

9 BAKTERİLER VE BAKTERİ VİRÜSLERİNİN GENETİĞİ

Geçmişteki genetik araştırmaların ve bu günkü moleküler genetik çalışmaların büyük kısmı bakteriler ve onların virüsleri ile ilgilidir. Bakteriler, genetik bilgiyi taşıyan ve ökaryotlarınkine yapısal olarak benzemeyen bir “kromozom” a sahiptirler. Prokaryotlar olarak bilinen zarla çevrili bir çekirdeğe sahip olmayan organizmalar içinde yer alırlar.

Virüsler organizmalardan oldukça farklıdırlar. Bazı özellikler bakımından (genetik materyal taşımaları) canlılara benzer olsalar da bağımsız olarak çoğalamamalarından dolayı çoğu yaşambilimci tarafından cansız olarak kabul edilirler. Virüsler çoğalabilmek için diğer hücrelerde parazitleşmek zorundadırlar. Bakteri paraziti olan virüslere **bakteriyofajlar** veya kısaca **fajlar** denilmektedir.

Bakteri ve virüslerin kalıtım özellikleri ökaryotlarınkinden oldukça farklılık gösterebilmektedir. Bakteriler hücrenin büyümesi ve bölünmesi şeklinde gerçekleşen eşeysel olmayan (aseksüel) üreme sekline sahiptirler, bir hücre ikiye bölünerek çoğalır. Buna rağmen eşeyli üremeye benzeyen, yani farklı kaynaklardan gelen genetik bilginin karışımını sağlayan mekanizmalar da vardır. Dolayısıyla bakteri ve bakteriyofajlar farklı tip gen aktarım mekanizmalarına sahiptirler.

Bakterilerde ancak DNA'nın hücre içine iletilmesi durumunda rekombinasyonun olduğu bilinmektedir. Hücre içine DNA iletimi temelde üç farklı şekilde gerçekleştirilir: i) **transformasyon**, sadece çıplak DNA'nın hücreye alınması, ii) **konjugasyon**, plazmit denilen bir kromozom dışı genetik elementin transferi veya bu elementin yardımıyla kromozomun bir parçasının transferi, iii) **transdüksiyon**, bir virüs aracılığıyla DNA transferi. Herhengi bir şekilde transfer edilen DNA molekülleri hücresel genomla integre olabilir veya otonom elementler olarak sitoplazmada varlığını sürdürebilir.

9.1 Mikroorganizmalarla Çalışma

Bakteriler hızla bölünürler ve küçük alanları işgal ederler. Bu nedenle genetik model organizmalar olarak çok kullanışlıdırlar. Hücre ikiye bölünerek çoğalır ve sayıları logaritmik olarak artar (1→2→4→8→16→32...). Çoğu bakteri hareketsizdir ve bir katı besiyerinin yüzeyine ekildiğinde hücre sayıları 10⁷'ye ulaşana kadar çıplak gözle gözlenemezler. Çıplak gözle gözlenebilen bu hücre yığını **koloni** olarak adlandırılır. Her koloni tek bir atasal hücreden köken aldığından bir koloninin üyeleri **klon** (klon hücre) olarak bilinir.

Yabani tip bakteriler **prototrof** olarak bilinir, yani minimal besiyerinde temel bir karbon kaynağını kullanarak ihtiyaç duydukları tüm yapıtaşlarını ve enerjiyi sağlayarak üreyebilirler. Bir veya daha fazla hücresel yapıtaşını sentezleyemeyen bakteri hücresi **oksotrof mutant** olarak bilinir. Sözelimi *met* mutantları metionin sentezleyemezler, dışardan hazır olarak almak zorundadırlar. Diğer bir mutant şekli belli bir enerji kaynağının kullanımı yeteneği ile ilgilidir. Bazı yabani tipler belli bir enerji kaynağını kullanabiliyorken mutantlar kullanamazlar (laktoz⁺, laktoz⁻). Diğer bir mutant kategorisinde yabani tipler bir gelişme baskılayıcısı (antibiyotik, ağır metal gibi) varlığında üreyemez-

ken mutant hücreler üreyebilirler, bu tip mutantlara **direnç mutantları** denir. Bütün bu mutant tipleri genetikçinin farklı suşları ayırt etmesine izin verir. Ayrıca deneylerde kullanılan genom ve hücrelerin (bakteri) takibini mümkün kılan **genetik işaretleyiciler** (genetik marker = genetik belirteç) olarak iş görürler. Bakteri genetiğinde kullanılan bazı genetik simgeler Tablo 9.1’de verilmektedir.

Tablo 9.1: Bakteri genetiğinde kullanılan bazı genetik simgeler.

Simge	Simge ile bağlantılı karakter veya fenotip
<i>bio</i> ⁻	Minimal besiyerine biotin ilavesi zorunluluğu
<i>arg</i> ⁻	Minimal besiyerine arjinin ilavesi zorunluluğu
<i>met</i> ⁻	Minimal besiyerine metionin ilavesi zorunluluğu
<i>lac</i> ⁻	Karbon kaynağı olarak laktozu kullanamaz
<i>gal</i> ⁻	Karbon kaynağı olarak galaktozu kullanamaz
<i>str</i> ^r	Streptomisine dirençli
<i>str</i> ^s	Streptomisine duyarlı

9.2 Bakteriyel Konjugasyon

Bakteriler eşeyli üreme ve rekombinasyona benzer her hangi bir sürece sahip midir? 1946 yılında J. Lederberg ve E. Tatum tarafından zekice tasarlanmış ve bakterilerde eşey benzeri bir sürecin varlığını gösteren deneyler yapılmıştır. Bu araştırmacılar iki *Escherichia coli* suşuyla çalıştılar. Suş A minimal besiyerine eğer metionin ve biotin eklenirse, suş B’de treonin, lösin ve tiamin eklenirse üreyebilirler:

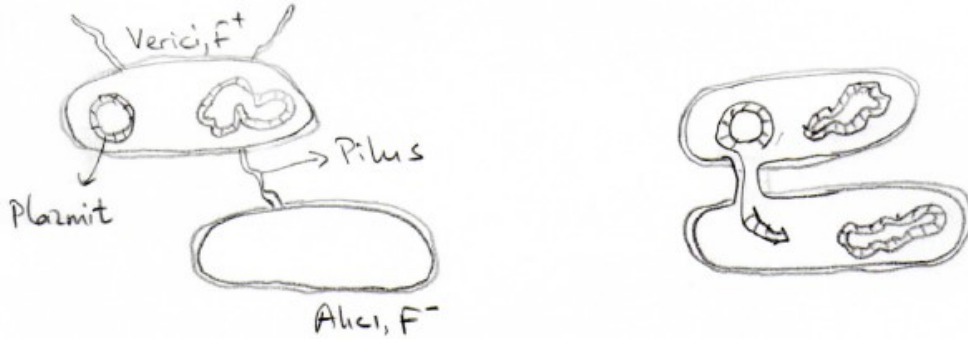
Suş A: *met*⁻ *bio*⁻ *thr*⁺ *leu*⁺ *thi*⁺

