

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

**Staphylococcus saprophyticus  
BAKTERİSİNDEN  
FOSFOTRANSASETİL AZ (PTA) GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

**İLKNUR AKSOY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE  
2010**



**T.C.**

**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**Staphylococcus saprophyticus**

**BAKTERİSİNDEN  
FOSFOTRANSASETİL AZ (PTA) GENİNİN  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

**İLKNUR AKSOY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. ALİ TÜRKAN**

**G.Y.T.E.  
2010**



**GEBZE YÜKSEK  
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

## YÜKSEK LİSANS/DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri/Sosyal Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ...../...../..... tarihinde tez savunma sınavı yapılan .....'ın tez çalışması .....Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Yard. Doç. ALİ TÜRKAN

ÜYE : Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE : Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE :

ÜYE :

### ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri/Sosyal Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

**TEZ KONU BAŞLIĞI: Staphylococcus saprophyticus  
BAKTERİSİNDEN FOSFOTRANSASETİLİZ'in  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU ve  
KARAKTERİZASYONU  
YAZAR ADI: İLKNUR AKSOY**

Fosfotransasetilaz (Pta), asetil-fosfattan asetil grubunun taşınımını geri dönüşümlü olarak katalizler ve bunun sonucunda asetil-CoA ile inorganik fosfat oluşur. Asetat/asetil-CoA hemoastazı tüm hücrelerdeki anabolik proses için önemlidir ve bundan dolayı Pta, biyosentez ve enerji üretimi arasında dengeyi korumada merkezi bir role sahiptir.

Bu çalışmada, *Staphylococcus saprophyticus* SSP2124 bakterisinin genomunda bulunan ve dizisi bilinen Pta'lara büyük benzerlik gösterdiğinden fosfotransasetilaz geni olduğu tahmin edilen ~1000 bp'lik gen, uygun primerler kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltılıp, pET28a(+) klonlama vektöründeki *NdeI* ve *BamHI* klonlama bölgelerine aktarıldı. Aktarılan gen ilk önce *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzim kesimleri ve PCR ile doğrulandı. Daha sonra, DNA dizisi dizi analizine gönderilerek belirlendi. Tahmini *pta* genini içeren pET28a(+) vektörü (*SspPTA-pET28a*) *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılıp, IPTG ile indüklenerek rekombinant proteinin fazla miktarda sentezlenmesi sağlandı ve Ni-NTA afinite kolonu kullanılarak saflaştırıldı. SDS-PAGE analizi ile %70-80 saf olduğu gözlemlendi. Saflaştırılan His-Tag içeren proteinin moleküler ağırlığı, MALDI-TOF kütle spektrometresi ile 37423.02 ±200 Da olduğu belirlendi. Rekombinant enzim yüksek Pta aktivitesi (300-600 µmol/min.mg protein) gösterdi.

Ayrıca, saflaştırılan fosfotransasetilaz enzimin karakterizasyonu yapılarak kinetik parametreleri belirlendi. Asetil-fosfat ve CoA'a karşı  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.159 mM ve 74 µM olarak hesaplandı. Optimum pH değeri 7.5 ve optimum sıcaklık

30-35°C olarak bulundu. Ayrıca,  $K^+$  ve  $NH_4^+$  iyonlarının aktiviteyi büyük oranda arttırdığı tespit edildi.

## SUMMARY

### **TITLE of THESIS: CLONING, EXPRESSION, and CHARACTERIZATION of PHOSPHOTRANSACETYLASE from Staphylococcus saprophyticus**

**AUTHOR NAME: İLKNUR AKSOY**

Phosphotransacetylase (Pta) catalyzes reversible transfer of acetyl group from acetylphosphate to CoASH, forming Acetyl-CoA and inorganic phosphate. The acetate/acetyl-CoA homeostasis is important for anabolic processes in all cells and therefore Pta has a central key role in the balance between biosynthesis and the energy production.

In this study, a putative *pta* gene in the genome of *Staphylococcus saprophyticus* SSP2124 was amplified using PCR with appropriate primers. The PCR product was cloned into the *Nde*I and *Bam*HI cloning sites of pET28a(+) expression vector. Its DNA sequence was confirmed by DNA sequencing. The pET28a(+) vector containing the *pta* gene was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) competent cells. The overexpression of the recombinant protein was achieved by IPTG induction and it was purified by using Ni-NTA affinity column. Its purity was determined to be about 70-80% based on SDS-PAGE analysis. The molecular weight of the recombinant Pta including His-Tag was determined as 37423.02 ±200 Da by MALDI-TOF mass spectrometer. The recombinant enzyme showed a high PTA activity (300-600 µmol/min.mg protein).

Furthermore, the kinetic parameters of the recombinant Pta was determined using a spectrophotometric assay at 233 nm. The  $K_m$  values for acetyl-phosphate and CoA were 0,159 mM and 74 µM, respectively. The optimum pH and temperature were 7,5 and 30-35 °C, respectively. In addition,  $K^+$  and  $NH_4^+$  ions greatly enhanced the activity of recombinant Pta.

# TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasında bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren, tüm imkanları sağlayan, fikirleri ile bilimsel düşüncelerimi biçimlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam Yard. Doç. Ali TÜRKAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca tez savunma jüri üyelerim Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN, Doç. Dr. Ayhan ÇELİK ve Doç.Dr. Melek ÖZKAN'a,

PCR cihazı kullanımını sağladığı için Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'a, spektrofotometre cihazı için Doç. Dr. Erhan DEMİRBAŞ'a,

GYTE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma verdikleri maddi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi öğrenim sürem boyunca da her türlü desteğini yanımda bulduğum, güven ve sevgileri ile bana güç veren sevgili aileme ve eşime minnetlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	V
SUMMARY	VII
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
KISALTLAMAR DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Asetat Metabolizması	3
2.1.1. Hücreler Niçin Asetat Salgılar	4
2.1.2. Asetat Aktivasyon Yolakları	5
2.1.3. Asetat Yıkımı: Pta-AckA Yolağı	6
2.1.3.1. Pta-AckA Yolağının Ekspresyonu ve Aktivitesi	7
2.1.4. TCA Döngüsünün Sınırlandırılması	9
2.1.5. Asetat Salınım Yolağı	10
2.2. Asetat Metabolizmasında Fosfotransasetilaz (Pta) Enziminin Önemi	12
2.2.1. Ökaryotlarda Fosfotransasetilaz (Pta)	14
2.2.2. Pta, Etanolamin ve 1,2-propanediol Katabolizmasına Katılır	16
	IX

2.2.3. Pta İki Alt Sınıfa Ayrılır	18
2.2.4. Pta ile İlgili Kinetik Çalışmalar	20
2.2.5. Pta ile İlgili Yapı Fonksiyon Çalışmaları	24
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Materyal	28
3.2. Metot	28
3.2.1. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Bakterisinde Olduğu Varsayılan <i>pta</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	28
3.2.1.1. <i>pta</i> Geninin Çoğaltılması İçin Primer Dizaynı	28
3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Deneyi	30
3.2.2. PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Saflaştırılması	32
3.2.3. <i>S. saprophyticus</i> Fosfotransasetilaz Geninin <i>BamHI</i> ve <i>NdeI</i> Endonükleazlar İle Kesimi	32
3.2.4. <i>pET28a</i> Klonlama Vektörünün İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması	33
3.2.4.1. <i>pET28a</i> Klonlama Vektörünün İzolasyonu	34
3.2.4.2. <i>pET28a</i> Klonlama Vektörünün <i>NdeI</i> ve <i>BamHI</i> Endonüklazları ile Kesimi	35
3.2.5. <i>S. saprophyticus</i> Fosfotransasetilaz Geninin <i>pET28a(+)</i> Vektörü ile Ligasyonu	35
3.2.6. Fosfotransasetilaz Geni Taşıyan <i>pET28a(+)</i> Vektörünün <i>E. coli</i> Top10 Bakterisine Transferi	36
3.2.7. Rekombinant <i>E. coli</i> Kolonilerinin Seçimi ve Karakterizasyonu	37

3.2.7.1. Ligasyonun Klone PCR Analizi ile Kontrolü	37
3.2.7.2. SspPta-pET28a Vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Nde</i> I Endonükleazlarla Kesimi	38
3.2.7.3. <i>pta</i> Geni Dizi Analizi	38
3.2.8. <i>S. saprophyticus</i> Fosfotransasetilaz Geni Taşıyan pET28a(+) Vektörünün BL21 (DE3) Hücrelerine Transferi	38
3.2.9. Fosfotransasetilazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	38
3.2.9.1. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinde Pta Ekspresyonu	38
3.2.9.2. Hücre Ekstratından Pta İzolasyonu	39
3.2.9.3. Ni-NTA Kolon Kullanılarak His-Tag'lı Rekombinant Pta'nın Saflaştırılması	39
3.2.9.4. SDS-PAGE Analizi	39
3.2.9.5. Bradford Metodu İle Protein Miktar Tayini	41
3.2.9.6. MALDI-TOF Analizi	42
3.2.10. Pta Aktivite Tayini	42
3.2.10.1. Enzim Miktarının Başlangıç Hızına Etkisi	42
3.2.10.2. Asetil-Fosfat için $K_m$ Değerinin Belirlenmesi	43
3.2.10.3. CoA için $K_m$ Değerinin Belirlenmesi	43
3.2.10.4. Farklı Tuzların Pta Aktivitesine Etkisi	43
3.2.10.5. pH'ın Pta Aktivitesine Etkisi	43
3.2.10.6. Sıcaklığın Pta Aktivitesine Etkisi	43

4. SONUÇ ve TARTIŞMA	44
4.1. Fosfotransasetilaz Geninin Klonlanması	44
4.1.1. Ligasyon Kontrolü	46
4.1.2. <i>pta</i> DNA Dizi Analiz Sonucu	47
4.1.3. <i>S. saprophyticus</i> Pta Amino Asit Dizisinin Diğer Pta Dizileri ile Karşılaştırması	49
4.2. Pta'nın Ekspresyonu ve Saflaştırması	51
4.2.1. Pta Ekspresyonu	51
4.2.2. Ni-NTA Kolondan Protein Saflaştırılması	52
4.2.4. MALDI-TOF Analizi	53
4.3. Pta'nın Karakterizasyonu	55
4.3.1. Enzim Miktarının Başlangıç Hızına Etkisi	55
4.3.2. Asetil-Fosfat ve CoA için $K_m$ Değerlerinin Belirlenmesi	56
4.3.3. Pta Aktivitesi Üzerine Tuzların Etkileri	58
4.3.4. pH'ın Pta Aktivitesine Etkisi	60
4.3.5. Sıcaklığın Pta Aktivitesine Etkisi	62
5. GENEL DEĞERLENDİRME	63
EKLER	82

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Asetil-CoA merkez metabolizmanın çapraz yolunda yer alır	3
2.2. Asetat aktivasyon yolları	7
2.3. Oksitlenmiş metabolitlerin salgılanma yolları.	11
2.4. Asetatın asetil-CoA'a dönüşümü için yollar.	13
2.5. <i>C. reinhardtii</i> 'de ACK, PTA, PFO, PFL'in ve <i>Polytomella sp.</i> 'de ADHE'nin lokalizasyonu ve fonksiyonları.	15
2.6. Etenolamin ve 1,2-propandiol'ün açıl-CoA türevlerine dönüşümü için biyokimyasal basamaklar.	17
2.7. Pta tarafından katalizlenen reaksiyonun önerilen mekanizması.	26
2.8. <i>B. subtilis</i> Pta'nın yapısı.	27
3.1. Fosfotransasetilaz genini <i>Staphylococcus saprophyticus</i> genomundan PCR ile çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.	29
3.2. Klonlama vektörü pET28a'nın vektör haritası.	34
4.2. Fosfotransasetilaz genine ait PCR ürününün % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi.	45
4.3. İzolasyonu yapılan pET28a(+), pta geninin agaroz jelde görüntülenmesi.	45
4.4. % 1'lik agaroz jelde PCR koloni ürünlerinin görüntülenmesi.	46
4.5. SspPta-pET28a vektörünün <i>BamHI</i> ve <i>NdeI</i> endonükleazlarla kesimi.	47
4.6. Dizi analizi sonucu belirlenen pta baz dizisi.	49

<b>4.7.</b> <i>B. subtilis</i> ve <i>S. saprophyticus</i> Pta'ların amino asit dizilerinin karşılaştırması.	50
<b>4.8.</b> <i>E.coli</i> BL21 (DE3) hücrelerinden Pta enziminin over ekspresyonunun SDS-PAGE jelinde görüntüsü.	51
<b>4.9.</b> Ni-NTA'dan rekombinant proteinlerin saflaştırılması.	52
<b>4.10.</b> Ni-NTA rezinden toplanan fraksiyonlar.	53
<b>4.11.</b> Pta'nın MALDI –TOF analizi.	54
<b>4.12.</b> Enzim miktarına bağlı olarak aktivite grafiği.	55
<b>4.13.</b> Pta enziminin asetil-fosfata olan spesifik aktivitesi.	57
<b>4.14.</b> CoA konsantrasyonuna bağlı Pta aktivitesi.	58
<b>4.15.</b> Pta aktivitesi üzerine tuzların etkisi.	59
<b>4.16.</b> NaCl tuzunun Pta aktivitesine etkisi.	60
<b>4.17.</b> Pta aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.	61
<b>4.18.</b> Sıcaklığın Pta aktivitesi üzerine etkisi.	62

# ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Farklı kaynaklardan fosfotransasetilazların karşılaştırılması.	19
3.1. pta geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.	30
3.2. Fosfotransasetilaz geninin <i>Staphylococcus saprophyticus</i> DNA'sından amplifikasyonu için PCR cihazına uygulanan program.	31
3.3. pta geni kesim reaksiyonu bileşenleri.	33
3.4. pET28a(+) vektörü ile fosfotransasetilaz geninin ligasyon reaksiyon bileşenleri.	36
3.5. SDS-PAGE hazırlamada kullanılan kimyasallar.	40
4.1. <i>S. saprophyticus</i> Pta için kinetik parametreleri.	57

# KISALTLAMAR DİZİNİ

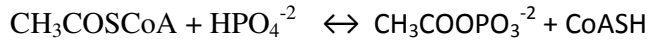
<b>PCR</b>	Polimer Zincir Reaksiyonu
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>MALDI-TOF</b>	Matriks-yardımlı lazer desorbsiyonu/ionizasyonu- Time off flight kütle ölçümü
<b>CoA</b>	Koenzim A
<b>ADP</b>	Adenozin difosfat
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>Ase-CoA</b>	Asetil-CoA
<b>AMP-ACS</b>	AMP oluşturan Asetil-CoA Sentetaz
<b>TCA</b>	Trikarboksilik asit
<b>NAD</b>	Nikotinamid adenin Nükleotit
<b>KGDH</b>	2-ketoglutarat dehidrogenaz
<b>POXB</b>	Piruvat oksidaz B
<i>pta</i>	Fosfotransasetilaz geni
<i>ackA</i>	Asetat kinaz geni
<i>pckA</i>	Fosfoenolpiruvat karboksilaz geni
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvat sentetaz geni
<i>fruR</i>	Fruktoz repressor geni
<i>pflB</i>	Piruvat format liyaz geni
<b>SCSC</b>	Sükkinil-CoA sentetaz kompleksi
<b>SDH</b>	Sükkinat dehidrogenaz
<b>PEP:PTS</b>	Fosfoenolpiruvat: karbonhidrat fosfotransferaz sistemi
<b>FDO</b>	Format dehidrogenaz
<b>FHL</b>	Format hidrojen liyaz
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotit
<b>EutD</b>	<i>S. enterica</i> fosfotransasetilazı
<b>AMP</b>	Adenozin monofosfat



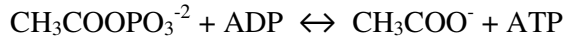
# 1. GİRİŞ

Asetat metabolizmasının temel ara ürünü olan asetil-CoA'nın hem tüketimi hem de üretimi, ökaryot ve prokaryotlarda fizyolojik öneme sahiptir. Asetat bütün fakültatif ve zorunlu anaerob mikropların enerji üretim metabolizmasında son üründür [Latimer ve Ferry, 1993].

Fosfotransasetilaz (Pta) [EC 2.3.1.8], CoA ve ortofosfat arasında açıl grubunun geri dönüşümlü olarak transferini katalizler.



Asetil-CoA (Ac-CoA) bütün anabolik proseslere direk olarak katılan merkezi bir metabolik ara üründür. Asetil-fosfat ve ADP asetat kinaz (Ack) [EC 2.7.2.1.] tarafından asetat ve ATP'e çevrilebilir [Xu et al., 2005].



*Staphylococcus saprophyticus* bakterisi domaininin düşük GC içerikli Gram pozitif grubuna aittir. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus* tanımlanan üç büyük insan patojenidir. *S. saprophyticus* kuagulaz negatif *Staphylococcus*'dur ve sıklıkla komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur [Kuroda et al., 2005].

*Staphylococcus saprophyticus* tüm genom dizisi 2005 yılında Kuroda M. ve arkadaşları tarafından tamamlanmıştır. Bu gram pozitif bakterisi 2.516.575 baz çifti uzunluğunda, 2.446 açık okuma bölgesi içeren halkasal kromozoma sahiptir.

Fosfoasetiltransferaz enzimi bakterisi ve arkea domainine ait birçok mikroorganizmadan izole edilip, biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Aerobik ve anaerobik bakterilerin metabolizmalarında ve anaerobik karbon döngüsünde bu enzimin önemi bilinmesine rağmen genetik alanda fazla çalışılmamıştır [Latimer ve Ferry, 1993].

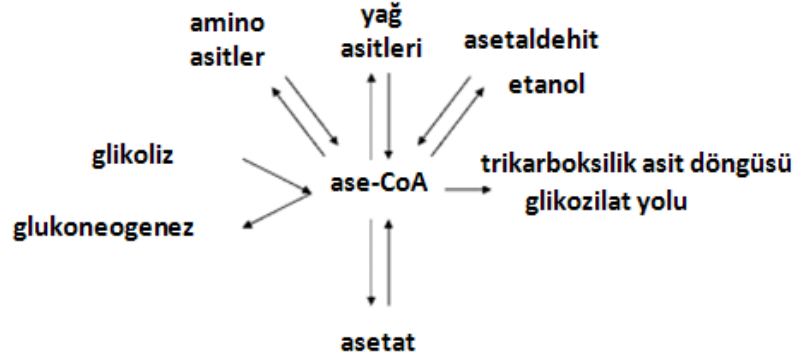
*Staphylococcus saprophyticus* genomik DNA dizisinde bulunan, tahmini (putative) *pta* dizisi 987 baz çifti uzunluğundadır. *pta* geni 328 amino asitten oluşan 35.186,9 Da büyüklüğünde proteini kodlar [Kuroda et al., 2005].

Bu çalışmada, ilk defa *Staphylococcus saprophyticus* genomundaki tahmini *pta* geni pET28a(+) vektörüne klonlanıp, *E. coli* BL21 (DE3) bakteri hücrelerine aktarıldı. Yine bu hücrede eksprese edilerek, afinite kromatografi metodu ile rekombinant protein saflaştırıldı. Elde edilen rekombinant proteinin yüksek Pta aktivitesine sahip olduğu bulundu. Spektrofotometrik yöntem kullanarak kinetik parametreleri, optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlendi. Amino asit dizisi karşılaştırma sonucunda, en çok *B. subtilis* Pta'sına benzerlik gösterdiği bulundu.

## 2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Asetat Metabolizması

Asetat şalteri bileşenleri ve ara ürünleri, 1940'larda keşfedilmiş ve 1950'lerde karakterize edilmeye başlanmıştır. Şimdilerde asetil-CoA olarak, aktive edilmiş asetatin, merkez metabolizmanın kavşağında yer alan yüksek enerjili ara ürün olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1) [Barnard et al., 2004; Bentley, 2004; Kennedy, 2001; Semenza, 2001 ].



**Şekil 2.1.** Asetil-CoA merkez metabolizmanın çapraz yolunda yer alır [Wolfe, 2005].

1950'lerden sonraki 30 yıl boyunca, araştırmacılar fermentasyon ile ilgili araştırmalarını canlı tutmuşlardır. 1990'ların başlarında asetat şalteri yeniden ilgi görmeye başlamıştır. Bu yenilenen ilgi, öncelikle asetil-fosfat üzerine olmuştur. Asetil-fosfat, asetat birikim yolunun yüksek enerjili ara ürünüdür ve global sinyal fonksiyonuna sahiptir [McCleary et al. 1993; Wanner, 1993]. Bugün daha ileri kanıtlar gösteriyor ki; asetil-fosfat nitrojen özümsemesi, ozmoregulasyon, kamçı biogenezi, pilus toplanması, kapsül biyosentezi, biofilm geliştirme ve patojenezinde olduğu kadar çeşitli düzenleyici hücrel işlevlerde de önemli role sahiptir [Bang et al., 2000; Bang et al., 2002; Heyde et al., 2000; Liu ve Ferenci, 2001; Liu ve Ferenci,

1998; Matsubara ve Mizuno, 1999; Ninfa et al., 2000; Pericone et al., 2003; Prohinar et al., 2002; Pr   , 1998; Pr    et al., 1996; Wolfe et al., 2003].

Birkaç dönemdir araştırmacıların ilgisi asetat özümleme enzimi AMP'yi oluşturan asetil-CoA sentetaz (AMP-ACS)  zerine kaymıştır. Bunun nedenlerinden ilki, kirletici madde degradasyonunda olduğu kadar antikanser ilaçlar, bazı antibiyotik ve yağ asitlerini de kapsayan enzimler için bir prototip olmasıdır [Starai et al., 2003]. İkincisi; AMP-ACS aktivitesinin, ökaryotlar tarafından kromatin yapısı, susturma, mitokondriyel sinyal ve yaşlanmayı kontrol etmede kullanım için bir ailasyon-deailasyon homolog sistemi tarafından düzenlenmesidir [Butow ve Avadhani, 2004; Starai ve Escalante-Semerena, 2004]. Üçüncüsü, *E. coli*'de AMP-ACS ekspresyonunu sağlayan kompleks *acs* promotor transkripsiyonunu tam anlamıyla oluşturan dinamik nükleoprotein kompleksinin nasıl olması gerektiğine dair bir model olmasıdır.

### **2.1.1. Hücreler Niçin Asetat Salgılar**

Asetojenez, hücrenin çevreye asetat salgılaması, piruvatı asetil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli olan CoA'nın geri dönüşümü ve glikoliz tarafından tüketilen NAD+'ın yeniden üretilmesi gerektiği için gerçekleşir. Trikarboksilik asit döngüsü; asetil-CoA'nın karbondioksit'e oksitlenmesini tamamlar. Asetojenez; (1) bütün TCA döngüsü tamamlanmadığı zaman, (2) hücredeki karbon akışı, hücrenin veya diğer merkez metabolik yolakların kapasitesini aştığı zaman oluşur [Chang et al., 1999; el-Mansi ve Holms, 1989; Farmer ve Liao, 1997; Holms, 1996; Holms, 1986; Kessler ve Knappe, 1996; Lee, 1996; Majewski ve Domach, 1990; Rossman et al., 1991; Varma ve Paulson, 1994; Xu et al., 1999]. Böylece, asetat salgılaması, karışık - asit fermentasyonu boyunca anaerobik Şekilde oluşur [Bock ve Sawers, 1996]. Bunun yanısıra asetojenez, hücre; solunumunu inhibe eden, aşırı glukoz varlığında oluşur [Holms, 1996; Holms, 1986], bu davranışa Crabtree etkisi denmektedir[Crabtree, 1929; Doelle et al., 1982; Luli ve Strohl, 1990; Rinas et al., 1989]. Crabtree etkisinin bir sonucu olarak, glukozun %15 kadarı, asetat olarak salgılanmaktadır [Holms, 1986]. Asetojenez, "yüksek akış" metabolizmanın bir sonucu olarak düşünülse de, son zamanlarda yayınlanan çalışmalarda, asetat salınımının; TCA döngüsü enzimi 2-ketoglutarat dehidrogenaz (KGDH) tarafından,

daha yüksek hücre yoğunluğuna daha hızlı ulaşmaya izin verdiği için olduğu rapor edilmektedir [El-Mansi, 2004].

### 2.1.2. Asetat Aktivasyon Yolakları

Aerobik koşullar altında asetat birikimi, büyük çoğunlukla bakteriyel suşa bağlı olmaktadır [van de Walle ve Shiloach, 1998; Noronha et al., 2000]. Düşük oksijen konsantrasyonunda ve/veya yüksek gelişim hızında oluşmaktadır [Ko et al, 1995]. Glikoliz boyunca hızlı metabolik akış tarafından TCA döngüsünün aşırı meşgul edilmesi, asetat birikiminin ilk nedeni olduğu düşünülmektedir [Majewski ve Domach, 1990]. Elektron taşıma sistemi [El-Mansi ve Holms, 1989] ve TCA döngüsünün [Holms, 1986] yüksek asetat birikimini etkileyen hız sınırlayıcı basamak olduğuna inanılmaktadır.

Asetat üretimine iki yolak katkıda bulunmaktadır:

1) Sürekli olduğu varsayılan, fosfotransasetilaz (Pta) ve asetat kinaz (ackA) ile asetil-CoA'nın dönüşümü [El-Mansi ve Holms, 1989; Kleman ve Strohl, 1994].

2) Piruvat oksidaz B (poxB) ile piruvatın direk olarak asetata dönüşümü [Abdel-Hamid et al., 2001].

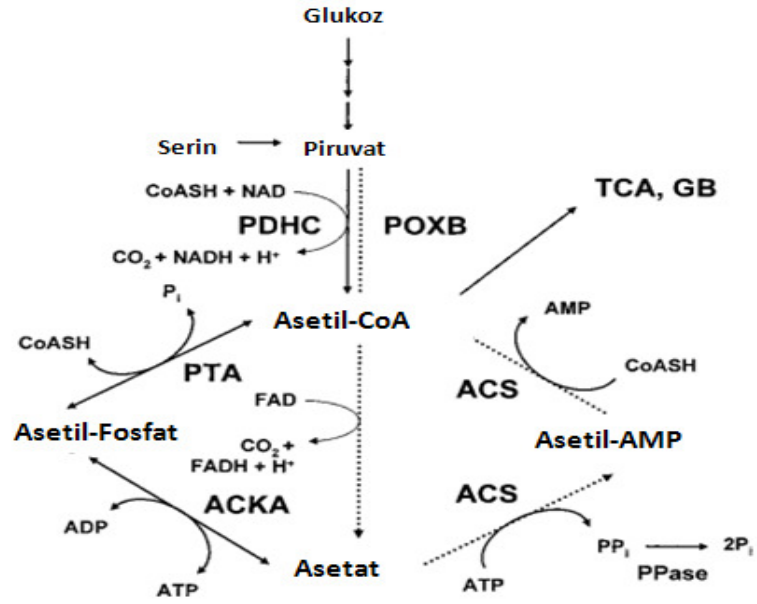
Asetat tüketimi, asetil-CoA sentetaz tarafından asetatin asetil-CoA'ya geri dönüşümü, *pta-ackA*'nın geri aktivitesi ve glikozilat devresi yolağı (aceBak) ile gerçekleşmektedir.

