonların tespiti, genetik analizlerde sıklıkla tercih edilen güçlü bir yaklaşımdır.

Seçim (Selection) Kavramı ve Örneği

- Seçilebilir mutasyonların izolasyonu, uygun çevresel koşullar sağlandığında oldukça kolaylaşır.
- Antibiyotik direnci gibi mutasyonlar, mutantın antibiyotik varlığında büyüyebilirken ebeveyn hücrenin etkilenmesiyle açık bir avantaj sağlar.
- Antibiyotik dirençli bir mutantın, antibiyotiğin öldürdüğü veya engellediği ebeveynin yerine geçmesi bu durumu net biçimde gösterir (Figür a).
- Bu bağlamda seçim yöntemi, milyonlarca hücre içeren bir popülasyondan tek bir mutantı bile ayırmayı mümkün kılan güçlü bir genetik araçtır.



T. D. Brock

(a)



Steven R. Spilatro

(b)

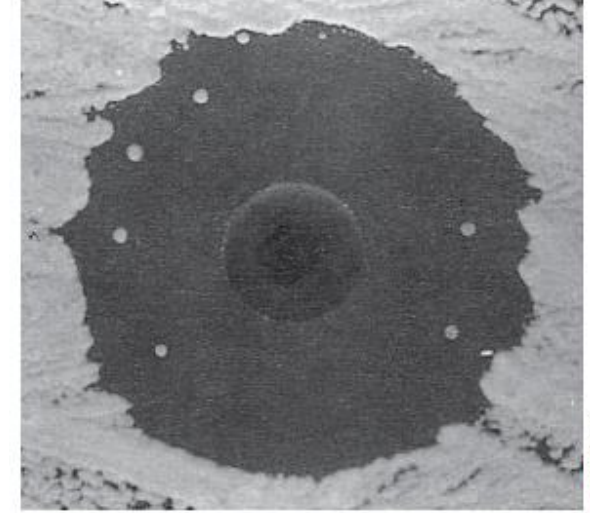


Shiladitya DasSarma, Priya Arora, Lone Simonsen

(c)

Seçilemeyen (Nonselectable) Mutasyonlar ve Tarama (Screening)

- Bazı mutasyonlar fenotipte belirgin değişiklik oluştursa bile laboratuvar koşullarında ne avantaj ne dezavantaj sağlar.
- Pigment kaybı bunun tipik bir örneği olup, bu tür mutasyonlar koloniler incelenerek ayırt edilebilir (Figür b, c).
- Bu tür mutasyonları belirlemek için çok sayıda koloninin tek tek gözlenmesi gerekir ve bu süreç tarama olarak adlandırılır.
- Tarama genellikle seçim yöntemine göre daha zahmetli olduğundan, seçimin mümkün olduğu durumlarda her zaman daha çok tercih edilir.



T. D. Brock

(a)



Steven R. Spiliato

(b)

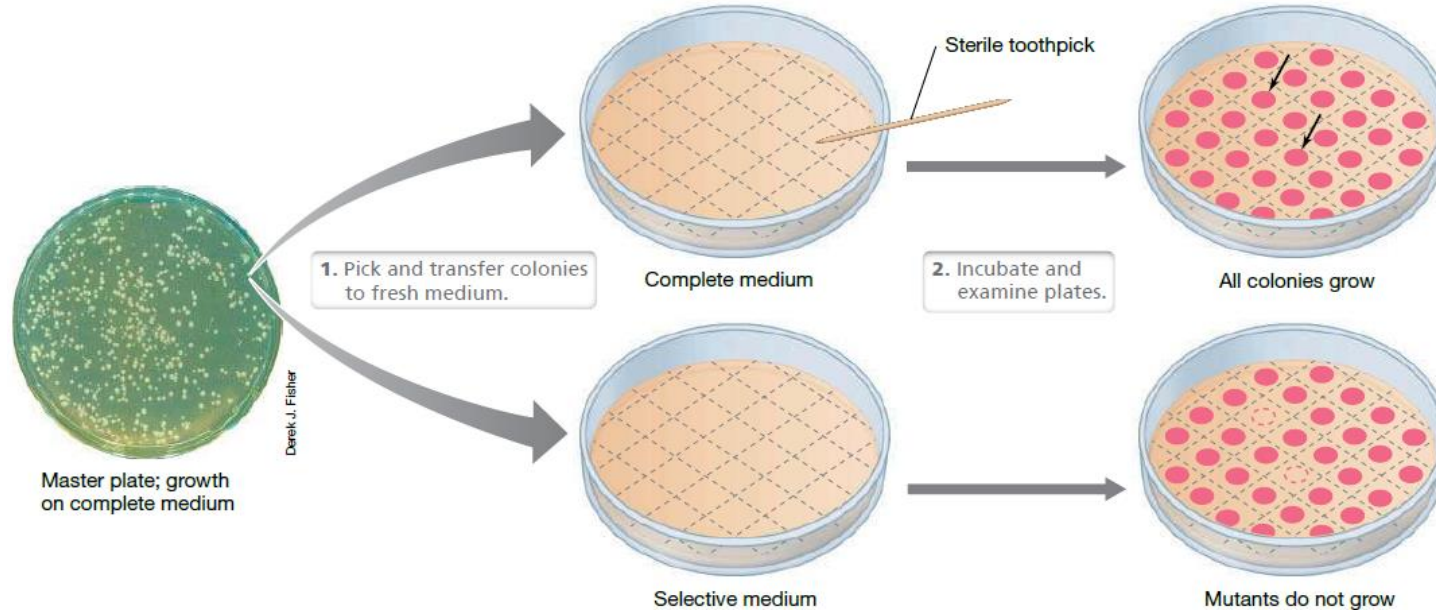


Shiladitya DasSarma, Priya Arora, Lone Simonsen

(c)

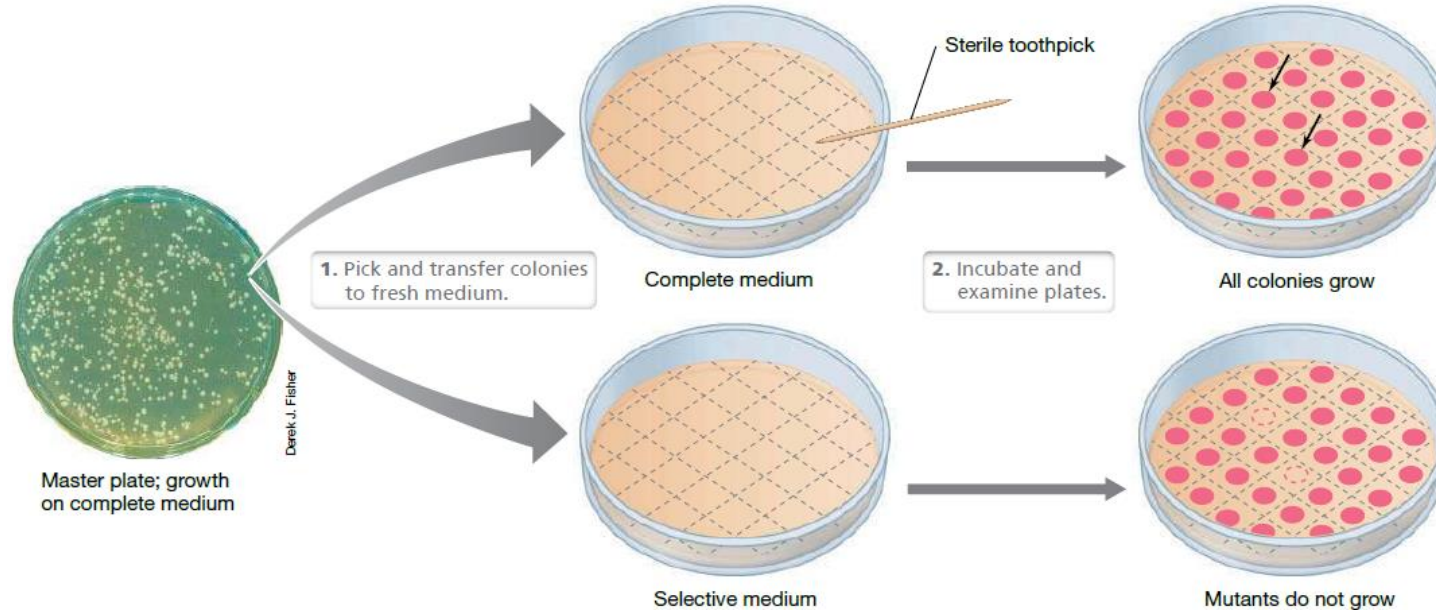
Besinsel Oksotrof Mutantların Tarama Yöntemleri

- Seçimden daha zahmetli olsa da, belirli mutasyon türlerini taramak için etkili yöntemler geliştirilmiştir.
- Besinsel açıdan kusurlu mutantların belirlenmesinde sıkça kullanılan tekniklerden biri replica plating (replika ekim) yöntemidir.



Besinsel Oksotrof Mutantların Tarama Yöntemleri

- Master plaktaki bir koloni, içeriğinde belirli bir besin olmayan ortama aktarılır ve büyüemeyen koloniler mutasyonun varlığına işaret eder.
- Replika plaktaki boşluğa karşılık gelen master plak kolonisi daha sonra seçilerek saflaştırılır ve karakterize edilir.



Oksotrof ve Prototrof Kavramları

- Büyüme için ek bir besine ihtiyaç duyan mutantlar oksotrof olarak adlandırılırken, bunların türediği ebeveyn suş prototrof olarak bilinir.
- Örneğin His⁻ fenotipli *E. coli* mutantları histidin oksotrofu iken, bu mutantların türediği His⁺ suş ise prototroftur.
- Aynı fenotipe yol açan birçok farklı mutasyon bulunabileceği için metabolik bir yolun genetiğini incelemeye birden fazla His⁻ suşun izole edilmesi yararlı olur.
- Bu yaklaşım, örneğin histidin biyosentezi gibi bir yolun genetik çözümlemesinin ilk basamaklarından biridir.

Mutant Sınıfları ve Tanımlama Yöntemleri

- Çeşitli mutant sınıflarının ve bunların tespit yöntemlerinin örnekleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.
- Bu sınıflandırmalar, farklı fenotipleri inceleyen genetik çalışmalar için temel bir başvuru niteliği taşır.

Some examples of mutants		
Phenotype	Nature of change	Detection of mutant
Auxotroph	Loss of enzyme in biosynthetic pathway	Inability to grow on medium lacking the nutrient
Temperature-sensitive	Alteration of an essential protein so it is more heat-sensitive	Inability to grow at a high temperature that normally supports growth
Cold-sensitive	Alteration of an essential protein so it is inactivated at low temperature	Inability to grow at a low temperature that normally supports growth
Drug-resistant	Detoxification of drug or alteration of drug target or permeability to drug	Growth on medium containing a normally inhibitory concentration of the drug
Rough colony	Loss or change in lipopolysaccharide layer	Granular, irregular colonies instead of smooth, glistening colonies
Nonencapsulated	Loss or modification of surface capsule	Small, rough colonies instead of larger, smooth colonies
Nonmotile	Loss of flagella or nonfunctional flagella	Compact instead of flat, spreading colonies; lack of motility by microscopy
Pigmentless	Loss of enzyme in biosynthetic pathway leading to loss of one or more pigments	Presence of different color or lack of color
Sugar fermentation	Loss of enzyme in degradative pathway	Lack of color change on agar containing sugar and a pH indicator
Virus-resistant	Loss of virus receptor	Growth in presence of large amounts of virus



Mutant Sınıfları ve Tanımlama Yöntemleri

- Böylece araştırmacılar, hangi mutasyon türünün hangi teknikle saptanabileceğini sistematik olarak değerlendirebilir.
- Tablo, mutasyon analizine giriş yapan öğrenciler için önemli bir kavramsal çerçeve sunar.

Some examples of mutants		
Phenotype	Nature of change	Detection of mutant
Auxotroph	Loss of enzyme in biosynthetic pathway	Inability to grow on medium lacking the nutrient
Temperature-sensitive	Alteration of an essential protein so it is more heat-sensitive	Inability to grow at a high temperature that normally supports growth
Cold-sensitive	Alteration of an essential protein so it is inactivated at low temperature	Inability to grow at a low temperature that normally supports growth
Drug-resistant	Detoxification of drug or alteration of drug target or permeability to drug	Growth on medium containing a normally inhibitory concentration of the drug
Rough colony	Loss or change in lipopolysaccharide layer	Granular, irregular colonies instead of smooth, glistening colonies
Nonencapsulated	Loss or modification of surface capsule	Small, rough colonies instead of larger, smooth colonies
Nonmotile	Loss of flagella or nonfunctional flagella	Compact instead of flat, spreading colonies; lack of motility by microscopy
Pigmentless	Loss of enzyme in biosynthetic pathway leading to loss of one or more pigments	Presence of different color or lack of color
Sugar fermentation	Loss of enzyme in degradative pathway	Lack of color change on agar containing sugar and a pH indicator
Virus-resistant	Loss of virus receptor	Growth in presence of large amounts of virus



Mutasyonların Moleküler Temelleri: Genel Bakış

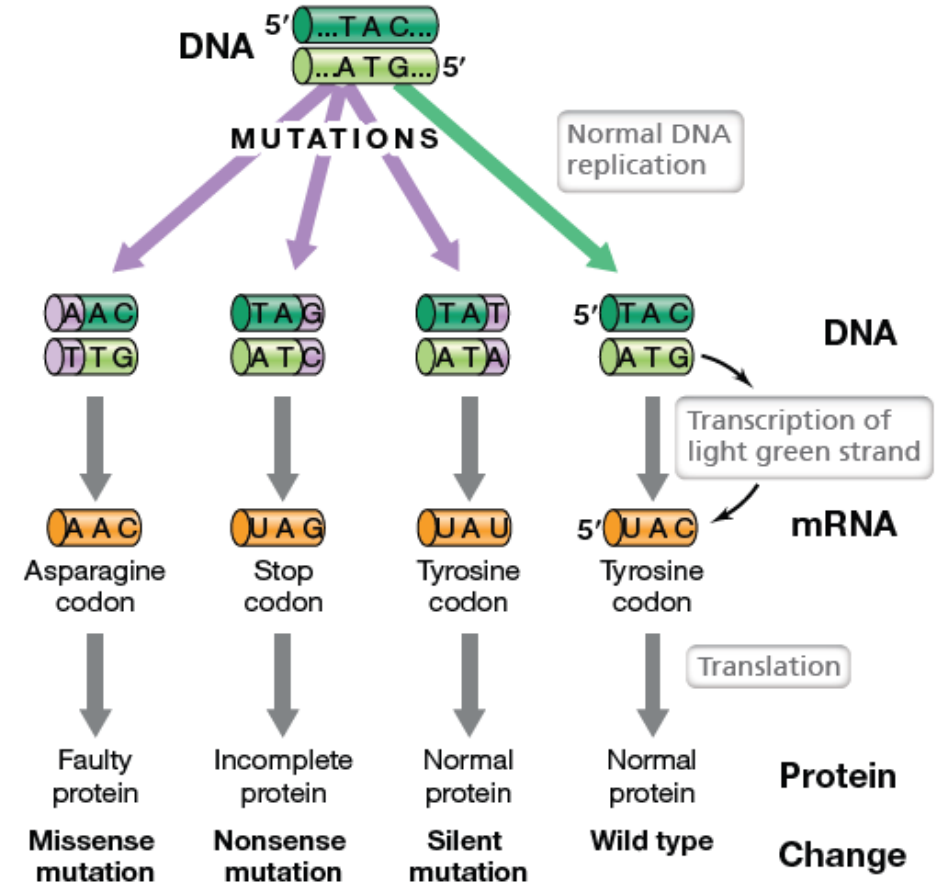
- Mutasyonlar spontan veya indüklenmiş şekilde ortaya çıkabilir ve bu iki durum farklı mekanizmalarla gerçekleşir.
- Spontan mutasyonlar dış müdahale olmaksızın, çoğunlukla DNA polimerazın baz eşleştirme hatalarından kaynaklanır.
- İndüklenmiş mutasyonlar ise doğal radyasyon veya DNA'yı kimyasal olarak değiştiren ajanlar gibi çevresel faktörlerle oluşur.
- Bazı indüklenmiş mutasyonlar insanlar tarafından da bilinçli olarak oluşturulabilir.

Nokta Mutasyonlar ve Fenotip Üzerindeki Etkileri

- Tek bir baz çifti değiştiğinde ortaya çıkan mutasyonlar nokta mutasyonu olarak adlandırılır.
- Nokta mutasyonlar DNA'da yalnızca tek bir baz çifti değişimi içerir.
- Bu tür mutasyonlar çoğu zaman belirgin bir fenotip oluşturmaz.
- Ancak fenotipik değişikliğin olup olmaması mutasyonun genomdaki konumuna ve gerçekleşen nükleotid değişiminin türüne bağlıdır.

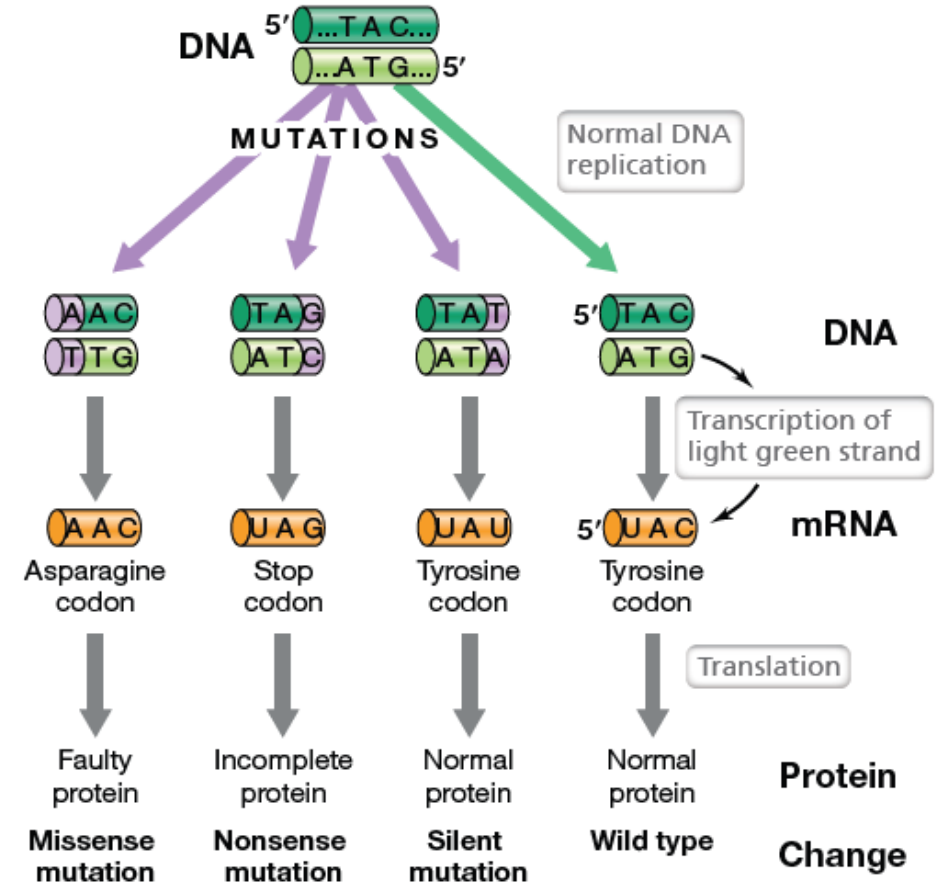
Baz Çifti Substitüsyonlarının (Değişimlerinin) Genel Etkisi

- Bir nokta mutasyonu bir polipeptidi kodlayan bölgede gerçekleştiğinde, ortaya çıkan fenotipik değişiklik çoğunlukla polipeptidin amino asit dizisindeki değişimden kaynaklanır.
- DNA'daki hatanın mRNA'ya transkripsiyonu ve bu hatalı mRNA'nın translasyonu sonucunda değişmiş bir polipeptid üretilir.
- Baz çiftlerindeki değişimlerin olası sonuçları yanda verilmiştir ve bu mutasyonların protein yapısını nasıl etkileyebileceği özetlenmiştir.
- Genetik kodun dejeneratif yapısı bazı mutasyonların polipeptidi değiştirmeden kalmasına olanak tanır.



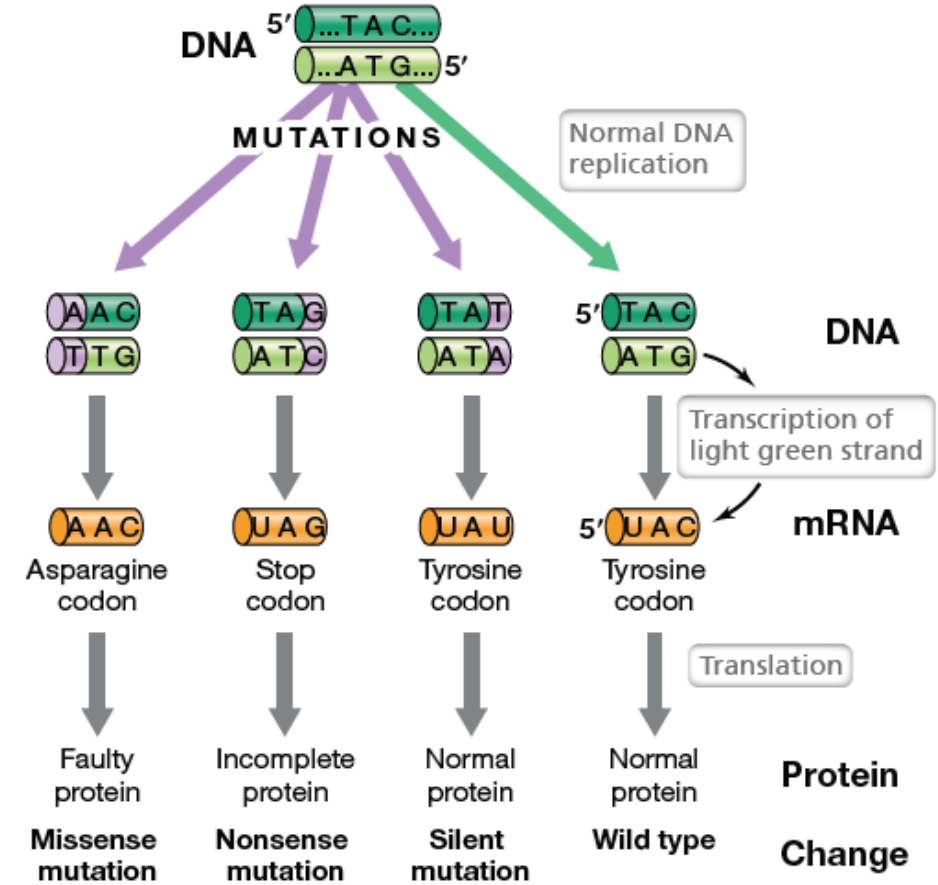
Sessiz (Silent) Mutasyonların Özelliği

- Yanda gösterildiği gibi UAC kodonunun UAU'ya dönüşmesi polipeptitte hiçbir değişikliğe yol açmaz çünkü her iki kodon da tirozin kodlar.
- Bu tür değişiklikler polipeptidin amino asit dizisini etkilemediği için sessiz mutasyon olarak adlandırılır ve hücre fenotipinde değişiklik oluşturmaz.
- Kodlayan bölgelerdeki sessiz mutasyonlar neredeyse her zaman kodonun üçüncü bazında ortaya çıkar ve bu durum kodon yapısının dejeneratif özelliğiyle ilişkilidir.
- Arjinin ve lösün gibi bazı amino asitlerde sessiz mutasyon kodonun ilk bazında da gerçekleşebilir.



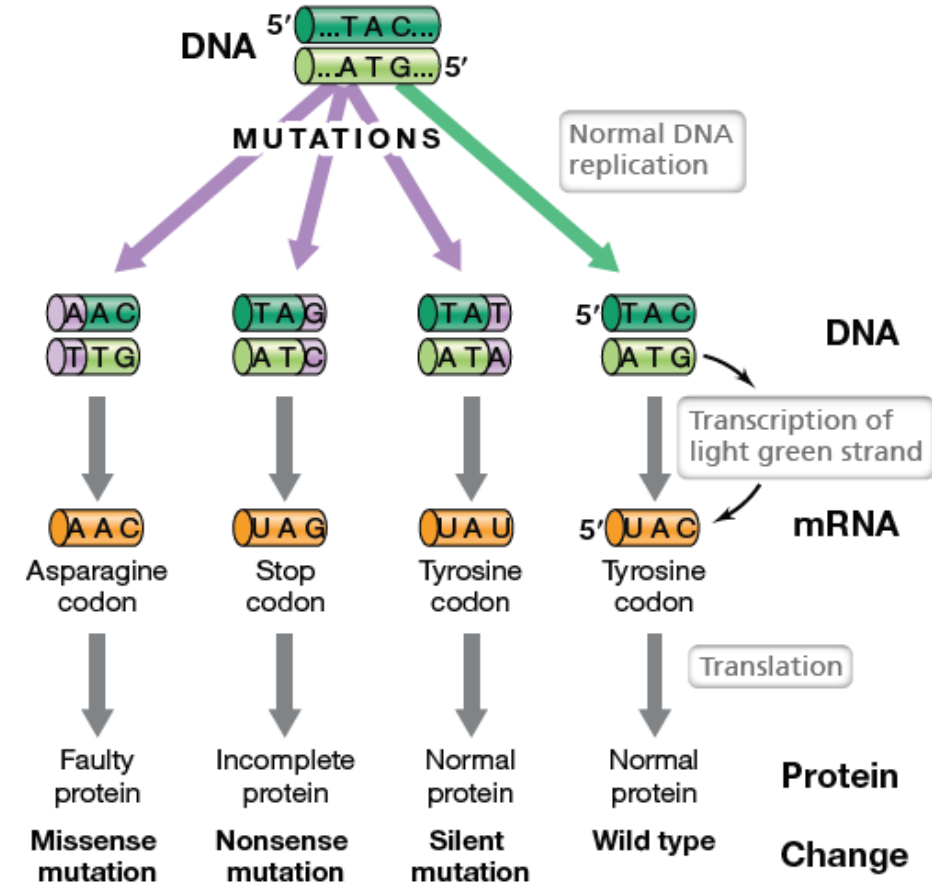
Missense (Yanlış Anlamlı) Mutasyonların Sonuçları

- Kodonun ilk veya ikinci bazındaki değişiklikler çoğunlukla amino asit dizisinde anlamlı farklılıklar oluşturur.
- UAC kodonunun AAC'ye dönüşmesi, polipeptidde tirozin yerine asparajin yerleşmesine neden olur ve bu değişim yanlış anlamlı mutasyon olarak adlandırılır.
- Yanlış anlamlı mutasyonun etkisi, değişikliğin polipeptid zincirindeki konumuna ve protein katlanması ya da aktivitesini nasıl etkilediğine bağlıdır.
- Enzimlerin aktif bölgesinde gerçekleşen yanlış anlamlı mutasyonların aktiviteyi kaybettirme olasılığı diğer bölgelere göre çok daha yüksektir.



Nonsense (Anlamsız) Mutasyonlar ve Sonuçları

- Baz çifti yer değiştirmeleri bir stop kodunu oluşturacak şekilde gerçekleşirse, bu durum translasyonun erken sonlanmasına yol açar.
- Anlamlı bir kodonun anlamsız bir kodona dönüşmesiyle oluşan bu mutasyonlar polipeptidin tamamlanmadan sonlanmasına neden olur.
- Oluşan ürün genellikle kısalmış (truncated) bir proteindir ve bu protein çoğunlukla tamamen işlevsizdir.
- Genin sonuna çok yakın olmadıkça anlamsız mutasyonlar normal aktiviteden belirgin şekilde yoksun ürünlerle sonuçlanır.

