

ÖNSÖZ

β -glukozidaz enzimleri, iki karbohidrat grubu veya biri karbohidrat diğeri karbohidrat olmayan iki grup arasındaki glikozidik bağı hidrolizleyen, glikozid hidrolaz ailelerinden 1. ve 3. aile içinde yer alan büyük bir grubu oluştururlar. β -glukozidazlar, bakterilerden insanlara kadar tüm canlılarda bulunurlar. Bitki β -glukozidazları, aralarında yüksek dizi homolojisi olmasına rağmen, substrat özgüllüğünde son derece farklılıklar gösterirler. Bu nedenle, özellikle substrat özgüllüğü ile ilgili sorunların çözümünde model sistem olarak bitki β -glukozidazları kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, basit yapılı ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'nin bitkilere ait genlerin moleküler düzeyde araştırılmasında ve özellikle işlevsel analizlerinin yapılmasında, uygun bir konak olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla, *Sorghum bicolor* (akdarı)'un siyanogenik bir β -O-glukozidazı (EC 3.2.1.21) şifreleyen *dhr1*, *Zea mays* (mısır)'ın bir β -O-glukozidazı (EC 3.2.1.21) şifreleyen *glu1* ile *Sinapis alba* (beyaz hardal)'nın bir β -S-glukozidazı (EC 3.2.3.1) şifreleyen *myr1* genlerinin bu mayadaki heterolog anlatımları incelendi.

Çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan ve yol gösteren danışmanım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Güler TEMİZKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda kullandığım bitki genlerini sağlayan ve "Virginia Polytechnic Institute and State University"deki laboratuvarında bir süre çalışmama olanak veren Prof. Dr. Asım ESEN'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan değerli hocalarım, Doç. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA ve Doç. Dr. Nazlı ARDA'ya ve çalışma arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK, Dr. Semian KARAER, Biyolog Tuba GÜNEL, Araştırma Görevlileri Evren ÖNAY UÇAR, Cenk KIĞ, Özgür ÇAKIR ile Doktora öğrencileri Gökhan AKMAN ve Murat PEKMEZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca, şekil çiziminde bana yardımcı olan kardeşim Sistem ve İnşaat Mühendisi Mehmet Soner GEMİCİ ve eşim Dr. İ. Mehmet PALABIYIK'a teşekkür ederim.

Bedia GEMİCİ-PALABIYIK

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-1040/19022001).