Asetat konsantrasyonu glukoneogenez tarafından da etkilenmektedir. Bu, fosfoenolpiruvat karboksikinaz (*pckA*) tarafından okzaloasetatin fosfoenolpiruvata direk olarak dönüşümü ve fosfoenolpiruvat sentaz (*ppsA*) tarafından piruvatın fosfoenolpiruvata dönüşümü ile gerçekleşmektedir. Her iki reaksiyon, piruvat ve asetil-CoA konsantrasyonunun azalmasına sebep olarak [Krebs ve Bridger, 1980] asetat birikiminde azalmaya neden olur. *fruR* gibi bir düzenleyici molekül, asetat ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili birçok yolağı aynı zamanda kontrol etmektedir [Ramseier et al., 1993; Saier ve Ramseier, 1996; Cozzone, 1998].

Piruvatın asetil-CoA'ya dönüşümünü sağlayan yolak gelişim koşullarına bağlı olmaktadır. Aerobik koşullarda, piruvatın dönüşümü, piruvat dehidrogenaz (*aceE,F*) ile anaerobik koşullarda ise piruvat format liyaz (*pf1B*) ile kataliz edilmektedir [Xu et al., 1999]. Daha sonraki enzimler baskılanmakta ve oksijen tarafından inhibe edilmektedir [Bock ve Sawers, 1996; Kessler ve Knappe, 1996].

### **2.1.3. Asetat Yıkımı: Pta-AckA Yolağı**

*E. coli*'de asetat yıkımı Pta (asetil-CoA: Pi asetiltransferaz; EC 2.3.1.8) [Matsuyama et al., 1994] ve AckA (ATP: asetat fosfotransferaz; EC 2.7.2.1) [Lee et al., 1990] enzimleri tarafından katalizlenmektedir. AckA, asetil-fosfat ve ADP'i, asetat ve ATP'e geri dönüşümlü şekilde dönüştürürken; Pta, asetil-CoA ve inorganik fosfatı, asetil-fosfat ve CoASH'a geri dönüşümlü şekilde dönüştürmektedir (Şekil 2.2) [Rose et al., 1954]. Bu nedenle; Pta-AckA yolağı, karbon ve fosforları enerji metabolizması ile bir araya getirmektedir [Wanner, 1992; Wanner, 1996]. Bu yolak propionil-CoA ve propionat arasında dönüşümü de sağlayabilmektedir [Rose et al., 1954]. A-ketobutirat metabolizması [Van Dyk et al., 1987], tek karbon ile yağ asitlerinin yıkımı, propionat'ın birikimi ve *Salmonella*'da enerji ve karbon kaynağı olarak 1,2-propandiol üretimini de sağlamaktadır.



Şekil 2.2. Asetat aktivasyon yolları [Wolfe, 2005].

### 2.1.3.1. Pta-AckA Yolağının Ekspresyonu ve Aktivitesi

*E. coli* ve *S. enterica*'da *ackA* ve *pta* bitişik yerleşmektedir [Kwan et al., 1988, Wanner et al., 1992, Yamamoto-Otake et al., 1990] ve *E. coli*'de bu operon iki transkripsiyonu sağlamaktadır. Biri *pta* ve *ackA*'ı kodlarken, diğeri sadece *pta*'yı kodlamaktadır [Kakuda et al., 1994]. Genetik kanıtlar temel alınarak, her transkriptin ayrı promotordan sonuçlandığı görülmektedir. Bu promotordardan biri *ack*'nin yukarı bölgesinde, diğeri *pta*'nın yukarı bölgesinde konumlanmaktadır [Wanner et al., 1992]. *S. enterica*'da zıt olarak, tek bir transkript tek bir promotor tarafından yürütülmektedir [Kwan et al., 1988].

*E. coli*'de gen ürünleri AckA, Pta ve onların enzimatik aktiviteleri gibi, *pta* ve *ackA* transkriptlerinin steady-state seviyeleri; oksijen basıncı, çevresel faktörler, asetat varlığı, sıcaklık, ortam zenginliği, açlık gibi çevresel faktörlere cevaben değişmektedir.

Oksijen basıncı en büyük etken olmaktadır. Anaerobik şartlar altında, AckA ve Pta seviyeleri 8-10 kat artmaktadır [Nyström, 1994] fakat aktiviteleri sadece 2-3 kat artmaktadır [Brown et al., 1977]. *S. enterica*'da, *ackA* transkripsiyonu anaerobik çevreye cevapta artar, fakat bu artış sadece 2 kattır [Kwan et al., 1988].

Daha önce tanımladığı gibi; çevresel pH ve asetat'ın varlığı ölçülebilir etkiler yapmaktadır. Aerobik gelişim boyunca, Pta'nın steady-state seviyeleri çevresel asidite ile düşmekte, alkalın artışı ile artmaktadır [Stancik et al., 2002]. Zıt olarak; anaerobik gelişim boyunca, çevre asiditesi arttıkça Ack'nın steady-state seviyeleri artmaktadır [Johannes et al., 2004]. Yüksek asetat konsantrasyonunda veya maruz kaldıktan sonra gelişim boyunca; *pta* ve *ackA* transkriptlerinin ve Pta protein seviyeleri yaklaşık 2-3 kat azalmaktadır [Kirkpatrick et al., 2001; Oh et al., 2000; Oh et al., 2002; Tseng et al., 2001].

Sıcaklık da belirli oranda etkiye sebep olmaktadır. Sıcaklık arttıkça, Pta aktivitesi artmaktadır. Zıt olarak, *ackA* transkripsiyonu azalmaktadır [Prüß et al., 1994]. Ortamın zenginliği de rol oynamaktadır: *ackA* transkriptlerinin ve AckA, Pta'nın steady-state seviyeleri, glukoz destekli minimal besiyerine göre glukoz destekli zengin besiyerinde 3-5 kat yüksek olmaktadır [Nyström, 1994, Tao et al., 1999].

Benzer etki açlıkta da oluşmaktadır. AckA ve Pta seviyeleri 1.5 ve 3 kat artmaktadır [Nyström, 1994]. Karbon kaynağının doğası AckA ve Pta aktivitelerini etkilemektedir. Artan Pta aktivitesi muhtemelen, erişilebilen piruvattan enzimin aktive edilmesinden kaynaklanmaktadır [Suzuki, 1969]. Zıt olarak, karbon kaynağı *E. coli* [Nyström, 1994] ve *S. enterica*'da [Kwan et al., 1988] protein veya transkript seviyelerinde her hangi bir etkiye neden olmamaktadır.

Son olarak; NADH, ADP ve ATP, Pta aktivitesini inhibe etmektedir [Suzuki, 1969]. Bu nedenle; sıcak, alkali, anaerobik ve besince zengin çevre genellikle yolağın aktivitesi ve/veya ekspresyonunu artırırken, soğuk, asidik, aerobik ve asetatca zengin çevre ekspresyonu ve/veya aktiviteyi arttırmamaktadır.



## 2.1.4. TCA Döngüsünün Sınırlandırılması

Karbon kaynağının doğası, miktarı ve oksijene erişim TCA döngüsünü yönetmektedir (Şekil 3) [Amarasingham ve Davis, 1965; Gray et al., 1966; Spencer ve Guest, 1987]. Oksijen yokluğunda ve katabolit baskılanmayı (aşırı glukoz gibi) arttıran koşullar altında *E. coli* hücreleri tüm TCA döngüsünü uyaramamaktadır [Amarasingham ve Davis, 1965; Neidhardt et al., 1990; Peng ve Shimizu, 2003] ve dallanmış versiyonda bir yolağı yönetmektedir. Bu yol, indirgeyici bir yol ile succinil-CoA ve oksidatif yol ile 2- ketoglutarat oluşturan bir dallanmış versiyondur [Cronan et al., 1996; Guest ve Russell, 1992; Lynch ve Lin, 1996; Spencer ve Guest, 1987]. TCA döngüsünün bu dallanmış formu enerji üretmez, biyosentetik olarak işlev görmekte ve öncü metabolitleri üretmektedir. Bu durumda, ATP, glikolizden [Amarasingham ve Davis, 1965] Pta-AckA yolağı aracılı substrat fosforilasyonundan gelmektedir [Brown et al., 1977; Rose et al., 1954; Thauer et al., 1977].

Bu dallanmış versiyon, oksijen yokluğunun birçok TCA döngü enzimlerinin ekspresyonunu inhibe etmesi nedeniyle oluşmaktadır. Bu enzimler özellikle süksinat dehidrogenaz (SDH), süksinil-CoA sentetaz kompleksi (SCSC) ve KGDH'dir. Aşırı glukoz varlığında orta dereceli inhibisyon oluşmaktadır [Gray et al., 1966; Gunsalus ve Park, 1994; Hollywood ve Doelle, 1976; Iuchi ve Lin, 1988; Park et al., 1997; Park et al., 1995; Park et al., 1994; Smith ve Neidhardt, 1983].

Oksijen yokluğunda, oksijen duyarlı global düzenleyiciler ArcA ve FNR, birçok TCA promotorunun baskılanmasını sağlamaktadır. En çok SDH, KGDH ve SCSC'i kodlayan *sdh-suc* operonuna etki etmektedir [Cunningham et al., 1998; Cunningham ve Guest, 1998; Gunsalus ve Park, 1994; Matsushika ve Mizuno, 1998; Park et al., 1997; Park et al., 1995; Shen ve Gunsalus, 1997]. Glukoz baskılamasını sağlayan mekanizma ve Crabtree etkisi açık değildir. Glukoz EIICB (Glc)'nin aktivitesi dolaylı olarak *sdh-suc*'u baskılar fakat mekanizma açık değildir. Membrana bağlı EIICB (Glc), fosfoenolpiruvat:karbonhidrat fosfotransferaz sistemin (PEP:PTS) bir parçası olmakta ve glukozu fosforilleyerek transloke etmektedir. Bu işlev EIICB (Glc)'nin defosforilasyonuna neden olmaktadır [Postma et al., 1996]. Defosforillenmiş EIICB (Glc), Mlc'i baskılamaktadır. Mlc, EIICB (Glc)'i kodlayan gen *ptsG*'i de içeren şeker metabolize eden enzimlerin alınımını sağlayan sistemin ve

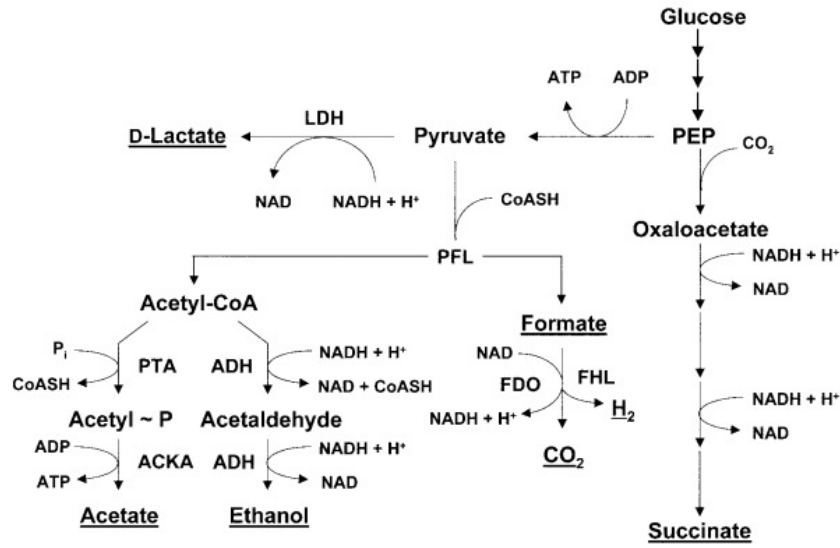
bu enzimleri kodlayan genlerin global baskılayıcısıdır. Bu nedenle, EIICB (Glc) tarafından glukozun translokasyonu, Mlc bağımlı baskılanmayı hafifletmektedir. Böylece glukoz aktive eden genlerin ekspresyonuna izin vermektedir.

*sdh-suc* ve diğer glukoz baskılayıcı promotorların mekanizmaları açık değildir. İşlev, direk olarak Mlc'i veya PEP havuzundaki olumsuzlukları içermemektedir [Chatterjee et al., 2001; Chen et al., 1997]. EIICB (Glc) tarafından glukoz translokasyonu EIIA (Glc)'ı defosforile etmektedir. Bu, PTS'in açıl fosforil donörüdür. Defosforillenmiş EIIA (Glc), diğer şeker permeazların bağlanması ve inhibisyonu ile uyarıcı taşınımına sebep olmaktadır. EIIA(Glc)'nin defosforilasyonu adenilat siklazın indirgenmiş aktivasyonu ile siklik AMP seviyelerini düşürebilmektedir [Postma et al., 1996; Stulke ve Hillen, 1999]. Fakat bu mekanizma tartışılabilir. cAMP-CRP, *sdh-suc* transkripsiyonunu direk olarak kontrol edememektedir [Park et al., 1995]. Diğer global karbon düzenleyici, Cra (FruR olarak da bilinir) da bu olaya katılmamaktadır [Park et al., 1995].

### **2.1.5. Asetat Salınım Yolağı**

*E. coli* hücreleri format ve etanol oluşumunda olduğu gibi asetat oluşumu için öncelikle piruvatın asetil-CoA'a dönüşümünü, aerobik koşullar altında oksidatif şekilde, anaerobik koşullarda oksidatif olmayan şekilde gerçekleştirmektedir. Oksidatif dekarboksilasyon, piruvat dehidrogenaz enzim kompleksi (PDHC) tarafından katalizlenen bir reaksiyondur. Glukoz başına 2 NADH üretmektedir. Yüksek konsantrasyonda NADH, PDHC aktivitesini inhibe etmektedir [Hansen ve Henning, 1996]. Bu nedenle PDHC, NADH'ın NAD<sup>+</sup>'a reoksidasyonunun hızlı şekilde gerçekleşmediği anaerobiozis gibi koşullar altında yönetim yapamamaktadır. Anaerobiozis PDHC'i kodlayan genlerin transkripsiyonunu da baskılamaktadır [Quail et al., 1994]. Bu nedenle, oksidatif dekarboksilasyon anaerobiozis boyunca bazı fonksiyonlar durdurulmasına rağmen, solunum metabolizması boyunca gerçekleşmektedir [Guest et al., 1989; Kaiser ve Sawers, 1994; Spencer ve Guest, 1985].

Anaerobiozis boyunca, *E. coli* hücreleri piruvatı, asetil-CoA'a dekarboksiller ve oksidatif olmayan reaksiyonu katalizleyen piruvat format liyaz (PFL) ile formata dönüştürmektedir [Knappe ve Sawers, 1990] (Şekil 2.3[Wolfe, 2005]). *In vitro*'da aktivitesi, oksijen duyarlı glisil rezidüsüne bağlı olması nedeniyle, PFL'ın sadece oksijen yokluğunda işlevsel olduğu düşünülmektedir. Son bulgular göstermiştir ki; PFL bir miktar oksijen varlığında *in vivo*'da işlevsel olabilmektedir [Alexeeva et al., 2000; de Graef et al., 1999].



Şekil 2.3. Oksitlenmiş metabolitlerin salgılanma yolları [Wolfe, 2005].

Formatın kaderi, çevresel pH'a bağlı olarak PFL tarafından oluşturulmaktadır. Nötral pH'de format salgılanmaktadır. Çevresel pH, oksijene bağlı olarak düştüğü zaman; format aerobik format dehidrogenaz (FDO) tarafından karbondioksit'e veya format-hidrojen liyaz (FHL) tarafından karbondioksit ve dihidrojen'e çevrilmektedir [Abaibou et al., 1995; Alexeeva et al., 2000; Rossman et al., 1991].

Oluşan asetil-CoA, iki alternatif kader izlemektedir; asetat'a dönüşüm veya etanole indirgenme. Asetil-CoA'nın asetata dönüşümü, Pta-AckA yolağı tarafından katalizlenmektedir. Glukoz başına 2 ATP üretilir fakat indirgeyici eşitlik

tüketilmemektedir. Asetil-CoA'nın etanole indirgenmesi, alkol dehidrogenaz tarafından katalizlenmekte ve enerji tüketilmektedir.

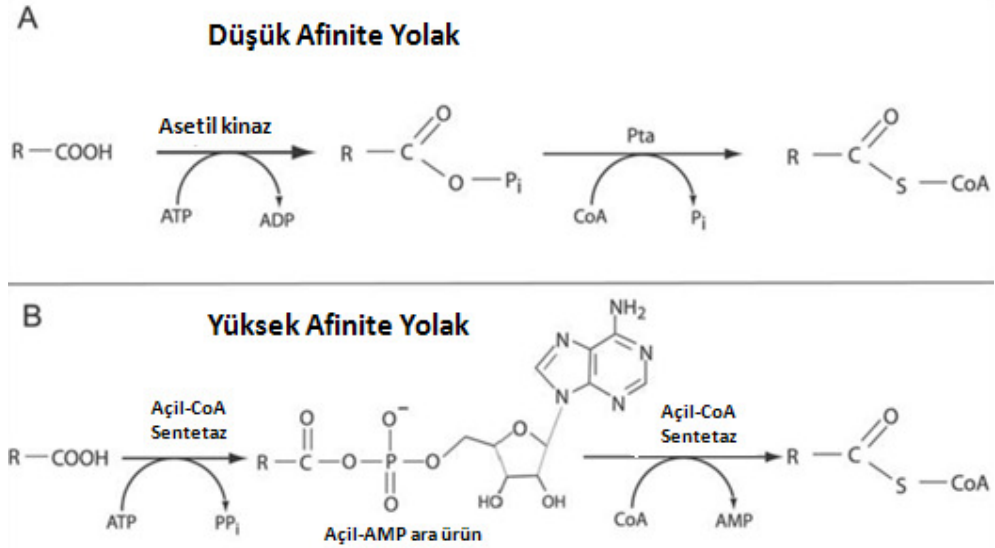
Asetat, bir üçüncü piruvat dekarboksilleyici enzim, piruvat oksidaz'ın (POXB) işlevi boyunca da salgılanabilmektedir. Son zamanlara kadar, POXB bilinmemektedir. Bu solunum enzimi, piruvatın direk olarak asetata oksidatif dekarboksilasyonunu katalizlemektedir. Bu reaksiyon karbon dioksiti üretmektedir ve flavin adenin dinükleotid (FAD)'ı indirgemektedir [Bertagnolli ve Hager, 1991; Bertagnolli ve Hager, 1993; Gennis ve Hager, 1976]. PDHC ve PFL'in, zorunlu enzim oldukları düşünülürken, POXB genellikle zorunlu olmayan ve potansiyel çöp olarak düşünülmektedir [Chang ve Cronan, 1983; Chang et al., 1994; Grabau ve Cronan, 1984]. Bir diğer kanıt göstermektedir ki; POXB, büyüme ve durağan faz arasında oluşan mikroaerofilik koşullarda enerji ve asetat grupları sağlamaktadır. Transkripsiyonu  $\sigma^s$  'e bağlıdır ve erken durağan fazda uyarılmaktadır. Aerobik gelişim boyunca maksimum seviyede eksprese edilmesine rağmen, anaerobik koşullarda da eksprese edilmektedir [Chang et al., 1994].

POXB yoksun mutantlar, yaban tiplerine göre daha az etkin gelişmektedirler. Overekspres veya eksprese edildiği zaman, daha az etkin olmasına rağmen POXB, PDHC yerini alabilmektedir. Bu nedenle POXB'nin, aerobik gelişim etkinliğine katkı sağladığı önerilmektedir [Abdel-Hamid, A. M. ve ark., 2001]. Asetattan yoksun ortamda uzun süreli inkübasyon sonrası, PDHC içermeyen mutantlar mikrokoloni oluşturmaktadır ve gelişimleri POXB'e bağlı olmaktadır [Chang ve Cronan, 1983]. En basit model, POXB ve PDHC ile piruvat'dan asetil-CoA oluşumunu sağlayan AMP-ACS'e sahip olmaktadır.

## **2.2. Asetat Metabolizmasında Fosfotransasetilaz (Pta) Enziminin Önemi**

Doğada, prokaryot ve ökaryotların metabolik işlevlerinde kullandıkları asetat, doğada bol bulunan kısa zicirli yağ asitidir. Hayvan ve insanlarda sindirim yolunda ve toprakta asetat konsantrasyonu çok yüksek seviyelere ulaşabilir [Buckel, 1999; Cummings et al., 1987]. Bütün hücreler asetatı metabolize etmeden önce aktive

ederler. Prokaryotik hücreler bu kısa zincirli yağ asidini asetil-CoA'a çevirmek için iki farklı yol geliştirmişlerdir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Asetatın asetil-CoA'a dönüşümü için yollar. Afinite, belirtilen yolda kullanılan optimum medyumdaki asetat konsantrasyonuyla tanımlanır. Düşük afinite yolak >30 mM fonksiyonel asetat konsantrasyonudur; <10 mM asetat yüksek afinite yolak içindir. [Starai et al., 2004]

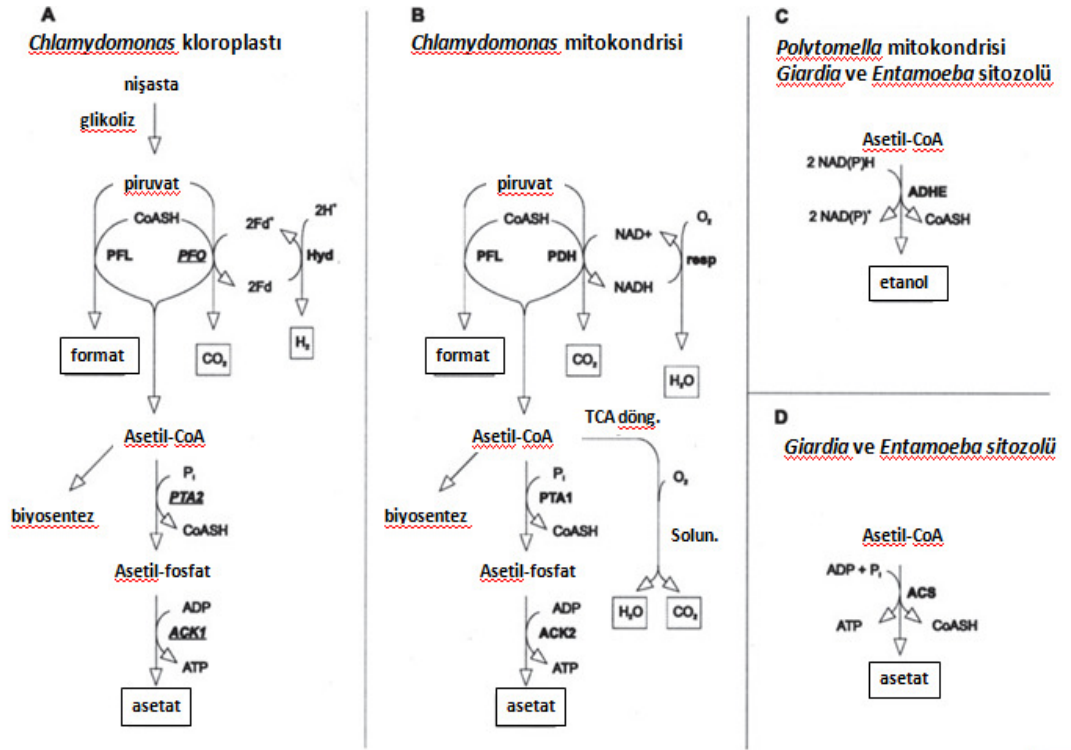
Bu yolların kullanımını kombine ederek, prokaryotlar asetatı çevredeki konsantrasyonlarına bakmaksızın karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Bir yolak asetat kinaz (AckA, EC 2.7.2.1)/fosfotransasetilaz (Pta, EC 2.3.1.8) enzimlerini kapsamaktadır. Bunlar asetatı asetil-fosfat ile asetil-CoA'a aktive etmektedirler [Brown et al., 1977]. Ack/Pta sistemi çevrede asetat yüksek konsantrasyonda olduğu zaman (>30 mM) prokaryotlar tarafından kullanılmaktadır. Birçok fermentatif ve fakültatif bakteri, hücrede kullanılan ve oluşan CoA seviyelerini sabit tutmak ve enerjii korumak için Ack/Pta'nın geri dönüşebilirliğini bir avantaj olarak almaktadır. Bu amaç için, hücreler asetil-CoA'ı asetil-fosfata çevirmek için Pta'yı kullanmaktadır. Asetil-fosfat; enerjii korumak için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bir de iki bileşenli düzenleyici sistemlerle gen ekspresyonunun düzenlenmesine de katılmaktadır [McCleary et al., 1993;

McCleary et al., 1994; Bentley, 2000; Wolfe et al., 2003; Wanner et al., 1992]. Asetatin asetil-CoA'a aktivasyonunun ikinci yolağı asetil-CoA sentetazı (ADP oluşumu) ve asetil-CoA sentetaz'ı (AMP oluşumu) içermektedir. Asetil-CoA sentetaz (ADP oluşumu, EC 6.2.1.1.3) asetat + ATP → ADP + P<sub>i</sub> + Ac-CoA geri dönüşebilir reaksiyonu katalizlemektedir.

### 2.2.1. Ökaryotlarda Fosfotransasetilaz (Pta)

Son zamanlara kadar, AckA-Pta yolağının sadece prokaryotlarda olduğu düşünölmekteydi. Şimdilerde, AckA-Pta yolağının bazı az gelişmiş ökaryotlarda bozulmamış ve fonksiyonel olduğu rapor edilmiştir [Atteia et al., 2006]. Bu konuya ilişkin çalışma *Clamydomanas reinhardtii*'de yürütölmüştür. *Clamydomanas reinhardtii* genomundan iki farklı Pta ve Ack proteinleri izole edilmiştir. Pta1, 581 amino aside sahip yaklaşık 60 kDa büyüklüğünde, Pta2 792 amino aside sahip yaklaşık 85 kDa büyüklüğünde bulunmuştur. Ack enzimleri ise; Ack1, 431 amino aside sahip yaklaşık 45,5 kDa büyüklüğünde ve Ack2, 408 amino aside sahip yaklaşık 43 kDa büyüklüğünde bulunmuştur.

Pta-Ack yolağında bulunan birçok peptid, aerobik gelişen alglerden izole edilen mitokondrinin çözülebilen fraksiyonunda tanımlanmıştır. Bu peptidler Pta1 ve Ack2'ye spesifikken, algin kloroplast hidrogenazı kodlayan hyda2 genine yakın olan *pta2* ve *ack1* genlerin ürünü Pta2 ve Ack1 enzimlerinden uzaktır. İzole edilen mitokondride Pta2 ve Ack1'e spesifik peptidlerin olmamasına ve gen organizasyonuna göre, bu peptidlerin kloroplastta konumlandığı bulunmuştur (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** *C. reinhardtii*'de ACK, PTA, PFO, PFL'in ve *C. Reinhardtii*'e yakın fotosentetik olmayan *Polytomella sp.*'de ADHE'nin lokalizasyonu ve fonksiyonları. Nişasta, ışıklı faz boyunca kloroplast içerisinde biriktirilir ve karanlıkta yıkılır. Nişastanın yıkımı anaerobik koşullarda, aerobik koşullarda olduğundan daha fazladır. İşlevsel TCA döngüsünün yokluğunda (anaerobiyozis), PFL veya PFO aracılığı ile üretilen asetil-CoA, asetata üreten ACK-PTA yoluna girer. PTA, ACK ve ADHE'nin rolü ayrıştırmadır. Bazı fizyolojik koşullar altında PTA/ACK ve/veya ADHE için biriktirme rolü hariç tutulur, çünkü asetata *C. reinhardtii* için karbon kaynağı iken, *Polytomella sp.* için de etanol bir karbon kaynağıdır. Son ürünler kutu içinde gösterilmiştir. Fd; ferrodoksin, Acs; ADP üreten asetil-Coa sentaz, PDH; piruvat dehidrogenaz [Atteia et al., 2006].

