

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

OLASI BAKTERİYEL HÜCRE İSKELET
SİSTEMİNİN İMMÜN FLORESAN BOYAMA
YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ

Ceren BÜYÜKKAYALAR
Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2008

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLASI BAKTERİYEL HÜCRE İSKELET
SİSTEMİNİN İMMÜN FLORESAN BOYAMA
YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ

Ceren BÜYÜKKAYALAR
Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Yosun MATER

GEBZE
2008

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Olası Bakteriyel Hücre İskelet Sisteminin İmmün Floresan Boyama Yöntemi ile Gösterilmesi

YAZARIN ADI: Ceren BÜYÜKKAYALAR

Hücre iskelet sistemi, ökaryot hücrelerde sitoplazmada protein filamentlerinden oluşan bir sistemdir. Bu sistem, hücrenin belirli bir şekle sahip olması, hücre bölünmesinde kromozomların birbirinden ayrılması, hücrenin ikiye bölünmesi ve içinde bir yerden başka bir yere madde taşınması gibi olaylarda rol alır. Yakın bir geçmişe kadar hücre iskelet sisteminin ökaryotik hücrelere özgü bir sistem olduğunun düşünülmesine karşın, son yirmi yılda yapılan yapısal ve biyokimyasal çalışmalar, FtsZ, MreB ve crescentin proteinlerinin sırasıyla tubulin, aktin ve ara filament proteinlerinin prokaryotik atası olduğuna dair bilgiler içermektedir.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan bakteri örnekleri, daha önce yapılmış bir doktora çalışmasında laboratuvarımızda kullanılan *Escherichia coli* JM 109, *E. coli* K92 ATCC 35860 bakteri suşları, *E. coli* K92 ATCC 35860 soyunun kapsül yapısını oluşturan polisialik asitlerin yüzeye eklenmesinden sorumlu olan sialiltransferaz enziminin sentezini sağlayan *neuS* genini taşıyan rekombinant *E. coli* JM 109 pUC19-ST ve *neuS* geninin nokta mutasyonlarını içeren rekombinantlar *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 ve *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3'tür. Bu örneklerle ek olarak Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Uygulama Merkezi (EBİLTEM) tarafından hediye edilen koleksiyon bakterileri *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 29998, *B. subtilis* ATCC 6634 ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341 kullanıldı.

Bu tez çalışmasında bakteriyel hücre iskelet sistemi FtsZ proteini çalışılmıştır. Buna göre, FtsZ proteinine özgül bir Western blot antikoru olan Anti-FtsZ ile işaretlenerek Alexa Fluor® 488 boyası içeren FluoroNanogold™ ile boyanmıştır. Özgün bağlanmış FtsZ proteini tüm bakteri örneklerinde floresan mikroskobu ile gösterildi. Çekilen mikrograflarda FtsZ proteini genel olarak her üç hücre morfolojisinde (kok-kokobasil, basil, kok) sitoplazmada dağılmış halde ve yer yer hücre zarına bağlı olarak bulundu. FtsZ proteini bölünme aşamasında bölünme

bölgesinin tam ters yönünde hücrenin kutuplarında, zara bağlı ve/veya sitoplazmada küçük birikintiler halinde gözlemlendi.

Çalışmanın özgünlüğünü sağlayan sonuçlar ise bölünme aşamasındaki prokaryot hücrelerde, FtsZ proteini şimdiye kadar yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak kutuplara doğru ve zarda birikim gösterdi. İlk defa FtsZ için özgül bir Western blot antikoru, immün floresan işaretleme protokolünde kullanıldı ve bu proteine yönelik özgün sonuçlar alındı.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: Display of Potential Bacterial Cytoskeletal System by Immune Fluorescence Staining Method

AUTHOR: Ceren BÜYÜKKAYALAR

Cytoskeleton is the special system that is made up of protein filaments in the eukaryotic cell cytoplasm. This system has roles in the events like formation of the cell shape, separation and distribution of the chromosomes during cell division, and transportation of the materials inside the cell. Until lately, it was thought that cytoskeleton is a system that is specific to eukaryotes, however the structural and biochemical studies done in the last twenty years include data on FtsZ, MreB, and crescentin proteins are prokaryotic ancestors of tubulin, actin, and intermediate filament proteins respectively.

The bacteria samples employed within this thesis are used in our laboratory for a previous study such as *Escherichia coli* JM 109, *E. coli* K92 ATCC 35860, recombinant *E. coli* JM 109 pUC19-ST carrying *neuS* gene that provides the synthesis of sialyltransferase enzyme responsible for the addition of polysialic acids onto the surface which constitute capsule structure of *E. coli* K92 ATCC 35860 strain, and recombinants *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 and *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 including the point mutations of *neuS* gene. In addition to these samples, collection bacteria *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 29998, *B. subtilis* ATCC 6634 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 donated as a gift by EBİLTEM (Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Uygulama Merkezi- Ege University Application Center for Scientific Research), were employed.

In this thesis, bacterial cytoskeleton system, FtsZ protein, was studied. Accordingly, it was marked by Anti-FtsZ, a Western blot antibody specific to FtsZ protein, and then with FluoroNanogold™ including Alexa Fluor®488 dye. Specifically labeled FtsZ protein was monitored by fluorescent microscope for all

bacteria samples. In the micrographs taken, FtsZ protein was generally found to be spread in the cytoplasm in all three cell morphologies (coccus-coccobacillus, bacillus, coccus), and to be bound to the cell membrane in some areas. FtsZ protein was observed in the polar regions of the cell just opposite the division site in the division stage, bound to the cell membrane, and/or in small aggregations in the cytoplasm.

The results that provide the uniqueness of the study showed that, unlike the studies carried out so far, in prokaryotic cells in the division stage, FtsZ protein aggregated close the poles and in the membrane. A Western blot antibody specific to FtsZ was used for the first time in the immunofluorescent procedure and unique results were obtained for this protein.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimleri ile bana ışık tutarak yol gösteren, anlayışı, sabrı, hoşgörüsünün yanında verdiği destek ve moral sayesinde geleceğe umutla bakmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Fusun GÜMÜŞEL'e teşekkür ederim.

Tezimin immünofloresan kısmında alt yapı desteğini sağlayıp bilgilerini, zamanlarını, yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen Prof. Dr. Selma YILMAZER, Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK'e ve deney aşamasında her türlü desteği verip yardımcı olan Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya teşekkür ederim.

Gerek tez çalışmamdaki deneyler gerekse tez yazımı sırasındaki yol göstericiliği ve dostluğu için her zaman yanımda olan sevgili danışmanım Yrd.Doç.Dr. Yosun MATER'e teşekkür ederim.

Güler yüzü ve manevi yardımları ile bana destek olan Yrd.Doç.Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda alt yapı desteğini sağlamış olan GYTE Enzim Moleküler Genetiği, Mikrobiyoloji ve Bitki Doku Kültürü Laboratuvarları'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan koleksiyon bakterilerini hediye eden Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Uygulama Merkezi'ne (EBİLTEM) ve Dr. Esin HAMEŞ KOCABAŞ'a, immünofloresan mikroskobu çalışmalarım için olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na ve Belgin ÜNLÜER'e, tez çalışmamda kullandığım antikorun seçiminde yönlendirici olan Prof. Dr. James HAINFELD'e teşekkür ederim.

Zamanını ve yardımlarını esirgemeyen, verdiği moral ile hep yanımda olan canım dostum Neslihan AYDEMİR'e, zor günlerimde yanımda olarak anlayışı, sabrı ve sevgisi ile bana destek olan Şükrü KIRMIZI'ya teşekkür ederim.

Bugüne kadar anlayışını, emeğini esirgemeyip her zaman yanımda olan, verdiği her türlü maddi ve manevi destekten dolayı sevgili anneciğime, yanımda olduklarını hep hissettiren ablam ve enişteme teşekkür ederim.

Bu çalışma, 2007-A-11 kodlu GYTE Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Bakteriyel Hücre İskelet Elemanları	2
1.1.1. Aktin Homologları	2
1.1.1.1. MreB ve MreB homologları	3
1.1.1.1.1. MreB proteinlerinin hücre iskelet organizasyonu	5
1.1.1.1.2. MreB polimerleşmesi ve depolimerleşmesi	6
1.1.1.1.3. MreB ve MreB homologlarının hücrel işlevleri	8
1.1.1.2. ParM sistemi	14
1.1.1.2.1. ParM polimer birleşmesi ve dağılması	16
1.1.1.2.2. ParM işlevinin mekanizması	17
1.1.1.2.3. Filament dağılması ve plazmid göçü	18
1.1.1.3. AlfA	19
1.1.1.4. FtsA	19
1.1.1.5. MamK	20
1.1.1.6. Ta0583	22
1.1.1.7. EF-Tu	22
1.1.2. Tübülün Homologları	24
1.1.2.1. FtsZ	25
1.1.2.1.1. FtsZ halkası	26
1.1.2.1.2. Z-halkasının zar bağlantısı	29
1.1.2.1.3. FtsZ spiral yapıları	30
1.1.2.1.4. FtsZ polimerleşmesi ve depolimerleşmesi	32
1.1.2.1.5. Z-halkası birleşmesi ve kararlılığının düzenlenmesi	33
1.1.2.2. BtubA/B	36
1.1.2.2.1. BtubA/B polimerleşmesi	36
1.1.2.3. <i>Verrucomicrobia</i> 'da mikrotübül benzeri yapılar	37
1.1.3. Ara Filament Protein Homologları	38
1.1.3.1. Crescentin	38
1.1.4. MinD/ParA sınıfı Bakteriyel Hücre İskelet Proteinleri	41
1.1.4.1. MinD sınıfı proteinler	41
1.1.4.1.1. MinCDE sistemi	41
1.1.4.1.2. MinD hücre iskeleti	42
1.1.4.1.3. MinD yapısı ve polimerleşmesi	44
1.1.4.1.4. MinD'nin zara hedeflenmesi ve MinD-çift tabaka etkileşimleri	45
1.1.4.1.5. MinD hücre iskeletinin dinamik yeniden düzenlenmesi	46
1.1.4.2. ParA sınıfı proteinler	47
1.1.4.2.1. Plazmid ayrılmasında ParA/B proteinleri	47
1.1.4.2.2. ParA hücre iskelet yapıları	48
1.1.4.2.3. ParA polimerleşmesi	48
1.1.4.2.4. ParA salınımı	49
1.1.4.3. Soj	49

1.1.4.4. Bakteriyel Dinamin	50
1.1.5. Diğer Filament Halindeki Hücre İçi Yapılar	51
1.1.5.1. <i>Spiroplasma melliferum</i> fibril yapıları	51
1.1.5.2. <i>Treponema phagodenis</i> sitoplazmik filamentleri	52
1.1.5.3. <i>Leptospira</i> türlerinde Scc	52
1.1.5.4. <i>Myxococcus xanthus</i> hücre içi filamentleri	53
1.1.5.5. <i>Mycoplasma</i> türlerinde filament yapıları	53
1.1.5.6. Bilinmeyen bileşimde hücre iskelet elemanları	54
1.2. HÜCRE İSKELETİ VE ANTİBİYOTİKLER	54
1.2.1. FtsZ'yi Hedefleyen Bileşikler	55
1.3. TEZİN AMACI	58
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	59
2.1. Materyaller	59
2.1.1. Kimyasal Maddeler	59
2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	59
2.2. Yöntem	60
2.2.1. Kullanılan Çözeltiler	60
2.2.2. Bakterilerin Büyütülmesi	61
2.2.3. Floresan Mikroskobu Yöntemleri	62
3. BULGULAR	64
3.1. Floresan Mikroskobu (FM) ile Elde Edilen Bulgular	64
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A22	S-(3,4-diklorbenzil) izotioüre
ANS	8-anilino-1-naftalinsülfonat
BDLP	Bakteriyel dinamin benzeri proteini
bis-ANS	[5,5'-bis-(8-anilino-1-naftalinsülfonat)]
BSA	Sığır serum albümin
BtubA/B	Bakteriyel tübülin
dH₂O	Distile su
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EF-Tu	Bakteriyel uzama faktörü
F-aktin	Filament aktin
FM	Floresan mikroskobu
FRAP	Fotoağartmadan sonra floresan geri eldesi
FtsZ	Filamentleşen ısıya duyarlı protein Z
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IF	Ara filament
KCl	Potosyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
M	Molar
Mbl	MreB benzeri
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mre	Murein kümesi E
MreBH	MreB homoloğu
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTS	Zar hedeflenme dizisi
Na₂HP0₄	Sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
°C	Derece santigrat
PBP2	Penisilin bağlayan protein 2

PBS	Fosfatla tamponlanan tuz çözeltisi
PG	Peptidoglikan
pN	piko Newton
RNAP	RNA polimeraz
rpm	Dakika başına rotasyon
TB	Tüberküloz
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy besi yeri
ZapA	Z-halkası-birleşmiş protein A
ZipA	Z-etkileşimli protein
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Aktin ve MreB proteinleri	4
1.2. <i>B. subtilis</i> MreB proteinlerinin şematik gösterimi	6
1.3. <i>E. coli</i> 'de hücre iskeleti ile bağlantılı hücre duvarı sentezi proteinleri	10
1.4. ParM proteininin yapısı	15
1.5. ParM filament büyümesi	17
1.6. Aktin ve FtsA kristal yapıları	19
1.7. MamK/MamJ yapısının şematik çizimi	21
1.8. Ökaryotik aktin ve prokaryotik Ta0583 proteinlerinin üç boyutlu monomer yapıları	22
1.9. Bakteriyel uzama faktörü EF-Tu	23
1.10. Tübülün homologları	24
1.11. <i>E. coli</i> hücresinin orta kısmında hücre bölünme protein toparlanmasının ardışık yolağı	26
1.12. <i>B. subtilis</i> hücrelerinde sporulasyon sırasındaki morfolojik değişimlerin şematik gösterimi	31
1.13. Tübülün ve FtsZ dimerlerinin üç boyutlu yapısı	33
1.14. Z-halkası oluşumunda ZapA'nın işlevi için bir model	35
1.15. SulA tarafından inhibe edilmiş <i>P. aeruginosa</i> FtsZ'sinin kristal yapısı	36
1.16. Crescentin faaliyetinin bir modeli	40
1.17. Hücre kutuplarında bölünmenin engellenmesi	43
1.18. <i>Archaeoglobus fulgidus</i> MinD proteini	45
1.19. Min proteinlerinin salınımını özetleyen şema	47
1.20. MinD ve Soj proteinleri	50
2.1. Büyümeye bırakılan hücrelerin görüntüsü	62
3.1. <i>Escherichia coli</i> JM 109 hücrelerinin FM mikrografları	65
3.2. <i>Escherichia coli</i> JM 109 hücrelerinin bölünme aşamasındaki FM mikrografları	65
3.3. <i>Escherichia coli</i> K92 ATCC 35860 hücrelerinin FM mikrografları	66
3.4. <i>Escherichia coli</i> K92 ATCC 35860 bölünme aşamasındaki hücrelerinin FM mikrografları	66

3.5. <i>Escherichia coli</i> JM 109 pUC19-ST hücrelerinin FM mikrografları	67
3.6. <i>Escherichia coli</i> JM 109 pUC19-ST M2 hücrelerinin FM mikrografları	68
3.7. <i>Escherichia coli</i> JM 109 pUC19-ST M2 hücrelerinin FM mikrografları	68
3.8. <i>Escherichia coli</i> JM 109 pUC19-ST M3 hücrelerinin normal FtsZ dağılımına ait FM mikrografi	69
3.9. <i>Escherichia coli</i> JM 109 pUC19-ST M3 hücrelerinin anormal FtsZ dağılımına ait hücre içi birikimler içeren FM mikrografi	69
3.10. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografi	70
3.11. <i>Escherichia coli</i> ATCC 29998 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografi	70
3.12. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6634 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografi	71
3.13. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6634 patlamış hücrelerinin FtsZ proteinlerinin hücre dışına çıkışına ait FM mikrografi	71
3.14. Bölünmeye hazırlanan bir <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6634 hücresinde FtsZ proteinlerinin kutuplara doğru gidişine ait FM mikrografi	72
3.15. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 hücrelerinin FtsZ proteinlerine ait FM mikrografi	72
3.16. Bölünmeye hazırlanan bir <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 hücresinde FtsZ proteinlerinin kutuplara doğru gidişine ait FM mikrografi	73

1. GİRİŞ

Hücrelerin çoğu, hücre duvarlarını kararlı kılan ve hücreye bir miktar sertlik veren faktörlere ihtiyaç duyar. Bu tür faktörler, hücre morfolojisinin korunması için önemlidir. Hücresel yaşam, kromozomların fiziksel olarak ayrılması ve hücrenin iki yavru hücreye bölünmesinin yanı sıra hücre içindeki hücre altı yapıların taşınması gibi birçok dinamik olaya dayalıdır. Doğa, hücre iskelet sistemi diye adlandırılan, hem hücre kararlılığı/morfolojisi, hem de hücre dinamiği yönünden anahtar elemanlar olan bir sınıf protein evrimleştirmiştir. Hücre iskelet elemanları, gerçekleştirdikleri göreve göre oldukça dinamik veya statik olabilen filament şeklinde yapılar oluştururlar (Graumann, 2007).

Ökaryotik hücreler üç değişik hücre iskeletinin filament sistemini içerir. Bu üç tür, filamentin çapına göre ayırt edilir: kalın mikrotübüller (25 nm), ince aktin filamentleri (7 nm) ve ara filamentler (IF) (10-12 nm) (Alberts ve ark., 2002; Lutkenhaus, 2003). Prokaryotlarda iyi tanımlanmış karmaşık bir hücre iskeletinin veya iskeletsel elemanların varlığı, elektron mikroskobunun icadından sonra bile uzun süre bulunamamıştır (Mayer, 2003). İlk olarak, Bi ve Lutkenhaus (1991), elektron mikroskobu ile, tübülün homoloğu olan ve filamentleşen, ısıya duyarlı protein Z'nin (FtsZ) bölünme alanında bir halka yapısı oluşturduğunu göstermişlerdir (Bi ve Lutkenhaus, 1991).

Aequorin ve yeşil floresan proteinlerinin (GFP) keşfedilmesi mikroskopi, hücre biyolojisi, canlı hücre görüntülemesi ve hücre içi sinyallere yönelik hücre biyolojisi ile ilgili araştırmalarda önemli etkiler sağlamıştır (Brooks, 2005). Proteinlerin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesinde GFP ve immünofloresanın kullanılabilmesi, bakteriyel hücre bölünmesi araştırmalarını oldukça değiştirmiştir (Buddelmeijer ve Beckwith, 2002). Yakın zamanlarda, floresan görüntüleme tekniklerinin kullanılması bakterilerde surpriz derecede içsel organizasyonun ortaya çıkmasının yolunu açmıştır (Møller-Jensen ve Löwe, 2005). Bu sayede, ilk kez, 2001'de Jones ve arkadaşları GFP kullanarak *Bacillus subtilis*'te bakteriyel aktin homologlarının, hücre şekli düzenlenmesinde anahtar roller oynayan, uzun sarmal

yapılar halinde organize olduklarını göstermişlerdir (Jones ve ark., 2001; Shih ve Rothfield, 2006).

Ökaryotlar için mitozun ve sitokinezin başarılı bir şekilde tamamlanması için vazgeçilmez olan hücre iskeletinin eksikliği, prokaryotların tanımlayıcı özelliklerinden birisiydi (van den Ent ve ark., 2001). Ancak, bakterilerin belirgin iç yapılarının olmadığı hükmü, günümüzde bakteri hücrelerinin çok sayıda organize hücre iskeleti elemanları içerdiğinin farkedilmesi ile değişmiştir (Shih ve Rothfield, 2006).

Ökaryotik ve prokaryotik hücre iskelet sistemleri arasında önemli farklılıklar da ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında hiçbir ökaryotik karşılığı olmayan en azından bir temel bakteriyel hücre iskeleti elemanları grubunun (MinD/ParA grubu) varoluğunun bulunması ve analog işlevlerin, sıklıkla, ökaryot ve prokaryotlarda farklı hücre iskelet sınıfları tarafından ve çoğu kez farklı mekanizmalar kullanılarak gerçekleştirildiğinin bulunması sayılabilir (Carballido-López, 2006; Grauman, 2007; Lewis, 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

Bakteriyel hücre iskelet yapıları, hücre içinde uzun menzilli düzenlemeler gösteren ve *in vitro* da kendi kendilerine uzun polimerik yapılar halinde birleşebilen tek bir sınıf proteinin polimerlerine dayanan, filament halindeki yapılar olarak tanımlanabilir. Bakteriyel hücre iskeleti, bu tanıma uyan çeşitli hücre içi yapılardan oluşur (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1. Bakteriyel Hücre İskelet Elemanları

1.1.1. Aktin Homologları

Bakteri hücrelerinden, aktin-benzeri ve aktinomyozin benzeri komplekslerin izole edilmesine yönelik çok sayıda deneme yapılmış fakat bu çalışmaların hiçbirisi sonuç vermemiş ve belirli bir proteinle ilişkilendirilememiştir. Asıl buluş, 2001’de MreB ve Mbl (MreB benzeri) *Bacillus subtilis* proteinlerinin hücre morfogenezinde farklı olaylar için gerekli olduklarının ve hücre boyunca uzanan sarmal bir yapı

oluşturduklarının gösterilmesi ile gerçekleşmiştir (Jones ve ark., 2001). Bundan kısa süre sonra, *Thermotoga maritima*'dan çıkarılan MreB'nin aktin benzeri bir polimerizasyon gerçekleştirdiğinin ve üç boyutlu yapısının aktine dikkat çekici düzeyde benzediğinin gösterilmesi ile bu sarmal filamentlerin doğası ortaya çıkarılmıştır. Bakteri hücrelerinde hücre iskeleti yapılarını oluşturan iki aktin homologu (ParM, MamK) ve bir arkeal aktin (Ta0583) belirlenmiştir (Carballido-López, 2006).

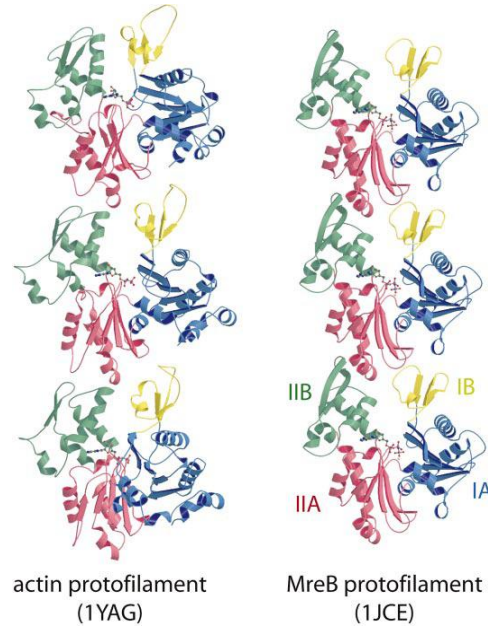
Bu aktin homologları ökaryotik aktin ile değişen derecelerde dizi benzerlikleri ve önemli yapısal benzerlikler gösterirler. Aktin üst ailesinin karakteristiği olan, aktin benzeri bir katlanma şeklini paylaşırlar ve bu yapının en korunan bölgesi aktin ATPaz “domain”idir. Aktin filamentleri genellikle, filament büyümesi, dağılması, kesilmesi gibi dinamiklerde düzenleyici roller üstlenen diğer bir miktar protein ile birlikte hareket eder. Birçok bakteriyel aktin homologu için bu tür filament ilişkili düzenleyici elemanlar henüz tanımlanmamıştır (Amos ve ark., 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.1. MreB ve MreB homologları

Çomak şekilli bakterilerde 1960'ların sonlarında keşfedilen lokuslardan birisi Mre (murein kümesi E) operonuydu. Bu lokus *E. coli* ve birçok bakteride üç gen içerir, bunlar *mreB*, *mreC*, ve *mreD* olarak adlandırılır. *MreBCD* genleri genellikle yuvarlak şekilli bakterilerde bulunmaz. Her üç gende de mutasyon olması düzensiz şişkinlikte veya oval yuvarlak hücrelerin oluşmasına yol açar. MreB ilk olarak 1988'de tanımlandı, fakat aktine olan benzerliği ancak 1992'de ortaya çıktı (Carballido-López, 2006; Grauman, 2007). X-ışını kristallografisi ve elektron mikroskopisi kullanılarak *Thermotoga maritima*'nın MreB'sinin aktin homologu olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.1.). MreB amino asit dizisi aktine % 15 benzerlik gösterir (Amos ve ark., 2004).

MreB ve MreB homologları, bakterilerde, hücre şeklinin belirlenmesi, kromozom ayrılması, hücre kutupluluğu ve zarlı organellerin dağılımını da içeren birçok hücre fonksiyonunda önemli roller oynayan aktin benzeri hücre iskelet proteinleridir (Margolin, 2005; Shih ve Rothfield, 2006). Bazı bakteri türleri, örneğin

E. coli ve *Caulobacter*, tek bir MreB proteini içerir (Møller-Jensen ve Löwe, 2005). Diğerleri iki ya da daha çok MreB benzeri protein içerir; örneğin *B. subtilis*, MreB, Mbl (MreB benzeri) ve MreBH (MreB homoloğu) proteinlerine sahiptir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2004; Graumann, 2007; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007; Shih ve Rothfield, 2006).



Şekil 1.1. Aktin ve MreB proteinleri. Solda maya aktini sağda ise *T. maritima*'dan elde edilen MreB'nin kristal yapısı görülmektedir (Löwe ve ark., 2004).

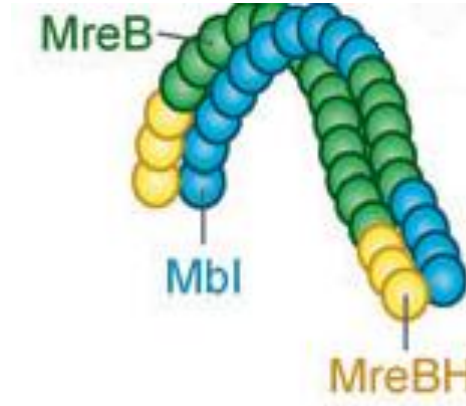
Yuvarlak, MreB'siz hücreler normal çomak şekilli hücrelerden daha büyük bir çapa sahiptir. Bu nedenle yuvarlak, MreB'siz hücreler, Z-halkasını tamamlamak için daha fazla FtsZ'ye ihtiyaç duyar (Kruse ve ark., 2005). Aslında, yuvarlak MreB'siz *B. subtilis* hücreleri sıklıkla tamamlanmamış Z-halkalarına sahiptir. FtsZ'nin fazla üretimi, bu nedenle, yuvarlak hücrelerin hücre bölünmesini devam ettirmelerini sağlar ve anormal hücre şekline rağmen (yavaş) çoğalmalarına izin verir. Diğer bir MreB paraloğu, Mbl proteini, *B. subtilis* ve *B. cereus*'ta bulunmuştur. *B. subtilis*'te *mbl*'nin çıkarılması ölümcül değildir fakat, yaban tip hücrelerden daha yavaş büyüyen, oldukça düzensiz şekilli hücrelerin oluşmasına yol açar. MreB, ayrıca *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*, ve *Rhodobacter sphaeroides* için gereklidir, fakat *S. coelicolor* veya *Azospirillum brasilense* için değildir. Bu da *mreB*'nin kompleks şekilli bakterilerin tümünde gerekli olmadığını gösterir (Graumann, 2007).

E. coli'de *mreBCD* tarafından kodlanan bileşenlerin yaşamsal gerekliliği araştırılmış bu proteinlerden yana yoksunlaştırılan hücrelerin her üç tipinde de hücre şeklinde önemli değişiklikler olduğu ve hücrelerin parçalandığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu üç protein hücre canlılığı için gereklidir. Fakat ilginç bir şekilde, *ftsQAZ* genlerini taşıyan çok kopyalı bir plazmidin varlığı *mre* operonundaki gen çıkarılmalarının ölümcül sonuçlarını bastırır (Kruse ve ark., 2005).

1.1.1.1.1. MreB proteinlerinin hücre iskelet organizasyonu

MreB ve MreB homologlarının *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, ve *Rhodobacter sphaeroides*'te hücresel organizasyonları tarif edilmiştir. Bu proteinlere karşı antikorlar kullanılarak yapılan immünofloresan deneyler, MreB ve Mbl'nin bakterilerde daha önce gözlemlenmeyen farklı yapılar oluşturduklarını gösterdiler. Her iki protein de hücre zarının altında, noktalar ve sarmal filamentler halinde iplikçikler oluştururlar (Carballido-López ve Errington, 2003; Jones ve ark., 2001; Lewis, 2004; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; van den Ent ve ark., 2001). Mbl filamentleri bir kutuptan diğerine uzanır ve MreB filamentleri baskın oranda hücre merkezine yakın bulunur. Mbl filamentlerinin, MreB filamentlerinden farklı sarmal adımlarına (sarmalın bir noktasından bir sarmal dönüşü izleyen bir sonraki nokta arasındaki uzaklık) sahip olduğu ve bu nedenle farklı yapılar oluşturdukları görülmüştür. Bu deneyler, bakterilerde hücre morfolojisini düzenleyen hücre iskelet yapılarının olduğunu göstermiştir. MreB tüketilmesi ve *mbl* çıkarılmasının sırası ile, yuvarlak veya uzamış ve burmalı hücreler üreten, farklı fenotipleri temel alındığında, MreB'nin hücre genişliğini, Mbl'in ise uzunlamasına büyümeyi kontrol ettiği ileri sürülmüştür (Amos ve ark., 2004; Graumann, 2004; Graumann, 2007; Jones ve ark., 2001, Lewis, 2004).

MreB, Mbl, veya MreBH'nin ortamdan çekilmesinin hücre morfolojisi için farklı sonuçlarının olması, proteinlerin farklı işlevleri gerçekleştirdikleri izlenimini verse de son dönemde eşzamanlı aynı-hücre görüntülemesi ile *B. subtilis* MreB'lerinin üçünün de aslında tek bir sarmal yapıda ve birbirine oldukça yakın oldukları bulunduğu üç MreB ortoloğunun bir hücre iskelet elemanı oluşturdukları açığa çıkmıştır (Grauman, 2007; Carballido-López, 2006) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *B. subtilis* MreB proteinlerinin şematik gösterimi (Graumann, 2007'den değiştirilerek alınmıştır).