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | v |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| SEMBOL LİSTESİ | ix |
| ÖZET..... | x |
| SUMMARY | xi |
| 1 GİRİŞ | 1 |
| 2 GENEL KISIMLAR | 4 |
| 2.1 β -GLUKOZİDAZLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ..... | 4 |
| 2.2 HAYVANSAL β -GLUKOZİDAZLAR | 6 |
| 2.2.1 Memeli β -Glukozidazları | 6 |
| 2.2.2 Böcek β -Glukozidazları | 7 |
| 2.3 BİTKİSEL β -GLUKOZİDAZLAR | 8 |
| 2.4 β -GLUKOZİDAZLARIN İŞLEVLERİ VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARI..... | 14 |
| 2.4.1 Savunma..... | 14 |
| 2.4.2 Büyüme ve Gelişme | 15 |
| 2.4.3 Besinlerde Kalite Artırımı..... | 15 |
| 2.4.4 Biokitle Dönüşümü | 17 |
| 2.4.5 Lignin Biyosentezi ve Kağıt Kalitesi | 17 |
| 2.5 β -GLUKOZİDAZLARIN KATALİZ MEKANİZMALARI | 18 |
| 2.6 β -GLUKOZİDAZLARIN SUBSTRAT ÖZGÜLLÜĞÜ..... | 20 |
| 2.7 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'nin ÖZELLİKLERİ VE HETEROLOG GEN ANLATIM SİSTEMLERİNDE KULLANIMI | 24 |
| 3 MALZEME VE YÖNTEM | 27 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1 | GENLER, ORGANİZMALAR VE PLAZMİDLER | 27 |
| 3.2 | ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI | 30 |
| 3.2.1 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Irklarının Üretilmesi | 30 |
| 3.2.2 | <i>Escherichia coli</i> Irkının Üretilmesi | 32 |
| 3.2.3 | Genotip Kontrolları | 33 |
| 3.3 | <i>S. pombe</i> IRKLARINDA ÜREMENİN İZLENMESİ | 33 |
| 3.4 | TRANSFORMASYON | 34 |
| 3.4.1 | Süper Yeterli <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması | 34 |
| 3.4.2 | <i>E. coli</i> Transformasyonu | 34 |
| 3.4.3 | <i>S. pombe</i> Transformasyonu | 35 |
| 3.5 | KOLONİ PCR TEKNİĞİ | 36 |
| 3.6 | DNA İZOLASYONU | 37 |
| 3.6.1 | <i>E. coli</i> Transformantlarından Plazmid İzolasyonu | 37 |
| 3.6.2 | <i>S. pombe</i> Transformantlarından Plazmid İzolasyonu | 38 |
| 3.6.3 | <i>S. Pombe</i> Transformantlarından Genomik DNA İzolasyonu | 39 |
| 3.7 | DNA DERİŞİMİNİN VE SAFLIĞININ BELİRLENMESİ | 40 |
| 3.8 | AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ | 40 |
| 3.9 | DNA'LARIN JELDEN GERİ ALINMASI | 41 |
| 3.10 | GENLERİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI | 42 |
| 3.11 | REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN OLUŞTURULMASI | 44 |
| 3.11.1 | Vektörlerin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi | 44 |
| 3.11.2 | pART1- <i>dhr1</i> ve pREP42- <i>dhr1</i> Rekombinantlarının Oluşturulması | 44 |
| 3.11.3 | pART1- <i>glu1</i> Rekombinantının Oluşturulması | 44 |
| 3.11.4 | pREP42- <i>glu1</i> Rekombinantının Oluşturulması | 45 |
| 3.11.5 | pART1- <i>myr1</i> ve pREP42- <i>myr1</i> Rekombinantlarının Oluşturulması | 46 |
| 3.12 | RNA İZOLASYONU VE ANALİZLERİ | 46 |
| 3.12.1 | Total RNA İzolasyonu | 46 |
| 3.12.2 | RNA Derişiminin Belirlenmesi | 48 |
| 3.12.3 | RNA'nın Elektroforetik Analizi | 49 |
| 3.12.4 | Northern Melezleme | 50 |
| 3.12.5 | Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) | 52 |
| 3.13 | PROTEİN İZOLASYONU VE ANALİZLERİ | 53 |
| 3.13.1 | <i>S. pombe</i> Hücrelerinden Ham Özüt Hazırlanması | 53 |
| 3.13.2 | Protein Derişiminin Belirlenmesi | 54 |
| 3.13.3 | Proteinlerin Denatüre Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Analizi | 55 |
| 3.13.4 | Protein Jellerinin "Coomassie" Yöntemi ile Boyanması | 57 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.13.5 | Western Melezleme | 57 |
| 3.13.6 | β -Glukozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi | 59 |
| 4 | BULGULAR..... | 62 |
| 4.1 | BİTKİ β -GLUKOZİDAZ GENLERİNİN <i>S. pombe</i> EKSPRESYON VEKTÖRLERİNDE KLONLANMASI..... | 62 |
| 4.1.1 | <i>dhr1</i> , <i>glu1</i> ve <i>myr1</i> Genlerinin PCR ile Çoğaltılması | 62 |
| 4.1.2 | Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi..... | 63 |
| 4.1.3 | <i>dhr1</i> Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması..... | 64 |
| 4.1.4 | <i>glu1</i> Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması | 70 |
| 4.1.5 | <i>myr1</i> Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması | 74 |
| 4.2 | BİTKİ β -GLUKOZİDAZ GENLERİNİN <i>S. pombe</i> 'de KLONLANMASI..... | 78 |
| 4.2.1 | <i>S. pombe</i> Irklarında Üremenin İzlenmesi | 78 |
| 4.2.2 | pDA27 ve pGA2 Rekombinant Plazmidlerinin <i>S. pombe</i> 'de Klonlanması | 79 |
| 4.2.3 | pDR41, pGR8 ve pMR4 Rekombinant Plazmidlerinin <i>S. pombe</i> 'de Klonlanması..... | 80 |
| 4.3 | BİTKİ β -GLUKOZİDAZLARININ <i>S. pombe</i> 'de HETEROLOG ANLATIMI | 84 |
| 4.3.1 | Northern Melezleme Tekniği ile Transkripsiyon Analizi | 84 |