*C. reinhardtii* Ack1 ve Pta2 proteinleri ve oomiset *Phytophthora sojae*'den uygun homologlarla belirlenen filogenetik ağ; her iki enzim için ortak atayı göstermektedir. Bu; asetil-CoA'nın asetata geri dönüşümlü şekilde dönüşümünü sağlayan iki basamaklı yolağın, oomiset ve bitkilerin ortak atasında bulunduğunu göstermektedir [Stechmann ve Cavalier-Smith, 2002].

Pta olmaksızın Ack, mitokondrisiz ökaryot *Entamoeba histolytica* genom dizisinde bulunmuştur. Pta-Ack sistemi, prokaryotlar arasında yaygındır [Wolfe,

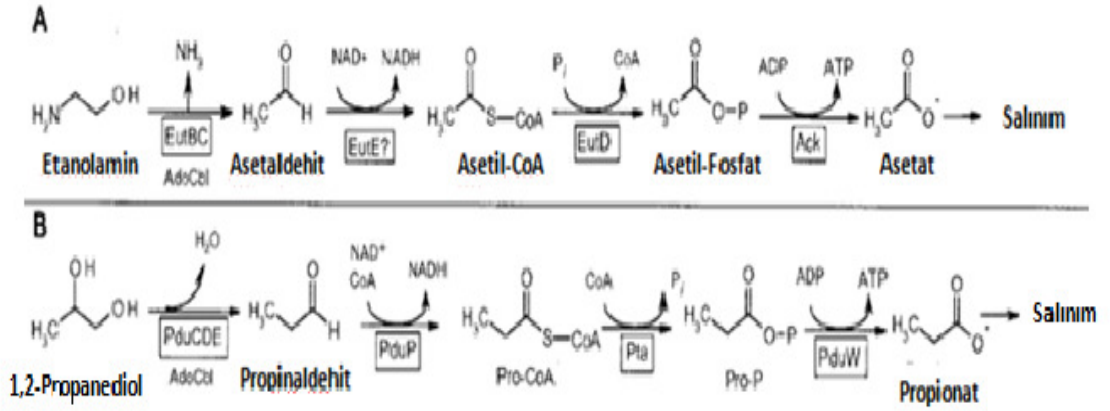
2005]. Kreuzberg et al. (1987) tarafından yapılan aktivite deneylerinde Ack ve Pta'nın, ökaryotlar arasında tipik ve yeni öbakteriyel enzimler olduğunu saptamıştır. *C. reinhardtii*'deki mitokondriyel Pta-Ack yolağı asetat oluşumu için alternatif yoldur.

### **2.2.2. Pta, Etanolamin ve 1,2-propanediol Katabolizmasına Katılır**

*S. enterica*'da asetat/propionat kinaz ve Pta aktiviteleri, tireonin, tek sayılı yağ asidi, etanolamin ve 1,2-propanediol katabolizması ile ilişkilidir [Clark ve Cronan, 1996; Sawers, 1998; Palacios, 2003; Brinsmade, 2004]. *Salmonella enterica*'da karbon ve enerji kaynağı olarak 1,2-propanediol'de gelişim propionatın oluşumuna ve salınımına neden olmaktadır. Propionatın propionil-CoA'a aktivasyonu, propionat kinaz (PduW)/fosfotransasetilaz (Pta) enzim sisteminin aktivitelerine bağlıdır.

Etanolamin, *Salmonella enterica* serotipi Typhimurium LT2 tarafından karbon, nitrojen ve enerjinin tek kaynağı olarak kullanılmaktadır [Chang ve Chang, 1975; Roof ve Roth, 1988; Roof ve Roth, 1989]. Prensipite, etanolaminin merkez metabolit asetil-CoA'a dönüşümünün biyokimyası basittir (Şekil 2.6).





**Şekil 2.6.** Etenolamin ve 1,2-propandiol'ün açıl-CoA türevlerine dönüşümü için biyokimyasal basamaklar. A) Etenolamin iki basamakta asetil-CoA'a dönüştürülür. Asetil-CoA asetata çevildiği zaman EutD ve Ack salınır. B) Benzer olarak, 1,2- propandiol Pta ve Ack tarafından Pro-CoA'dan propionata dönüştürülür. Sonuçta propionat salınır [Brinsmade ve Escalante-Semerena, 2004].

Etenolamin katabolizmasının ilk basamağı iyi karakterize edilmiş Coenzim B<sub>12</sub> bağlı enzim etenolamin amonyaliyaz tarafından kataliz edilmektedir [Bandarian et al., 1999; Bandarian ve Reed, 2002; Blackwell ve Turner, 1978; Faust et al., 1990; Semialjac ve Schwarz, 2003]. Etenolamin amonyaliyaz katalizli reaksiyonun ürünleri, amonyum ve asetaldehidtir. Asetata oksidasyonu asetil-CoA sentezine eşlik etmektedir [Babior, 1982]. Bu bakteride CoA için olası iki yol vardır. Hücre enerji için aç değilken, asetil-CoA enerji üreten sistemi çalıştırmak için trikarboksilik asit döngüsünün glikozilat yan yoluna girmektedir ve birçok ara ürün ve ikincil metabolizma yolları için başlatıcı olarak davranmaktadır [Kornberg, 1966]. Sınırlı enerji koşulları altında, asetil-CoA asetil-fosfata dönüştürülmektedir ve sonunda fosfotransasetilaz ve asetat kinazın aktiviteleri ile asetata çevilmektedir. Bu yolda, asetil-fosfatın asetata dönüşümü ATP'yi üretmek için substrat seviyesinde ADP'nin fosforilasyonuna eşlik etmektedir. *S. enterica*'da etanolamin katabolik fonksiyonları 17 gen içeren *eut* operonu tarafından kodlanmaktadır [Kofoid et al., 1999; Stojiljkovic et al., 1995]. EutD proteinin amino asit dizileri *S. enterica*'nın ve diğer birçok prokaryotun Pta enziminin katalitik domainine %56 benzerlik gösterirken, %37 özgündür.

### 2.2.3. Pta İki Alt Sınıfa Ayrılır

Dizilenmiş mikrobiyel genom çalışmaları, Pta enziminin iki sınıfını ortaya çıkarmaktadır. Sınıf 1 enzimleri (Pta<sup>I</sup>) yaklaşık 350 rezidüye sahipken, sınıf 2 enzimler (Pta<sup>II</sup>) Pta<sup>I</sup> 'in iki katı olarak yaklaşık 700 rezidüye sahiptir [Brinsmade ve Escalante-Semerena, 2004; Lundie ve Ferry, 1989]. Bilinen birkaç Pta enziminin moleküler büyüklükleri Çizelge 2.1'de [Lundie ve Ferry, 1989] gösterilmektedir.

PtaI enzimleri, PtaII enzimlerinin aktif bölgesini içeren C- terminal domaini ile uç uca homoloji göstermektedir. Bu, PtaII'nin N-terminal domaininin fonksiyonunun ne olduğu sorusunu doğurmaktadır. *In vivo* genetik ve *in vitro*'daki çalışmalardan elde edilen daha önceki sonuçlara göre, *Salmonella*'dan Pta'nın N-terminal domaini NADH ve piruvat için bir sensördür. Farklı metabolitlere karşı davranış ve kinetik analizler, Pta'nın bu ek domaininin önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

*S. enterica*'nın *pduL* geni, protein için ek kodlama göstermektedir. Bu, fosfotransasetilaz geninin evrimsel farklı sınıfıdır [Liu et al., 2007]. PduL, 210 aminoasite sahip, fosfotransasetilazın üçüncü sınıfıdır. PduL, sınıf 1 ve sınıf 2 enzim benzerliğinden yoksundur. Sınıf 2 Pta BioD-benzer ve DRTGG domainlerini içermektedirler. Bu iki domain sınıf 1 ve sınıf 3'te yoktur. Bu domainlerin fizyolojik rolü açık değildir.

**Çizelge 2.1.** Farklı kaynaklardan fosfotransasetilazların karşılaştırılması.

Organizma	M <sub>r</sub> (kDa)	Spesifik Aktivite (Unite/mg) <sup>a</sup>	K <sub>m</sub>		Metal Etkileri
			CoAS	Asetil-fosfat	
<i>Bacillus subtilis</i>	90	1,371	0,096	0,48	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uyarır; Mn <sup>2+</sup> ve Ca <sup>2+</sup> inhibe eder.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NR <sup>b</sup>	8- 12 <sup>c</sup>	NR	NR	K <sup>+</sup> uyarır; Na <sup>+</sup> , AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> inhibe eder.
<i>Clostridium acidurici</i>	63-75	710	NR	NR	Fe <sup>2+</sup> gereklidir; Na <sup>+</sup> , AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> inhibe eder.
<i>Clostridium kluyveri</i>	60	196	0,12	0,6- 1,3	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> gerekli; Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> ? inhibe eder.
<i>C. thermoaceticum</i>	88 <sup>d</sup>	123	NR	NR	Mg <sup>2+</sup> uyarır; AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> birbirinden ayırır.
<i>E. coli</i>	160-250	333	0,32	3,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KPO <sub>4</sub> inhibe eder.
<i>Lactobacillus fermenti</i>	68	1,124	0,09	NR	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> uyarır; Ca <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> inhibe eder.
<i>M. thermophila</i>	43- 52	2,496	0,09	0,17	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> gereklidir; Na <sup>+</sup> , AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> inhibe eder.
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	55- 57	32	0,15	4,70	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> uyarır; Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> inhibe eder.
<i>Veillonella alcalescens</i>	75– 85 <sup>e</sup>	812	NR	NR	Mg <sup>2+</sup> ATP ile inhibisyonu geri çevirir.

<sup>a</sup>Bir ünite, dakikada oluşan asetil-CoA'nın 1 µmol'üdür. <sup>b</sup>Değerler rapor edilmemiştir. <sup>c</sup>1 ünite, dakikada oluşan 1 nmol asetil-CoA'dır, hücre ekstratındaki aktivite. <sup>d</sup>Alt ünite moleküler ağırlığı 22,000 Da olan homotetramer olarak saflaştırılmış enzim. <sup>e</sup>Alt ünite moleküler ağırlığı 32,000- 40,000 Da olan dimer olarak saflaştırılan enzim.

## 2.2.4. Pta ile İlgili Kinetik Çalışmalar

1971 yılında Whiteley ve Pelroy; *Veillonella alcalescens*'den saflaştırılan fosfotransasetilazın jel filtrasyonu ile moleküler ağırlığının 75-80 kDa olduğunu ve sukroz gradiyentinde, ultra santrifüj ve sedimentasyon proteinlerin heterojen yıkımını göstermişlerdir. Üre ve sodyum dedosil sülfat ile denaturasyon sonucu 32-40 kDa moleküler ağırlıklı tek bir polipeptid oluştuğunu bildirmişlerdir. Denatürasyondan önce dimetil suberimidate ile amidinasyon sonucu, enzimin iki alt üniteden oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu fosfotransasetilazın özelliklerini, diğer bakterilerden izole edilen fosfotransasetilazlarla karşılaştırmışlardır.

Saflaştırdıkları proteinin konsantrasyonu 0.5 mg/ml veya daha fazla olduğunda, fosfotransasetilaz'ın 4°C ve -20°C'de birkaç hafta kararlı olduğunu bulmuşlardır. Amonyum sülfat ve potasyum fosfatı kararlılaştırıcı ajan olarak tanımlamışlardır. Divalent katyonlar ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  ve  $\text{MgSO}_4$ ) ve ATP eklenmesi ile kararsızlığı arttırmışlardır. ATP ile enzimin katalitik aktivitesini inhibe etmişlerdir. ATP inhibisyonunun, CoA'ye ilgide yarışçı, asetil-fosfata ilgide yarışçı olmayan şekilde olduğunu ifade etmişlerdir. ATP inhibisyonunu  $\text{Mg}^{+2}$ 'nin eklenmesi ile tamamiyle kaldırmışlardır.  $\text{Mg}^{+2}$ 'un enzim kararlılığı üzerine ATP'nin etkisini geri döndürmediğini, asetil-fosfat, CoA veya  $\beta$ -merkaptolanol karışımının ATP ile inaktivasyona karşı enzimi koruduğunu bulmuşlardır. ATP varlığında artan kararsızlığı; 0.01 M amonyum sülfat, potasyum fosfat, CoA ve asetil-fosfat varlığında görmüşlerdir. 0.1 M asetil-fosfat varlığında, ATP'nin daha az etkiye sahip olduğunu, enzim kararlılığının  $\beta$ -merkaptolanol eklenmesi ile arttığını fakat ATP ve  $\text{Mg}^{2+}$  tarafından enzim kararsızlığının devam ettiğini tanımlamışlardır.

1972'de ise Pelroy ve Whiteley; *Viellonella alcalescens*'in fosfotransasetilaz enziminin, bütün substratlar için Michaelis-Menten kinetikli geri dönüşümlü reaksiyonu kataliz ettiğini göstermişlerdir. Enzimin geri reaksiyon hızının (asetil-fosfattan asetil-CoA'nın sentezi) ileri reaksiyon (asetil-CoA'dan asetil-fosfatın sentezi) hızından 6.5 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. İleri reaksiyon için tanımladıkları  $K_m$  değeri, asetil-CoA için 8.6  $\mu\text{M}$  ve asetil-fosfat için 0.59 mM'dır. İleri ve geri reaksiyonlarda son ürün tarafından inhibisyon analiz sonuçlarının bi-bi mekanizmasına uygun olarak bulmuşlardır. Enzimin adenzin trifosfat ve adenzin

difosfat ile inhibe edildiğini fakat indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid veya piruvat tarafından etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Thomas ve Hoch 1973'de fosfotransasetilaz'ı saflaştırmak için farklı bir organizma olarak *B.subtilis*'i kullanmışlardır. Saflaştırılan enzimin  $K^+$  ve  $NH_4^+$  ile aktive edilirken,  $Mn^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Enzimin kısa zincirli yağ asidi esterleri propionil-CoA ve butiril-CoA kesim yeteneğine sahip olduğunu fakat bu substratlara olan  $V_{max}$  ve afinitelerinin asetil-CoA için elde edileden daha az olduğunu bildirmişlerdir. Enzim sukkinil-CoA veya palmitil-CoA kesimini sağlayamazken; palmitil-CoA'nın, CoA-SH'ın yarışçı inhibitörü olarak davrandığını belirlemişlerdir. Adenin nükleotidleri, ATP, ADP ve AMP 1 mM konsantrasyonda enzim üzerine inhibitör etki ettiğini bildirmişlerdir. Piruvat ve indirgenmiş piridin nükleotidleri tarafından inhibisyon gözlememişlerdir. Sephadex G-150 kolonda enzimin moleküler ağırlığını 90 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzimin maksimum aktivitesinin gelişimin büyüme fazında olduğunu bulmuşlardır. Sitrlik asit döngüsü mutasyonları sonucuna göre, enzimin sitrlik asit döngüsü ile düzenlenmediğini göstermişlerdir.

1989'da Lundie ve Ferry; günümüzde hakkında en fazla bilgiye sahip olduğumuz *Methanosarcina thermophila*'dan fosfotransasetilaz (EC 2.3.1.8.) proteinini saflaştırmışlardır. Saflaştırılan proteinin 42.000- 52.000 Da'luk monomer ve membrana bağlı olmadığını belirtmişlerdir. Proteinin bir mg'mın dakikada 2.5 mmol asetil-CoA spesifik aktivitesinin 83 katı ile saflaştırıldığını ve bu hızın asetil-fosfat sentez hızından 10 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Enzim optimum aktivitesini pH 7.0'da ve 35- 45°C'de gösterdiğini, havaya ve 70°C sıcaklığa kararlı olduğunu fakat daha üstü sıcaklıklarda inaktive olduğunu göstermişlerdir. Fosfat ve sülfat sıcaklık inaktivasyonuna karşı kısmen önlerken, 10 mM'ın üstünde potasyum veya amonyum iyon konsantrasyonu, saflaştırılan enzimin maksimum aktivitesi için gerekli olduğunu bildirilmiştir. Sodyum, fosfat, sülfat ve arsenat iyonları ile enzim aktivitesini inhibe etmişlerdir. Hücre akstratlarının Western blot analizlerine göre; fosfotransasetilazı, asetatta gelişen hücrelerde metanolde gelişen hücrelere göre daha çok sentez etmişlerdir.

1990'lara gelindiğinde gen lokalizasyonu ve dizi benzerlikleri üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Hideko et al. 1990'da ; K-12 den köken alan *E. coli* 1100'un genomik DNA kütüphanesinden fosfotransasetilaz (*pta*) genini klonlamışlardır. *pta*<sup>+</sup> plazmidini içeren suşların fosfotransasetilaz aktivitelerinin, *lac* promotorun kontrolü altında yaklaşık 150 kat fazla olduğunu belirtmişlerdir. Fosfotransasetilaz'ın moleküler ağırlığını sodyum dedosilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 81.000 olarak bulmuşlardır. *pta* geninin, plazmid alt klonlama ve restriksiyon analizlerinin kombinasyonu ile *ackA*'nın alt bölgesinde, kromozomun *purF-folC-hisT* bölgesinin 13 kb yukarı bölgesinde konumlanmış olduğunu bildirmişlerdir.

Matthew T. Latimer ve James G. Ferry (1993); *Methanosarcina thermophila* TM-1'dan asetat aktive edici enzim genleri, asetat kinaz (*ack*) ve fosfotransasetilaz (*pta*) klonlamış ve dizilemişlerdir. Her iki genin genom başına bir kopya olarak bulunduğunu ve *pta* geninin *ack* geni yukarı bölgesinde bitişik olarak yerleştiğini belirtmişlerdir. Korunmuş arkeal promotor dizilerinin, *pta* genini kodlayan bölgenin yukarı bölgesinde bulunduğunu bildirmişlerdir. *pta* ve *ack* genlerinin moleküler büyüklüğü 35.198 ve 44.482 Da olan polipeptidleri kodladığını bildirmişleridir. Fosfotransasetilaz dizisi ile enzimin hidrofobik polipeptid olduğunu belirtmişler ve membrana bağlı domainin olmamasını bunun kanıtı olarak sunmuşlardır. *M. thermophila* ve *E. coli* *ack* genleri karşılaştırarak, genler arasında benzer moleküler ağırlıklı alt ünite ve % 44 özgün olduğunu göstermişlerdir (% 60 benzerlik). Birçok korunmuş arjinin, sistein ve glutamik asit rezidülerin varlığını da göstermiştir. Daha önce arjinin, sistein ve glutamik asit rezidülerinin, *E. coli* asetat kinaz'ın aktif bölgesinde veya yakınında olduğu belirtilmiştir [Wong et al., 1981; Wong et al., 1980]. *E. coli*'de *pta* ve *ack* genlerini hipereksprese etmişler ve aşırı eksprese edilen proteinler *M. thermophila*'dan daha önce saflaştırılan enzimden daha yüksek spesifik aktiviteli olarak homojen şekilde saflaştırdıklarını belirtmişlerdir.

Kavita et al. (1995); *Methanosarcina thermophila*'dan fosfotransasetilaz ve asetat kinaz enzimlerini kodlayan genleri (*pta* ve *ack*) klonlayıp ve dizilemişlerdir. Kromozom üzerinde *ack*'ın yukarı bölgesinde konumlanan *pta* ile beraber düzenlendikleri daha önce belirtilmişti [Latimer ve Ferry, 1993]. Fosfotransasetilaz

ve asetat kinaz'ın aktivitelerinin, asetatta gelişen hücrelerde metanol, monometilamin, dimetilamin veya trimetilamin'de gelişen hücrelerden en az 8-10 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Northern blot (RNA) analizleri ile *pta* ve *ack*'nın yaklaşık 2,4-kb polisistronik mesaj olarak transkripsiyona uğradığını ve enzim sentezinin mRNA seviyesinde düzenlendiğini göstermişlerdir. Primer uzatma deneyleri ile transkripsiyon başlama bölgelerinin *pta* geninin translasyon başlangıcından 27 baz çifti yukarı bölgesinde ve korunmuş arkeal *boxA* promotor dizisinden 24 baz çifti alt bölgesinde olduğunu ortaya çıkarmışlardır. S1 nükleaz koruma deneyleri ile her biri dört ardışık tekrar içeren başlangıca göre haritalanmış, dört farklı 3' uçlu transkriptleri tanımlamışlardır. *ack* özgün proplar kullanarak yaptıkları northern blot analizleri ile 2.4 kb polisistronik transkripti ve daha küçük olan 1.4 kb'lik monosistronik *ack* mRNA transkript'ini tanımlamışlardır.

Zhuang (1996); *Clostridium acetobutylicum*'un fermentasyonunda asetil-CoA'nın asetata dönüşümünü kataliz eden fosfotransasetilaz (Pta) ve asetat kinaz (AK) enzimlerini kodlayan *pta* ve *ack* genlerini klonlayıp, dizilemişlerdir. Enzim aktivite deneylerini alt klonu barındıran *E. coli* ve *C. acetobutylicum*'un hücre ekstratlarında yapmışlardır ve AK ve Pta aktivitelerinde artış gözlemişlerdir. *pta* geninin 333 amino asit rezidülü ve moleküler ağırlığı 36.2 kDa olan proteini kodladığını bildirmişlerdir. *ack* geninin ise 401 amino asit rezidülü ve 44.3 kDa moleküler ağırlığına sahip olan proteini kodladığını bildirmişlerdir. Primer uzatma analizleri ile *pta* geni başlangıç kodonunun 70 baz çifti yukarı bölgesinde konumlanmış tek transkripsiyon başlangıç bölgesi tanımlamışlardır.

Ruth et al. (2001); *Lactobacillus sanfranciscensis*'in karbonhidrat yolağında anahtar dallanma noktası reaksiyonunu kataliz eden fosfotransasetilaz geninin 35.5 kD'luk moleküler ağırlığına sahip bir proteini kodlayan 987 baz çiftlik açık okuma bölgesini içerdiğini belirtmişlerdir. Diğer bütün bakterilerin aksine; *Lactobacillus sanfranciscensis*'da *pta* geninin asetat kinaz kodlayan gene yakın konumlanmadığını savunmuşlardır. *Lactobacillus sanfranciscensis*'in fosfotransasetilaz gen dizisinin *B. subtilis* fosfotransasetilazı ile %61 dizi benzerliği ve %60 amino asit dizi benzerliği içerdiğini bildirmişlerdir.

Pta *E. coli*'de biyotinlenmiş füzyon protein olarak heterolog eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan proteinin asetil-fosfat ve CoA için yaklaşık  $K_m$  değerlerini sırasıyla 1.3 ve 0.1 mM olarak tanımlamışlardır. Enzimin  $V_{max}$ 'ını 194 U/mg olarak belirtmişlerdir. Enzimin, ters reaksiyonu asetil-CoA ve fosfat için yaklaşık 0,6 ve 6.7 mM  $K_m$  değeri ile *in vitro*'da da kataliz ettiğini belirtmişlerdir (38U/mg  $V_{max}$  ile). Saflaştırdıkları Pta'nın, optimum aktivitesini 49-58°C geniş sıcaklık aralığında gösterirken, 60 °C'de 15 dakika sonra inaktif hale geldiğini bildirmişlerdir. Optimum pH aralığı 8.1- 9.1 iken, pH kararlılığı 7-10'dur. Enzimin aktivitesinin MgCl<sub>2</sub> (10mM) veya KCl (100mM) ile etkilenmediğini bulmuşlardır.

### 2.2.5. Pta ile İlgili Yapı Fonksiyon Çalışmaları

1997'de Madeline ve arkadaşları, Methanosarcina thermophila'dan fosfotransasetilazın arjinin ve sistein rezidülerinin önemi üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada, dizide bulunan 4 sistein rezidüsü (C159, C277, C312, C325) alanin ile yer değiştirilmiştir ve değişen enzimin kinetik sabitleri tanımlanmıştır. 4 sisteinden sadece birinin (C159) aktivite için zorunlu olduğu bulunmuştur. Bu rezidünün serin ile yer değiştirmesi full aktivite ile sonuçlanmıştır. C312 rezidüsü kataliz için gerekli değilken, modifikasyona uğratıldığında aktivitenin inhibe edilmesi ile sonuçlanmıştır. Bu da onun aktif bölgede yer aldığını göstermiştir.

Enzimde bulunan 5 arjinin rezidüsü (R28, R87, R133, R287, R310) glutamin ile yer değiştirilmiştir. Değişen enzimin kinetik analizleri R310 rezidüsünün aktivite için zorunlu olduğunu göstermiştir. Diğer 4'ü aktivite için zorunlu değilken, R87 ve R133'ün CoA ya bağlanmaya katıldığı görülmüştür.

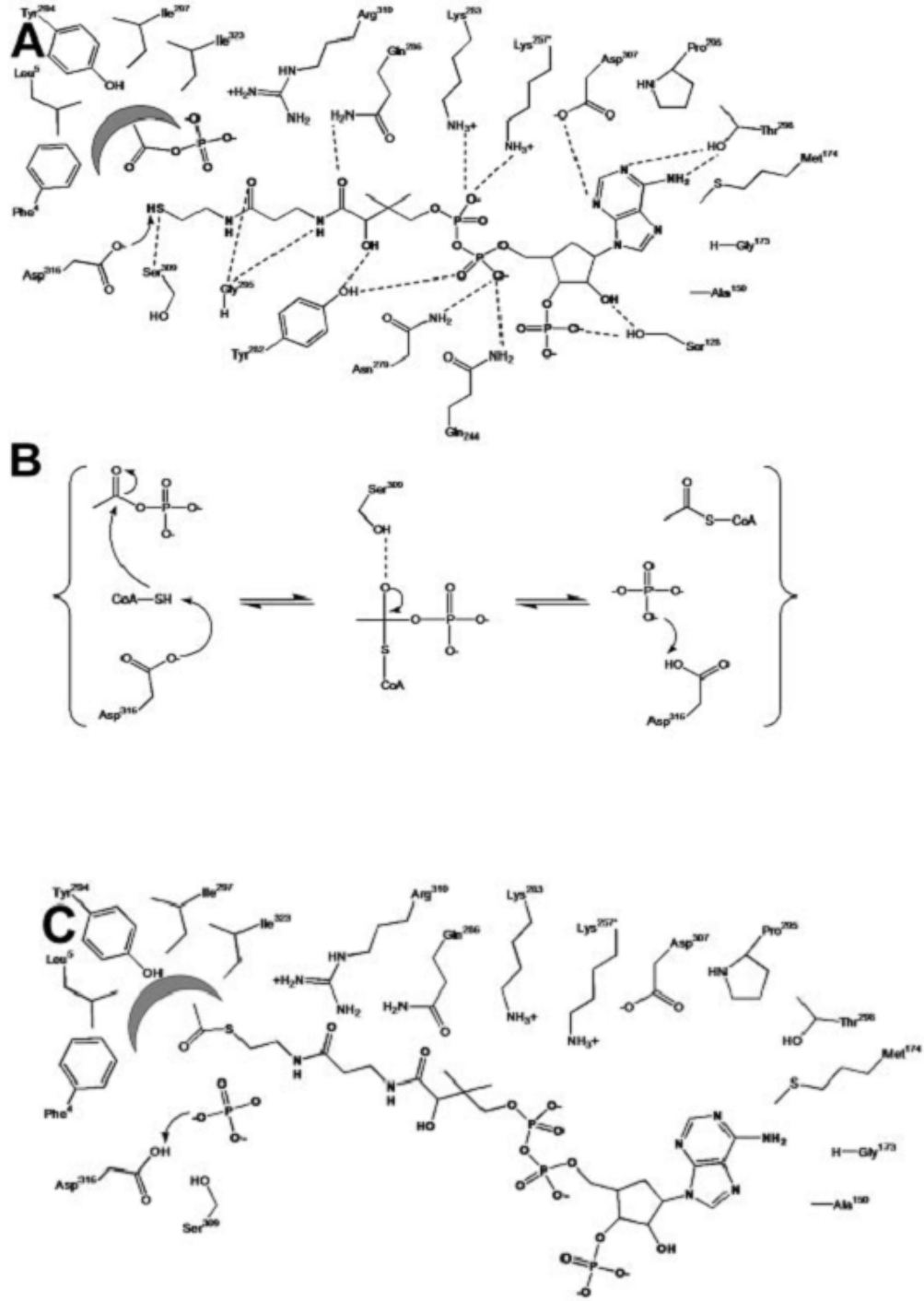
2001'de Iyer ve Ferry tarafından aynı Pta enziminin CoA'ya bağlanmasında arjinin rezidülerinin önemi araştırılmıştır. Çalışmalarında daha önce bağlanmada önemli olduğu görülen R133 ve R87 rezidüleri alanin, glutamin, lizin, glutamik asit'e değiştirilmiştir. Varyantların kinetik çalışmaları, Arg87 ve Arg 133'ün substrat CoA ile iletişimde olduğunu ispatlamıştır. Arjinin 87 varyantları CoA ve Coa analogu 3'-defosfo-CoA arasında ayırım yapma yeteneğini yitirmiştir. Bu, Arjinin 87 rezidüsünün CoA'nın 3'-fosfatı ile tuz köprüsü oluşturduğunu göstermiştir. Arg 133'ün CoA'nın 5' fosfat ile etkileşimde olduğu varsayılmaktadır. Bütün arjinin 87



ve arjinin 133 varyantları için  $k_{cat}$  ve  $k_{cat}/K_m$ 'deki büyük düşüşler, bu rezidülerin kataliz için önemli olduğunu göstermiştir.  $k_{cat}$  ve  $k_{cat}/K_m$ 'deki büyük düşüşler arginin 87 ve arjinin 133'ün yerine lizinin geçtiği varyantlarda da görülmüştür. Bu rezidülerin CoA veya onların büyük yığınları ile etkileşimi optimum aktivite için önemli olduğunu ifade etmektedir. Desulfo-CoA enzim için kuvvetli yarışçı inhibitör olmuştur. Bu, CoA sülfidril grubunun CoA bağlanma enerjisinin optimizasyonu için önemli olduğunu, fakat sıkı bağlanma için önemli olmadığını göstermiştir [Iyer ve Ferry, 2001].