Hücre zarının altındaki MreB ve Mbl filamentlerinin, oldukça dinamik oldukları *in vivo* da gösterilmiştir. Fotoağartmadan sonra floresan geri eldesi (FRAP) yöntemini kullanarak, Carballido-López ve Errington (2003), GFP-Mbl filamentlerinin hızlıca eksildiklerini gösterdiler. Bu deneylerde, bir hücrenin uzunlamasına yarısı bir lazer ışığı ile ağartılır. Hücrenin ağartılan kısmında GFP-Mbl floresanının yaklaşık 8 dakika içinde yeniden görülmesi, yapıların, hücrenin ağartılmamış kısmındaki GFP-Mbl katkısı ile değiştiğine işaret eder. Floresanın yeniden görülmesine, hücrenin diğer yarısında ağartılmamış GFP-Mbl filamentlerinin floresan kaybının eşlik etmesi, ağartılmamış GFP'nin hücrenin bir yanal kısmından diğer kısmına hareket ettiğini göstermesi bakımından önemlidir (Carballido-López ve Errington, 2003). Yine başka bir çalışma, MreB benzeri yapıların oldukça dinamik olduklarını göstermiştir. GFP-MreB ve GFP-Mbl filamentlerinin 10 saniye aralıklarla yerleşimlerini değiştirdikleri bulunmuştur. Ayrıca *B. subtilis*'teki GFP işaretli MreB ve Mbl sarmal yapılarında hızlı hareketler gözlemlenmiş, birkaç saniyelik bir zaman aralığında hücre kutuplarına doğru ve hücre kutuplarından uzağa doğru, farkedilebilen tek yönlü hareketleri içerdiği görülmüştür (Carballido-López, 2006; Graumann, 2004; Graumann, 2007; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.1.2. MreB polimerleşmesi ve depolimerleşmesi

MreB filamentlerinin yapısı ve polimerleşme özellikleri hakkındaki mevcut tüm bilgi, termofilik organizma *Thermotoga maritima*'dan elde edilen MreB ile

yapılan çalışmalara dayanır fakat bu türde proteinin hücresel organizasyonu henüz araştırılmamıştır. MreB yapısının aktin ile benzer olduğu ve MreB'nin bu nedenle aktinin bakteriyel homoloğu olduğu gösterildiğinde, bakterilerin aktin benzeri bir hücre iskeletine sahip olduğu açığa çıktı. *T. maritima*'nın MreB'sinin üç boyutlu yapısı sadece küçük farklılıklarla neredeyse tüm uzunluğu boyunca aktinin üstüne oturtulabilir (Löwe ve ark., 2004) (Şekil 1.1.).

Elektron mikroskopunun kullanımı ile, MreB'nin, ATP veya GTP'nin varlığına bağlı (fakat magnezyumun değil) uzun filament benzeri yapılar olarak birleştiği gösterildi. Bu filamentlerde iki MreB ipliği düz bir protofilament oluşturur. Ökaryotik aktinin aksine, bu iki ipli filament sarmal değil düzdür (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007). Polimerleşme hem ATP hem de GTP varlığında aynı ölçüde gerçekleşir ve bu nedenle, sadece ATP varlığında gerçekleşen, aktin polimerleşmesinden farklıdır. MreB'nin ATP hidrolizi aktin ile aynı kinetiğe sahiptir. ATP'yi GTP'ye tercih eden aktinden farklı olarak, MreB, aktin tarafından oluşturulanlardan daha sert filamentler oluşturmak üzere hem ATP'yi hem de GTP'yi eşit derecede iyi kullanır. Dahası, aktin tek protofilamentler halinde birleşirken, MreB, filament demetleri halinde birleşir. Filamentler bir jelleşme süreci geçirir ve katı benzeri bir yapı oluşur. Demetler halindeki MreB yapısı, eşleniği olan filament aktin (F-aktin) yapısından çok daha serttir ve özellikleri aktinden ziyade ökaryotik IF'lere benzerdir. Bunların arasında, yüksek elastikiyet, polimerleşme için düşük kritik konsantrasyon ve demetleşme için yüksek bir eğilim yer alır. MreB filamentlerinin, bakteri hücrelerine çomak şeklinin veya diğer kompleks şekil tiplerinin korunmasına katkıda bulunacak mekanik sertliği sağlama potansiyeli vardır (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006). MreB polimerleşmesi, ATPaz aktivitesini uyarır, fakat MreB polimerleşmesi ile fosfat salınımı eş zamanlı değildir. Bu, ATP hidrolizinin, MreB monomerleri filamentlere eklendikten sonra gerçekleştiği ve ATP hidrolizinden çok ATP bağlanmasıyla büyüyen polimere alt ünite eklenmesi için yeterli olduğu anlamına geldiğinden polimerleşme süreci bu bakımdan aktine benzer (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.1.3. MreB ve MreB homologlarının hücresel işlevleri

Hücre şeklinin belirlenmesi: *mreB* geninin, MreB ve MreB benzeri aktin homologlarının neredeyse tüm çomak şekilli bakterilerde bulunduğu fakat kok şekillilerde bulunmadığı gösterilmiştir. MreB'siz hücrelerin genellikle küre halinde büyümesi, MreB'nin çomak şekilli bakterilerde hücre şeklinin belirlenmesinde rol aldığı izlenimini verir (Carballido-López, 2006; Shih ve Rothfield, 2006). Koklarda MreB'nin bulunmamasını ve hücre duvarı biyosentetik enzimlerinin yerleşiminin MreB'ye bağımlılığını içeren ilave kanıt, MreB'nin, silindirik hücre duvarı büyümesini güçlü bir şekilde sürdürmek üzere hücre duvarı biyosentezini yönlendirdiği fikrini destekler (Margolin, 2005).

Çoğu bakteriler, izole edildiğinde, bakterinin şeklini koruyan sert bir hücre duvarı ile çevrelenmişlerdir, ki bu da bakteri şeklinin, yeni hücre duvarını kuran enzim sistemi tarafından belirlendiği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Carballido-López, 2006; Kruse ve ark., 2005; Lutkenhaus, 2003; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007; Young, 2003). MreB iç zarın altında sarmallar oluşturur ve muhtemelen hücre duvarı sentezleyen transmembran enzimleri periplazmaya konumlandırarak hücre şeklini belirler (Kruse ve ark., 2005; Jones ve ark., 2001; Lutkenhaus, 2003). Zaten *mreB* operonu, murein sentezinde yer alan, geniş bir gen topluluğunun bir parçasıdır. Bu da MreB ve sert murein dış iskeletinin sentezi arasında olası bir ilişki olduğunu gösterir (Kruse ve ark., 2005; Shih ve Rothfield, 2006). Ayrıca *E. coli*'de *mreB*'nin mutasyonu veya çıkarılması, hücre duvarı sentezini hedef alan antibiyotiklere karşı oldukça hassas yuvarlak ve yavaş büyüyen hücrelerin oluşmasına yol açar. Benzer bir fenotip daha aşağıdaki *mreC* ve *mreD* genlerinin mutasyonu sonucunda da oluşur. Bu deneyler de MreB'nin hücre duvarı sentezinde etkili olduğu izlenimini verir (Graumann, 2007).

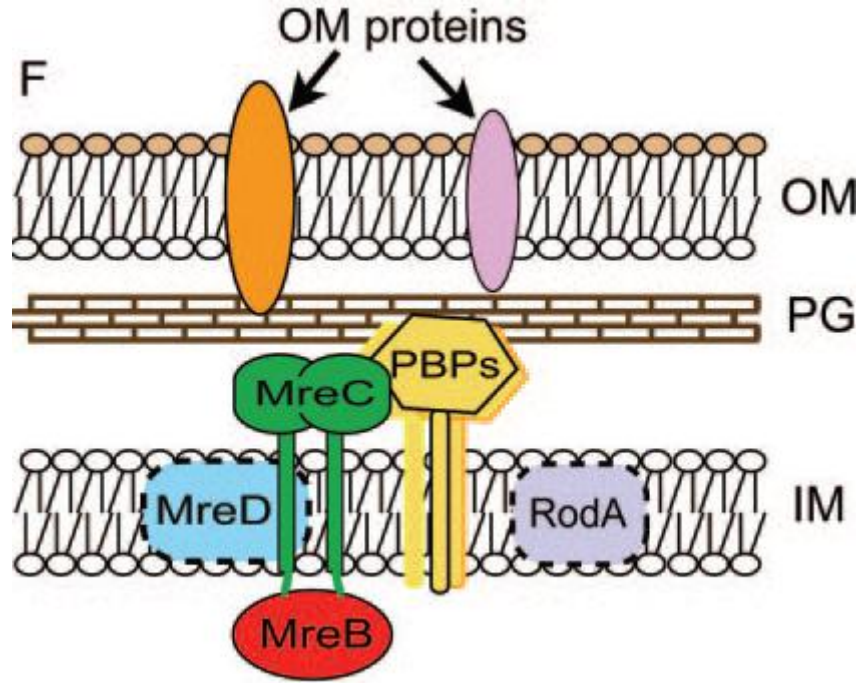
Çomak biçimli hücrelerin şekli, uzunlamasına murein sentezinden sorumlu olan enzimlere dayanır. Çomak şekil, MreB ve MreB homologlarının varlığına da dayalıdır, çünkü bu proteinlerin ortadan kalkması normal çomak şeklin kaybolmasına ve küresel hücreler oluşmasına veya Mbl'nin kaybolması durumunda, geniş çıkıntılar ve hücre kalınlığındaki genişleme ile deforme olan hücreler oluşmasına yol açar. Mbl'nin silindir hücre duvarı sentezini kontrol ettiği öne sürülmüştür. Farklı birçok

hücresel proteinler de çomak şeklin oluşturulmasına karışır, çünkü bu proteinlerin de ortamdan alınması çomaktan küreye geçişe yol açar. Bunların arasında, bir murein biyosentetik enzim olan penisilin bağlayan protein 2 (PBP2) bulunur. PBP2, yanal peptidoglikan (PG) sentezinden sorumludur (Kruse ve ark., 2005; Shih ve Rothfield, 2006).

MreB ve homologları, çomak bakterilerin şeklini, murein biyosentetik enzimlerini, hücrenin uzun eksenini boyunca yönlendirilen sarmal bir biçimde organize ederek düzenler. Bu, floresan işaretli vancomycin ile yapılan çalışmalarda ön sürülmüştür. Vancomycin çalışmaları, *B. subtilis*'teki olgun mureinin en yakın öncülerinin hücrenin uzun eksenini boyunca uzanan sarmal bir düzende organize olduklarını ve MreB ile Mbl'nin dağılım şekline benzediklerini göstermiştir. Sarmallı vancomycin düzeni MreB homologu Mbl'nin varlığına dayalıdır. Gram-pozitif *Corynebacterium* ve *Streptomyces* türleri gibi MreB içermeyen çomak şekilli hücrelerin, yeni hücre materyalini, yanal duvar ve kutup bölgelerine eklemesine karşın; kokların, yeni hücre duvarı katmanlarını sadece bölünme alanlarına eklediği gösterilmiştir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007; Möller-Jensen ve Löwe, 2005).

Çomak şekil için gerekli olan biyosentetik murein transpeptidaz ve aynı zamanda penisilin bağlayan PBP2, hücre silindiri boyunca, MreB ve Mbl'ninki gibi, sarmal bir biçimde dağıtılmıştır. Bu *C. crescentus*'ta gösterilmiştir ancak aynıısının *E. coli* için de geçerli olması olasıdır. PBP2'nin sarmal dağılım düzeni, MreB ve MreC varlığına bağlıdır. Bu, sarmal MreB ve MreC yapılarının PBP2'nin hücresel organizasyonunun belirlenmesinde önemli rol üstlendiği anlamına gelir (Shih ve Rothfield, 2006). MreC, *E. coli* ve *B. subtilis* çalışmalarında gösterildiği gibi, MreB hücre iskeleti ve murein biyosentetik makinesi arasında bir köprü vazifesi görür. MreD proteini ise *E. coli* ve *B. subtilis* gibi organizmalarda bu köprü kompleksinin bir elemanı olabilir. Çünkü, *E. coli* MreC proteini bakteriyel ikili hibrit testlerinde MreB ve MreD ile etkileşirken MreB, MreD ile etkileşmez (Kruse ve ark., 2005). Bu, MreC'nin olası bir multiprotein kompleks içinde, MreB ve MreD arasına eklenmiş olabileceği izlenimini verir. İlaveten, birçok delil, MreB, MreC, MreD, PBP2 ve belki de diğer murein biyosentetik enzimlerin, MreB hücre iskeletinin, murein sentezinin topolojisi üzerine etkilerini düzenleyen bir yapının elemanları

olabileceğine işaret eder (Şekil 1.3.). İlginç biçimde, MreB veya MreC'den birinin kaybolması, PBP2'nin sarmal yapısını kaybetmesine ve *C. crescentus*'ta da hücre ortasında lokalize olmasına yol açar. Bu, PBP2'nin hücrel lokalizasyonunun, ve büyük ihtimalle etki alanının, hücre bölünme makinesi ve MreB/MreC hücre iskeleti arasındaki etkileşimle düzenlendiği izlenimini verir (Carballido-López, 2006; Shih ve Rothfield, 2006).



Şekil 1.3. *E. coli*'de hücre iskeleti ile bağlantılı hücre duvarı sentezi proteinleri. Sitoplazmik MreB hücre iskeleti MreC ve MreD ile PBP murein biyosentetik enzimlere bağlı. RodA kompleksin bir elemanı olabilir, ve bazı dış zara bağlı proteinlerin MreC ile ilgili yapıların bir parçası olabilir. OM, dış zar; PG, peptidoglikan (murein); IM, iç zar (Shih ve Rothfield, 2006).

MreBH filamentleri, *B. subtilis*'de yanıl duvar hidrolizini yönetir. Yakın dönemde, MreBH'ın *B. subtilis* hücre morfogenezinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. MreBH'ın tükenmesi, MreB ve Mbl tükenmesi durumlarından farklı olarak hafif bir hücre şekli bozukluğuna yol açarak hücreleri eğik ve şişkin hale getirir. MreBH'nin kaybının hücre duvarı hidrolazı olan LytE'nin özgül lokalizasyonunu bozması, MreBH'nin, büyük olasılıkla LytE'nin salgılanmasını etkileyerek lokalizasyon düzenini ve çalışmasını yönlendirdiği izlenimini verir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007).

Hücre kutupluluğu: Çomak şekilli bakterilerin kutupları hücrenin geri kalanından birkaç yönden farklılık gösterir: Bu farklılıklar; bir dizi zara bağlı proteinin özgül polar lokalizasyonunu, belli türlerde polar flagella veya pili olmasını, murein ve hücre kutuplarında dışardan işaretli proteinlerin yıkımının olmamasını, yeni oluşan kutupta anatomik değişiklikleri (bakteriyel doğum lekesi) içerir (Shih ve Rothfield, 2006). Birçok protein, farklı bakterilerde özgül olarak hücre kutuplarında lokalize olur. *C. crescentus* ve *E. coli* hücrelerinde *mreB*'nin çıkarılması ile birçok proteinin polar lokalizasyonunu kaybetmesi, MreB'nin ayrıca hücre polaritesinin kurulması ve devam ettirilmesinde yer aldığını gösterir (Graumann, 2007; Møller-Jensen ve Löwe, 2005).

C. crescentus farklılaşma döngüsünü yöneten proteinler farklı olarak bir ya da her iki hücre kutbuna hedeflenir. MreB, bu proteinlerin polar hedeflenmesi için gereklidir (Lewis, 2004). MreB'nin ortamdan çekilmesinden sonra, bu proteinlerin polar lokalizasyonu kaybolur ve hücre içinde dağılmış hale gelirler. MreB, diğer organizmalarda da proteinlerin polar lokalizasyonu için gereklidir. *E. coli*'de ve benzer Gram-negatif bakterilerde, kemotaksiste, hareketlilikte, salgılamada ve virulansta yer alan zarla ilişkili proteinler normal olarak bir veya iki hücre kutbuna yönlendirilir. *E. coli*'de bu proteinler ifade edildiğinde, MreB'nin olmaması bu proteinlerin polar hedeflenmesini değiştirir (Shih ve Rothfield, 2006).

Bakteri gelişimi ve spor oluşumu: *Streptomyces coelicolor* büyümesi sırasında MreB'den vazgeçilebilir, ve bu da, yeni hücre duvarı materyali katılımının, yan taraflar değil de, büyüen *S. coelicolor* hücrelerinin ucundan olduğu fikri ile uyumludur. *S. coelicolor mreB* mutantlarında, yüzeyden havaya doğru uzayan aerial hiften üretilen spor oluşumunda şiddetli bozukluklar görülür. MreB mutanti sporları oldukça genişlemiş, biçimsiz olup yaban tip sporların kolaylıkla yaşayabildikleri stres koşullarına oldukça hassastırlar. MreB sporlaşan aerial hiflerin bölmelerinde lokalize olur. Bu nedenle, *Streptomyces* 'te *mreB* geni farklılaşma olayında kullanılır, büyüme sırasında çomak şeklinin korunmasından çok, sporlarda hücre duvarının doğru şekilde oluşumunu etkiler. Bu görüşe uygun olarak, MreB sadece spor oluşturan aktinomisetlerde bulunur (streptomycetes gibi) fakat, *Corynebacterium glutamicum* gibi polar uzama ile uzadığı halde sporlaşamayan türlerde bulunmaz.

mreC'nin çıkarılması, hücrelerin yavaş büyümesine yol açar ve bu da MreB'nin aksine, MreC'nin vejetatif *S. coelicolor* hücrelerinde önemli bir rol oynadığını ifade eder (Graumann, 2007).

Hücre bölünmesi: Mbl proteinlerinin sarmal lokalizasyonu FtsZ yokluğundan etkilenmez. Buna rağmen, *C. crescentus*'da bölünme düzlemi ve MreB halkalarının oluşumu FtsZ'ye bağlıdır. Bu da, MreB proteinlerinin hücre bölünmesinde rol aldığını düşündürür. Bu fikir çeşitli gözlemlerle desteklenmiştir. Birincisi, S-(3,4-diklorbenzil) izotioüre'ye (A22) maruz bırakılan *C. crescentus* hücreleri bölünememekte ve bu da DNA ayrılması ile uyarılan hücre döngüsü kontrol noktasının varlığına veya MreB'lerin hücre bölünmesinde bağımsız bir rolü olduğuna işaret etmektedir. İkincisi, hücre bölünmesi ve Z-halkasının konumu *B. subtilis* *mreB* ve *mbl* mutantlarında bozulmuştur. Bu bozukluklar, *mreB* ve *mbl* mutant hücrelerinin geniş ve düzensiz yan duvarları etrafında Z-halkasının yayılmasının ikincil etkisi olarak düşünülmüştür. Buna rağmen hücre bölünmesi sırasında MreB'lerin FtsZ ile birlikte görev almasının sonucu da olabilirler. MreB'nin hücre her bölündüğünde doğru çapı sağlamak üzere bölünme bölgesinde sürekli görev aldığı da öne sürülmüştür. MreB proteinlerinin hücre bölünmesinde birincil bir rol mü oynadığı yoksa bölünme üzerindeki etkilerinin diğer işlevlerinin ikincil bir sonucu mu olduğu halen net değildir (Carballido-López, 2006).

Kromozom ayrılması: Normal hücre döngüsü sırasında, yavru nükleoidler, hızlıca hücrenin karşıt kutuplarına doğru ilerlerler, ve bu, yeni yavru hücrelere eşit olarak dağılımı sağlar. Hücrenin her bir yarısında, kromozom bölgelerini iten ve çeken aktif birer hücre içi makinenin olması gerekir. Kromozom ayrılmasını neyin yönettiği hala bilinmemektedir, fakat bu işlem için MreB'nin faaliyeti önemli ve gereklidir. MreB, DNA'nın orijin bölgesi ile bağılıyken terminus bölgesinde bağlı değildir, bu da MreB'nin, erken kromozom ayrılması işleminin önemli bir elemanı olduğunu gösterir (Graumann, 2007).

Son çalışmalar, MreB'nin özgül olarak bakteriyel kromozomun replikasyon orijini bölgesini ayıran kinetokor-benzeri bir kompleksin parçası olduğunu akla getirmektedir. MreB'nin karışıklığının *oriC* konumlanmasının değişimi de dahil kromozom ayrılması ile ilgili ciddi sorunlara neden olduğu keşfedilmiştir. Kromatin

immünopresipitasyonu kullanılarak MreB'nin *oriC*'ye ve *C. crescentus* kromozomunun birkaç kilobazı içeren küçük bir bölgesine, doğrudan veya dolaylı, özgül olarak bağlandığı gösterilmiştir (Margolin, 2005).

B. subtilis ve *E. coli* gibi çomak şekilli hücrelerde, replikasyonun başlamasından sonra, kromozomların duplike edilen bölgeleri karşı kutuplara doğru ayrılırlar. Bu olay *E. coli* ve *C. crescentus* hücrelerinde MreB ortadan kaldırılsa bozulur. Normal kromozom ayrılması için, MreB'nin gerekliliği yönündeki daha fazla veri, *E. coli* ve *C. crescentus*'ta yeni oluşan kromozomların orijin ve terminus bölgelerinin ayrılması çalışmalarından geldi. MreB ortologlarının kromozom ayrılmasında yer almasının doğrudan bir delili, *C. crescentus*'ta yapılan deneylerde A22 ilacının eklenmesinin MreB filamentlerinin oluşmasını hızla etkilemesi ve hücre iskeleti yapılarının ayrışmasına neden olmasıdır. MreB filamentlerinin kaybolmasına orijin bölgelerinin ayrılamaması eşlik eder, buna rağmen, A22, orijinler ayrıldıktan sonra eklenirse, terminuslar ayrılabilir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007).

Replikasyon olan kromozomları uzayan MreB filamentlerine bağlayan bir (veya birden çok) adaptörün var olması gerekir. Alternatif olarak, *E. coli* MreB'sinin *in vivo* da, RNA polimeraz (RNAP) ile etkileştiği bulgusuna dayanarak öne sürüldüğü gibi, MreB, RNA polimeraz için bir çapa görevi görebilir. Çoğu gen replikasyon orijinlerinden uzağa doğru yönelmişlerdir ve MreB ile bağlanmış RNAP molekülleri vasıtası ile karşıt hücre kutuplarına taşınabilirler (Graumann, 2007). Aynı şekilde, MreB ve RNAP'ın ikisinin de *E. coli*'de kromozom ayrılması için gerekli oldukları yönünde ikna edici kanıtlar sunulmuş MreB ve RNAP'ın kromozom ayrılmasında birlikte görev aldığı öne sürülmüştür (Carballido-López, 2006).

E. coli ve *C. crescentus* için elde edilen sonuçlara karşıt olarak, *B. subtilis*'te kromozom ayrılması için MreB veya başka bir aktin homologunun (Mbl veya MreBH) gerekli olup olmadığı bilinmemektedir. *B. subtilis*'te MreB olmaması kromozom ayrılmasında belirgin bozukluklara yol açmaz ve MreB ile Mbl'nin olmaması sadece hafif ayrılma bozukluklarına yol açar. Üçüncü aktin homologu MreBH'nin *B. subtilis* kromozom ayrılmasını etkileyip etkilemediği konusu açıklanmayı beklemektedir (Shih ve Rothfield, 2006).

B.subtilis'te MreB'nin olmaması, kromozomları içeren nükleoidlerin hızla dekonpanse olması ve çekirdeksiz hücrelerin oluşması ile sonuçlanır. Diğer bir deyişle, MreC ve MreD sentezi devam etse bile (genleri *mreB* ile aynı promotör tarafından kontrol edilir) hücre bölünmesinden sonra DNA içermeyen hücreler ortaya çıkar. Kromozom ayrılmasındaki bozukluk hücre morfolojisindeki bozukluk görülmeden önce ortaya çıkar. Ayrılma bozuklukları, orijin bölgelerinin ayrılması aşamasında ortaya çıkar, MreB yokluğunda (ve daha az ölçüde Mbl eksikliğinde), orijin bölgeleri genellikle hücre ortasında kalır veya aynı hücre yarısına taşınırlar. $\Delta mreB$ hücrelerinde Mbl'nin ortadan kaldırılması, büyümenin durmasında, düzenli hücre şeklinin tamamen kaybolmasında ve kromozom ayrılmasında bozukluğa yol açar. Bu gözlem, özel koşullar altında Mbl'nin kısmen MreB fonksiyonları edindiği izlenimini verir, ve bir paraloğun kaybolmasının karışık MreB/Mbl/MreBH polimerini zayıflattığı fakat bunun özel ortam koşulları ile telafi edildiği fikrini güçlendirir (Graumann, 2007).

MreB hücre iskeletinin kromozom ayrılmasındaki tam rolünün iyice anlaşılması; MreB sarmal dizilerinin makromoleküler organizasyonunun, filament birleşmesi ve dağılmasının polaritesinin, ve MreB-*oriC* etkileşiminin temelini daha iyi anlaşılmasını gerektirir (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.2. ParM sistemi

Düşük kopya sayılı plazmidlerin kararlı kalıtımı, ATPaz aktivitesi olan bir ayırma proteinini içeren bir aktif ayırma sistemi tarafından gerçekleştirilir. Tip I ayırma sistemlerinde, bu proteinler Walker-tipi ATPaz üst ailesine aittir. Tip II sistemlerinde ayrılma proteini aktin protein üst ailesine ait olan bir ATPazdır, ve *E. coli* plazmidi R1'in ParM proteini ile örneklendirilebilir (Shih ve Rothfield, 2006) (Şekil 1.4.). ParM amino asit dizisi aktine %12 benzerlik gösterir (Amos ve ark., 2004).



Şekil 1.4. ParM proteininin yapısı (Amos ve ark., 2004).

Plazmid R1'in *par* lokusu, bakteriyel sistemin ökaryotik hücrelerdeki mitotik aygıtın rolünü yerine getiren ve en iyi anlaşılan örneğidir. Lokus üç gen içerir: *parM* aktin benzeri ParM proteinini kodlar (M, motor anlamında), *parC* cis-etkili sentromerik DNA alanıdır (C, sentromer anlamında); *parR* (R, represör anlamında), *parC* genlerine bağlanarak *par* genlerinin transkripsiyonunu otoregüle eder ve ParM motor proteinini plazmid DNA'sına bağlayan ParR proteinini kodlar (Amos ve ark., 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

Plazmid içeren ve immünofloresan mikroskopu ile görüntülenen hücrelerde ParM'ler, hücrenin uzun eksenine boyunca doğrusal bir filament halinde yapılar oluştururlar. ParM'nin hücresel bolluğu (hücre başına ~18000 molekül), herbir hücre içi filamentin bir miktar protofilament içerdiği izlenimini verir (Carballido-López, 2006; Shih ve Rothfield, 2006).

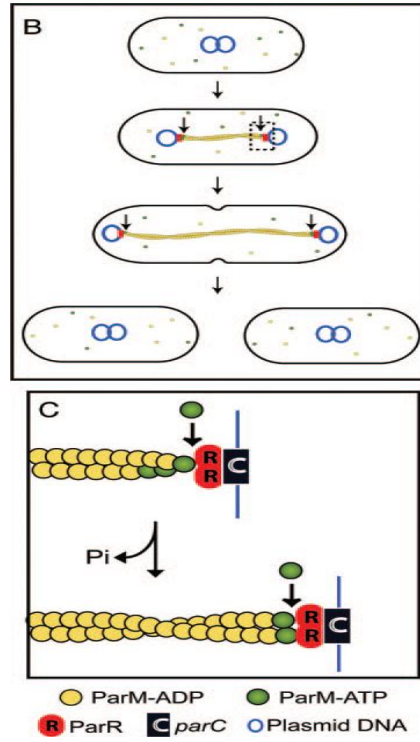
ParM filamentlerinin büyümesi, yavru plazmidleri bölünme düzleminin karşılıklı alanlarına doğru iter ve böylelikle plazmidlerin konak hücrede kararlı kalmalarını sağlar (Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Lewis, 2004) (Şekil 1.5.).

1.1.1.2.1. ParM polimer birleşmesi ve dağılması

ParM, *in vitro* da muhtemelen, hücre içi ParM filamentlerine karşılık gelen filamentler oluşturmak üzere polimerleşirler. ParM polimerleri çarpıcı şekilde F-aktine benzer, neredeyse aynı açısız bükülmeye sahip çift sarmal yapısını alırlar. ParM'nin dinamik davranışının gerektirdiği enerji ATP yıkımından gelir. ParM polimerizasyonunun plazmid kopyalarını zıt kutuplara ayırmakta gerekli olan kuvveti ürettiği gösterilmiştir. *In vitro* daki her bir filament birer çift iplikli, sarmal yapıdır ve muhtemelen herbir sarmal iplik tek bir ParM polimeridir (Carballido-López, 2006; Amos ve ark., 2004; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Shih ve Rothfield, 2006). MreB filamentlerinin aksine ve aktin ile benzer olarak, iki ParM ipliği sağ el sarmalı şeklinde, birbirini üzerine sarılır (Grauman, 2007). Aktin ve MreB filamentlerinden farklı olarak, ParM filamentleri *in vitro* da demetler veya levhalar oluşturmaz (Shih ve Rothfield, 2006).

ParM filamentinin birleşmesi ve dağılması, ATP bağlanması ve hidrolizi ile düzenlenir. Alt ünitelerin sadece filamentin bir ucuna eklendiği aktin filamentlerinin aksine, ParM filamentleri büyüyen filamentin her iki ucuna alt ünite eklenmesi ile uzarlar. ParM filamentlerinin ucuna alt ünite eklenme hızının aktin filamentlerinin büyüme hızı ile benzer olmasına rağmen, dağılma hızı F-aktinden 100 kat daha yüksektir.