Suş B: *met*⁺ *bio*⁺ *thr*⁻ *leu*⁻ *thi*⁻

Suş A ve suş B bir temel karbon kaynağı içeren minimal besiyerine ayrı ayrı ekildiklerinde, her ikisi de oksotrof mutant olduklarından koloni oluşturamamışlardır. Bu iki suş birbiriyle karıştırılıp kısa bir süre bekletildikten sonra minimal besiyerine ekildiklerinde az sayıda ($1/10^7$) koloni üreyebilmiş yani prototrofik özellik göstermiştir. Dolayısıyla minimal besiyerinde üreyebildiklerine göre bunlar yabancı tip olmalıydılar. Bu sonuç iki oksotrofun genomları arasında rekombinasyon meydana geldiğini, böylece prototrofların meydana geldiğini göstermektedir.

Prototrofluğun her iki suş tarafından ayrı ayrı sentezlenen bileşiklerin yardımıyla oluştuğu görüşüne karşı daha sonraları bir deney ile cevap verilmiştir. Hücrelerin doğrudan temas edemediği ancak besiyerinin geçebildiği bir U borusu düzeneğinde iki mutant suş üretilmiş ve suşların hiç birinin prototrofluğa geçiş yapamadıkları belirlenmiştir. Dolayısıyla oksotrof hücrelerin prototrof hale gelebilmeleri için hücrelerin fiziksel temasının olmasının gerektiği ortaya çıkmış, prototrofiye geçişte bir çeşit genom birleşmesinin gerçekleştiği yani rekombinasyonun oluştuğu anlaşılmıştır. Bakteri hücrelerinin, DNA transferi için fiziksel olarak birleştikleri bu olay **konjugasyon** olarak adlandırılmaktadır.

1953 yılında W. Hayes yukarıda söz edilen “çaprazlama”da eşlerden sadece birinin genomunun bir kısmını veya tamamını diğer hücreye transfer ettiğini belirledi. Bu durumda hücrelerden birinin **verici** (donor) diğerinin de **alıcı** (receptient) olarak iş gördüğü anlaşılmıştır. Bu durum eşlerin eşit şekilde katkıda bulunduğu ökaryotik çaprazlamalardan oldukça farklıdır. Yapılan deneylerde DNA transfer etme yeteneğinin kaybedilip tekrar kazanılabildiği ve transferin hızla gerçekleştirilebildiği belirlendi. Bu durum, bazı faktörlerin bakteri hücrelerine bulaşıcı bir şekilde transferinin gerçekleştirildiğini düşündürdü. Sonuçta vericilik yeteneğinin bir fertilitite (F) faktörü (üretkenlik faktörü) tarafından gerçekleştirilen kalıtsal bir durum olduğu ileri sürülmüştür. F faktörünü taşıyan suşlar transfer gerçekleştirebilirler ve **F⁺** olarak adlandırılırlar (Şekil 9.1).

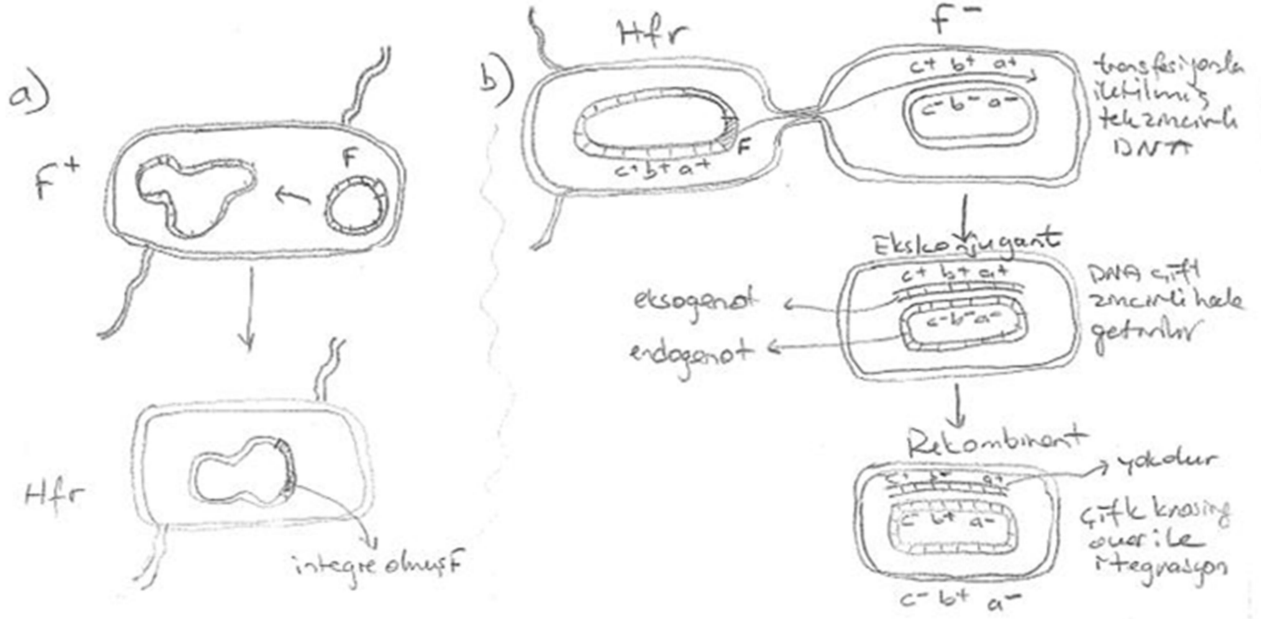


Şekil 9.1: Konjugasyon. Pilus iki bakteriyi çekerek yaklaştırır, sonra iki hücre arasında bir köprü oluşur ve bu köprünün açıklığından tek zincirli DNA alıcı hücreye geçer.

Bugün bir F faktörünün bakteri hücrelerinde bulunan otonom olarak çoğalan halkasal DNA molekülleri olan **plazmit**lerin bir çeşidi olduğunu biliyoruz. Plazmitler sitoplazmada kromozomdan bağımsız olarak replike olurlar. F plazmiti F pilusu sentezini gerçekleştirir. F pilusları alıcı hücreyle teması sağlayan hücre yüzey uzantılarıdır. Verici hücre F piluslarıyla alıcı hücreye bağlanıp iki hücreyi birbirine yaklaştırır (Şekil 9.1). F plazmiti üzerinde transfer orijini denilen belli bir noktadan DNA zincirlerinin biri kopar ve **dönen halka replikasyonu** denen bir mekanizma ile sağlam halka dönerken kırılan zincir alıcı hücreye geçer. Alıcı hücreye geçen ve verici hücrede kalan tek zincirler çift zincirli hale getirilir. Böylece eşleşen her iki hücre de F plazmitine sahip olur, F⁻ alıcı hücre de F⁺ verici hale geçer.