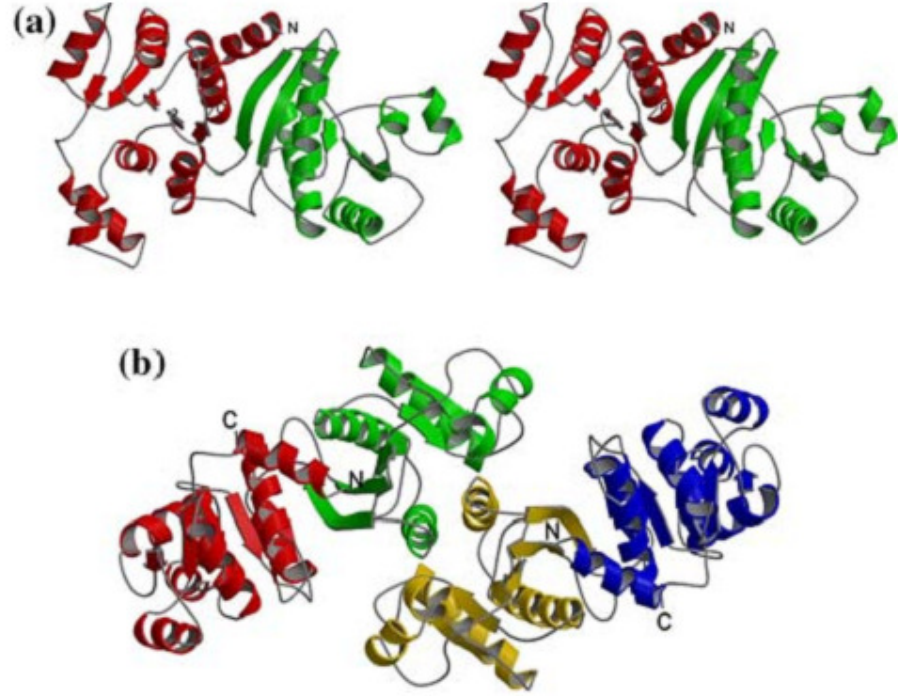
Pta enzimlerinin kristalize edilme çalışmalarına 2001 yılında Xu ve arkadaşlarının *S. pyogenes* Pta enzimini kristalize etmesi ile başlanmıştır. Bunu 2003 yılında Iyer ve arkadaşlarının *Metahnosarcina thermophila* Pta enzimini kristalize etmesi izlemiştir. Kristalize edilen bu Pta enzimi üzerine 2005 yılında Lawrence ve arkadaşları tarafından yapı fonksiyon belirleme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada Pta enzimi için ilk kez çalışma mekanizması önerilmiştir.

Pta için gösterilen reaksiyon mekanizması, bölge özgü yer değiştirilmiş varyantların kinetik analizleri, kristalize yapıdan elde edilen enzim aktif bölge mimarisine dair veriler ve bu tarihe kadar elde edilen Pta'lar için mekanik ve kinetik bilgilerle oluşturulmuştur. Asetil fosfatın fosfat grubunun, Pta'nın aktif bölgesine, katalitik öneme sahip Arg<sup>310</sup> ile koordine olmuş şekilde bağlandığı bildirilmiştir. Metil grubu enzimin Phe<sup>4</sup>, Leu<sup>5</sup>, Phe<sup>294</sup>, Ile<sup>297</sup>, Ile<sup>323</sup> ile oluşan hidrofobik paketinde yer alır. Şekil 2.7'de; CoA, Asp<sup>307</sup>, Pro<sup>296</sup>, Gly<sup>173</sup>, Ala<sup>150</sup>, Ser<sup>178</sup> tarafından oluşan pakette yer alan adenin halkası ile katalitik ilişkili oryantasyonda olduğu görülmüştür. Protein ve CoA arasında hidrojen bağları gösterilmiştir. Önerilen mekanizma, baz-kolaylaştırılmış kataliz boyunca işlemektedir. Bu, asetil fosfatın karbonil karbonuna direk olarak atakta bulunmak için tiyolat anyonuna ulaşmada, CoA'dan sülfidril protonun Asp<sup>316</sup> aracılı ayrımı ile oluşur (Şekil 2.7A). Bu mekanizma, negatif yüklü geçici durumun oluşumunu içerir. Bu Ser<sup>309</sup> tarafından teorik olarak kararlı olabilir (Şekil 2.7B). Asetil-CoA oluştuğu zaman (Şekil 2.7C), oluşan PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> iyonu Asp<sup>316</sup>'dan protonu ayırır. Fosfatın negatif yüklerinden biri dengeye ulaşır ve bu onu daha iyi protonlanmaya hazır grup yapar. Katalizin diğer turunda Asp<sup>316</sup>'nın deprotonlanmasını sağlar. Benzer mekanizma, karnitin ve kloramfenikol asetiltransferazlar için önerilmiştir [Lewendon et al., 1990, Wu, 2003].



**Şekil 2.7.** Pta tarafından katalizlenen reaksiyonun önerilen mekanizması. A) Substratlar aktif bölgeye bağlanmıştır. B) Negatif yüklü geçici durumun kararlılığı. C) Ürünler aktif bölgeye bağlanmıştır. Kesikli çizgiler kristal yapıda olduğu anlaşılan hidrojen bağlarıdır ve bitişik monomerlerden Lys<sup>257</sup> ve Gln<sup>244</sup> rezidüleri arasında oluşur. Oklar elektron akışını gösterir [Lawrence et al., 2005].

Aynı yıl Xu ve arkadaşları tarafından *Bacillus subtilis* Pta enzimi kristalize edilmiştir ve yapı, fonksiyon çalışmalarına ışık tutması sağlanmıştır (Şekil 2.8) [Xu et al., 2005].



**Şekil 2.8.** *B. subtilis* Pta'nın yapısı. A) Sırası ile, kırmızı ve yeşil renkli domain I ve II'li *B. subtilis* monomerinin stereo ribbon görüntüsü. b) *B. subtilis* dimer Pta'sının yapısı. Bir monomer Şekil 2.8a'daki gibi, diğer monomer; domain I ve II, sırası ile mavi ve sarı ile gösterilmiştir [Xu et al., 2005].

## 3. MATERYAL ve METOT

### 3.1 Materyal

Heidolph Promax 2020 GFL 1080 marka su banyosu, İmolab WTW Series pH ölçer, Heidolph MR 3004 safety manyetik karıştırıcı, Varioklav Typ 300 Otoklav, Sortorius Basic marka tartı, Beckman Coulter Allegra 64R marka santrifüj, Excella E25 marka çalkalamalı inkübatör, New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U410 premium marka -80°C dondurucu, Indesit TN5 (TK) marka -20° soğutucu, Mikro 120 Hettich Zantrifugen marka santrifüj, Sodium dodecyl sulfate (Sigma / L4509), TEMED (Merck / 1.10732), Tris-HCl (Calbiochem/ 648317), Triton X-100 (Merck/ 1.08603), Yeast extract granulated (Merck/ 1.03753.0500), 2-mercaptoethanol (Merck/ 8.05740.0250), Acrylamide (Merck/ 8.00830.1000), Acrylamide:N,N-methylene bis acrylamide (Fluka/ 01706), Agar (Fluka/ 05040), Agarose (Sigma/ A9539), Bradford reagent (Sigma/ SIB6916), Imidazole (Sigma/ I-0125), IPTG (Qiagen/ 12992), Kanamycin sulphate (Fluka/ 60615), MOPS sodium salt (Sigma/M9024), Peptone (kazeinden) (Merck/ 1.07213.1000), Potassium chloride (Sigma/ P3911), Sodium chloride (Merck/ 1.06404).

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. *Staphylococcus saprophyticus* Bakterisinde Olduğu Varsayılan *pta* Geninin PCR ile Çoğaltılması

##### 3.2.1.1. *pta* Geninin Çoğaltılması İçin Primer Dizaynı

*pta* geninin çoğaltılması için kullanılacak olan *Staphylococcus saprophyticus* SSP2124 (DSM 20229, ATCC 15305) bakterisinin genomik DNA'sı Doç. Dr. Ayhan Çelik (GYTE Kimya Anabilim Dalı) tarafından sağlanmıştır.

*Staphylococcus saprophyticus* bakterisinin varsayılan (putative) fosfotransasetilaz geninin DNA baz dizileri dikkatli bir şekilde incelenerek, geni

bakteri kromozomundan çoğaltacak DNA baz dizileri belirlenmiştir. PCR ürününün vektöre ligasyonunu kolaylaştırmak amacı ile yapışkan uç açığa çıkacak şekilde primerlerle 5' ucuna *NdeI* endonükleaz, 3' ucuna *BamHI* endonükleazına ait tanıma dizileri (*NdeI* için, 5'-CATATG-3'; *BamHI* için, 5'-GGATCC-3') ilave edilmiştir.

*BamHI* ve *NdeI* endonükleazları; gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması ve vektör DNA üzerinde çoklu klonlama bölgesinde (MCS) kesim yapan enzimlerden olmaları gibi önemli unsurlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Bu kriterler göz önünde bulundurularak dizayn edilen ve fosfotransasetilaz genini *Staphylococcus saprophyticus* genomundan çoğaltacak kullanılacak olan primer dizileri Şekil 3.1'de verilmiştir.

İleri Primer: 5'- AGG CCC **CAT ATG** ACT TTA TTA GAT GTA TTA CAA -3'

*NdeI* Kesim Bölgesi

*BamHI* Kesim Bölgesi

Geri Primer: 5'- TTG CTA **GGA TCC** TTA TTG CAA TGA TTG TGC -3'

**Şekil 3.1.** Fosfotransasetilaz genini *Staphylococcus saprophyticus* genomundan PCR ile çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.

### 3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Deneyi

Reaksiyon hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenerek, stok kontaminasyonun önlenmesi amacıyla günlük kullanımlar için steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılmıştır. Günlük stoklar hazırlandıktan sonra mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Fosfotransasetilaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *pta* geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
			(/50 µl)
<i>S. saprophyticus</i> kalıp DNA’sı	250 ng/µl	2,5 µl	650 ng
İleri Primer	10 µM	5 µl	1 µM
Geri Primer	10 µM	5 µl	1 µM
dNTP Karışımı	10 mM	5 µl	1 µM
Reaksiyon Tamponu	10 X	5 µl	1X
Paq DNA Polimeraz	5 U	0,5 µl	0,05 U
Deiyonize Su	-	27,5 µl	-
TOPLAM	-	50 µl	-

0.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünde bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan PCR cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırılmıştır.

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık ( $T_m$  = annealing sıcaklığı) primer alınan firma tarafından bildirilmiştir. Buna göre  $T_m$  değerleri;

İleri Primer için (5'- AGG CCC **CAT ATG** ACT TTA TTA GAT GTA TTA CAA -3')  $T_m = 57.4^\circ\text{C}$

Geri Primer için (5'- TTG CTA **GGA TCC** TTA TTG CAA TGA TTG TGC -3')  $T_m = 59.3^\circ\text{C}$ 'dir.

Bu durumda annealing sıcaklığı için (Annealing sıcaklığı hesaplanan  $T_m$  değerinin 2-5 °C aşağısı alınmaktadır) ilk beş döngüde 50 °C, kalan 25 döngü için 58°C olacak şekilde gradient uygulanmıştır.

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda hazırlanan Thermal Cycler programı Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Fosfotransasetilaz geninin *Staphylococcus saprophyticus* DNA'sından amplifikasyonu için PCR cihazına uygulanan program.

Program Grupları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	95°C	5 dakika	1
2	94°C	30saniye	5
	50°C	30 saniye	
	72°C	1,5 dakika	
3	94°C	30 saniye	25
	58°C	30 saniye	
	72°C	1 dakika	
4	72°C	5 dakika	1
5	4°C	1 saat	1

### **3.2.2. PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Saflaştırılması**

PCR programı tamamlandıktan sonra reaksiyon ürününden 40 µl alınarak üzerine 8 µl 6X yükleme tamponu ilave edilmiş ve hafifçe pipetlenerek homojenize hale getirilmiştir. Elde edilen karışım markır DNA ile birlikte % 1'lik agaroz jelin kuyularına dikkatli bir şekilde yüklenmiş ve önce 30V'da 15 dakika, sonra 150 V'da 45 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Beklenen moleküler ağırlıkta oluşan tek bir DNA bantı temiz bir bistüri yardımı ile dikkatli bir şekilde kesilerek alınmış ve darası alınan temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konarak miktarı tespit edilmiştir. DNA, RTA agaroz jelden saflaştırma kiti (RTA firması) protokolüne göre agaroz jelden arındırılmıştır.

Saflaştırılan DNA'dan 5 µl'si alınarak yeniden % 1'lik agaroz jelde aynı koşullarda elektroforeze tabi tutulmuştur. Miktarı bilinen markır DNA'sı baz alınarak, UV altında parlaklık ve göreceli büyüklüğe göre izole edilen DNA miktarı belirlenmiştir. Daha sonra DNA kesiminde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.3. *S. saprophyticus* Fosfotransasetilaz Geninin *BamHI* ve *NdeI* Endonükleazlar İle Kesimi**

PCR ile sentezlenip miktarı belirlenen *S. saprophyticus* fosfotransasetilaz genini vektör pET28a ile ligasyona tabi tutmak için, DNA'nın her iki ucunun uygun restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu sırasında primerlerle yerleştirilen *BamHI* ve *NdeI* kesim bölgeleri kullanılarak yapılan kesimde DNA'nın her iki ucunda yapışkan uç elde edilmiştir. Fosfotransasetilaz geninin *NdeI* ve *BamHI* endonükleazlar ile kesim reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.



**Çizelge 3.3.** Fosfotransasetilaz geni kesim reaksiyonu bileşenleri.

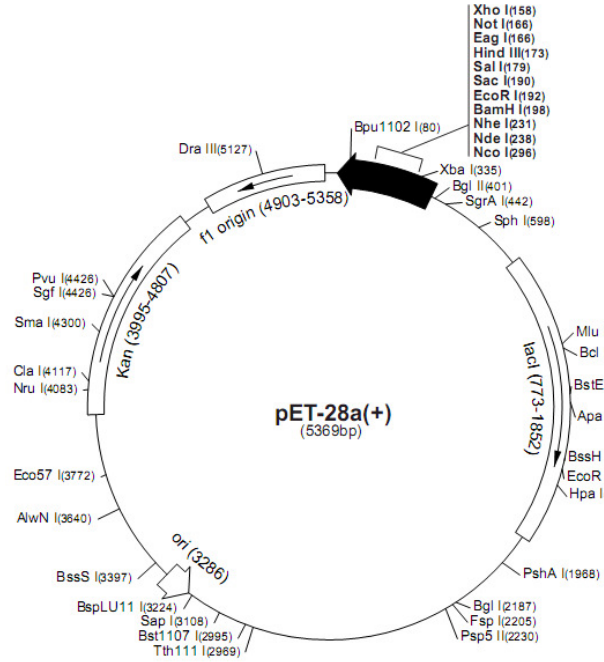
Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon (/50 µl)
<i>S.sp-pta</i>	36 ng/µl	42 µl	450 ng
Reaksiyon Tamponu	10 X	5 µl	1 X
( <i>BamHI</i> )			
<i>NdeI</i>	10 U/µl	1µl	0,5 U
<i>BamHI</i>	10 U/µl	1µl	0,5 U
Deiyonize su	-	8 µl	-
TOPLAM	-	50 µl	-

Kesim reaksiyonu *BamHI* enziminin star aktivitesi olması nedeni ile iki basamakta yapılmıştır. İlk olarak, *BamHI* enzimi olmaksızın, *NdeI* kesim reaksiyonu 37°C'e ayarlanmış su banyosunda 1.5 saat bekletilmiştir. Daha sonra *BamHI* enzimi eklenerek kesim reaksiyonuna aynı koşullar altında 1.5 saat devam edilmiştir.

Kesim ürününün izolasyonu için kesim reaksiyonun hepsi % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Ligasyon reaksiyonu kurmadan önce alıcı vektörün miktarının bilinmesi gerektiğinden, 5 µl'si % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Miktarı bilinen markır DNA'sı baz alınarak, UV altında parlaklık ve göreceli büyüklüğe göre izole edilen DNA miktarı belirlenmiştir. Daha sonra DNA ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.4. pET28a Klonlama Vektörünün İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması**

*S. saprophyticus pta* geninin klonlanması için pET28a(+) klonlama vektörü kullanılmıştır. Bu vektörün seçilme nedeni, klonlama bölgesinin 5' ucunda His-Tag bölgesinin bulunmasıdır. Böylece, Ni-NTA kullanılarak protein saflaştırılması sağlanmış olacaktır. Kullanılan pET28a'a ait vektör haritası Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** Klonlama vektörü *pET28a*'nın vektör haritası.

### 3.2.4.1. *pET28a* Klonlama Vektörünün İzolasyonu

*E. coli* Top10 hücrelerinden *pET28a(+)* vektörünün izolasyonu için, LB/Kan plaklarından *pET28a(+)* içeren *E. coli* Top10 koloni seçimi yapılmıştır. Steril kürdanla seçilen koloni 5 ml LB/Kan sıvı besiyerine batırılarak, 37°C'e ayarlanmış inkübatörde gece boyu büyümeye bırakılmıştır. Sabah büyüyen hücre kültüründen *pET28a(+)* klonlama vektörü plazmit izolasyon kiti (RTA Firması, GEBZE) kullanılarak izole edilmiştir.

İzole edilen *pET28a(+)* klonlama vektörünün görüntülenmesi ve miktar tayini için % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur.

### **3.2.4.2. pET28a Klonlama Vektörünün *NdeI* ve *BamHI* Endonüklazları ile Kesimi**

İzolasyonu yapılan ve miktarı belirlenen pET28a(+) plazmit DNA'sı *NdeI* ve *BamHI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) hale getirilmiştir. *NdeI* ve *BamHI* endonükleazları plazmidin her iki ucunda yapışkan uçlar meydana getirmiştir. pET28a(+) plazmit DNA'sının *NdeI* ve *BamHI* endonükleazları ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.3'de verilenlerle aynıdır. Fakat kesim ürünü olarak *Ssp*-Pta yerine 35 µl 12ng/µl konsantrasyona sahip pET28a(+) vektörü kullanılmıştır.

Kesim reaksiyonu *BamHI* enziminin star aktivitesi olması nedeni ile iki basamakta yapılmıştır. İlk olarak, *BamHI* enzimi olmaksızın, *NdeI* kesim reaksiyonu 37°C'e ayarlanmış su banyosunda 1.5 saat bekletilmiştir. Daha sonra *BamHI* enzimi eklenerek kesim reaksiyonuna aynı koşullar altında 1.5 saat devam edilir.

Kesim ürününün izolasyonu için kesim reaksiyonun hepsi % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Ligasyon reaksiyonu kurmadan önce alıcı vektörün miktarının bilinmesi gerektiğinden, 5 µl'si % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Miktarı bilinen markır DNA'sı baz alınarak, UV altında parlaklık ve göreceli büyüklüğe göre izole edilen DNA miktarı belirlenmiştir. Daha sonra DNA ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.5. *S. saprophyticus* Fosfotransasetilaz Geninin pET28a(+) Vektörü ile Ligasyonu**

*BamHI* ve *NdeI* endonükleazları ile kesilen pET28a klonlama vektörü ile *S. Saprophyticus* fosfotransasetilaz geni için ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri, Çizelge 3.4'de verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** *pET28a(+)* vektörü ile fosfotransasetilaz geninin ligasyon reaksiyon bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
<i>Ssp.- Pta/BamHI-Ndel</i>	3 ng/μl	15 μl	45 ng
<i>pET28a/BamHI-Ndel</i>	12 ng/μl	1,25 μl	16,2 ng
T4 Ligaz	5 U/μl	1 μl	0,1 U
T4 Ligaz Tamponu	10X	2 μl	1 X
TOPLAM	-	19,25 μl	-

Elde edilen ligasyon reaksiyonu 16 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon sıvısı bir gece -20°C’de saklanmıştır. Ertesi gün ligasyon karışımından 5μl alınarak *E. coli* BL21 (DE3) bakterisine transferde kullanılmıştır.

### **3.2.6. Fosfotransasetilaz Geni Taşıyan *pET28a(+)* Vektörünün *E. coli* Top10 Bakterisine Transferi**

Ligasyon ürünlerinin *E. coli* Top10 hücrelerine aktarımından önce, bu hücreler kompetant hale getirilmiştir. Kompetant hücre hazırlamak için, öncelikle *E. coli* BL21 (DE3) bakterisinin -80 stoğundan 5μl’i 1 gece önce 30 μg/ml kanamisin içeren 5 ml hacimli LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün, üremiş olan kültürden 50 ml hacimli LB sıvı besiyerine %1 olacak şekilde inoküle edilmiş ve 37 °C’de  $OD_{600nm} \cong 0.4$  oluncaya kadar (~2.5-3.0 saat) üretilmiştir. Bakteri buz üzerine alınarak 50 ml hacimli steril santrifüj tüplerine 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Bakteri kültürü 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısım dökülerek pelet 2 ml soğuk 0.1 M ile yıkanmıştır. Bakteri kültürü 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılarak bakteri peleti 2 ml soğuk 0.1 M  $CaCl_2$  ile çözülmüş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. Bakteri kültürü 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Süpernatant dökülerek bakteri peleti 1000 μl soğuk 0.1 M  $CaCl_2$  ile tekrar çözülmüştür. Bakteri kültürü steril mikrosantrifüj tüplerine 50’er μl olacak şekilde paylaştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.5’de verilen ligasyon karışımından 5 µl alınarak hazırlanan kompetant hücrelere transforme edilmiştir. Transformasyon işlemi için, kompetent *E. coli* BL21 bakterisi bulunduran 5 adet mikrosantrifüj tüpü buz üzerine alınmıştır. Dördüne tanesine 5 µl ligasyon sıvısı ilave edilerek hafifçe pipetlenmiş ve karışım homojen hale getirilmiştir. Diğer tüpe ise ligasyon kontrol grubunun 5 µl’i ilave edilmiş (sadece kesilen vektörü içerir) ve kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Tüpler buz üzerinde en az 30 dk bekletilmiştir. Tüpler 42 °C’de 90 saniye tutulmuş ve hemen tekrar buz üzerine alınmıştır. Tüplerdeki sıvıların üzerine 450 µl LB sıvı besiyerleri (antibiyotik içermiyor) boşaltılarak 37 °C’de 1 saat süreyle üretilmiştir. Daha sonra bakteriler 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. İçinde yaklaşık 200 µl kalacak şekilde üst sıvı atılmıştır. Bu 200 µl içerisinde çöken hücreler süspanse edilmiş ve 30 µg/ml kanamisin içeren LB agar plaklarına steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmiştir. Plaklar 5-10 dk kurutulduktan sonra ters çevrilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatöre ertesi güne kadar üremeye bırakılmıştır.

### **3.2.7. Rekombinant *E. coli* Kolonilerinin Seçimi ve Karakterizasyonu**

#### **3.2.7.1. Ligasyonun Klone PCR Analizi ile Kontrolü**

Transformasyon plağında gelişen kolonilerden 5 tanesi steril kürdan yardımı ile seçilerek önce koloni PCR tüpüne, sonra LB/Agar/Kan plaklarına ekilerek 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. PCR koloni; Çizelge 3.3’deki reaksiyon ortamı oluşturularak Çizelge 3.2’deki program uygulanarak yapılmıştır. Koloni PCR ile ligasyonun başarılı olduğu, gene özgü primerlerin bu geni çoğaltarak % 1’lik agaroz jelde istenen büyüklükte band oluşumu ile görüntülenmiştir. Seçilen kolonilerden istenen bandı içeren koloni, LB/Agar/Kan plaklarından steril kürdan ile seçilip 5 ml LB/Kan sıvı besiyerine ekilip, 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün plazmid izolasyon protokolü (RTA kullanılarak plazmid izolasyonu sağlanır).

### **3.2.7.2. SspPta-pET28a Vektörünün *Bam*HI ve *Nde*I Endonükleazlarla Kesimi**

Ligasyon sonucu oluşan SspPta-pET28a vektörünün ligasyon kontrolü yapılması için, üzerinde bulunan *Nde*I ve *Bam*HI kesim bölgeleri kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyon bileşenleri için Çizelge 3.4'a bakınız.

### **3.2.7.3. pta Geni Dizi Analizi**

DNA dizi analizi için SspPta-pET28a vektörünün yaklaşık 20 ng/µl'den 45 µl'si kullanılarak, dizi analizi için RefGen Firması (ANKARA) tarafından yapılmıştır.

### **3.2.8. *S. saprophyticus* Fosfotransasetilaz Geni Taşıyan pET28a(+) Vektörünün BL21 (DE3) Hücrelerine Transferi**

İzolasyonu yapılan fosfotransasetilaz geni taşıyan pET28a vektörünün 5 µl'si alınarak Bölüm 3.2.6'da belirtildiği gibi *E. coli* Top10 bakterisine transfer edilmiştir.