Polimer büyümesi, ParM-ATP alt ünitelerinin ParM zincirinin ucuna eklenmesi ile gerçekleşir. Bu daha önce eklenen terminal ParM-ATP'nin ATP parçasının hidrolizine bağlıdır ve bu, sistemin polimerizasyona bağlı ATPaz aktivitesini açıklar. Böylece polimerin sondan bir önceki birimi ParM-ADP'dir (Şekil 1.5.). Bu nedenle, ParM filamentleri, en son eklenen ParM-ATP ile ucu kapatılmış ParM-ADP zincirini içerir. ParM-ADP polimerleri oldukça kararsızdır ve ParM-ATP ile kapatılmadıkları sürece yüksek dağılma ihtimalleri vardır (Shih ve Rothfield, 2006).



Şekil 1.5. ParM filament büyümesi (B) Plazmid replikasyonundan sonra, ParM polimerik filamentinin (Sarı) büyümesi yavru R1 plazmidlerini iter, onları hücre ortasından kutuplara taşır. (C) ParM-ADP filamentleri ParM-ATP ile kapatılmıştır. Kapatılan uç ParR proteini ile plazmidin *parC* sentromerik bölgesine bağlanmıştır. ParM filament büyümesi ParM-ATP alt ünitelerinin, ParR/*parC* kompleksi arasındaki alana girmesi ile gerçekleşir. Bu, bir önceki alt ParM-ATP ünitesinin ATP'sinin hidrolizi ile bağlantılıdır ve böylelikle sondan bir önceki alt üniteyi ParM-ADP'ye çevirmiştir (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.2.2. ParM işlevinin mekanizması

Önemli miktarda delil ParR'nin, ParM filamentlerinin ucu ve hücrenin uçlarına taşınacak olan plazmid DNA'sı arasında köprü olduğunu gösterir (Şekil 1.5.). ParM oligomerinin veya kısa polimerinin uçları, ParR-*parC* kompleksi ile etkileşir, plazmid çiftini ayırır ve filamentin her iki ucu da ParR aracılığı ile bir plazmid DNAsı molekülüne bağlı kalır (Şekil 1.5.). Daha sonra polimer, ParM filamentinin ucu ile ParR-*parC* kapak arasına giren yeni ParM alt ünitelerinin eklenmesi ile uzar ve böylelikle, ekli olan plazmidleri hücrenin karşılıklı uçlarına doğru iter (Şekil 1.5.). ParR-*parC* kompleksinin ParM filamentinin her iki ucunda da bulunması, polimer büyümesi periyodunda alt ünitelerin ayrılmasını inhibe eder ve

göreceli sınırlı bir büyüme periyodundan sonra gerçekleşebilecek katastrofik dağılmayı engeller. Polimer büyümesi filamentlerin ucunun hücrenin sonuna ulaşması ile durur. ParM polimerleri daha sonra dağılır ve yavru hücrelerin hücre ortası replikasyon alanında plazmid replikasyonundan sonra gerçekleşecek olan filament birleşimi döngüsünü başlatmak üzere gerekli ParM alt ünitelerini oluştururlar (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.2.3. Filament dağılması ve plazmid göçü

ParM filamentlerinin dağılmasını tetikleyen mekanizma hala anlaşılmamıştır. İki olası filament dağılma modeli göz önünde bulundurulur. Birincisi, plazmidin hücre duvarına ulaşma sinyaline cevap olarak, dağılma, sağlam filamentin her iki ucundan iki yönlü olarak devam eder. Bunu başarmak için, birleşme/dağılma dengesi filament uçlarından dağılma lehinde değiştirilmelidir. Bunun normalde alt ünite kaybını engellemek üzere, ParR-plazmid kompleksinin ayrılmasına bağlı olması olasıdır. Bu, iki serbest uçlu tek bir ParM filamenti içeren hücreler vermelidir. Filament, her iki uçtan alt üniteler ayrıldıkça, giderek kısılacaktır. İkinci bir modelde, dağılma, filamentin içinden kesilmesi ile başlayarak, hücre ortasından her iki kutuba doğru ilerler. Bu, hücre ortasında bir yerde lokalize olan serbest bir uç ve polar uçta plazmid-ParR kompleksi olan iki filament üretecektir. Serbest uçlarda ParR-*parC* kapağı bulunmayacağı için, her iki filament de bu serbest uçlardan hücre kutuplarına doğru hızlıca dağılacaktır. Kesilme, sırası ile kataninler ve kofilinler gibi mikrotübül ve aktin filamentleri kesen ökaryotik faktörlere benzer proteinler tarafından gerçekleştirilebilir.

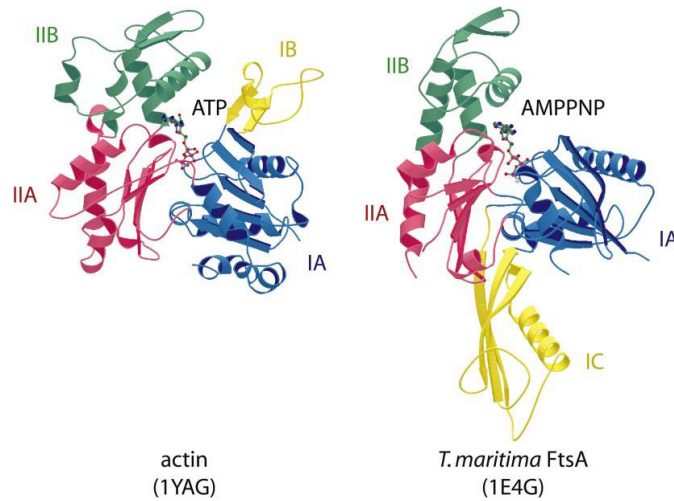
Ayrılan plazmidlerin, hücrenin sonundan yeni replikasyon alanlarına hareket mekanizması, daha tanımlanmamıştır. ParM filamenti dağıldıktan sonra, serbest bırakılan her bir plazmid, bölünme sonrasındaki hücrenin ucundan, ortada yer alacak replikasyon alanına taşınmalıdır. Bu işlem sırasında, serbest kalan plazmidlerin, septal kapanmadan önce hücrenin diğer yarısına difüz olmaları engellenmelidir. Bunun nasıl gerçekleştirildiği bilinmese de, birçok olasılık bulunmaktadır (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.3. AlfA

AlfA, yakın zamanda *B. subtilis*'te bulunan ve plazmid ayıran aktin benzeri bir protein olarak tanımlanmıştır. Plazmid üzerinden kodlanır ve aşağı kısmındaki gen *alfB* ile birlikte, bölünme ve sporlaşma sırasında plazmid ayrılması için gerekli ve yeterlidir. AlfA molekülleri, hücrelerde bir kutuptan diğer kutuba uzanan filamentler oluştururlar ve büyük olasılıkla ParM ile analog şekilde, duplike olan plazmidleri karşıt kutuplara doğru iterler. AlfA, Gram-pozitif organizmalarda bulunmasına karşın ParM, Gram-negatif bakterilerde belirlenmiştir (Graumann, 2007).

1.1.1.4. FtsA

FtsA, dizi ve yapısal benzerliklerle gösterildiği üzere, bir aktin homologudur (Şekil 1.6.). 47 kDa ağırlığında bir protein olan FtsA, FtsZ'nin C-terminal bölgesi ile doğrudan etkileşir (Löwe ve ark., 2004; Mileykovskaya ve Dowhan, 2005).



Şekil 1.6. Aktin ve FtsA kristal yapıları. Solda maya aktini, sağda *Thermotoga maritima* FtsA proteinini (Löwe ve ark., 2004).

FtsA bölünme makinesinin önemli bir elemanı olup FtsZ halkasını lokalize eder. Her zaman FtsZ'ye bağımlıdır fakat bölünme makinesinin başka hiçbir elemanına bağımlı değildir. FtsZ dışındaki bölünme proteinlerinin çoğu FtsZ

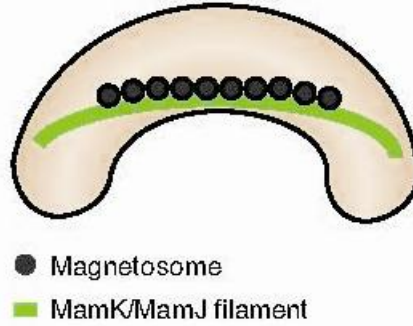
halkasına FtsA aracılığı ile katılır (Graumann, 2007; Margolin, 2000; van den Ent ve ark., 2001). Bu veriler, FtsA'nın FtsZ halkasına erken bir zamanda katıldığını gösterir. *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinde FtsZ'nin FtsA'ya oranı sırası ile 100:1 ve 5:1'dir (Errington ve ark., 2003; Margolin, 2000). FtsA ve FtsZ seviyelerinin oranı, kasılma sürecinin düzgün kontrol edilmesi için önemlidir ancak bu proteinlerin ayrı ayrı seviyeleri önemli değildir (Margolin, 2000; Voskuil ve ark., 1994).

FtsA'nın, *E. coli* ve kokları (*Streptococcus pneumoniae*) içeren birçok diğer bakteride bulunması zorunluyken, *B. subtilis*'te *ftsA*'nın (genellikle *ftsZ*'nin yukarısında) çıkarılması yavaş büyümeye izin verir ancak bölünmede büyük bozukluklara yol açar. FtsA olmadığında, *B. subtilis* hücrelerinde FtsZ anormal halkalar oluşturur. FtsA ile Z-etkileşimli protein A'nın (ZipA) kaybolması, *E. coli*'de FtsZ halkası oluşumunu ortadan kaldırır ve bu, FtsA'nın FtsZ polimerleşmesi ve hücre ortasındaki FtsZ filamentlerinin kararlılığı için önemlidir. FtsA sonradan toplanan bölünme proteinleri ile doğrudan etkileşir ve divizom'un birleşiminde ilave bir rol oynar (Graumann, 2007). Kesik bir *ftsA* geni ürünü yüksek derecede eğri C şekilli hücreler oluşturur (Young, 2003). Ayrıca FtsA'nın aşırı üretimi de muhtemelen PG sentezindeki yerel artış sebebi ile kambur hücreler oluşturur (Nanninga, 1998). FtsA'nın tam işlevi halen belirlenmeyi beklemektedir (Graumann, 2007).

1.1.1.5. MamK

Magnetotaktik türler, vibrio'nun (veya spiral oluşturan hücrelerin) kısa eksenini boyunca düz bir hatta 15-20 magnetozomdan oluşan doğrusal bir dizi kuran özelleşmiş bir makineye sahip bir grup bakteridir. Magnetozomlar, iç hücre zarının invajinasyonu ile oluşan ve manyetik alana göre yönelimi belirleyen, magnetit (genellikle 50 nm çapında) (Fe_3O_4) ile dolu zarlı yapılardır. Kriyo-elektron mikroskobu ile *Magnetospirillum magneticum* ve *M. gryphiswaldense*'de, hücre zarına yakın magnetozom hattına paralel uzanan ~4nm kalınlığında yedi filamentten oluşan bir ağ görüntülenmiştir. Bu hücre iskelet yapısı, magnetozomların sıralanması için esas olduğu yakın zamanda belirlenen iki faktörü içerir: MamK adında bir aktin

ortoloğu ve MamJ adında yeni bir tür protein. MamK ve MamJ olmadığında, magnetozomlar yine de oluşur fakat yanlış lokalize olurlar ve hücrenin ortasında toplanırlar. GFP ile birleşik iki protein de, hücrenin kısa eksenı boyunca, sıralanan magnetozom yapılarına karşılık gelen filament yapılar gösterir (Şekil 1.7.). Her ne kadar, magnetozomlar sarmal hücrelerin merkezi boyunca sıralansalar da, filament halindeki MamK-GFP and MamJ-GFP yapıları kutuptan kutuba uzanır.



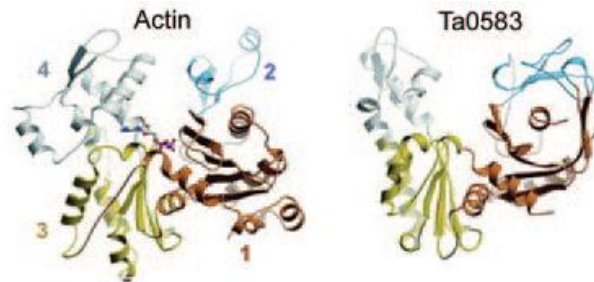
Şekil 1.7. MamK/MamJ yapısının şematik çizimi (Graumann, 2007).

MamK'nın *E. coli* hücrelerindeki ekspresyonu sonucunda, kutuptan kutuba düz filament halinde bir yapının oluşması, *Magnetospirillum*'da görüldüğü gibi bir hücre iskelet yapısına kendi kendine birleştiği izlenimini verir. Bakterilerde hücre içi organel benzeri yapılara yol göstermek, bakteriyel aktin ortologları için, yeni bir işlevdir. MamK filamentleri, MreB ve ParM'nin oluşturduğuna benzer dinamik yapılardır, fakat MreB ortologları tarafından oluşturulan sarmal filamentler yerine düz filamentler oluştururlar.

Diğer magnetozom genleri olmadığında, MamJ-GFP'nin sitosol boyunca lokalize olması, MamJ'nin kendi kendine hücre iskelet yapısı oluşturmadığı fakat bir yapı ile birleşik olduğu ve muhtemelen bir hücre iskelet elemanı olan MamK ile magnetozomları birleştirdiği izlenimini verir. Magnetozomlar, hücre içinde farklı pozisyonlarda oluşurlar ve yaban tip hücrelerde hücre ortasında düz bir hatta toplanırlar. MamJ olmadığında, toplandıktan sonra bir yığın haline dönüşürler. Bu deneyler, magnetozomların, hücrenin herhangi bir yerindeki magnetit kristallerinin çevresinde hücre zarının invajinasyonu sonucunda oluşuktan sonra, MamK ve MamJ'nin ortak eylemi ile bir filamentte toplandıkları izlenimini verir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.1.6. Ta0583

mreB genleri arkeal genomlarda da bulunur. *Thermoplasmatales* takımından üç tür, yapısı *Thermoplasma acidophilum*'da belirlenen Ta0583'ün korunmuş bir kopyasını içerir (Şekil 1.8.). Ta0583, genel yapısı itibarı ile en çok (MreB veya aktinin yerine) ParM ile benzerdir. ATPaz aktivitesine sahiptir ve *in vitro* da kristalin levhalar oluşturur. Kristal içinde monomerlerin paketlenmesi temel alındığında, Ta0583, *in vitro* da elektron mikroskobu görüntülerinde görünen levha benzeri yapıları oluşturmak için birbiri ile etkileşen aktin benzeri protofilamentleri oluşturur. Polimerleşme kinetikleri ve filogeni bakımından Ta0583, aktine daha yakındır. Dizi analizi arkeal aktin homologlarının çok çeşitli olduğunu göstermiştir ve Ta0583 homologları sadece *Thermoplasmatales* takımında bulunur. Bu bulgular gözetilerek, Ta0583 ortologlarının, bir plazmid tarafından kodlanan ve sonra *Thermoplasmatales*'lerin ortak atasına transfer olan ParM-benzeri aktin homologundan geldikleri öne sürüldü. *Thermoplasmatales*'de hücre morfolojisinde önemli bir rol oynayabilecek olmasına rağmen, *in vivo*'da, az bulunan bir protein olan Ta0583'ün sert hücre duvarı yapıları bulunmayan bu hücrelerde uzun hücre iskelet yapıları oluşturması olası görünmemektedir. Ta0583'ün gerçek işlevi halen açıklanmayı beklemektedir (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007).

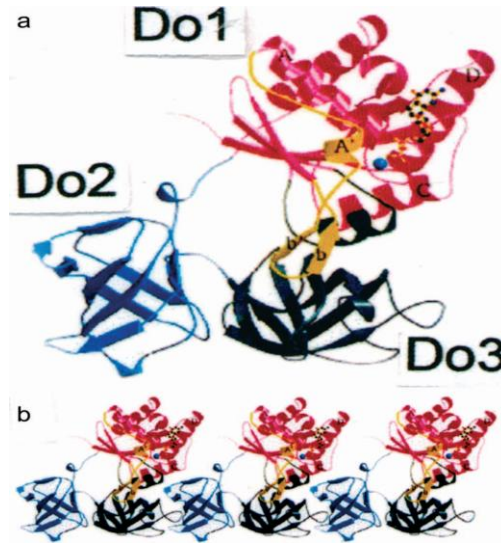


Şekil 1.8. Ökaryotik aktin ve prokaryotik Ta0583 proteinlerinin üç boyutlu monomer yapıları (Carballido-López, 2006).

1.1.1.7. EF-Tu

Hücresinin tamamına yayılan aktin-benzeri sitoplazmik ağına varlığı öne sürülmüştür. Bu proteinin, daha sonra aktine sınırlı bir benzerlik gösteren bakteriyel uzama faktörü (EF-Tu) olduğu ortaya çıkmıştır (Nanninga, 1998) (Şekil 1.9.). EF-

Tu'nun kuramsal olarak ikili ayrı role sahip olduğu düşünülmektedir: "hücre iskeleti ağı" gibi davranabilir ve translasyona yardımcı olur (Löwe ve ark., 2004; Mayer, 2003). Bu durum, belirli olumlu koşullar altında proteinin *in vitro* da filamentler oluşturma yeteneğinden, EF-Tu mutantlarının aşırı anlatımının *E. coli*'nin şeklini kaybetmesine ve patlamasına neden olduğu gerçeğinden, hücre içi konsantrasyonu yüksek (%5-10'a kadar) çözünür bir protein olmasından ve zar ile olan açık etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Löwe ve ark., 2004). Bakteriyel hücre proteinlerinin %9'unu EF-Tu oluşturabilir. Bu miktar, yukarıda tanımlanan hücre iskeleti ağının oluşumu için yeterlidir. Bakteriyel hücrede "birinci" veya "ikinci" EF-Tu görevinin gelişim sırasını belirleyebilecek bir yol şu anda yoktur. Örneğin, EF-Tu'nun hangi görevinin (hücre iskelet elemanı veya uzama faktörü) önce evrimleştiği bilinmemektedir (Mayer, 2003).



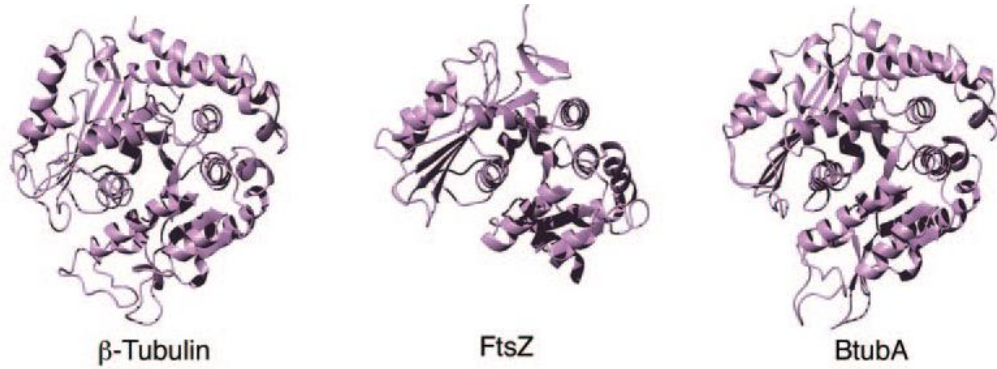
Şekil 1.9. Bakteriyel uzama faktörü EF-Tu. a) GDP formu b) Domain 2 ve 3'ün etkileşimi ile protofilament oluşumu (Mayer, 2003).

70000 EF-Tu molekülünün yaklaşık dörtte birinin protein sentezinde aktif rol aldığı, geri kalanının ise hücrede yapısal bir görevinin olabileceği düşünülmektedir (Nanninga, 1998). Ayrıca, yapısal çalışmaların sonuçları ribozomların/polizomların EF-Tu içeren hücre içi protofilamentlere bağlı olduklarının belirlenmesi ile EF-Tu'nun aktif ribozomlarla kompleks oluşturmaya ilişkin yeni bir modelin geliştirilmesine yol açmıştır. Buna göre, protofilamentler *in vitro* daki deneylerde monomerik EF-Tu'nun GTP varlığında bekletilmesi ile elde edilebilir (Mayer, 2003). Monomer doğrusal dizileri içeren EF-Tu filamentleri sitoplazmada bulunsada,

mevcut elektron mikroskop teknikleri ile görüntülenmeleri güçtür çünkü floresan işaretlemeye olduğu üzere çözünürlük yetersiz kalabilir. Bu nedenle, *E. coli*'de EF-Tu filamentleri bulunması ihtimali halen mevcuttur (Nanninga, 1998).

1.1.2. Tübülün Homologları

Prokaryotlarda FtsZ ve *Prosthecobacter dejongei*'nin BtubA ve BtubB proteinleri ile örneklendirilebilecek iki tip tübülün homologu belirlenmiştir. FtsZ, BtubA/B ve ökaryotik tübülünler ayrı bir GTPaz ailesini oluşturur (Schlieper ve ark., 2005). Bakteriyel proteinler ve tübülünler arasındaki dizi homolojisi oldukça değişkendir. Ökaryotik tübülünle karşılaştırıldığında, FtsZ zayıf dizi homolojisi gösterir (%17) BtubA/B için homoloji %35 oranındadır. Buna karşın, bakteriyel tübülün homologlarının üç boyutlu yapısı, ökaryotik tübülünler ile benzerdir (Carballido-López ve Errington, 2003; Erickson, 1995; Löwe ve Amos, 1998; Margolin, 1998; Schlieper ve ark., 2005; van den Ent ve ark., 2001) (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Tübülün homologları. Soldan sağa: *Bos taurus* β -tubulin GTP/GDP bağlı, *Methanococcus jannaschii* FtsZ GDP bağlı, *Prosthecobacter dejongei* BtubA GTP bağlı (Shih ve Rothfield, 2006).

Filogenetik analiz sonuçları FtsZ ve tübülünün ortak bir atadan evrimleşmesinin muhtemel olduğuna ve evrimin erken safhalarında ayrıldıklarına işaret etmektedir. Daha yakın bir çalışmanın sonuçları BtubA ve BtubB'nin bir ökaryotik kaynaktan tübülün veya tübülün benzeri bir proteinin yatay gen transferi ile geçişini takiben evrimleştiğini düşündürmektedir (Schlieper ve ark., 2005).

1.1.2.1. FtsZ

FtsZ, prokaryotik hücrelerde bir hücre iskelet elemanı olarak belirlenen ilk proteindir. Yüksek sıcaklıklarda filamentler oluşturan ısıya duyarlı mutantların seçildiği taramalarda araştırmacılar, hücre bölünmesinde yer alan birçok geni belirlediler ve *ftsZ* geni (ismini filamentleştirici ısıya duyarlı mutant Z'den alır) ilk olarak 1980'de tanımlandı. 37-47 kDa luk bir protein olan FtsZ, bakteriyel hücre bölünmesi için önemlidir ve neredeyse tüm bakteri ve arkeada oldukça korunmuş FtsZ homologları bulunur. FtsZ homologları, ayrıca, mitokondri ve kloroplast gibi bakteriyel endosimbiyontlar oldukları düşünülen ökaryotik organellerde de bulunur. (Carballido-López ve Errington, 2003; Graumann, 2007; Löwe, 1998; Löwe ve Amos, 1998; Löwe ve ark., 2004; Margolin, 2000; Miyagishima ve ark., 2003; Sun ve Margolin, 1998). Tübülün hücre iskeleti, ökaryotik hücrelerin bölünme düzlemini belirlemede önemli bir rol oynar ve tübülün homoloğu olan FtsZ, bakterilerde bölünme düzlemini belirler (Margolin, 1998; van den Ent ve ark., 2001).

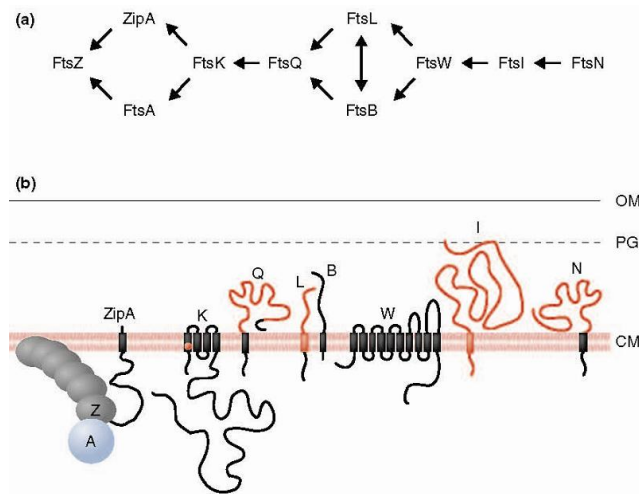
FtsZ ve tubulin arasındaki dizi benzerliği iki molekülün yalnızca N-terminal bölgesinde farkedilebilir, bu N-terminal segmentinin her iki proteinde de korunmuş bir bölgeyi temsil ettiği, buna karşın C-terminal bölgelerinin farklı olduğu düşünülmektedir. Tubulinler GTP bağlamasında görev aldığı önerilen bir dizi parçasına sahiptir ve bu, tubulin “imza” motifidir. FtsZ'nin bu dizisi sondan bir önceki amino asitteki değişim dışında tubulin imza motifine özdeştir (Erickson, 1995; Margolin, 2000).

Voskuil ve arkadaşları (1994), FtsZ'nin GTP-bağlayıcı bölgesi de dahil farklı domainleri ile ilgili veri elde etmek için, FtsZ'ye karşı monoklonal antikor üretmişlerdir. Tüm monoklonal antikorlar doğal şartlarda güçlü tepkimeler vermiş ve başka proteinlerle (hücre bölünmesi) etkileşime olanak sağlayabilecek beş farklı antijenik belirtecin (epitop) lokalizasyonu rapor edilmiştir. Bu verilere ve bilgisayar analizine dayanarak FtsZ'nin temelde globüler bir protein olduğu ortaya çıkarılmıştır (Voskuil ve ark., 1994).

1.1.2.1.1. FtsZ halkası

Bi ve Lutkenhaus (1991), bölünmeyen hücrelerin sitoplazmasında FtsZ proteinlerinin tek tip küçük parçacıklar olarak dağıldığını, ancak bölünmenin başlamasından hemen önce bölünme bölgesindeki bir halkada yoğunlaştığını göstermek için immünoelektron mikroskobu kullanarak FtsZ'nin esas olarak septumun içe bükülen ucunda bulunduğunu gösterdiler (Bi ve Lutkenhaus, 1991). İmmünofloresan mikroskobunun kullanılması ile FtsZ'nin, daha hücre belirgin bir içe bükülme göstermezken bile, hücre ortasında bir halka oluşturduğu ortaya çıkarıldı (Addinall ve Lutkenhaus, 1996; Graumann, 2007).

FtsZ, çoğu bakteride temel bir hücre bölünmesi proteindir. Bölünme makinesinin hücre ortasına yönelen bilinen ilk elemanıdır ve bütün bölünme proteinlerinin lokalizasyonu FtsZ'ye bağlıdır. Burada, hücre zarının iç yüzeyinde yerleşen çevresel bir halka olan Z-halkasını oluşturur (Graumann, 2007; Voskuil ve ark., 1994). *E. coli* Z-halkası, en az 10 ilave proteinin sitokinetik halkada (ayrıca septazom, divizom, septatör olarak da adlandırılır) birleşmesi için bir iskele görevi görür (Şekil 1.11.). *E. coli* hücresi başına düşen FtsZ monomerlerinin tahmini sayısı 3200 ile 20000 arasında değişir (Bi ve Lutkenhaus, 1991; Buddelmeijer ve Beckwith, 2002; Errington ve ark., 2003; Löwe ve ark., 2004; Miyagishima ve ark., 2003; Nanninga, 98).



Şekil 1.11. *E. coli* hücresinin orta kısmında hücre bölünme proteinleri birleşmesinin ardışık yolağı. (a) Proteinlerin bölünme bölgesine yerleşiminin bağımlılık yolağı. Her okun baş kısmı okun başlama yerindeki proteinin yerleştirilmesi için gerekli olan protein(ler)e işaret eder. (b) *E. coli* hücre bölünme proteinleri ve bunların hücre zarındaki tahmin edilen topolojileri. Kırmızı domainler kasılma

bölgesine proteinlerin yerleştirilmesi için önemlidir. CM, hücre zarı; OM, dış zar; PG, peptidoglikan (Buddelmeijer ve Beckwith, 2002).

Daha sonra FtsZ, başka hücre bölünmesi proteinleri ile ilişki içinde, septal PG sentezi ile eş zamanlı olarak, hücreyi bölmek ve iki yeni yavru hücre oluşturmak üzere daralır (Lewis, 2004). Septal invajinasyon ilerlerken FtsZ, içeri büyüyen septumun iç ucuna bağlı kalmasına rağmen, kasılma işleminde doğrudan bir rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir (Shih ve Rothfield, 2006). FtsZ pasif olarak sadece büzülen septumu sentezleyen makine için iskele görevi mi görür yoksa, aktin-miyozin halkasına benzer şekilde, aktif olarak güç mü üretir, sorusuna yanıt aranmıştır. FtsZ'ye has bir kuvvet olabilir veya diğer Fts proteinleri veya henüz bulunmamış bir takım motor proteinleri tarafından FtsZ üzerine güç uygulanabilir (Margolin, 1998; Sun ve Margolin, 1998; van den Ent ve ark., 2001). FtsZ GTP'ye bağlı durumda iken düz bir filament konformasyonunu, GDP'ye bağlı durumda iken bükümlü bir konformasyonu tercih eder. Dahası, GDP ayrılmasının önlenmesi, polimerlerin hidrolizden elde edilen enerjiyi kullanmasına ve halkanın büzülmesi sırasında güç üretmesine izin verir (Lafontaine ve ark., 2007; Möller-Jensen ve Löwe, 2005). Lan ve arkadaşları (2007), çubuk şekilli bakterilerdeki büyüme ve Z-halkası daralması işlemlerini tanımlamak için matematiksel bir model geliştirerek, daralma hızı, hücre şekli ve daralma kuvvetini tahmin etmek amacı ile, hücre duvarının esnekliği ve büyümesini modele dahil etmişlerdir. Sonuç olarak modele göre 8 pN ile 80 pN arasındaki geniş bir Z-halkası kuvveti aralığında bölünme gerçekleşebilir, ancak Z-halkasından gelecek az bir kuvvet (*E. coli*'de 8 pN kadar az) bölünmeyi tamamlamaya yeterlidir (Lan ve ark., 2007).