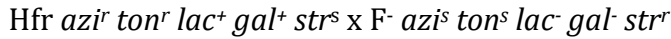
F⁺ suşlarından bazılarının normal F⁺ suşlarından daha sıklıkla rekombinasyona neden olduğu da bilinmektedir. **Hfr** (**H**igh **f**requency of **r**ecombination) olarak isimlendirilen bu suşlar F plazmitinin hücre genomuna integrasyonu ile oluşan suşlardır (Şekil 9.2a). F⁺ x F⁻ çaprazlarında F⁻ ataların çok büyük bir çoğunluğunun F⁺’ya dönüşmesine rağmen Hfr x F⁻ çaprazlarında F⁻ suşlar ne F⁺ suşa ne de Hfr suşa dönüşmemektedir. Hfr suşlarda F DNA’sının orijin kısmından zincirlerden biri koparak hücreler arası temas bölgesinden F⁻ hücreye geçer. Tam bir F DNA’sının alıcı hücreye geçebilmesi için bütün kromozomun alıcı hücreye transfer edilmesi gerekir ki bu normal şartlarda gerçekleşmez. Dolayısıyla tam bir F plazmit DNA’sı alıcı hücreye transfer edilemez. Verici durumdaki Hfr suş kromozomundaki tek zincirli bölgeler çift zincirli hale getirilir ve hücre Hfr olarak kalır (Şekil 9.2b). Alıcı hücreye transfer edilen tek zincirli DNA çift zincirli hale getirilir. Transfer edilen bu DNA ile homolog olan alıcı genom bölgesi arasında rekombi-

nasyon gerçekleşebilir. Rekombinasyonun gerçekleşmemesi durumunda transfer edilen DNA zamanla yok olacaktır.

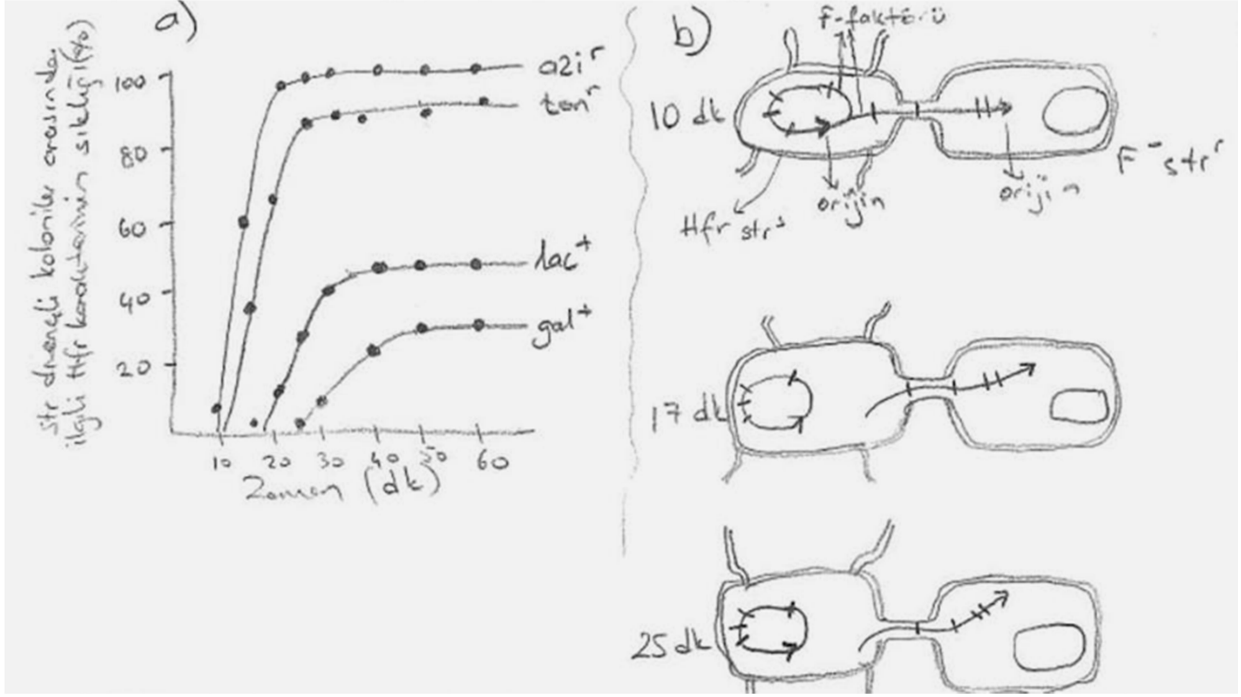


Şekil 9.2: a) Hfr oluşumu. Bir F faktörü nadir olarak *E. coli* genomuna integre olur ve Hfr suşu oluşur. b) Bakteriyel konjugasyon sonrası rekombinasyon. Verici kromozomunun tek zincirli parçasının alıcıya transferi ve alıcı kromozomuyla rekombinasyonu.

Hfr hücrenin genleri transfer orijininin den itibaren kromozom üzerindeki konumlarına göre sırasıyla alıcı hücreye geçerler: Önce orijine yakın gen sonra sıra ile daha uzak olanlar. Konjugasyon sırasında belli aralıklarla konjugasyon karışımından örnekler alınarak blenderle karıştırılırsa hücrelerin bağlantısı kopar ve transfer durur. Bu olay **durdurulmuş eşleşme** olarak adlandırılır. Sonra alınan örnekler katı besiyerine ekilir ve genetik işaretleyici karakterler aranır. Aranan genetik işaretleyicileri taşıyan hücreler **ekskonjugant** olarak adlandırılır:



Bu çaprazlamada ekskonjugantlar streptomisin içeren besiyerlerinde geliştirilerek hangi tip işaretleyicileri taşıdıkları analiz edilir. Her bir allel F⁻ alıcı hücrelerde eşleşme başladıktan belli bir süre sonra görülür. Verici allelleri alıcı hücrelere orijinden itibaren sırayla taşıdığına göre bir ekskonjugant popülasyonunda allellerin alıcı hücrelerde görülme sıklığı orijinden uzaklıklarıyla doğru orantılı olarak azalacaktır (Şekil 9.3).



Şekil 9.3: Durdurulmuş eşleşme konjugasyon deneyi. a) Eşleşme sonrasında ekskonjugantlar arasında verici allellerinin zamana bağlı sıklığını gösteren grafik. b) Zamana bağlı olarak genetik işaretleyicilerin şematik görünümü.