### **3.2.9. Fosfotransasetilazın Ekspresyonu ve Saflaştırılması**

#### **3.2.9.1. *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinde Pta Ekspresyonu**

30 µg/ml Kanamisin içeren LB agar plaklarından BL21(DE3) hücre kolonilerinden biri steril kürdanla seçilerek 5ml LB sıvı besiyerine ekilmiştir. 37°C'de gece boyu büyümeye bırakılan kültür sabah 1litrelik flaskta 5 g KCl içeren 1 litre LB/Kan besiyerine aktarılmıştır. 30°C'de OD<sub>600</sub> 0.6 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır (yaklaşık 3.5-4 saat). OD<sub>600</sub> 0.6'a ulaştığında son konsantrasyonu 0.25 mM olacak şekilde IPTG ile uyarılmış ve oda koşullarında gece boyu büyümeye bırakılmıştır.

### 3.2.9.2. Hücre Ekstratından Pta İzolasyonu

*E. coli*/S.spPTA-pET28a bakterisinden hücre içi protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Gece boyu büyümeye bırakılan hücreler 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjle çöktürülmüştür. Elde edilen bakteri peleti hacminin 10 katı kadar lizis tamponunda çözülmüştür. Elde edilen bakteri çözeltisi buz içerisinde 40 saniye süre ile 15 kez 3'er dakika ara ile sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Açığa çıkan hücresel atıklar 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj ile uzaklaştırılmıştır.

### 3.2.9.3. Ni-NTA Kolon Kullanılarak His-Tag'lı Rekombinant Pta'nın Saflaştırılması

Sonikasyon sonrası yapılan santrifüjden yaklaşık 65 ml süpernatant elde edilmiştir. Süpernatanttan His-Tag'lı proteinlerin izolasyonuna geçmeden önce, resin kolonun daha önce saflaştırma deneylerinin olası kalıntılarından arındırmak için; resinin 5ml'i Tampon A (500 mM imidazol içeren 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH; 7.5) ile 10 kez yıkanmıştır. Olası protein kalıntılarından arındırılan kolon, imidazol içermeyen yıkama tamponu ile 20 kez yıkanarak imidazolden arındırıldı. Protein ekstratı kolona yüklenerek akan süzüntü toplanmıştır. Tüm protein ekstratı aktıldıktan sonra 25 ml imidazolsüz Tris-HCl tamponunda yıkanan kolon, önce 0.010 M ve sonra 0.2 M imidazol içeren Tris-HCl/NaCl tamponu ile yıkanmıştır. 10 mM imidazol içeren tamponla 1'er ml'lik 14 fraksiyon toplanmışken, 200 mM imidazol içeren tampon ile 16 fraksiyon toplanmıştır.

### 3.2.9.4. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE jel ile fraksiyonlarda toplanan proteinlerin görüntülenmesi sağlanmıştır. SDS-PAGE'de yürütülmek üzere, sonikasyon sonrası peletten, kolon yıkaması sırasında elde edilen tutunmayan protein fraksiyonundan, süpernatanttan ve 10 mM ve 200 mM imidazol içeren elute tamponu ile toplanan fraksiyonlardan örnekler hazırlanmıştır.

%12'lik toplayıcı jel aşağıda verilen oranlarda kimyasalların ilavesiyle hazırlanır:

Cinsi	Yürütme Jeli	Yükleme Jeli
Su	3.3 ml	1.4 ml
%30 Akrilamid Karışımı	4.0 ml	0.33 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-
1 M Tris (pH 6.8)	-	0.25 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.02 ml
%10 amonyum persülfat	0.1 ml	0.02 ml
TEMED	0.004 ml	0.002 ml

**Çizelge 3.5.** SDS-PAGE hazırlamada kullanılan kimyasallar [Laemmli, 1970].

Yürütme jeli hazırlanırken polimerizasyonu sağlayan amonyum persülfat ve TEMED çözeltilerinin en son ilave edilmesine dikkat edilmiştir. Daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde su ilave edilerek donması için 45 dk beklenmiştir. Jel donduktan sonra üstteki su bir peçeteye emdirilerek alınmıştır. Bu arada yukarıda verilen oranlarda kimyasalların karışımıyla yükleme jel bir erlen içerisine hazırlanmıştır:

1.8 ml Akrilamid, 3.65 ml Tris (0.5 M, pH 6.8), 0.15 ml SDS (%10), 9.4 ml Saf su

Polimerizasyonu sağlamak için 100 µl amonyum persülfat (%10) ve 10 µl TEMED eklenerek bir pipet yardımıyla yürütme jelin üzerine dökülmüştür. Jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dk beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak yarısına kadar elektrod solüsyonu konmuş olan tankın içerisine kısa cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Karşı tarafa iki cam levha yan yana konularak uzun cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra iki cam levhanın arasına jelin üzerine çıkacak kadar, dışına ise 2-3 parmak yüksekliğinde elektrod solüsyonu ilave edilmiştir [Laemmli, 1970].



Örneklerden 5X, 6X yükleme tamponundan 1X olacak şekilde ependorf tüplerinde SDS-PAGE örnekleri hazırlanmıştır. 10 dakika kaynatma sonrası kısa süreli santrifüj edilen örnekler, SDS-PAGE kuyularına dikkatlice yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur.

Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE görüntülerine bakılarak, uygun örnekler bir araya getirilerek diyaliz tamponunda (2 mM 2-merkaptoetanol, 50 mM KCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponu) diyaliz edilmiştir.

### **3.2.9.5. Bradford Metodu İle Protein Miktar Tayini**

Diyaliz edilen 7-13 numaralı karışım içerisindeki protein miktarı Bradford metodu ile belirlenmiştir [Bradford, 1976].

. Bu protokol ile protein miktarı belirlemek için mikrolaka okuyucusu olması şarttır. Metoda göre;

1) Bradford boya ajanının 1 hacmine, distile suyun 4 hacmi eklenir. Olası partikülleri uzaklaştırmak için Whatman # 1 filtresinden geçirilir. Bu boya oda sıcaklığında yaklaşık iki hafta kullanılabilir.

2) 5 farklı dilüsyonda (0.05 mg/ml- 0.5 mg/ml) protein standartları hazırlanır. Kullanmadan önce mikrolaka okuyucuda okunup, standartların lineer olmasına dikkat edilir.

3) Her standart ve örneklerden 10 µl alınıp, plakanın kuyularına yüklenir.

4) Her kuyuya boya solüsyonundan 200 µl eklenir. Mikrolaka karıştırıcıda veya temiz pipet ucu ile dikkatlice karıştırılır.

5) En az 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

6) Örnek yüklü plaka 595 nm absorbansta okutulur.

### 3.2.9.6. MALDI-TOF Analizi

Rekombinant proteinin moleküler ağırlığı MALDI-TOF kütle spektrometre ile analiz edildi. Analiz için 50 µl enzim (1 mg/ml) solüsyonuna 500 µl %20'lik TCA çözeltisi eklendi ve 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen pelete, 500 µl aseton eklenerek, 3-5 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilerek tekrar çöktürüldü. Oda sıcaklığında kurutulan pelet, daha önce formik asit/su/izopropanol (1/3/2) çözeltisinde doyurulmuş sinapinik asit matriksinin 30 µl'si ile süspanse edildi. Bu örnekten 3 µl alınarak MALDI-TOF plakaya damlatıldıktan sonra kurutulup analizi yapıldı.

### 3.2.10. Pta Aktivite Tayini

Pta aktivitesi, daha önce belirtilen spektrofotometrik yöntemle 233 nm'de Asetil-CoA'nın oluşumunu zamana karşı (toplam 120 sn) takip edilerek ölçülmüştür [Lawrence et al.,2005]. Reaksiyon karışımı (toplam 500 µl): 455 µl tampon B (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 115 mM KCl, 2mM DTT), 25 µl asetil-fosfat (suda çözünmüş 72 mM) , 20 µl CoA'dan (suda çözünmüş ve 3 mM DTT içerir) oluşmaktadır. Reaksiyon karışımı istenilen sıcaklığa gelince (~ 3 dk), 2 µl enzim eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.

#### 3.2.10.1. Enzim Miktarının Başlangıç Hızına Etkisi

Enzim miktarını seri halde seyreltmek için enzim dilüsyon tamponu (25 mM MOPS tamponu, 50 mM KCl, 2 mM DTT, %10 gliserol içeren) ile 10 kattan 150 kata kadar enzim dilüsyonları hazırlanarak; 3.6 mM asetil-fosfat, 0.16 mM CoA ile oda sıcaklığında reaksiyona tabi tutulmuştur. Enzim aktivite ölçümlerinde 2 mM 2-merkaptoetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7.5 tamponu kullanılmıştır.

### **3.2.10.2. Asetil-Fosfat için $K_m$ Değerinin Belirlenmesi**

Enzim miktarı 0.02 µg, CoA miktarı 0,12 mM'da sabit tutulup 0.0144'ten 3.6 mM'a kadar seri asetil-fosfat miktarları oluşturularak 25 °C'de reaksiyona tabi tutulmuştur.

### **3.2.10.3. CoA için $K_m$ Değerinin Belirlenmesi**

CoA'a karşı spesifik aktivite belirlenirken; enzim miktarı 0,02 µg, asetil-fosfat miktarı 3.6 mM'da sabit tutulup 1.6'dan 200 µM'a kadar seri CoA miktarları oluşturularak 25 C°'de reaksiyona tabi tutulmuştur.

### **3.2.10.4. Farklı Tuzların Pta Aktivitesine Etkisi**

Pta üzerine KCl, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuzlarının etkileri incelenmiştir. Her tuz için 1M stok solüsyonu hazırlanmıştır. 0.02 µg enzim, 4.32 mM asetil-fosfat, 0.12 mM CoA miktarında 20 mM'dan 200 mM'a kadar tuz konsantrasyonları varlığında enzim aktivite değişimi incelenmiştir.

### **3.2.10.5. pH'ın Pta Aktivitesine Etkisi**

Pta üzerine pH etkisini incelemek için 50 mM MOPS ve 50 mM Tris tamponu kullanılmıştır. 6.5- 8.0 pH aralığı için MOPS tamponu, 7.5-9.0 pH aralığı için Tris tamponu kullanılmıştır. Reaksiyon 0.02 µg enzim, 0.12 mM CoA, 3.6 mM asetil-fosfat varlığında 25°C'de gerçekleşmiştir.

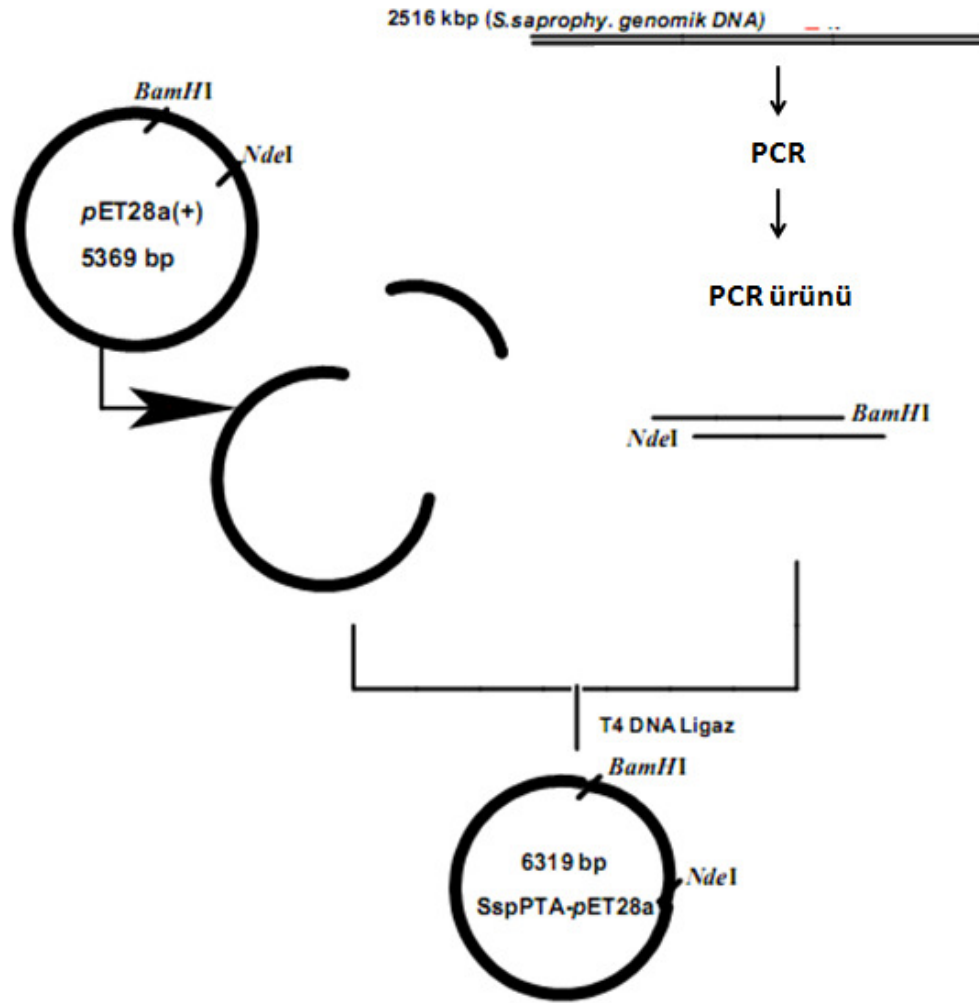
### **3.2.10.6. Sıcaklığın Pta Aktivitesine Etkisi**

Pta üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 2 mM 2-merkaptöetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7,25 tamponu kullanılmıştır. 10°C'den 80°C'e kadar sıcaklık değişiminde enzim (0.02 µg) ve substrat miktarları (asetil-fosfat, 3.6 mM; CoA, 0.12 mM) sabit tutularak ölçüm yapılmıştır. Sıcaklık değişimleri su banyosu kullanılarak yapılmıştır.

## 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

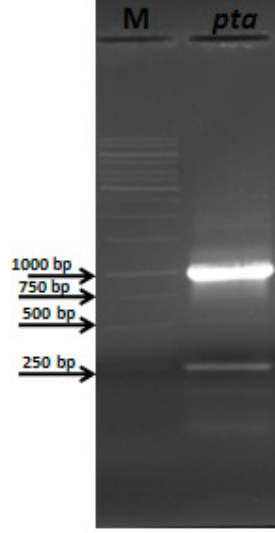
### 4.1. Fosfotransasetilaz Geninin Klonlanması

*S. saprophyticus pta* geninin *pET28a(+)* vektörüne klonlama aşamaları özetle Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



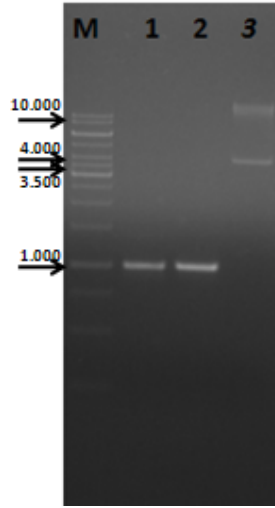
Şekil 4.1. *S. saprophyticus pta* geninin *pET28a (+)* vektörüne klonlama aşamaları.

İlk önce, *pta* genine spesifik primerler (bkz. Şekil 3.1) kullanılarak tahmini büyüklükteki gen (~ 1000 bp) PCR ile çoğaltılarak elde edildi (Şekil 4. 2).



**Şekil 4.2.** Fosfotransasetilaz genine ait PCR ürününün % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: markır, *pta*: PCR ürünü.

Daha sonra, plazmit izolasyonu kiti (RTA firması Gebze) ile saflaştırılması yapıldı (Şekil 4.3).



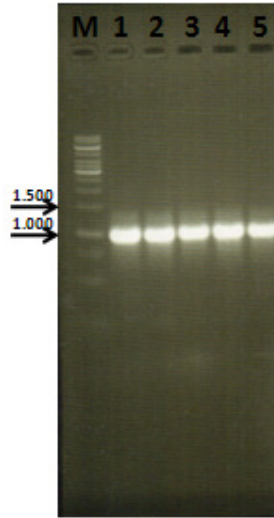
**Şekil 4.3.** İzolasyonu yapılan pET28a(+), *pta* geninin agaroz jelde görüntülenmesi. M, markır; 1-2, *pta* geni; 3, pET28a(+)

Saflaştırılan PCR ürünü ile pET28a(+) vektörü *NdeI* ve *BamHI* endonükleazlar ile kesilerek ligasyona hazırlandı. Kesilen parçalar 3/1 insört/vektör oranı T4 DNA

ligaz enzimi kullanılarak ligasyon reaksiyonuna tabi tutuldu. Ligasyon ürünleri %1'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.5).

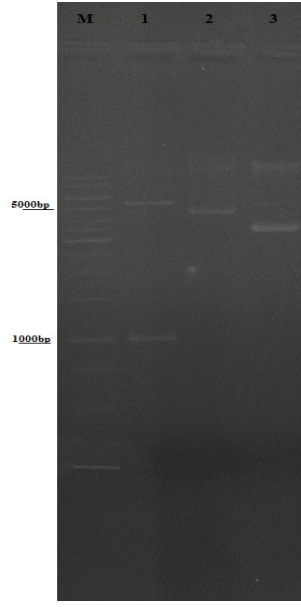
#### 4.1.1. Ligasyon Kontrolü

*E.coli* Top10 hücrelerine aktarılan ligasyon ürünleri, 30 µg/ml Kanamisin içeren plaklarda koloni seçimi için büyütüldü. Seçilen koloniler ile koloni PCR yapıldı. Koloni PCR sonuçları ile %1'lik agaroz jelde, 987 baz çiftlik *pta* geni büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** % 1'lik agaroz jelde PCR koloni ürünlerinin görüntülenmesi. M; markır, 1-5 numaralı seçilen kolonilerin PCR ürünleri.

Ligasyon reaksiyonun bir diğer kontrolü için, plasmid SspPTA-pET28a(+) *NdeI* ve *BamHI* endonükleazlarla kesime tabi tutulmuştur (Şekil 4.5). Kesim sonucu plazmidin *pta* geni büyüklüğünde parça attığı gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** SspPta-*pET28a* vektörünün *Bam*HI ve *Nde*I endonükleazlarla kesimi. M; markır, 1; SspPta-*pET28a* vektörü kesim reaksiyon ürünleri 2; SspPta-*pET28a* vektörü 3; *pET28a* vektörü.

#### 4.1.2. *pta* DNA Dizi Analiz Sonucu

RefGen Firması'na (Ankara) yaptırılan dizi analizi sonuçlarına göre, *pET28a* (+) vektörüne aktarılan gen parçasının *S. saprophyticus* bakterisinin olası *pta* geni olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.6). Dizi analiz sonucunda elde edilen dizi kromotogramları Ek-1 ve Ek-2'de gösterilmektedir. Bu sonuçlar, KEGG veribankasında verilen *S. saprophyticus* genom haritasında olduğu varsayılan *pta* gen dizisi ile karşılaştırıldığında; 270. glisin rezidüsünün glutamik aside dönüştüğü görülmüştür.

1	TTG GCG TAA TTC CCT CTA GAA TAT TTT GTT TAC TTT AAG AAG GAG	45
46	ATT ACC ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly	90
91	CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG ACT TTA TTA GAT GTA TTA CAA Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Thr Leu Leu Asp Val Leu Gln	135
136	GAA AAA CTT ACG GGA AAA AAC GTG AAA ATC GTT TTA CCA GAA GGT Glu Lys Leu Thr Gly Lys Asn Val Lys Ile Val Leu Pro Glu Gly	180
181	GAA GAC GAG CGC GTA TTA GAA GCG GCA ACA CAA TTA CAA GGT ACT Glu Asp Glu Arg Val Leu Glu Ala Ala Thr Gln Leu Gln Gly Thr	225
226	GAT TAT GTT TCT CCT ATA TTA TTA GGA AAT GAA TCG AAC ATC AAA Asp Tyr Val Ser Pro Ile Leu Leu Gly Asn Glu Ser Asn Ile Lys	270
271	GCC TTA GCT AGT GAT AAA GGT TTA GAA ATT TCA GAT TTA GAA ATC Ala Leu Ala Ser Asp Lys Gly Leu Glu Ile Ser Asp Leu Glu Ile	315
316	ATT GAC CCA GAA ACA AGC GAA TTG AAA CAA GAA CTT GTT ACT GCA Ile Asp Pro Glu Thr Ser Glu Leu Lys Gln Glu Leu Val Thr Ala	360
361	TTT GTT GAA CGC CGT AAA GGT AAA GCG ACT GAA GAA CAA GCG CAA Phe Val Glu Arg Arg Lys Gly Lys Ala Thr Glu Glu Gln Ala Gln	405
406	GAG ATG TTG AAA GAT GTT AAC TAC TTT GGG ACA ATG CTT GTT TAT Glu Met Leu Lys Asp Val Asn Tyr Phe Gly Thr Met Leu Val Tyr	450
451	ACT GGT AAA GCA GAA GGT TTA GTA AGT GGT GCG GCA CAT TCA ACT Thr Gly Lys Ala Glu Gly Leu Val Ser Gly Ala Ala His Ser Thr	495
496	GGT GAT ACG GTA CGT CCA GCG TTA CAA ATC ATC AAA ACA AAA CCA Gly Asp Thr Val Arg Pro Ala Leu Gln Ile Ile Lys Thr Lys Pro	540
541	GGT GTC TCT AAA ACT TCT GGT ATT TTC TTC ATG ATT AAA GAC GAT Gly Val Ser Lys Thr Ser Gly Ile Phe Phe Met Ile Lys Asp Asp	585
586	AAA CAA TAT ATC TTT GGA GAT TGT GCA ATC AAT CCA ACA CTT GAA Lys Gln Tyr Ile Phe Gly Asp Cys Ala Ile Asn Pro Thr Leu Glu	630
631	GCA CAA GAT TTA GCA GAA ATA GCT GTG GAA AGT GCA AAA TCT GCT Ala Gln Asp Leu Ala Glu Ile Ala Val Glu Ser Ala Lys Ser Ala	675
676	AAA AGC TTT GGC ATG TCA CCA CGC GTT GCA ATG TTA AGC TTC TCA Lys Ser Phe Gly Met Ser Pro Arg Val Ala Met Leu Ser Phe Ser	720
721	ACT AAA GGT TCT GCA AAA TCT GAC GAT GTT GAA AAA GTT GCA ACT Thr Lys Gly Ser Ala Lys Ser Asp Asp Val Glu Lys Val Ala Thr	765
766	GCT GTT AAC TTA GCT CAA GAG AAA ATT GAA GCA GAT CAT TTA GAA Ala Val Asn Leu Ala Gln Glu Lys Ile Glu Ala Asp His Leu Glu	810
811	GAT GTT GTT GTA GAT GGT GAA TTC CAA TTT GAC GCA GCA ATT GTA Asp Val Val Val Asp Gly Glu Phe Gln Phe Asp Ala Ala Ile Val	855
856	CCT GAA GTT GCT AAG AAA AAA GCA CCT GAT GCA AAA ATT CAA GGC Pro Glu Val Ala Lys Lys Lys Ala Pro Asp Ala Lys Ile Gln Gly	900
901	GAT GCA AAT GTA TTC GTA TTC CCA AGC TTA GAA GCA GGT AAT ATT Asp Ala Asn Val Phe Val Phe Pro Ser Leu Glu Ala Gly Asn Ile	945
946	GGT TAC AAA ATT GCA CAA CGT TTA GGC GAA TTT GAT GCA GTA GGT Gly Tyr Lys Ile Ala Gln Arg Leu Gly Glu Phe Asp Ala Val Gly	990
991	CCA GTA TTA CAA GGT CTT AAT TCT CCA GTG AAT GAT TTA TCA CGT Pro Val Leu Gln Gly Leu Asn Ser Pro Val Asn Asp Leu Ser Arg	1035



```
1036 GGC TGT TCT AAA GAA GAC GTG TAT AAT TTA TCA ATC ATT ACT GCA 1080
      Gly Cys Ser Lys Glu Asp Val Tyr Asn Leu Ser Ile Ile Thr Ala
1081 GCA CAA TCA TTG CAA TAA 1098
      Ala Gln Ser Leu Gln End
```

**Şekil 4.6.** Dizi analizi sonucu belirlenen *pta* baz dizisi. İlk 111 baz pET28a(+) vektörüne aittir. *pta* genine ait kısım 112. bazdan itibaren başlamaktadır. Ayrıca, kodladığı amino asit dizisi alt kısımda verilmiştir.

#### **4.1.3. *S. saprophyticus* Pta Amino Asit Dizisinin Diğer Pta Dizileri ile Karşılaştırması**

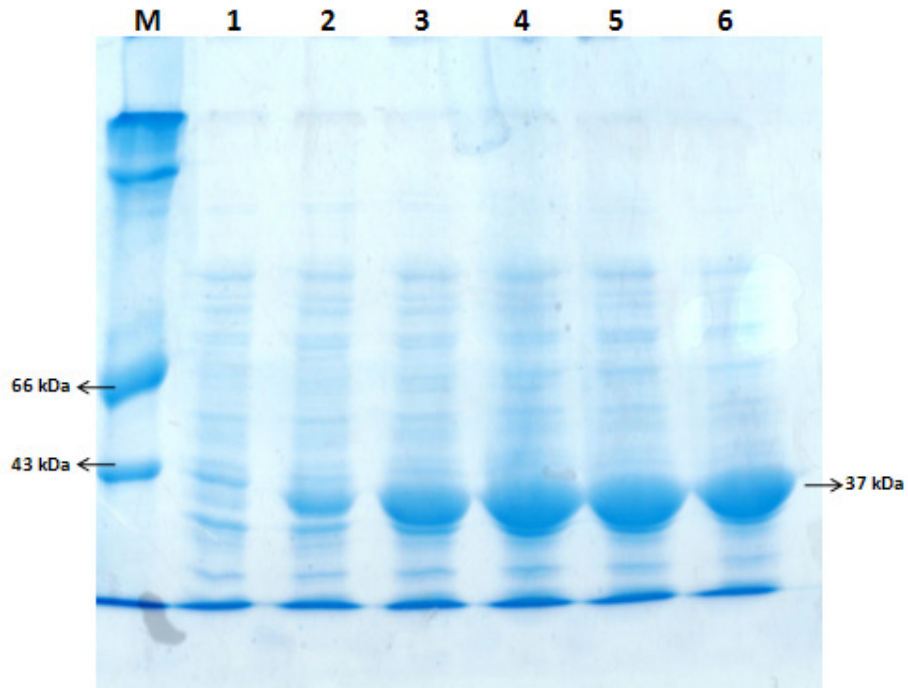
Kristal yapısı bilinen *B. subtilis*, *M. thermophila*, *S. pyogenes* bakterilerinden elde edilen Pta ile *S. saprophyticus* bakterisinden elde edilen Pta arasındaki dizi benzerliği LALIGN [Huang and Miller 1991] programı ile incelenmiştir. Bu karşılaştırmaya göre *S. saprophyticus* Pta *M. thermopyla* Pta'sı ile %45.8, *S. pyogenes* Pta'sı ile %56.5, *B. Subtilis* Pta'sı ile %67.1 dizi benzerliği göstermiştir. Bu sonuçlara göre yapı ve fonksiyon için en yakın benzerliğe sahip olan *B. Subtilis* Pta'sıdır (Şekil 4.7). *S. Saprophyticus* Pta'sının karakterizasyonu yapılırken *B. subtilis pta*'sı ile karşılaştırmaya gidilmiştir.