Z-halkası, anti-FtsZ antikoru, GFP veya bir türevine bağlı FtsZ kullanılarak, immünoelektron ve floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. Sun ve Margolin, FtsZ-GFP içeren hücrelerin üç boyutlu görüntü rekonstrüksiyonlarını kullanarak ilk kez FtsZ dinamiğinin bütün hücre döngüsü boyunca bireysel, büyüyen *E. coli* hücrelerinde doğrudan görüntülenebileceğini gösterdiler (Sun ve Margolin, 1998). Yeni FtsZ halkasının oluşması 1 dakika içinde olur ve henüz hücre ortası Z-halkaları tamamen kapanmadan ve hücre bir sonraki bölünme evresine geçmeden önce ileriki bölünme noktasında gerçekleşir (Errington ve ark., 2003; Guerios-Filho ve Losick, 2002; Lewis, 2004; Margolin, 1998; Sun ve Margolin 1998). Bu sonuçlar FtsZ'nin

bir noktada çekirdekleşip sonra bir yay olarak polimerize olduğunun gözüktüğü *E. coli*'nin küresel bir mutanıtı üzerine Addinall ve Lutkenhaus (1996), tarafından yapılan bir diğer çalışmayı güçlü bir şekilde desteklemektedir (Addinall ve Lutkenhaus, 1996).

Floresan teknikleri FtsZ'nin hücrede polimerler oluşturduğunu açıkça göstermiştir fakat, FtsZ polimerleri hiçbir zaman bakterilerin işaretlenen ince kesitlerinde elektron mikroskobu ile gösterilememiştir (Margolin, 1998). Stricker ve arkadaşlarının (2002) çalışmaları, hücredeki FtsZ'lerin sadece %30'unun Z-halkasına dahil olduğunu göstermiştir. FtsZ'lerin geri kalanı, muhtemelen serbest sitoplazmik alt üniteler veya küçük bileşikler olarak hücre boyunca dağılmıştır. Bu sonuçlar, herhangi bir zamanda, halka içine girmeye hazır büyük bir FtsZ havuzu bulunduğu anlamına gelmektedir. Aynı zamanda, Z-halkasının, ortalama altı ile yedi protofilament kalınlığında olduğu ileri sürülmüştür. Bu da Z-halkasının ince kesit elektron mikroskobunda neden hiçbir zaman görülemediğini açıklar (Stricker ve ark., 2002).

Stricker ve arkadaşları (2002), FRAP yöntemini kullanarak Z-halkasının oldukça dinamik bir yapı olduğunu göstermişlerdir. Deney koşullarına bağlı olarak, FtsZ molekülleri, hücre içinde başka yerdeki FtsZ molekülleri ile yaklaşık 30 saniyelik bir turnover ile değişirler. Daha yavaş GTPaz aktivitesi olan bir mutantta floresan geri eldesinin bariz şekilde azalması, FtsZ monomerlerinin değişiminin (ve böylelikle filamentin dağılması) GTP hidrolizine dayandığını gösterir (Stricker ve ark., 2002).

FtsZ halkası, *C. crescentus*'ta hücre duvarı uzamasının ciddi bir bölümünü yönlendirir ve bu da FtsZ halkasına hücre bölünmesi ile ilişkili olmayan yeni bir işlev ekler. FtsZ, temel lipid II PG hücre duvarı prekürsörünü üreten MurG proteinin yerleşimini düzlemsel olarak düzenleyerek hücre uzamasında temel bir rol oynar, çünkü hücre uzaması sırasında MurG FtsZ halkası ile birlikte yerleşir (Aaron ve ark., 2007; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007). Hücre uzamasının, kutuplar dışında yanal duvarlar boyunca, varolan polimere yeni PG materyalinin dağınık sarmal halde girmesi ile meydana geldiği düşünülmekteyken, hücre bölünmesi, bölünme alanında lokalize olmuş PG sentezi ile ilerler (Aaron ve ark., 2007; de Pedro ve ark., 1997).

Hücre bölünmesi sırasında septal PG büyümesini yönlendirme rolü de Pedro ve arkadaşları (1997) tarafından *E. coli* için geliştirilen D-sistein metodu ile oldukça iyi belgelenmiştir. Hücre bölünmesinin başlangıcında potansiyel bölünme bölgelerinde murein sentezinin FtsZ'ye bağımlı bir aktivasyonu vardır (de Pedro ve ark., 1997; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007; Young, 2003).

Siyanobakteriyel hücrelerin sitoplazmasında FtsZ bulunması FtsZ'nin siyanobakteride ikili bir görevi olduğuna işaret eder. Çünkü FtsZ proteininin ayrı bir kısmı vejetatif hücrelerin sitoplazmasında sürekli bulunur ve hücre iskeleti rolü görür. Buna paralel olarak, Klint ve arkadaşlarının (2005) filamentöz siyanobakteri *Nostoc/Anabaena* sp. ile yaptıkları çalışmada vejetatif hücrelerden tamamen farklılaşmış heterosistlere geçiş sırasında sitoplazmik FtsZ değerleri oldukça düşmüştür. FtsZ'nin, hücre farklılaşma yetisi olan filamentöz siyanobakteri dahil prokaryotlar arasında korunmuş bir görevi olduğunu ve muhtemelen bir de hücre iskeleti bileşeni olarak sitoplazmada görev aldığını gösterdiler (Klint ve ark., 2005).

1.1.2.1.2. Z-halkasının zar bağlantısı

E. coli'nin Z-halkasının birleşimi, halkayı zara çapalamak ve büyük olasılıkla, halka birleşmesi ve kararlılığını sağlamak için, FtsA ve ZipA'yı gerektirir. ZipA ve FtsA, FtsZ'nin C-terminal bölgesi ile etkileşerek ayrı ayrı bölünme bölgesine getirilir. FtsA homologları birçok bakteriyel türde bulunurken, ZipA az sayıda bakteri ile sınırlıdır. Bu proteinlerden herhangi birisi, FtsZ'nin zar bağlantısını desteklemek veya Z-halkası oluşumu için yeterlidir. İlginç biçimde, FtsA veya ZipA'dan herhangi biri Z-halkası oluşumunu destekleyebildiği halde, sonrasında diğer proteinlerin halkaya girmesi için her ikisi de gereklidir. FtsZ, FtsA ve ZipA'nın hepsi sitokinetik halkanın kalıcı bileşenleridir. Fakat, FtsA ve ZipA'nın olmadığı durumlarda, Z-halkasının oluşumu gerçekleşmez. FtsA'daki bir mutasyonun, bölünme sırasında ZipA'ya olan ihtiyacı telafi edebilmesi, Z-halkası oluşumu ve/veya korunmasında FtsA ve ZipA'nın örtüşen işlevleri olduğu izlenimini verir (Graumann, 2007; Löwe ve ark., 2004; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Pichoff ve Lutkenhaus, 2001; Shih ve Rothfield, 2006; Young, 2003).

FtsA veya ZipA'nın, bölünme sürecinde, Z-halkası çapalanması ve septazom birleşmesi dışında rollerinin olup olmadığı bilinmemekle beraber sitoplazmik FtsA'nın, *in vitro* da polimerik filamentler oluşturma yeteneği ve *E. coli*'de FtsA filamentlerinin oluşması, FtsA'nın sitokinetik halka veya septasyon olayının kendisinde de hücre iskeleti benzeri bir rolü olabileceği izlenimini verir (Shih ve Rothfield, 2006).

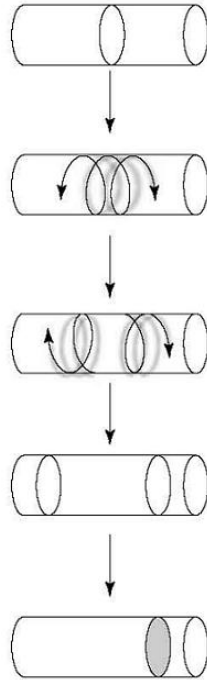
Ayrıca, *E. coli*'de artan veriler, zardaki fosfolipidlerin bölünmede yer alması ile uyumludur, çünkü özgül fosfolipidlerin *E. coli* iç zarında heterojen dağılım göstermesi ve kutuplar ile hücre merkezindeki özgül zar domainlerinin hücre bölünme proteinleri için özgül bağlanma noktaları sağlayabilmeleri ayrıca önemlidir (Lafontaine ve ark., 2006; Mileykovskaya ve Dowhan, 2005).

1.1.2.1.3. FtsZ spiral yapıları

Bölünme alanında, Z-halkasını oluşturmaya ilaveten, FtsZ, hücre iskelet proteinleri MreB, Mbl, MreBH ve MinD tarafından oluşturulan sarmal yapılara benzeyen, hücrenin uzun eksenine çevresine sarılan geçici sarmal dizileri oluşturur (Nanninga, 1998; Shih ve Rothfield, 2006). FtsZ spiral yapılarının, FtsZ halkası oluşumunun ara ürünleri olabileceğinin delili, sporlaşan ve vejetatif *B. subtilis* hücrelerinde yapılan çalışmalardan anlaşılmıştır (Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Shih ve Rothfield, 2006).

B. subtilis hücreleri stres koşullarında ya da kalabalıklaştığında vejetatif büyümeden çıkarak sporulasyon evresine geçer ve bu süreçte farklılaşan ana hücre içinde endosporlar oluşur. Bu sporlar, koşullar vejetatif büyüme için tekrar uygun olana kadar bakteriyel eşey hücre öncüllerini güvenli bir şekilde saklama kapasitesine sahiptirler (Margolin, 2002). Sporlaşmanın ayırıcı özelliği hücre ortası yerine bir kutuba daha yakın bir septumun oluşturulmasıdır. Asimetrik bölünme, spora farklılaşan küçük bir hücre ve parçalanmış büyük bir hücre (anne hücre olarak adlandırılır) üretir. Bu işlem sırasında, hücre ortası halkasının kaybolmasını takiben,

yeni Z-halkaları her iki kutupta da görülür. FtsZ-GFP füzyonu kullanarak Ben-Yehuda ve Losick (2002), hücre ortası Z-halkasının hücrenin uzun eksenı boyunca büyüyen FtsZ'nin spiral-benzeri bir filamentı tarafından yer değiştirdiğini fark etmişlerdir (Ben-Yehuda ve Losick, 2002). FtsZ sonuçta iki kutupsal halka olarak yerleşir ve bunların her ikisi de divizom (bölünme aparatı) birleşimini başlatır. Septumlardan biri diğerinden daha hızlı olgunlaşır ve bu septumun tamamlanması ile bir genetik program başlatılır; bu da ikinci (daha yavaş) kutupsal septumun tamamlanmasını aktive eden proteinleri engelleyerek, ikinci Z- halkasının dağılmasını ayarlar. Her iki polar Z-halkası sitokinezi tetikleme potansiyeline sahiptir, ancak septasyon-engelleyici üç proteini içeren düzenleyici bir yol, yalnızca bir Z-halkasının septuma dönüştürölmesini garantiye alır. Dikkat çekici bir şekilde, sporlanma geri besinler eklenerek tersine çevrildiğinde polar halkalar spirallere ve sonra yeniden hücre ortası halkalara dönüştürölür (Errington ve ark., 2003; Graumann, 2007; Margolin, 2002; Shih ve Rothfield, 2006) (şekil 1.12.).



şekil 1.12. *B. subtilis* hücrelerinde sporulasyon sırasındaki morfolojik değişimlerin şematik gösterimi (Graumann, 2004).

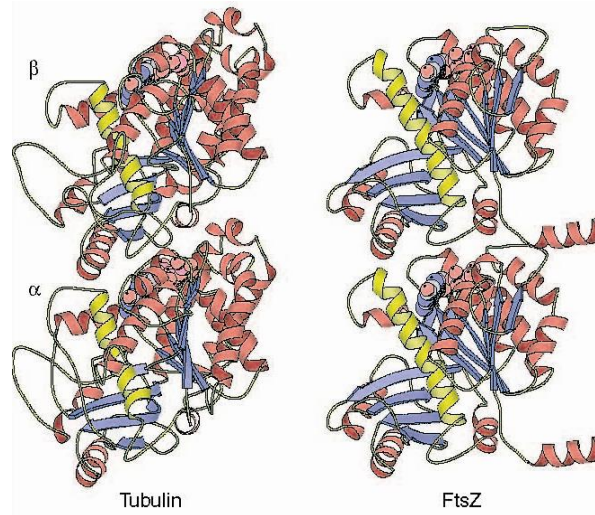
SpoIIE, sitoplazmik merkezi bölgesi FtsZ ile etkileşen 92 kDa luk ve *B. subtilis*'in iç zarında yerleşmiş bir proteindir (Löwe ve ark., 2004). SpoIIE'nin yerleşiminin hücre bölünme proteini FtsZ'ye bağımlı olduğu; immunofloresan

mikroskop çalışmaları ile, erken-sporlanan hücrelerdeki bipolar yerleşim düzeninin, hücre bölünme proteini FtsZ'nin bipolar yerleşim şekli ile üst üste çakıştığı gösterilerek belirlenmiştir (Levin ve ark., 1997). Büyüyen hücreler karşılaştırıldığında Z-halkasının hücre ortasındaki veya bipolar konumdaki yerleşimleri arasındaki geçişte *ftsZ* transkripsiyonunun artması (sporlaşmaya özgü sigma faktörü tarafından uyarılan ilave bir promotörün uyarılması sonucu) ve kutupsal FtsZ halkalarını sabit kılan bir zar proteini olan SpoIIE'nin sporulasyona özgü üretiminin spiral yapıların oluşumuna yol açtığı sonucuna varılmıştır (Ben-Yehuda ve Losick, 2002; Graumann, 2007).

FtsZ sarmal yapıları ayrıca FtsZ'yi aşırı üreten veya tam işlevsel olmayan ancak canlı hücrelerde Z- halkalarını veya diğer FtsZ yapıları için belirteç görevi gören bir protein olan, FtsZ-GFP'i üreten *E. coli* hücrelerinde bulunur (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.2.1.4. FtsZ polimerleşmesi ve depolimerleşmesi

Methanococcus jannaschii'den elde edilmiş FtsZ'nin kristal yapısı incelenmiş, FtsZ'nin üç boyutlu yapısının α - ve β - tübülün ile benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (Löwe, 1998; Löwe ve Amos, 1998) (Şekil 1.13.). Ayrıca, FtsZ ve tübülünün polimerleşme karakteristikleri arasında da benzerlik vardır. Her iki durumda da, proteinler GTP'ye bağımlı bir tarzda, tek yönlü olarak düz protofilamentlere polimerleşirler. FtsZ proteini, GTP'nin varlığına bağlı olarak farklı türlerde *in vitro* da, tek protofilamentler, levhalar, tübülün benzeri yapılar gibi polimerler oluşturur (Erickson ve ark., 1996; Errington ve ark., 2003; Löwe, 1998; Löwe ve Amos, 1999; van den Ent ve ark., 2001).



Şekil 1.13. Tübülün ve FtsZ dimerlerinin üç boyutlu yapısı (van den Ent ve ark., 2001).

Fakat, FtsZ'nin *in vitro* veya *in vivo* da mikrotübül benzeri yapılar oluşturduğuna dair bir delil yoktur ve FtsZ filamentleri ve tübülün arasındaki nükleotid değişiminin kinetikleri arasında belirgin farklılıklar vardır. Tübülünün polimerleşmesi sırasında, β -tubulin'deki GTP hemen hidroliz olurken, α - ve β -tubulin'de hidroliz daha yavaştır. Aksine GTP, FtsZ filamentlerinde daha da hızlı hidroliz olur ve polimerleşme sırasında, hidroliz her bir FtsZ monomerinin içinde gerçekleşir (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006). GTP/GDP oranındaki değişiklikler polimer dağılma hızını etkiler. FtsZ polimerlerinin birleşmesi veya dağılmasının ökaryotik hücrelerdeki mikrotübüller için olduğu üzere, yardımcı proteinler tarafından değiştirilip değiştirilmediği bilinmemektedir (Shih ve Rothfield, 2006).

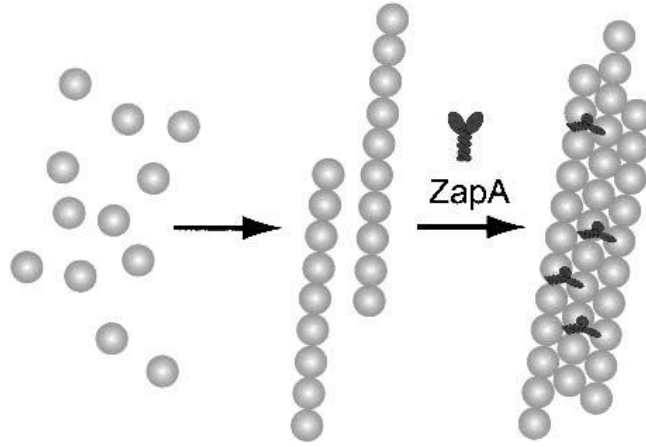
1.1.2.1.5. Z-halkası birleşmesi ve kararlılığının düzenlenmesi

Normal bölünme döngüsü sırasında, Z-halkasının birleşmesi, kararlılığı ve işlevi, birçok protein tarafından kontrol edilir. *E. coli*'de Z-halkası oluşumunun yerinin belirlenmesinde iki temel negatif düzenleyici vardır: nükleoid ve min sistemi. Z-halkasının oluşumu, min sistemi proteinleri tarafından daha sonra septumun oluşacağı bölge ile sınırlanır; şöyle ki, MinC hücre kutuplarına yakın FtsZ polimerleşmesini engeller (Amos ve ark., 2004; Errington ve ark., 2003; Graumann, 2004; Löwe ve ark., 2004; Margolin, 2000; Norris ve ark., 2004). Nükleoid ise bölünme işlemi için fiziksel bir engel teşkil eder (Nanninga, 1998). Nükleoid

oklüzyon nükleoidler boyunca bölünmeyi engeller ve bölünmeyi, normalde ayrılan nükleoidler arasındaki hücre ortası bölgeye veya kutup bölgesine yönlendirir (Errington ve ark., 2003; Lafontaine ve ark., 2007). Z-halkası, hücrenin ortasında oluşmak yerine, ayrılmamış nükleoid kütlelerinin kenarlarında da oluşur. Hücrenin ortasındaki birincil bölgenin bloke olduğu durumlarda bu bölge, FtsZ oluşumu için uygun bölgedir (Sun ve Margolin, 2001).

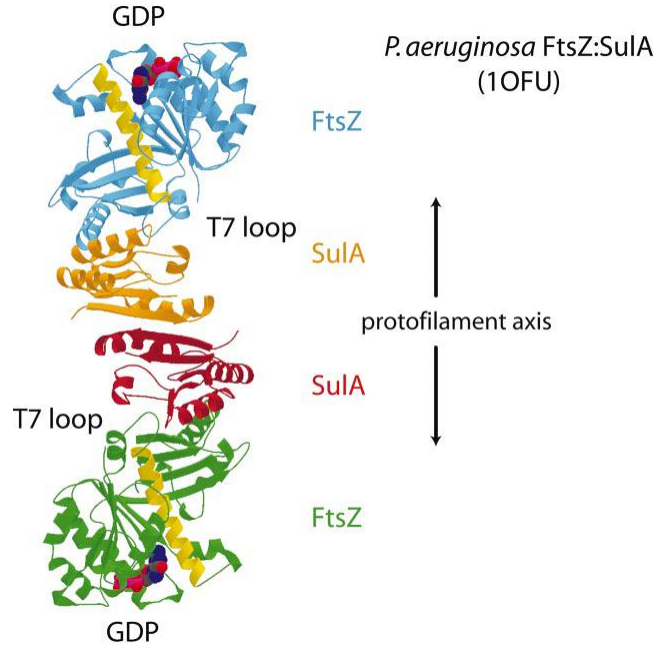
Septum oluşumunun, kromozom replikasyonu ve ayrılması tamamlandıktan sonra gerçekleşmesini sağlamak için Z-halkası birleşimi ve kalıcılığını düzenleyen pozitif ve negatif etkileyici başka proteinler de vardır (Shih ve Rothfield, 2006). *B. subtilis* Z-halkasında ZipA yerine Z-halkası birleşik protein A (ZapA), EzrA ve SepF/YlmA proteinleri yer alır. ZapA, yaklaşık 10 kDa luk küçük bir protein, EzrA ise 62 kDa luk bir proteindir. Bu proteinlerin hepsi FtsZ'ye bağlanır (Löwe ve ark., 2004).

Gueiros-Filho ve Losick (2002), *B. subtilis*'te aşırı ekspresyon kütüphanesini kullanarak, çok yüksek miktarlarda eksprese edildiğinde MinCD direnci ile sonuçlanan yeni bir gen izole ettiler. Bu genin ürünü olan protein, Z-halkası ile birleşmiş olması nedeni ile ZapA olarak adlandırıldı. Araştırmacılar, ZapA'nın *in vivo* da Z-halkası ile birlikte yerleştiğini, *in vitro* da ise FtsZ'ye bağlanabildiğini ve daha yüksek düzenli birleşimleri desteklediğini gözlemiştir (Gueiros-Filho ve Losick, 2002). ZapA, normal laboratuvar koşulları altında büyüme ve sporlanma süresince septum oluşumu için temel değildir. Ayrıca, ZapA'nın bulunmaması tek başına hücre canlılığını bozmamıştır ve bölünme için de temel değildir ancak EzrA'nın yokluğu ile birlikte hücre bölünmesinde önemli bir engellemeye neden olmuştur. EzrA, *B. subtilis* zar proteini. EzrA'nın yokluğu ekstra Z-halkalarının oluşumuna yol açar ve hücrel konsantrasyonu düşük olduğunda Z-halkası oluşumuna olanak verebilir. Gueiros-Filho ve Losick (2002), ZapA ile ZipA ve FtsA gibi Z halkası-etkileşimli proteinlerin, protofilamentlerin yanlamasına birleşme eğilimini arttırarak hücrede FtsZ'nin kooperatif birleşimini destekleyebileceğini ileri sürmüşlerdir (Gueiros-Filho ve Losick, 2002) (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Z-halkası oluşumunda ZapA'nın işlevi için bir model. Model, ZapA dimerlerinin (siyah Y-şekilli) bitişik protofilamentlerde FtsZ monomerleri ile (gri küreler) çapraz bağlandığını ve dolayısı ile yanıl etkileşimleri kararlı kıldığını önermektedir (Guerios-Filho ve Losick, 2002).

Z-halkası oluşumunun düzenlenmesi, geç kalan kromozom ayrılması için veya DNA hasarındaki hasar kontrol mekanizması olarak da kullanılır. Sula, 19 kDa luk bir dimerdir ve iki FtsZ molekülüne her bir açık dimer kısmından bağlanarak kararlı bir kompleks oluşturur ve FtsZ'nin polimerleşmesini engeller (Şekil 1.15.). DNA bozukluğuna SOS cevabının bir parçası olarak, kromozomdaki hasar tamir edilene kadar, Z-halkası oluşumu bloke edilerek istenmeyen hücre bölünmesine ket vurulmuş olur (Amos ve ark., 2004; Bi ve Lutkenhaus, 1991; Graumann, 2007; Löwe ve ark., 2004; Justice ve ark., 2000; Margolin, 2000; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Shih ve Rothfield, 2006). Sula homologlarının, siyanobakteriler ve *Arabidopsis thaliana* plastidlerinde hücre bölünmesi için gerekli oldukları rapor edilmiştir ki bu da normal büyüme koşulları altında Sula'nın hücre bölünmesinde bir rolü olduğunu ortaya koyar (Møller-Jensen ve Löwe, 2005).



Şekil 1.15. SulA tarafından inhibe edilmiş *P. aeruginosa* FtsZ'sinin kristal yapısı (Löwe ve ark., 2004).

1.1.2.2. BtubA/B

Diğer bir grup bakteriyel tübülün homologları, BtubA ve BtubB (bakteriyel tübülün) proteinleridir. Neredeyse tüm bakteri türlerinde bulunan FtsZ'nin aksine, BtubA ve BtubB şimdiye kadar sadece, *Verrucomicrobia* bölümünden *Prostheco bacter* cinsinde bulunur. *Prostheco bacter de joneii*'deki proteinler daha ayrıntılı incelenmişlerdir ve genomlarında *ftsZ* yoktur. BtubA ve BtubB, bu organizmadaki yegane tübülün homologlarıdır (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006). BtubA monomeri ve BtubA/B heterodimerinin üç boyutlu yapıları tübülüninkine benzerdir (Schlieper ve ark., 2005) (Şekil 1.10.).

1.1.2.2.1. BtubA/B polimerleşmesi

BtubA ve BtubB, GTP varlığında, çift sarmallı protofilamentler ve küçük halkalar halinde birlikte polimerleşirler (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006). Filament oluşumu, her iki proteini de gerektirir ancak, BtubA yokluğunda, BtubB kendi kendine yaklaşık 35 nm genişliğinde halkalar halinde polimerleşirken, BtubA

tek başına polimerleşmez. BtubA/B protofilamentleri, bazen bir merkezi oyuk çevresinde kendi kendilerine demetler halinde birleşir, mikrotübül benzeri yapılar üretirler. BtubA/B protofilamentinin sarmal dönüşleri arasındaki uzaklıklar, tübülün ve FtsZ protofilamentlerinin ile aynıdır (Schlieper ve ark., 2005). Polimerleşmenin ve polimerlerin tübüler yapılar içinde kendi kendilerine birleşmesinin kooperatif şekli, heterodimer alt ünitelerden oluşan ($\alpha\beta$ -tübülün) ökaryotik tübülünün mikrotübül yapılarının birleşmesini hatırlatır. BtubA/B polimerleşmesinin GTPaz aktivitesinde artışla ilişkili olması, hem tübülün hem de FtsZ'nin polimerleşmesinde gerçekleşen GTPaz aktivasyonu ile benzerlik gösterir. BtubA/B tübüler yapıları, ökaryotik mikrotübüllerden daha kalındır (40 nm'ye 25 nm dış çap) ve tek katman yerine iki kat protofilamentten oluşur (Shih ve Rothfield, 2006).

BtubA ve BtubB'nin tübülün'e yakından benzemesi ve bilinen diğer bakteri genomlarında bulunmamaları bu genlerin *P. dejongeii*'ye (ve muhtemelen diğer *Verrucomicrobia*) yatay gen transferi yolu ile geçip FtsZ'nin yerini aldığı izlenimini vermektedir. Her durumda, BtubA ve BtubB, hem yapı hem de katlanma bakımından, FtsZ ve tübülün arasında ara bir adımı temsil etmektedir çünkü tübülünün aksine, FtsZ gibi BtubA ve BtubB de katlanmak için şaperonlara ihtiyaç duymaz (Graumann, 2007).

1.1.2.3. *Verrucomicrobia*'da mikrotübül benzeri yapılar

Deniz kirpiksiz sillilerinin (*Euplotidium* türleri) ektosimbiontları *Verrucomicrobia* olarak karakterize edilmişlerdir. Bu bölüm *P. dejongeii*'yi de içerir, fakat *P. dejongeii*'den farklıdır. Avcılara karşı koruma sağlayan mikrotübül benzeri yapılar birçok türde gözlemlenmiştir (Graumann, 2007). Kompleks yaşam döngüsünün bir evresinde, ektosimbiont, bu dışa püskürtme aygıtını geliştirir. Bu aygıt, tübüler yapılar içeren bir sepet tarafından çevrelenir. Bu tübüler yapılar, aygıt dışarı çıktıktan sonra hücre içinde kalır. Ökaryotik mikrotübüllerin boyutlarına benzer olarak, tübüllerin dış çapı yaklaşık 22 nm ve lümen çapı yaklaşık 13 nm dir. Tübüller, birçok monoklonal anti-tübülün antikoruyla reaksiyona girer ve tübülün inhibitörü nocodazole varlığında dağılırlar. Bu tübüler yapıların içerikleri henüz

belirlenmemiştir ve organizmanın Btub homologları içerip içermediği bilinmemektedir (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.3. Ara Filament Protein Homologları

Ara filament (IF) proteinleri, ökaryotik hücre iskelet proteinlerinin üçüncü ana sınıfını oluşturur. Ara filamentlerin en önemli rolü, hücreyi mekanik strese karşı koruyarak hücre şeklinin ve bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan bir iskele görevi görmesidir. Bakterilerde IF-benzeri protein crescentinin tanımlanmasına kadar, IF proteinlerinin hayvan hücrelerine özgü oldukları düşünülmekteydi.

1.1.3.1. Crescentin

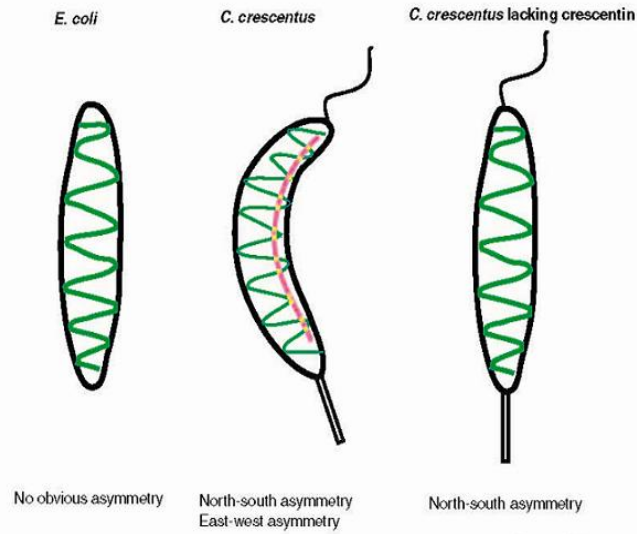
Ausmees ve arkadaşları (2003), ara filamentleri içeren üçüncü ailenin de bakteride bir kökene sahip olduğuna ve bükülmüş hücrelerin üretiminden sorumlu olduğuna dair bulgular sağlamışlardır (Ausmees ve ark., 2003). Crescentin, 430 rezidürlük bir proteindir. Crescentin prokaryotik hücrelerde, şimdiye kadar tanımlanan tek hücre iskeletsel IF homologudur. Virgül şekilli organizma *C. crescentus* 'un şeklinden sorumludur (Ausmees, 2006; Graumann, 2004; Lewis, 2004; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007). Bu, hücre şeklini etkileyen bir *C. crescentus* transpozon insersiyon mutanlığı için yapılan bir taramada belirlenmiştir. Crescentin yapısal geni (*creS*) nin kaybolması, hücre şeklinde virgülden çomağa bir değişime neden olur (Ausmees ve ark., 2003; Lewis, 2004; Margolin, 2004; Møller-Jensen ve Löwe, 2005) (Şekil 1.16.).