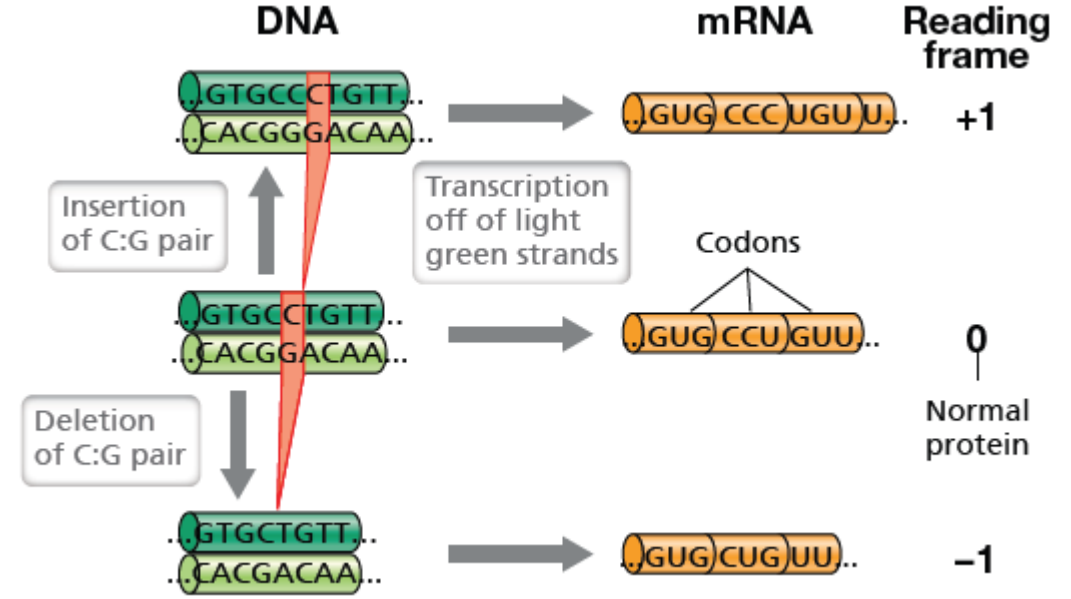


Baz Değişimlerinin Sınıflandırılması: Transisyon ve Transversiyon

- Transisyon mutasyonlarında bir pürin bazı başka bir pürin ile ya da bir pirimidin başka bir pirimidin ile yer değiştirir.
- Transversiyon mutasyonlarında ise bir pürin bazının pirimidin ile veya pirimidin bazının pürin ile yer değiştirmesi söz konusudur.
- Bu terimler, nokta mutasyonların moleküler düzeydeki değişim tipini daha spesifik şekilde tanımlar.
- Transisyon ve transversiyon ayrımı, mutasyonların mekanizmasını ve sonuçlarını anlamada temel bir sınıflandırma sağlar.

Frameshift (Çerçeve Kayması) Mutasyonlarının Temel Mekanizması

- Genetik kodun üçlü baz blokları hâlinde okunması, tek bir baz çiftinin eklenmesi ya da silinmesi durumunda okuma çerçevesinin kaymasına yol açar.
- Bu çerçeve kayması mutasyonları genellikle ciddi sonuçlar doğurur çünkü polipeptidin primer dizisi büyük ölçüde değişir.
- Yandaki figür, tek bazlık insersiyon veya delesyon sonucu oluşan dizisel kaymaları ve bunların proteine yansımalarını gösterir.
- Bu tür mikro-inseriyon veya mikro-delesyon hataları çoğunlukla DNA replikasyonundaki hatalardan kaynaklanır.



Çerçeve Kayması Dışındaki Insertiyon ve Delesyonlar

- İki baz çiftinin eklenmesi veya çıkarılması da okuma çerçevesini kaydırır ve polipeptidin dizisini büyük ölçüde değiştirir.
- Üç baz çiftinin eklenmesi veya çıkarılması ise çerçeve kayması oluşturmaz ancak polipeptide bir amino asidin eklenmesine ya da çıkarılmasına yol açar.
- Tek bir amino asidin eklenmesi ya da çıkarılması protein fonksiyonunu bozabilir fakat çerçeve kayması kadar yıkıcı değildir.

Büyük Ölçekli İnserسیون ve Delesyonlar

- Daha büyük inserسیون veya delesyon olaylarında yüzlerce hatta binlerce baz çifti kaybedilebilir ya da eklenebilir ve bu değişiklikler gen fonksiyonunu tamamen yok eder.
- Büyük delesyonlar birden fazla genin kaybına yol açabilir ve eğer silinen genlerden biri esansiyel ise bu mutasyon letal (öldürücü) olur.
- Bu tür büyük delesyonlar yalnızca yeni mutasyonlarla değil, genetik rekombinasyon yoluyla da geri kazanılabilir.
- Geniş çaplı inserسیون ve delesyonlar genellikle rekombinasyon hatalarından veya transpoze (hareketli) elementlerin inserسیونundan kaynaklanır.

Mutasyon Oranlarının Değişkenliği

- Farklı mutasyon türlerinin oluşma hızları oldukça geniş bir aralık gösterir ve bazıları neredeyse tespit edilemeyecek kadar nadirdir.
- Bazı mutasyonlar ise o kadar sık gerçekleşir ki, deneysel açıdan genetik olarak stabil stok kültürlerini korumayı güçleştirir.
- Gözlenen mutasyon oranı, DNA'daki değişim sıklığının yanında organizmanın DNA onarım sistemlerinin etkinliği tarafından da belirlenir.
- Bu nedenle mutasyon oranı hem mutasyon oluşumu hem de onarım süreçlerinin birleşik etkisiyle ortaya çıkar.

Geri Dönüşler: Reversiyonlar

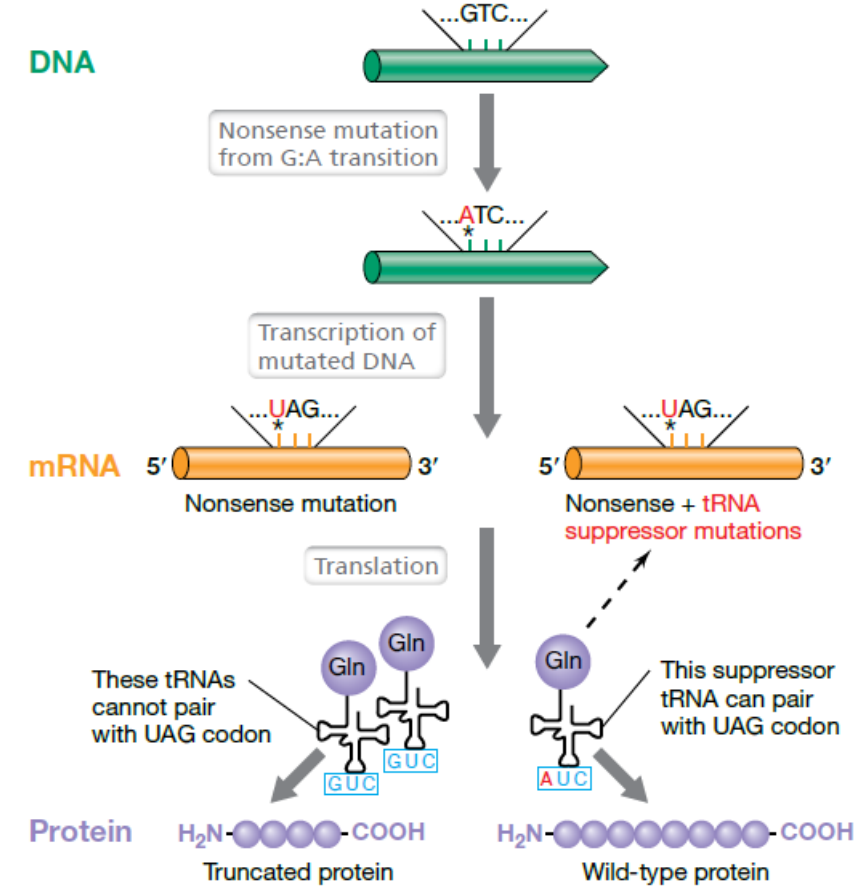
- Nokta mutasyonlar çoğu zaman üçüncü bir mutasyonla geri döndürülebilir ve bu sürece reversiyon adı verilir.
- Revertant, ilk mutasyonla değişen fenotipin ikinci bir mutasyonla yeniden eski haline döndüğü suştur.
- Aynı bölgede gerçekleşen reversiyonlarda mutasyonu düzelten değişiklik, ilk mutasyonla aynı bölgede bulunur.
- Eğer geri dönüş aynı bölgede gerçekleşip DNA dizisini tamamen eski hâline getiriyorsa buna “true revertant” denir.

İkinci-Bölge Revertantlar ve Baskılayıcı Mutasyonlar

- İkinci-bölge revertantlarda, mutasyon ilk mutasyonun bulunduğu yerden farklı bir bölgede gerçekleşir.
- Bu tür mutasyonlar, orijinal mutasyonun etkisini telafi edebildiklerinde baskılayıcı (suppressor) mutasyonlar olarak adlandırılır.
- Baskılayıcı mutasyonlar aynı gen içinde ikinci bir kayma mutasyonu ile okuma çerçevesinin yeniden kurulması gibi mekanizmalarla işlevi geri kazandırabilir.
- Ayrıca başka genlerde oluşan mutasyonlar, orijinal genin işlevini dolaylı biçimde geri getirebilir ya da eksik enzimin yerini alacak yeni bir enzimin üretilmesini sağlayabilir.

tRNA Baskılayıcıları ve Anlamsız Mutasyonlar

- Baskılayıcı mutasyonların en iyi örneklerinden biri, anlamsız mutasyonların tRNA antikodonunda meydana gelen bir değişiklikle okunabilir hâle gelmesidir.
- Antikodonu değişen tRNA, artık bir stop kodonunu tanıyıp taşıdığı amino asidi bu pozisyona yerleştirebilir.
- Bu tür tRNA'lar “baskılayıcı tRNA” olarak adlandırılır ve aynı kodon için birden fazla tRNA bulunduğu için hücre açısından genellikle yaşamsal değildir.
- Baskılayıcı tRNA aynı amino asidi eklediğinde protein tamamen işlevsel olabilirken, farklı bir amino asit eklenirse yalnızca kısmen aktif bir protein üretilir.



Mikroorganizmalarda Mutasyon Oranları

- Çoğu mikroorganizmada DNA replikasyonundaki hata sıklığı, her replikasyon döngüsünde yaklaşık her bin baz başına 10^{-6} ile 10^{-7} düzeyindedir.
- Ortalama 1000 baz çifti uzunluğundaki bir gen için bu, her replikasyon turunda benzer mutasyon olasılıkları anlamına gelir.
- Örneğin, 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki bir kültürde belirli bir gen için birçok farklı mutantın bulunması beklenir.
- Ökaryotlarda hata oranları çoğunlukla bakterilere göre yaklaşık on kat daha düşüktür.

Virüslerde Yüksek Mutasyon Oranları

- DNA virüsleri, özellikle küçük genomlu olanlar, hücresel organizmalara göre 100 ila 1000 kat daha yüksek hata oranlarına sahip olabilir.
- RNA virüsleri ise ek olarak düşük düzeyde proof-reading ve RNA onarım sistemlerinden yoksun oldukları için çok daha yüksek mutasyon oranları gösterir.
- Bu yüksek hata oranı, RNA virüslerinin hızlı evrimsel değişim potansiyeline önemli ölçüde katkı sağlar.
- Bu nedenle RNA virüslerinde çeşitlilik, replikasyon mekanizmalarının güvenilirliğinden çok sınırlandırılmış onarım kapasitesine bağlıdır.

Tek Baz Değişimlerinin Sonuçları

- DNA replikasyonu sırasında meydana gelen tek baz değişimleri çoğunlukla bir amino asidin başka bir amino asitle değiştirildiği yanlış anlamlı mutasyonlara yol açar.
- Bir sonraki en yaygın sonuç, kodonların üçüncü pozisyonundaki esneklik nedeniyle oluşan sessiz (silent) mutasyonlardır.
- Bir kodon tek bazlık bir değişiklikle toplam 27 alternatif kodona dönüşebilir ve bunların ortalama ikisi sessiz, biri anlamsız, geri kalanları yanlış anlamlı mutasyon oluşturur.
- Bu dağılım, tek baz değişimlerinin büyük bölümünün proteinin yapısını tamamen bozmadan varyasyon yarattığını gösterir.

Chemical and physical mutagens and their modes of action		
Agent	Action	Result
Base analogs		
5-Bromouracil	Incorporated like T; occasional faulty pairing with G	AT → GC and occasionally GC → AT
2-Aminopurine	Incorporated like A; faulty pairing with C	AT → GC and occasionally GC → AT
Chemicals reacting with DNA		
Nitrous acid (HNO ₂)	Deaminates A and C	AT → GC and GC → AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reacts with C	GC → AT
Alkylating agents		
Monofunctional (for example, ethyl methanesulfonate)	Puts methyl on G; faulty pairing with T	GC → AT
Bifunctional (for example, mitomycin, nitrogen mustards, nitrosoguanidine)	Cross-links DNA strands; faulty region excised by DNase	Both point mutations and deletions
Intercalating agents		
Acridines, ethidium bromide	Inserts between two base pairs	Microinsertions and microdeletions
Radiation		
Ultraviolet (UV)	Pyrimidine dimer formation	Repair may lead to error or deletion
Ionizing radiation (for example, X-rays)	Free-radical attack on DNA, breaking chain	Repair may lead to error or deletion

Mutasyonların Deneysel Tespiti ve Mutasyon Havuzu

- Seçilemeyen mutasyonların deneysel olarak tespit edilmesi güçtür ve genetikçiler mutasyon tespit verimliliğini artırmak için çeşitli yöntemler kullanır.
- En etkili yöntemlerden biri, mutasyon havuzunun büyütülmesidir; böylece tespit şansı artar.
- Mutajenik etkenlerle mutasyon oranı yapay olarak büyük ölçüde artırılabilir.
- Ayrıca hücreler yüksek stres koşullarına maruz kaldığında doğal mutasyon oranı da değişebilir.

Mutagenез ve Mutasyon Oranlarının Artışı

- Kendiliğinden mutasyon oranı oldukça düşük olmakla birlikte çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenler bu oranı artırarak mutasyonu indükleyebilir.
- Mutasyon oranını yükselten tüm bu etkenler mutajen olarak adlandırılır ve mutajenler farklı sınıflara ayrılarak etkinlikleriyle birlikte incelenir.
- Mutajenler DNA üzerindeki değişiklikleri artırarak mutasyon oluşumunu kolaylaştırır.

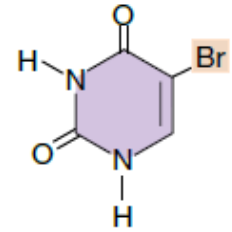
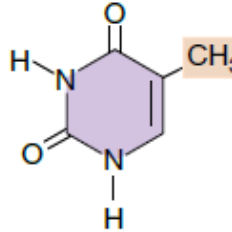
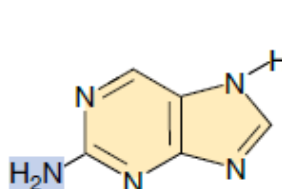
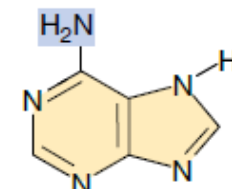
Kimyasal Mutajenlere Genel Bakış

- Başlıca kimyasal mutajenlerin özellikleri ve etkileri yandaki tabloda özetlenmiştir.
- Kimyasal mutajenler farklı sınıflardan oluşur ve DNA ile etkileşim biçimleri birbirlerinden belirgin şekilde ayrılır.
- Bu mutajenlerin bir kısmı doğrudan baz yapısını taklit ederken bir kısmı bazlarda kimyasal değişiklikler oluşturarak hatalı eşleşmelere yol açar.

Chemical and physical mutagens and their modes of action		
Agent	Action	Result
Base analogs		
5-Bromouracil	Incorporated like T; occasional faulty pairing with G	AT → GC and occasionally GC → AT
2-Aminopurine	Incorporated like A; faulty pairing with C	AT → GC and occasionally GC → AT
Chemicals reacting with DNA		
Nitrous acid (HNO ₂)	Deaminates A and C	AT → GC and GC → AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reacts with C	GC → AT
Alkylating agents		
Monofunctional (for example, ethyl methanesulfonate)	Puts methyl on G; faulty pairing with T	GC → AT
Bifunctional (for example, mitomycin, nitrogen mustards, nitrosoguanidine)	Cross-links DNA strands; faulty region excised by DNase	Both point mutations and deletions
Intercalating agents		
Acridines, ethidium bromide	Inserts between two base pairs	Microinsertions and microdeletions
Radiation		
Ultraviolet (UV)	Pyrimidine dimer formation	Repair may lead to error or deletion
Ionizing radiation (for example, X-rays)	Free-radical attack on DNA, breaking chain	Repair may lead to error or deletion

Baz Analogları ve Hatalı Eşleşmeler

- Baz analogları, DNA'daki pürin ve pirimidin bazlarına yapısal olarak benzeyen ancak hatalı eşleşme eğilimi gösteren moleküllerdir.
- Bu analoglar doğal bazların yerine DNA'ya dahil olduğunda çoğu zaman normal replikasyona izin verse de yanlış eşleşme olasılığı belirgin şekilde artar.
- Yanlış eşleşmeler yeni zincire hatalı bazın eklenmesine neden olur ve bu zincir replike olduğunda mutasyon kalıcı hale gelir.

Analog	Substitutes for
 5-Bromouracil	 Thymine
 2-Aminopurine	 Adenine

Baz Modifikasyonları ve Alkilleyici Ajanların Etkileri

- Baz modifikasyonu yapan kimyasallar bir bazın kimyasal yapısını değiştirerek hatalı eşleşme veya benzeri replikasyon hatalarına yol açar.
- Nitrosoguanidin gibi alkilleyici ajanlar amino, karboksil ve hidroksil gruplarına alkil grupları ekleyerek güçlü mutajenik etki oluşturur.
- Baz analoglarından farklı olarak alkilleyici ajanlar yalnızca replikasyon sırasında değil, replike olmayan DNA üzerinde de değişiklik oluşturabilir.
- Her iki grup da çoğunlukla baz-çifti yer değiştirmelerine neden olur.

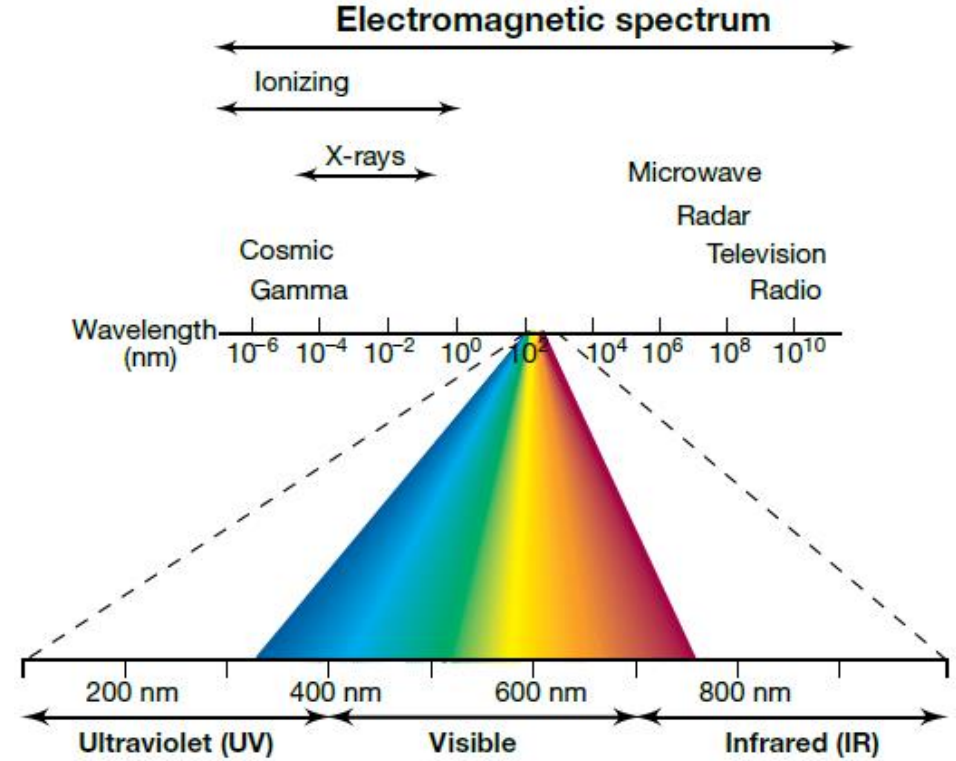
Chemical and physical mutagens and their modes of action		
Agent	Action	Result
Base analogs		
5-Bromouracil	Incorporated like T; occasional faulty pairing with G	AT → GC and occasionally GC → AT
2-Aminopurine	Incorporated like A; faulty pairing with C	AT → GC and occasionally GC → AT
Chemicals reacting with DNA		
Nitrous acid (HNO ₂)	Deaminates A and C	AT → GC and GC → AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reacts with C	GC → AT
Alkylating agents		
Monofunctional (for example, ethyl methanesulfonate)	Puts methyl on G; faulty pairing with T	GC → AT
Bifunctional (for example, mitomycin, nitrogen mustards, nitrosoguanidine)	Cross-links DNA strands; faulty region excised by DNase	Both point mutations and deletions
Intercalating agents		
Acridines, ethidium bromide	Inserts between two base pairs	Microinsertions and microdeletions
Radiation		
Ultraviolet (UV)	Pyrimidine dimer formation	Repair may lead to error or deletion
Ionizing radiation (for example, X-rays)	Free-radical attack on DNA, breaking chain	Repair may lead to error or deletion

Akridinler ve Çerçeve Kayması Mutasyonları

- Akridinler, iki baz çifti arasına girerek DNA'yı genişleten planarlı moleküllerdir ve interkale edici ajanlar olarak görev yapar.
- Bu moleküllerin araya girmesi replikasyon sırasında tek baz eklenmesi ya da çıkarılmasına yol açarak çerçeve kayması mutasyonlarını tetikler.
- Etidyum bromür de bir interkale edici ajan olduğundan jel elektroforezinde yaygın kullanılsa da aynı zamanda bir mutajendir.

Noniyonize ve İyonize Radyasyonun Mutajenik Etkileri

- UV radyasyonu ve iyonize radyasyon, son derece güçlü mutajenik etkilere sahip elektromanyetik radyasyon türleridir.
- DNA bazları UV ışığını özellikle 260 nm civarında yoğun şekilde absorbe eder ve bunun sonucunda pirimidin dimerleri oluşur.
- Pirimidin dimerleri DNA polimerazın ilerlemesini yavaşlatır veya yanlış okuma ihtimalini artırarak hücre ölümüne yol açabilir.
- X-ışınları, kozmik ışınlar ve gama ışınları gibi iyonize radyasyonlar serbest radikaller oluşturarak DNA'da tek ve çift iplik kırıkları meydana getirir.



DNA Tamiri ve Mutasyonun Önlenmesi

- Mutasyon, ancak hasarlı DNA, hücre bölünmesinden önce düzeltilmediğinde kalıcı hale gelir ve bu nedenle DNA tamir sistemleri büyük önem taşır.
- Hücrelerde birçok DNA tamir mekanizması bulunur; bunların bir kısmı hatasız çalışırken bazıları hataya daha açık olup mutasyon oluşmasına sebep olabilir.
- Çok yoğun DNA hasarı, replikasyonun durmasına ve kromozomda ölümcül kırıklara yol açabileceği için özellikle tehlikelidir.

SOS Yanıt Sisteminin Aktivasyonu

- Bakterilerde replikasyonun durması ya da ciddi DNA hasarı SOS tamir sistemini aktive eder ve bu sistem çok sayıda onarım sürecini başlatır.
- SOS sistemi bazı süreçlerde hatasız tamir sağlasa da, kalıp olmaksızın dNTP eklenmesine izin veren süreçlerde hataya yatkın onarım gerçekleşir.
- Kalıpsız tamir, boşluğu doldurarak hücreyi ölümcül kırıklardan korur ancak beraberinde çok sayıda mutasyon üretir.

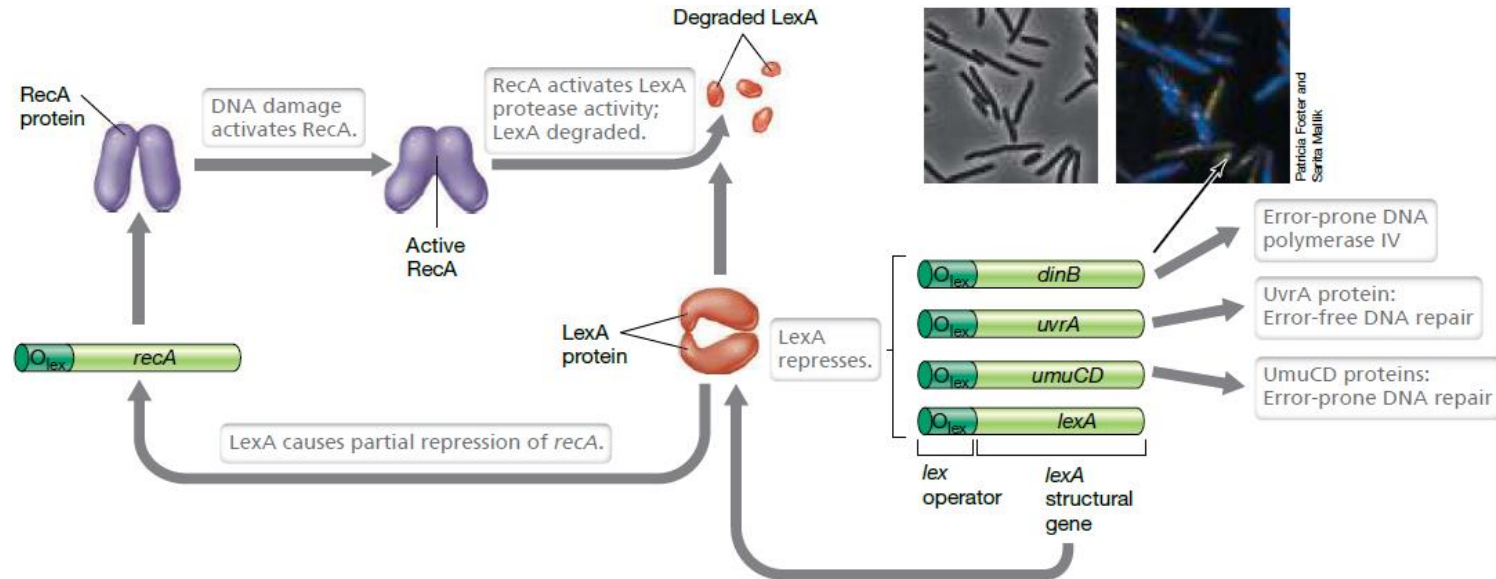
E. coli'de SOS Regülönü ve Translesyon (Lezyon-Aşırı) Sentezi

- *E. coli*'de SOS sisteminin yaklaşık 40 geni kapsayan geniş bir regülönü kontrol ettiği ve bu genlerin DNA hasar toleransı ile onarımda görev yaptığı bilinir.
- Translesyon (lezyon-aşırı) sentezi, hasarlı bölgelerin özel DNA polimerazlar tarafından atlanması ile gerçekleşir ve bu süreç sık hatalar üretir.
- Hatasız baz yerleştirme mümkün olmasa bile hücre açısından boşluk bırakmaktan daha az tehlikeli olduğundan bu mekanizma tercih edilir.

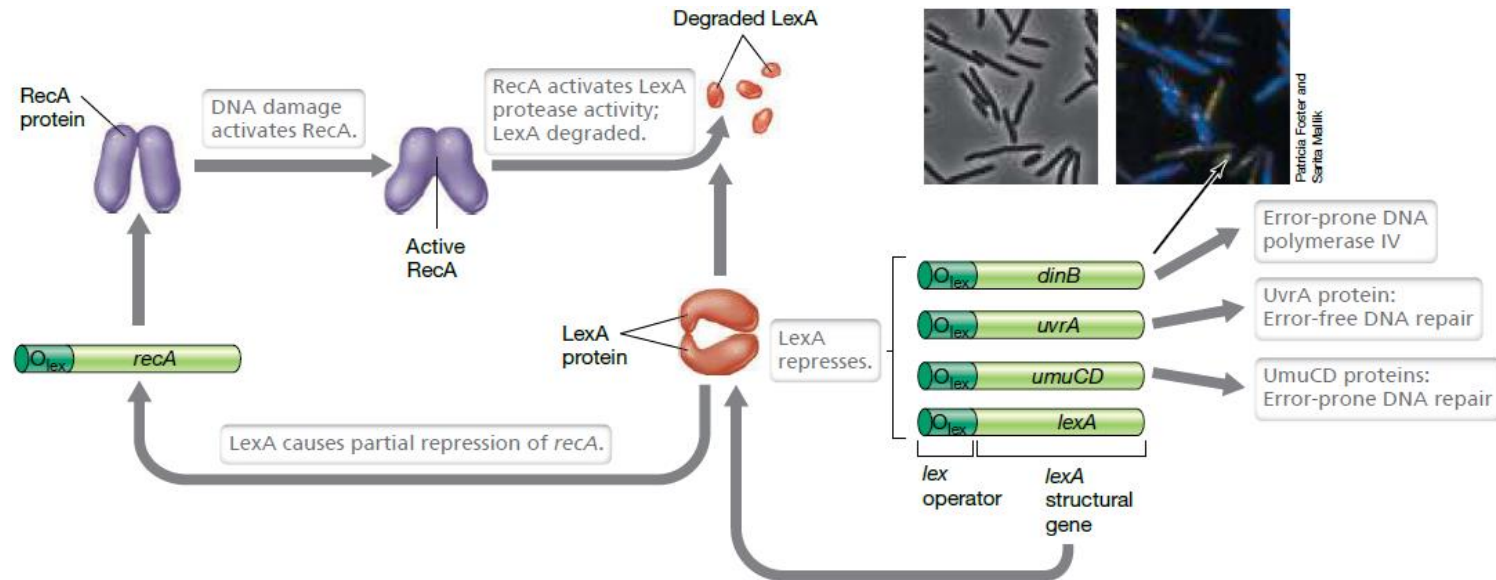


Hataya Eğilimli Polimerazlar: Pol IV ve Pol V

- *E. coli*'de hataya eğilimli SOS ilişkili polimerazlar DNA polimeraz V (umuCD ürünleri) ve DNA polimeraz IV (dinB) enzimleridir.
- Bu iki polimeraz DNA hasarı varsa indüklenir ve hasarlı bölgelerin üzerinden geçerek tamiri mümkün kılar fakat yüksek hata oranı taşır.