## 4.2. Pta'nın Ekspresyonu ve Saflaştırması

### 4.2.1. Pta Ekspresyonu

. Plasmidi taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ile 100 ml'lik küçük kültür başlatıldı ve zamana karşı ekspresyon olup olmadığı gözlemlendi. Şekil 4.8'den de görüleceği gibi 37 °C'de IPTG ile indüklendiğinde zamanla ekspresyonu artmakta ve 3 saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır.



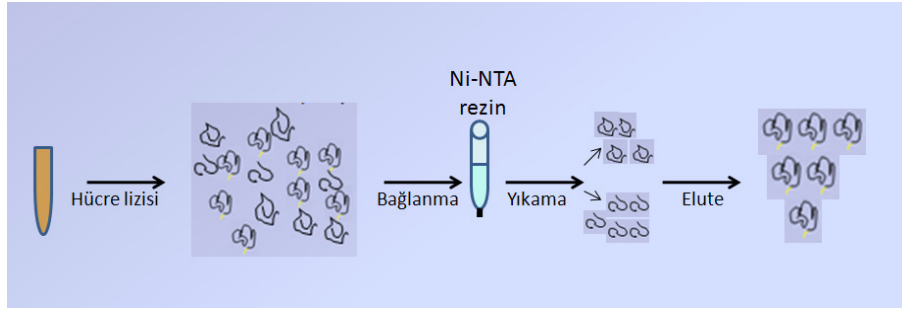
**Şekil 4.8.** *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden Pta enziminin over ekspresyonunun SDS-PAGE jelinde görüntüsü. M, markır; 1, IPTG öncesi; 2, IPTG sonrası 1. Saat; 3, IPTG sonrası 2. Saat; 4, IPTG sonrası 3. Saat; 5, IPTG sonrası 4. Saat; 6, IPTG sonrası 5. Saat.

*S. saprophyticus* Pta elde etmek için; SspPTA-pET28a(+) vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3) hücreleri 37°C'de büyütülüp, yine aynı sıcaklıkta IPTG ile uyarıldı. Fakat, saflaştırma aşamasında rekombinant Pta'nın çoğu inklüzyon cisimcikleri olarak gözlemlendi ve çözünür halde elde edilen az miktardaki protein Pta aktivitesi göstermedi.

İkinci denemede, hücreler 30°C’de büyütüldü ve oda sıcaklığında 0.25 mM IPTG ile uyarıldı. Bu kez; rekombinant Pta’nın daha az kısmı inklüzyon cisimciklerinde gözlendi ve elde edilen protein yüksek Pta aktivitesi (400 µmol/dk.mg protein) gösterdi.

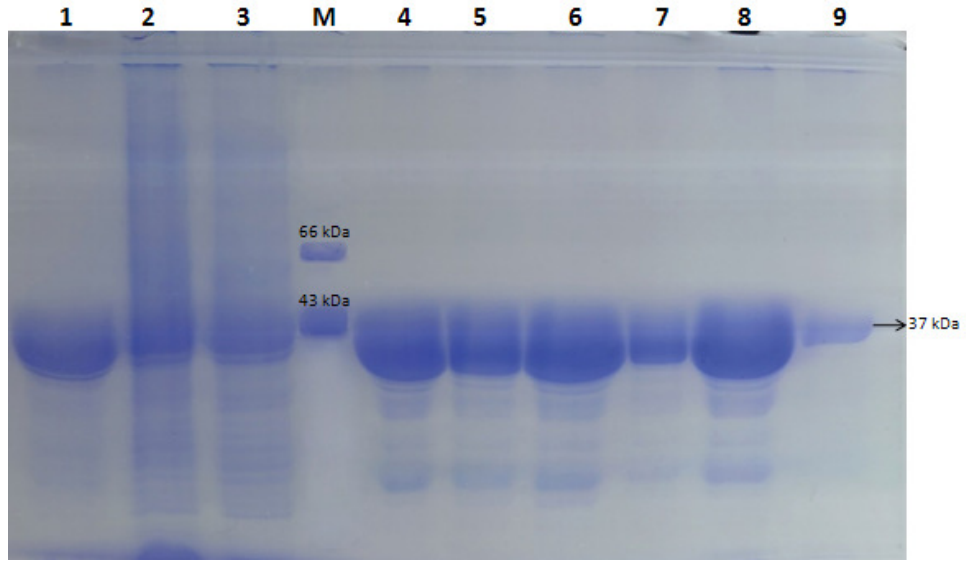
#### 4.2.2. Ni-NTA Kolondan Protein Saflaştırılması

Sonikasyon sonrası süpernatant, rekombinant protein harici farklı proteinleri de içerdiği için, His-Tag içeren rekombinant proteinlerin saflaştırılması Ni-NTA rezin ile gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Ni-NTA’dan rekombinant proteinlerin saflaştırılması.

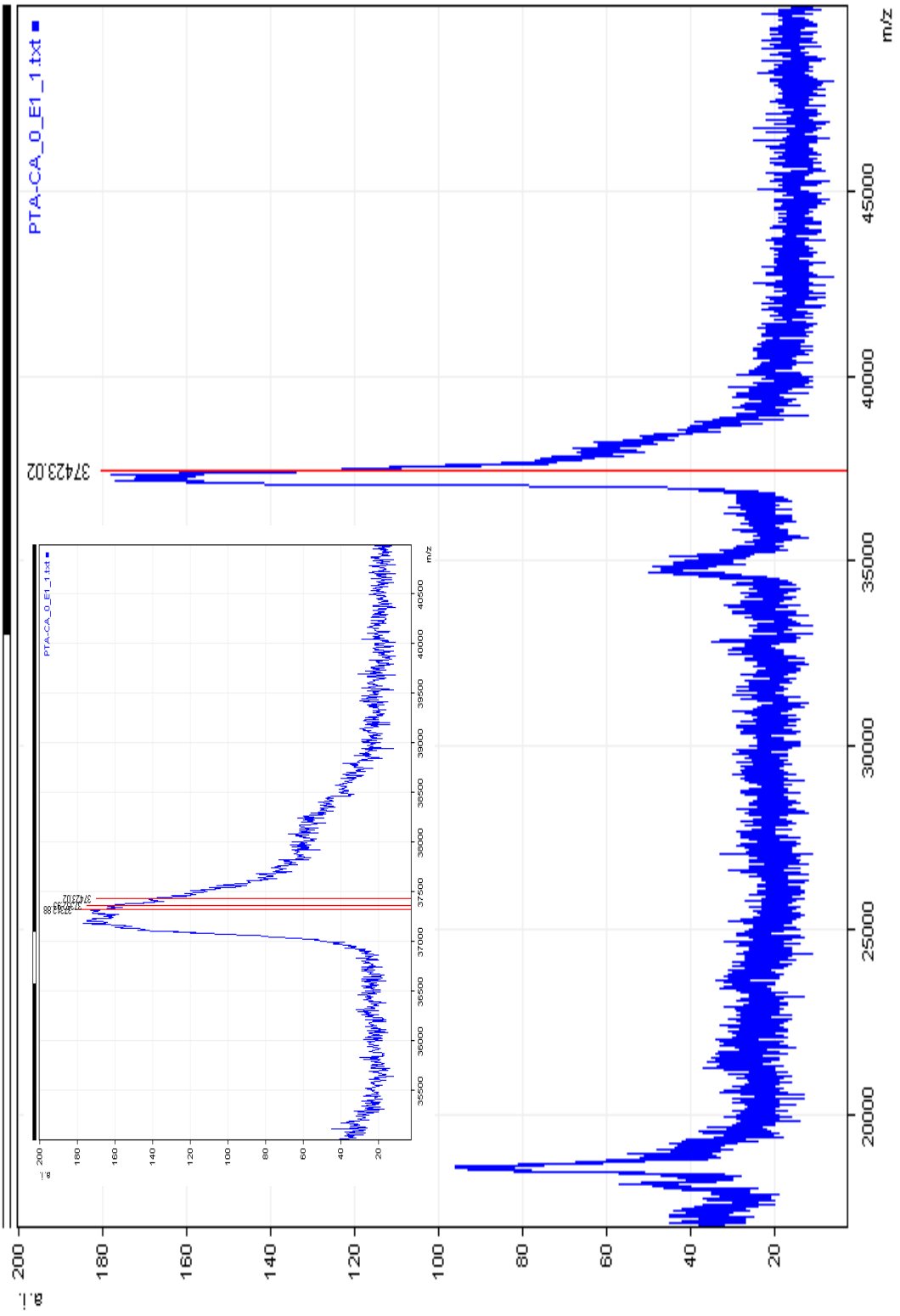
Yıkama 10 mM imidazol ve 200 mM imidazol içeren iki farklı yıkama tamponu ile yapıldı. 10 mM imidazol içeren tampon ile spesifik olmayan bağlanmaya gösteren farklı proteinler rezin kolondan ayrıştırılırken, 200 mM imidazol içeren yıkama tamponu ile rekombinant Pta’nın saf halde elde edilmesi sağlandı (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Ni-NTA rezinden toplanan fraksiyonlar. 1, Pelet; 2, kolondan geçen protein ekstratı; 3, süpernatant; M, markır; 4, 200 mM imidazol içeren ayırma tamponu ile toplanan 4. fraksiyon; 5, 5. fraksiyonun 2,5 µl'i; 6, 5. fraksiyonun 5µl'i; 7, 6. fraksiyonun 2,5 µl'i; 8, 6. fraksiyonun 5µl'i; 9, diyaliz edilen 7-13. fraksiyon karışımı.

#### 4.2.4. MALDI-TOF Analizi

His-tag içeren rekombinant Pta'nın hesaplanan moleküler ağırlığı 37422.3 Da'dur. MALDI-TOF kütle spektrometre analizi ile His-tag Pta'nın moleküler büyüklüğü  $37423.02 \pm 200$  Da bulundu (Şekil 4.11). Bu sonuçlara göre, hesaplanan ve bulunan moleküler ağırlıklar uyumludur.

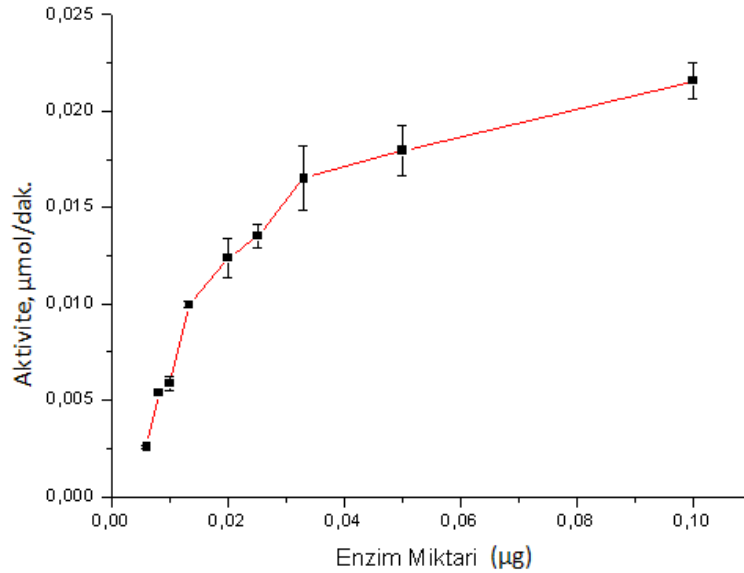


**Şekil 4.11.** Pta'nın MALDI –TOF analizi. Küçük spektrom, 37000 m/z civarındaki bantın genişletilmiş halidir.

### 4.3. Pta'nın Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Enzim Miktarının Başlangıç Hızına Etkisi

Michaelis-Menten denkleminde göre başlangıç hızı, tüm substrat konsantrasyonlarında, enzim konsantrasyonu ile direkt orantılıdır. Yani, *in vitro* deney şartlarında enzim miktarı hız belirleyicidir. Dolayısıyla, enzim karakterizasyon çalışmalarında, ilk önce, enzim miktarının başlangıç hızına etkisi belirlenip, diğer kinetik deneylerde kullanılacak enzim miktarı tayin edilmelidir. Bu bağlamda, biz de ilk önce, rekombinant Pta enzim miktarının başlangıç hızına etkisini belirledik (Şekil 4.12). Şekil 4.12'den de görüleceği gibi, belirtilen deney şartlarında, yaklaşık 0.02 µg enzim miktarına kadar başlangıç hızı lineer artmaktadır. Bu sonuçlara göre, aynı şartlarda, yaklaşık 0.01-0.02 µg enzim miktarının uygun olduğu düşünüldü ve bundan sonraki deneylerde, aksi belirtilmediği takdirde, bu miktarlar ile devam edildi.



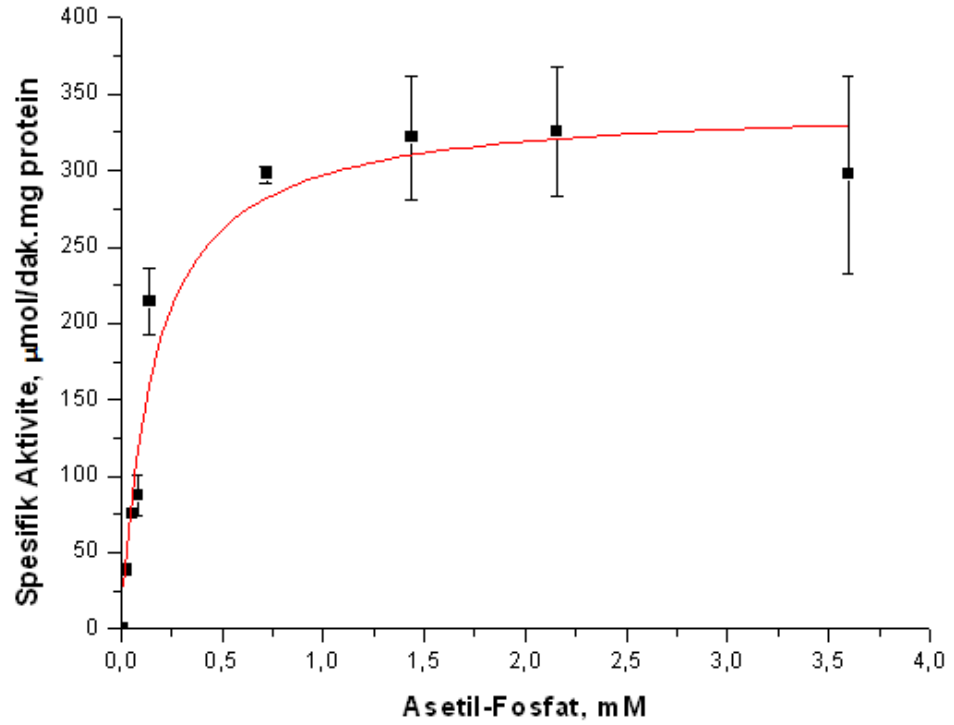
**Şekil 4.12.** Enzim miktarına bağlı olarak aktivite grafiği. Reaksiyon 2 mM 2-merkaptetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7.5 tamponu içerisinde 3.6 mM asetil-fosfat, 0.16 mM CoA ile 25 °C'de gerçekleştirilmiştir.

### 4.3.2. Asetil-Fosfat ve CoA için $K_m$ Değerlerinin Belirlenmesi

Michaelis-Menten denkleminde göre enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir  $V_{max}$  düzeyinde sabit kalır.  $K_m$ , en yüksek hız değerinin ( $V_{max}$ ) yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır.  $k_{cat}/K_m$  (veya  $V_{max}/K_m$ ) değeri enzim-substrat ilişkisinde bir ölçüdür.  $k_{cat}/K_m$  değeri yüksek olan bir enzim substratına yüksek ilgi gösterir.

Bu bağlamda, elde ettiğimiz rekombinant Pta'nın, asetil-fosfat ve CoA substratlarına olan ilgisini gösteren  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. *Staphylococcus saprophyticus* Pta'nın asetil-fosfata karşı olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, Şekil 4.13'teki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlinear fit edilerek, sırasıyla, 0.159 mM ve 344  $\mu\text{mol/dak.mg}$  olarak bulunmuştur. BRENDA database'de bilinen Pta'lar içerisinde asetil-fosfata olan  $K_m$  değerleri 0.024-22.5 mM arasında değişmektedir. *Staphylococcus saprophyticus* Pta enzimine en yakın dizi benzerliği gösteren *B. subtilis*'in asetil fosfata olan  $K_m$  değeri 0.53 mM olarak bulunmuştur. Bu değer *S. saprophyticus* Pta'sının asetil fosfata daha yüksek bir afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.





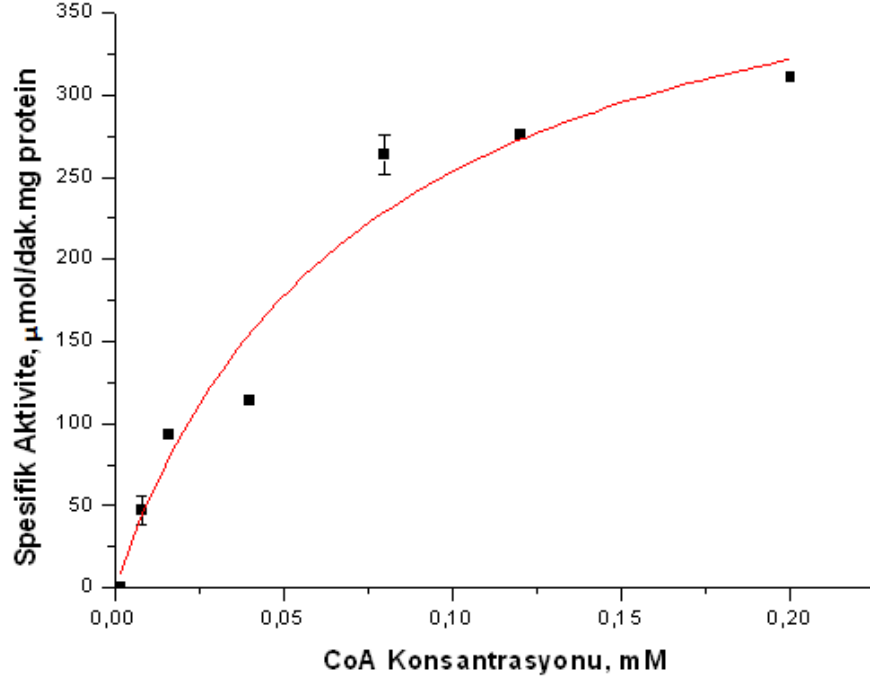
**Şekil 4.13.** Pta enziminin asetil-fosfata olan spesifik aktivitesi. Reaksiyon 2 mM 2-merkaptoetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7.5 tamponunda, enzim miktarı 0.02 µg, CoA miktarı 0.12 mM'da sabit tutulup 0.0144'ten 3.6 mM'a kadar seri asetil-fosfat miktarları oluşturularak 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Veriler Michaelis-Menten denkleminde nonlineer olarak fit edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *S. saprophyticus* Pta için kinetik parametreleri.

Substrat Çeşitleri	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (µmol/min.mg)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Asetil fosfat	0.159	344	213.7	1.34x10 <sup>6</sup>
CoA	0.0738	440	274.6	3.76x10 <sup>6</sup>

*S. saprophyticus* Pta'nın CoA'ya karşı olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, Şekil 4.14'teki verilerin Michaelis-Menten denkleminde nonlineer fit edilerek, sırasıyla, 73.8 µM ve 440 µmol/dak..mg olarak bulunmuştur. BRENDA database verilerine göre bilinen Pta'ların CoA'a olan  $K_m$  değerleri 30-1694 µM arasında değişmektedir.

*B. subtilis* Pta'nın CoA için  $K_m$  değeri 1.3  $\mu$ M olarak bulunmuştur [Xu et al., 2005]. *S. saprophyticus* Pta'sının CoA'a olan afinitesine en yakın afiniteye termofilik bakteri *M. thermophyla* Pta'sı ( $K_m$ , 70  $\mu$ M) sahiptir.

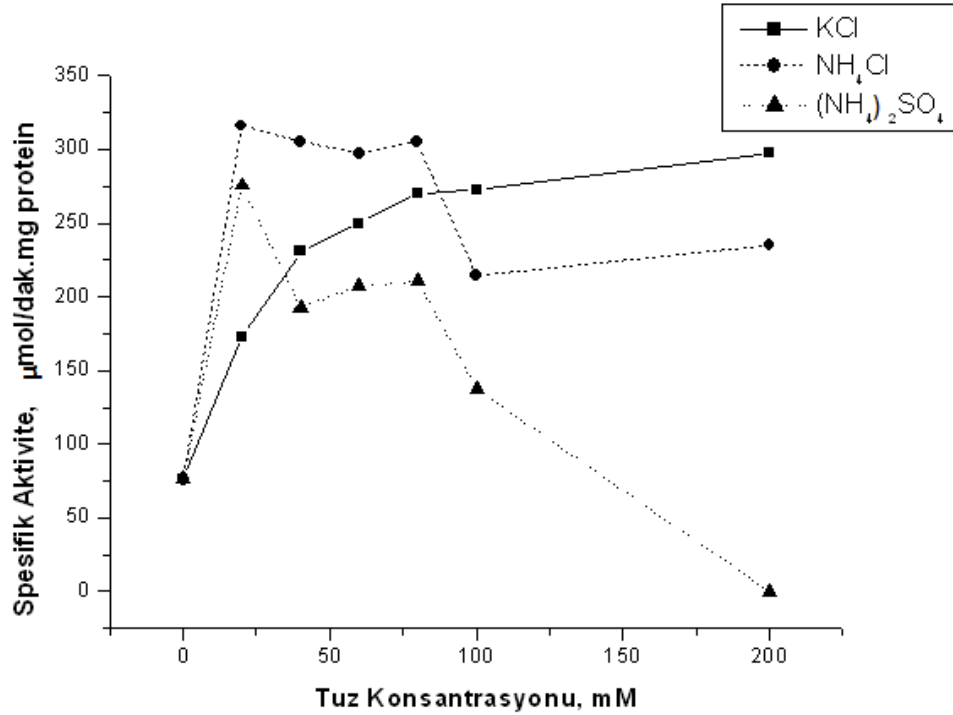


**Şekil 4.14.** CoA konsantrasyonuna bağlı Pta aktivitesi. Reaksiyon 2 mM 2-merkaptoetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7.5 tamponunda,enzim miktarı 0.02  $\mu$ g, asetil-fosfat miktarı 3.6 mM'da sabit tutulup 0.0016'dan 0.2 mM'a kadar seri CoA miktarları oluşturularak 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Veriler Michaelis-Menten denkleminde nonlineer olarak fit edilmiştir.

### 4.3.3. Pta Aktivitesi Üzerine Tuzların Etkileri

Literatürde, şimdiye kadar biyokimyasal özellikleri rapor edilen tüm Pta aktivitelerinin  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  iyonlarının varlığında arttığı rapor edilmiştir [bkz Çizelge 2.1]. Bu çalışmada, rekombinant olarak elde ettiğimiz *S. saprophyticus* Pta aktivitesi üzerine bu iyonların etkilerini incelemek için KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzları kullanılmıştır.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzu, düşük konsantrasyonlarda aktiviteyi artırırken yüksek

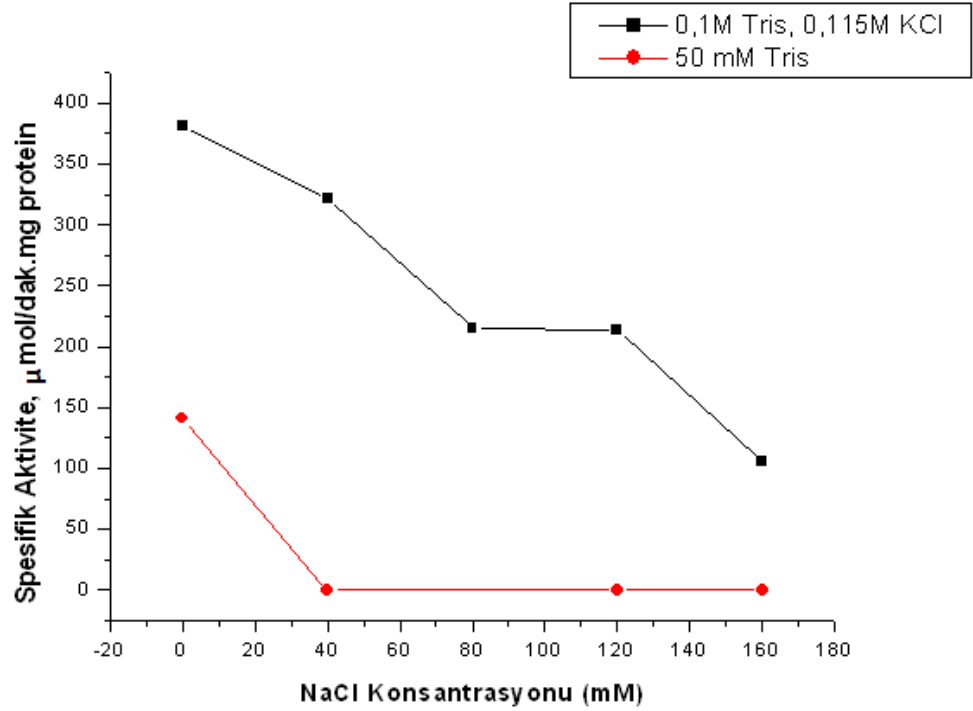
konsantrasyonlarda enzim inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 4.15). Yüksek konsantrasyonlarda,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzunun Pta'nın çözünürlüğünü düşürdüğü düşünülmektedir. Diğer yandan, KCl ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tuzlarının konsantrasyonu arttıkça enzim aktivasyonunun arttığı görülmektedir (Şekil 4.14); bu iki tuz herhangi bir inhibisyona sebep olmamaktadır.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tuzu düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğu gözlemlendi. Her iki tuzun beraber kullanılması aktiviteyi, her ikisinin ayrı ayrı kullanıldığından fazla arttırmamıştır. Bu sonuçlar,  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının aynı bölgeye bağlandığını göstermektedir. Benzer sonuçlar,  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının aktivitesini artırdığı başka enzimler için de rapor edilmiştir [Hiromasa and Roche, 2008].



**Şekil 4.15.** Pta aktivitesi üzerine tuzların etkisi. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl tamponunda, 0.02 µg enzim, 4.32 mM asetil-fosfat, 0.12 mM CoA miktarında 20 mM'dan 200 mM'a kadar tuz konsantrasyonları varlığında 25°C'de gerçekleştirilmiştir.

Literatürde iyon etkisi olarak bir de NaCl çalışılmıştır ve Pta aktivitelerinin inhibisyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [Lundie ve Ferry, 1989]. Bu çalışmada da NaCl'ün rekombinant Pta aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.16). KCl varlığında inhibisyon etkisi daha azdır, fakat NaCl konsantrasyonu arttıkça

inbibisyon etkisi de artmaktadır (Şekil 4.16). Bu da,  $\text{Na}^+$  iyonlarının  $\text{K}^+$  iyonlarının bağlandığı bölgeye bağlanarak inhibe ettiğini göstermektedir.