Crescentinin bir IF protein homologu olarak önerilmesi temelde tahmini protein domain organizasyonuna dayanır. Yüksek seviyede sarmallı sarmalları nedeni ile, IF'ler oldukça uzun yapılara sahiptirler. Birçok farklı dizi sarmal oluşturabildiği için, IF proteinleri arasındaki dizi korunması düşüktür (Ausmees, 2006; Graumann, 2007). Crescentinin dizisi, sitokeratin 19'unki ile %25 aynı, %40 benzer; nükleer lamin A ile de %24 aynı, %40 benzer bulunmuştur. Fakat aynı zamanda, geniş sarmallı sarmal yapıları içeren ancak IF olmayan proteinlerle de dizi benzerliği olduğunu belirtmek gerekir (Ausmees ve ark., 2003).

Crescentin'in hücre içinde bir hücre iskelet yapısı oluşturduğunun delili, crescentinin, *C. crescentus* hücresinin içbükey yanı boyunca filament halinde bir yapı oluşturduğunu gösteren immünofloresan çalışmalarıdır (Ausmees ve ark., 2003; Ausmees, 2006; Graumann, 2007; Margolin, 2004). Bu, canlı hücrelerde crescentin olmadığında hücrenin kıvrık şeklinin kaybolarak uzun çubuklar halini alması ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, hücrenin iç bükümü boyunca uzanan filament halindeki yapıların, hücrenin virgül şeklini oluşturan ve koruyan crescentin temelli bir hücre iskelet elemanı olduğu izlenimini verir (Ausmees ve ark., 2003).

İlginç biçimde, crescentin ve MreB hücre iskelet yapılarının her ikisi de virgül şekilli hücre şeklinin üretilmesi için gereklidir. MreB olmadığında, crescentin olmasına rağmen, *C. crescentus* hücreleri küre şeklini alırken, MreB varlığı devam ederken crescentinin kaybı, virgülden çomak şekle geçişe yol açar (Ausmees ve ark., 2003). MreB, çomak şekle neden olan uzunlamasına hücre büyüme modu için gerekli iken, crescentin çomak şekilli hücreye bir büküm eklemek için önemlidir. Bükümlü şekil crescentin polimerik yapısına has değildir, çünkü crescentin, *in vitro* da doğrusal filamentler olarak polimerleşir. *C. crescentus*'un izole edilen murein sakkulusunun genel bükümlü şekli alması, sert crescentin iskelet yapısının, şekil belirlemede mekanik bir rol oynadığı görüşüne karşı çıkar. Bu nedenle molekülün, murein biyosentezi makinesinin hücresel organizasyonunu etkileyerek, virgül şeklin oluşturulmasına dolaylı olarak katıldığı düşünülmüştür. MreB, normalde, murein biyosentetik bileşenlerin, uzunlamasına sarmal düzenlemedeki organizasyonu için gereklidir. Crescentin, sadece MreB içeren hücrelerde hücre şeklini değiştirdiği için, MreB, hücre iskeletinin aksi halde uzunlamasına sarmal olacak organizasyonuna bir büküm katarak ve böylelikle, ikincil olarak murein biyosentetik makinenin hücresel dağılımını değiştirerek etki edebilir (Shih ve Rothfield, 2006). *C. crescentus*, şeklini, hücrenin içbükey kısmında dışbükey kısmından daha az hücre duvarı ağı sentezleyerek kazanmış olmalıdır. Bu durumda, crescentin'in MreB hücre iskeleti ile ve hücre duvarı sentezini yöneten diğer faktörlerle etkileşmesi muhtemeldir ve hatta, hücre duvarı biyosentezinde görev alan genleri ve proteinleri kontrol ettikleri düşünülmektedir (Ausmees, 2006; Margolin, 2004) (Şekil 1.16.).

Crescentin, *in vitro* da, ökaryotik IF proteinlerine benzer şekilde kofaktör veya enerjiye ihtiyaç duymaksızın 10 nm kalınlığında filamentler ve levhalar halinde birleşir (Ausmees ve ark., 2003; Ausmees, 2006; Graumann, 2004; Lutkenhaus, 2003; Margolin, 2004; Möller-Jensen ve Löwe, 2005). Bu yönden bakteriyel veya ökaryotik tübülün ve aktin homologlarından farklılık gösterir. Crescentin filamentlerinin yanal bağlarla daha kalın filamentler oluşturma eğilimleri vardır ve *in vitro* da geniş ağlar oluşturabilirler. Ayrıca crescentinler yüksek pH'da bir araya gelemez (Ausmees, 2006). Crescentin filamentleri, ökaryotik IF'lerle, hızlı birleşmeleri ve viskoelastik özellikleri bakımından benzeşirler, bu, crescentin ağının katıya benzer olduğunu ve mekanik gerilmeye dayanıklı olduğunu gösterir (Shih ve Rothfield, 2006).



Şekil 1.16. Crescentin faaliyetinin bir modeli. Özgül bölgelerde (sarı), Crescentin filamentinin (kırmızı) hücre duvarı sentezini inhibe etmek üzere aktin benzeri MreB sarmalı ile (yeşil) etkileştiği ve büyüme sırasında sol-sağ asimetrisine yol açtığı ileri sürülmektedir. *E. coli* ve crescentin'siz *C. crescentus* mutantları gibi crescentine sahip olmayan hücreler, MreB etkisi ile düz silindir şeklindedirler. Crescentin olmadığında bile *C. crescentus*, bir kutupta flagellum (üst) ve diğer kutupta sap (alt) ile bir eksenli hücresel asimetri gösterir (Margolin, 2004).

1.1.4. MinD/ParA sınıfı Bakteriyel Hücre İskelet Proteinleri

Ökaryotik hücre iskelet proteinlerine ilaveten, bakteriyel hücreler, ökaryotik hücre iskelet elemanları ile hiçbir benzerliği olmayan başka bir grup hücre iskelet proteinine sahiptirler (Carballido-López, 2006; Graumann, 2007; Lewis, 2004). Bunlar, geniş MinD/ParA üst ailesine aittirler. Anormal Walker A-tipi ATPaz motiflerin varlığı ile karakterize edilen bu proteinler hücre içinde organize filament halinde şekiller olarak bulunmaları ve incelendiği durumlarda, *in vitro* da uzun polimerik filamentler halinde kendi kendilerine birleşebilmeleri temelinde hücre iskelet proteini olarak sınıflandırılırlar. Walker A-tipi ATPazların, hücre iskelet elemanı olarak kullanılması bakteriyel hücrelere hasmış gibi görünmektedir (Shih ve Rothfield, 2006).

MinD/ParA proteinleri iki alt gruba ayrılabilir. MinD alt grubunun proteinleri bakteriyel ve plastid bölünme alanlarının yerleşiminde yer alırken, ParA grubunun proteinleri öncelikle DNA ayrılmasında görev alırlar (Lewis, 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.1. MinD sınıfı proteinler

1.1.4.1.1. MinCDE sistemi

MinD, *E. coli*’de septal yerleşimin yerini belirlemede, *minB* operonunun diğer gen ürünleri MinC ve MinE ile birlikte, anahtar rol oynayan bir hücre iskelet proteinidir. Bu operonun ortadan kaldırılması kutuplarda septum oluşumuna sebep olur, bölünme hücre ortası yerine hücre kutbuna bitişik gerçekleşir. Bu kutupsal septasyon durumunda nükleoidsiz mini-hücreler oluşur (Errington ve ark., 2003; Fu ve ark., 2000; Margolin, 2000; Nanninga, 1998; Pichoff ve Lutkenhaus, 2001; Sun ve Margolin, 2001). Böylece Min proteinleri, septasyonu, istenen hücre ortası alana kısıtlar ve bunu hücrenin kenarlarına yakın alanlarda bölünme makinesinin birleşimini engelleyerek yapar. Min proteinleri, diğer prokaryotik türlerde de bölünme alanının yerleşimini, bitki ve fotosentetik bakterilerin plastidlerinin organel bölünme alanlarının yerleşimini düzenler. MinD ve MinE homologları, yeşil alg

Chlorella kloroplast genomunda ve *Arabidopsis*'in nükleer genomunda da bulunmuştur (Miyagishima ve ark., 2003).

MinE homoloğu bulunmayan *B. subtilis*'te, polar alanların oluşumu, MinE ile benzer olmayan ve başka bir lokalizasyon mekanizması kullanan DivIVA proteini tarafından düzenlenir. Öte yandan *C. crescentus* gibi bazı bakterilerin Min proteinleri bulunmaz ve bu bakterilerde bölünme alanının nasıl belirlendiği bilinmemektedir (Graumann, 2007; Margolin, 2003; Mileykovskaya ve Dowhan, 2005; Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Norris ve ark., 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

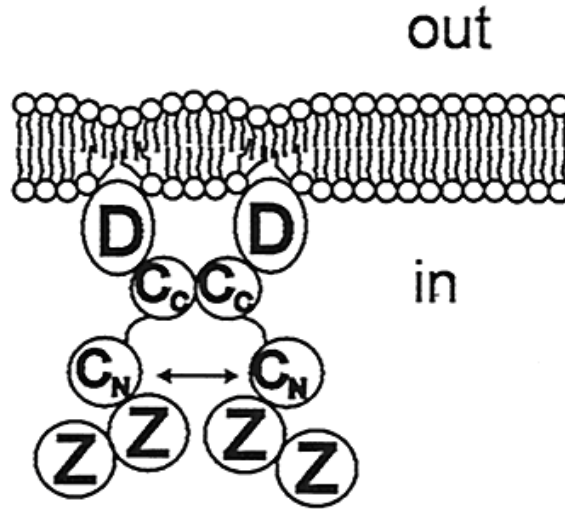
1.1.4.1.2. MinD hücre iskeleti

Yüksek çözünürlüklü floresan mikroskobu sayesinde MinC ve Min E ile birlikte MinD moleküllerinin sitoplazmik zarın hemen içinde, *E. coli* hücresinin çevresine sarılan sarmal yapılar halinde organize olduğu görüntülenmiştir. MinD sarmal yapıları MreB hücre iskeletini oluşturan sarmal yapılara benzese de MreB ve MinD sarmal dizileri bağımsız yapılardır. MinD'nin, Min hücre iskelet sisteminin temel elemanı olduğu sonucuna uygun olarak, MinE ve MinC bu yapılarda ancak MinD varlığında bulunurlar (Shih ve Rothfield, 2006).

MinC ve MinD birlikte Z-halkasının toplanmasını negatif olarak düzenlerler (Møller-Jensen ve Löwe, 2005; Margolin, 2000; Norris ve ark., 2004). MinE ise MinC ve MinD'nin aktivitesini negatif olarak düzenler (Margolin, 2000).

Justice ve arkadaşları (2000), MinCD'nin, Z-halkasının birleşmesinden sonra harekete geçtiğini ve FtsA'nın FtsZ'ye katılmasını engellediğini öne sürseler de Pichoff ve Lutkenhaus (2001), MinC'nin asıl hedefinin FtsZ olduğunu ve MinCD'nin, Z-halkası oluşumunu bloke ederek bölünmeyi önlediğini göstermişlerdir (Justice ve ark., 2000; Pichoff ve Lutkenhaus, 2001). MinC, FtsZ polimerlerinin *in vivo* ve *in vitro* da parçalanmasını destekler (Errington ve ark., 2003; Margolin, 2003; Lutkenhaus, 2002). MinC hücre kutuplarına MinD tarafından çekilir (Graumann, 2004). MinC'nin N-terminal domaini FtsZ ile etkileşimi, C-terminal

domaini ise dimerizasyonu ve aynı zamanda MinD ile etkileşimi sağlar (Errington ve ark., 2003) (Şekil 1.17.).



Şekil 1.17. Hücre kutuplarında bölünmenin engellenmesi. MinCD inhibitörü hücre kutuplarında sitoplazmik zara bağlanır ve FtsZ polimerizasyonunu engeller. MinC'nin C-terminal domain'i (C_C) MinC dimerizasyonunu sağlar ve zara bağlanan MinD (D) ile etkileşir. MinC'nin N-terminal domain'i (C_N) FtsZ (Z) ile etkileşir ve FtsZ polimerizasyonunu veya diğer bölünme proteinlerinin FtsZ halkası ile etkileşimini engeller (Errington ve ark., 2003).

MinE, MinCD bölünme inhibitörüne topolojik özgüllük uygulayarak etki eder, hücre ortası bölgede hücre uzunluğu boyunca diğer istenmeyen bölgelerde bölünmeyi engellemesine izin verirken hücre ortası bölgede inhibitörün etki etmesini engeller (Errington ve ark., 2003; Fu ve ark., 2000). MinE esas olarak MinCD salınımında rol alır ve FtsZ halkası oluşumunda doğrudan yer almaz. MinE, MinD'yi bir hücre yarısından diğerine takip eder (Buddelmeijer ve Beckwith, 2002). MinE, *in vitro* da, MinD filamentlerini dağıtır, çünkü MinD'nin ATPaz aktivitesini uyarır (Graumann, 2007; Norris ve ark., 2004). MinE yalnızca MinD zara bağlı olduğunda ATP hidrolizini uyarır. Bu uyarım, fosfolipid keseciklerini gerektirir ve bu da Min proteinlerinin fosfolipidlerle doğrudan ve karşılıklı etkileştiğine işaret etmektedir (Lutkenhaus, 2002).

GFP füzyonlarının kullanımı üç Min bileşeninin (C, D ve E) hücrenin iki yarısı arasında hızlı salınımlarını göstermiştir, MinC ve MinD'nin her ikisi de bir kompleks halinde bir kutuptan diğerine salınır (Buddelmeijer ve Beckwith, 2002; Fu ve ark., 2000; Grauman, 2004; Margolin, 2000; Lutkenhaus, 2002; Pichoff ve

Lutkenhaus, 2001). *B. subtilis* hücrelerinde Min salınımı görülmez. *B. subtilis*’te MinD hücre içine salınmak yerine hücrenin uçlarında kararlı kepler oluşturur (Lewis, 2004; Norris ve ark., 2004).

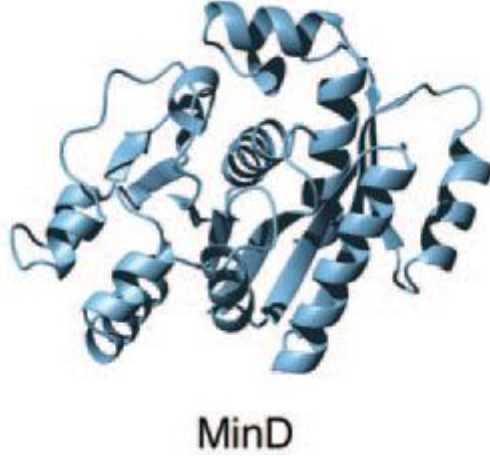
Bazı MinE’lerin MinCD polar bölgesi boyunca yayılmış olmasına rağmen MinE’nin çoğu MinCD polar bölgesinin ucunda bir halka olarak belirir (Fu ve ark., 2000; Graumann, 2007; Lutkenhaus, 2002). MinE-GFP görüntülemelerinde bu halka FtsZ’den bağımsız olarak hücre ortasına yakın halka benzeri bir yapı halinde lokalize olur. Buna karşın Z-halkası tamamen merkezdedir (Margolin, 2000; Sun ve Margolin, 2001). Fu ve arkadaşları (2000), MinE halkasının hücre ortasına yakın bir konumda sabitlenmediğini ancak ilk olarak bir hücre kutbuna ve sonra zıt kutuba olan hareketin tekrarlayan dinamik bir yapı olduğunu bildirmişlerdir. Bu döngü her bir bölünme döngüsünün içinde birçok kez tekrarlanır. E-halkasının MinCD bölünme inhibitörünün faaliyetini engellemek için hücre ortasında bölgesel olarak hareket ettiği varsayılmaktadır (Fu ve ark., 2000). E-halkasının iki rol oynadığına inanılır. Bunlardan birisi, MinD alt ünitelerinin daha fazla eklenmesini engellemek için bir kapak görevi görerek polar alanın hücre ortasını geçmesini engellemesi diğeri ise MinD-ATP polimerlerinin önde giden ucunda, MinD ATPaz aktivitesini aktif hale getirmesidir (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.1.3. MinD yapısı ve polimerleşmesi

Üç termofilik organizmada; *Archaeoglobus fulgidus*’da MinD-1, *Pyrococcus furiosus*’da MinD ve *Pyrococcus horikoshii*’de MinD-2 olmak üzere MinD’nin kristal yapısı belirlenmiştir (Şekil 1.18.). Bu üç protein primer dizi ve üç boyutlu yapı bakımından benzerdir. Termofilik organizmalar MinC ve MinE eşleniklerini içermezler (Shih ve Rothfield, 2006).

MinD, 30 kDa luk bir proteindir (Löwe ve ark., 2004). ATP ile inkübe edildiğinde, *in vitro* da, kısa çift zincirli filamentler halinde polimerleşir (Amos ve ark., 2004; Graumann, 2007). Fosfolipid keseciklerin eklenmesi MinD filamentlerin oluşumunu artırır. MinD filamentleri boyuna uzar ve kendi kendilerine demetler

halinde birleşirler. Bu da MinD'nin hücre zarı boyunca kendi kendine birleştiği görüşünü destekler (Graumann, 2007). MinE, MinD'nin ATPaz aktivitesini etkinleştirerek MinD filamentlerinin dağılmasına yol açar (Mileykovskaya ve Dowhan, 2005). MinD ATPaz aktivitesinin Min E tarafından harekete geçirilmesi için fosfolipid keseciklerinin varlığı gerekmektedir (Errington ve ark., 2003).



Sekil 1.18. *Archaeoglobus fulgidus* MinD proteini (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.1.4. MinD'nin zara hedeflenmesi ve MinD-çift tabaka etkileşimleri

MinD'nin zar bağlantısı, farklı türlerde 8 ila 12 amino asit arasında değişen C-terminal zar hedeflenme dizisi (MTS) tarafından yönlendirilir. Birçok türdeki MinD proteinleri benzer bir MTS içerir ve benzer MTS *E. coli* hücre bölünmesi proteini FtsA'nın zar bağlantısını da yönlendirir (Shih ve Rothfield, 2006). Mileykovskaya ve Dowhan (2005), MinD'nin oldukça korunan C-terminal motifinin proteinin zara yerleşmesi için zorunlu olduğu yönünde deliller sağlayan ilk raporu sunmuşlardır (Mileykovskaya ve Dowhan, 2005).

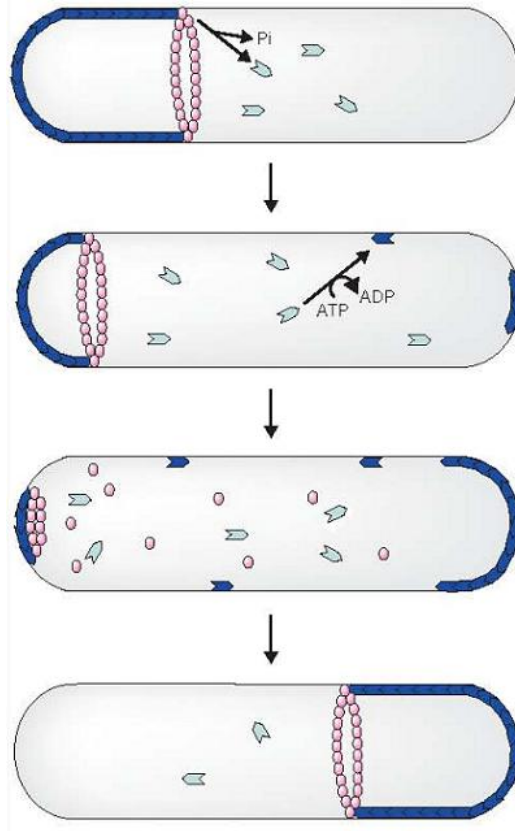
MinD, doğrudan zara bağlanan bakteriyel hücre iskelet elemanlarının araştırılan ilk örneğidir. MinD, ATP veya hidroliz edilemeyen ATP varlığında fosfolipid keseciklere bağlanır, fakat ATP olmadan bağlanmaz. Ayrıca MinD'nin ATP varlığında dimerleşebildiği ve MinD'nin ATP uyarımlı dimerleşmesinin molekülün zara bağlanmasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Amos ve ark., 2004; Shih ve Rothfield, 2006).

Çarpıcı şekilde, MinD'nin fosfolipid kesecikleri ile ATP'ye bağlı etkileşimi, hem MinD polimerleşmesine hem de, kesecik yüzeyinden uzanan, 50 ila 100 nm çapında uzun lipid tüplerin oluşumu ile, kesecik deformasyonuna yol açar. MinE'nin eklenmesi, MinD'nin ATPaz aktivitesini uyararak muhtemelen MinD polimer dağılması nedeni ile tübülleşme reaksiyonunu geri çevirir (Errington ve ark., 2003; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.1.5. MinD hücre iskeletinin dinamik yeniden düzenlenmesi

Min proteinlerinin kutuptan kutuba salınımı bölünme alanı seçimi için esastır. Salınımlar MinC, MinD ve MinE moleküllerinin, hücrenin bir ucundaki polar sarmallardan diğer ucundaki polar sarmallara tekrar dağılımını da içermek üzere ve hücre iskeletinin sıralı bir dizi tekrar düzenlenmesi sonucunda gerçekleşir (Amos ve ark., 2004).

Zara bağlı MinD-ATP, hücre kutbundan hücre ortasına uzanan sarmal düzende polimerleşir. Polar alanın birleşmesi sırasında, MinD, MinC ve MinE'yi toplayarak sarmal MinD polar alanını MinCDE alanına çevirir. MinD polimerinin büyüyen uçları hücre ortasına yaklaşıncı, MinD-ATP'nin eklenmesi yavaşlar ve MinE, E-halkasını yapmak üzere sarmal protofilamentlerin uzayan uçlarında birleşir. Daha sonra MinE, MinD'nin ATPaz aktivitesini aktif hale getirir. MinD ATPazın aktivasyonu, MinD-ATP'nin MinD-ADP'ye dönüşmesine neden olur ve MinD polimerin ucundan serbest bırakılır. Bu, sarılmış MinDCE polar yapısının, E-halkası ile birlikte kaybolana kadar, giderek küçülmesine neden olur. Bırakılan MinD-ADP, MinD-ATP'ye çevrilir ve birleşme dağılma siklusunu tekrar etmek üzere diğer kutuba ilerler, böylelikle salınım siklusuna devam edilir (Shih ve Rothfield, 2006) (Şekil 1.19.).



Şekil 1.19. Min proteinlerinin salınımını özetleyen şema. MinD-ATP (mavi) polar alanın üzerinde zarla birleşir. Bir MinE halkası (kırmızı) polar alanın ucunda birleşir ve MinD ATPaz aktivitesini uyarır. Bunun sonucu olarak MinD-ADP (açık mavi) serbest kalır. MinD-ATP zara bağlanır ve zıt kutupta birleşmeye başlar. MinE halkası kutuba ulaştığında serbest bırakılır ve polar kuşağın ucunda yeniden birleşir. (Lutkenhaus, 2002).

1.1.4.2. ParA sınıfı proteinler

1.1.4.2.1. Plazmid ayrılmasında ParA/B proteinleri

Bilinen bütün tip I ayırma sistemleri cis-etkili sentromerik DNA alanı (*ParC* ve *ParS* olarak da adlandırılır) ve iki adet plazmidin kodladığı proteinleri içerir. İlk protein bir Walker tipi ATPazdır ve *ParA*, *SopA*, veya *Par F* şeklinde adlandırılır. *ParA* proteinleri, yavru plazmidleri hücrenin karşıt yarısına ayırmaktan sorumludur. *ParA* proteinleri, MinD proteini ile dizi benzerliği gösterir. *ParA* proteinlerinde MinD'yi sitoplazmik zara çapalayan, C-terminal MTS'si yoktur ve *ParA* proteinlerinin zara bağlı olduklarına dair bir veri de yoktur. *ParA* proteinlerinde, MinD proteininin karakteristiği olan, MinD kutusu da bulunmaz.

İkinci protein ParB, SopB veya ParG olarak adlandırılan bir sentromer bağlanma proteinidir. ParB, plazmid ve ParA proteini arasında bir bağlantı kurulması için gereklidir. Tip II ayırma sisteminde olduğu gibi, ParB'nin plazmid ayrılmasını kolaylaştırmak için plazmidlerin eşlenmesinden de sorumlu olduğu öne sürülmüştür, fakat diğer modeller plazmid eşleşmesine ihtiyaç duymazlar. Hem ParA hem de ParB proteinleri *par* operonunun transkripsiyonel oto regülasyonunda rol oynayabilirler (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.2.2. ParA hücre iskelet yapıları

Sadece birkaç sistem detaylı incelenmiş olsa da, MinD ve plazmid ayırma proteini ParA'nın, *E. coli* hücreleri içinde dinamik, hücre iskeleti benzeri yapılar oluşturma yeteneği bulunduğu dair artan deliller mevcuttur. *In vivo* ortamda hücre iskelet benzeri yapılar oluşturdıkları gösterilen ParA proteinleri $ParA^{F(SopA)}$ ve $ParA^{pB171(ParA)}$ ile örneklenebilir. Genel görünüşleri MinD sarmal dizilerine benzeyen uzun sarmal düzenlerde bulunurlar. Sarılmış yapılar farklı plazmidlerde dağılımda değişiklikler gösterirler. Örneğin, $ParA^{F(SopA)}$ sarmal yapıları, iki kutup arasında uzanır gibi görünürken, $ParA^{pB171(ParA)}$ sarmal dizileri nükleoidin üzerinde lokalize olur. $ParA^{F(SopA)}$ ve $ParA^{pB171(ParA)}$ sarmal düzenleri ParB anlatımı olmayan hücrelerde olur ve $ParB^{F(SopB)}$ 'nin sarmal yapılarda bulunması ParA proteinin varlığına bağlıdır (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.2.3. ParA polimerleşmesi

ParA polimerleşme sistemi, birçok yönden MinD sistemine benzer. ParB, MinE gibi yardımcı protein olarak görev yapar. *In vitro* da, ParA ATP'ye bağımlı filamentler ve filamentlerin birbiri üzerinde sarmalandığı filament demetleri oluştururlar. Öncelikle, MinD polimerleşmesi ve ParA polimerleşmesi ATP tarafından uyarılır. MinD ve ParA polimerleşme sistemlerinde, ATP'nin, hidroliz olmayan analogu ile değiştirilebilmesi ATP hidrolizinden çok bağlanmasının polimerleşme için gerekli olduğu anlamına gelir (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.2.4. ParA salınımı

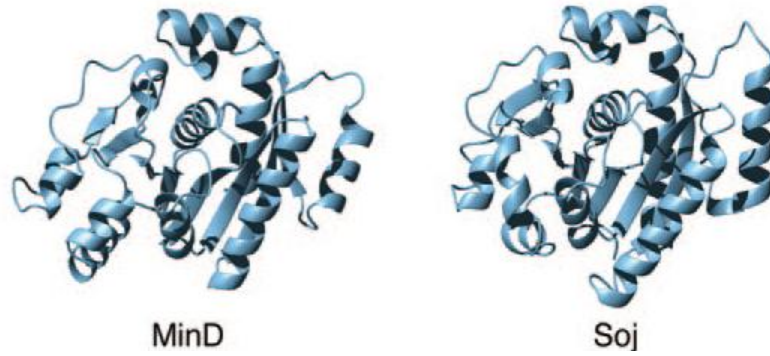
MinD ve ParA proteinlerinin davranışlarında benzer olan, bazı ParA proteinlerinin de, hücre içinde iki pozisyon arasında salınım hareketi göstermesidir. Hücre çeyrekleri arasında ve nükleoid bölgelerinde salınımları gözlemlenmiştir. Salınım periyotları yaklaşık 20 dakikadır ve rapor edilen MinD salınım hızlarından belirgin şekilde yavaştır. Fakat, MinD'nin salınım hızı MinD/MinE oranından belirgin şekilde etkilenir. ParA/ParB oranının ParA salınım hızını etkileme olasılığı henüz sistematik olarak incelenmemiştir. İlginç biçimde, ParB olmadığında, ParA sarmal yapılar oluşturabilmekte, ancak salınımlar hem ParB hem de *parC* DNA'sını gerektirmektedir. Bu, aynı şekilde bir yardımcı protein, MinE, gerektiren MinD salınımını hatırlatır (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.3. Soj

B. subtilis'in Soj proteini MinD/ParA ailesinin bir elemanıdır ve Spo0J proteini ile birlikte birçok görevi gerçekleştirir. Spo0J, *B. subtilis* kromozom replikasyon orijini yakınındaki sentromer benzeri DNA dizilerini (*parS*) tanır, bu nedenle, plazmid tarafından kodlanan, plazmid sentromerik lokuslarını tanıyan ParB proteinine benzer. *parS* dizisi düşük kopyalı plazmidlere eklendiğinde, Spo0J ve Soj, yavru hücrelere doğru plazmid dağılımı sağlayan plazmid ayırma sistemi olarak işlev gösterirler. Bu sistemde Soj, ParA proteini olarak, Spo0J ise ParB eşdeğeri olarak görev alır.

Soj değil, Spo0J, normal nükleoid ayrılması ve kromozomal *oriC* bölgelerinin sporlaşma sırasında, erken sporlara yönelmiş ayrılması için gereklidir (Shih ve Rothfield, 2006). Spo0J'nin, immünofloresan mikroskobu ve GFP füzyonu ile, *B. subtilis*'in vejetatif ve sporlaşan hücrelerinde hücre kutuplarında bir noktada lokalize olduğu ve *oriC* ile uyum içinde, mitoz benzeri bir şekilde kutuplara doğru hareket ettiği gösterildi (Margolin, 1998). Soj ve Spo0J, sporlaşmanın erken evrelerinde birçok genin anlatımını düzenler. Soj transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yaparken Spo0J onun etkisini ortadan kaldırır (Shih ve Rothfield, 2006).