Hfr allellerinin alıcı hücrelerde sıralı olarak görülmesi ve zamana bağlı olarak görülme sıklıklarındaki farktan faydalanılarak bakteriyel genlerin haritalanması mümkün olmaktadır (Şekil 9.3'ü inceleyiniz). Bakteri kromozomu üzerinde F plazmitlerinin farklı bölgelere integre olmasıyla oluşmuş farklı tip Hfr suşları kullanılarak farklı kromozom bölgelerinin haritalanması mümkündür.

Bakterilerdeki rekombinasyon olayı ökaryotlardaki gibi tam bir kromozomal eşleşmeyle gerçekleşmez. Alıcı hücrenin (F⁻) kromozomu rekombinasyona katılır ve **endogenot** olarak adlandırılır. Hfr vericiden sağlanan tam olmayan kromozom parçası ise **eksogenot** olarak adlandırılır. DNA eşleşmesi ve rekombinasyon tam bir kromozom olan endogenot ile başka bir kromozomun parçası olan eksogenot arasında gerçekleşir. Bu durumda hücre (eksogenot bölgesi bakımından) kısmi olarak diploittir yani **merozigottur**. (Herhangi bir şekilde genomun belli bölgesinin iki kopyasını taşıyan bakteri hücreleri de merozigot olarak adlandırılır).

Bazı Hfr suşlarında F plazmiti kromozomdan ayrılabilen ve integrasyon öncesindeki otonom haline dönmektedir. Bu ayrılma bazen tam doğrulukta olmamakta, plazmitin yapısına bir miktar genomik DNA da katılmaktadır. Yapısında genomik DNA da taşıyan bu F plazmitlerine **F' plazmitleri** denmektedir.

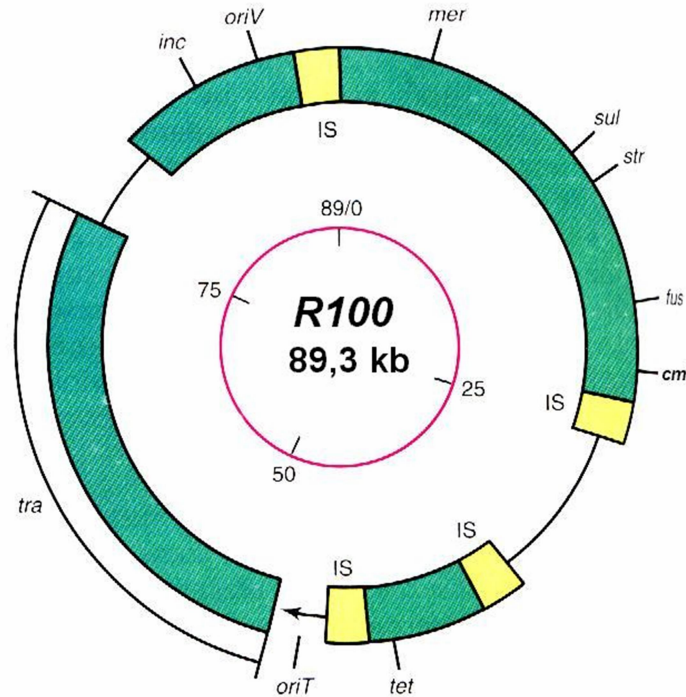
9.2.1 R Plazmitleri (Direnç plazmitleri)

İlk defa 1950'de, dizanteriye neden olan *Shigella* bakterisinin hastalarda hızla penisilin, tetrasiklin, sulfonik asit, streptomisin ve kloramfenikole direnç kazandığı ve bu direncin bulaşıcı bir şekilde duyarlı bakteriler arasında hızla yayıldığı belirlenmiştir. Bu direncin sitoplazmada bulunan konjugatif plazmitlerden kaynaklandığı ve sadece *Shigel-*

la'da değil birçok diğer bakteride de görüldüğü belirlendi. Bu direnç plazmitlerinin aynı türe ait bireyler arasında olduğu gibi oldukça farklı taksonomik gruplar arasında da konjugasyonla yayılabildiği ve dolayısıyla antibiyotik direncinin de paralel olarak yayıldığı bilinmektedir. (Bu durum tıp açısından büyük bir problem ise de genetik mühendisliği için son derece kullanışlı bir gen transfer mekanizması sağlar). Konjugatif fonksiyonu gerçekleştirmekten sorumlu genler yanında, bu plazmitler, antibiyotik ve diğer maddelere karşı dirençten sorumlu genler de taşırlar. Aşağıda bu genlerden bazıları ve fonksiyonları verilmiştir (Tablo 9.2). Şekil 9.4'de tipik bir direnç plazmitinin fiziksel haritası görülmektedir.

Tablo 9.2: Plazmitler tarafından taşınan genetik belirleyiciler.

Karakter	Örnek plazmitler
Fertilite (Üretkenlik)	F, R1, Col
Bakteriyosin üretimi	ColE1
Ağır metal direnci	R6
Enterotoksin üretimi	Ent
Kamfor metabolizması	Cam
Bitkilerde tümörleştirme	T1 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'te)



Şekil 9.4: Tipik bir direnç plazmitinin fiziksel haritası.

9.3 Bakteriyel Transformasyon

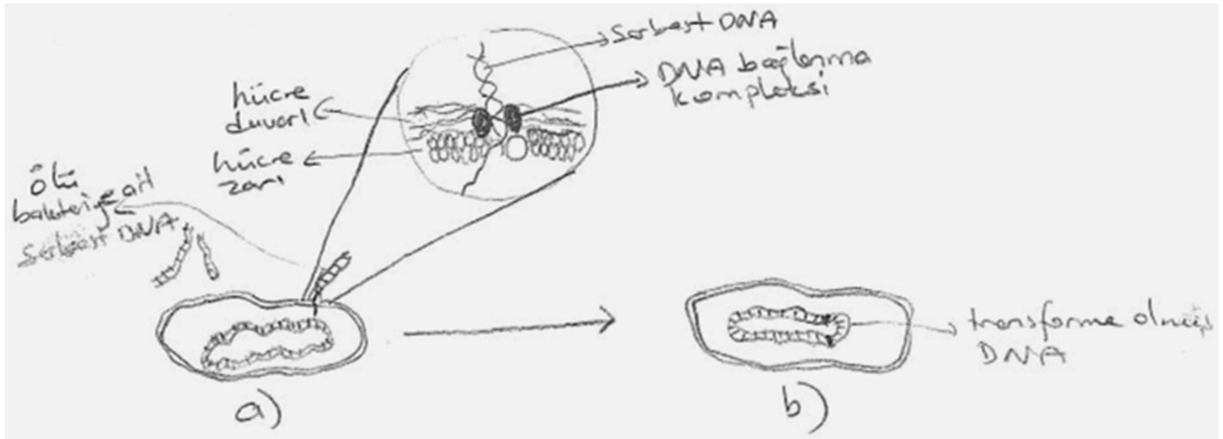
Bazı bakteriler dış ortamdan hücre içine DNA alabilmektedir. Bu DNA ölü bir hücreden serbest kalmış olabilir veya canlı bir hücre tarafından salgılanabilir. Aynı türe ait diğer bir hücreden olabilir ya da farklı türe ait hücrelerden köken alabilir. Her ne kaynaktan olursa olsun hücre içine alınan DNA alıcı hücrenin genomuna integre olabilir.