| 4.3.2 | RT-PCR Tekniği ile Transkripsiyon Analizi | 85 |
| 4.3.3 | SDS-PAGE ve Western Melezleme ile Translasyon Analizi..... | 86 |
| 4.3.4 | Enzim Aktivitesi Analizi..... | 88 |
| 5 | TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 89 |
| | KAYNAKLAR | 97 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 110 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Şekil 2.1 | : <i>Zea mays</i> 'a ait β -glukozidazlardan Glu1'in üç boyutlu yapısal modeli (Czjzek ve diğ., 2001).... | 6 |
| Şekil 2.2 | : β -glukozidazların genel kataliz reaksiyonu şeması..... | 18 |
| Şekil 2.3 | : Siyanogenik β -glukozidazların genel hidrolizi. Bu şemada bir siyanogenik β -glukozid örneği olarak dihurin, β -glukozidaz olarak da dihurinaz verilmiştir..... | 18 |
| Şekil 2.4 | : Alikoyma mekanizmasıyla glikozidik bağın hidrolizi (Clarke ve diğ., 1993)..... | 19 |
| Şekil 2.5 | : 1. Aileye ait β -glukozidazların amino asit dizilerinde, kataliz işlemlerinde görevi olan motif dizilerin karşılaştırılması. 1: <i>Zea mays</i> , 2: <i>Sorghum bicolor</i> , 3: <i>Avena sativa</i> , 4: <i>Coctus speciosus</i> , 5: <i>Arabidopsis thaliana</i> , 6: <i>Brassica napus</i> , 7: <i>Prunus avium</i> , 8: <i>Trifolium repens</i> , 9: <i>Sinapis alba</i> 10: <i>Oryctolagus cuniculus</i> (laktöz pirolozin hidrolaz), 11: <i>Bacillus spp</i> , 12: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , 13: <i>Bacillus polymyxa</i> . Rakamların yanında genlerin "GenBank"ta kullanılan simgeleri verilmiştir. Şeklin başında verilen numaralar ise ilk β -glukozidazdaki E kalıntısının bulunduğu amino asit dizi numarasını ifade etmektedir (Çiçek, 1999)..... | 19 |
| Şekil 2.6 | : β -glukozidazların substratlarına ait bazı örnekler. a) doğal; b) yapay substratlar..... | 22 |
| Şekil 3.1 | <i>dhr1</i> , <i>glu1</i> ve <i>myr1</i> genlerinin cDNA'larının nükleotid dizileri. \downarrow : atg başlangıç kodonunun eklendiği yerler..... | 28 |
| Şekil 3.2 | : Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları. a) pART1; b) pREP42..... | 32 |
| Şekil 3.3 | : Çalışmada kullanılan standart DNA'ların % 1'lik agaroz jeldeki görünüşleri. a) "Hi-Lo DNA", b) "Lambda DNA/Hind III", c) "1 kb DNA Ladder"..... | 41 |
| Şekil 3.4 | : Standart RNA ("RNA Ladder")'nın % 1'lik formaldehitli agaroz jeldeki görünümü..... | 49 |
| Şekil 3.5 | : SDS-PAGE'de kullanılan "Prestained Protein Molecular Weight Marker" protein standardı..... | 57 |
| Şekil 4.1 | : <i>dhr1</i> , <i>glu1</i> ve <i>myr1</i> 'in PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. M: Hi-Lo standart DNA, N: negatif kontrol, 1: <i>dhr1</i> , 2: <i>glu1</i> , 3: <i>myr1</i> genlerine ait PCR ürünleri..... | 63 |
| Şekil 4.2 | : pART1, pREP42 ve pBluescript II KS (+) plazmidlerinin <i>Sma I</i> , <i>BamH I</i> ve <i>Sal I</i> restriksiyon endonükleazları ile tekli ya da ikili kesim ürünlerinin % 0,8'lik agaroz jeldeki görünüşleri. M: Hi-Lo standart DNA, a) 1: pBluescript (<i>Sma I/Sma I</i>), 2: pREP42 (<i>BamH I/BamH I</i>), 3: pART1 (<i>BamH I/BamH I</i>), b) 1: pART1 (<i>Sma I/Sma I</i>), 2: pART1 (<i>Sal I/BamH I</i>)..... | 64 |
| Şekil 4.3 | : pART1- <i>dhr1/E.coli</i> DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması sonucu elde edilen görüntü. a) β -Glu119 ve β -Glu120 primer çifti kullanılarak, b) Dhr1-SBF ve Dhr1-SBR primer çifti kullanılarak tarandı. M: Hi-Lo standart DNA, a)1-6: 1-30, b) 7-14: 31-70 no.lu transformantlara ait koloni PCR örnekleri, N: negatif kontrol (kalıp DNA yok) P: pozitif kontrol (kalıp DNA olarak pBluescript- <i>dhr1</i> kullanıldı)..... | 65 |
| Şekil 4.4 | : pART1- <i>dhr1/E.coli</i> DH10B transformantlarına ait koloni PCR'nin açılımı. M: Hi-Lo standart DNA, 1-5: 26-30, 6-15: 56-65 numaralı transformant kolonilere ait koloni PCR örnekleri, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol..... | 66 |
| Şekil 4.5 | : pREP42- <i>dhr1/E.coli</i> DH10B transformantlarının Koloni PCR tekniği ile taranması ile elde edilen sonuçlar. M: Hi-Lo standart DNA, P: pozitif kontrol (kalıp DNA olarak pBluescript- <i>dhr1</i>), N: negatif kontrol, 1-16: 1-80 nolu transformantlara ait koloni PCR örnekleri | 66 |
| Şekil 4.6 | : pREP42- <i>dhr1/</i> DH10B transformantlarında koloni PCR sonuçları. M: Hi-Lo standart DNA, 1-15. ceplere sırasıyla: 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 no.lu transformant örnekler, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol..... | 67 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Şekil 4.7 | : pDA27, pDA64, pDR41, pDR64 ve pDR68 plazmidlerinin restriksiyon endonükleazları ile kesimi. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1:pDR41+Nde I, 2:pDR64+Nde I, 3:pDR68+Nde I, 4: pDA64+Sma I, 5: pDA27+Sma I..... | 68 |