Soj, MinD ile önemli yapısal benzerliklere sahiptir ve üç boyutlu yapısı bilinen bir diğer ParA homologudur (Şekil 1.20.). Soj ve MinD, ATP varlığında dimerleşmeleri bakımından benzerdirler. Soj, birçok hücre iskelet proteini ile, *in vitro* da uzun filamentler halinde kendi kendine birleşmesi bakımından benzerdir. Burada Soj, ATP ve özgül olmayan DNA'ya ihtiyaç duyar. Soj salınımı MinD ve ParA'dan belirgin şekilde farklılık gösterse de, yaşayan hücrelerde tekrarlayan değişiklikler geçirmesi bakımından MinD/ParA ailesinin diğer bireyleri ile benzeşir (Shih ve Rothfield, 2006).



Şekil 1.20. MinD ve Soj proteinleri: *Archaeoglobus fulgidus* MinD proteini, *Thermus thermophilus* Soj proteini (Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.4.4. Bakteriyel Dinamin

Dinaminler, endositozda, kesecik trafiğinde, mitokondriyal bölünmede ve ökaryotik hücrelerin morfolojisinde işlevsel olan, çok domainli GTPaz ailesidir. *In vitro* da dinaminler, GTP bağlanması ile büzülen oligomerik halkalar ve sarmal yapılar oluştururlar. Lipid keseciklerinde birleşen dinamin spirallerinin GTP hidrolizi ile uzaması, dinaminlerin kesecikleri yay benzeri bir tarzda kopardığı izlenimini verir.

Yakın zamanda, siyanobakteriyel dinamin benzeri proteinin yapısı çözüldü, ve GTPaz domain yapısının çarpıcı korunumu ortaya çıkarıldı. *Nostoc punctiforme* bakteriyel dinamin benzeri proteini (BDLP); GMP-PNP (GTP'nin hidroliz edilmeyen bir formu) ve keseciklerin varlığında uzun tübüller oluşturan düşük afiniteli bir GTPaz'dır ve kesecikleri, yaklaşık 45 nm çapında ve filamentler arası adım tekrarı 6 nm olan kompakt sarmal bir kaplama ile tübüler hale getirir. Hidrofilik kısımları ile

lipidler, tübüllerin iç kısmına bağlanabilir. *N. punctiforme* BDLP, filament halindeki siyanobakterinin hücre zarına noktalı bir düzende lokalize olur. *B. subtilis* BDLP ortoloğu da, benzer bir şekilde lokalize olur. Bu da, BDLP'lerin, birçok türde zarı zarı rol oynadığını gösterir, esasen dinamin benzeri proteinleri kodlayan genler diğer birçok bakteriyel genomda da bulunur (Grauman, 2007).

1.1.5. Diğer Filament Halindeki Hücre İçi Yapılar

1.1.5.1. *Spiroplasma melliferum* fibril yapıları

Spiroplasma melliferum, Mollicutes sınıfına dahildir. Bu sınıf hücre duvarı içermeyen bir sınıf olmasına rağmen filogenetik olarak bakterilerin Gram-pozitif filumuna dahildir (Graumann, 2007). Kürner ve arkadaşları 2005 yılında, *Spiroplasma melliferum* hücrelerinin üç boyutlu yapılarını yaklaşık 4 nm çözünürlükte, doğal hallerine yakın şekilde incelemek için kriyo-elektron tomografisi kullanmışlardır (Kürner ve ark., 2005). Hücrenin kısa eksenini boyunca, zarın altında, iki tür filament halinde levhalar uzanmaktadır. Filamentler, spiral şekilli organizmanın boyunca uzanan üç paralel şerit halinde düzenlenmişlerdir. Yaklaşık 4 nm aralıklı dokuz ince filamentten oluşan merkezi bir levha ve her iki yanda da yaklaşık 11 nm aralıklı beş kalın filamentten oluşan levhalar bulunur. İç filamentlerin boyutları, aktin veya MreB tarafından oluşturulanlarla oldukça benzerdir ve bu nedenle bir MreB ortoloğundan oluşmuş olabilir. Aslında *Spiroplasma*, genomunda beş *mreb* geni taşır. Dış levhalar, *Spiroplasma*'ya özgü bir protein olan, fibrilden yapılmıştır. Fibril, bir dimer oluşturduğu düşünülen, 55 kDa luk bir proteindir. Bu uzun yapıların sarmal şekilli bakterinin hareketinden sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Beveridge, 2006; Carballido-López, 2006; Kürner ve ark., 2005; Löwe ve ark., 2004; Graumann, 2007; Trachtenberg ve Gilad, 2001).

1.1.5.2. *Treponema phagodenis* sitoplazmik filamentleri

T. phagodenis hücreleri, *cfpA* geninin anlatımına bağlı olarak, spiral şekilli hücrenin uzunluğunca bükülen beş paralel filament benzeri yapı dizisini içerir. Bu dağılım virgül şekilli hücrelerde crescentinin dağılımına benzese de, CfpA, crescentin ve diğer IF'lerde bulunan, bir sarmallı sarmal yapı içermez (Shih ve Rothfield, 2006). Crescentin'in aksine, filamentler hücrenin uzun eksenı boyunca sarmal yollarda ilerlerler. Görünüşe göre, filamentler, periplazmik flagellanın karşılık gelen grubunun altında lokalize olmuştur ve orijinal olarak hareketlilikte görev aldıkları öne sürülmüştür, fakat flagella ve hücre içi filament yapıları arasındaki bir yapısal bağlantının delili bulunmamaktadır (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006).

Filamentlerin temel bileşeninin, birçok uzun sarmallı sarmal yapılar içeren, spiroketlere özel olduğu düşünülen, 79 kDa luk bir polipeptid (CfpA) olduğu bulundu. Bu özellikler, CfpA'nın IF protein ailesine dahil olabileceği izlenimini verir. *E. coli*'de eksprese edildiğinde, CfpA'nın uzun filament halindeki yapıların oluşmasını indüklemesi, CfpA'nın aslında kendi kendine filamentler oluşturabileceğini gösterir. Periplazmik flagella, CfpA olmadığında normal olarak lokalize olur ve tam tersi olması her iki sistemin de birbirinden bağımsız birleştiği izlenimini verir. *CfpA* mutantlarının daha az hareketliliği, değişen morfoloji nedeni ile olabileceği için, CfpA'nın flagella işlevinde doğrudan veya dolaylı bir etkisinin olup olmadığı açık değildir (Graumann, 2007).

1.1.5.3. *Leptospira* türlerinde Scc

Uzamış N-terminal sarmallı sarmal bölgesi içeren bir diğer protein *Leptospira* türlerinde bulunur. Scc proteini 2-3 µm uzunluğunda sarmal yapılar ve herhangi bir kofaktörden bağımsız, günlerce kararlı kalabilen öte yandan *in vitro* da, 6 ila 10 nm çapında tek filament halinde yapılar oluşturan bir moleküldür. *E. coli* hücrelerinde eksprese edildiğinde, Scc-GFP hücre boyunca bir kutuptan diğerine doğru veya hücre zarının altında uzanan, tek uzun bir filament oluşturur. Saflaştırılan Scc RNA ve DNA'ya bağlı kalır ve çarpıcı çomak şekilli nükleoprotein yapılar oluşturur. Scc

kodlayan genin çıkarılması, değişen koloni morfolojisine yol açar, fakat hücre morfolojisi ve hareketliliğinin değişmemesi, Scc'nin hücrelerin yayılması sırasında, kemotaksiste yer aldığını gösterir (Graumann, 2007).

1.1.5.4. *Myxococcus xanthus* hücre içi filamentleri

Zar altı filamentlerinin uzun demetleri *M. xanthus* hücrelerinde gözlemlenmiştir. Bunlar, bu organizmalarda A-hareketlilik sistemi ile sağlanan kayma hareketinin düzenlenmesinde yer alan AglZ proteini ile ilgili olabilirler. AglZ, *Myxococcus xanthus* bakterisinde sosyal hareketlilikte yer alır ve bu süreçte yer alan bir küçük GTPaz ile etkileşir. AglZ'nin N-terminali iki elemanlı cevap düzenleyici proteinlerinin alıcı domainlerine benzerken, C-terminali miyozin ağır zinciri gibi sarmallı sarmal proteinlerinin çubuk bölgelerinin karakteristiği olan heptad tekrarlarını içerir. Sonraki domain, *in vitro* da filamentler halinde kendi kendine birleşir ve *E. coli*'de eksprese edildiğinde sıralı filament dizileri oluşturur. Bütün haldeki proteinin *Myxococcus* veya diğer organizmalarda benzer yapılar oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir (Graumann, 2007; Shih ve Rothfield, 2006).

1.1.5.5. *Mycoplasma* türlerinde filament yapıları

M. pneumoniae patojen bakterisi, MreB kodlayan bir genden yoksun olduğu halde, elektron mikroskobu gözlemlerine göre şekil koruyucu özelliği olan oldukça farklılaşmış bir hücre iskeletine sahiptir (Mayer, 2003). Benzer yapılar sağlam *M. pneumoniae* hücrelerinin deterjan özütlerinde de görülür (Shih ve Rothfield, 2006).

Elektron mikroskobu kullanarak araştırmacılar, *Mycoplasma genitalium*'da fibril olarak veya sarmal yerleşimli bıçak benzeri yapılar gibi görünen belirgin hücre altı yapılar gözlemlediler. Zarlar ve sitosolik proteinler Triton X100 ile uzaklaştırıldıktan sonra, kabaca 300×40 nm boyutları olan yuvarlak bir uca sahip şaşırtıcı bir (görünüşe göre birçok paralel filamentten oluşan) çomak şekilli yapı gözlemlenebildi. *Mycoplasma*'nın Triton'da çözülmeyen hücre fraksiyonunun

yapısal bileşenleri araştırılmakta olup, çomak şekilli yapıların fonksiyonları halen açığa çıkarılmayı beklemektedir (Graumann, 2007).

1.1.5.6. Bilinmeyen bileşimde hücre iskelet elemanları

Kriyo-elektron mikroskobu kullanılarak, *C. crescentus* hücrelerinde yeni fakat daha karakterize edilmemiş hücre iskelet elemanları gözlemlenmiştir (Pichoff ve Lutkenhaus, 2007). Hücrelerin yaklaşık dörtte biri, hücrenin içbükey kısmında zarın yanında filament demetleri içerir. Bu demetler, *creS* içermeyen hücrelerde ve *MreB* filament oluşumunun A22 tarafından baskılandığı hücrelerde gözlemlenmiştir. Bu nedenle, hücrenin uzun ekseninden çok daha kısa olan bu filamentler, filament oluşturan yeni proteinler ortaya koyabilirler. Benzer şekilde sitoplazmik şeritler diye adlandırılan yapılar (zara görünür bir bağlantısı olmayan üç veya beş şerit demeti), *CreS* ve *MreB* yokluğunda bile, analiz edilen hücrelerin yaklaşık yarısında görülmektedir. İlave iki yapı, kutupsal şeritler ve halka benzeri bir yapı, düşük frekansta görülmüştür ve doğaları hakkında hiçbir şey bilinmemektedir. Böylelikle, *C. crescentus*'ta en azından filament halinde dört bağımsız yapı olduğu görülmektedir (Beveridge, 2006; Graumann, 2007).

1.2. HÜCRE İSKELETİ VE ANTİBİYOTİKLER

Tüberküloz (TB), tanımlanan ilk bulaşıcı hastalıklardan biriydi. Pek çok kişi tarafından yok edilebileceği düşünülmeyle birlikte, hastalık tekrar ortaya çıkmıştır ve günümüzde dünyada yalnızca bulaşıcı hastalıktan kaynaklanan ölümün başlıca etkenidir. TB ve HIV/AIDS birbirlerinin ilerleyişini hızlandırarak ölümcül bir kombinasyon oluşturur. Bu ortak enfeksiyon gittikçe daha yaygın hale gelmektedir ve TB ile baş etmeden, HIV/AIDS etkili şekilde önlenemez. Birçok ilaca karşı dirençli *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) türlerinin ortaya çıkması, mevcut olan anti-TB ilaçlarının çoğunu etkisiz hale getirmiştir (Huang ve ark., 2007). Mevcut (ve klinik olarak hala etkili) ilaçlar temel olarak belirli hedeflere yönlendirilmektedir: Hücre duvarı, DNA ve protein sentezleri. Ortaya çıkan direnç sorununun üstesinden

gelmek için yeni etki mekanizmalarına sahip yeni antibiyotiklere ihtiyaç vardır. Özellikle hücre bölünmesi, antimikrobiyal hedef olarak büyük ilgi çekmektedir. Çünkü bir hücre bölünme inhibitörü, enfekte bölgelerdeki kontrol edilemeyen bakteri üremesini engelleyebilmekte ve hücre bölünmesinin engellenmesi, birçok patojenin ölümüne yol açmaktadır (Vollmer, 2006). Hücre bölünme alanında, diğer hücre bölünme proteinlerinin düzenlenmesinin ardından, Z-halkası büzülerek septumda kapanmayı sağlar ve bunu takiben iki kardeş hücre meydana gelir. FtsZ'nin inaktivasyonu ya da FtsZ birleşiminin değiştirilmesi Z-halkası ve septum oluşumunu engelleyeceğinden, yeni antimikrobiyal ilaçlar geliştirmek adına FtsZ iyi bir hedeftir (Huang ve ark., 2007).

1.2.1. FtsZ'yi Hedefleyen Bileşikler

Viriditoksin: *E. coli* FtsZ ile doğrudan etkileşim yolu ile polimerleşmeyi ve GTP hidrolizini engelleyerek Z-halkasını açıkça bozan küçük bir moleküldür. Viriditoksin klinik olarak ilgili pek çok Gram-pozitif patojene karşı geniş spektrumlu bir antibakteriyel etkinlik gösterir (Huang ve ark., 2006; Jaiswal ve ark., 2007; Rai ve ark., 2008; Vollmer, 2006).

Zantrinler: *E. coli* FtsZ'nin GTPaz etkinliğini engelleyen ve zantrinler olarak adlandırılan, yapısal olarak farklı beş molekül belirlenmiştir (Huang ve ark., 2007; Rai ve ark., 2008). Bunlardan Zantrin Z1, FtsZ GTPaz etkinliğini önler ve alt birimler arasındaki etkileşimlerin kararlılığını bozar. Zantrin Z2 ve Zantrin Z3 FtsZ, protofilaman depolimerizasyonunun inhibitörleridir (Vollmer, 2006). Antibiyotiğe karşı dirençli ve zehirli patojenler de dahil olmak üzere, sıvı besi kültürlerindeki çeşitli bakterileri öldürdüğüne gözlenmesi, geniş spektrumlu yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesinde FtsZ'nin iyi bir hedef olduğu hipotezini daha da güçlendirmektedir (Huang ve ark., 2007).

BrGTP: Çözünebilir FtsZ için bağlama bölgesinde GTP ile rekabet eden bir GTP analogudur. BrGTP'nin inhibitör etkinliği ilk olarak, BrGTP eklenmesinin daha kısa ve daha ince FtsZ filamentlerinin oluşmasına yol açması ile anlaşılmıştır. BrGTP'nin tübülün birleşimini engellememesi, FtsZ ve tübülündeki GTP bağlama bölgeleri arasında hassas farklılıklar olduğunu göstermektedir (Huang ve ark., 2007).

Sanguinarin: *Sanguinaria canadensis*'in rizomlarından türetilmiş bir benzofenantiridin alkaloid olan sanguinarin geniş bir antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Çeşitli kanser hücresi türlerinin çoğalmasını engellediği de bilinir ve hem *in vitro* da hem de kanser hücrelerinde mikrotübülleri depolimerize eder. Sanguinarin, Z-halkası oluşumunu bozarak Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde sitokinezi engeller (Huang ve ark., 2007; Jaiswal ve ark., 2007).

Tiyabendazol ve Albendazol: Albendazol ve tiyabendazol, tübülün polimerleşmesinin bilinen inhibitörleridir. Bu, tübülün inhibitörlerinin, FtsZ üzerinde tübülündekine benzer şekilde etki gösterdiği anlamına gelmektedir (Huang ve ark., 2007).

2-Alkoksikarbonilaminopiridinler: Küçük organik moleküllerdir. FtsZ'nin GTPaz etkinliğini ve polimerleşmesini engelleyerek bakteriyel hücre bölünmesini durdururlar (Vollmer, 2006). SRI-3072 ve SRI-7614 dozdan bağımsız olarak Mtb FtsZ polimerleşmesini engeller. SRI-3072 sadece FtsZ ile sınırlı kalarak tübülünün polimerleşmesini engellemez (Huang ve ark., 2007).

Taksanlar: 120 taksanın araştırılması ile bazı taksanların önemli ölçüde anti-TB etkinlik sergilediği ortaya çıkarıldı (Huang ve ark., 2007). Bazı taksan türevlerinin, *B. subtilis* hücrelerini engellediği bulundu (Jaiswal ve ark., 2007).

Totarol: Bir diterpeonid fenol olan totarol, Mtb de dahil olmak üzere, bir takım patojenik Gram-pozitif bakterilerin çoğalmasını önler. *Bacillus subtilis* hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek hücre uzamasına neden olur. Totarol, memelilere ait hücrelerin çoğalmasında çok zayıf inhibitör etkiler sergiler. Saflaştırılmış tübüline etkili şekilde bağlanmaz ve yüksek totarol konsantrasyonları, HeLa hücrelerinde mikrotübül ve kromozom organizasyonunu bozmaz (Jaiswal ve ark., 2007). Totarol, Mtb FtsZ protofilamentlerinin birleşimini azaltır ve Mtb FtsZ'nin GTPaz aktivitesini güçlü şekilde bastırır. Z-halkasının oluşumunu engelleyerek sitokinezi durdurur (Rai ve ark., 2008; Jaiswal ve ark., 2007).

Dichamanetin: *B. subtilis* hücrelerine etki gösterir. FtsZ'nin GTPaz etkinliğini önleyerek birleşim dinamiklerini bozan ve bakteriyel hücre bölünmesini engelleyen küçük organik moleküllerdir (Vollmer, 2006; Jaiswal ve ark., 2007).

Curcumin: Curcumin, *Curcuma longa* rizomlarından elde edilir. Tübüline bağlanarak mikrotübül polimerleşmesini engeller. Diyetel bir polifenolik bileşik olan Curcumin, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Enterococcus* dahil olmak üzere birtakım patojenik bakterilere karşı güçlü bir antibakteriyel

etkinliğe sahiptir. *B. subtilis* 168'de bakteriyel sitokinezi engelleyecek şekilde, filamentlenmeye neden olduğu bulunmuştur. Curcumin'in *in vitro* da FtsZ'ye bağlandığı, GTPaz etkinliğini arttırdığı ve FtsZ protofilamentlerinin birleşimini ve kümelenmesini engellediği bulunmuştur. Ayrıca FtsZ'nin ikincil yapısını da bozar. Curcumin, FtsZ'nin GTPaz etkinliğini arttıran, şu ana kadar belirlenmiş ilk küçük molekül FtsZ inhibitörüdür (Rai ve ark., 2008).

Bis-ANS: 1998'de Yu ve Margolin, *E. coli* FtsZ'sinin bis-ANS [5,5'-bis-(8-anilino-1-naftalinsülfonat)] ile inhibisyonunu rapor etti ve FtsZ'de moleküller arası hidrofobik etkileşimleri durdurarak bis-ANS'ın FtsZ'yi engellediğini öne sürdüler. Bis-ANS'a benzer bir hidrofobik prob olan ANS (8-anilino-1-naftalinsülfonat) ise, FtsZ birleşimi veya tübülün birleşimi üzerinde herhangi bir inhibitör etkiye sahip değildir (Yu ve Margolin, 1998).

Vinblastin: Vinblastin, mikrotübül kararsızlaştırıcı bir ilaçtır. Vinblastin varlığında memeli hücrelerinde polimerler halinde FtsZ ve tübülün birlikte sıralanabilirler (Yu ve ark., 1999; Margolin, 2000).

Tubulin inhibitörleri, kolşisin, kolsemid, benomil ve vinblastin, FtsZ'nin polimerlere Ca^{+2} destekli ve GTP bağımlı birleşmesi üzerinde bir etki göstermez (Yu ve Margolin, 1998). Tübülün inhibitörlerinin FtsZ birleşimi üzerindeki etkilerinin araştırılması, FtsZ'nin yapısı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır (Huang ve ark., 2007).

FtsZyi hedefleyen bileşikler dışında, FtsZ-ZipA etkileşimi [3-(2-indolil) piperidin türevi ve karboksibifenilindol türevi] ve MreB için (A22) de ilaçlar vardır (Vollmer, 2006).

Bakteriyel hücre iskeletinin elemanları antimikrobiyal bileşikler için potansiyel hedef olurlar, çünkü bakteriyel yaşam için gereklidirler ve önemli patojenlerin içinde korunurlar. Ayrıca, bakteriyel hücre iskelet proteinleri, ökaryotik benzerlerinden belirgin şekilde farklı yapıya sahiptir. Bu da bakteriyel proteinler için belirli inhibitörler geliştirmeyi mümkün kılar (Vollmer, 2006). Şöyle ki; paklitaksel, vinblastin ve kolşisin dahil olmak üzere, tübülün/mikrotübül hedefleyen maddelerin çoğu FtsZ birleşim dinamiklerini etkilemez (Jaiswal ve ark., 2007). Sonuç olarak, tübülün ve FtsZ yapıları benzer olmakla birlikte, FtsZ ve tübülünin protein

seviyesinde sınırlı (<%20 benzerlik) bir dizi benzerliğine sahip olması, ökaryotik hücreler üzerinde belirli bir düzeye kadar sitotoksik olan ve doğrudan FtsZ'ye yönelen bileşiklerin keşfedilmesini cazip hale getirir (Huang ve ark., 2007). Belirli proteinler, bölünme aparatının oluşumunda farklı adımlara saldırarak, bakteriyel hücre bölünmesini etkilerler. Moleküler ayrıntılar daha kesin bir şekilde belirlendiğinde, bölünme sürecinin çeşitli adımlarına saldıran bölünme inhibitörlerini taklit eden ilaçlar geliştirmek mümkün olabilir (Justice ve ark., 2000).

1.3. TEZİN AMACI

Bu tezin amacı bakteri hücrelerinde iskelet sistemi bileşenlerinden FtsZ proteininin varlığının özgül floresan boyama ile floresan mikroskopunda immünohistokimyasal olarak gösterilmesidir.

Bu tez, ülkemizde prokaryotik hücre iskelet varlığını göstermeye yönelik ve floresan işaretleme ile yapılan ilk çalışma olarak planlanmıştır. Bakteriyel hücre iskelet sisteminin varlığının belirtilen yöntemle tanımlanması, daha ileride özgül immünofloresan işaretleme yöntemi kullanılacak diğer çalışmalara ışık tutacak ve incelenecek bakteriler için hücre iskelet elemanlarını boyamaya yönelik geliştirilen hızlı ve özgül işaretleme yöntemi ile bu konuda çalışan araştırmacıların çalışmaları için bir model oluşturulacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyaller

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Sodyum klorür (Merck 1.06404), Potasyum klorür (Merck 1.04936), Sodyum hidrojen fosfat (AppliChem A1046), Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel-de Haën® 04243), Hidroklorik asit (Merck 1.00319), Sodyum hidroksit (Riedel-de Haën® 06203), Tryptic soy agar (Merck 1.05458), Tryptic soy broth besiyeri (Merck 1.05459), Paraformaldehit (Merck 1.0405), Gluteraldehit (Merck 8.20603), Trizma base (Sigma T6066), Glukoz (Riedel-de Haën® 16301), EDTA (Sigma ED), Lizozim (Roche 1 243 004), Sığır serum albümini (Sigma A7906), Anti-FtsZ antikoru (Agrisera AS07 217), FluoroNanogold™-anti-rabbit Fab'-Alexa Fluor®488 (Nanoprobe 7204), Antikor sulandırıcı (Zymed 00-3118), UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology sc-24941).

2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

+4 °C Soğutucu (Regal RDP 455 A), +4 °C Soğutucu (Indesit TN 5 FNF), -20 °C Dondurucu (Regal RDD 1280), -20 °C Dondurucu (Regal RDP 455 A), -20 °C Dondurucu (Indesit TN 5 FNF), -80 °C Derin Dondurucu (THERMO), Hassas Terazî (SARTORIUS BL 210S), Hassas Terazî (SARTORIUS BL 3100), Manyetik Karıştırıcı (Schott), Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001), Otoklav (HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50), Otomatik Pipetler (GILSON), Mikropipet uçları (Isolab), pH metre (Multical® pH 526), Steril Kabin (nüve® MN 090), Etüv (Binder), Çalkalayıcı (Labotron INFORS AG), Tek Kullanımlık Steril Filtre (0,22 µm) (Chromafil® CA-20/25 S), Lam (Surgipath X-tra™ Adhesive 00210), Lamel (Marienfield superior 0101242), Floresan mikroskopu (Olympus BX 50), Kamera sistemi (MicroPublisher 3.3 RTV), Fotoğraflama programı (Qcapture).

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Çözeltiler

1) 10 M PBS (pH: 7.2-7.3): 40 gr NaCl, 1 g KCl, 7,2 g Na₂HP0₄ ve 1,2 g KH₂P0₄ tartıldı. dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik enjeksiyon filtresinden geçirilerek kapaklı steril şişede steril olarak oda sıcaklığında saklandı. Gerekli seyreltmeler için stok çözelti olarak kullanıldı.

2) 1 M HCl: 8,62 ml HCl, 91,39 ml dH₂O ile kapaklı steril cam şişede tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

3) 1 N NaOH: 4 gr NaOH tartılarak 100 ml'ye dH₂O ile kapaklı steril şişede tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı (Ausubel ve ark., 1997).

4) TSB: 6 g TSB tartılarak dH₂O ile 200 ml'ye tamamlandı. 121°C'ta 40 dakika otoklav edildi. +4°C'ta saklandı.

5) TSA: 8 g TSA tartılarak dH₂O ile 200 ml'ye tamamlandı. 121°C'ta 40 dakika otoklav edildi. +4°C'ta saklandı.

6) %16'lık paraformaldehit: 16 g paraformaldehit tartılarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. 60°C'a ısıtıldı ve kenara alındığı zaman şeffaflaşana kadar birkaç damla 1 N NaOH eklendi.

7) Gluteraldehit-paraformaldehit fiksatif: 100 ml % 16'lık paraformaldehite 150 µl %25'lik gluteraldehit eklenerek 100 ml fiksatif hazırlandı.

8) 1 M Tris-HCl: 12.1 g Tris tartılarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı ve 1 N HCl eklenerek pH 8'e ayarlandı.

9) GTE: 500 ml GTE solüsyonu için; 4.95 g glukoz, 1,461 g EDTA tartılarak 487,5 ml dH₂O içinde çözüldü. Çözeltiye 12,5 ml 1 M Tris-HCl eklendi ve pH 8.0'e ayarlandı.

10) Lizozim (2mg/ml): 242,1 mg lizozim tartılarak 2,42 ml GTE içinde çözülerek 100 mg/ml stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden 1 µl alınıp 10 ml GTE içinde çözülerek 10 µg/ml oranında bir lizozim çözeltisi hazırlandı.

11) % 1'lik BSA: 1 g BSA tartılarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.2. Bakterilerin Büyütülmesi

Daha önceki çalışmada (Y.Mater Doktora Tezi) laboratuvarımızda kullanılan *Escherichia coli* JM 109, *E. coli* K92 ATCC 35860 bakteri suşları, *E. coli* K92 ATCC 35860 soyunun kapsül yapısını oluşturan polisialik asitlerin yüzeye eklenmesinden sorumlu olan sialiltransferaz enziminin sentezini sağlayan *neuS* genini taşıyan rekombinant *E. coli* JM 109 pUC19-ST ve *neuS* geninin nokta mutasyonlarını içeren rekombinantlar *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 ve *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 bakterilerine ek olarak Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Uygulama Merkezi (EBİLTEM) tarafından hediye edilen *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 29998, *B. subtilis* ATCC 6634 ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341 bakterileri kullanıldı.

Steril kabinde 2 ml'lik TSB besiyeri içeren kapaklı Schott tüplere laboratuvarımızda kullanılan ve üretilen bakteriler sıvı ortamda üretildikleri için otomatik pipet yardımı ile 100 µl olarak, EBİLTEM'den gelen bakteri örnekleri de katı ortamda büyütüldükleri için bir öze yardımı ile ekildi. Örnekler, 30°C'ta 24 saat 250 rpm'de büyümeye bırakıldılar (Şekil 2.1.). Bakterilerin kendine gelmesi için bu işlem birbirini takip eden günlerde iki kez daha tekrarlandı. Daha sonra tüm bakterilerin TSA besiyerine bir öze yardımı ile çizgi ekimleri yapıldı ve 30°C'ta bir gece inkübe edilerek büyütüldüler.



Şekil 2.1. Büyümeye bırakılan hücrelerin görüntüsü

2.2.3. Floresan Mikroskobu Yöntemleri

Büyütülen örnekler bir damla su ve öze ile adhesive lamlara yayıldılar. Bu lamaların kullanılmasının sebebi yüzeylerinin pozitif (+) yüklü manyetik bir yapıda olması ve böylece immünofloresan protokolü fiksasyon ve işaretleme basamaklarında hücre kaybetme riskini en aza indirmesidir. Lamalar içi % 25'lik gluteraldehit-% 16'lık paraformaldehit fiksatif içeren boyama kabına yerleştirilerek önce 15 dakika oda sıcaklığında sonra 15 dakika buzda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lamalar 1 M PBS pH 7,25 ile yıkandı (<http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/Gluteraldehyde=Paraformaldehyde.pdf>).