İntegre olan bu DNA parçasının genotipi alıcı kromozomunun ilgili bölgesinden farklı ise integrasyon sonrasında alıcı hücrenin genotipi kalıcı olarak değişir. Bu olay **transformasyon** olarak bilinir. (Not: Transformasyon terimi ileri ökaryotlarda kanserleşme sürecini ifade etmek üzere kullanılır. Bu organizmalarda dışardan gelen DNA parçalarının genoma integrasyonu ise transfeksiyon olarak adlandırılır. Halbuki transfeksiyon terimi prokaryotlarda bir viral DNA ile transformasyonu ifade etmek için kullanılır).

Bakteriyel transformasyonla ilgili tarihi deneyler 1928 yılında Griffith ve 1944 yılında Avery ve MacLeod tarafından gerçekleştirilmiş olup bu deneyler sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak incelenecektir.

Transformasyonu sağlayan DNA molekülü alıcı hücre kromozomuna konjugasyondaki Hfr x F⁻ çaprazlamasındaki gibi bir süreçle integre olur (Şekil 9.5). Bununla beraber konjugasyonda DNA transferi canlı bir hücreden canlı bir hücreye doğru gerçekleşirken, transformasyonda belli bir harici DNA molekülü alıcı hücrenin hücre duvarı ve plazma zarından hücre içine alınmaktadır.

Transformasyon bakteriyel araştırmalarda çok farklı amaçlar için gerçekleştirilen DNA transferinde kullanılmaktadır. Birçok bakteri manupile edilmiş DNA'nın transformasyonuna izin vermektedir. Bu kolay yöntem bugün ökaryotik hücrelerde de DNA nakli için yaygın olarak kullanılmaktadır.



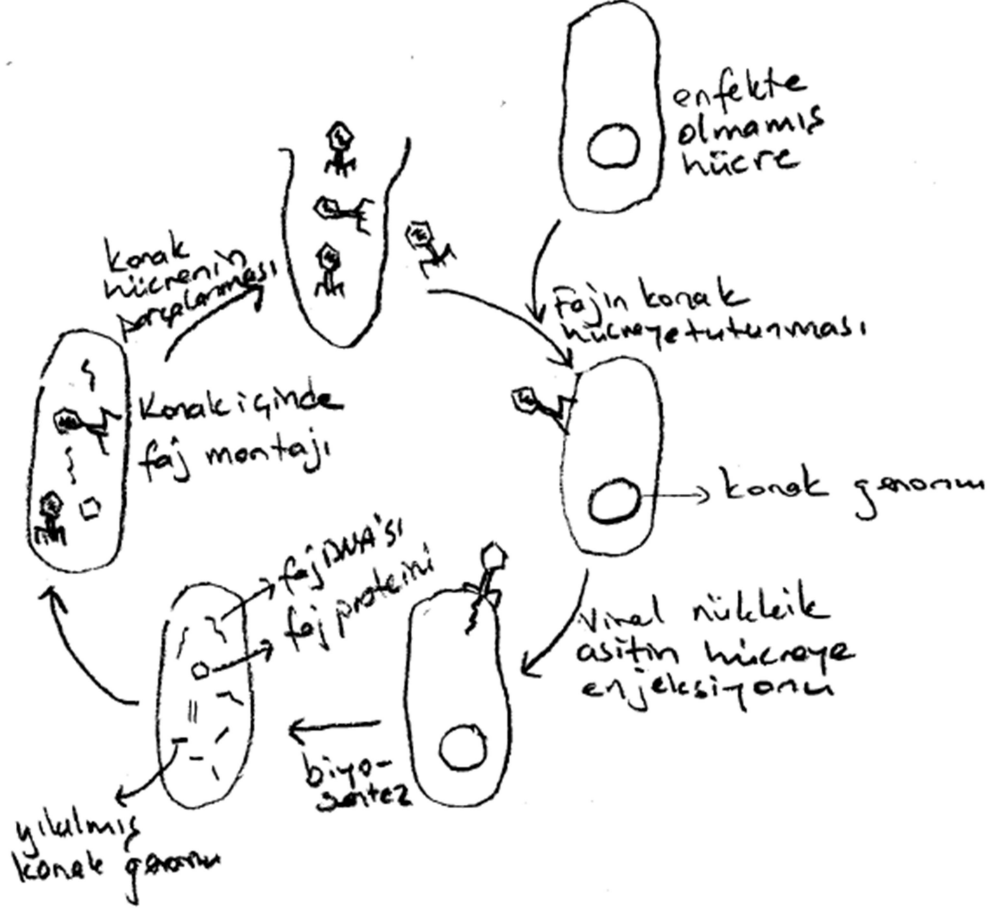
Şekil 9.5: Transformasyon. a) Bakteri ölü bir hücreden bırakılmış serbest DNA'yı alır, b) bu DNA alıcı hücre genomuna integre olur.

9.4 Bakteriyofaj Genetiği

Bakteriyofajlar (bakteri yiyen) bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bakteri virüsleri üzerine yapılan çalışmalar, hayvan ve bitki virüslerinin araştırılmasında model sistem olarak kullanılır. Bakterilerin çoğu bakteriyofaj saldırısına açıktır. Bir faj parçacığı protein yapısında bir örtü ile çevrelenmiş nükleik asit (DNA veya RNA) "kromozom"dan meydana gelmiştir. Bakteri virüsleri cins isimleri yerine simgelerle gösterilir: Faj T4, faj λ , faj P1, faj P22 gibi.

Viral enfeksiyon sırasında virüs bakteriye tutunur ve genetik materyalini hücre içine enjekte eder. Faj genetik bilgisi hücresel genomu parçalayarak yıkar ve hücresel mekanizmaları kontrol altına alır. Hücresel mekanizmaların yardımıyla yeni viral genomlar, örtü proteinleri, kuyruk yapıları ve diğer gerekli viral yapıtaşları ve enzimler sentezlenir. Kullanılan genetik bilgi virüs genomundan sağlanır. Sentezlenen yeni virüs

yapıtaşları ve genomlar yeni virüs parçacıkları şeklinde monte edilir, bakteri hücresi (konak=konukçu) parçalanır (lizis) ve yeni virüs parçacıkları serbest kalır (Şekil 9.6). Bu tip enfeksiyon oluşturan virüslere **virü lent virüsler**, bu tip viral enfeksiyona da **litik enfeksiyon döngüsü** denir. Serbest kalan bu virüs parçacıkları çevredeki diğer bakteri hücrelerini enfekte eder ve olaylar bu şekilde peş peşe devam eder.