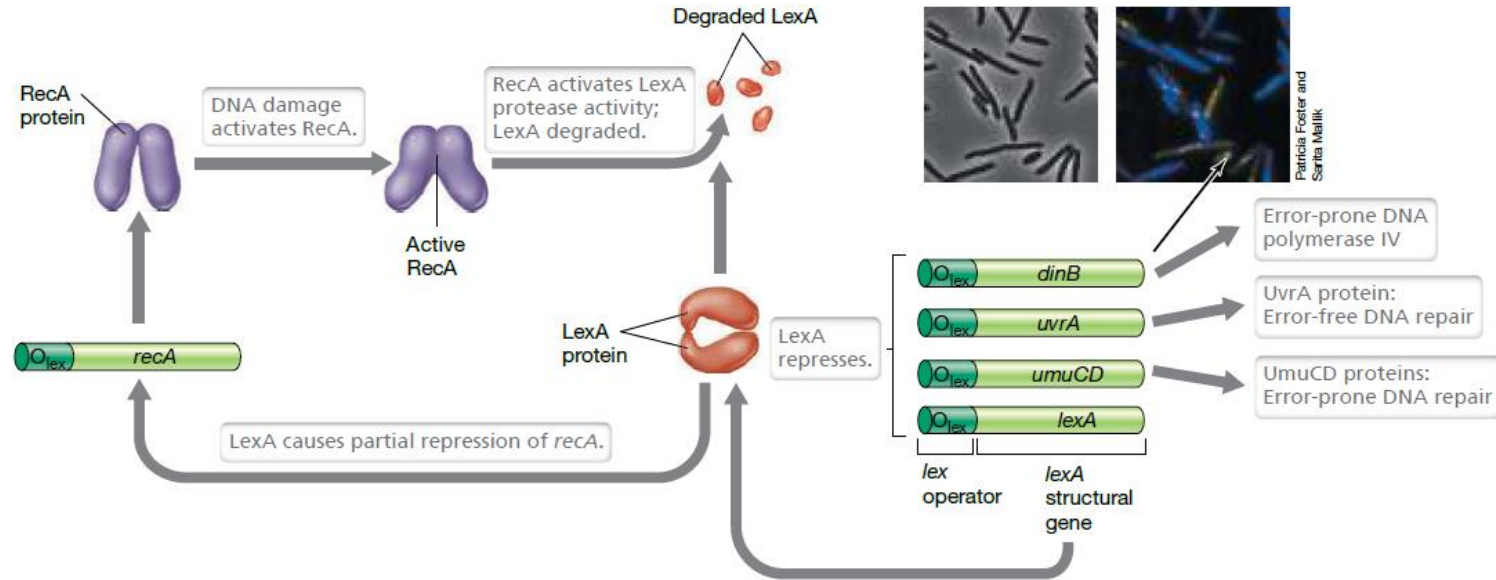


- SOS yanıtının ana düzenleyici proteinleri LexA ve RecA'dır; LexA normal koşullarda SOS genlerini baskılayan bir represördür.
- DNA hasarı sonrası biriken tek iplikli DNA, RecA'nın aktif forma geçmesini tetikler ve aktif RecA, LexA'nın kendi kendini keserek inaktive olmasını sağlar.



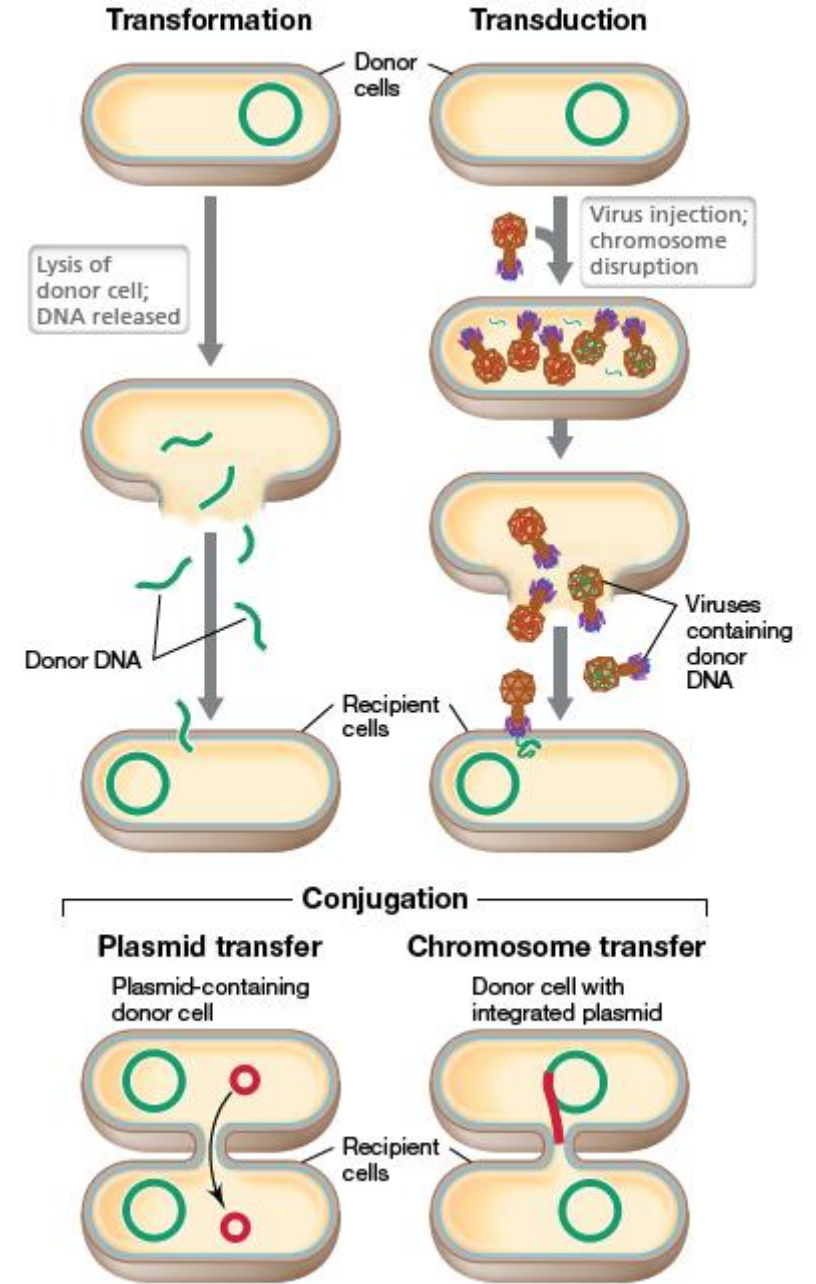
SOS Sistemi Ana Düzenleyicileri: LexA ve RecA

- LexA baskısının kalkması SOS regülunun eşgüdümlü olarak açılmasına ve çeşitli DNA tamir yollarının devreye girmesine izin verir.
- DNA hasarı giderildiğinde LexA yeniden baskı kurar ve böylece mutagenез süreci durur.



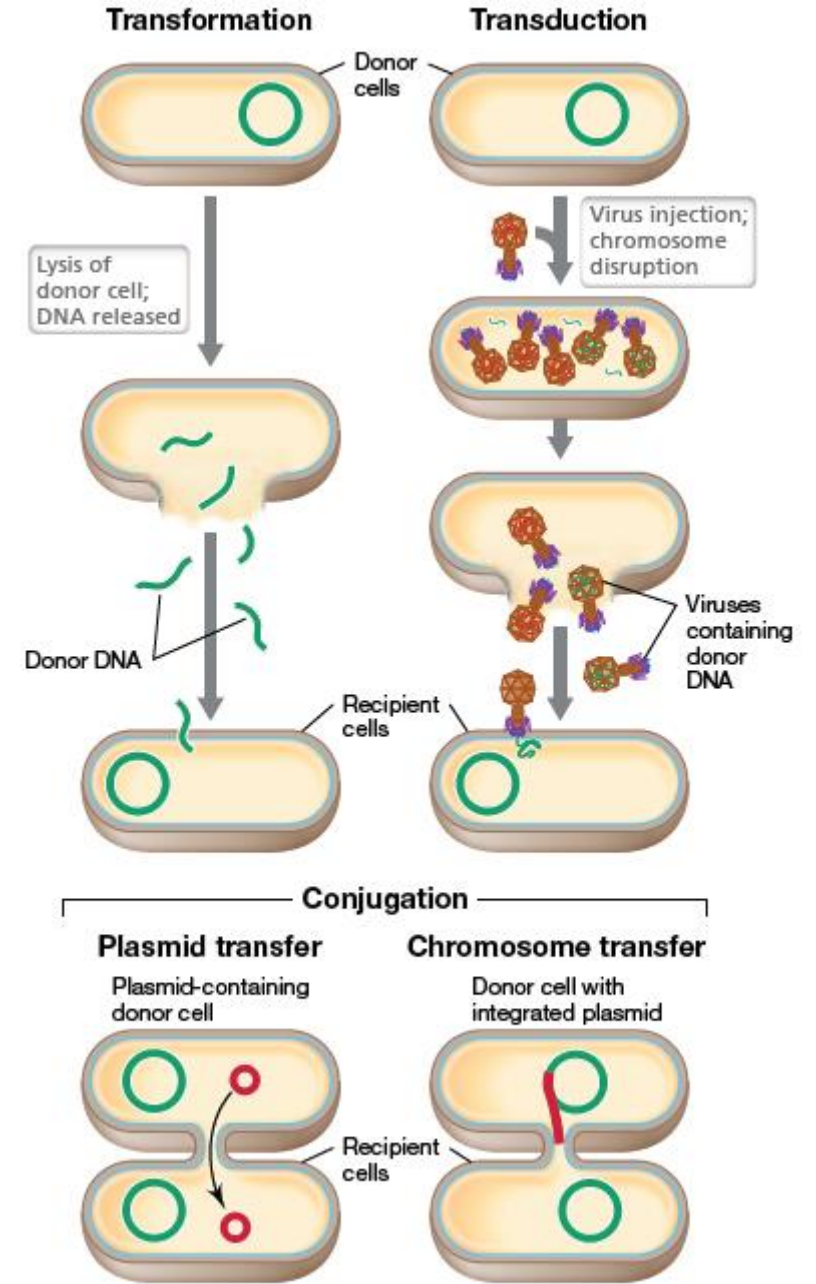
Bakterilerde Gen Transferinin Önemi

- Yakın akraba mikroorganizmaların genomlarının karşılaştırılması, farklı fenotipleri açıklayan belirgin genom farklılıklarını ortaya koyar.
- Bu farklılıkların çoğu, hücreler arasında soy bağı olmadan gerçekleşen yatay gen transferinden kaynaklanır.
- Yatay gen transferi, hücrelerin kısa sürede yeni özellikler kazanmasını sağlar ve metabolik çeşitliliği artırır.
- Yandaki şekilde üç ana genetik değişim mekanizmasının karşılaştırması verilmiştir.



Bakterilerde Gen Transferi Mekanizmaları

- Transformasyon, bir hücrenin serbest halde bulunan DNA'yı almasıyla gerçekleşir.
- Transdüksiyon, DNA'nın bir virüs tarafından hücreler arasında taşınmasıyla gerçekleşir.
- Konjugasyonda DNA aktarımı, hücreler arasında doğrudan temas ve donör hücrede bulunan konjugatif plazmid aracılığıyla olur.
- DNA transferi çoğunlukla tek yönlü gerçekleşir; donörden alıcıya doğru.



Aktarılan DNA'nın Hücredeki Olası Kaderi

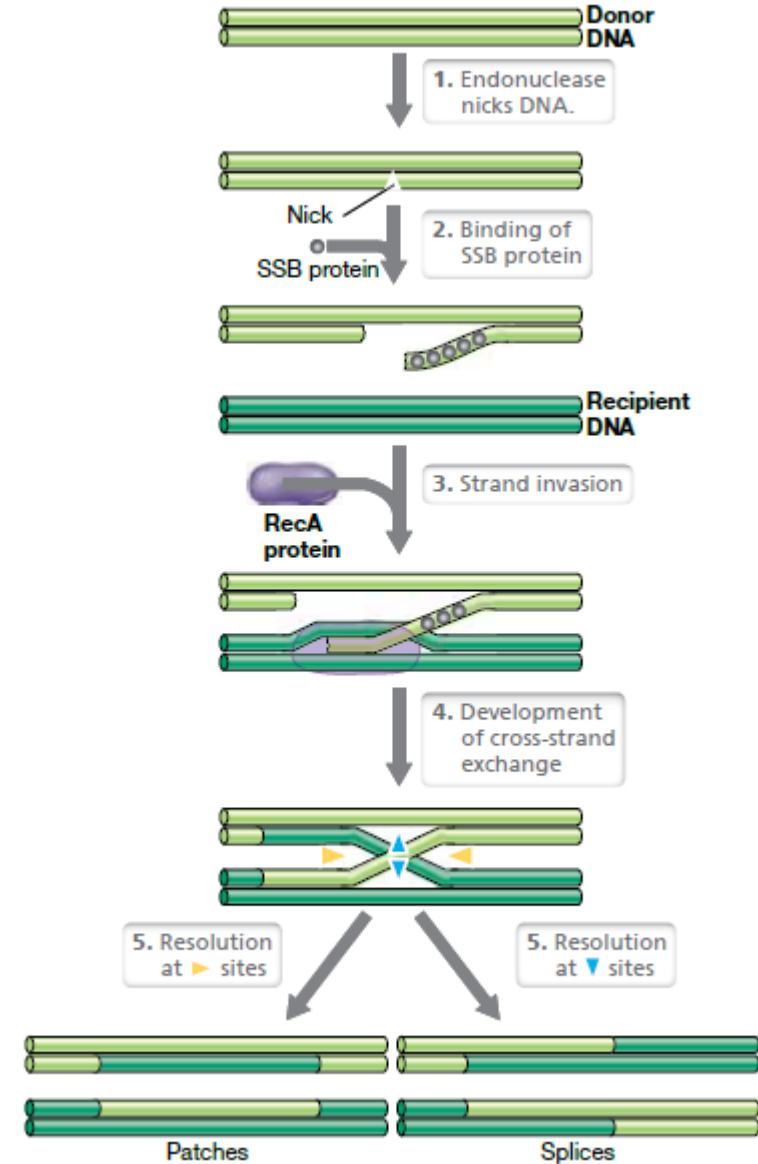
- Yatay gen transferiyle hücreye giren DNA, alıcı hücrenin restriksiyon enzimleri veya diğer yok edici sistemlerince parçalanabilir.
- DNA, eğer kendi replikasyon orijinine sahipse (plazmid veya faj genomu gibi), hücre içinde bağımsız olarak çoğalabilir.
- Aktarılan DNA, alıcı hücrenin kromozomu ile rekombinasyona uğrayabilir.
- Bu üç temel olasılık, transfer edilen DNA'nın hücredeki kalıcılığını belirler.

Homolog Rekombinasyonun Temel Özellikleri

- Rekombinasyon, genetik bilgiyi taşıyan DNA elemanları arasında fiziksel DNA değişimidir.
- Homolog rekombinasyon, iki farklı kaynaktan gelen ancak neredeyse aynı dizilimde olan DNA segmentleri arasında gerçekleşir.
- Bu benzer dizilimler, uzun bölgelerde baz eşleşmesine izin vererek DNA değişiminin gerçekleşmesini kolaylaştırır.
- Homolog rekombinasyon, klasik genetikte “crossing over” olarak bilinen sürecin temelini oluşturur.

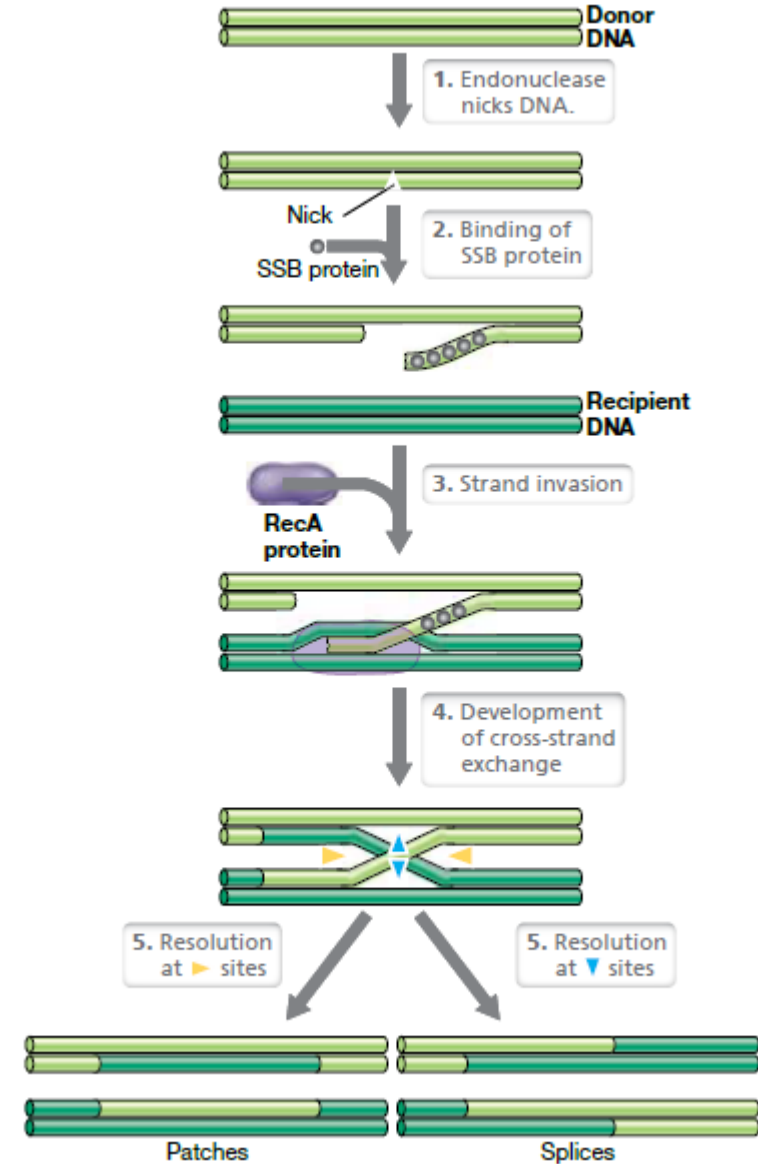
Homolog Rekombinasyonda RecA'nın Rolü

- RecA proteini, hemen tüm homolog rekombinasyon yollarında gerekli olan temel bir proteindir.
- RecA, daha önce SOS onarım sistemi bağlamında incelenmiş olup rekombinasyonda da kritik öneme sahiptir.
- RecA-benzeri proteinler, şimdiye kadar incelenen tüm Bacteria türlerinde ve ayrıca birçok Archaea ve Eukarya üyesinde tespit edilmiştir.
- RecA, homolog DNA dizilerinin eşleşmesine aracılık ederek fiziksel değişimin başlamasını sağlar.



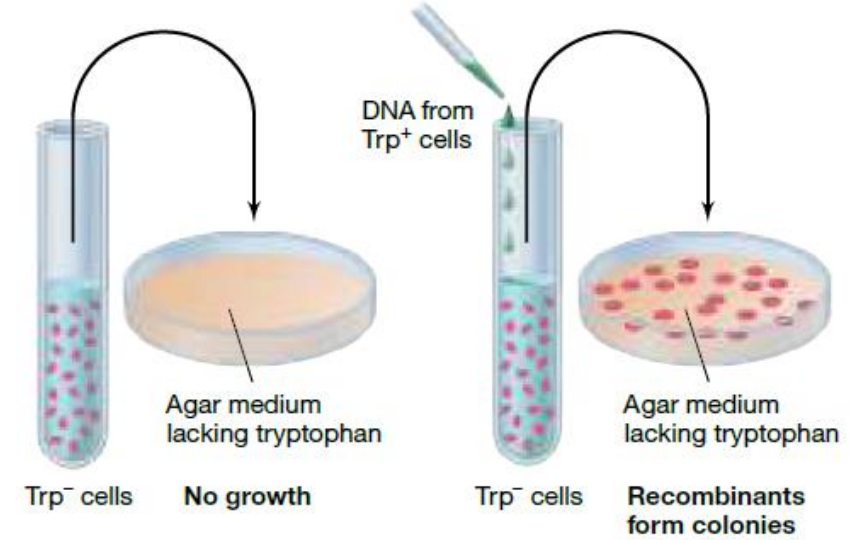
Homolog Rekombinasyonun Moleküler Aşamaları

- Homolog rekombinasyonun mekanizması yanda gösterilmiş olup süreç, donör DNA'nın bir endonükleaz tarafından tek ipliğinden kesilmesiyle başlar.
- Kesilen tek iplik, helikaz aktivitesine sahip proteinlerce ayrılır; oluşan tek zincir, tek zincire bağlanan proteinlere ve ardından RecA'ya bağlanır.
- Bu RecA–DNA kompleksi, alıcı DNA'da tamamlayıcı bölgeyi bularak baz eşleşmesini başlatır ve bu süreç “zincir istilası” olarak adlandırılır.
- İki DNA molekülü arasında oluşan uzun heterodubleks bölgeler daha sonra enzimlerce kesilip yeniden birleştirilerek “patch” veya “splice” yapısında ürünler oluşturur.



Homolog Rekombinasyonun Genotipe Etkisi

- Yeni genotiplerin ortaya çıkabilmesi için iki homolog DNA dizisinin benzer fakat genetik olarak farklı olması gerekir.
- Bakterilerde bu farklı DNA parçaları, transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyonla alıcı hücreye taşındıktan sonra rekombinasyonla birleşir.
- Rekombinasyonun fenotipik olarak fark edilebilmesi için ortaya çıkan hücrelerin her iki ebeveyninden de farklı özellik göstermesi gerekir.
- Seçilebilir belirteçler (ilaç direnci, besin gereksinimi gibi), az sayıdaki rekombinant hücreyi çok büyük popülasyonlar içinde bile tespit edebilmek için kritik öneme sahiptir.



Rekombinantların Seçilmesi ve Önemi

- Bakteriyel genetikte, alıcı hücreler genellikle belirli bir özelliği taşımayan özel mutantlar olarak seçilir.
- Rekombinantlar, kazandıkları yeni özellikler sayesinde belirli bir besiyerinde büyüeyebilir veya alıcı hücreden farklı bir fenotip sergileyebilir.
- Seçim işleminin yüksek duyarlılığı, çok az sayıdaki rekombinant hücrenin bile kolaylıkla tespit edilmesini sağlar.
- Bu nedenle seçim, mikrobiyal genetik çalışmalarda vazgeçilmez bir araçtır.

Bakteriyel Gen Transferinde Kısmi Diploidinin Mantığı

- Bakteriyel gen aktarımının tüm yöntemlerinde donör kromozomunun yalnızca bir kısmı alıcı hücreye geçtiği için, bu DNA rekombinasyon olmazsa kendini çoğaltamayarak kaybolur.
- Buna rağmen, genetik analizlerde kullanılmak üzere bir hücrede belirli bir kromozom bölgesinin iki kopyasının kararlı biçimde korunması mümkündür.
- Bu duruma kısmi diploidi veya mero-diploidi denir ve genellikle bir kopya kromozomda, diğer kopya ise bir plazmid ya da bakteriyofaj üzerindedir.
- Böylece araştırmacılar, belirli genlerin fonksiyonlarını anlamak için hücrede iki kopya taşıyan özel suşlar kullanabilirler.

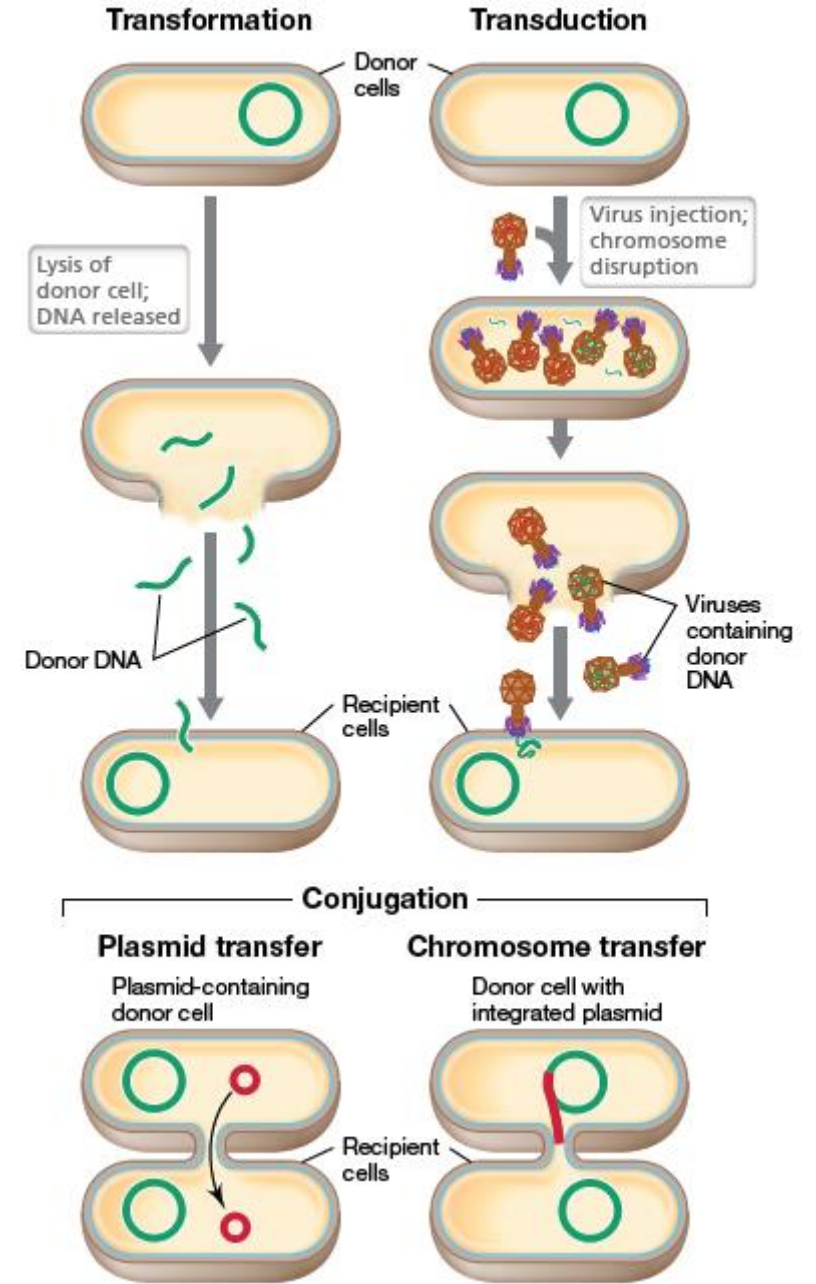


Komplementasyonun Temel Mantığı

- Kromozom üzerindeki bir gen mutasyon nedeniyle işlevsiz olduğunda, bu genin sağlam (yabanıl-tip) bir kopyasının plazmid ya da fajla hücreye verilmesi mümkündür.
- Örneğin, triptofan biyosentezindeki bir gen mutasyona uğradığında Trp^- fenotipi oluşur ve hücre dışarıdan triptofan almak zorunda kalır.
- Ancak aynı hücreye genin yabanıl-tip kopyası girerse, bu gen gerekli proteini üreterek normal fenotipi geri kazandırır.
- Bu süreç komplementasyon olarak adlandırılır ve mutasyonlu hücrenin Trp^- 'den Trp^+ hâline dönüşmesini sağlar.