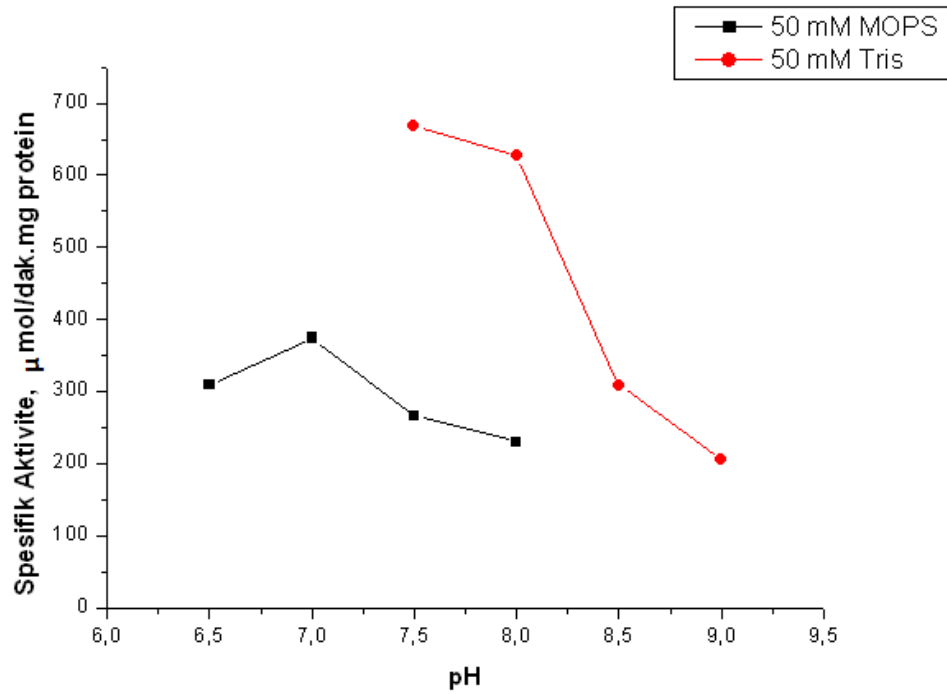
**Şekil 4.16.** NaCl tuzunun Pta aktivitesine etkisi. Reaksiyon 0.02 µg enzim, 4.32 mM asetil-fosfat, 0.12 mM CoA miktarında 0-160 mM NaCl konsantrasyonu varlığında 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun yapılışı tam ifade edilmemiş.

#### 4.3.4. pH'in Pta Aktivitesine Etkisi

Enzimin aktif bölgesi, buraya substrat bağlanmasını ve reaksiyonun katalizlenmesini mümkün kılacak bir iyonik biçimde ya da iyonik gruplardan oluşacak bir konformasyon verecek bir şekilde oluşmuştur. pH'daki değişimler bu iyonlaşabilen gruplarda ve dolayısıyla konformasyonel yapıda değişikliğe neden olarak katalizin hızını etkileyebilir. Bunun dışında substrat molekülü de

iyonlaşabilen gruplar içerebilir, ya da substratın sadece iyonlaşabilen şekli enzime bağlanarak katalize uğrayabilir. Bu da reaksiyonun hızını etkiler.

Bu nedenle bu çalışmada, pH'ın Pta aktivitesine etkisi belirlenmiştir. *S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesi için optimum pH 7.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17). Enzim 6.5-7.5 aralığında aktivite gösterebilmektedir. pH 8 ve sonrasında aktivite büyük miktarda azalmaktadır. Dizi benzeri olan *B. subtilis* Pta için optimum pH 7.6'dır [BRENDA database].

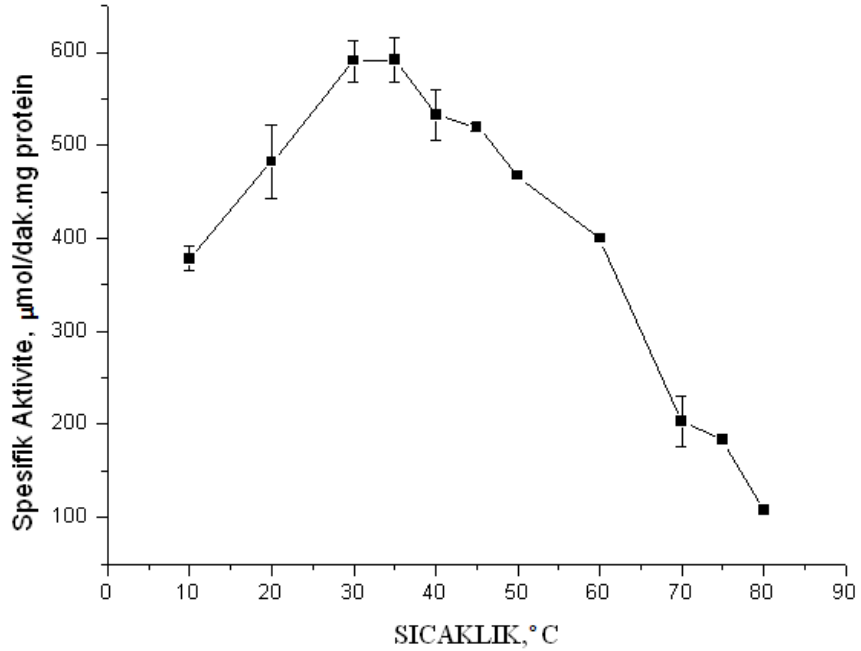


**Şekil 4.17.** Pta aktivitesi üzerine pH'ın etkisi. Reaksiyon 0.02 µg enzim, 0.12 mM CoA, 0.72 mM asetil-fosfat varlığında 25°C'de Bölüm 3.2.10.5'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 4.3.5. Sıcaklığın Pta Aktivitesine Etkisi

Kimyasal reaksiyonların çoğunun hızı sıcaklığın artması ile artar. Sıcaklıktaki artış reaktant moleküllere daha fazla kinetik enerji sağlar, bu da birim zamanda daha fazla sayıda üretken çarpışma ile sonuçlanır. Enzim katalizli reaksiyonlarda da benzer tarzda davranır. Ancak yüksek sıcaklıklarda enzimler denatürasyona uğrar ve aktivitesini yitirir. Bu nedenle, her enzim için optimum sıcaklığın belirlenmesi önem arz etmektedir.

*S. saprophyticus* Pta'nın aktivitesi için optimum sıcaklığı 30°C-35°C olarak belirlendi (Şekil 4.18). Enzimin aktivitesi 60 °C'den sonra büyük oranda azalmaktadır. Dizi benzeri *B. subtilis* Pta için sıcaklık çalışılmamıştır; fakat termofilik bakteri *M. thermopila* için optimum sıcaklık 45°C olarak bildirilmiştir [BRENDA database].



**Şekil 4.18.** Sıcaklığın Pta aktivitesi üzerine etkisi. Reaksiyon 2 mM 2-merkaptoetanol içeren 0.1M Tris-HCl, 0.115 M KCl pH 7.25 tamponunda 0.02 µg enzim, 0.12 mM CoA, 3.6 mM asetil-fosfat varlığında 10°C- 80°C arası değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

## 5. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada, *S. saprophyticus* bakterisinde olduğu varsayılan *pta* geni ilk kez klonlanmıştır. Klonlanan genin baz dizisi dizi analizi ile doğrulandı. Gen ürünü olan Pta'nın amino asit dizilimiyle seçilen üç bakteriden (*M. thermopila*, *B. subtilis*, *S. pyogenese*) Pta amino asit dizileri dizi alignment LALIGN [Huang and Miller 1991] programı ile karşılaştırılmıştır. En yakın dizi benzeri (%67.1) *B. subtilis* olduğu bulunmuştur. Kristal yapıları bilinen Pta'ların sekonder yapıları aynı olduğu bildirilmiştir [Xu et al., 2005]. Buna göre; elde edilen SspPTA'nında üçüncü ve ikinci yapıları aynı olduğu düşünülmektedir.

MALTI-TOF analizleri ile elde edilen Pta'nın molekül ağırlığı  $37422.02 \pm 200$  Da olarak bulundu. Enzimin asetil-fosfat için  $K_m$  değeri 0.159 mM, CoA için  $K_m$  değeri 0.0738 mM olarak saptandı. Bulunan afinite değerleri literatürde şimdiye kadar analizi yapılmış Pta'lara göre oldukça yüksektir. Literatürde şimdiye kadar biyokimyasal olarak karakterize edilmiş Pta'lar için  $K^+$  ve  $NH_4^+$  iyonlarının aktive edici rolü olduğu bilindiğinden dolayı, *S. saprophyticus* Pta aktivitesine tuzların etkileri araştırıldı. KCl ve  $NH_4Cl$  tuzlarının Pta aktivitesini arttırdığı belirlenirken,  $(NH_4)_2SO_4$  (yüksek konsantrasyonda) ve NaCl tuzlarının aktiviteyi inhibe ettiği belirlendi. Enzim için optimum pH 7.5 ve optimum sıcaklık  $30^\circ-35^\circ C$  olarak belirlendi.

Pta enziminin yapı ve fonksiyonuna dair çalışmalar henüz netlik kazanmış değildir. Bu nedenle, ileride enzim üzerinde yapı fonksiyon çalışmaları yapılarak, aktivasyon prosesi için öneriler geliştirilebilir. İnsanda, yapı ve fonksiyon benzeri enzimlerin çalışma prensibine ışık tutularak, olası tıbbi kullanımına açıklık getirilebilir.

## KAYNAKLAR

Abaibou, H., J. Pommier, S. Benoit, G. Giordano, and M. Mandrand- and Berthelot. (1995). "Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase." J. Bacteriol. **177**: 7141–7149.

Abdel-Hamid, A. M., M. M. Attwood, and J. R. Guest. (2001). " Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*." Microbiology **147**: 1483–1498.

Alexeeva, S., B. de Kort, G. Sawers, K. J. Hellingwerf, and M. J. de Mattos. (2000). "Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **182**: 4934–4940.

Amarasingham, C. D., and B. D. Davis. (1965). " Regulation of delta-keto-glutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **240**: 3664–3668.

Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., and N. Rolland, and Martin, W. (2006). J. Biol. Chem. **281**: 9909–9918.

Babior, B. M., Ed. (1982). Ethanolamine ammonia-lyase. New York, N.Y., John Wiley & Sons.

Bandarian, V., R. R. Poyner, and G. H. Reed. (1999). "Hydrogen atom exchange between 5'-deoxyadenosine and hydroxyethylhydrazine during the single turnover inactivation of ethanolamine ammonia-lyase. ." Biochemistry **38**: 12403–12407.

Bandarian, V., and G. H. Reed. (2002). "Analysis of the electron paramagnetic resonance spectrum of a radical intermediate in the coenzyme B(12)-dependent ethanolamine ammonia-lyase catalyzed reaction of S-2-aminopropanol." Biochemistry **41**: 8580–8588.



Bang, I., B. Kim, J. Foster, and Y. Park. (2000). "OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." J. Bacteriol. **182**: 2245-2252.

Bang, I. S., J. P. Audia, Y. K. Park, and J. W. Foster. (2002). "Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response." Mol. Microbiol. **44**: 1235–1250.

Barnard, A., A. Wolfe, and S. Busby. (2004). "Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organisations to produce different regulatory outcomes." Curr. Opin. Microbiol. **7**: 102–108.

Bertagnolli, B. L., and L. P. Hager. (1991). "Activation of *Escherichia coli* pyruvate oxidase enhances the oxidation of hydroxyethylthiamin pyrophosphate." J. Biol. Chem. **266**: 10168-10173.

Bertagnolli, B. L., and L. P. Hager. (1993). "Role of flavin in acetoin production by two bacterial pyruvate oxidases." Arch. Biochem. Biophys. **300**: 364-371.

Bentley, R. (2000). "From 'reactive C2 units' to acetyl coenzyme A: a long trail with an acetyl phosphate detour." Trends Biochem. Sci. **25**: 302–305.

Blackwell, C. M., and J. M. Turner. 1978. Microbial metabolism of amino, a. f. o. c. B.-d. e. ammonia-, et al. (1978). " Microbial metabolism of amino alcohols: formation of coenzyme B12-dependent ethanolamine ammonia-lyase and its concerted induction in *Escherichia coli*." Biochem. J. **176**: 751–757.

Bock, A., and G. Sawers., Ed. (1996). Fermentation. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem. **72**, 248

Brinsmade, S. R., and Escalante-Semerena, J. C. (2004). J. Bacteriol. **186**: 1890-1892.

Brown, T. D. K., M. C. Jones-Mortimer, and H. L. Kornberg. (1977). "The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*." J. Gen. Microbiol. **102**: 327–336.

Buckel, W.(1999). " Anaerobic energy metabolism." Biology of the procaryotes, edited by H. G. Chlegel, Thieme Stuttgart Germany. 278-326.

Butow, R. A., and N. G. Avadhani. 2004. Mitochondrial signaling: the and r. r. M. C. 14:1–15. (2004). " Mitochondrial signaling: the retrograde response." Mol. Cell **14**: 1–15.

Chang, G. W., and J. T. Chang. (1975). "Evidence for the B12-dependent enzyme ethanalamine deaminase in *Salmonella*." Nature **254**: 150–151.

Chang, D.-E., S. Shin, J.-S. Rhee, and J.-G. Pan. (1999). "Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl-CoA flux for the growth and survival." J. Bacteriol. **181**: 6656–6663.

Chang, Y. Y., and J. E. J. Cronan. (1983). "Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (*poxB*) for pyruvate oxidase." J. Bacteriol. **154**: 756–762.

Chang, Y. Y., A. Y. Wang, and J. Cronan, J. E. (1994). " Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*)gene." Mol. Microbiol. **11**: 1019–1028.

Chatterjee, R., C. S. Millard, K. Champion, D. P. Clark, and M. I. Donnelly. (2001). "Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*." Appl. Environ.Microbiol. **67**: 148–154.

Chen, R., V. Hatzimanikatis, W. M. Yap, P. W. Postma, and J. E. Bailey. (1997). "Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in aphenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*." Biotechnol. Prog. **13**: 768–775.

Cherrington, C. A., Hinton, M. Pearson, G. R. and Chopra, I. (1991). "Inhibition of *E. coli* K-12 by short-chain organic acids: lack of evidence for induction of SOS response." J. Appl. Bacteriol. **70**: 156-160.

Clark, D. P., and Cronan, J. E. , Ed. (1996). Washington, American Society for Microbiology.

Cozzone, A. J. (1998). "Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria." Annu. Rev. Microbiol. **52**: 127–164.

Crabtree, H. G. (1929). "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours." Biochem. J. **23**: 536–545.

Cronan, J. E., Jr., and D. LaPorte., Ed. (1996). Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Cummings J. H., P. E. W., Branch W. J., Naylor C. P. and and M. G. T. (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." Gut **28**: 1221–1227.

Cunningham, L., D. Georgellis, J. Green, and J. R. Guest. (1998). "Coregulation of lipoamide dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*: characterisation of an ArcA binding site in the *lpd* promoter." FEMS Microbiol. Lett. **169**: 403–408.

Cunningham, L., and J. R. Guest. 1998. Transcription and transcript processing in the *sdhCDAB-sucABCD* operon of *Escherichia coli*. *Microbiology* and 144:2113–2123. (1998). "Transcription and transcript processing in the *sdhCDAB-sucABCD* operon of *Escherichia coli*." Microbiology **144**: 2113–2123.

de Graef, M. R., S. Alexeeva, J. L. Snoep, and M. J. Teixeira de Mattos. (1999). "The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state

and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **181**: 2351–2357.

Diaz-Ricci, J. C., L. Regan, and J. E. Bailey. (1991). " Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*." Biotechnol. Bioeng. **38**: 1318–1324

Doelle, H. W., K. N. Ewings, and N. W. Hollywood. (1982). "Regulation of glucose metabolism in bacterial systems ." Adv. Biochem. Eng. **23**: 1–35.

El-Mansi, E. M., and W. H. Holms. (1989). " Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures." J. Gen. Microbiol. **135**: 2875–2883.

El-Mansi, M. (2004). "Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. ." J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **31**: 295–300.

El-Mansi, M., Cozzone, A. J., Shiloach, J., and Eikmanns, B. J. (2006). Curr. Opin. Microbiol. **9**: 173–179.

Farmer, W. R., and J. C. Liao. (1997). "Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*." Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3205–3210.

Faust, L. P., J. A. Connor, D. M. Roof, J. A. Hoch, and B. M. Babior. (1990). "Cloning, sequencing and expression of the genes encoding the adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonia-lyase of *Salmonella typhimurium*." J. Biol. Chem. **265**: 12462–12466.

Gennis, R. B., and L. P. Hager., Ed. (1976). Pyruvate oxidase. The enzymes and biological membranes. New York, N.Y., Plenum.

Grabau, C., and J. E. J. Cronan. (1984). "Molecular cloning of the gene (*poxB*) encoding the pyruvate oxidase of *Escherichia coli*, a lipid-activated enzyme." J. Bacteriol. **160**: 1088–1092.

Gray, C. T., J. W. T. Wimpenny, and W. R. Mossman. (1966). "Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs's cycle enzymes in *Escherichia coli*." Biochim. Biophys. Acta **117**: 33–41.

Guest, J. R., S. J. Angier, and G. C. Russell. (1989). "Structure, expression, and protein engineering of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*." Ann. N. Y. Acad. Sci. **573**: 76–99.

Guest, J. R., and G. C. Russell. (1992). "Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli*." Curr. Top. Cell. Regul. **33**: 231–247.

Gunsalus, R. P., and S. J. Park. (1994). "Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons." Res. Microbiol. **145**: 437–450.

Hansen, H. G. and Henning, U. (1996) "Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *E. coli* K-12." Biochim. Biophys. Acta. **122**: 355-358

Heyde, M., P. Laloi, and R. Portalier. (2000). "Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **182**: 198–202.

Hideko Y-O, A. Matsuyama, and E. Nakano. (1990). "Cloning of a gene coding for phosphotransacetylase from *Escherichia coli*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**: 680-682.

Hiromasa Y. and Roche, T.E. (2008). Critical role of specific ions for ligand-induced changes regulating pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2. Biochemistry **47**: 2298-2311.

Hollywood, N., and H. W. Doelle. (1976). "Effect of specific growth rate and glucose concentration on growth and glucose metabolism of *Escherichia coli* K-12." Microbios **17**: 23–33.

Holms, W. H. (1986). "The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate." Curr. Top. Cell. Regul. **28**: 59–105.

Holms, H. (1996). "Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol. Rev. **19**: 85–116.

Huang and Miller (1991). Adv. Appl. Math. **12**:337-357.

Iuchi, S., and E. C. Lin. (1988). "arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 1888–1892.

Iyer, P. P. and J. G. Ferry. (2001). "Role of arginines in Coenzyme A binding and catalysis by the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*." J. Bacteriol. **183**: 4244-4250.

Johannes, E., D. M. Barnhart, and J. L. Slonczewski. (2004). "pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **186**: 192–199.

Kaiser, M., and G. Sawers. (1994). " Pyruvate formate-lyase is not essential for nitrate respiration by *Escherichia coli*." FEMS Microbiol. Lett. **117**: 163–168.

Kakuda, H., K. Hosono, K. Shiroishi, and S. Ichihara. (1994). "Identification and characterization of the ackA (acetate kinase A)-pta (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an ackA-pta deletion mutant of *Escherichia coli*." J. Biochem. **116**: 916–922.

Kavita, S.-W. and J. G. Ferry. (1995). "Transcriptional regulation of the phosphotransacetylase-encoding and acetate kinase-encoding genes (*pta* and *ack*) from *Methanosarcina thermophila*." J. Bacteriol. **177**: 1699–1702.

Kennedy, E. P. (2001). "Hitler's gift and the era of biosynthesis. ." J. Biol. Chem. **276**: 42619–42631.

Kessler, D., and J. Knappe. , Ed. (1996). Anaerobic dissimilation of pyruvate. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Kirkpatrick, C., L. M. Maurer, N. E. Oyelakin, Y. N. Yoncheva, R. Maurer, and a. J. L. Slonczewski. (2001). "Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **183**: 6466–6477.

Kleman, G. L., and W. R. Strohl. (1994). "Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell density fermentation." Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3952–3958.

Knappe, J., and G. Sawers. (1990). "A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*." FEMS Microbiol. Rev. **75**: 383–398.

Ko, Y. F., Bentley, W. E. and Weigand, W. A. (1995) "The effects of cellular energetics on foreign protein production." Appl. Biochem. Biotechnol. **50**: 145-159

Kofoed, E., C. Rappleye, I. Stojiljkovic, and J. Roth. (1999). " The 17-gene ethanolamine (*eut*) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. " J. Bacteriol. **181**: 5317–5329.

Kornberg, H. L. (1966). "The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*." Biochem. J. **99**: 1–11.

Krebs, A., and Bridger, W. A. (1980). "The kinetic properties of the phosphoenolpyruvate carboxykinase of *E. coli*." Can. J. Biochem. **58**: 309-318.

Kreuzberg, K., Klösch, G., and Großheiser, D. (1987) *Physiol. Plant.* 69, 481–488  
(1987). *Physiol. Plant.* **69**: 481–488.

Kuroda M., Yamashita, A., Hirakawa, H. et al. (13 co-authors). (2005).” Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 13272-13277

Kwan, H. S., H. W. Chui, and K. K. Wong. (1988). "ack::Mu d1–8 (Ap<sup>r</sup>lac) operon fusions of *Salmonella typhimurium* LT-2." *Mol. Gen. Genet.* **211**: 183–185.

Latimer, M. T., and J. G. Ferry. (1993). “Cloning, sequence analysis, and hyperexpression of the genes encoding phosphotransacetylase and acetatekinase from *Methanosarcina thermophila*.” *J. Bacteriol.* **175**: 6822–6829.

Lawrence, S. H., Luther, K. B., Schindelin, H. and Ferry, J. G. (2005) “Structural and functional studies suggest a catalysis mechanism for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*.” *J. Bacteriol.* **188**: 1143-1154.

Lee, T. Y., Makino, K., Shinagawa, H., Nakata, A. (1990). “ Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the phoR and phoM functions in *E. coli*.” *J. Bacteriol.* **172**: 2245-2249.

Lee, S. Y. (1996). "High cell density culture of *Escherichia coli*. " *Trends Biotechnol.* **14**: 98–105.

Lewendon, A., I. A. Murray, W. V. Shaw, M. R. Gibbs, and A. G. Leslie. (1990). “Evidence for transition-state stabilization by serine-148 in the catalytic mechanism of chloramphenicol acetyltransferase.” *Biochemistry* **29**: 2075-2080.

Liu, X., and T. Ferenci. (2001). "An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation." *Microbiology* **147**: 2981–2989.



Liu, Y., Leal, N. A., Sampson, E.M., Johnson, C. L., Havemann, G. D., and Bobik, T. A. (2007). J. Bacteriol. **189**: 1589–1596.

Luli, G. W., and W. R. Strohl. (1990). "Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. ." Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1004–1011.

Lundie, L. L., Jr., and Ferry, J. G. (1989). J. Biol. Chem. **264**: 18392–18396.

Lynch, A. S., and Lin, E. C. C., Ed. (1996). 1526–1538. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Majewski, R. A., and M. M. Domach. (1990). "Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*." Biotechnol. Bioeng. **35**: 732–738.

Matsubara, M., and T. Mizuno. (1999). " EnvZ-independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR-mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*." Biosci. Biotechnol. Biochem. **63**: 408–414.

Matsushika, A., and T. Mizuno. (1998). "A dual-signaling mechanism mediated by the ArcB hybrid sensor kinase containing the histidine-containing phosphotransfer domain in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **180**: 3973–3977.

Matsuyama, A., H. Yamamoto-Otake, J. Hewitt, R. T. A. MacGillivray, and E. Nakano. (1994). " Nucleotide sequence of the phosphotransacetylase gene of *Escherichia coli* strain K12. ." Biochim. Biophys. Acta **1219**: 559–562.

McCleary, W. R., J. B. Stock, and A. J. Ninfa. (1993). "Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*?" J. Bacteriol. **175**: 2793–2798.

McCleary, W. R., and Stock, J. B. (1994). J. Biol. Chem. **269**: 31567–31572.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, and M. Schaechter. 1990. Physiology of, I. the bacterial cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Sunder-, et al., Eds. (1990).

Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.

Ninfa, A. J., P. Jiang, M. R. Atkinson, and J. A. Peliska. (2000). "Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*." Curr. Top. Cell Regul. **36**: 31–75.

Noronha, S. B., H. J. Yeh, T. F. Spande, and J. Shiloach. (2000). "Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using (13)C- NMR/MS. ." Biotechnol. Bioeng. **68**: 316–327.

Nyström, T. (1994). "The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival." Mol. Microbiol. **12**: 833–843.

Oh, M. K., and J. C. Liao. (2000). "Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*." Biotechnol. Prog. **16**: 278–286.

Oh, M. K., Rohlin, L., Kao K. C. and Liao, J. C. (2002)" Global expression profiling of acetate-grown *E. coli*." J. Biol. Chem. **277**: 13175-13183

Palacios, S., Starai, V. J., and Escalante-Semerena, J. C. (2003). J. Bacteriol. **185**: 2802–2810.

Park, S. J., J. McCabe, J. Turna, and R. P. Gunsalus. (1994). "Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. ." J. Bacteriol. **176**: 5086–5092.

Park, S. J., P. A. Cotter, and R. P. Gunsalus. (1995). "Regulation of malatedehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability." J. Bacteriol. **177**: 6652–6656.

Park, S. J., and R. P. Gunsalus. (1995). "Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products." J. Bacteriol. **177**: 6255–6262.

Park, S.-J., G. Chao, and R. P. Gunsalus. (1997). "Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of *ArcA*, *Fnr*, and the upstream *sdhCBAB* promoter." J. Bacteriol. **179**(4138–4142).

Pelroy, R. A., and H. R. Whiteley. (1972). Kinetic properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescens*. J. Bacteriol. **111**:47–55.

Peng, L., and K. Shimizu. (2003). "Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. ." Appl. Microbiol. Biotechnol. **61**: 163–178.

Pericone, C. D., S. Park, J. A. Imlay, and J. N. Weiser. (2003). "Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the Fenton reaction. ." J. Bacteriol. **185**: 6815–6825.

Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson., Ed. (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Prohinar, P., S. A. Forst, D. Reed, I. Mandic-Mulec, and J. Weiss. (2002). "OmpR-dependent and OmpR-independent responses of *Escherichia coli* to sublethal attack by the neutrophil bactericidal/permeability increasing protein." Mol. Microbiol. **43**: 1493–1504.

Prüß, B. M., J. M. Nelms, C. Park, and A. J. Wolfe. (1994). "Mutations in NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids." J. Bacteriol. **176**: 2143–2150.

Prüß, B. M., and P. Matsumura. 1996. A regulator of the flagellar regulon and fl. of *Escherichia coli*, also affect cell division. *J. Bacteriol.* 178:668–674. (1996). "A regulator of the flagellar regulon of *Escherichia coli*, *flhD*, also affect cell division." *J. Bacteriol.* **178**: 668–674.

Prüß, B. M. (1998). "Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*." *Arch.Microbiol.* **170**: 141–146.

Quail, M. A., D. J. Haydon, and J. R. Guest. (1994). "The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex." *Mol. Microbiol.* **12**: 95–104.

Ramseier, T. M., D. Negre, J. C. Cortay, M. Scarabel, A. J. Cozzone, and and J. M. H. Saier (1993). "In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the *fru*, *pps*, *ace*, *pts* and *icd* operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *J. Mol. Biol.* **234**: 28–44.

Rinas, U., H. Kracke-Helm, and K. Schugerl. (1989). "Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 163–167.

Roof, D. M., and J. R. Roth. (1988). "Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*." *J. Bacteriol.* **170**: 3855–3863.

Roof, D. M., and J. R. Roth. (1989). "Functions required for vitamin B12-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*." *J. Bacteriol.* **171**: 3316–3323.

Rose, I. A., M. Grunsberg-Manago, S. R. Korey, and S. Ochoa. (1954). "Enzymatic phosphorylation of acetate." *J. Biol. Chem.* **211**: 737–756.

Rossmann, R., G. Sawers, and A. Bock. (1991). "Mechanism of regulation of the formate- hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon." *Mol. Microbiol.* **5**: 2807-2814.