Fikse edilmiş örneklerden *B. subtilis* ATCC 6634 ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341'nin üzerine stok lizozim (100 mg/ml) çözeltisinden 20 µl eklenerek 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Diğer örnekler üzerine 10 µg/ml'lik lizozim çözeltisinden 10 µl eklenerek 2-3 dakika oda sıcaklığında beklendi. Daha sonra lamalar 1 M PBS pH 7,25 ile yıkandı. Lamalara bir damla % 1'lik BSA solüsyonundan damlatıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Bu arada birincil antikor (Anti-FtsZ) 200 µl dH₂O içinde çözülde ve 1:500 oranında sulandırılabilmesi için 3 µl alınarak 1,5 ml antikor sulandırıcı ile sulandırıldı. Lamalardan % 1'lik BSA solüsyonunun uçmasını takiben lamalar kurumadan her lama bir damla sulandırılmış birincil antikor eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra lamalar 1 M PBS pH 7,25 içeren boyama kabına daldırılıp yıkandı. İkincil antikor (anti-rabbit Fab') 1:250 oranında sulandırabilmek için 4 µl ikincil antikor 1 ml % 1'lik BSA

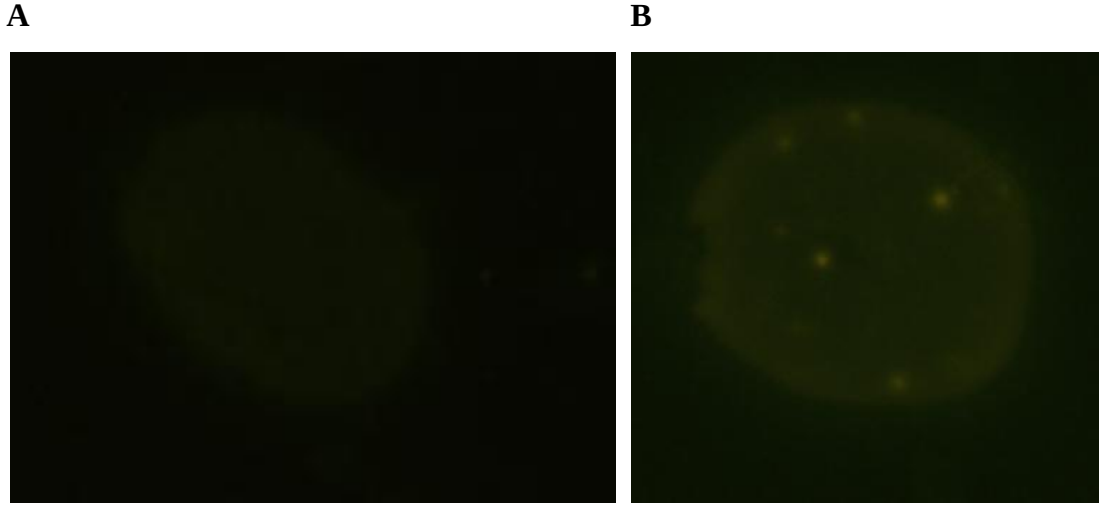
solüsyonu ile sulandırıldı. Lamlara ikincil antikordan bir damla eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık odada inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lamalar 1 M PBS pH 7,25 içeren boyama kabına daldırılıp yıkandı. Lamlara 1 damla kapama solüsyonu eklenerek lamellerle kapatıldı ve alüminyum folyo ile sarılarak daha sonra floresan mikroskopunda incelenmek üzere -20°C 'a kaldırıldı (<http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/IFM-II.pdf>). -20°C 'tan alınan örnekler, floresan mikroskopunda incelenerek kamera sistemi ve fotoğrafıma programı sayesinde görüntüldü.

3. BULGULAR

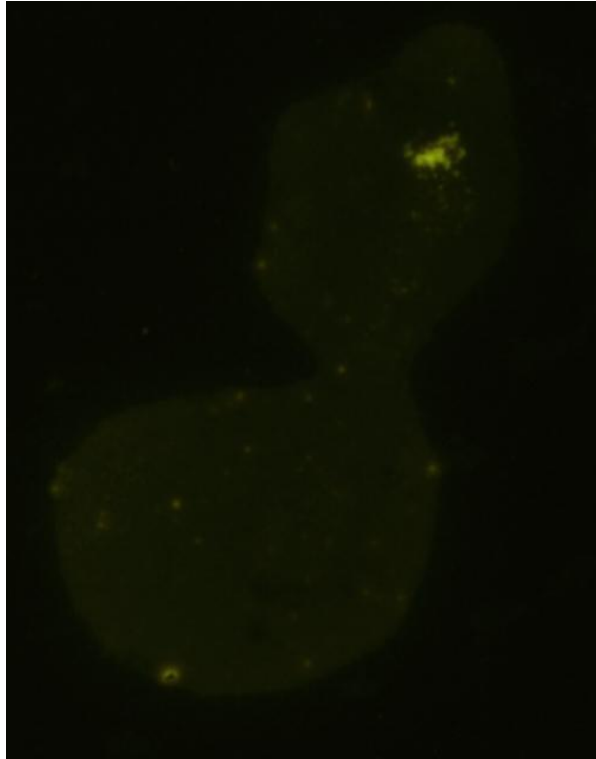
3.1. Floresan Mikroskobu (FM) ile Elde Edilen Bulgular

Uygulama sonucunda daha önceki çalışmada (Y. Mater Doktora Tezi) laboratuvarımızda kullanılan, *E. coli* JM 109, *Escherichia coli* K92 ATCC 35860 bakteri suşları ve bu suşlar kullanılarak oluşturulan, sialiltransferaz yaban tipi genini taşıyan (*E. coli* JM 109 pUC19-ST) ve sialiltransferaz mutant genlerini taşıyan (*E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 ve *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3) 3 rekombinant soy, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Uygulama Merkezinden hediye edilen 4 koleksiyon suşu; *Escherichia coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 29998, *Bacillus subtilis* ATCC 6634 ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341 kullanılmıştır. Bu bakteri örneklerinde ökaryotlardaki tübülünün homoloğu olduğu belirlenen FtsZ'nin işaretlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla FtsZ'ye özgül tavşan antikoru kullanılarak modifiye edilmiş işaretleme yöntemi ile bu malzemeye özgül Alexa Fluor®488 boyası içeren FluoroNanogold™ kullanılarak FtsZ proteini özgün olarak işaretlenmiş ve görüntülenmiştir.

Buna göre *Escherichia coli* JM 109 bakteri örneklerinde özgül antikor uygulanmamış örnekler çalışma için negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1.A). FtsZ antikoru içeren Anti-FtsZ ve Alexa Fluor®488 boyası içeren FluoroNanogold™ ile boyanmış örneklerde sarı-yeşil renkte ışımlar genelde düzgün hücre şekline sahip tüm bakteri içine dağılmış gözlenirken (Şekil 3.1.B), bölünme aşamasındaki hücrelerde bölünmenin ters yönünde birikimler yapmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2.).



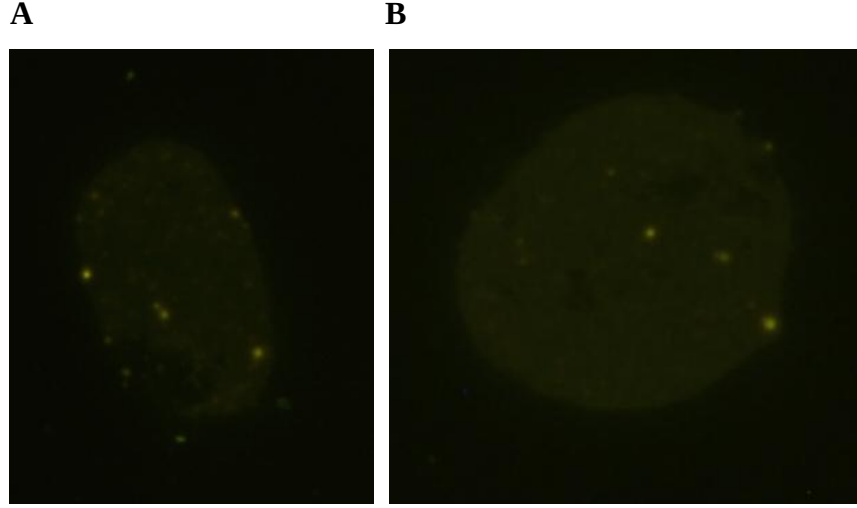
Şekil 3.1. *Escherichia coli* JM 109 hücrelerinin FM mikrografları **A.** Antikor uygulanmamış negatif (-) kontrol. **B.** Antikor uygulanmış örnek X400.



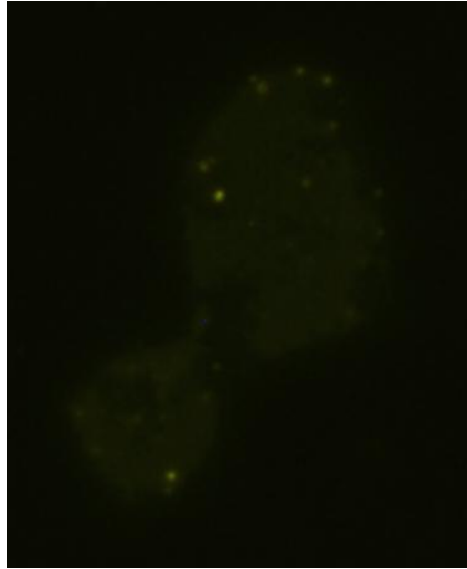
Şekil 3.2. *Escherichia coli* JM 109 hücrelerinin bölünme aşamasındaki FM mikrografları X400.

Escherichia coli K92 ATCC 35860 örneklerinde özgül bağlanmış antikor kokobasil formundaki bakteride hücre içine dağılmış, küçük ve bir arada, daha büyük partiküller halinde görülmektedir. Buna ek olarak zaman zaman hücre zarına bağlandığı gözlenmektedir (Şekil 3.3.A). FtsZ proteininin hücre zarına bağlı olduğu

noktalarda hücre zarının dışarıya doğru hafif bombe yapması (Şekil 3.3.B) ve hücre bölünmesi aşamasında, bölünmenin ters yönünde hücre sitoplazmasında ve zarında daha fazla protein bulunması (Şekil 3.4.) dikkat çekici görülmektedir.



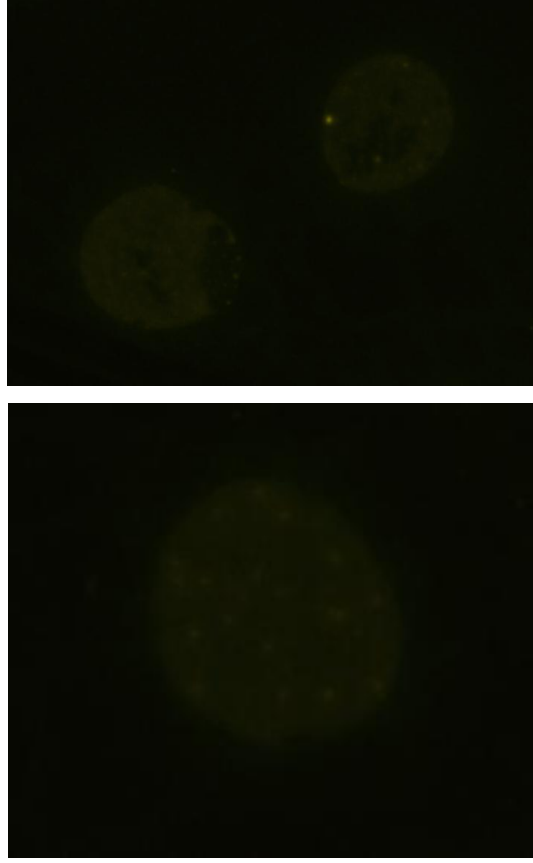
Şekil 3.3 *Escherichia coli* K92 ATCC 35860 hücrelerinin FM mikrografları X400.



Şekil 3.4. *Escherichia coli* K92 ATCC 35860 bölünme aşamasındaki hücrelerinin FM mikrografları X400.

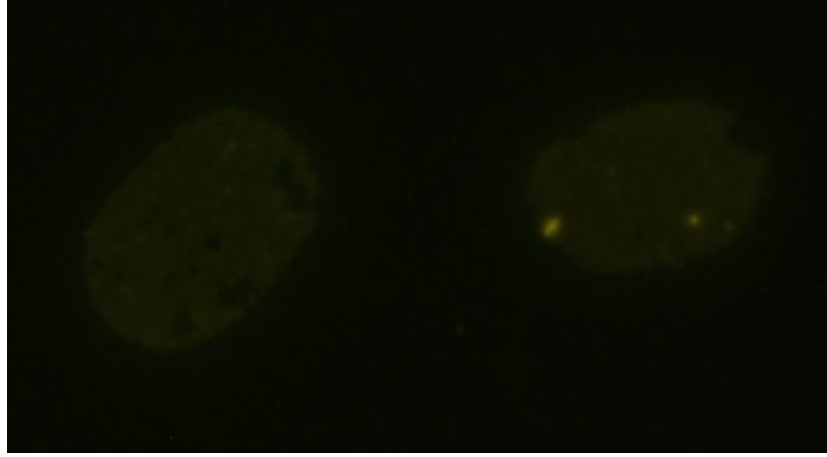
Laboratuvarımızda oluşturulan yaban tipi sialiltransferaz geni taşıyan *E. coli* JM 109 pUC19-ST suşları ise bu boyamada yukarıdaki diğer *E. coli* örneklerine

benzer sonuçlar gösterdi. İşaretli FtsZ proteini bakteri sitoplazmasında ve zarında dağınık bir şekilde görüldü (Şekil 3.5.).

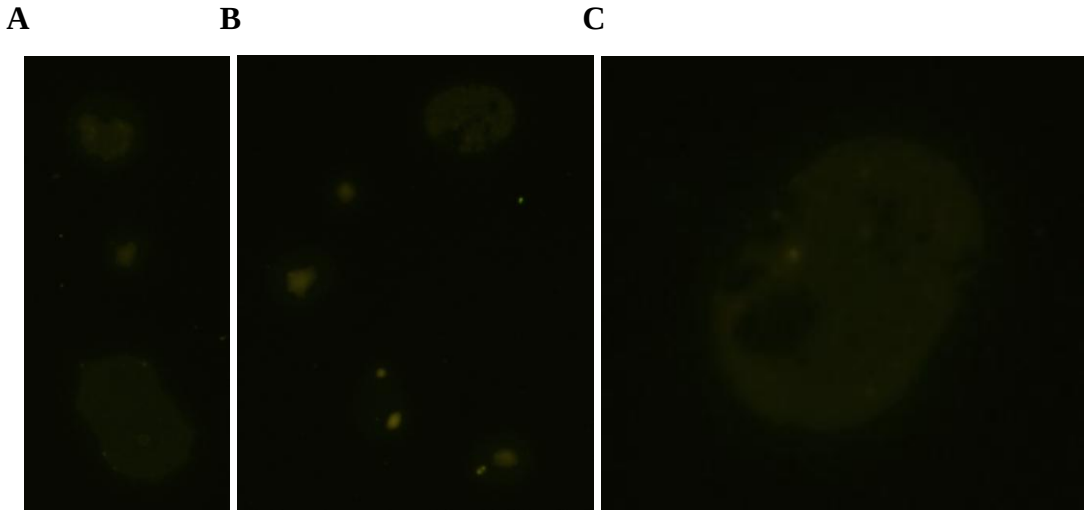


Şekil 3.5. *Escherichia coli* JM 109 pUC19-ST hücrelerinin FM mikrografları X400.

Laboratuvarımızda oluşturulan mutant tip sialiltransferaz geni taşıyan *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 suşları ise daha önce yapılmış çalışmamızda şekil bozuklukları ve vakuoller yapılar göstermişti (Y. Mater Doktora Tezi). Bu çalışmada da diğer *E. coli* örneklerinden farklı olarak ama daha önceki bildirimine uygun bir hücre şekli bozukluğu ve hücre içinde vakuoller yapı gösterdi. Zaman zaman dairesel hücre formu içinde görülen küçük birikimler (Şekil 3.6.), hücresel şekil bozukluğu (Şekil 3.7.A) ve içinde vakuol olan hücrelerde sitoplazmada düzensiz dağılmış ve/veya hücre merkezinde birikmiş FtsZ proteinine bağlı ışımlar görüldü (Şekil 3.7.B,C).

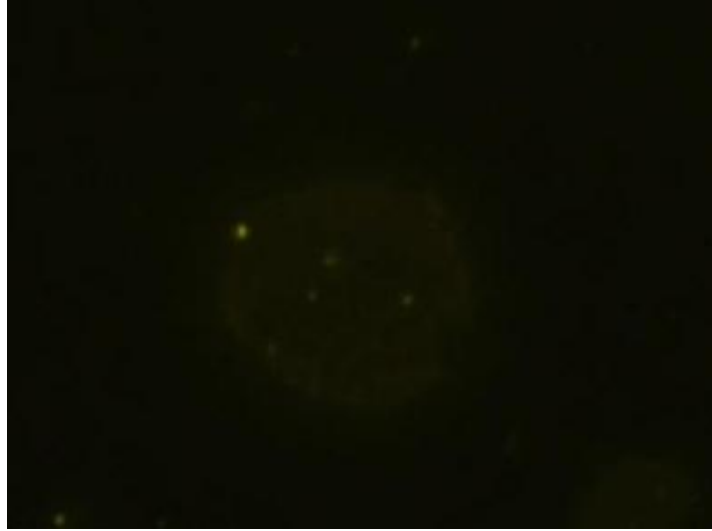


Şekil 3.6 *Escherichia coli* JM 109 pUC19-ST M2 hücrelerinin FM mikrografları X400.



Şekil 3.7. *Escherichia coli* JM 109 pUC19-ST M2 hücrelerinin FM mikrografları. **A.** Şekil bozuklukları birikimler **B.** ve **C.** Birikimler ve vakuoller yapılar X400.

Laboratuvarımızda oluşturulan mutant tip sialiltransferaz geni taşıyan bir diğer mutant rekombinant suş *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 ise daha önce yapılan bir çalışmada mezozom benzeri yapılar ve ipliksi birikintiler göstermişti (Y. Mater Doktora Tezi). Bu boyama sonucunda hücrelerde şekil bozuklukları görüldü (Şekil 3.8.). FtsZ'nin dağılımında da bir önceki mutant örneğe benzer şekilde hücre merkezinde birikimler olduğu gözlemlendi (Şekil 3.9.). Diğer bir değişle FtsZ proteininin dağılımının düzensiz olması dikkat çekici bulundu.

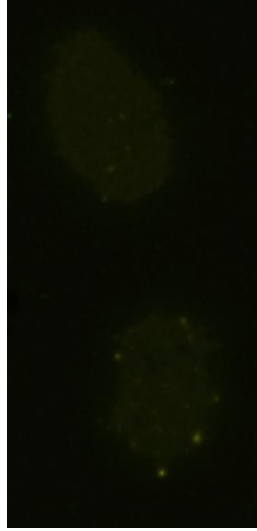


Şekil 3.8. *Escherichia coli* JM 109 pUC19-ST M3 hücrelerinin normal FtsZ dağılımına ait FM mikrografi X400.



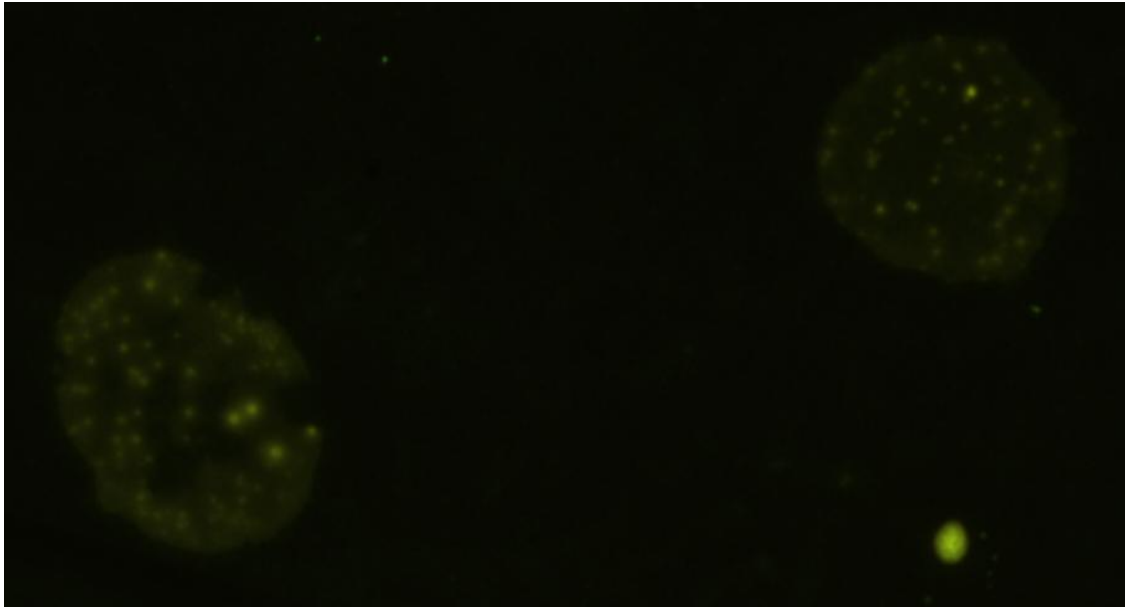
Şekil 3.9. *Escherichia coli* JM 109 pUC19-ST M3 hücrelerinin anormal FtsZ dağılımına ait hücre içi birikimler içeren FM mikrografi X400.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer koleksiyon suşu *E. coli* ATCC 8739’da ise FtsZ, bakteri sitoplazmasında ve hücre zarında dağınık bir şekilde görüldü (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. *Escherichia coli* ATCC 8739 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografı X400.

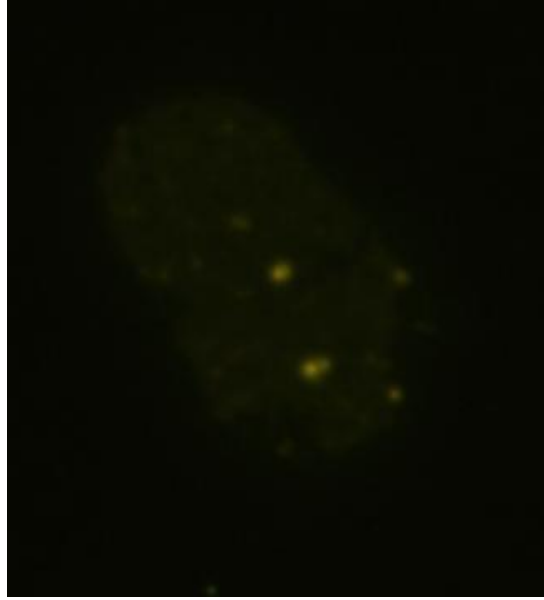
Çalıştığımız son *E. coli* koleksiyon suşu *E. coli* ATCC 29998 diğer tüm *E. coli* suşlarından daha fazla miktarda FtsZ ışıması gösterdi. Bu bakteri suşunda da diğer bakteri örneklerinde olduğu gibi ışıma, hücre sitoplazmasına dağılmış ve zaman zaman hücre zarına bağlanmış bir şekilde görüldü (Şekil 3.11.).



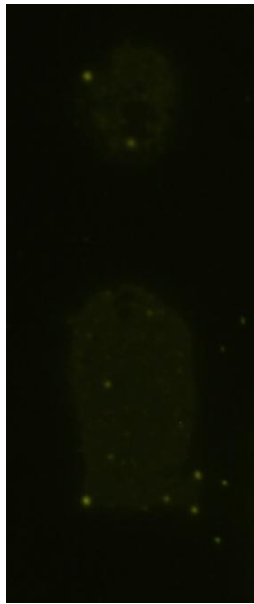
Şekil 3.11. *Escherichia coli* ATCC 29998 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografı X400.

Bacillus subtilis ATCC 6634 suşunda diğer bakteri örneklerinde olduğu gibi ışıma, hücre sitoplazmasında dağılmış ve zaman zaman zara bağlanmış bir şekilde

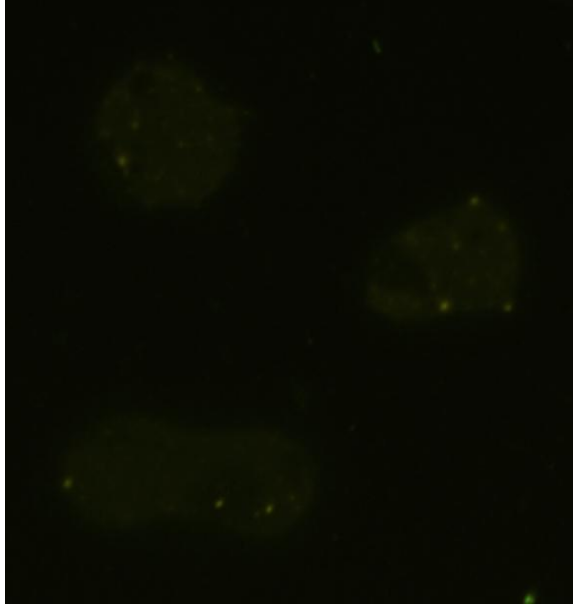
gözlendi (Şekil 3.12.). Bununla beraber FtsZ proteinine bağlı ışımaya miktarı diğer kok-kokobasil örneklerine göre daha az görüldü. Bu bulgu basil şekilli örneklerde daha az miktarda FtsZ proteini olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak ucundan patlamış bir hücrede proteinlerin hücre dışına çıkışı (Şekil 3.13.) ve bölünmeye hazırlanan bir basil hücresinde proteinlerin kutuplara doğru gidişi de (Şekil 3.14.) benzer boyama sonucunda gözlenmiştir.



Şekil 3.12. *Bacillus subtilis* ATCC 6634 hücrelerinin FtsZ dağılımına ait FM mikrografı X400.

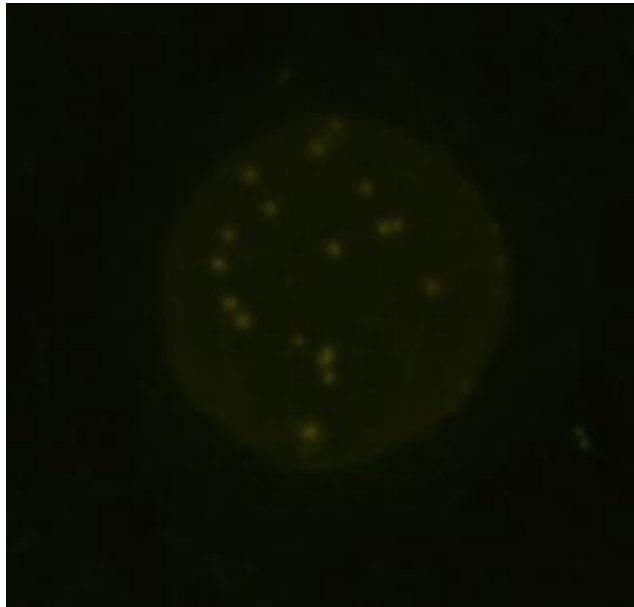


Şekil 3.13 *Bacillus subtilis* ATCC 6634 patlamış hücrelerinin FtsZ proteinlerinin hücre dışına çıkışına ait FM mikrografı X400.

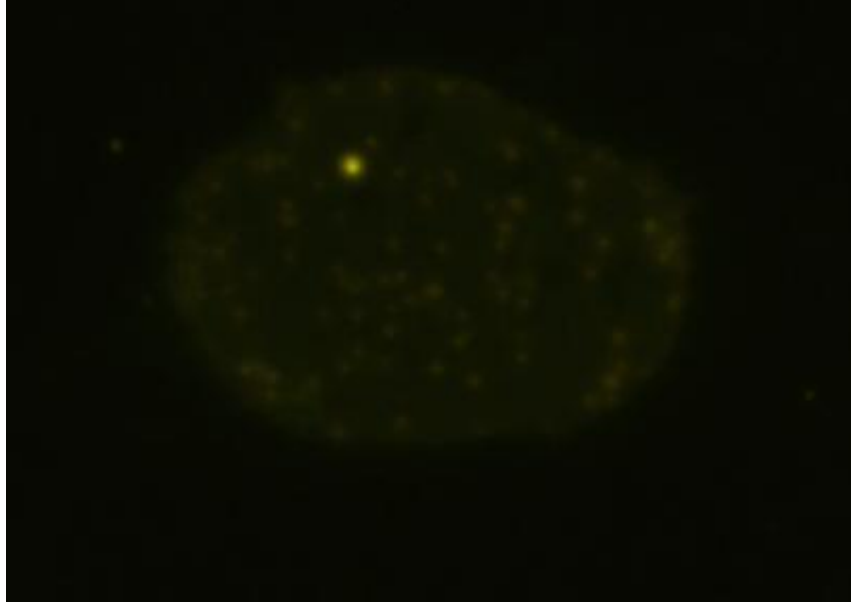


Şekil 3.14. Bölünmeye hazırlanan bir *Bacillus subtilis* ATCC 6634 hücresinde FtsZ proteinlerinin kutuplara doğru gidişine ait FM mikrografi X400.

Micrococcus luteus ATCC 9341 bakterisinde de, diğer örneklerde olduğu gibi, FtsZ proteinini işaret eden ışıma sitoplazmada dağılmış ve zaman zaman zara bağlanmış bir şekilde görüldü (Şekil 3.15.). Buna ek olarak diğer tüm örneklerden daha fazla miktarda FtsZ proteini ışıması gözlemlendi. *M. luteus* ATCC 9341 hücresinde FtsZ proteinlerinin kutuplarda ve zara yakın olarak birikmesi, hücrenin kok şeklini kaybetmesi ve bölünme aşamasına geçtiğinin bir göstergesi olarak dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 3.16.).



Şekil 3.15 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 hücrelerinin FtsZ proteinlerine ait FM mikrografi X400.



Şekil 3.16. Bölünmeye hazırlanan bir *Micrococcus luteus* ATCC 9341 hücresinde FtsZ proteinlerinin kutuplara doğru gidişine ait FM mikrografı X400.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ökaryotik hücresel sistemler şekillerini koruyabilmek, dış etkenlerden korunabilmek, bölünme gibi hayati işlevleri yerine getirmek ve hücre içi trafiği yönlendirmek için iskelet sistemi diye adlandırılan, hem hücre kararlılığı/morfolojisi, hem de hücre dinamiği yönünden anahtar elemanlar olan filament şekilli bir sınıf proteini içerir. Hücre iskelet elemanları, gerçekleştirdikleri göreve göre oldukça dinamik veya statik olabilen önemli yapılar oluştururlar (Graumann, 2007).