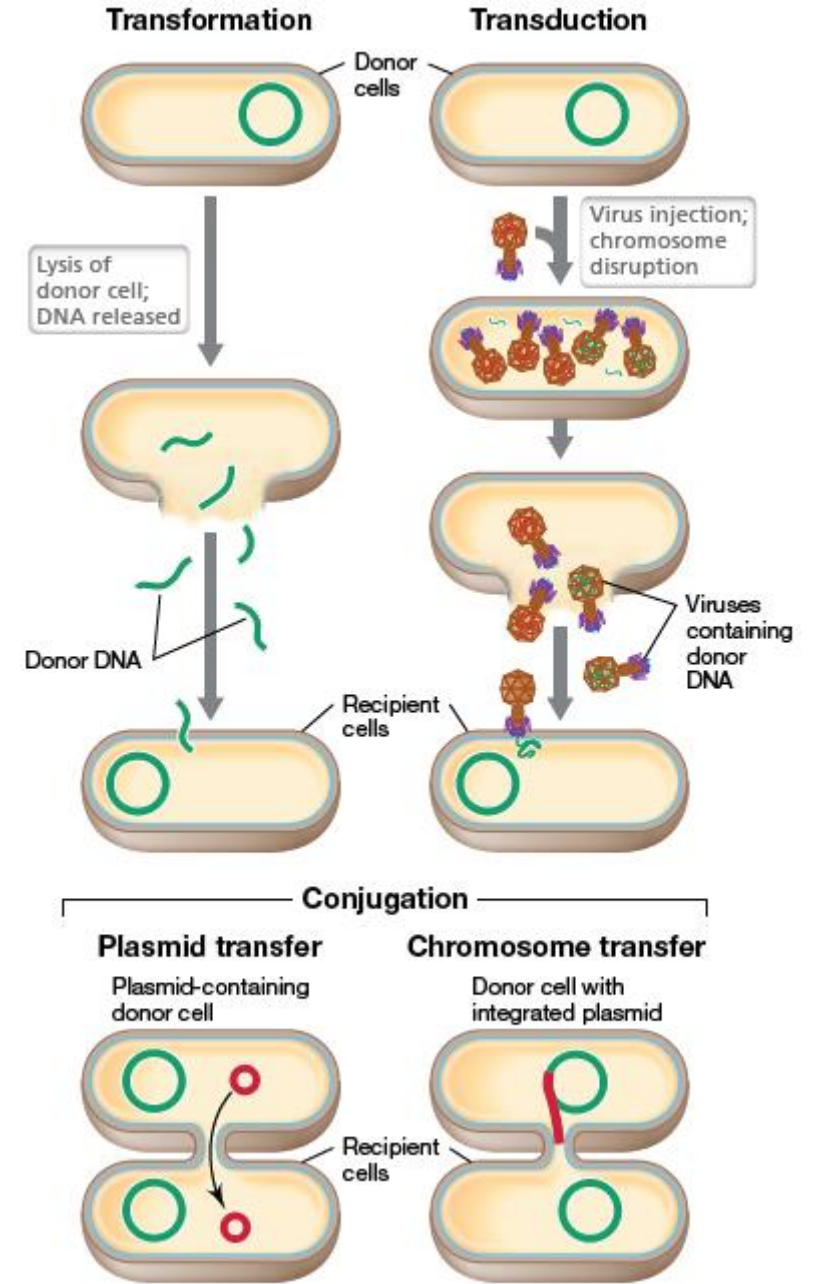
Transformasyonun Genel Özellikleri

- Transformasyon, serbest DNA'nın alıcı hücreye alınarak genetik bir değişikliğe yol açtığı bir gen aktarım sürecidir.
- Doğal olarak transformasyon yapabilen birçok gram-negatif, gram-pozitif bakteri ve bazı Archaea türleri vardır.
- Prokaryot DNA'sı tek ve büyük bir molekül olduğundan hücre hafifçe lizis olduğunda dışarı dökülür.
- Örneğin *Bacillus subtilis* kromozomu lineerleştğinde 1700 μm uzunluğunda olup, nazik bir ekstraksiyonda 10 kb'lık parçalara bölünerek her bir parçada yaklaşık on gen bulunur.



Transformasyonla Gen Aktarımının Sınırları

- Bir hücre genellikle yalnızca bir ya da birkaç DNA parçasını içeri alabildiğinden, tek bir transformasyon olayında donör genlerin yalnızca küçük bir bölümü aktarılabilir.
- Bu durum, transformasyonun çoğunlukla sınırlı bir genetik değişime yol açtığını gösterir.
- Dolayısıyla, doğal transformasyonun etkisi büyük kromozomal bölgelerden çok küçük gen setlerinin taşınmasıyla sınırlıdır.
- Transformasyonun biyolojik anlamı, her hücrenin büyük DNA parçalarını değil, yalnızca sınırlı sayıda geni taşıyabilmesidir.



Kompetans: Transformasyon İçin Gerekli Hücresel Durum

- DNA'yı alarak transformasyon geçirebilen hücrelere kompetan denir ve bu özellik genetik olarak belirlenmiştir.
- Çoğu doğal olarak transformasyon yapabilen bakteride kompetans düzenlenmiş bir süreçtir ve DNA alımı için özel proteinler görev alır.
- Bu proteinler arasında zarla ilişkili DNA bağlayıcı proteinler, hücre duvarı otolizini ve çeşitli nükleazlar bulunur.
- Kompetans bu özel proteinlerin koordine çalışmasıyla hücrede geçici olarak ortaya çıkan bir durumdur.

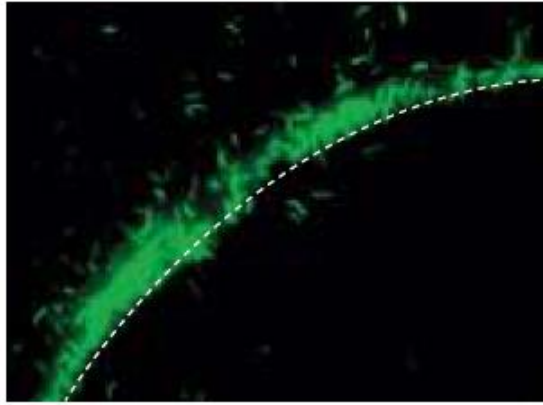
Bacillus subtilis'te Kompetans ve Quorum Sensing

- *B. subtilis*'te doğal kompetans, hücre yoğunluğunu algılayan bir quorum sensing sistemi tarafından düzenlenir.
- Hücreler büyüme sırasında küçük bir peptit üretip dışarı salgılar ve bu peptidin yüksek düzeye ulaşması kompetansın indüklenmesini sağlar.
- Popülasyondaki hücrelerin yalnızca yaklaşık %20'si kompetan hâle gelir ve bu durum birkaç saat sürebilir.
- Bu nedenle, kompetans *Bacillus* popülasyonlarında tüm hücrelerde görülmeyen, sınırlı fakat önemli bir fizyolojik durumdur.

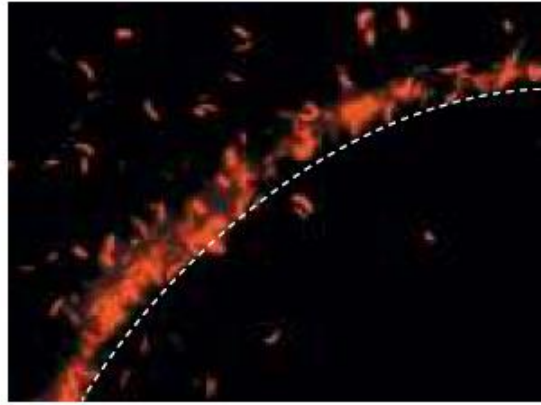


Streptococcus ve *Vibrio cholerae*'de Kompetansın Çeşitli Kontrolleri

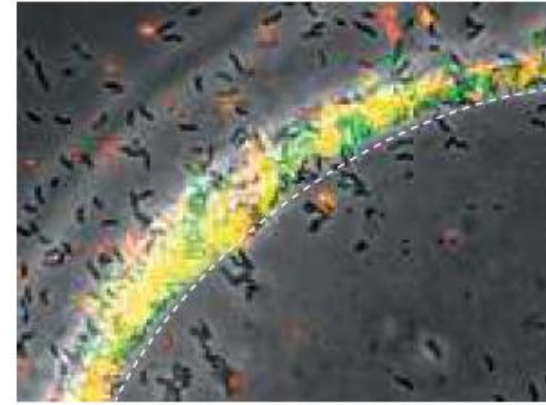
- *Streptococcus* türlerinde popülasyonun %100'ü kompetan olabilse de bu durum büyüme döngüsünün yalnızca kısa bir döneminde görülür.
- Diğer bakterilerde ise kompetans çok katmanlı düzenleyici mekanizmalarla kontrol edilir.



(a)



(b)

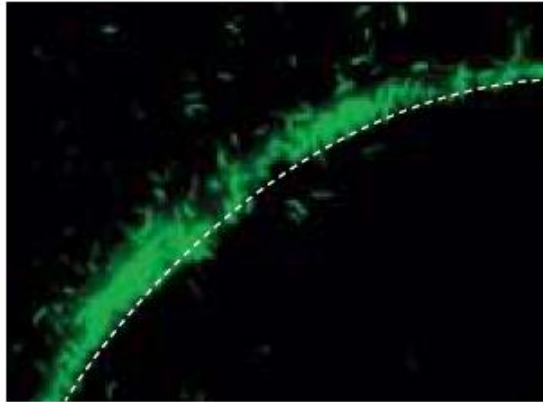


(c)

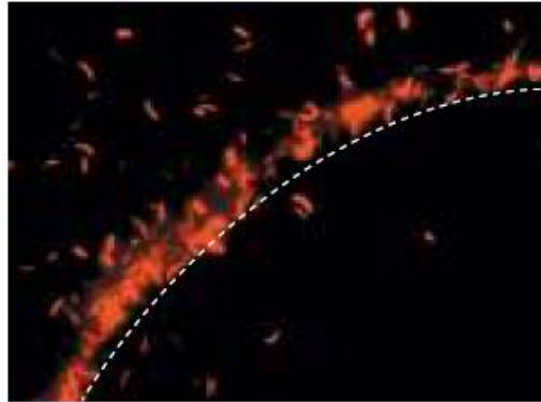
Melanie Blockesch

Streptococcus ve *Vibrio cholerae*'de Kompetansın Çeşitli Kontrolleri

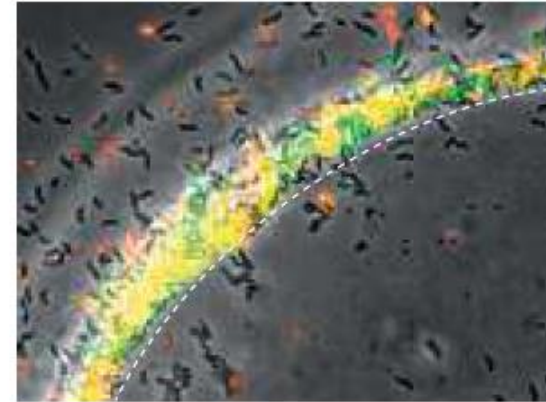
- *V. cholerae*'de kompetans hem quorum sensing hem de kitosan (chitin) algılama ve katabolit baskılanması tarafından düzenlenir.
- Bu süreç, denizel ortamlarda kitin yüzeylerine tutunmuş hücrelerin bir arada bulunmasıyla DNA değişimini kolaylaştırır.
- Aşağıdaki figür bu durumu göstermektedir.



(a)



(b)



(c)

Melanie Blockesch

Doğal Transformasyonun Yaygınlığı ve Besinsel Avantajı

- Yüksek verimlilikte doğal transformasyon yapan bakteriler arasında *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Thermus* bulunur.
- Bu doğal kompetansın ek bir avantajı, serbest DNA'nın karbon, azot ve fosfor bakımından zengin bir besin kaynağı olmasıdır.
- Buna karşılık, birçok bakteri türü doğal koşullarda çok düşük transformasyon kapasitesine sahiptir.
- Bu farklılık, bakterilerin ekolojik nişlerine ve fizyolojik özelliklerine göre değişen bir uyum stratejisidir.

E. coli ve Diğer Gram-Negatif Bakterilerde Yapay Kompetans

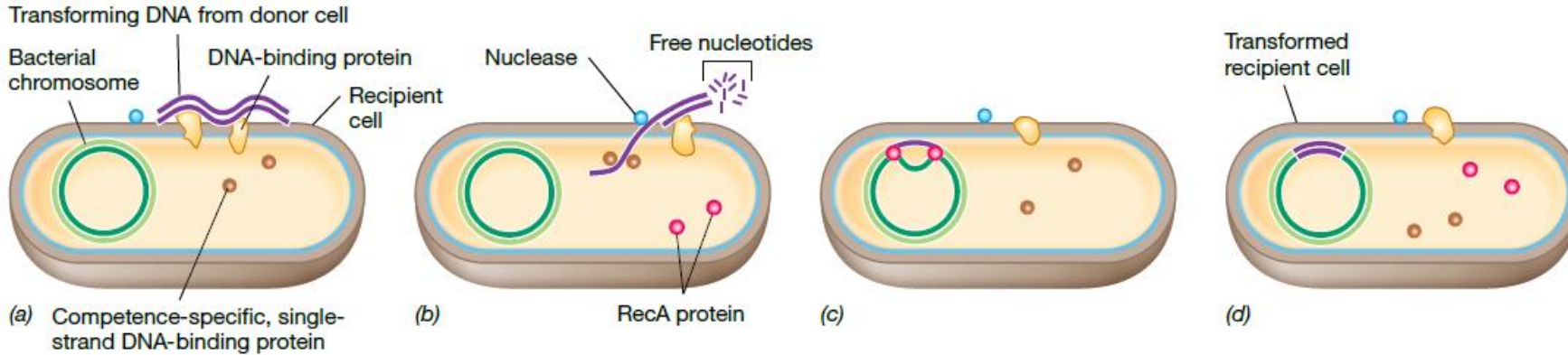
- *E. coli* ve birçok gram-negatif bakteri doğal olarak çok düşük düzeyde transformasyon yeteneğine sahiptir.
- Ancak bu hücreler yüksek konsantrasyonda Ca^{2+} ile muamele edilip soğutulduğunda yeterli derecede kompetan hâle gelir.
- Bu işlemle hücreler çift iplikli DNA'yı alabilir ve plazmid transformasyonu oldukça verimli hâle gelir.
- Bu uygulama, genetik mühendisliğinin temel organizması olan *E. coli*'ye DNA aktarımı açısından kritik önemdedir.

Elektroporasyon: Zor Hücrelere DNA Aktarma Yöntemi

- Elektroporasyon, transformasyonu zor veya kalın hücre duvarlı organizmalara DNA aktarmak için kullanılan fiziksel bir tekniktir.
- Yöntemde hücreler DNA ile karıştırılır ve kısa, yüksek voltajlı elektrik darbelerine maruz bırakılır.
- Bu darbeler hücre zarfını geçici olarak geçirgen hâle getirerek DNA'nın hücre içine girmesini sağlar.
- Elektroporasyon, *E. coli*, diğer birçok Bakteri, bazı Archaea türleri, maya ve belirli bitki hücrelerine DNA aktarımında etkili bir yöntemdir.

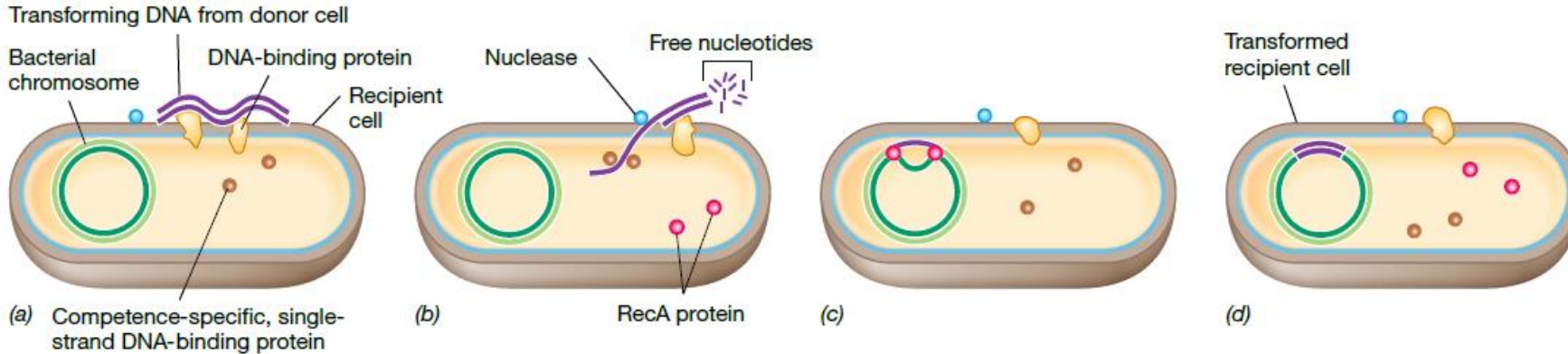
Doğal Transformasyonun Genel Çerçevesi

- Doğal transformasyon sırasında kompetan bakteriler DNA'yı önce geri dönüşümlü olarak, kısa süre sonra ise geri dönüşümsüz şekilde bağlar.
- Kompetan hücreler, kompetan olmayanlara kıyasla yaklaşık 1000 kat daha fazla DNA bağlayabilir.



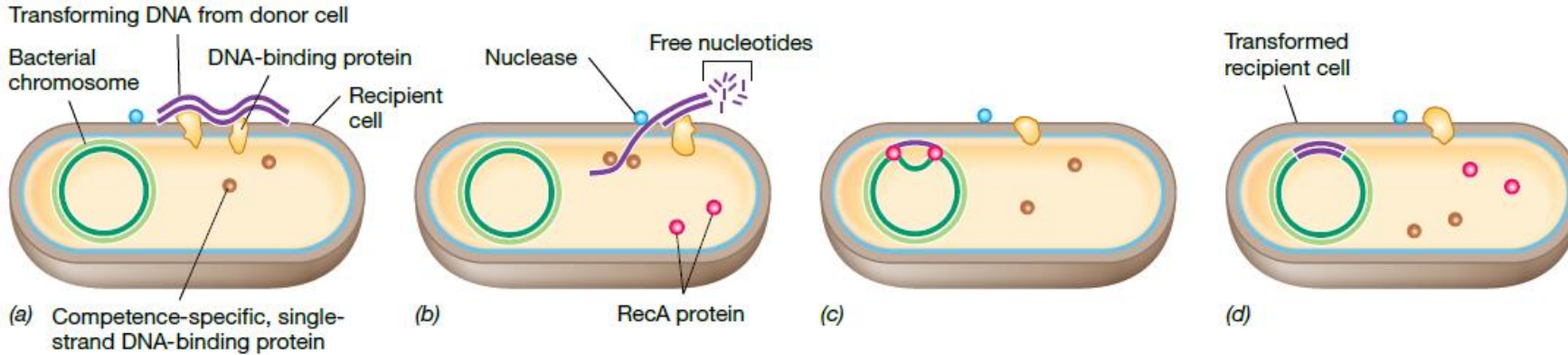
Doğal Transformasyonun Genel Çerçevesi

- Transformasyon için alınan DNA parçaları tüm genomdan çok daha küçük olup, alım sürecinde ek olarak parçalanır.
- *Streptococcus pneumoniae* hücreleri her biri 10–15 kbp uzunluğunda yalnızca yaklaşık on adet çift sarmallı DNA molekülü bağlayabilir.



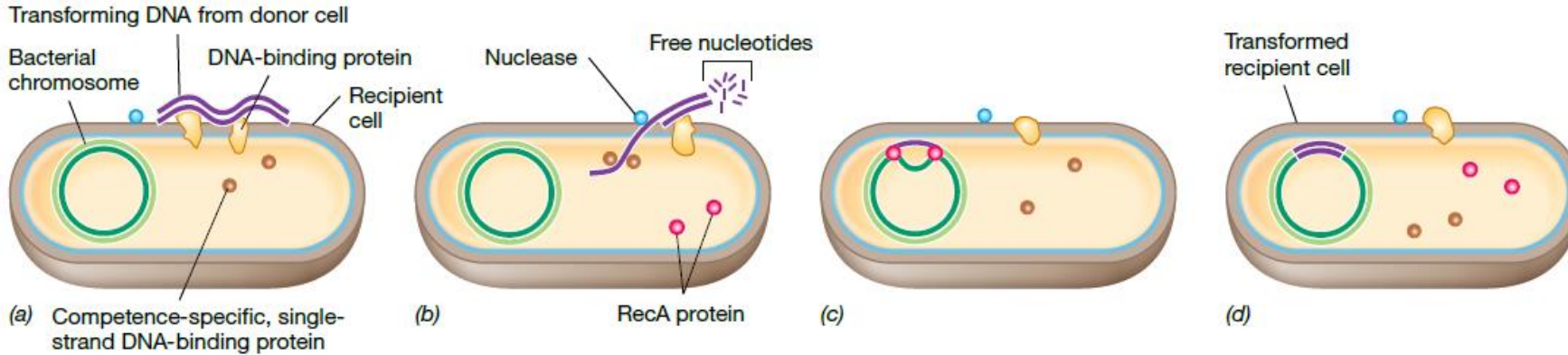
DNA Parçalarının Tek Sarmala Dönüştürülmesi

- Alınan DNA parçaları hücre içine geçerken tek sarmallı yaklaşık 8 kb'lık fragmanlara dönüştürülür ve tamamlayıcı zincir bu sırada parçalanır.
- Karışımındaki DNA fragmentleri birbirleriyle rekabet ettiği için avantaj sağlayan bir genin alınma olasılığı önemli ölçüde azalır.



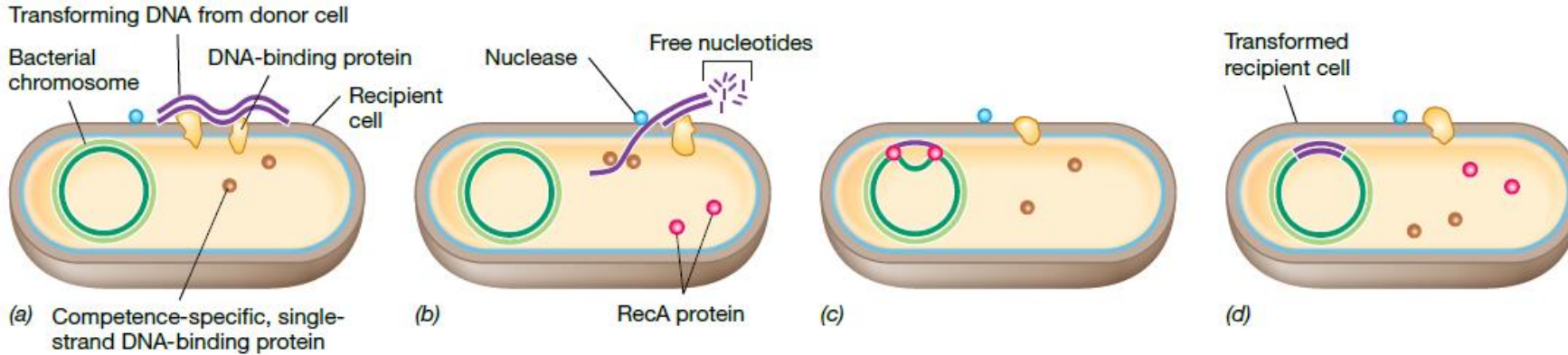
DNA Parçalarının Tek Sarmala Dönüştürülmesi

- Transformasyonun ilk aşaması, DNA'nın hücre yüzeyine bağlanmasını sağlayan bir DNA-bağlayıcı protein tarafından yürütülür.
- Bu protein birçok türde bir pilusa benzeyerek DNA'yı gram-negatiflerde periplazmaya, gram-pozitiflerde ise kalın hücre duvarından içeri çekebilir.



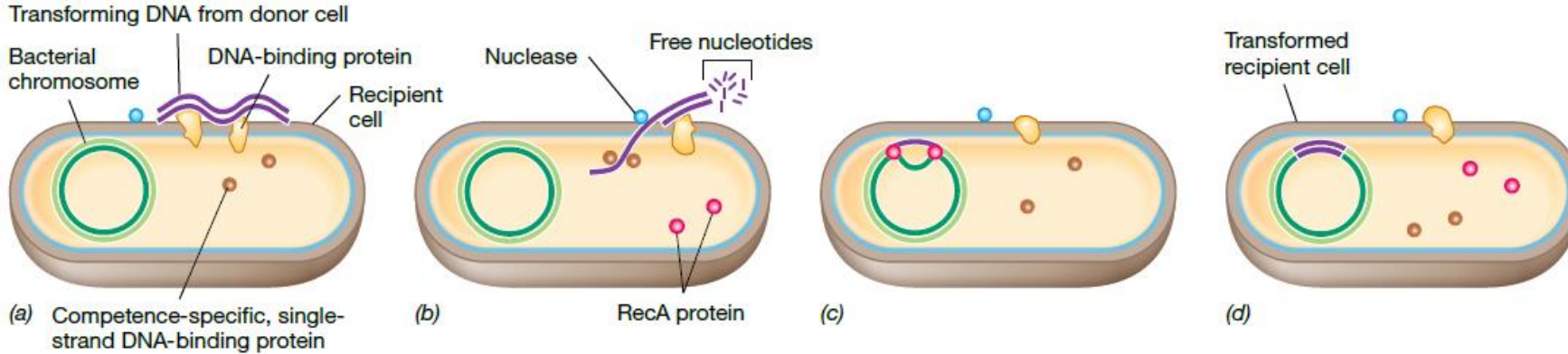
DNA Alımı ve Tek Sarmalın Korunması

- Organizmaya bağılı olarak DNA'nın tamamı çift sarmal hâlde içeri alınır ya da bir nükleaz bir zinciri parçalayarak yalnızca kalan tek zincirin içeri girişine izin verir.
- Hücre içine alınan tek sarmallı DNA, kompetansa özgü bir protein tarafından bağlanarak nükleaz saldırılarına karşı korunur.



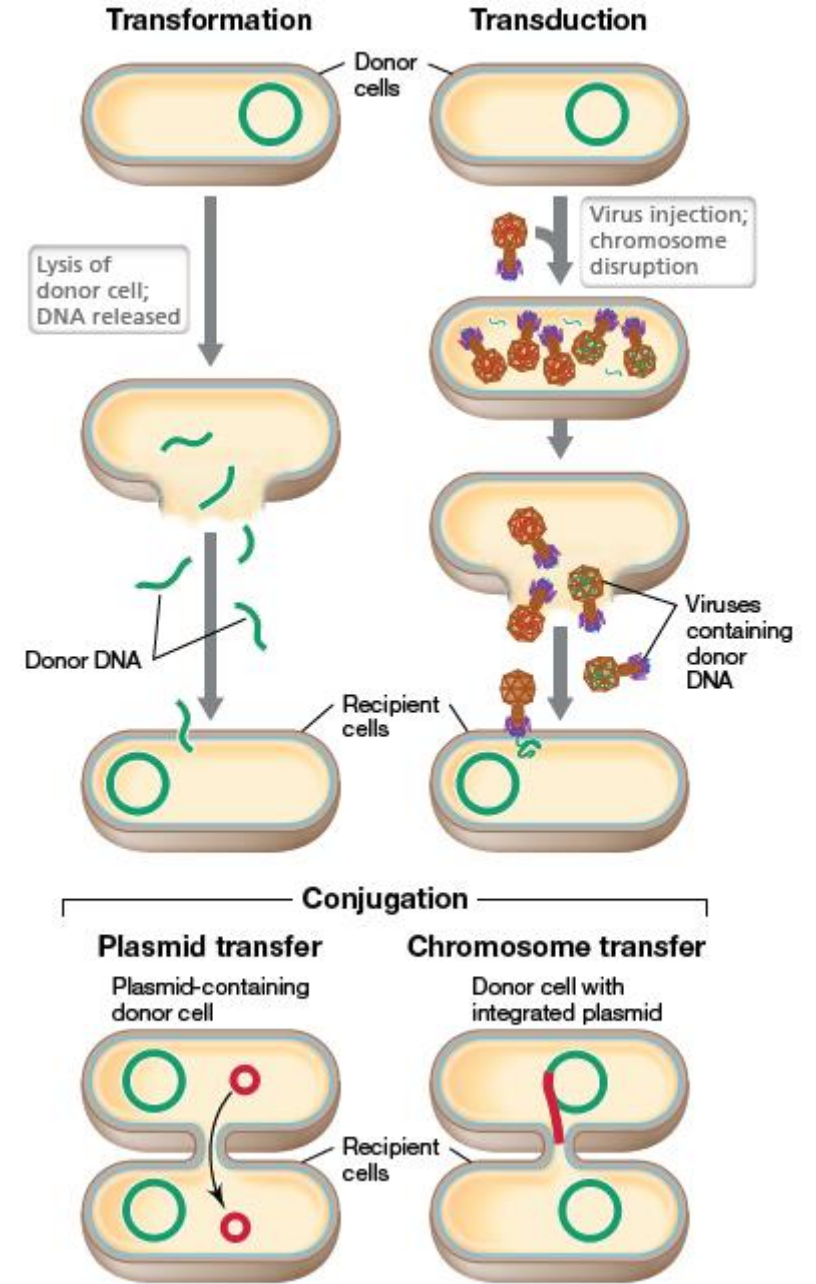
DNA Alımı ve Tek Sarmalın Korunması

- Bu korunan DNA, kromozoma ulaşınca RecA proteininin aracılık ettiği rekombinasyonla genom içine entegre edilir.
- Bu süreç yalnızca küçük ve doğrusal DNA parçaları için geçerlidir; çünkü pek çok doğal olarak transforme edilebilir bakteri, çift sarmallı ve halkasal kalması gereken plazmid DNA'yı çok zayıf şekilde alır.