Şekil 9.6: Genel bir bakteriyofaj litik döngüsü.

Katı besiyerinin yüzeyine yayma ekim yöntemiyle bakteri ekimi yapılırsa yüzey bir bakteri tabakasıyla kaplanacaktır. Bu yapıya **bakteri çayırı** (lawn) denmektedir. Bir bakteri çayırı virüslerle enfekte edildiğinde çayır içinde belli bir noktadaki bir bakteri hücresinde viral enfeksiyon başlar. Sonra enfeksiyon komşu hücrelere yayılır ve enfeksiyon noktasında görülebilir büyüklükte parçalanmış hücrelerin bulunduğu bir bölge şeffaf olarak görülür. Bu bölgeler **plak** (plaq) olarak adlandırılır. Böyle bir plak virüsün genotipine göre büyük veya küçük, açık veya donuk olabilmektedir. Dolayısıyla plak morfolojisi bir faj karakteridir ve genetik seviyede analiz edilebilir. Diğer bir faj karakteri konak (konukçu) aralığıdır; fajlar enfekte edebildikleri bakteriyel suşlara göre de farklılık gösterirler.

İki fajın genotipi (farklı genotiplere sahip iki faj!) çaprazlanabilir. Orijinal olarak A. Hershey tarafından gerçekleştirilen iki T2 faj genotipi çaprazlamasını inceleyelim:

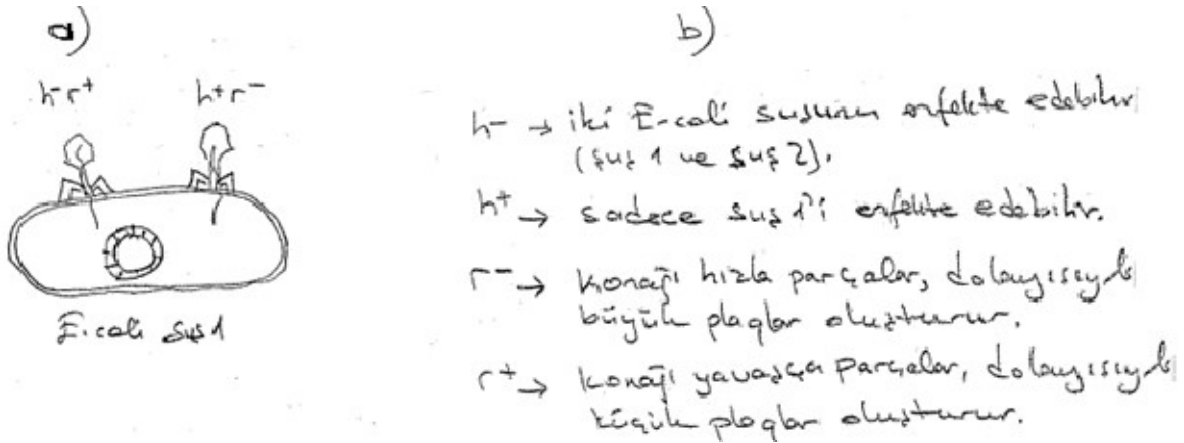
$$h^{-}r^{+} \times h^{+}r^{-}$$

- h^- iki farklı *E. coli* suşunu (suş 1 ve suş 2 diyelim) enfekte edebilir,
- h^+ sadece suş 1'i enfekte edebilir,
- r^- hücreleri hızla parçalar, dolayısıyla büyük plaqlar oluşturur,
- r^+ hücreleri yavaşça parçalar, küçük plaqlar oluşturur.

Böyle bir çaprazlama her iki virüsü de aynı hücreye enfekte etme esasına dayandığından **karışık enfeksiyon** veya **çiftli enfeksiyon** olarak adlandırılır. Çaprazlamayı gerçekleştirmek üzere her iki atasal faj suş 1'e enfekte edilir. Belli bir süre sonra yeni oluşan virüsler karışık olarak izole edilerek suş 1 ve suş 2'nin birlikte bulunduğu bir bakteri çayırına enfekte edilir. Bu enfeksiyon sonrasında dört farklı fenotip elde edilir ve her plaq tipinin sayısı belirlenir: atasal plaqlar h^+r^+ ve h^-r^- , rekombinant plaqlar h^-r^+ ve h^+r^- (Şekil 1.7). Rekombinantların sıklığı (RS) aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

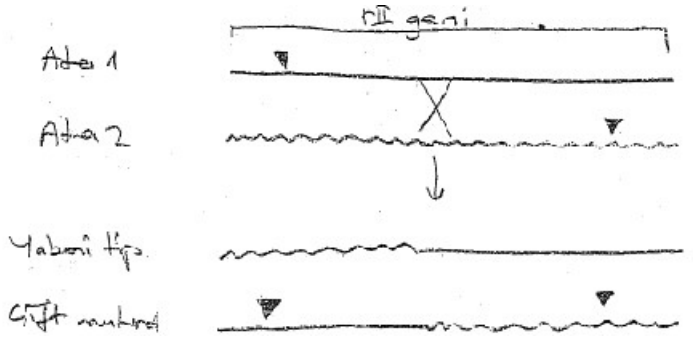
$$RS = \frac{(h^-r^+) + (h^+r^-)}{\text{Toplam plak}}$$

Faj kromozomunun doğrusal olduğunu varsayarsak tek crossing over ile rekombinantlar oluşur. Faj çaprazlamaları bazı genetik karışıklıklar gösterse de sonuçta RS hesaplaması geçerli bir harita uzaklığı değeri verir.



Şekil 1.7: a) İki faj tarafından bir *E. coli* hücresinin çiftli enfeksiyonu. b) h^+r^+ x h^-r^- çaprazlaması sonucu oluşan plaq fenotipleri.

Astronomik sayıda fajın rekombinasyon analizlerinde kullanılabilmesinden dolayı nadiren meydana gelen (bir birine çok yakın iki nokta arasında) rekombinasyon olaylarının da gözlenebilmesi mümkündür. 1950'lerde S. Benzer T4 fajının *rII* geni içindeki mutant bölgelerin haritasını yapmıştır. Farklı *rII* mutant alleller kendiliğinden oluşmakta ve mutant bölgeler gen içinde farklı pozisyonlarda bulunabilmektedir. İki farklı *rII* mutantı (rII^- x rII^-) çaprazlandığında mutant bölgeler arasında nadiren crossing over oluşur ve yabancı tip fenotipe sahip rekombinantlar oluşur (Şekil 9.8).