Ökaryotik hücreler, hücre iskeletini oluşturan üç değişik filament sistemi bulundurur. Bu üç filament çaplarına göre: kalın mikrotübüller (25 nm), ince aktin filamentleri (7 nm) ve ara filamentler (IF) (10-12 nm) olarak adlandırılırlar (Alberts ve ark., 2002; Lutkenhaus, 2003). Prokaryotlarda ise iyi tanımlanmış karmaşık bir hücre iskeletinin varlığı bulunamamıştır (Mayer, 2003). Uzun yıllar ökaryotlar için vazgeçilmez olan hücre iskeletinin eksikliği, prokaryotların tanımlayıcı özelliklerinden biri olarak kabul edilmiştir (van den Ent ve ark., 2001). İlk olarak, Bi ve Lutkenhaus (1991), elektron mikroskobu ile tübülün homoloğu, filamentleşen ısıya duyarlı protein Z'nin (FtsZ) bölünme alanında bir halka yapısı oluşturduğunu göstermişlerdir (Bi ve Lutkenhaus, 1991). Böylece prokaryotlar için yeni bir dönem başlamıştır. Bu zamandan sonra, bakteri hücrelerinin içinin büyük sayıda organize hücre iskeletine ait atasal proteinleri içerdiği fark edilmeye başlanmıştır (Shih ve Rothfield, 2006). Aequorin ve yeşil floresan proteininin (GFP) keşfedilmesi ve immünofloresanın kullanılabilmesi, bakteriyel hücre bölünmesi araştırmalarını oldukça değiştirmiştir (Brooks, 2005; Buddelmeijer ve Beckwith, 2002). Floresan görüntüleme tekniklerinin kullanılması bakterilerde geniş ve karmaşık bir iç organizasyonun varlığını göstermiştir (Møller-Jensen ve Löwe, 2005). Bu sayede, ilk kez, 2001'de Jones ve arkadaşları GFP kullanarak *Bacillus subtilis*'te bakteriyel aktin homologlarının, hücre şekli düzenlenmesinde anahtar roller oynayan, uzun sarmal yapılar halinde organize olduklarını göstermişlerdir (Jones ve ark., 2001).

Ökaryotik ve prokaryotik hücre iskelet sistemleri arasında en önemli farklılık prokaryotlara özel en azından bir temel bakteriyel hücre iskeleti elemanı grubunun (MinD/ParA grubu) varolduğunun bulunması ve analog fonksiyonların, sıklıkla,

ökaryot ve prokaryotlarda farklı hücre iskelet sınıfları tarafından ve çoğu kez farklı mekanizmalar kullanılarak gerçekleştirildiğinin bulunmasını içerir (Carballido-López, 2006; Grauman, 2007; Lewis, 2004; Shih ve Rothfield, 2006). Bakteriyel hücre iskelet yapıları, hücre içinde uzun menzilli düzenlemeler gösteren ve kendi kendilerine, *in vitro* da, uzun polimerik yapılar halinde birleşebilen tek bir sınıf proteinin polimerlerine dayanan, filament halindeki yapılar olarak tanımlanabilir (Shih ve Rothfield, 2006).

Tübülün hücre iskeleti, ökaryotik hücrelerin bölünme düzlemini belirlemede önemli bir rol oynar ve tübülün homoloğu olan FtsZ, bakterilerde bölünme düzlemini belirler (Margolin, 1998; van den Ent ve ark., 2001). FtsZ, çoğu bakteride temel bir hücre bölünmesi proteindir. Bölünme makinesinin hücre ortasına yönelen bilinen ilk elemanıdır ve bütün bölünme proteinlerinin lokalizasyonu FtsZ'ye bağlıdır. Bi ve Lutkenhaus (1991), bölünmeyen hücrelerin sitoplazmasında FtsZ proteinlerinin tek tip küçük parçacıklar olarak dağıldığını, ancak bölünmenin başlamasından hemen önce, FtsZ proteininin bölünme bölgesindeki bir halkada yoğunlaştığını, septumun içe bükülen ucunda bulunduğunu göstermişlerdir (Bi ve Lutkenhaus, 1991). Benzer şekilde immünofloresan mikroskobunun kullanılması ile FtsZ'nin, daha hücre belirgin bir içe bükülme göstermezken bile, hücre ortasında bir halka oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır (Addinall ve Lutkenhaus, 1996; Graumann, 2007). Septal invajinasyon ilerlerken FtsZ, içeri büyüyen septumun iç ucuna bağlı kalmasına rağmen, kasılma işleminde doğrudan bir rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir (Shih ve Rothfield, 2006). Daha sonra FtsZ, başka hücre bölünmesi proteinleri ile ilişki içinde, septal PG sentezi ile eş zamanlı olarak, hücreyi bölmek ve iki yeni yavru hücre oluşturmak üzere daralır (Lewis, 2004). Floresan teknikleri FtsZ'nin hücrede polimerler oluşturduğunu açıkça göstermiştir; fakat FtsZ polimerleri hiçbir zaman bakterilerin işaretlenen ince kesitlerinde elektron mikroskobu ile gösterilememiştir (Margolin, 1998). Stricker ve arkadaşlarının çalışmaları (2002), hücredeki FtsZ'lerin sadece %30'unun Z-halkasına dahil olduğunu göstermiştir. FtsZ'lerin geri kalanı, muhtemelen serbest sitoplazmik alt üniteler veya küçük bileşikler olarak hücre boyunca dağılmıştır. Bu sonuçlar, herhangi bir zamanda, halka içine girmeye hazır büyük bir FtsZ havuzu bulunduğu anlamına gelmektedir. Aynı çalışmada, Z-halkasının, ortalama altı ile yedi protofilament kalınlığında

olduğu ileri sürülmüştür. Bu da Z-halkasının ince kesit elektron mikroskopunda neden hiçbir zaman görülemediğini açıklar (Stricker ve ark., 2002).

Yukarıda literatür bilgisinde verilen GFP ile yapılan çalışmalardan farklı olarak bu tez çalışması kapsamında bakteriyel hücre iskelet yapısına ait FtsZ proteinlerinin tanıma-tutunma mekanizmasına dayalı olarak özgül immünofloresan ile işaretlenmesi, belirlenmesi ve bunun mikroskopik olarak gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla literatür taraması ile özgül bir antikör araştırılmıştır. Araştırma sonucu, FtsZ'ye özgül bir Western blot antikoru olan Anti-FtsZ'ye (Agrisera) ulaşılmıştır. Şimdiye kadar floresan mikroskopunda bu amaçla kullanılmamış ürün, özgül bir immünofloresan boyama prosedürü oluşturularak kullanılmıştır. FtsZ proteinine özgül immünofloresan işaretleme yöntemi başarı ile uygulanmıştır. Yapılan çalışmada *E. coli* JM 109 negatif örneği ile karşılaştırıldığında (Şekil 3.1.A), *E. coli* JM 109 pozitif örneği de (Şekil 3.1.B) dahil olmak üzere işaretlemelerimiz, *Escherichia coli* K92 ATCC 35860 (Şekil 3.3.A ve B), *E. coli* JM 109 pUC19-ST (Şekil 3.5.), *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 (Şekil 3.6.), *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 (Şekil 3.8.), *E. coli* ATCC 8739 (Şekil 3.10.), *E. coli* ATCC 29998 (Şekil 3.11.), *Bacillus subtilis* ATCC 6634 (Şekil 3.12.) ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341'i de (Şekil 3.15.) içeren tüm örneklerimizde özgül bağlanma başarılı olmuş ve gösterilmiştir. Mikrograflarda özgül işaretli FtsZ proteini hücre içine dağılmış ve zaman zaman da hücre zarına tutunmuş olarak görülmüştür. Bu sonuç, bölünme durumunda olmayan hücrelerde FtsZ'lerin serbest sitoplazmik alt üniteler veya küçük bileşikler olarak hücre boyunca dağıldığını ve hücrede herhangi bir zamanda, halka içine girmeye hazır büyük bir FtsZ havuzu bulunduğuna dair Stricker ve arkadaşlarının (2002) çalışmasını desteklemekte ve doğrulamaktadır (Stricker ve ark., 2002). Aynı zamanda bu veriler Klint ve arkadaşlarının (2005) siyanobakteri hücrelerinin sitoplazmasında FtsZ bulunması sonucunu da destekler. Aynı çalışmada FtsZ'nin siyanobakteride ikili bir görevi olduğu bildirilmiştir. Bu fikir, FtsZ proteininin ayrı bir kısmı vejetatif hücrelerin sitoplazmasında sürekli bulunduğu ve hücre iskeleti rolü gördüğü düşüncesi ve bölünmede görev aldığı verisi ile araştırmacı tarafından desteklenmiştir. FtsZ'nin, hücre farklılaşma yetisi olan filamentöz siyanobakteri dahil prokaryotlar arasında korunmuş bir görevi olduğunu ve muhtemelen bir de hücre iskeleti bileşeni olarak sitoplazmada da görev aldığını göstermişlerdir (Klint ve ark., 2005). Bizim sonuçlarımızda da farklı şekillere sahip

bakterilerde özgül işaretli FtsZ proteini sitoplazmada dağınık bulunmakta ve siyanobakteriler ile yapılan bu çalışmayı desteklemektedir.

Hücre sitoplazmasında yer alan FtsZ miktarının değişken olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalarda kok şekilli, MreB'siz hücrelerin normal çomak şekilli hücrelerden daha büyük bir çapa sahip olması nedeni ile Z-halkasını tamamlamak için daha fazla FtsZ'ye ihtiyaç duydukları bildirilmiştir. Aynı çalışmada yuvarlak şekilli MreB'siz anormal *B. subtilis* hücrelerinin sıklıkla tamamlanmamış Z-halkalarına sahip olduğunu görmüştür. FtsZ'nin fazla üretimi, bu nedenle, bu hücrelerin hücre bölünmesini devam ettirmelerini sağlamış ve anormal hücre şekline rağmen yavaş da olsa çoğalmalarına izin vermiştir (Kruse ve ark., 2005). Buna rağmen, *Caulobacter crescentus*'da yapılan bir diğer çalışmada bölünme düzlemi ve MreB halkalarının oluşumu FtsZ varlığı ve miktarına bağlı bulunmuştur (Carballido-López, 2006). Bizim tez çalışmamızda da kok-kokobasil, basil ve kok formunda bakteriler kullanılarak hücre morfolojisi ile FtsZ proteini ilişkisi irdelenmiş ve farklı morfolojilerde bakterilerin sitoplazmalarında yer alan özgül işaretli FtsZ protein miktarına göre karşılaştırılması mümkün olmuştur. Genel olarak bakıldığında kok formunda bir bakteri olan *Micrococcus luteus* ATCC 9341'in (Şekil 3.16.); kokobasil formundaki *Escherichia coli* JM 109 (Şekil 3.1.B), *E. coli* K92 ATCC 35860 (Şekil 3.3.A ve B), *E. coli* JM 109 pUC19-ST (Şekil 3.5.), *E. coli* ATCC 8739 (Şekil 3.10.), *E. coli* ATCC 29998'den (Şekil 3.11.) daha fazla FtsZ proteini içerdiği gözlenmiştir. Benzer şekilde basil formundaki *Bacillus subtilis* ATCC 6634 (Şekil 3.12.) bakterilerinin kokobasil formundaki bakterilerden daha az, kok formundaki bakteriden ise çok daha az FtsZ proteini içerdiği, ışımalara bakarak gözlenebilmektedir. Bu sonuç bölünme halkası oluşumunda morfolojiye bağlı çapın önemini irdelleyen yukarıda adı geçen referansları desteklemektedir.

FtsZ halkası, *C. crescentus*'ta hücre duvarı uzamasının ciddi bir bölümünü yönlendirir ve bu da FtsZ halkasına hücre bölünmesi ile ilişkili olmayan yeni bir fonksiyon ekler. FtsZ, temel lipid II peptidoglikan (PG) hücre duvarı prekürsörünü üreten MurG proteinin yerleşimini düzlemsel olarak düzenleyerek hücre uzamasında temel bir rol oynar, çünkü hücre uzaması sırasında MurG, FtsZ halkası ile birlikte yerleşir (Aaron ve ark., 2007; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007). Hücre uzaması, kutuplar dışında yanıl duvarlar boyunca, varolan polimere yeni PG materyalinin

dağınık sarmal halde girmesi ile meydana geldiği düşünülmekteyken, hücre bölünmesi, bölünme alanında lokalize olmuş PG sentezi ile ilerler (Aaron ve ark., 2007; de Pedro ve ark., 1997). FtsZ'nin hücre bölünmesi sırasında septal PG büyümesini yönlendirme rolü de Pedro ve arkadaşları (1997) tarafından *E. coli* için geliştirilen D-sistein metodu ile oldukça iyi belgelenmiştir. Hücre bölünmesinin başlangıcında potansiyel bölünme bölgelerinde murein sentezinin FtsZ'ye bağımlı bir aktivasyonu vardır (de Pedro ve ark., 1997). Diğer bir deyişle FtsZ proteinleri zar ve zar metabolizmasında görev alan bileşen ve enzim sistemlerinden etkilenmektedir. Bu veri FtsZ'nin bir noktada çekirdekleşip sonra bir yay olarak polimerize olduğunun gözüktüğü *E. coli*'nin küresel bir mutanlığı üzerine Addinall ve Lutkenhaus (1996) tarafından yapılan çalışmayı güçlü bir şekilde desteklemektedir (Addinall ve Lutkenhaus, 1996). Yaptığımız bu tez çalışmasına da temel oluşturan bir önceki çalışmada (Y. Mater Doktora Tezi) sialik asit transferinde görev alan sialiltransferaz mutant genlerini taşıyan *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 ve *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 hücrelerinde görülen hücre şekli ve zar şekli bozuklukları, hücre içinde vakuoller oluşumlar ve mezozom benzeri birikintiler ökaryotlardaki hücre iskeleti stres fibrilleri birikimlerine benzerlik göstermiştir. Bu hücrelerle yaptığımız immünofloresan çalışmada *E. coli* JM 109 pUC19-ST M2 (Şekil 3.7.A,B,C) ve *E. coli* JM 109 pUC19-ST M3 (Şekil 3.9.) benzer hücre morfolojisi bozuklukları göstermişlerdir. Buna ek olarak yukarıdaki literatürlerde bildirildiği gibi FtsZ proteini, hücre merkezinde bir birikme ve yığılma sergilemiştir. Hücrelerde görülen şekil bozuklukları da FtsZ proteini yığılması ve/veya dağılımıyla ilgili olabilir. Bu sonuç, bakterilerde PG sentezi, murein sentezinde FtsZ ile yapılan de Pedro ve arkadaşlarının (1997) sonuçlarını ve sialiltransferaz enzimi-hücre zarı ilişkisine yönelik Mater (2004) doktora tezi sonuçlarını desteklemektedir. Sağlıklı *Escherichia coli* K92 ATCC 35860 (Şekil 3.3.B) hücrelerinde zara bağlı toplanmış FtsZ proteininin dışarı doğru bombe yapmış olması FtsZ'nin hücre uzamasında MurG proteininin yerleşimini düzenleyerek şekil üzerine etkisini destekler (Aaron ve ark., 2007; Pichoff ve Lutkenhaus, 2007; de Pedro ve ark., 1997). Buna ek olarak referanslarda bildirilenlerin tersine *E. coli* K92 ATCC 35860'ın (Şekil 3.4.), *E. coli* JM 109'un (Şekil 3.2.), *Bacillus subtilis* ATCC 6634'ün (Şekil 3.14.) bölünme aşamasında ve *Micrococcus luteus* ATCC 9341'in (Şekil 3.16.) bölünme öncesi uzamasında FtsZ proteinlerinin sitoplazmada ve hücrenin kutuplarında yoğunlaştığı ve hücre şeklini sanki iki uçtan çekercesine uzattığı görülmektedir. Benzer şekilde

patlamış *Bacillus subtilis* ATCC 6634 (Şekil 3.13.) hücrelerinden yayılan materyal içinde FtsZ miktarı fazladır. Bu FtsZ proteinlerinin hücre zarının şeklini korumasında etkili olduğunu düşündürmekte ve bu konuya yönelik yukarıda adı geçen literatürlerle uyumlu görülmektedir.

Bölünme alanında, Z-halkasını oluşturmaya ilaveten, FtsZ, hücre iskelet proteinleri MreB, Mbl, MreBH ve MinD tarafından oluşturulan sarmal yapılara benzeyen, hücrenin uzun eksenine çevresine sarılan geçici sarmal dizileri oluşturur (Nanninga, 1998; Shih ve Rothfield, 2006). *E. coli*'de Z-halkası oluşumunun yerinin belirlenmesinde iki temel negatif düzenleyici vardır: nükleoid ve min sistemi. Min sistemi proteinleri tarafından Z-halkası oluşumu, sonradan septum oluşumu için istenen bölgede kısıtlanır; şöyle ki, MinC hücre kutuplarına yakın FtsZ polimerleşmesini engeller (Amos ve ark., 2004; Errington ve ark., 2003; Graumann, 2004; Löwe ve ark., 2004; Margolin, 2000; Norris ve ark., 2004). Nükleoid ise bölünme işlemi için fiziksel bir engel teşkil eder (Nanninga, 1998). Nükleoid oklüzyon, nükleoidler boyunca bölünmeyi engeller ve bölünmeyi, normalde, ayrılan nükleoidler arasındaki hücre ortası bölgeye veya kutup bölgesine yönlendirir (Errington ve ark., 2003; Lafontaine ve ark., 2007). Z-halkası, orta hücrede oluşmak yerine, ayrılmamış nükleoid kütlelerinin kenarlarında da oluşur. Orta hücredeki birincil bölgenin bloke olduğu durumlarda bu bölge, FtsZ oluşumu için uygun bölgedir (Sun ve Margolin, 2001). Sporulasyona yönelik yapılan bir çalışmada benzer asimetric bölünmede hücre ortası halkasının kaybolmasını takiben, yeni Z-halkalarının her iki kutupta da görüldüğünü, FtsZ-GFP füzyonu kullanarak Ben-Yehuda ve Losick (2002) göstermiştir (Ben-Yehuda ve Losick, 2002). Bizim çalışmamızda bölünme aşamasında kok-kokobasil şekline sahip *E. coli* K92 ATCC 35860 (Şekil 3.4.) ve *E. coli* JM 109 (Şekil 3.2.), basil şekline sahip *Bacillus subtilis* ATCC 6634 (Şekil 3.14.) ve kok şekline sahip *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (Şekil 3.16.) örneklerinde; daha önce özgül yeşil-sarı floresan işaretli FtsZ proteinleri ile yapılan çalışmalarda (Amos ve ark., 2004; Errington ve ark., 2003; Graumann, 2004; Löwe ve ark., 2004; Margolin, 2000; Norris ve ark., 2004) bildirilenlerin tersine FtsZ proteininin bölünme aşamasında boğumlanma alanında değil, boğumlanmanın ters yönünde özellikle hücre kutuplarında ve sitoplazmada yoğunlaştığı görülmüştür. Bu bulgu daha çok spor oluşturan bakterilerde FtsZ'nin kutuplarda bulunduğunu

belirleyen çalışmaya (Ben-Yehuda ve Losick, 2002) benzerlik göstermiştir ve çok dikkat çekici bulunmuştur.

Elde edilen sonuçları özetlersek; bu tez çalışmasında; örnekler özgün FtsZ antijeni kullanılarak işaretlenmiştir. İlk kez üç farklı bakteriyal hücre şekline sahip bakteride ve karşılaştırmalı olarak bu işaretleme yapılmıştır. İşaretleme protokolü bir Western blot antikoru olan Anti-FtsZ antikoru ile P.A. Levin protokollerinden (<http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/Glutaraldehyde=Paraformaldehyde.pdf>, <http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/IFM-II.pdf>) modifiye edilerek oluşturulmuş, özgün bir immünofloresan çalışma protokolüdür ve ilk kez uygulanmıştır. Böylece hızlı sonuç veren, özgün bir işaretleme yöntemi geliştirilmiştir. Bu sayede prokaryotlarda, hücre iskeleti çalışmalarında, FtsZ proteinine özgül immünofloresan işaretlemede, farklı morfolojilere sahip hücrelerde kolayca uygulanabilecek bir yöntem oluşturulmuştur. FtsZ proteini genel olarak her üç hücre formunda sitoplazmada dağılmış halde ve zaman zaman hücre zarına bağlı olarak bulunmuştur. Hücre şeklinin korunmasında görevli olduğu gözlenmiştir. Tüm bu bilgiler kısmen ve/veya tamamen referanslar ile desteklenmiş ve uyumlu görülmüştür. Buna ek olarak elimizdeki bazı referansların tersine özgül antikorla işaretli FtsZ proteini bölünme aşamasında bölünme halkasında veya boğumlanma bölgesinde değil, boğumlanma, bölünme bölgesinin tam ters yönünde hücrenin kutuplarında, hücre zarına bağlı ve/veya hücre sitoplazmasında küçük birikintiler halinde gözlenmiştir.

Yapılan çalışma, hücre zarı tanıma-tutunma mekanizmasında rol oynayan sialik asit transferaz (sialiltransferaz) mutant hücrelerde düzensiz dağılımlar göstermesi nedeni ile FtsZ proteini ve sialik asit metabolizması arasında bir etkileşim olabileceği düşüncesini desteklemiştir. FtsZ ve/veya benzeri proteinler ile hücrede sialiltransferaz etkinliği ya da bozulmuş etkinliğine bağlı yapılanma arasındaki bağlantının belirlenmesi amacıyla ileriye yönelik çalışmalara, hücre zarı ve hücre şekli arasındaki bağlantılara yönelik çalışmalara, sadece bakterilerde bulunan ve özgül bir hücre iskelet elemanı proteinleri olan MinD/ParA sistemi çalışmalarına öncülük edebilir.

KAYNAKLAR

1. Aaron, M., Charbon, G., Lam, H., Schwarz, H., Vollmer, W. and Jacobs-Wagner, C. 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. Mol Microbiol. 64(4):938-52.
2. Addinall, S.G. and Lutkenhaus, J. 1996. FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 22(2):231-7.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th Ed., Garland Publishing, New York.
4. Amos, L.A., van den Ent, F. and Löwe, J. 2004. Structural/functional homology between the bacterial and eukaryotic cytoskeletons. Curr Opin Cell Biol. 16(1):24-31.
5. Ausmees, N. 2006. Intermediate filament-like cytoskeleton of *Caulobacter crescentus*. J Mol Microbiol Biotechnol. 11(3-5):152-8.
6. Ausmees, N., Kuhn, J.R. and Jacobs-Wagner, C. 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. Cell. 115(6):705-13.
7. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1997. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Ed., John Wiley & Sons Inc., Canada.
8. Ben-Yehuda, S. and Losick, R. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. Cell. 109(2):257-66.
9. Beveridge, T.J. 2006. Understanding the shapes of bacteria just got more complicated. Mol Microbiol. 62(1):1-4.
10. Bi, E.F. and Lutkenhaus, J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature. 354(6349):161-4.
11. Brooks S. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. Journal of Microscopy. Vol. 217. 1-2.
12. Buddelmeijer, N. and Beckwith, J. 2002. Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. Curr Opin Microbiol. 5(6):553-7.

13. Carballido-López, R. 2006. The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(4):888-909.
14. Carballido-López, R. and Errington, J. 2003. A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13(11):577-83.
15. de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Høltje, J.V. and Schwarz, H. 1997. Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179(9):2823-34.
16. Erickson, H.P. 1995. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell.* 80(3):367-70.
17. Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A. and Bramhill, D. 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):519-23.
18. Errington, J., Daniel, R.A. and Scheffers, D.J. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(1):52-65.
19. Fu, X., Shih, Y.L., Zhang, Y. and Rothfield, L.I. 2001. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(3):980-5.
20. Graumann PL. 2004. Cytoskeletal elements in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 7(6):565-71.
21. Graumann, P.L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 61:589-618.
22. Gueiros-Filho, F.J. and Losick, R. 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16(19):2544-56.
23. <http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/Gluterldehyde=Paraformaldehyde.pdf>.
24. <http://www.biology.wustl.edu/levin/protocols/microscopy/IFM-II.pdf>.
25. Huang, Q., Tonge, P.J., Slayden, R.A., Kirikae, T. and Ojima, I. 2007. FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 7(5):527-43.
26. Jaiswal, R., Beuria, T.K., Mohan, R., Mahajan, S.K. and Panda, D. 2007. Tatarol inhibits bacterial cytokinesis by perturbing the assembly dynamics of FtsZ. *Biochemistry.* 46(14):4211-20.

27. Jones, L.J., Carballido-López, R., Errington, J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*. 104(6):913-22.
28. Justice, S.S., García-Lara, J. and Rothfield, L.I. 2000. Cell division inhibitors SulA and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. *Mol Microbiol*. 37(2):410-23.
29. Klint, J., Rasmussen, U. and Bergman, B. 2007. FtsZ may have dual roles in the filamentous cyanobacterium *Nostoc/Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Plant Physiol*. 164(1):11-8.
30. Kruse, T., Bork-Jensen, J. and Gerdes, K. 2005. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol*. 55(1):78-89.
31. Kürner, J., Frangakis, A.S. and Baumeister, W. 2005. Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science*. 307(5708):436-8.
32. Lafontaine, C., Valletton, J.M., Orange, N., Norris, V., Mileykovskaya, E. and Alexandre, S. 2007. Behaviour of bacterial division protein FtsZ under a monolayer with phospholipid domains. *Biochim Biophys Acta*. 1768(11):2812-21.
33. Lan, G., Wolgemuth, C.W. and Sun, S.X. 2007. Z-ring force and cell shape during division in rod-like bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(41):16110-5.
34. Levin, P.A., Losick, R., Stragier, P. and Arigoni, F. 1997. Localization of the sporulation protein SpoIIE in *Bacillus subtilis* is dependent upon the cell division protein FtsZ. *Mol Microbiol*. 25(5):839-46.
35. Lewis, P.J. 2004. Bacterial subcellular architecture: recent advances and future prospects. *Mol Microbiol*. 54(5):1135-50.
36. Löwe, J. 1998. Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol*. 124(2-3):235-43.
37. Löwe, J. and Amos, L.A. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*. 391(6663):203-6.
38. Löwe, J. and Amos, L.A. 1999. Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *EMBO J*. 18(9):2364-71.

39. Löwe, J., van den Ent, F. and Amos, L.A. 2004. Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:177-98.
40. Lutkenhaus, J. 2002. Dynamic proteins in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 5(6):548-52.
41. Lutkenhaus, J. 2003. Another cytoskeleton in the closet. *Cell.* 115(6):648-50.
42. Margolin, W. 1998. A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends Microbiol.* 6(6):233-8.
43. Margolin, W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev.* 24(4):531-48.
44. Margolin, W. 2002. Bacterial sporulation: FtsZ rings do the twist. *Curr Biol.* 12(11):R391-2.
45. Margolin, W. 2003. Bacterial division: the fellowship of the ring. *Curr Biol.* 13(1):R16-8.
46. Margolin, W. 2004. Bacterial shape: concave coiled coils curve *Caulobacter*. *Curr Biol.* 14(6):R242-4.
47. Margolin, W. 2005. Bacterial mitosis: actin in a new role at the origin. *Curr Biol.* 15(7):R259-61.
48. Mater, Y., Karaçalı S., Gümüsel F. (Doktora Tezi) 2004. *Escherichia coli* Sialiltransferaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Yapı-işlev İlişkileri. İzmir.
49. Mayer, F. 2003. Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biol Int.* 27(5):429-38.
50. Mileykovskaya, E. and Dowhan W. 2005. Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):135-42.
51. Miyagishima, S.Y., Nishida, K. and Kuroiwa, T. 2003. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci.* 8(9):432-8.
52. Møller-Jensen, J. and Löwe, J. 2005. Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 17(1):75-81.
53. Nanninga, N. 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):110-29.
54. Norris, V., Woldringh, C. and Mileykovskaya, E. 2004. A hypothesis to explain division site selection in *Escherichia coli* by combining nucleoid occlusion and Min. *FEBS Lett.* 561(1-3):3-10.

55. Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. 2001. *Escherichia coli* division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-ring formation. J Bacteriol. 183(22):6630-5.
56. Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. 2007. Overview of cell shape: cytoskeletons shape bacterial cells. Curr Opin Microbiol. 10(6):601-5.
57. Rai, D., Singh, J.K., Roy, N. and Panda, D. 2008. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. Biochem J. 410(1):147-55.
58. Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M. and Löwe, J. 2005. Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. Natl Acad Sci U S A. 102(26):9170-5.
59. Shih, Y.L. and Rothfield, L. 2006. The bacterial cytoskeleton. Microbiol Mol Biol Rev. 70(3):729-54.
60. Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D. and Erickson, H.P. 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(5):3171-5.
61. Sun, Q. and Margolin, W. 1998. FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. J Bacteriol. 180(8):2050-6.
62. Sun, Q. and Margolin, W. 2001. Influence of the nucleoid on placement of FtsZ and MinE rings in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 183(4):1413-22.
63. Trachtenberg, S., Gilad, R. 2001. A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3. Mol Microbiol. 41(4):827-48.
64. van den Ent, F., Amos, L. and Löwe, J. 2001. Bacterial ancestry of actin and tubulin. Curr Opin Microbiol. 4(6):634-8.
65. Vollmer, W. 2006. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? Appl Microbiol Biotechnol. 73(1):37-47.
66. Voskuil, J.L., Westerbeek, C.A., Wu, C., Kolk, A.H. and Nanninga, N. 1994. Epitope mapping of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ with monoclonal antibodies. J Bacteriol. 176(7):1886-93.
67. Young, K.D. 2003. Bacterial shape. Mol Microbiol. 49(3):571-80.

- 68.** Yu, X.C., Margolin, W. 1998. Inhibition of assembly of bacterial cell division protein FtsZ by the hydrophobic dye 5,5'-bis-(8-anilino-1-naphthalenesulfonate). *J Biol Chem.* 273(17):10216-22
- 69.** Yu, X.C., Margolin, W., Gonzalez-Garay, M.L. and Cabral, F. 1999. Vinblastine induces an interaction between FtsZ and tubulin in mammalian cells. *J Cell Sci.* 112 (Pt 14):2301-11.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdu. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans programından mezun oldu. 2005 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.