Transdüksiyona Giriş

- Transdüksiyon, bir bakteriyofajın DNA'yı bir hücreden diğerine taşıdığı yatay gen transferi sürecidir.
- Fajlar, konak genlerini iki ana yolla taşıyabilir; bunlar genelleştirilmiş transdüksiyon ve özelleşmiş transdüksiyon olarak adlandırılır.
- Genelleştirilmiş transdüksiyonda konak genomunun neredeyse herhangi bir bölgesinden alınmış DNA, olgun faj partikülüne viral genom yerine paketlenir.
- Özelleşmiş transdüksiyon ise yalnızca belirli bölgeden alınan bakteri DNA'sı bazı viral genlerin yerine doğrudan faj genomuna entegre edilir.



Genelleştirilmiş ve Özelleşmiş Transdüksiyonun Karşılaştırılması

- Genelleştirilmiş transdüksiyonda taşınan bakteri genleri bağımsız çoğalamaz ve viral genomun parçası değildir; bu nedenle kalıcı olabilmesi için alıcı kromozomla rekombinasyon gerekir.
- Özelleşmiş transdüksiyonda homolog rekombinasyon yine gerçekleşebilir, ancak taşınan bakteri DNA'sı bir ılımlı faj genomunun parçası olduğu için lizogeni sırasında kromozoma entegre olabilir.
- Transdüksiyon, çok farklı bakteri cinslerinde ve bazı Archaea türlerinde görülür; ancak her faj transdüksiyon yapamaz ve her bakteri transdüksiyona uygun değildir.
- Doğal ortamlarda fajların prokaryotlardan yaklaşık on kat daha fazla olması, transdüksiyonun ekosistemlerde önemli bir gen transfer mekanizması olabileceğini düşündürür.



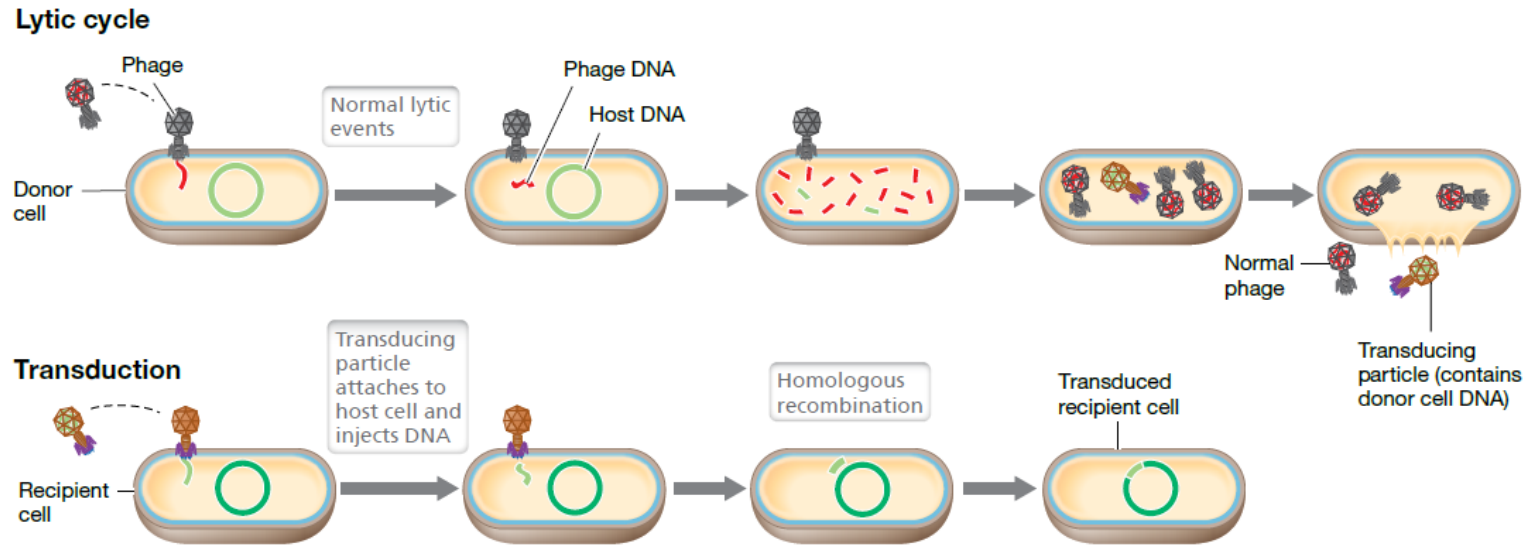
Transdüksiyonla Taşınan Genlere Örnekler

- Çoklu antibiyotik direnç genleri *Salmonella enterica* suşları arasında transdüksiyonla aktarılabilir.
- Shiga-benzeri toksin genleri *E. coli*'de bazı transdüksiyon olaylarıyla taşınır.
- *V. cholerae*'da virülans faktörlerini ve siyanobakterilerde fotosentetik proteinleri kodlayan bazı genler transdüksiyonla aktarılabilir.
- Bu örnekler, fajların patojenite ve metabolik kapasite üzerinde kritik etkiler yaratabileceğini göstermektedir.



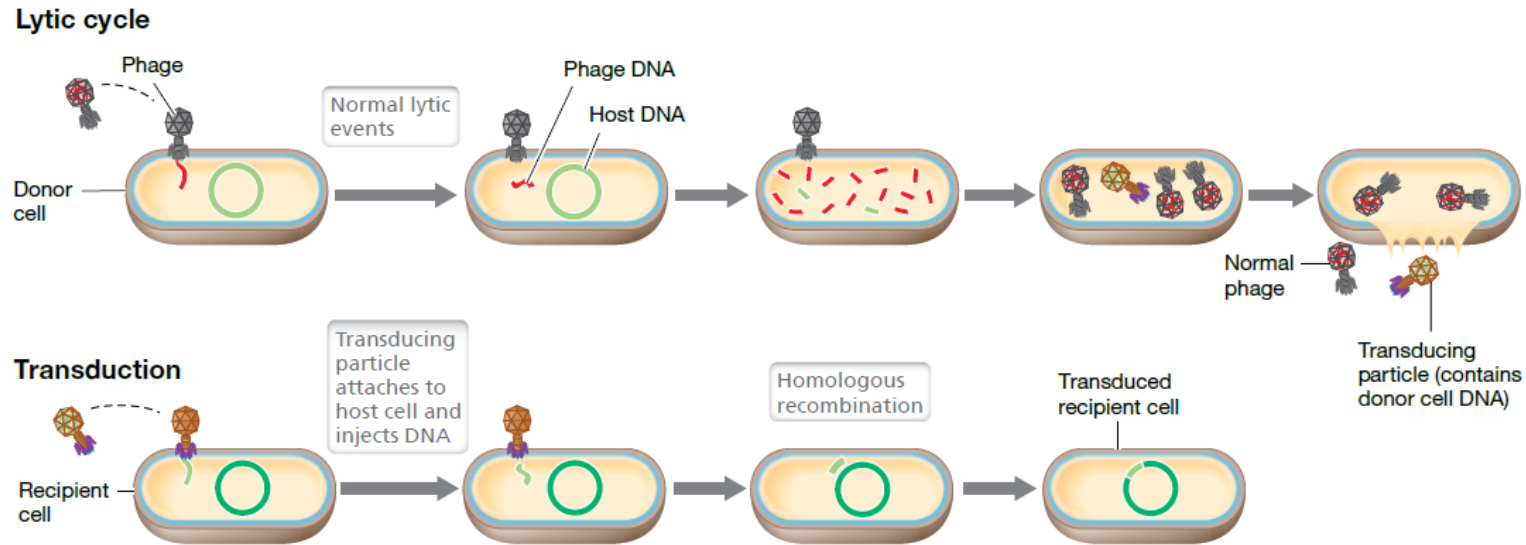
Genelleştirilmiş Transdüksiyonun Mekanizması

- Genelleştirilmiş transdüksiyonda, donör bakterinin hemen her geni alıcı hücreye taşınabilir ve bu sürecin sonunda oluşan hücreye transdüktant adı verilir.
- Bu süreç ilk olarak *Salmonella enterica*'da P22 faji ile keşfedilmiş ve *E. coli*'de P1 faji ile ayrıntılı olarak çalışılmıştır.



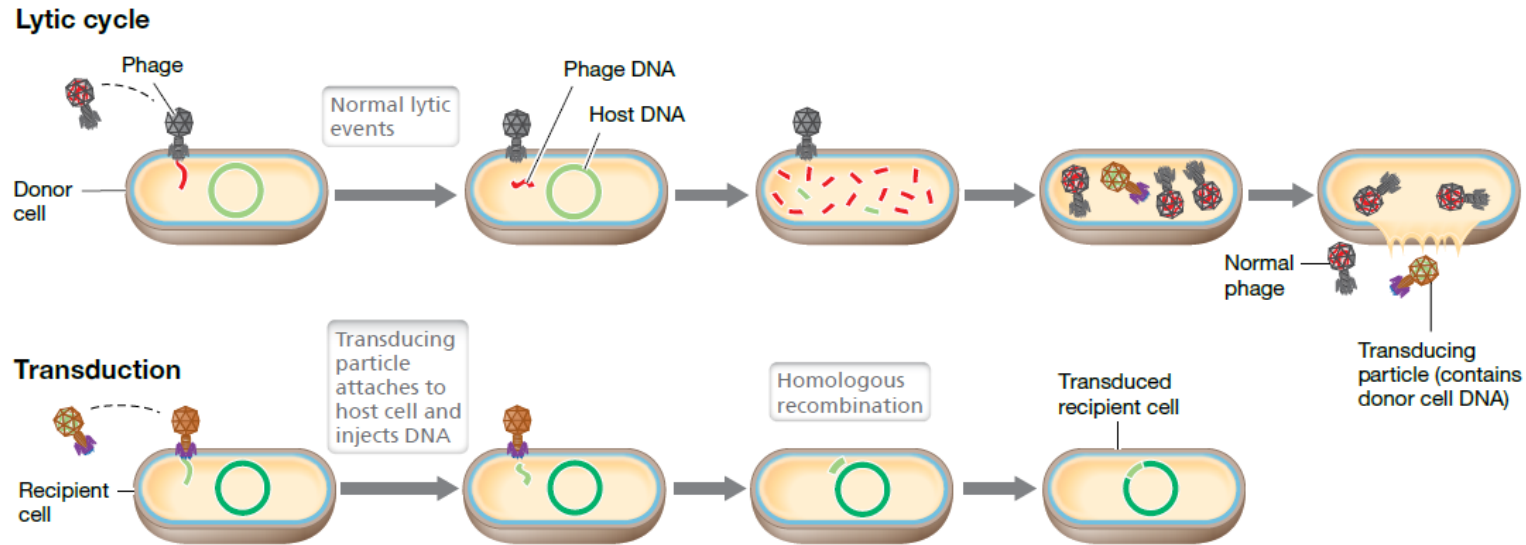
Genelleştirilmiş Transdüksiyonun Mekanizması

- Genelleştirilmiş transdüksiyonun mekanizması aşağıda gösterilmiştir.
- Bir bakteriyofaj hücreyi enfekte ettiğinde litik döngü başlayabilir ve DNA paketleme enzimleri zaman zaman viral genom yerine konak DNA'sını yanlışlıkla paketleyebilir.



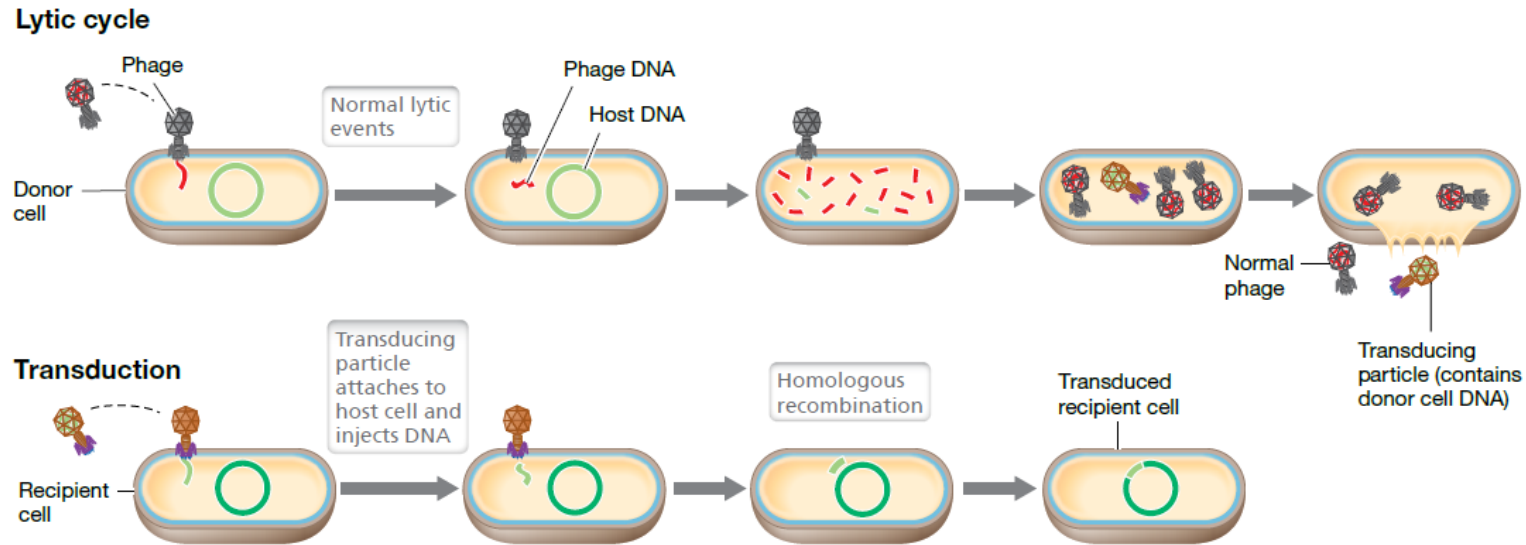
Transdüksiyon Partikülleri ve Rekombinasyon

- Konak DNA'sını taşıyan bu özel faj partikülleri transdüksiyon partikülleri olarak adlandırılır ve viral DNA içermedikleri için litik enfeksiyon yapamaz.
- Hücre lizisi sırasında normal faj partikülleriyle birlikte bu transdüksiyon partikülleri de ortama salınır.



Transdüksiyon Partikülleri ve Rekombinasyon

- Bu karışım alıcı hücrelere verildiğinde çoğu hücre normal fajlarla enfekte olurken küçük bir kısmı transdüksiyon partiküllerinden konak DNA'sını alır.
- Bu DNA bağımsız çoğalamaz ancak alıcının genomuyla rekombine olabilir.

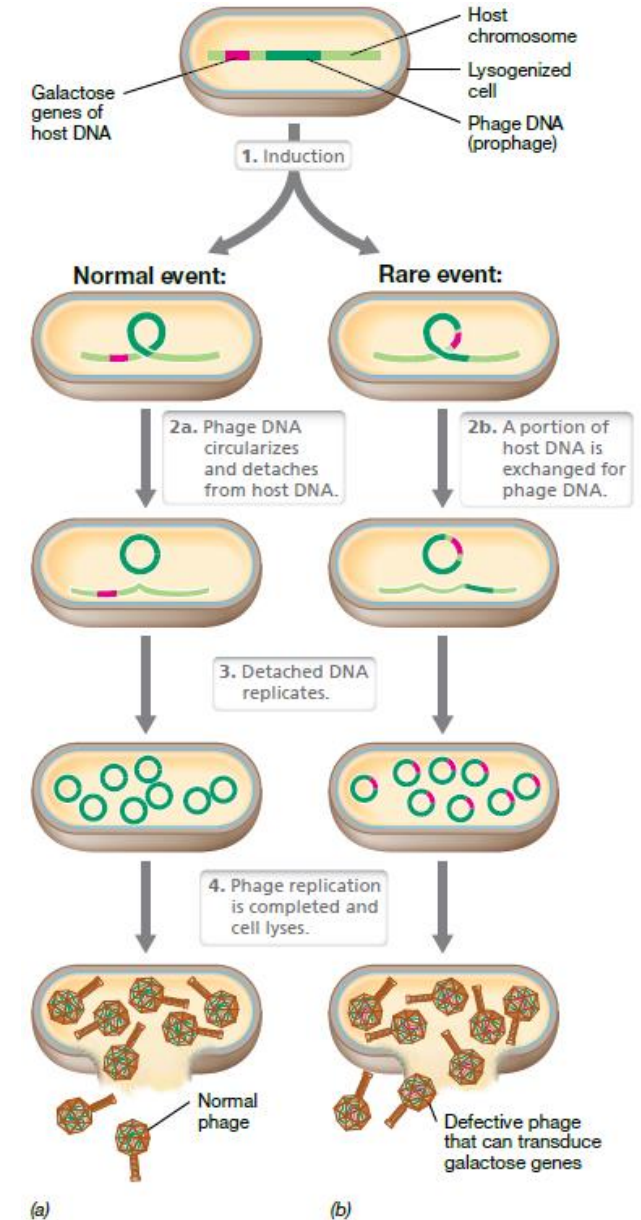


Transdüksiyonun Verimliliği

- Lizatta bulunan partiküllerin yalnızca küçük bir bölümü hatalı paketlenmiş olduğu için belirli bir genin taşınma olasılığı oldukça düşüktür.
- Her transdüksiyon partikülü sadece küçük bir donör DNA fragmanı içerdiğinden belirli bir genin bir partikül içinde bulunma şansı sınırlıdır.
- Genelleştirilmiş transdüksiyonda herhangi bir gen için transdüklenme olasılığı genellikle 10^6 ila 10^8 hücrede bir kez gerçekleşir.
- Bu düşük sıklığa rağmen süreç, popülasyon düzeyinde genetik çeşitliliğe katkıda bulunur.

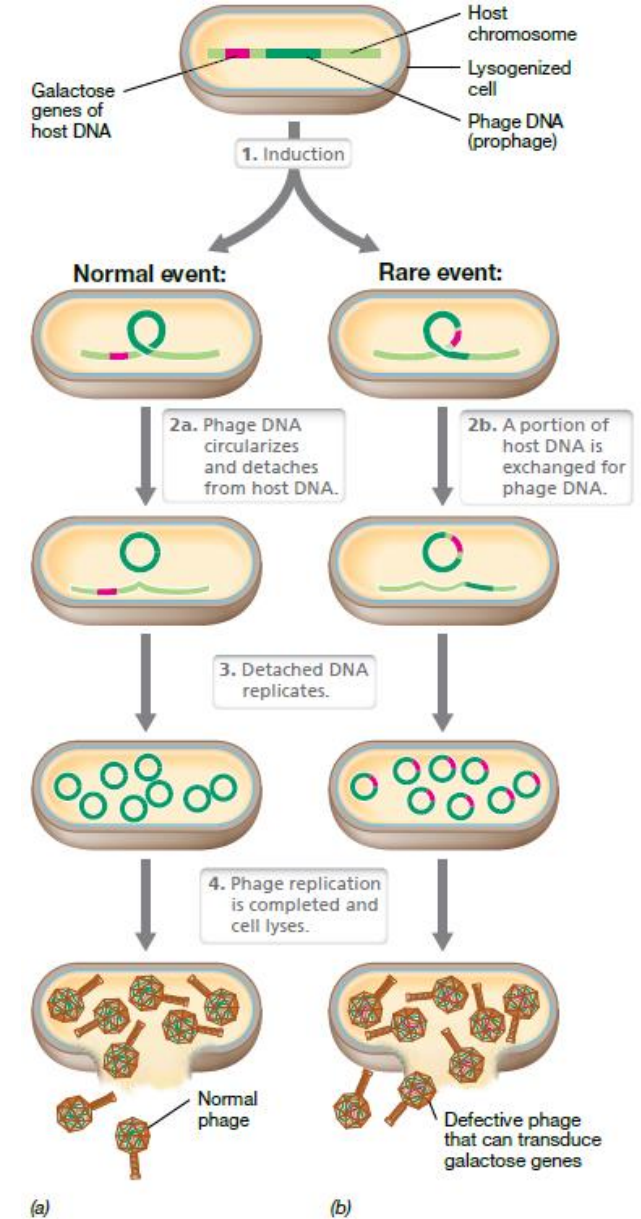
Lizogeni ve Özel Transdüksiyonun Temel Farkı

- Genelleştirilmiş transdüksiyon herhangi bir genin düşük frekansla aktarılmasına olanak tanırken, özelleşmiş transdüksiyon yalnızca küçük bir kromozomal bölgeyi çok yüksek verimle aktarır.
- Özelleşmiş transdüksiyonun ilk tanımlanan örneğinde, galaktoz katabolizması genleri *E. coli*'nin ılımlı faji lambda tarafından taşınmıştır.
- Lambda fajının bu seçici aktarım özelliği, bakteriyel kromozom üzerinde belirli bir bölgeye özgü olarak konak genomuna entegre olmasından kaynaklanır.



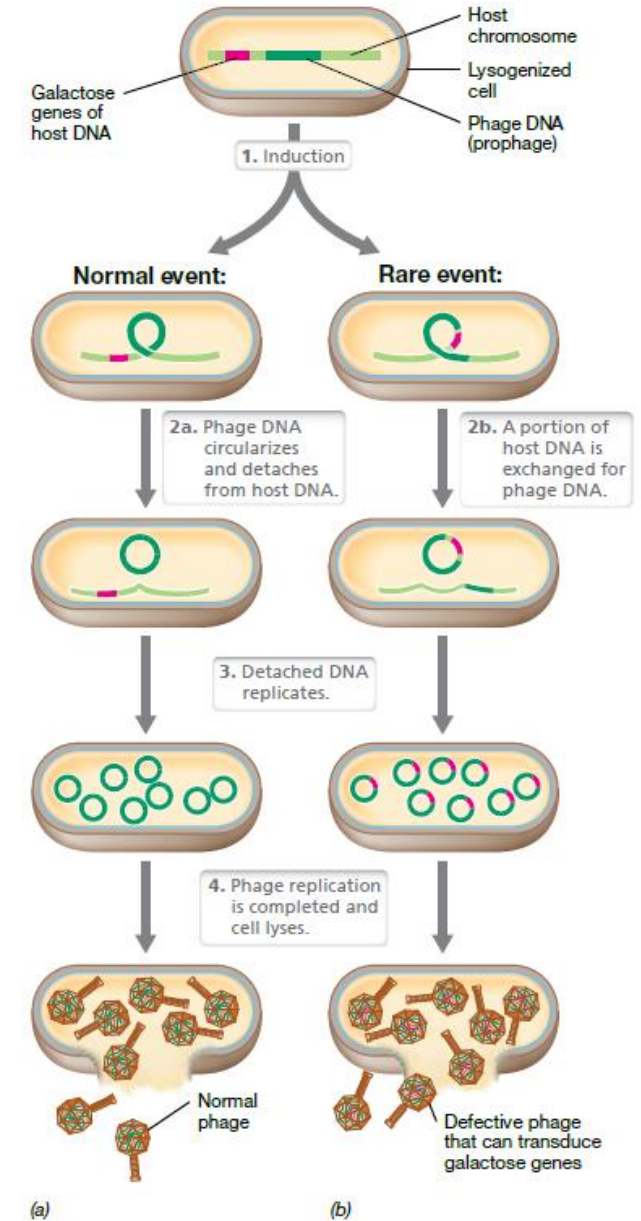
Lambda Fajının Entegrasyonu ve Genom Komşuluğu

- Lambda fajı konak hücreye lizogenleştğinde, genomunu *E. coli* kromozomundaki belirli bir bölgeye entegre eder ve bu bölge galaktoz kullanım genlerinin hemen yanındadır.
- Entegrasyondan sonra faj DNA'sının replikasyonu artık konak kromozomunun kontrolü altındadır.
- Uygun koşullarda faj indüklendiğinde, faj genomu konak DNA'sından ayrılır ve bu ayrılma entegrasyonun tersine işleyen bir süreçtir.



Hatalı Eksizyon ve Gal Operonunun Taşınması

- Genellikle lambda DNA'sı konak genomundan düzgün biçimde çıkar, ancak nadiren hatalı eksizyon gerçekleşir ve faj DNA'sına bitişik bazı konak genleri de birlikte taşınır.
- Bu sırada faj genomunun bir kısmı konakta kalabilir ve galaktoz operonu gibi yan komşu genler faj DNA'sına dâhil olabilir (Figür b).
- Bu şekilde oluşan transdükleyen partikül, galaktoz kullanım genlerini yalnızca Gal⁻ bir alıcı hücreye taşındığında ve Gal⁺ transdüktantlar seçildiğinde tespit edilebilir.



Enfeksiyon İçin Gerekli Faj DNA'sının Sınırları

- Bir lambda virionunun enfeksiyöz olabilmesi için, faj genomunun konak DNA'sı ile ne kadar yer değiştirebileceği sınırlıdır.
- Fajın protein kılıfının ve lizogeni–lizis süreçlerinin gerçekleşmesi için belirli miktarda faj geninin mutlaka korunması gerekir.
- Ancak karışık bir enfeksiyonda yardımcı faj kullanıldığında, kusurlu fajın yalnızca att bölgesi, cos bölgesi ve replikasyon başlangıç bölgesini içermesi yeterli olabilir.

Faj Konversiyonunun Tanımı

- Bir hücrenin lizogenleşme sonrası fenotipinde meydana gelen değişiklikler faj konversiyonu olarak adlandırılır.
- Normal, yani kusursuz bir ılımlı fajın lizogenleşmesi hücreye aynı fajla yeniden enfekte olma karşısında bağışıklık kazandırır ve bu durum dahi bir fenotip değişimi olarak kabul edilir.
- Bunun yanında, faj bağışıklığından bağımsız fenotipik değişiklikler de lizogen hücrelerde sıklıkla gözlemlenir.

Faj Konversiyonunun İki Klasik Örneği

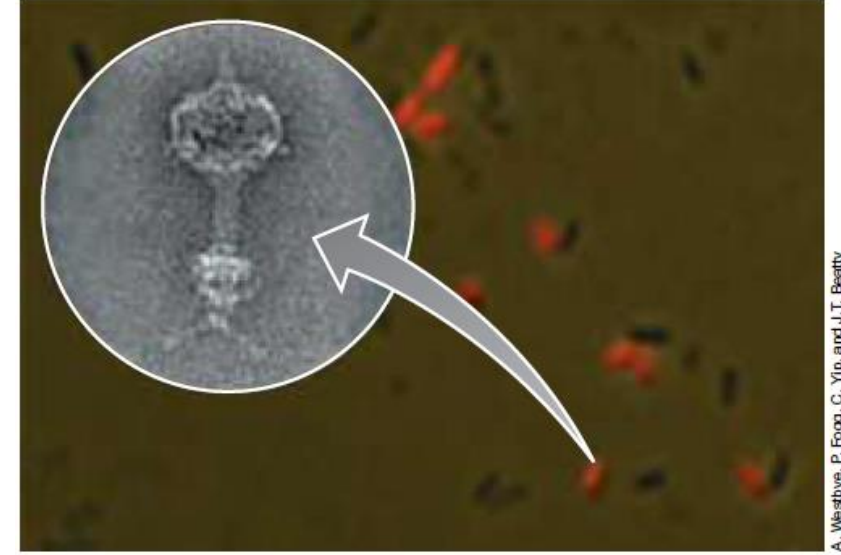
- *Salmonella enterica* (anatum) hücre yüzeyindeki bir polisakkaridin yapısı, faj $\epsilon 15$ ile lizogenleşme sonrası değışiklik gösterir.
- *Corynebacterium diphtheriae*'nin toksin üretmeyen suşları, beta fajı ile lizogenleşme sonrası toksin üreten patojen suşlara dönüşür.
- Bu örneklerde fenotipik değışimden sorumlu genler faj genomunun doğal bir parçasıdır ve lizogeni sırasında otomatik olarak konak hücreye aktarılır.