Şekil 9.8: *rII* gen içi mutantların rekombinasyonu sonucu yabani tip *rII*⁺ geninin oluşumu.

rII⁺ rekombinantların sayısı mutasyon pozisyonları arasındaki uzaklıkla doğru orantılı olacaktır. Benzer, bu nadir rekombinantları astronomik sayıdaki yavru fajlar arasından zekice bir yolla ayırt etmiştir. *rII* mutantları *E. coli* suş K içinde enfeksiyon gerçekleştiremez. Diğer suşta (*E. coli* suş B) çiftli çaprazlamayı yapıp astronomik sayıda yavru virüs elde ettikten sonra, bu virüsleri K suşuna enfekte etti. K suşunda sadece nadir rekombinasyonlar sonucu oluşan *rII*⁺ fajlar enfeksiyon yapabilir. Belirlenen plak sayısı, rekombinasyon sıklığının hesabedilmesinde kullanılabilir. Benzerin uyguladığı, aynı gen içinde meydana gelen mutasyonların pozisyonlarının belirlenmesi (haritalanması) yöntemi, herhangi bir gen için uygulanabilir. Ancak bu gün için DNA dizileme teknikleriyle mutant bölgeler daha hızlı ve etkili bir şekilde belirlenebilmektedir.

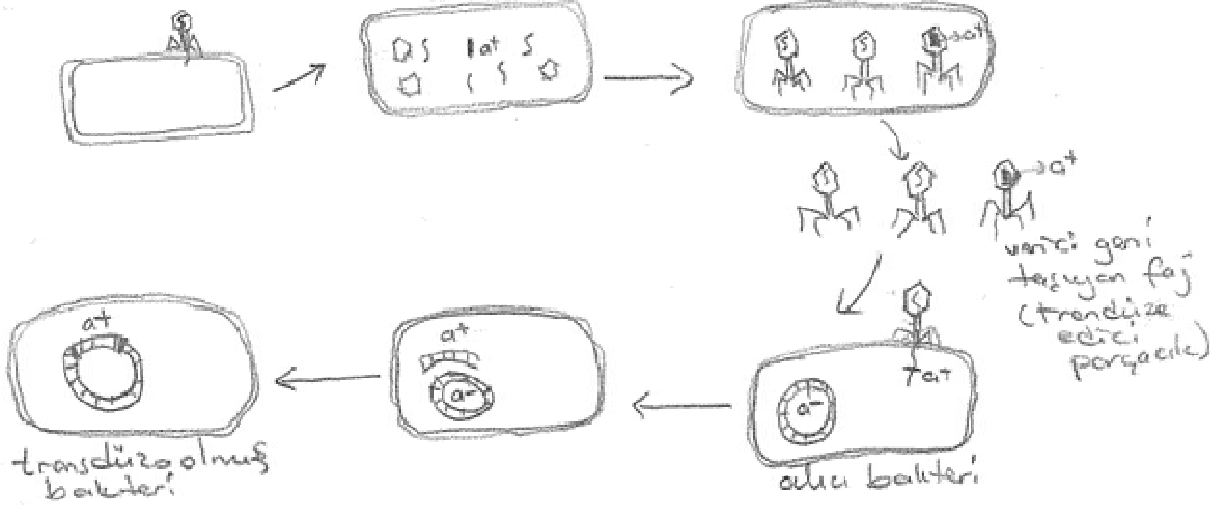
9.5 Transdüksiyon

Bazı fajlar bakteriyel genleri alarak bunları diğer bir bakteriye taşıyabilirler. Bu olay **transdüksiyon** olarak isimlendirilir. Transdüksiyon Hfr kromozom transferi, F' plazmit transferi ve transformasyon gibi bakteriler arasında genomik DNA transferinin diğer bir şeklidir. Transdüksiyon, 1951 yılında J. Lederberg ve N. Zinder tarafından *Salmonella typhimurium* bakterisinde rekombinasyon araştırılırken, P22 fajı aracılığı ile genomik DNA aktarımının gerçekleştiği gösterilerek keşfedilmiştir.

Transdüksiyon olayını anlayabilmek için iki tip faj döngüsünü tanımak gerekir. **Virü lent fajlar** konak hücreyi hızla parçalayan ve öldüren fajlardır. **İlımlı fajlar** ise konak hücre içinde onu öldürmeden belli bir süre kalabilen fajlardır. Bu sırada ılımlı fajlar DNA'larını ya genoma integre ederler ya da plazmitler gibi sitoplazmada otonom olarak kalırlar. Bakteri genomuna integre olmuş bir ılımlı virüs genomu **profaj** olarak adlandırılır. Bu şekilde sessiz (enfeksiyon süreçleri devam etmeyen) bir fajı taşıyan bakteri hücresi ise **lizojen**, bu tip enfeksiyon da **lizojenik enfeksiyon** olarak adlandırılır. Sadece ılımlı fajlar transdüksiyon yapabilirler. İki tip transdüksiyon vardır: genel transdüksiyon ve özelleşmiş transdüksiyon. Genel transdüksiyonda bakteri genomunun herhangi bir bölgesi transdüze edilirken (virüs aracılığıyla transfer edilirken) özelleşmiş transdüksiyonda genomun özgül bir parçası transdüze edilir.

Genel transdüksiyonda bir seri olay gerçekleşir. Buna tipik örnek P1 fajıdır. Litik döngü sırasında bakteriyel genom parçalara ayrılır. Enfeksiyonun sonuna doğru, yeni virüs parçacıkları oluşturulurken, nadiren virüs parçacığı içine yanlışlıkla viral DNA değil hücresel genomik DNA paketlenir. Bu olay transdüksiyon yapıcı parçacığın kaynağını oluşturur. Transdüksiyon yapıcı bu faj parçacığı (genomik DNA'yı taşıyan faj) yeni bir