| Şekil 4.8 | : <i>dhr1</i> geninin pART1 ve pREP42 ekspresyon vektörlerinde klonlanması..... | 69 |
| Şekil 4.9 | : pBluescript- <i>glu1</i> /E.coli DH10B transformantlarının koloni PCR ürünleri. M: Hi-Lo standart DNA, N: negatif kontrol, 1-4: beyaz kolonilerin PCR ürünleri..... | 70 |
| Şekil 4.10 | : pBluescript- <i>glu1</i> plazmidinin <i>Xho</i> I ve <i>Bam</i> H I restriksiyon endonükleazları ile ikili kesimi. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1: <i>glu1</i> (<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> H I) DNA'sı..... | 71 |
| Şekil 4.11 | : pART- <i>glu1</i> /E. coli DH10B transformantlarının koloni PCR sonuçları. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1-5: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: negatif kontrol..... | 71 |
| Şekil 4.12 | : pREP42- <i>glu1</i> /E. coli DH10B transformantlarının koloni PCR sonuçları. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1-9: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: negatif kontrol..... | 72 |
| Şekil 4.13 | <i>glu1</i> geninin pART1 ve pREP42 plazmidlerinde klonlanması..... | 73 |
| Şekil 4.14 | : pART1- <i>myr1</i> /E. coli DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması. M: Hi-Lo standart DNA, 1-10: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp DNA olarak, 50 ng/µl pBluescript- <i>myr1</i> içeren pozitif kontrol..... | 74 |
| Şekil 4.15 | : pART1- <i>myr1</i> /E. coli DH10B rekombinantlarının <i>Bam</i> H I restriksiyon endonükleazı ile kesimi. M: Hi-Lo standart DNA, 1: 9 numaralı transformantın <i>Bam</i> H I ile kesimi, 2: 10 numaralı transformantın <i>Bam</i> H I ile kesimi..... | 75 |
| Şekil 4.16 | : pREP42- <i>myr1</i> /E. coli DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması. M: Hi-Lo standart DNA, 1-4: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol..... | 75 |
| Şekil 4.17 | : <i>myr1</i> geninin pART1 ve pREP42 plazmidlerinde klonlanması..... | 77 |
| Şekil 4.18 | : <i>S. pombe leu1-32</i> ve <i>S. pombe ura4-D18</i> irklarının YNB besi ortamındaki üreme grafiği..... | 79 |
| Şekil 4.19 | : pDR41/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarında koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: 1kb Standart DNA, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>dhr1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-6: 1-30 numaralı transformant kolonilerin PCR ürünleri..... | 80 |
| Şekil 4.20 | : pDR41/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarından 5 numaralı PCR tüpteki kolonilerin ayrı ayrı koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: 1kb Standart DNA, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>dhr1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-5: 21-25 numaralı transformant koloniler..... | 81 |
| Şekil 4.21 | : pGR8/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarının koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: 1kb Standart DNA, M2: λ Hind III standart DNA'sı, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>glu1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-4: 1-20 numaralı transformant koloniler..... | 81 |
| Şekil 4.22 | : pGR8/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarından 1 ve 2 numaralı PCR tüplerinde bulunan 10 farklı koloniye ait PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: λ Hind III standart DNA'sı, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>glu1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-10: 1'den 10'a kadar numaralandırılan transformant koloniler..... | 82 |
| Şekil 4.23 | : pMR4/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarının koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: 1kb Standart DNA, M2: λ Hind III standart DNA'sı, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>myr1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-4: 1-20 no.lu transformant kolonilerin PCR ürünleri..... | 82 |
| Şekil 4.24 | : pMR4/ <i>S. pombe ura4-D18</i> transformantlarından 1 numaralı PCR tüpündeki 5 farklı koloninin ayrı ayrı koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: λ Hind III standart DNA'sı, M2: 1kb Standart DNA'sı, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp olarak pBluescript- <i>myr1</i> DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-5: 1'den 5' kadar numaralandırılan transformant koloniler..... | 83 |