Lizogeninin Seçilimsel Avantajı

- Lizogeni, konak hücreye aynı tip virüslere karşı direnç kazandırdığı için güçlü bir seçilimsel avantaj sağlar.
- Faj konversiyonu, hücrelerin genetik olarak değişmesini sağladığından evrimsel açıdan da önemli kabul edilir.
- Doğada izole edilen pek çok bakterinin doğal lizogen olduğu gösterilmiş ve lizogeninin birçok tür için hayati öneme sahip olabileceği düşünülmüştür.

Gen Transfer Ajanlarına Genel Bakış

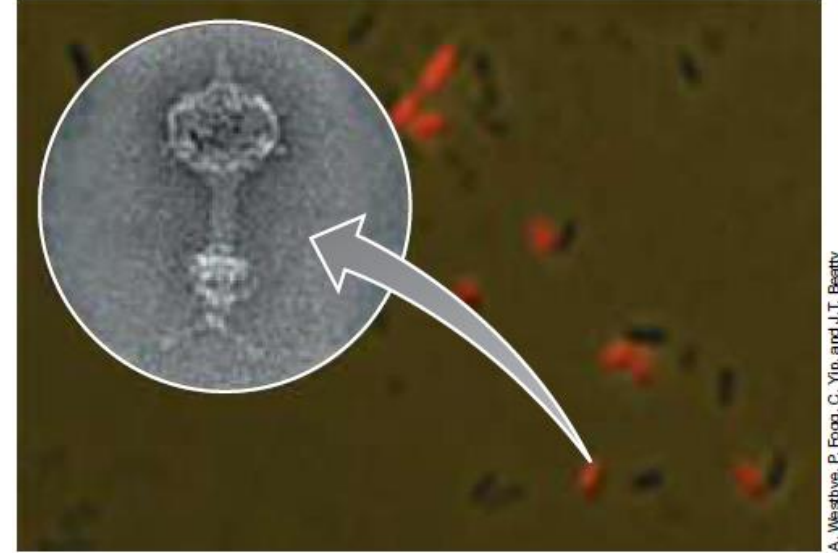
- Kusurlu bakteriyofajlardan türeyen DNA taşıyıcıları olan gen transfer ajanları, prokaryotların bu kusurlu virüsleri DNA değişimi için kullanmasıyla ortaya çıkar.
- Gen transfer ajanları küçük kuyruklu fajlara benzer fakat yalnızca rastgele küçük konak DNA parçaları içerir.
- Kendi üretimlerini sağlayacak genlere sahip olmadıkları ve viral plak oluşturmadıkları için gerçek bir virüs olarak kabul edilmezler.



A. Westbye, P. Fogg, C. Yip, and J.T. Beatty

Gen Transfer Ajanlarının Üretimi ve Ekolojik Dağılımı

- Gen transfer ajanlarının üretiminden sorumlu genler, bunları üreten hücrenin genomunda yer alır ve birçok bakteri ile bazı Archaea türlerinde izole edilmiştir.
- Özellikle denizel bakterilerde, özellikle de *Roseovarius* gibi mor bakterilerde gen transfer ajanları üretimi yaygındır.
- *Rhodobacter capsulatus* üzerinde yapılan çalışmalar, kültürdeki bir alt popülasyonun durağan faz ve besin dalgalanmaları sırasında gen transfer ajanları ürettiğini ve saldığını göstermiştir.



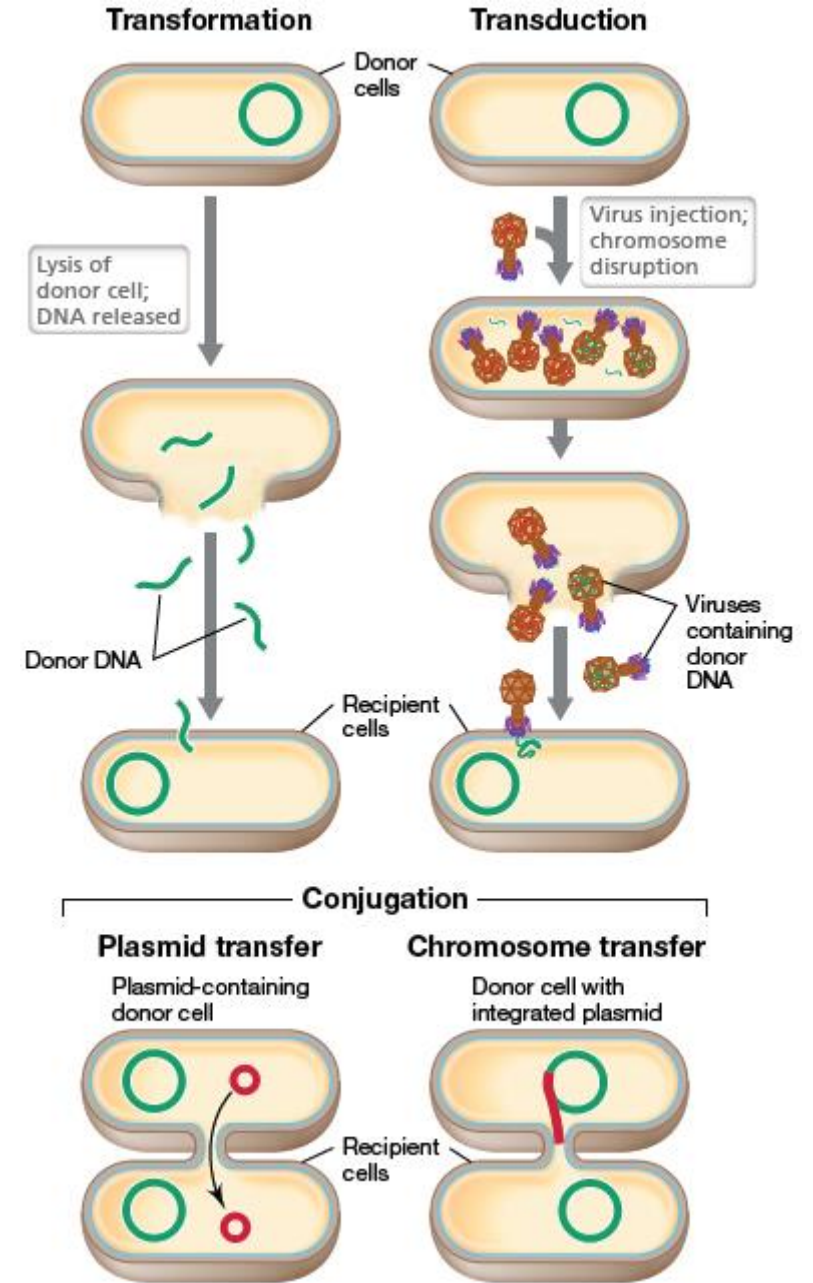
A. Westbye, P. Fogg, C. Yip, and J.T. Beatty

Gen Transfer Ajanların Doğadaki Önemi

- Gen transfer ajanlarının üretiminin, hücre lizisiyle salınan DNA'nın hızla bozulmasından önce genlerin korunaklı biçimde çevreye yayılmasını sağlayan bir mekanizma olarak evrimleşmiş olabileceği düşünülmektedir.
- Doğada en bol mikrobiyal varlıklar bakteriyofajlar olsa da bunların ne kadarının gen transfer ajanı olduğu bilinmemektedir, bu oran önemli düzeyde olabileceği düşünülmektedir.
- Gen transfer ajanlarının hücreleri lizize uğratmadan, taksonomik olarak uzak bakteriler arasında gen aktarabilmesi, özellikle açık okyanus gibi düşük besinli ekosistemlerde gen akışının başlıca taşıyıcılarından biri olabileceğini göstermektedir.

Konjugasyonun Genel Özellikleri

- Konjugasyon, hem gram-negatif hem gram-pozitif bakterilerde hücre-hücre teması gerektiren bir yatay gen aktarım biçimidir.
- Bu süreç, plazmidler tarafından kodlanan ve hem yakın akraba hem de farklı cinslere ait hücreler arasında DNA aktarımını mümkün kılan bir mekanizmadır.
- Konjugatif plazmidler, taşıdıkları genlerle birlikte kendilerinin yeni hücrelere kopyalarını aktararak özellikle antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına aracılık eder.
- Konjugasyon için donör hücre plazmidi taşıırken, alıcı hücre plazmidi taşımayan hücredir.

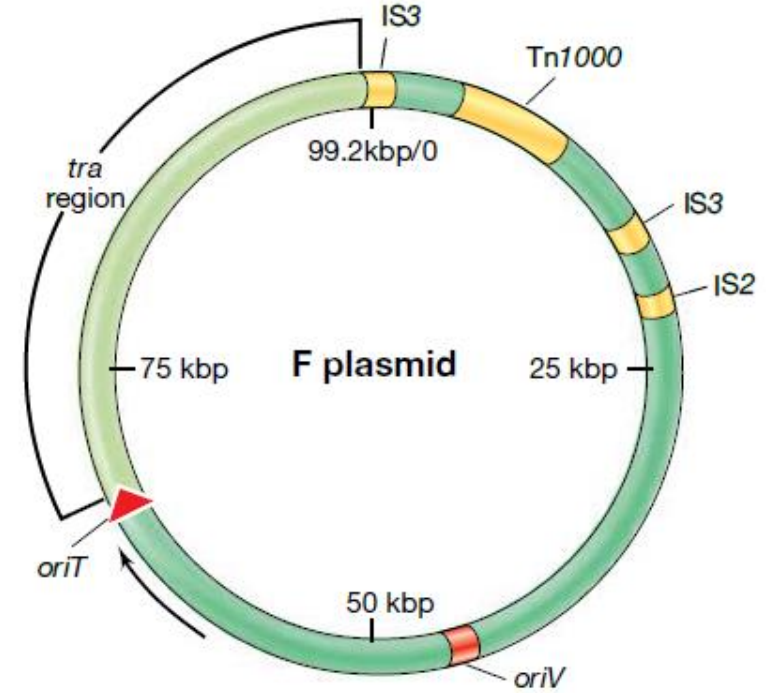


Konjugasyonda Mobilizasyon ve Keşif Süreci

- Kendilerini aktaramayan bazı genetik elementler, konjugasyon sırasında donör plazmid tarafından mobilize edilerek aktarılabilir.
- Bu mobilize edilen elementler başka plazmidler olabileceği gibi, konak kromozomu da olabilir.
- Konjugasyon olayı, *E. coli*'deki F plazmidinin konak kromozomunu mobilize edebilmesi sayesinde keşfedilmiştir.
- Gram-negatif bakterilerdeki çoğu konjugatif plazmid, F plazmidine benzer aktarma mekanizmaları kullanır.

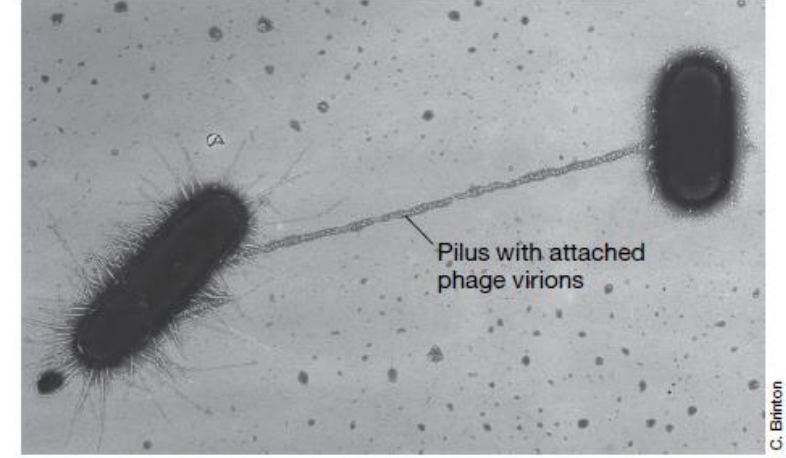
F Plazmidinin Genel Yapısı

- F plazmidi yaklaşık 99.159 bp uzunluğunda halkasal bir DNA molekülüdür.
- Plazmid üzerinde DNA replikasyonunu düzenleyen genlerin bulunduğu bir bölge ile plazmidin kromozoma entegrasyonunu sağlayan transpozonlar yer alır.
- Plazmidin geniş tra bölgesi, DNA transferi için gerekli proteinleri kodlayan genleri barındırır.
- Tra bölgesindeki genlerin çoğu, cinsiyet pilusunun ve Tip IV salgı sisteminin sentez ve işleyişinde görev yapar.



F Pilusun Rolü ve Hücre Eşleşmesi

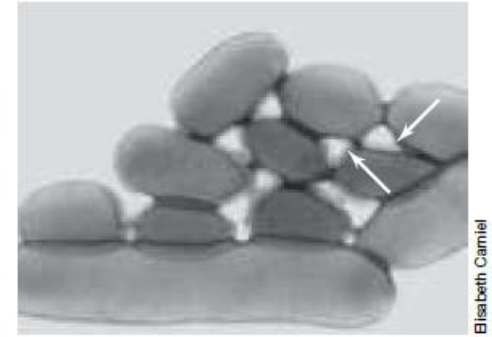
- F pilus yalnızca donör hücreler tarafından üretilir ve alıcı hücredeki belirli reseptörlere bağlanarak özgül hücre eşleşmesini başlatır.
- Pilusun reseptöre tutunmasının ardından, alt birimlerinin geri çözülmesiyle hücreler birbirine doğru çekilir (Figür a).
- Hücreler daha sonra dış zar üzerindeki bağlayıcı proteinler aracılığıyla yakın temasını sürdürür (Figür b).
- Bu temas bölgesinde oluşan konjugasyon bağlantısı üzerinden DNA, donörden alıcıya aktarılır (Figür c).



(a)



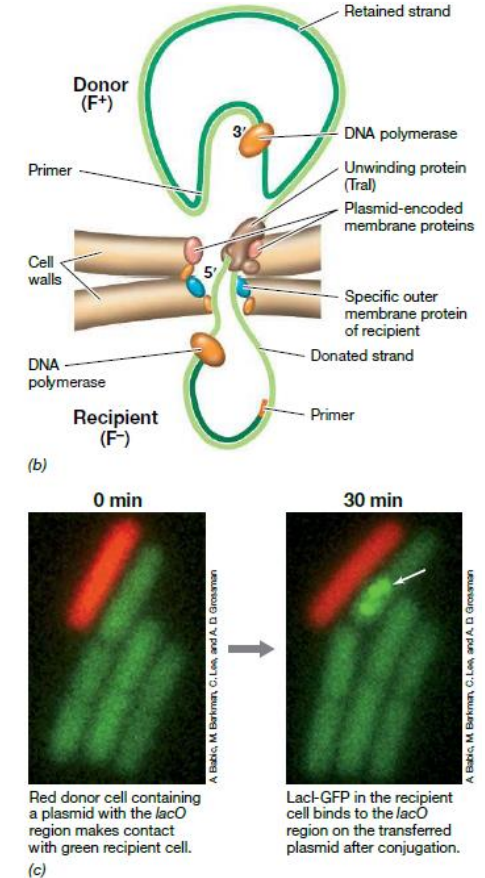
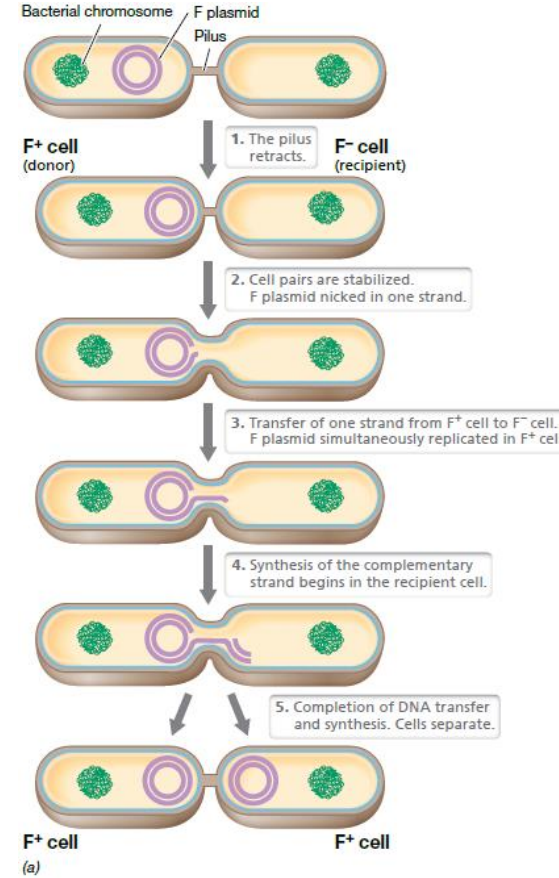
(b)



(c)

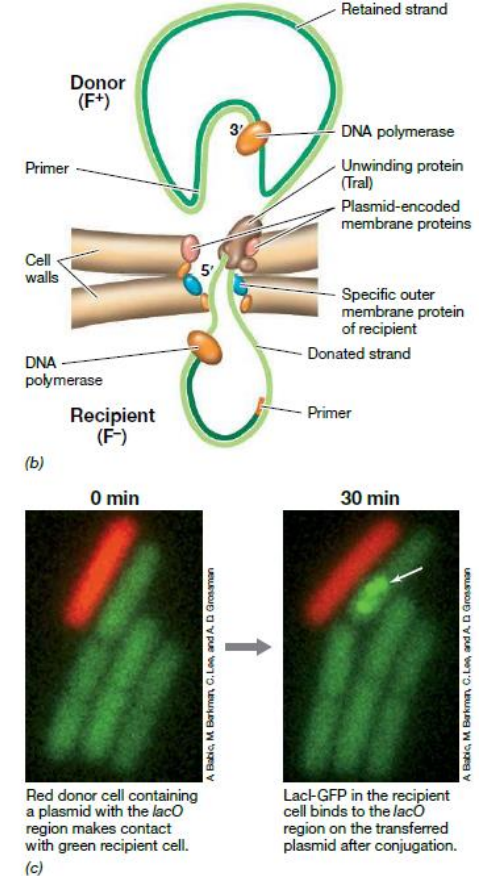
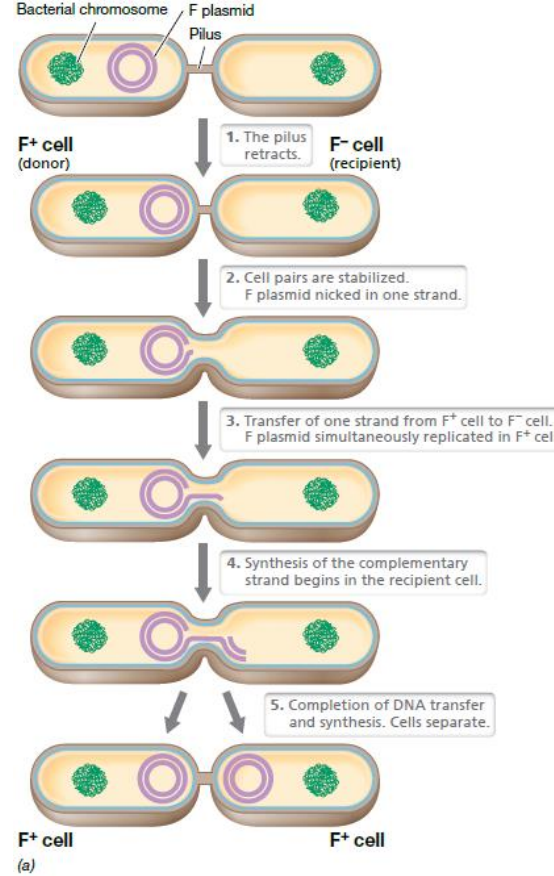
Konjugasyonda DNA Aktarım Mekanizması

- Konjugasyonda DNA aktarımı, normal çift yönlü replikasyon değil, rolling circle replikasyonu ile gerçekleşir.
- Hücre teması sonrası plazmidin bir zinciri TraI enzimi tarafından kesilir; TraI aynı zamanda aktarılacak zinciri açan helikaz aktivitesine sahiptir.
- Donörde rolling circle mekanizması ile yeni zincir sentezlenirken, alıcı hücrede tamamlayıcı zincir eşzamanlı olarak sentezlenir.
- Süreç sonunda hem donör hem de alıcı hücre tam bir F plazmidine sahip olur.



F Plazmidinin Yayılımı ve Ekolojik Önemi

- Bir F^+ donör hücre, F^- bir alıcıyla eşleştiğinde süreç sonunda iki hücre de F^+ duruma geçer.
- Plazmid aktarımı hızlı ve verimlidir; uygun koşullarda donörle temas eden hemen tüm alıcı hücreler plazmidi kazanır.
- Yaklaşık 100 kbp'lik F plazmidinin aktarımı yalnızca yaklaşık 5 dakika sürer.
- Konjugatif plazmidlerin hızla yayılması, bakteri ekosistemlerinde önemli sonuçlar doğurur ve plazmid taşıyan az sayıda hücre bile kısa sürede tüm popülasyonu dönüştürebilir.

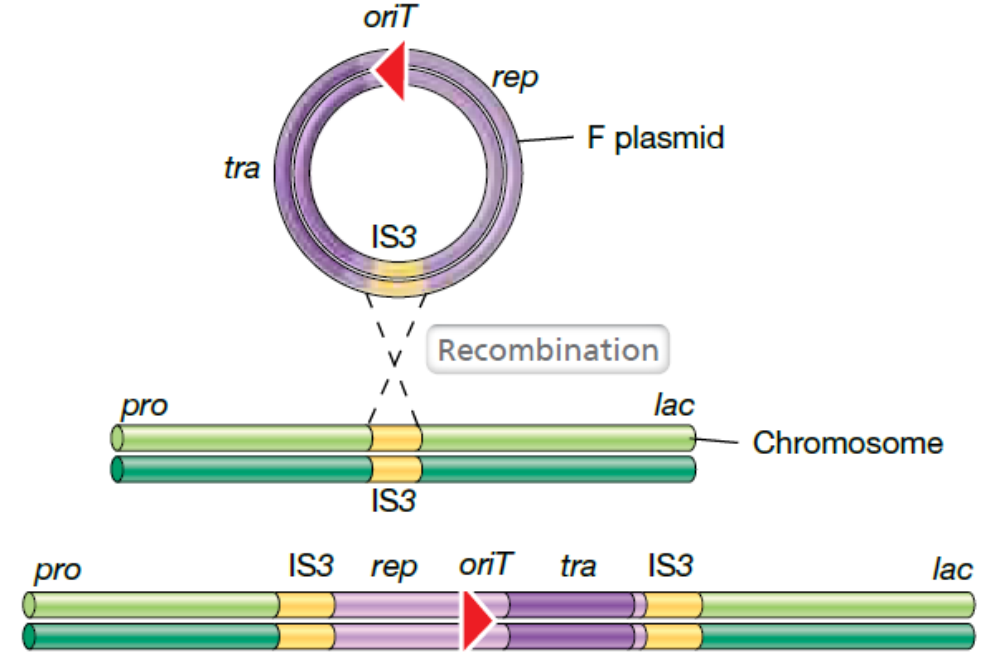


Hfr Hücrelerinin Oluşumu

- F plazmidi, konak kromozomuna entegre olabilen bir epizomdur ve bu durumda kromozomal genler konjugasyon sırasında plazmidle birlikte aktarılabilir.
- Entegrasyon gerçekleştiğinde hücre Hfr (high frequency of recombination) olarak adlandırılır; serbest F plazmidi taşıyan hücreler ise F^+ olarak bilinir.
- Hfr hücreleri F^+ hücreler gibi donördür ancak aktarım, plazmidle birlikte kromozomal genleri de içerir.
- Bu süreç, donör ve alıcı kromozomları arasında yüksek rekombinasyon oranlarıyla sonuçlanır.

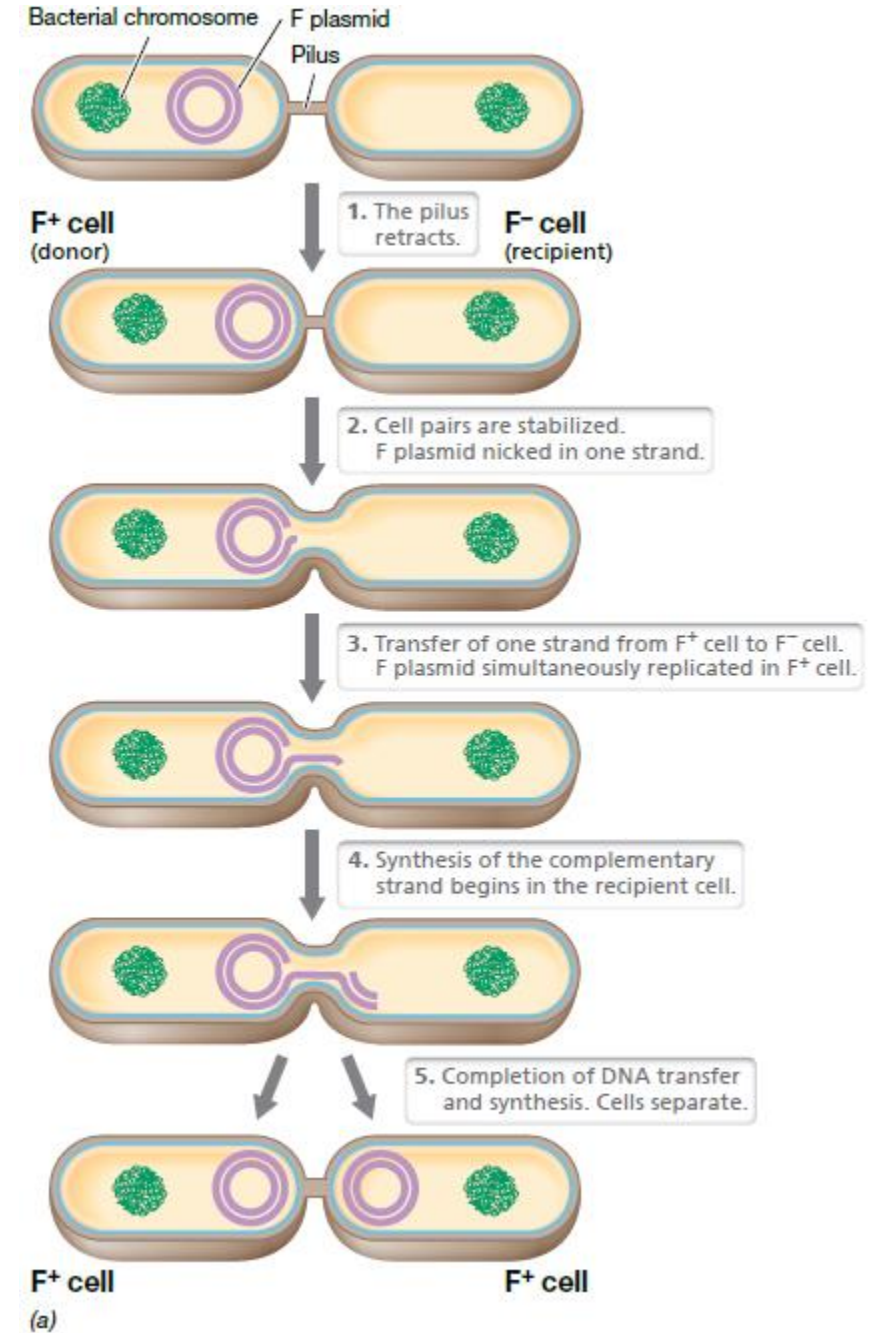
Hfr Konjugasyonunda Kromozomun Aktarılması

- F plazmidi kromozoma entegre olduğunda, plazmid ve kromozom tek bir DNA molekülü gibi davranır.
- Rolling circle replikasyonu başlatıldığında replikasyon plazmidden kromozoma doğru devam eder ve kromozomun bölümleri transfer edilir.
- Böylece hücre genomunun mobilize edilmesi mümkün hale gelir ve geniş çaplı gen aktarımı gerçekleşebilir.
- Bu mekanizma konjugatif plazmidlerin yalnızca plazmid genlerini değil, hücrenin kromozomal genlerini de yatay olarak yayabilmesini sağlar.