Saier, M. H., Jr., and T. M. Ramseier. (1996). "The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria." J. Bacteriol. **178**: 3411–3417.

Sawers, G. A. M. (1998). Arch. Microbiol. **171**: 1–5.

Semenza, G. (2001). "Fifty years ago: the identification of 'active acetate' as acetyl-CoA." FEBS Lett. **509**: 343–344.

Semialjac, M., and H. Schwarz. (2003). "Computational study on mechanistic details of the aminoethanol rearrangement catalyzed by the vitamin B(12)-dependent ethanolamine ammonia lyase: his and asp/glu acting simultaneously as catalytic auxiliaries." J. Org. Chem. **68**: 6967–6983.

Shen, J., and R. P. Gunsalus. (1997). "Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. **26**: 223–236.

Smith, M. W., and F. C. Neidhardt. (1983). "2-Oxoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*: cellular amounts and patterns of synthesis. ." J. Bacteriol. **156**: 81–88.

Spencer, M. E., and J. R. Guest. (1985). "Transcription analysis of the *sucAB*, *aceEF*, and *lpd* genes of *Escherichia coli*." Mol. Gen. Genet. **200**: 145–154.

Spencer, M. E., and J. R. Guest. (1987). "Regulation of citric acid cycle genes in facultative bacteria." Microbiol. Sci. **4**: 164–168.

Stancik, L. M., D.M. Stancik, B. Schmidt, D.M. Barnhart, Y. N. Yoncheva, and a. J. L. Slonczewski. (2002). "pH-Dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **184**: 4246–4258.

Starai, V. J., H. Takahashi, J. D. Boeke, and J. C. Escalante-Semerena. (2003). "Short- chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2

protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **163**: 545–555.

Starai, V. J., and Escalante-Semerena, J. C. (2004). "Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)." Cell. Mol. Life Sci. **61**: 2020-2030.

Stechmann, A., and Cavalier-Smith, T. (2002). Science **297**: 89–91.

Stojiljkovic, I., A. J. Baumler, and F. Heffron. (1995). "Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the *cchA cchB eutE eutJ eutH* gene cluster." J. Bacteriol. **177**: 1357–1366.

Stulke, J., and W. Hillen. (1999). "Carbon catabolite repression in bacteria." Curr. Opin. Microbiol. **2**: 195–201.

Suzuki, T. (1969). " Phosphotransacetylase of *Escherichia coli* B, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides. ." Biochim. Biophys. Acta **191**: 559–569.

Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner, and T. Conway. (1999). "Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. ." J. Bacteriol. **181**: 6425–6440.

Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker. (1977). "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria." Bacteriol. Rev. **41**: 100–180.

Thomas, A. R and Hoch, J. A. (1973). "Phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis*: purification and physiological studies." Biochimica et Biophysica Acta. **321**: 114-125.

Tseng, G. C., M.-K. Oh, L. Rohlin, J. C. Liao, and W. H. Wong. (2001). " Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. ." Nucleic Acids. Res. **29**: 2549–2557.

Varma, A., and B. O. Paulson. (1994). "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. ." Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3724–3731.

van de Walle, M., and J. Shiloach. (1998). "Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation." Biotechnol. Bioeng. **57**: 71–78.

Van Dyk, T. K., and R. A. LaRossa. (1987). " Involvement of ack-pta operon products in alpha-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*." Mol. Gen. Genet. **207**: 435–440.

Wanner, B. L. (1992). "Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria?" EMBO J. **11**: 265–277.

Wanner, B. L. (1993). "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria." J. Cell. Biochem. **51**: 47–54.

Wanner, B. L., Ed. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphateregulon. *Escherichia coli* and *Salmonella*:cellular and molecular biology. Washington, D.C., ASM Press.

Whiteley, H. R. and Pelroy, R. A. (1971). "Purification and properties of phosphotransacetylase from *Veillonella alcalescens*" J. of Biol. Chem. **247**: 1911-1917.

Wolfe, A. J., D.-E. Chang, J. D. Walker, J. E. Seitz-Partridge, M. D., C. F. L. Vidaurri, B. M. Prüß, M. C. Henk, J. C. Larkin, and T., et al. (2003). "Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development." Mol. Microbiol. **48**: 977–988.

Wolfe, A. J. (2005). Microbiol. Mol. Biol. Rev. **69**: 12–50.

Wong, S. S., Wong, L. J. (1980). "Inactivation of *E. coli* acetate kinase by N-etylenmaleimide. Protection by substrates and products." Bio. Chim. Biophys. Acta. **615**: 121-131.

Wong, S. S., Wong, L. J. (1981). "Evidence for an essential arginine residue at the active site of *E. coli* acetate kinase." Bio. Chim. Biophys. Acta. **660**: 142-147.

Wu, D., L. Govindasamy, W. Lian, Y. Gu, T. Kukar, M. Agbandje-McKenna, and R. McKenna. (2003). "Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer." J. Biol. Chem. **278**: 13159- 13165.

Xu, B., M. Jahic, and S.-O. Enfors. (1999). "Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli* ." Biotechnol. Prog. **15**: 81-90.

Xu, Q. S., Jancerik, J., Lou, Y., Kuznetsova, K., Yakunin, A. F., Yokota, H., Adams, P., Kim, R., and Kim, S. H. (2005). "Crystal structures of a phosphotransacetylase from *B. subtilis* and its complexes with acetyl-phosphate." J. Struct. Funct. Genomics **6**: 269-279

Yamamoto-Otake, H. M., A. Matsuyama, and F. Nakano. (1990). "Cloning of a gene coding for phosphotransacetylase from *Escherichia coli*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**: 680-682.

Zhuang, L. B., G. N. BENNETT, and F. B. Rudolph. (1996). "Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." Appl. and Envir. Microbiol. **62**: 2758-2766

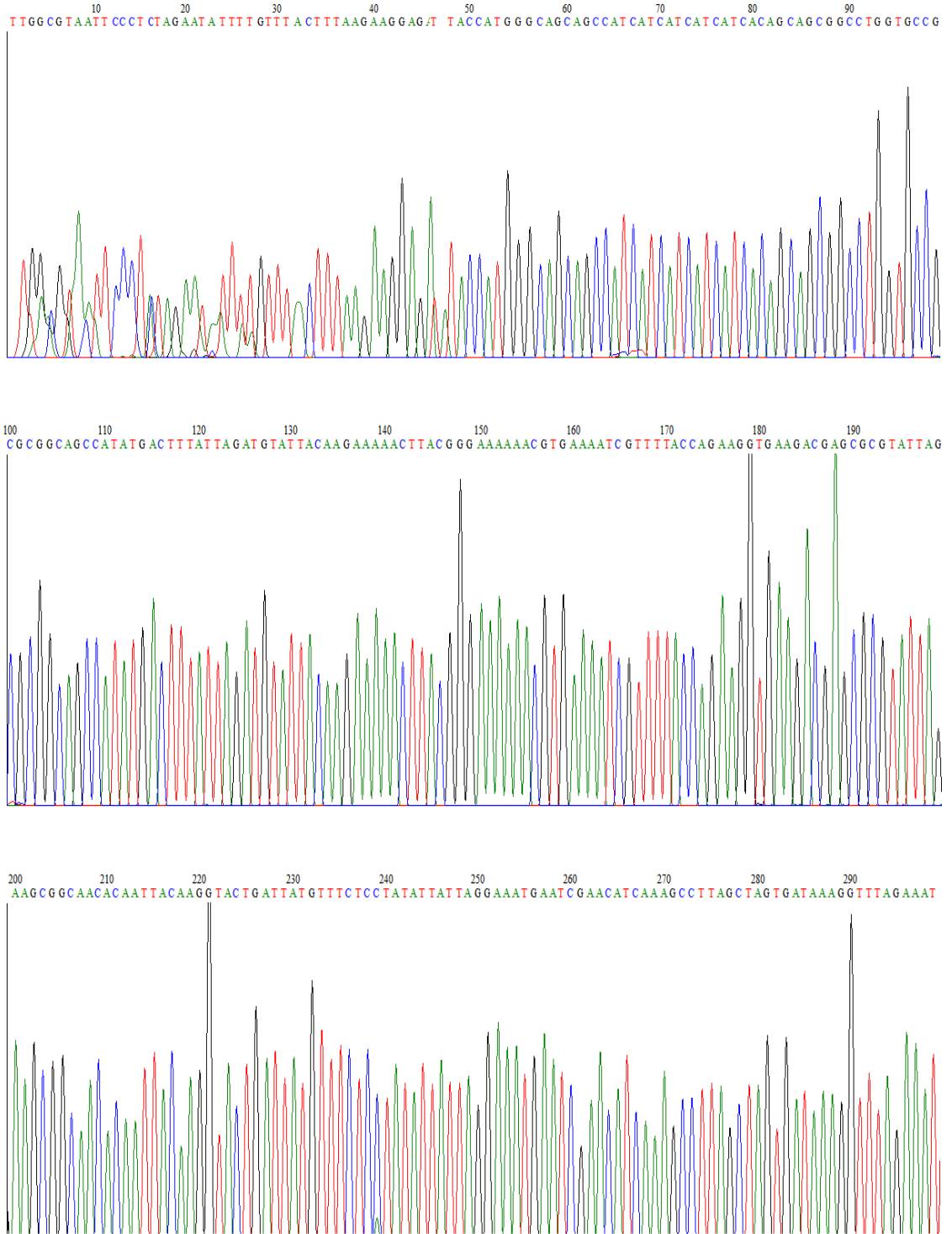


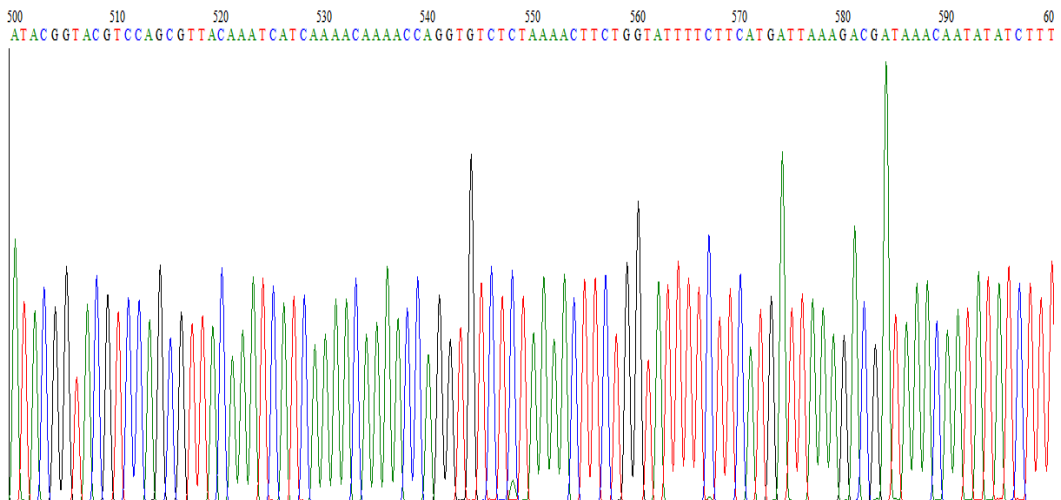
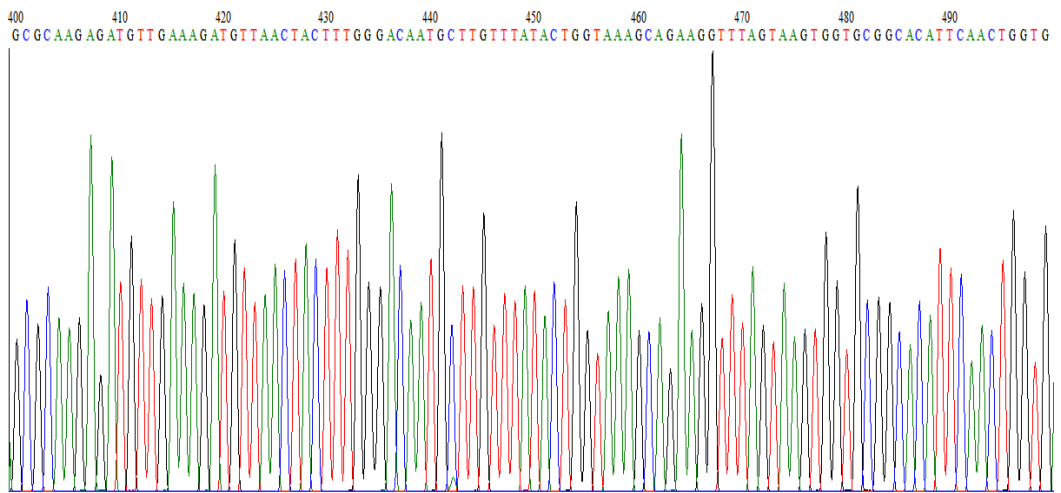
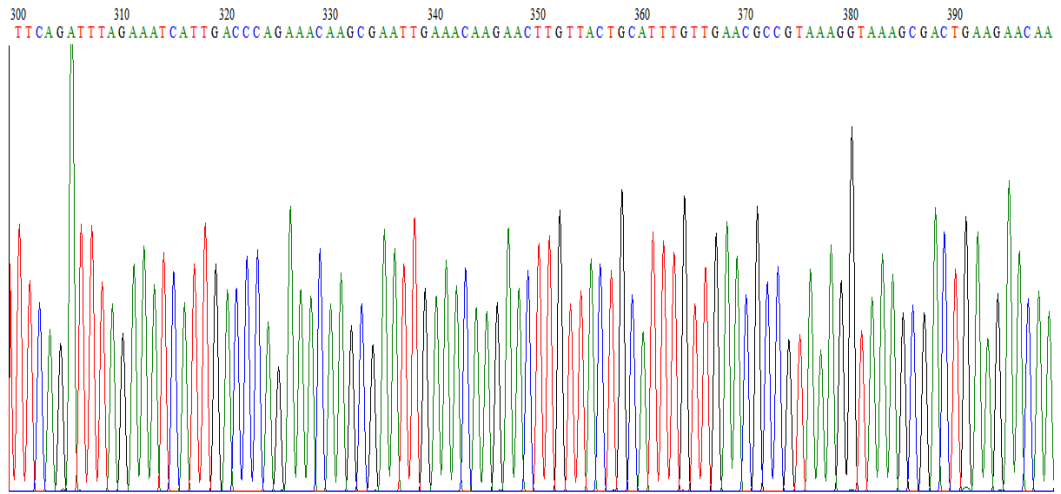
## ÖZGEÇMİŞ

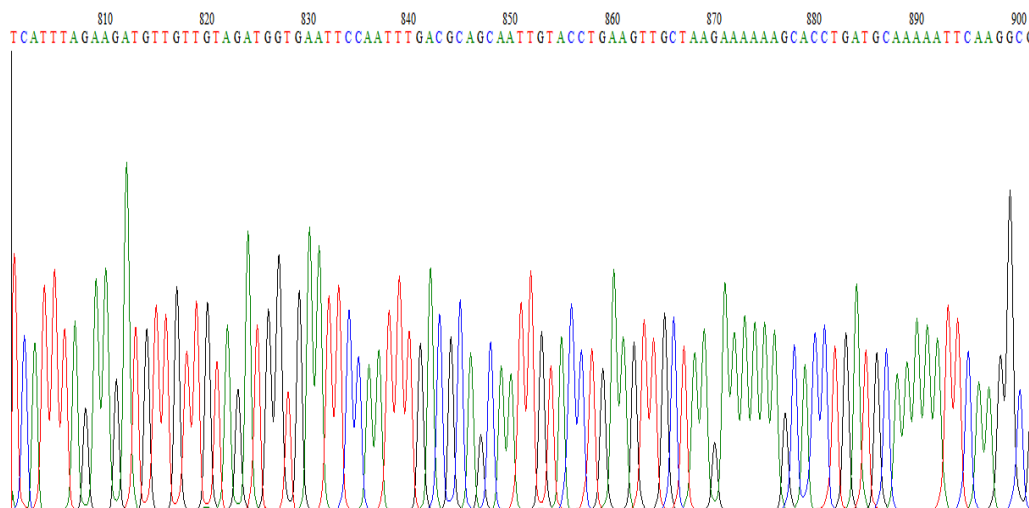
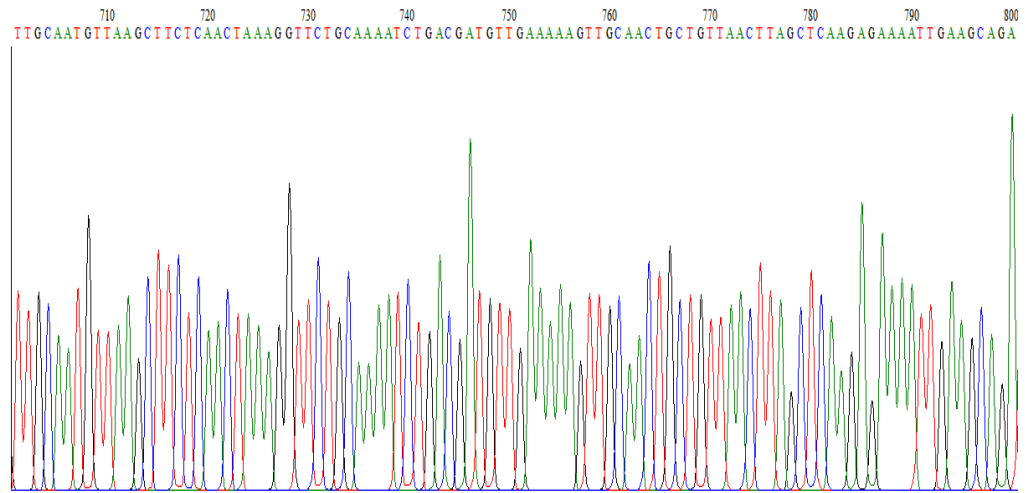
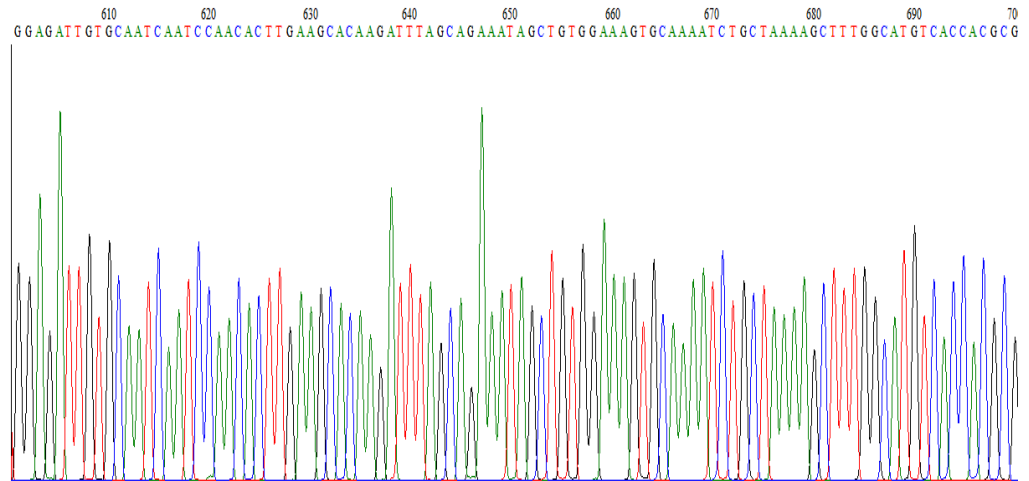
İlknur (Yurtsever) AKSOY, 05.07.1982 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk ve Ortaöğrenimini İstanbul'da tamamladıktan sonra, 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Ön Lisans programına kaydoldu ve bu programı 2002 yılında tamamladı. Aynı yıl, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Lisans Programına katıldı ve bu programı da 2005 yılında tamamladı. 2005 yılında GYTE Biyoloji Bölümü'nde başladığı Yüksek Lisans eğitimine, 2007 yılından itibaren Kimya Bölümü'nde devam etti. 2008 yılında evlenerek AKSOY soyadını aldı. ERASMUS programı kapsamında 2009 yılında 8 ay süreyle, Eindhoven Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Biyomedikal Teknolojileri alanında çalışmalarda bulundu. Yabancı dili İngilizcedir.

# EKLER

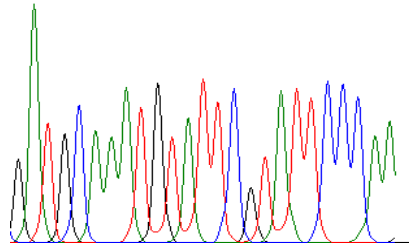
**EK-1.** T7-İleri Primer ile *pta* Geni Dizi Analizi Kromotogramı.



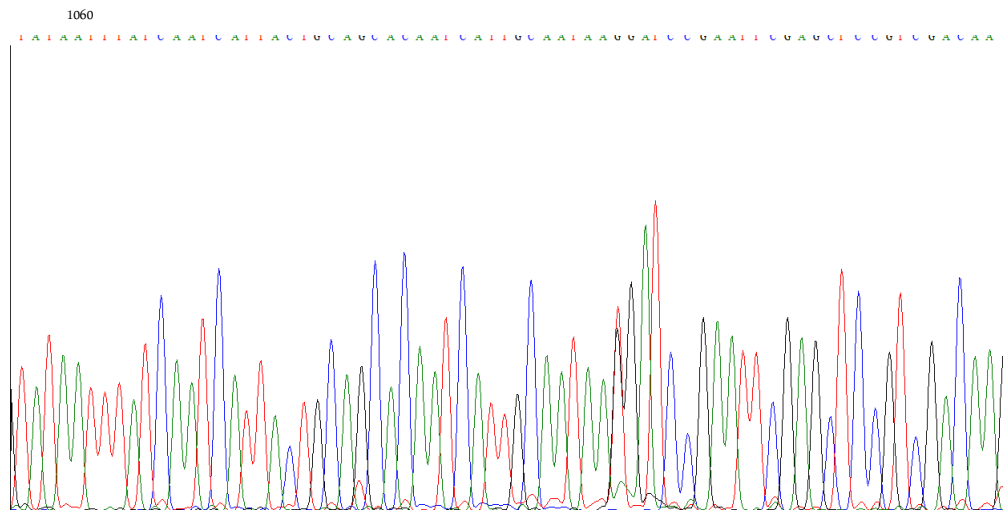
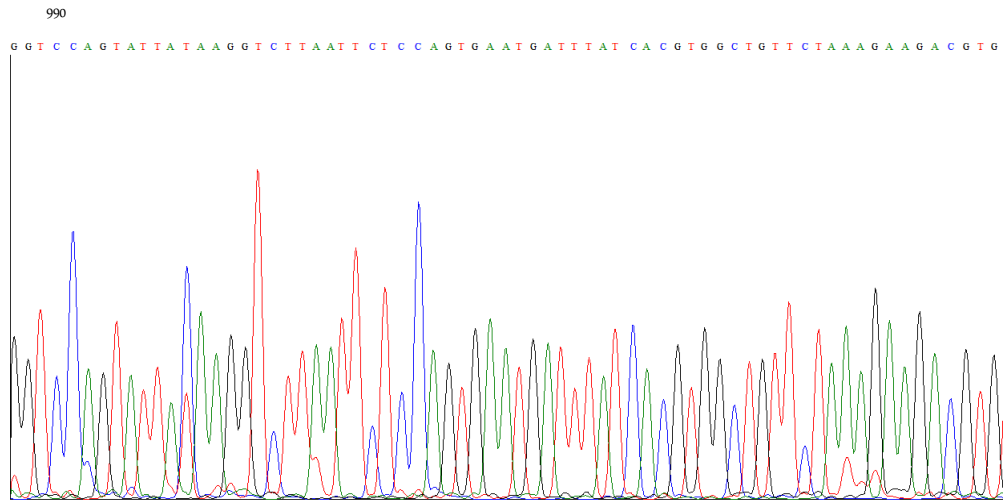
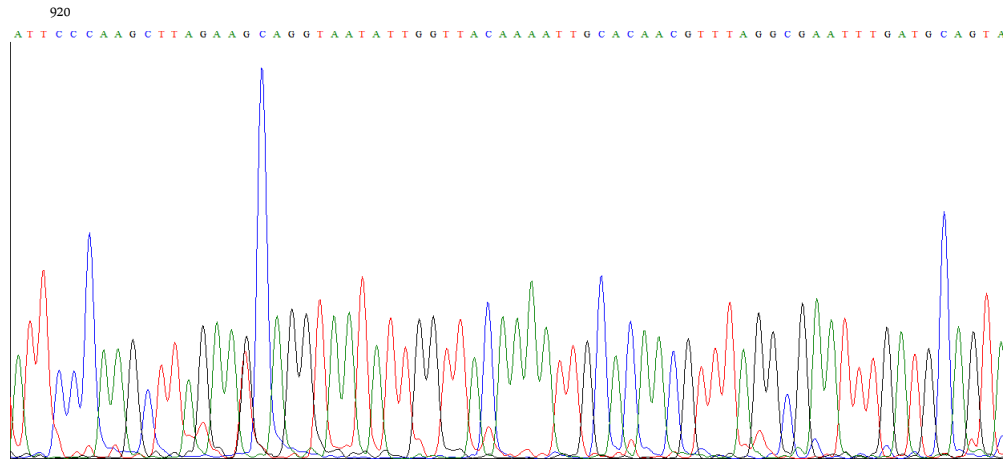


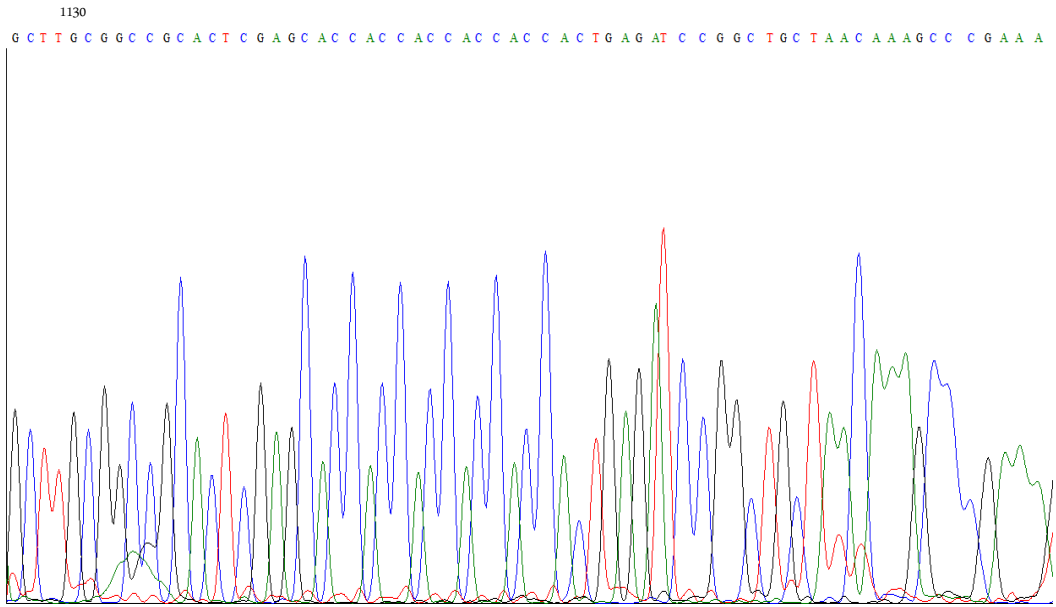


GATGCAAATGTATTCTATTCCAA



## EK-2. T7-Geri Primer ile *pta* Dizi Analizi Kromotogramı





1200

T G A A G C T G A T T G G A C C