- Şekil 4.25** : *S. pombe* rekombinantlarından izole edilen total RNA'ların % 1,2'lik formaldehitli agaroz jeldeki görünümü. M: "High Range" standart RNA, a) 1: DR41-S22, 2: DR41-S25 3: pREP42/*S. pombe*, b) 1: GR8-S2, 2: pREP42/*S. pombe*, c) 1: MR4-S1, 2: pREP42/*S. pombe* klonlarından elde edilen total RNA'lar.....**84**
- Şekil 4.26** : DR41-S22, MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* klonlarından izole edilen RNA'larının RT-PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: λ Hind III standart DNA'sı, M2: 1kb Standart DNA'sı, a)1: pREP42/*S. pombe ura4-D18*, 2: DR41-S22, b) 1: MR4-S1, 2: pREP42/*S. pombe ura4-D18* ırklarının RT-PCR örnekleri.....**85**
- Şekil 4.27** : Derişimi bilinen BSA çözeltilerinin 550 nm dalga boyunda alınan absorbands değerlerine göre çizilen Standart grafik.....**86**
- Şekil 4.28** : *S.pombe* rekombinant klonlarından elde edilen protein özütlerinin elektroforetik analizi. a) SDS-PAGE'de ayrılan proteinlerin "Coomassie" boyama ile elde edilen sonuçları. b) Western melezleme sonuçları. M1: Standart proteinler ("MBI-Prestaining Molecular Weight Marker"), M2: Sigma-MW-70L standart proteinleri, 1: pREP42/*S. pombe ura4-D18*; 2: DR41-S22; 3: MR4-S1; 4: GR8-S2. Uygulanan örnekler, % 35-55 aseton çöktürmesi ile elde edildi ve her bir cepte 10'ar μ g protein olacak şekilde yükleme yapıldı.....**87**