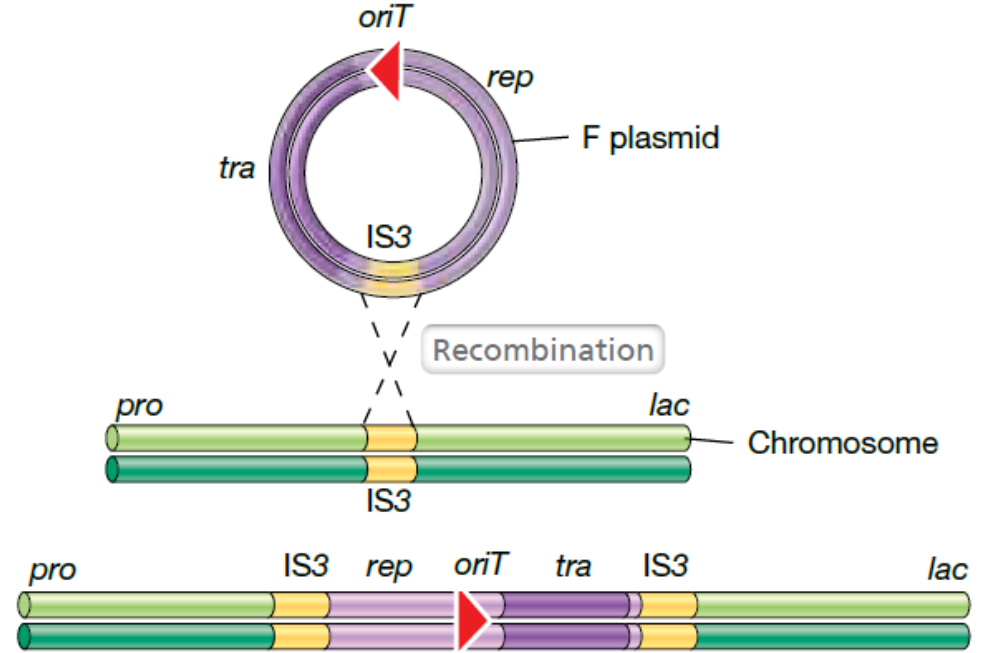
F Plazmidinin Hücrede Yarattığı Üç Temel Değişiklik

- Hücre, F pilusunu sentezleme yeteneği kazandığında ve bu yapı konjugasyonun başlatılmasında kritik rol oynar.
- Hücre, DNA mobilizasyonu yaparak genlerini başka hücrelere aktarabilir hale gelir.
- Yüzey reseptörleri değiştiği için hücre artık alıcı olamaz ve ikinci bir F plazmidi ya da benzer plazmidleri kabul edemez.



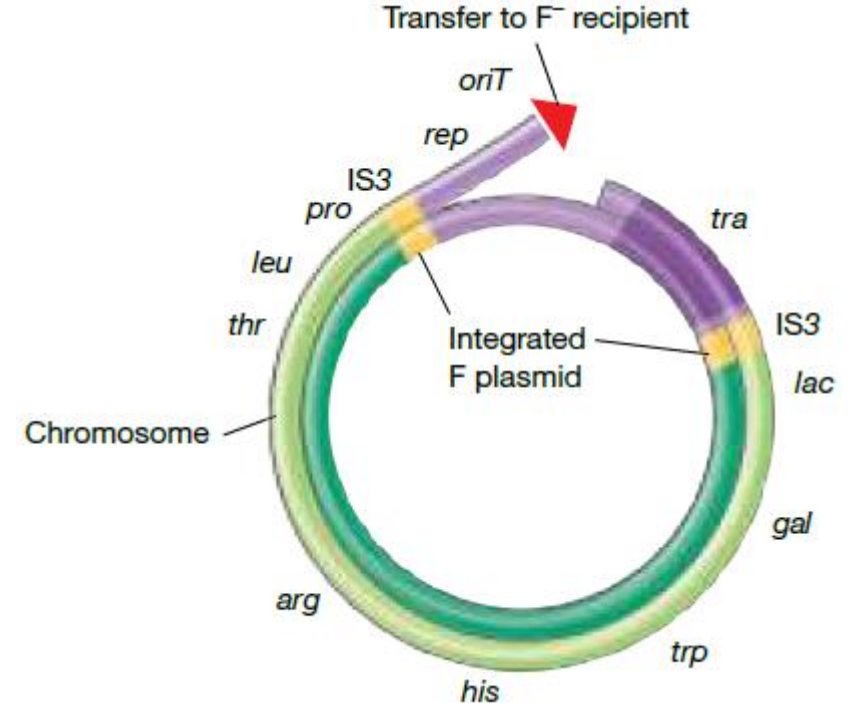
F Plazmidinin Kromozoma Entegrasyonunun Temeli

- *E. coli* kromozomu ile F plazmidinde birden fazla yer alabilen IS dizileri, iki DNA arasında homolog bölgeler oluşturarak rekombinasyon için zemin hazırlar.
- Bir IS dizisi üzerinden gerçekleşen homolog rekombinasyon, F plazmidinin bakteri kromozomuna entegre olmasına yol açar.
- Entegrasyon sonrası plazmid bağımsız olarak çoğalmaz ancak tra operonu çalışmaya devam ettiği için hücre yine pilus sentezler.
- Böyle bir hücre alıcı bir F⁻ hücreyle karşılaştığında, F⁺ hücrelerde olduğu gibi konjugasyon tetiklenir ve DNA transferi oriT bölgesinden başlar.



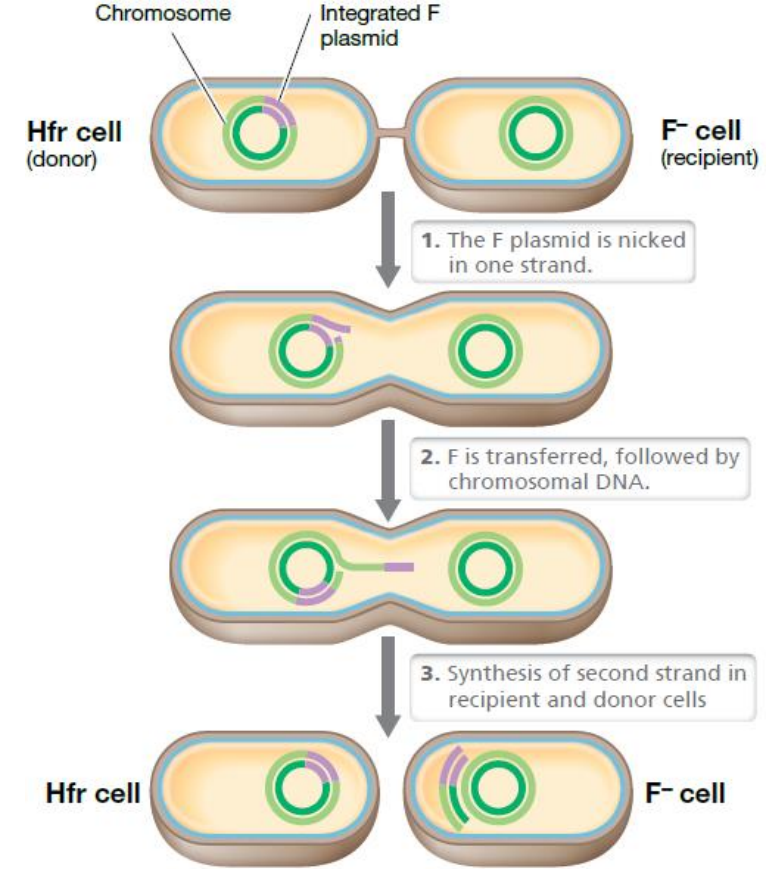
Entegre F Plazmidi ile Konjugasyonda Kromozomal Gen Aktarımı

- F plazmidi artık kromozomun parçası olduğundan, plazmid dizisinin ardından kromozomal genlerin de alıcı hücreye aktarımı başlar.
- Bu süreçte, tıpkı serbest F plazmidi konjugasyonunda olduğu gibi DNA aktarımı DNA replikasyonu ile birlikte yürür.



Entegre F Plazmidi ile Konjugasyonda Kromozomal Gen Aktarımı

- Transfer sırasında DNA zincirinin genellikle kopması nedeniyle verici kromozomun yalnızca bir kısmı alıcıya geçer.
- Bu yüzden alıcı hücre Hfr ya da F^+ hâline gelmez çünkü entegre F plazmidinin tamamı aktarılmaz.



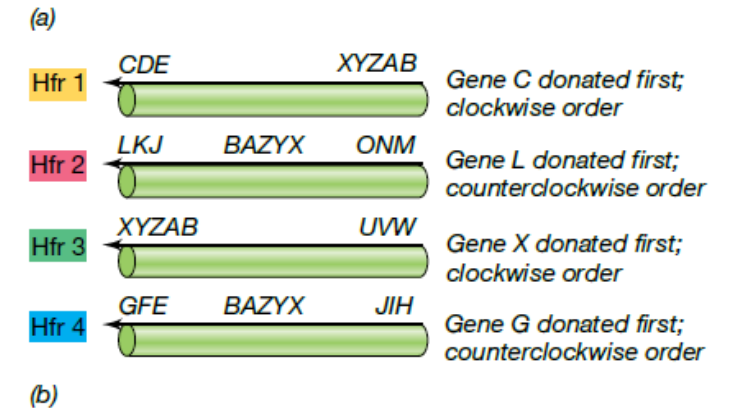
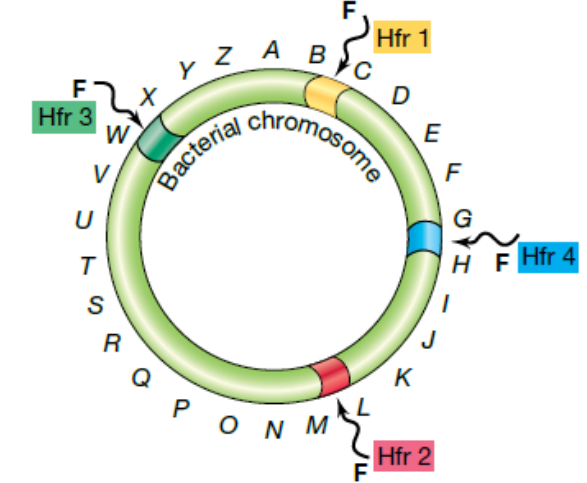
Hfr Hücrelerin Genetik Özellikleri ve Rekombinasyonun Sonuçları

- Aktarım sonrasında Hfr hücreler genetik olarak Hfr kalmaya devam eder çünkü entegre F plazmidinin bir kopyası kromozomda hâlâ bulunur.
- Alıcı hücre, yalnızca aktarılan donör genleri kendi kromozomuna entegre edebilirse yeni bir fenotip kazanabilir ancak genetik olarak F^- olarak kalır.
- Kısmi kromozom parçaları bağımsız çoğalamadığından, donör DNA'nın kalıcı olabilmesi için alıcı kromozomu ile homolog rekombinasyon yapması gerekir.
- Bu gereklilik, transformasyon ve transdüksiyonda olduğu gibi rekombinasyonun homolog diziler üzerinden gerçekleştiğini bir kez daha gösterir.



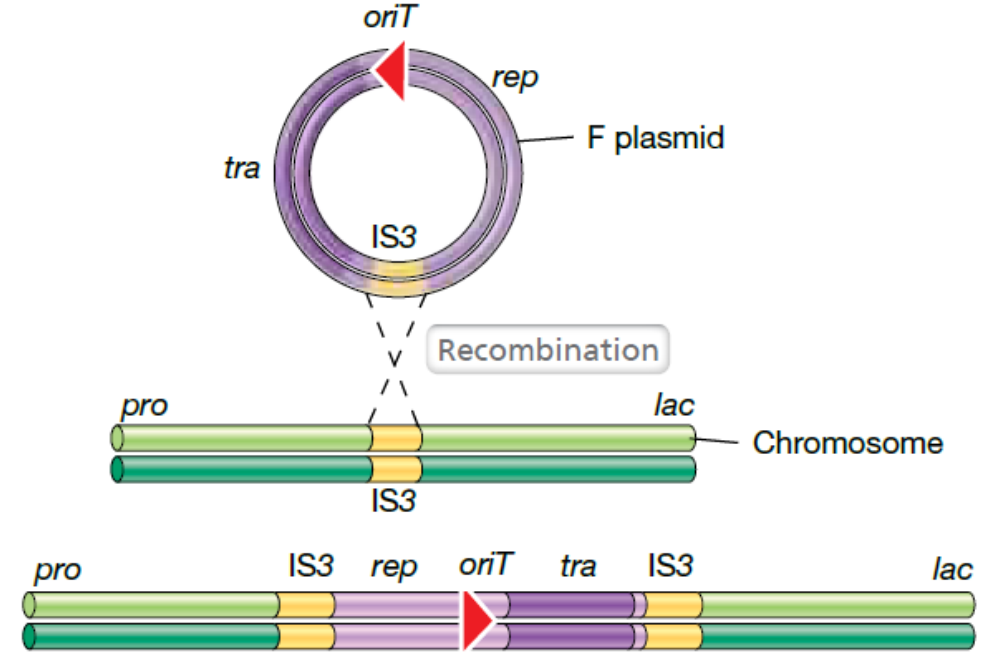
Farklı Hfr Suşlarının Ortaya Çıkışı ve Gen Aktarım Yönleri

- *E. coli* kromozomunda birçok farklı IS dizisinin bulunması, F plazmidinin çeşitli bölgelerde entegre olabilmesine ve böylece çok sayıda farklı Hfr suşu oluşmasına imkân verir.
- Her Hfr suşu, F plazmidinin kromozoma bağlandığı noktaya özgü olarak genleri her zaman aynı sırayla ve aynı başlangıç noktasından aktarır.
- Entegrasyon bölgesi değiştikçe gen aktarım sırası da değişir ve farklı yönelimlerdeki F plazmidleri genlerin giriş sırasını belirler.
- Bu durum, uygun Hfr konfigürasyonları ile kromozom üzerindeki hemen her genin alıcıya aktarılabilceğini gösterir.



F' Plazmidlerinin Oluşumu ve Kromozomal Gen Aktarımı

- Zaman zaman entegre F plazmidi kromozomdan eksiz olurken (ayrılırken) kromozomal genleri de yanında taşıyarak serbestleşebilir.
- Kromozomal genler içeren bu yeni plazmidlere F' (F-prime) plazmidler adı verilir.
- F' plazmidler konjugasyonu başlattığında, taşıdıkları kromozomal genleri alıcıya yüksek frekansta aktarır.
- Her bir F' plazmidi yalnızca belirli bir gen grubunu taşıdığı için aktarılan gen çeşidi sınırlıdır ve bu durum özelleşmiş transdüksiyona benzer bir aktarım biçimi oluşturur.



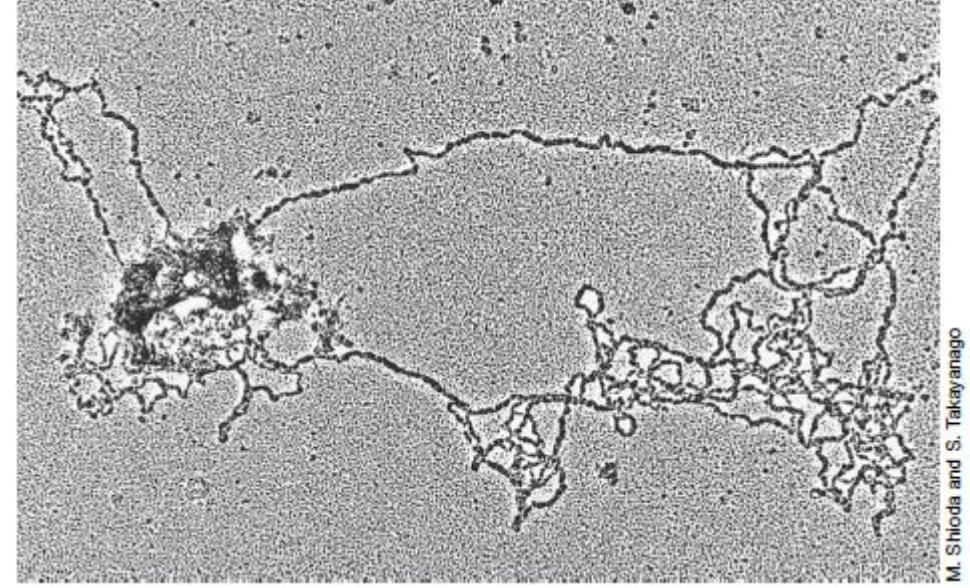
F' Plazmidleri ve Kısmi Diploidlerin Önemi

- Bilinen bir F' plazmidinin alıcıya aktarılması, kromozomun belirli bir bölgesi için iki kopya oluşturulmasına yani kısmi diploid (mero-diploid) yapının kurulmasına imkân tanır.
- Bu kısmi diploidlik, genetik tamamlayıcılık testlerinin yapılabilmesi için önemli bir araçtır.
- F' plazmidleri böylece hem gen haritalama hem de gen işlevini test etme çalışmalarında temel bir deneysel sistem sunar.
- Bu süreç, plazmid–kromozom etkileşimlerinin genetik analizler için nasıl kullanılabileceğini açık biçimde ortaya koyar.



Archaea'da Yatay Gen Transferi İçin Genel Çerçeve

- Archaea da çoğu Bakteride olduğu gibi tek bir halkasal kromozoma sahiptir.
- Genom analizleri, Archaea'da da doğal ortamda yatay gen transferinin gerçekleştiğini açık biçimde ortaya koyar.
- Ancak laboratuvarında uygulanabilir gen aktarım sistemleri Archaea için henüz bakterilerdeki kadar gelişmiş değildir.
- Bu gecikme, araştırmaların ilerlemesini yavaşlatsa da yeni genetik araçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar sürmektedir.



Archaea Genetiğinde Karşılaşılan Pratik Zorluklar

- Çoğu iyi çalışılmış Archaeon ekstremofildir ve yüksek tuz ya da yüksek sıcaklık gibi alışılmadık koşullarda büyüdüğü için laboratuvar ortamı bu türleri kültüre almakta güçlük çıkarır.
- Örneğin bazı hipertermofillerin gerekli büyüme sıcaklıkları agarı eritecek kadar yüksek olduğundan, katı ortam hazırlamak için alternatif maddeler gerekir.
- Bu tür pratik engeller, saf koloni izolasyonu ve genetik çaprazlamaların yapılmasını zorlaştırır.
- Dolayısıyla Archaea genetiğinde yöntem geliştirme süreci çoğu zaman bakterilerden daha yavaş ilerler.



Archaea İçin Uygun Seleksiyon Sistemlerinin Sınırlılıkları

- Bilinen antibiyotiklerin büyük kısmı Archaea üzerinde etkili değildir çünkü örneğin penisilinler, peptidoglikan içermeyen hücre duvarına sahip Archaea'yı hedefleyemez.
- Bu nedenle genetik seçim deneylerinde kullanılabilecek uygun seçici belirteçlerin sayısı sınırlı kalır.
- Yine de novobiosin ve mevinolin gibi bazı inhibitörler aşırı halofilleri, puromisin ve neomisin ise metanojenleri baskılayabilir.
- Ayrıca birkaç Archaeon için oksotrofik mutantlar elde edilmiş ve bu suşlar genetik seçimlerde kullanılır hâle gelmiştir.



Arkeal Genetik Çalışmaların Genel Çerçevesi

- Arkeal genetik için tek bir model organizma olmamakla birlikte, en çok genetik çalışma aşırı halofiller üzerinde yapılmıştır (örn; Halobacterium, Haloferax).
- Archaea içinde farklı türlere dağılmış çeşitli gen transfer mekanizmaları tanımlanmıştır.
- Archaea'dan çeşitli plazmidler izole edilmiş ve bunların bazıları gen klonlama ve dizileme çalışmalarında kullanılacak vektörlere dönüştürülmüştür.
- Transpozon mutagenezi, özellikle *Methanococcus* ve *Methanosarcina* türlerinde geliştirilmiş olup metanojenlerin özgün biyokimyasını incelemek için ek araçlarla desteklenmiştir.



Archaea'larda Transformasyon ve Hücre Duvarının Rolü

- Doğal kompetans gösteren *Methanococcus voltae*, *Thermococcus kodakarensis* ve *Pyrococcus furiosus* türlerinde transformasyon gerçekleşmektedir.
- *Thermococcus* türleri, DNA içeren membran vezikülleri oluşturarak plazmid değişimi yapabilmektedir.
- Bazı transformasyon yöntemleri, iki değerlikli metal iyonlarının uzaklaştırılmasıyla S-tabakası glikoprotein duvarının kısmen dağılmasına dayanır.
- Rigid hücre duvarına sahip Archaea'nın transformasyonu zor olsa da, *Methanosarcina* türlerinde lipozom kullanılarak yüksek verimli sistemler geliştirilmiştir.



Arkeal Viroloji ve Transdüksiyonun Sınırlılığı

- Archaea'yı enfekte eden çok sayıda virüs bulunmasına rağmen transdüksiyon son derece nadirdir.
- Sadece *Methanothermobacter thermautotrophicus*'u enfekte eden bir virüsün konak genlerini transdüklediği gösterilmiştir.
- Bu sistemdeki düşük patlama miktarı (lizis sonrası salınan virüs/faj partikülü sayısı-hücre başına yaklaşık altı faj) nedeniyle gen transferi için pratik bir yöntem sağlanamamaktadır.
- Gen transfer ajanları bazı metanojenlerde bulunmasına rağmen Archaea genelinde yaygın değildir.



Archaea'larda Konjugasyonun Temel Özellikleri

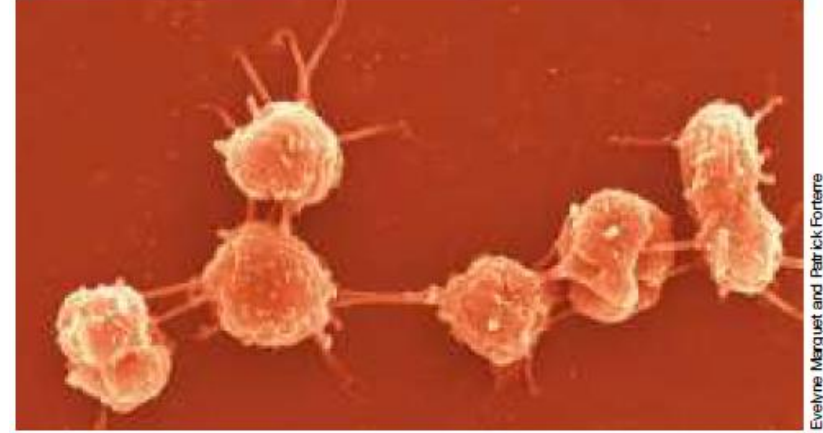
- Bazı *Sulfolobus solfataricus* suşları, bakterilerdeki sisteme benzer şekilde konjugasyonu teşvik eden plazmidler taşımaktadır.
- Bu süreçte hücre eşleşmesi pilus oluşumundan bağımsızdır ve DNA transferi tek yönlüdür.
- *S. solfataricus*'ta bu işlevleri kodlayan genlerin çoğu gram-negatif bakterilerdeki dizilere benzememektedir.
- Ancak F plazmidindeki traG'ye benzer bir genin ürünü, eşleşme sırasında hücre çiftlerini stabilize etmektedir.

Sulfolobus Türlerinde UV Tetikli DNA Değişimi

- Çoğu *Sulfolobus* türü, F plazmidi olmaksızın DNA değişimi yapabilmektedir.
- Bu DNA değişimi, UV ışığının tetiklediği pilus sentezine bağlı olan hücre agregasyonunu gerektirir.
- Pililer, hücrelerin S-tabakasındaki glikozilasyon desenlerini tanıyarak aynı türden hücreleri bir araya getirir.
- Bu mekanizmanın ayrıntıları tam olarak bilinmemekle birlikte, tür içi DNA etkileşimini mümkün kıldığı düşünülmektedir.

Archaea'larda Özel Yapılar ve Nanotüplerle DNA Transferi

- Bazı Archaea türleri, genetik değişim için hücreler arasında özelleşmiş yapılar oluşturur ve bu süreç F plazmidi gerektirmez.
- *Thermococcus* türlerinde hücreler arasında DNA taşıyan nanotüplerin oluşumu yanda gösterilmektedir.
- *Thermococcus* nanotüpleri, diğer yatay gen transfer mekanizmalarından farklı olarak çift yönlü DNA transferine olanak sağlar.
- Bazı halobakterilerde de DNA aktarımında kullanılan sitoplazmik köprüler bulunur ve bu sistemler gelecekte gen transfer çalışmalarını kolaylaştırabilir.



Evelyn Marguet and Patrick Forterre

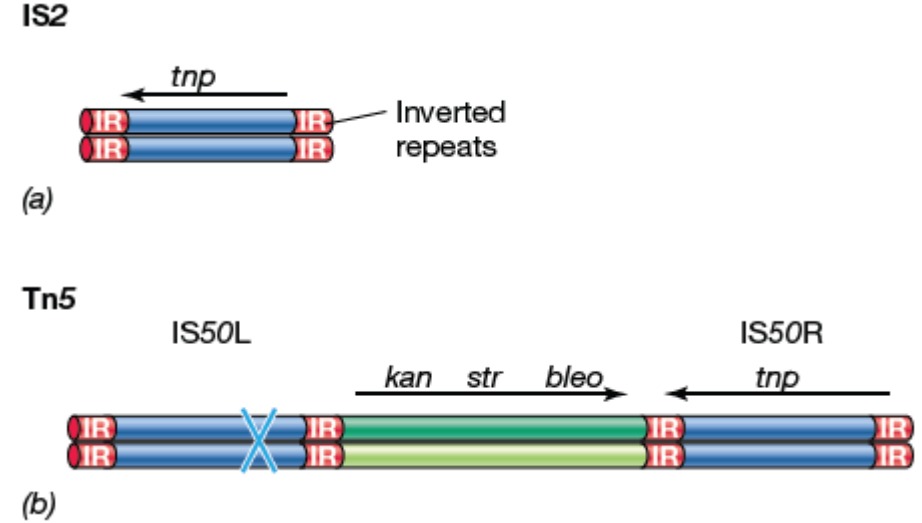


Mobil DNA Kavramı ve Transpoze Olabilir Unsurların Önemi

- Mobil DNA, diğer DNA molekülleri içinde bir yerden başka bir yere hareket edebilen ayırık DNA segmentlerini ifade eder.
- Bazı virüslerin DNA'ları konağın genomuna girip çıkabilse de, mobil DNA çoğunlukla transpoze olabilen elementlerden oluşur.
- Transpoze elementler kendi replikasyon orijinine sahip değildir ve konak DNA'sı replike olduğunda replike edilir.
- Bu elementlerin transpozisyon yeteneği, genomun yeniden düzenlenmesi ve genetik analiz açısından önemli bir süreçtir.

Bakterilerde Transpozon Tipleri ve Yapısal Özellikleri

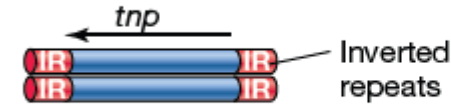
- Transpoze elementler tüm yaşam alanlarında yaygın olup genom düzenlenmesini hızlandırarak seçilim avantajı sağlayabilir.
- Bakterilerdeki iki ana transpoze element türü insersiyon dizileri (IS) ve transpozonlardır.
- Her iki elemana da transpozisyon için gerekli olan transpozaz genleri ve uçlarında bulunan kısa ters tekrar dizileri (IR) eşlik eder.
- Yandaki figür, IS2 ve Tn5 gibi iyi çalışılmış transpoze elementlerin genetik haritalarını göstermektedir.



En Basit Transpoze Olabilen Öğeler: IS Elementleri

- İnsersiyon sekansı (IS) elementleri yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda olan ve en basit transpoze olabilen DNA segmentlerini temsil eder.
- Bu elementler, uçlarında 10–50 baz çifti uzunluğunda ters tekrar dizileri taşır ve her IS elementinde bu tekrarların uzunluğu farklılık gösterebilir.
- IS elementlerinin tek kodladığı protein transpozazdır ve şimdiye kadar yüzlerce farklı IS karakterize edilmiştir.
- IS elementleri Bacteria ve Archaea kromozomlarında, plazmidlerde ve bazı bakteriyofajlarda bulunur.