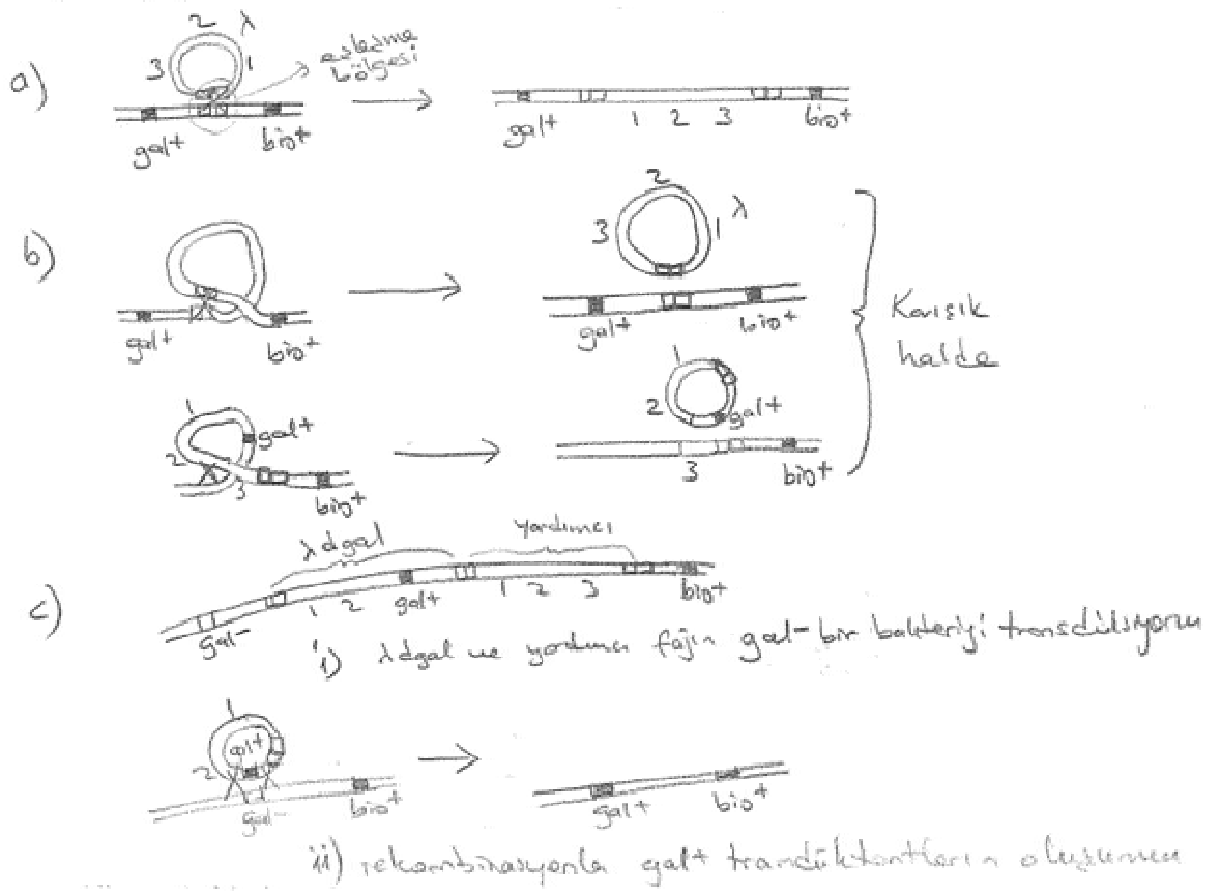
hücreyi enfekte ettiğinde taşıdığı DNA alıcı hücrenin genomu ile integre olur ve böylece transdüksiyon gerçekleşir (Şekil 9.9). Gerçekte çok küçük sayıda faj parçacığı (1/10 000) verici hücre genlerini taşır. Genel transdüksiyon birbirine yakın genlerin bağlantı analizleri ve kromozom haritalama amacıyla da kullanılabilir.



Şekil 9.9: Genel transdüksiyon mekanizması. Gerçekte çok küçük sayıda (1/10 000) yavru faj verici hücre DNA'sı taşır.

Özelleşmiş transdüksiyonda bakteriyel genoma integre olmuş virüsler aracılığı ile transdüksiyon gerçekleştirilir. *E. coli* λ fajı buna tipik örnektir. Bu virüsler *E. coli* genomunun özgül bölgelerine integre olur. Profaj genomdan ayrılırken bazen tam doğru bölgeden ayrılmaz, hücresel genomun bir parçasını da alarak ayrılırlar. (Hücresel genomdan aldığı DNA bölgesi kadar kendi genomundan kaybeder). Hücresel genomdan virüsün yapısına katılan DNA bölgesindeki genler (verici genleri) sonraki enfekte edilen hücreye (alıcı hücre) taşınır. Verici DNA'sı ile homolog olan alıcı genomu arasında rekombinasyon gerçekleşir.

λ kromozomu ve bakteriyel kromozom (her ikisi de halkasal!) tek crossing over ile integre olur. Bu integrasyon noktası hücresel genomda λ **eklenme bölgesi** denilen bir bölgeden gerçekleşir. *E. coli* genomunda λ eklenme bölgesi *gal* ve *bio* genleri arasındaki bir bölgededir. İntegrasyondan sonra ayrılma halkası oluşurken ya tam doğrulukta bir ayrılma halkası oluşur, λ genomu tam olarak ayrılır. Ya da hatalı bir halka oluşur *gal* geni de (veya *bio* geni de) ayrılarak yeni virüs parçacığı içinde yer alır. Bu durumda normal λ parçaları ve *dgal* λ (defektif virüs= transdüksiyon oluşturucu parçacık) oluşur. (Bazen defektif virüs parçacığı λ *dgal* olarak da simgelenebilir). *dgal* λ yardımcı virüs denilen normal λ fajlarının varlığında bir alıcı hücreyi enfekte eder. Alıcı hücre *gal*⁻ ise *dgal* λ ile taşınan *gal*⁺ DNA bölgesiyle rekombinasyon gerçekleşir ve alıcı hücre transdüksiyonuna uğrar (Şekil 9.10).



Şekil 9.10: λ fajında özelleşmiş transdüksiyon mekanizması. a) Lizojen oluşumu, b) Profajin genomdan ayrılması, normal ve yanlış ayrılma, c) Genomdan ayrılan defektif virüsün alıcı bir hücreyi (sonraki enfekte edilen hücre) transdüksiyona uğratması.

9.6 Bağlantı Haritası ve Fiziksel Harita

Durdurulmuş eşleşme, rekombinasyon haritalama, transformasyon ve transdüksiyon haritalama tekniklerinin birlikte değerlendirilmesiyle çok ayrıntılı bakteri kromozom haritaları oluşturulmuştur. 1963 yılında 100 *E. coli* geni haritalanmıştır (Şekil 9.11). 1991'e gelindiğinde 1400 gen haritaya yerleştirilmiştir. Kromozomun ilk 5 dakika bölgesindeki genler Şekil 9.12a'da gösterilmiştir. 1997'ye gelindiğinde *E. coli* genomunun tamamının nükleotit dizisi belirlenerek genlerin kromozom üzerindeki konumları fiziksel olarak belirlenmiştir. Şekil 9.12b'de genomun 60 dakika civarındaki bölgesinin fiziksel ve genetik haritaları karşılaştırılmıştır. Şüphesiz bir şekilde genetik harita ve fiziksel harita arasındaki eşleşme oldukça yakındır.

Şekil 1.11: *E. coli* kromozom haritası. a) 1963 yılında yapılmış 100 genin yerleştirildiği genetik harita. Halkaların iç kısımlarındaki rakamlar dakika olarak harita birimini ifade eder.

Şekil 1.12: *E. coli* kromozom haritası. a) 1990 yılında yapılmış 100 dakikadan oluşmuş *E. coli* kromozom haritasının 5 dakikalık biriminin bağlantı haritası. b) Genomun 60-61 dakika bölgesinin genetik ve fiziksel haritalarının ilişkisi. 1990 bağlantı haritası ile 1997 fiziksel harita karşılaştırılmıştır.