TABLO LİSTESİ

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Tablo 2.1 | : Farklı organizmalarda doğal olarak oluşan substratlara ait örnekler..... | 21 |
| Tablo 2.2 | : Bazı bitkilerin linamaraz ve mirosinaz enzimlerinin farklı substratlar ile göreceli maksimum hidroliz aktivitesi (V_{max}) (Conn, 1993)..... | 22 |
| Tablo 3.1 | : Çalışmada kullanılan bitki β -glukozidaz enzimlerini şifreleyen genler ve ait oldukları bitki türleri..... | 29 |
| Tablo 3.2 | : Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ve <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri..... | 29 |
| Tablo 3.3 | : Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ekspresyon vektörlerinin özellikleri..... | 29 |
| Tablo 3.4 | : <i>S. pombe</i> 'nin üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamları..... | 31 |
| Tablo 3.5 | : MML ve MMA besi ortamlarında kullanılan stok çözeltiler..... | 32 |
| Tablo 3.6 | : <i>E. coli</i> ırkının üretiminde kullanılan besi ortamları..... | 32 |
| Tablo 3.7 | : Koloni PCR'da kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri..... | 37 |
| Tablo 3.8 | : Koloni PCR koşulları..... | 37 |
| Tablo 3.9 | : <i>E. coli</i> transformantlarından plazmid izolasyonunda kullanılan çözeltiler..... | 38 |
| Tablo 3.10 | : <i>S. pombe</i> transformantlarından plazmid ve genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler..... | 39 |
| Tablo 3.11 | : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler..... | 41 |
| Tablo 3.12 | : Çalışmada kullanılan β -glukozidaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan oligonükleotid primer çiftleri..... | 43 |
| Tablo 3.13 | : PCR'de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri..... | 43 |
| Tablo 3.14 | : RNA izolasyonunda ve analizinde kullanılan tampon ve çözeltiler..... | 47 |
| Tablo 3.15 | : RT-PCR'de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri..... | 52 |
| Tablo 3.16 | : RT-PCR koşulları..... | 52 |
| Tablo 3.17 | : Protein özütlemesinde kullanılan çözeltiler ve tampon..... | 54 |
| Tablo 3.18 | : SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler..... | 56 |
| Tablo 3.19 | : SDS-PAGE'de kullanılan jellerin içeriği..... | 56 |
| Tablo 3.20 | : Western melezlemede kullanılan çözeltiler ve tamponlar..... | 58 |
| Tablo 4.1 | : Çalışmada elde edilen rekombinant plazmidler..... | 78 |
| Tablo 4.2 | : Bitki genlerini içeren rekombinant <i>S. pombe</i> klonları..... | 83 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|---------|--|
| 4MUG | : 4-metilumbelliferil- β -glukozidaz |
| ABTS | : 2,2'-azinobis-3-etilbentiazolinsülfonik asit |
| DEPC | : dietilpirokarbonat |
| DIBOAG | : 2-O- β -D-glukopiranozil-4-hidroksi-1,4-benzoksazin-3-on |
| DIG | : digoksinen |
| DIMBOAG | : 2-O- β -D-glukopiranozil-4-hidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on |
| DMSO | : dimetilsülfoksit |
| EB | : etidyum bromür |
| EDTA | : etilendiamintetraasetik asit |
| GAR-P | : keçi anti-tavşan peroksidaz ("goat antirabbit-peroxidase") |
| MOPS | : morfolino-propan sülfonik asit |
| n-BuOH | : n-butanol |
| oNPG | : orto-nitrofenil β -D-glukopronozid |
| PAGE | : poliakrilamid jel elektroforezi |
| PBS | : "phosphate buffered saline" (fosfatla tamponlanmış tuz) |
| PBST | : tween 20 içeren fosfatla tamponlanmış tuz |
| PEG | : polietilen glikol |
| PGO | : peroksidaz-glukoz-oksidad |
| PMSF | : fenilmetilsülfonil florür |
| pNPG | : para-nitrofenil β -D-glukopronozid |
| pNPTG | : para-nitrofenil β -D-tiyoglukozid |
| PVDF | : polivinilidindiflorür |
| SDS | : sodyum dodesil sülfat |
| TEMED | : N,N,N',N'-tetrametiletildiamin |
| Tris | : tris (hidroksimetil) amino metan |
| X-gal | : 5-bromo-4-kloro-3indolil- β -D-galaktozid |