IS2



(a)

Tn5



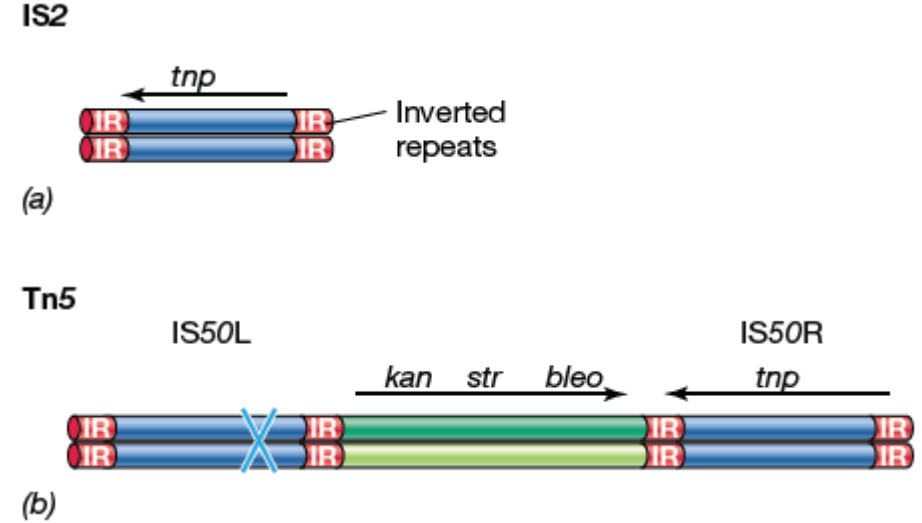
(b)

IS Elementlerinin Genomik Dağılımı ve Örnekler

- Aynı türün farklı bakteri suşları taşıdıkları IS elementlerinin sayısı ve genom içindeki konumu bakımından önemli çeşitlilik gösterir.
- Örneğin, bir *E. coli* suşunun genomunda beş adet IS2 ve beş adet IS3 bulunabilir.
- Birçok plazmid, özellikle F plazmidi, IS elementleri taşır ve F plazmidinin kromozoma entegrasyonu, F plazmidindeki ve kromozomdaki özdeş IS elementleri arasında gerçekleşen rekombinasyonla kolaylaşır.

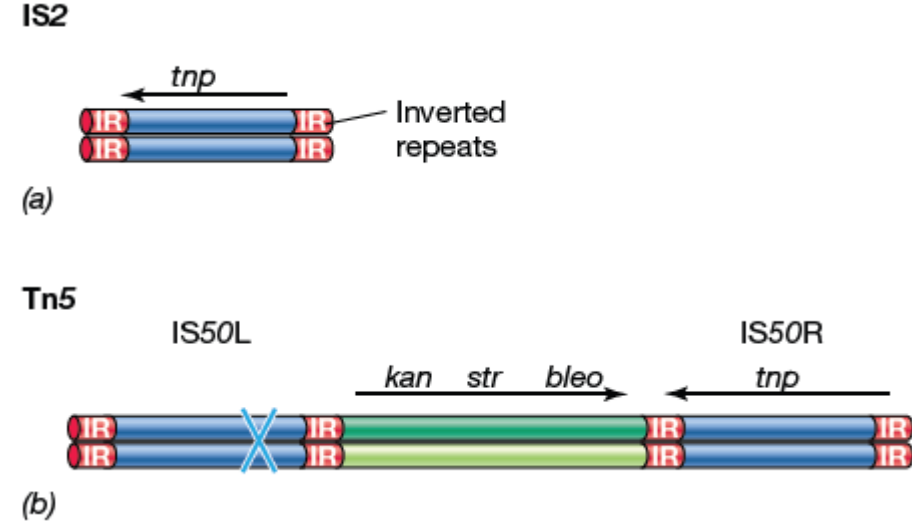
Transpozonların Genel Yapısı

- Transpozonlar IS elementlerinden daha büyük olup uçlarında ters tekrar dizileri ve transpozazı kodlayan bir gen taşımaları bakımından IS elementleri ile aynı temel yapıya sahiptir (Figür b).
- Transpozaz, ters tekrar dizilerini tanır ve bu dizilerle çevrili DNA segmentini genom içinde yeni bir hedef bölgeye taşır.
- Böylece ters tekrarlar arasında yer alan herhangi bir DNA bölgesi de transpozonun bir parçası olarak taşınmış olur.
- Transpozonların içerdiği genler oldukça çeşitlidir ve aralarında canlıya yeni özellikler kazandıran antibiyotik direnç genleri de bulunur.



Antibiyotik Direnç Genleri Taşıyan Transpozon Örnekleri

- Antibiyotik direnci hem önemli hem de tespiti kolay bir özellik olduğu için pek çok iyi çalışılmış transpozon, antibiyotik direnç genlerini seçilebilir belirteç olarak taşır.
- Tn5 transpozonu kanamisin direncini kodlayan bir gen taşır (Figür b).
- Tn10 transpozonu ise tetrasiklin direncini kodlar ve bu yönüyle geniş çapta kullanılan bir diğer örnektir.

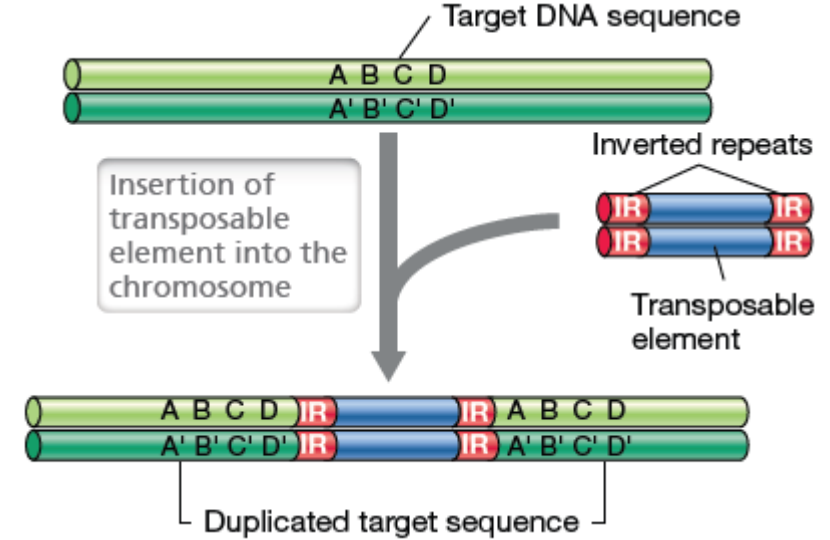


Hibrit ve Konjugatif Transpozonlar

- Ters tekrarlar arasında yer alan tüm genler transpozonun bir parçası olabileceğinden hibrit transpozonlar oluşabilir.
- Konjugatif transpozonlar tra genleri taşır ve türler arası konjugasyonla aktarılabilirken, aynı zamanda tek bir genom içinde yer değiştirebilir.
- Daha karmaşık bir örnek olan bakteriyofaj Mu ise hem bir virüs hem de bir transpozon olup yapısı içinde tam bir virüs genomu yer alır.

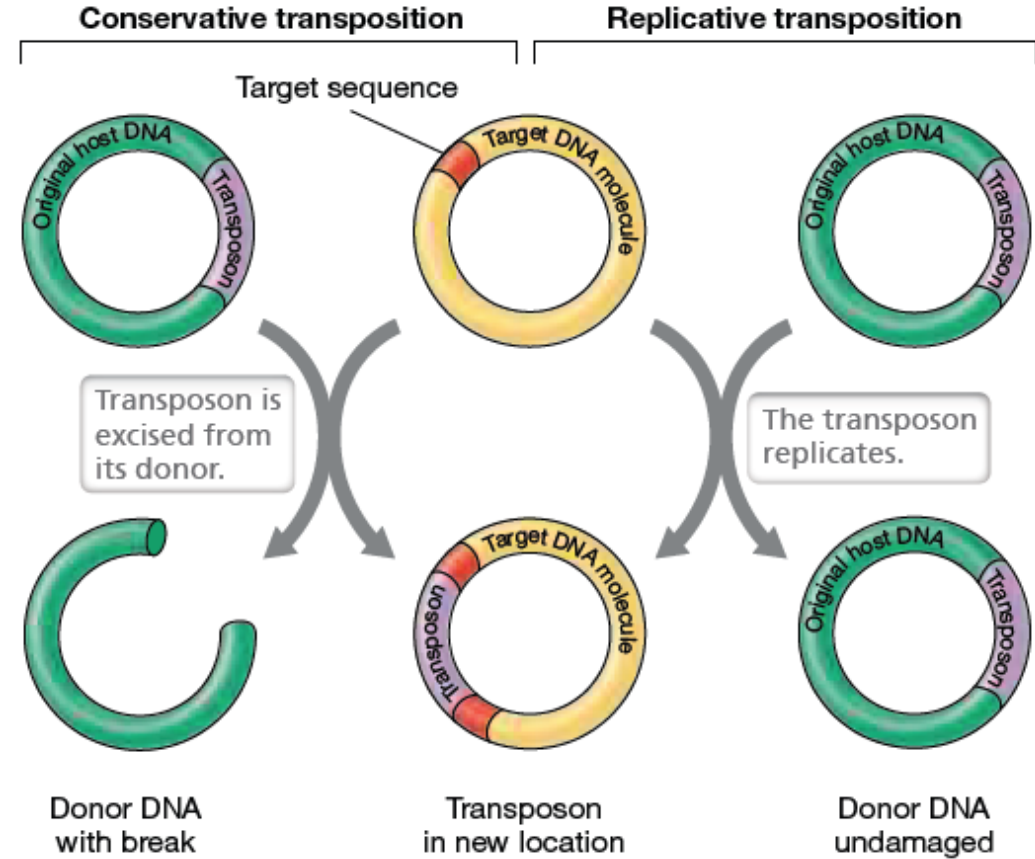
Transpozisyonun Temel Bileşenleri

- Transpoze olma süreci için hem elementin uçlarındaki ters tekrar dizileri hem de transpozaz enzimi zorunludur.
- Transpozaz, transpozisyon sırasında DNA'yı tanıyan, kesen ve bağlayan temel enzimdir.
- Bir transpozon hedef DNA'ya yerleştiğinde, hedef bölgedeki kısa bir dizi transpozisyon sırasında çoğaltılır.
- Bu çoğalma transpozazın oluşturduğu tek iplikçikli kırıklar ve hedef DNA uçlarına yapılan bağlanma işleminin ardından hücre enzimlerinin boşlukları doldurmasıyla gerçekleşir.



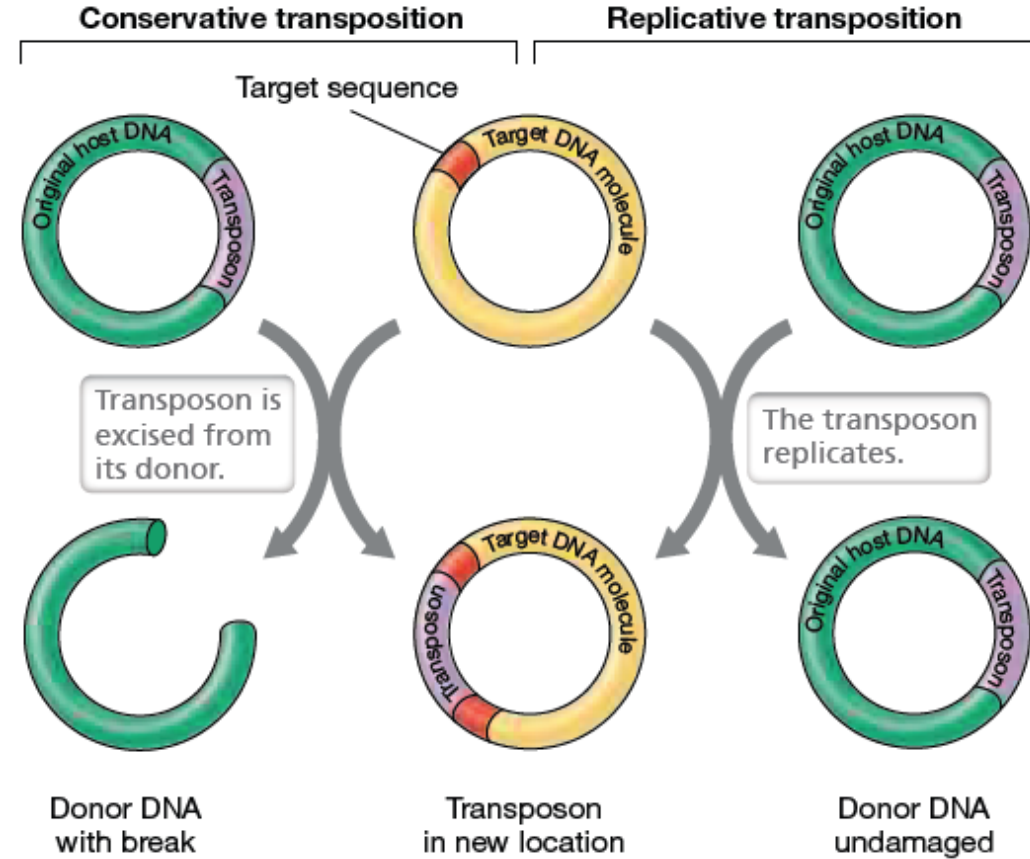
Transpozisyon Mekanizması: Koruyucu (Conservative) ve Çoğaltıcı (Replicative)

- Transpozisyon iki farklı mekanizma ile gerçekleşir: konservatif transpozisyon ve replikatif transpozisyon.
- Konservatif transpozisyonda, örneğin Tn5 transpozonunda olduğu gibi, transpozon bir bölgeden tamamen çıkar ve başka bir bölgeye tek kopya olarak yerleşir.
- Replikatif transpozisyonda ise transpozonun yeni bir kopyası oluşur ve hedef bölgeye eklenir.
- Böylece replikatif transpozisyon sonunda orijinal bölgede bir kopya kalırken ikinci bir kopya yeni bölgeye yerleşmiş olur.



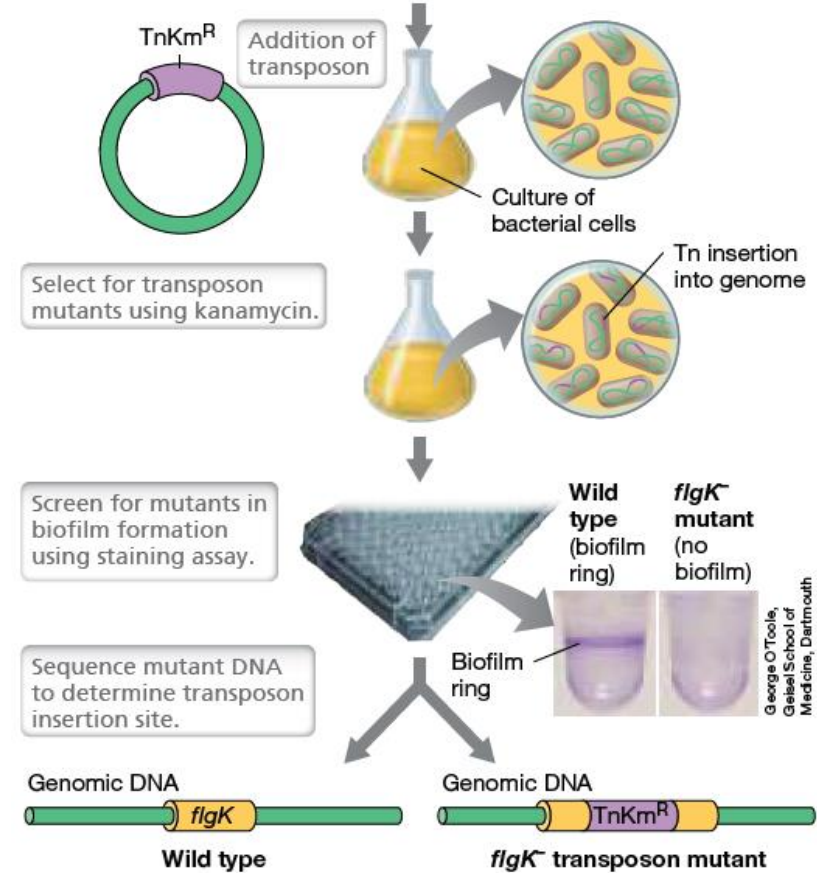
Transpozon Mutagenезinin Temel Prensipleri

- Bir transpozon bir genin içine yerleştğinde o genin DNA dizisini bozarak mutasyon oluşturur.
- Bu tür mutasyonlar doğal olarak meydana gelebilir ancak laboratuvarında kontrollü olarak oluşturulan transpozon mutagenезi güçlü bir genetik araçtır.
- Laboratuvar uygulamalarında antibiyotik direnç genleri taşıyan transpozonlar, hedef hücreye çoğalamayan bir plazmid aracılığıyla konjugasyon veya transformasyonla aktarılır.
- Bu durumda antibiyotiğe dirençli kolonilerin çoğu transpozonun bakteri genomuna yerleşmesinden kaynaklanır.



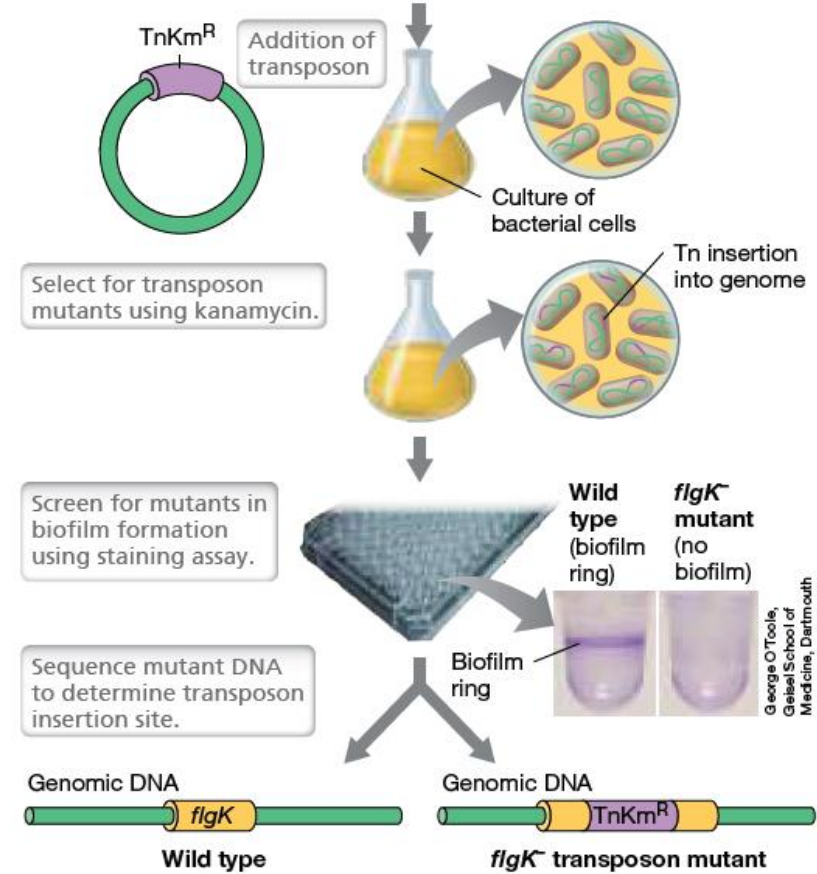
Mutagenез ile Gen Fonksiyonunun Belirlenmesi

- Bakteriyel genomların büyük kısmı kodlayan DNA'dan oluştuğu için transpozonların çoğu protein kodlayan genlere yerleşir.
- Eğer transpozon, örneğin bir biyofilm oluşumu için gerekli bir genin içine girerse, mutasyonlu bakteri artık biyofilm oluşturamaz.
- Bu yaklaşım, uygun bir tarama yöntemi bulunduğunda yeni bir genin fonksiyonunun belirlenmesine olanak tanır.
- Yandaki figürde, *Pseudomonas aeruginosa*'da flagellum yapısı ve fonksiyonunu incelemek için transpozon mutagenезinin özel bir boyama tekniğiyle birlikte nasıl kullanıldığı gösterilmiştir.



Transpozonların Araştırma Alanlarındaki Kullanımı

- Yandaki çalışma, flagellar hook proteini FlgK'nin biyofilm oluşumu için gerekli bir protein olduğunu ortaya koymuştur.
- Tn5 ve Tn10, *E. coli* ve akraba bakterilerde mutagenез için yaygın biçimde kullanılan iki transpozon örneğidir.
- Genetik olarak tasarlanmış transpozonlar birçok bakteri, bazı Archaea türleri ve maya *Saccharomyces cerevisiae*'de mutasyon oluşturmak için kullanılmıştır.
- Son yıllarda transpozonlar, fareler gibi bazı hayvanlarda mutasyon izolasyonu amacıyla da uygulanmaya başlanmıştır.

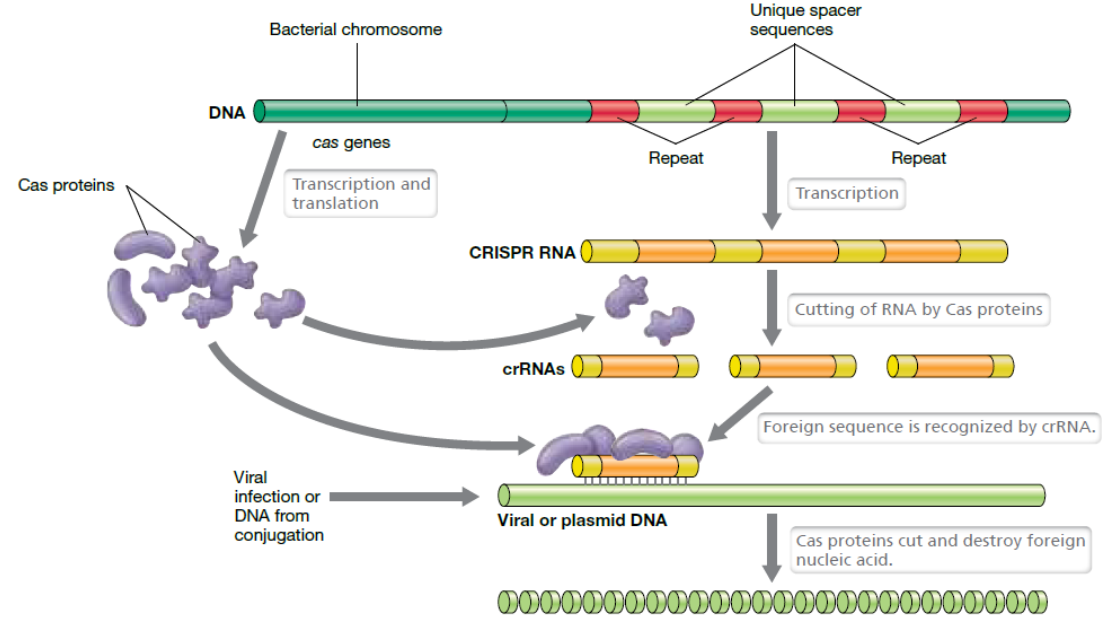


Prokaryotlarda Genom Bütünlüğünün Korunması

- Bakteriler ve Archaea'lar, yabancı DNA'yı yok etmek için restriksiyon endonükleazları üretmenin yanı sıra, viral DNA'yı ve yatay gen transferiyle gelen bazı genleri hedefleyen RNA-temelli bir savunma sistemi de taşırlar.
- CRISPR adı verilen bu savunma sistemi, daha önce virüs tahribatına karşı kaçınma stratejisi olarak tanımlanmış olsa da, aynı zamanda hücrenin genom bütünlüğünün korunmasına önemli katkı sağlar.
- CRISPR sistemi, belirli plazmitlerin ve yatay transferle kazanılmış bazı genlerin yok edilmesine yardımcı olarak genomun rastgele yabancı DNA birikiminden korunmasını mümkün kılar.

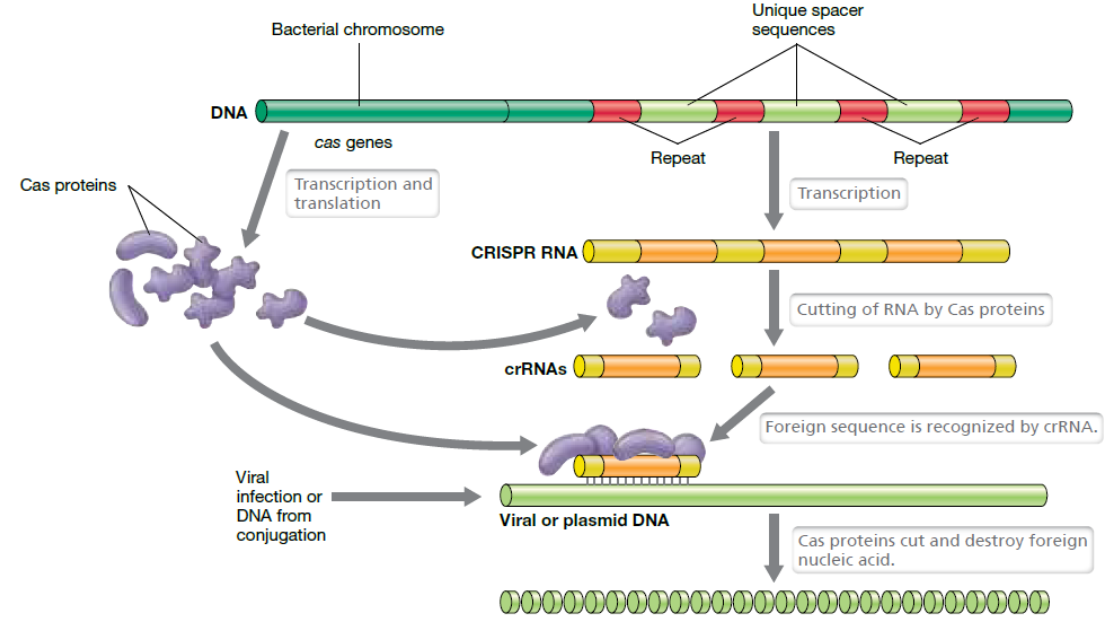
CRISPR Bölgesinin Hafıza Fonksiyonu

- Bakteriyel kromozom üzerindeki CRISPR bölgesi, yabancı nükleik asit dizilerinin depolandığı ve gelecekteki saldırılara karşı bir gözetim aracı olarak işlev gören bir tür “hafıza bankasıdır”.
- Bu bölge, farklı yabancı DNA parçalarından oluşan çok sayıda spacer dizisinin, birbirini tekrar eden özdeş dizilerle ardışık şekilde yerleşmesinden oluşur.
- Spacer dizileri, hücrenin daha önce maruz kaldığı yabancı DNA parçalarına karşılık gelir ve bu diziler CRISPR bölgesine eklendiğinde, aynı ya da çok yakın dizilere sahip yeni DNA veya RNA girişlerine karşı direnç sağlanır.



crRNA Oluşumu ve Yıkım Mekanizması

- CRISPR'in yatay DNA girişini engelleme etkinliği, uzun bir RNA molekülünün transkripsiyonu ve bu molekülün her tekrar dizisinin ortasından Cas proteinlerinin nükleaz aktivitesiyle kesilmesine dayanır.
- Bu işlem, uzun RNA molekülünü spacer dizilerine karşılık gelen küçük CRISPR RNA'larına (crRNA) dönüştürür.
- Herhangi bir crRNA, işgalci bir nükleik asitle baz eşleşmesi yaptığında, Cas proteinlerinin nükleaz aktivitesi bu yabancı DNA veya RNA çift sarmalını parçalayarak yok eder.
- Bu yok etme süreci, yabancı DNA'nın replikasyonunu veya genomla rekombinasyonunu engelleyerek hücrenin genom bütünlüğünün korunmasını sağlar.



CRISPR Sisteminin Yaygınlığı

- CRISPR sistemi hem Archaea hem de Bakteri âlemlerinde geniş şekilde dağılmış olup, dizilenmiş Archaea genomlarının yaklaşık %90'ında ve Bakteri genomlarının yaklaşık %70'inde bulunur.
- Sistem ilk olarak süt fermantasyonunda kullanılan kültürlerdeki bakteriyofaj enfeksiyonlarının kontrolü bağlamında dikkat çekmiş, özellikle bir *Streptococcus thermophilus* suşunda bulunan CRISPR spacer dizileri bu suşun fajlara dirençli olmasını açıklamıştır.
- Bu örnek, spacer dizilerinin bir suşun viral saldırılara karşı duyarlılığını ya da direncini belirlemede ne kadar kritik olabileceğini göstermiştir.



CRISPR Sisteminin Sınırları ve Evrimsel Rekabet

- Bazı virüslerin ve diğer yabancı DNA'ların neden CRISPR sisteminin spacer eklenmesi için gerekli tanıma dizilerine (PAM dizileri) sahip olduğu bilinmese de, laboratuvar çalışmaları fajların mutasyon yoluyla Cas proteinleri ve crRNA tanınmasından kaçabildiğini göstermiştir.
- Bu durum, CRISPR'ın güçlü bir savunma mekanizması olmasına rağmen, önceden karşılaşılmış dizilerin tanınmasına bağımlı olması nedeniyle belirli bir dezavantaja da sahip olduğunu ortaya koyar.
- Viral veya diğer yabancı genomların zaman içinde mutasyona uğraması, daha önce tanınan dizilerin ileride CRISPR tarafından fark edilememesine yol açabilir.

Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