ÖZET

BİTKİ GENLERİNİN *Schizosaccharomyces pombe*'de ANLATIMI

Bu çalışmada, *Schizosaccharomyces pombe*'nin bitkisel genlerin özellikle işlevsel analizlerinin yapılmasında, uygun bir model organizma olarak kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla *Sorghum bicolor* (akdarı)'un β -O-glukozidazını şifreleyen *dhr1*, *Zea mays* (mısır)'ın β -O-glukozidazını şifreleyen *glu1* ile *Sinapis alba* (beyaz hardal)'nın β -S-glukozidazını şifreleyen *myr1* genlerinin bu mayadaki heterolog anlatımları araştırıldı.

pBluescript II KS (+) klonlanmış olan *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin cDNA'ları PCR ile çoğaltıldı. Her bir gene ait PCR ürünleri, *S. pombe* için geliştirilmiş pART1 ve pREP42 ekspresyon vektörlerinde klonlandı. Bu vektörlerden pART1'de *dhr1* ve *glu1* genlerini içeren rekombinant plazmidler (pDA27 ve pGA2) elde edildi. Rekombinant plazmidler, *S. pombe leu1-32* ırkına lityum asetat ve de elektroporasyon yöntemleri ile transfer edildi. *S. pombe* transformantlarında yabancı genlerin varlığı, hem koloni PCR hem de transformant kolonilerden izole edilen genom ve plazmid DNA'larının PCR ile taranması ile DNA düzeyinde gösterildi. pREP42'de *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin klonlanması ile elde edilen rekombinant plazmidler (pDR41, pGR8 ve pMR4) *S. pombe ura4-D18* ırkına elektroporasyon yöntemi ile transfer edildi. Transformantlar koloni PCR tekniği ile tarandı; pDR41'i içeren 2 (DR41-S22 ve DR41-S25), pGR8'i içeren 3 (GR8-S2, GR8-S6 ve GR8-S9), pMR4'ü içeren 5 (MR4-S1, MR4-S2, MR4-S3, MR4-S4, MR4-S5) adet *S. pombe* klonu elde edildi.

Bu genlerin *S. pombe*'deki heterolog anlatımlarını transkripsiyon düzeyinde analiz etmek için, klonlardan total RNA izolasyonu yapıldı. Northern melezleme tekniği ile genlerin mRNA ürünlerinin varlığı saptanamadı. Aynı klonlar genlere özgü primerlerin kullanıldığı RT-PCR tekniği ile tarandığında ise DR41-S22 klonunda *dhr1*'in ve MR4-S1 klonunda *myr1*'in mRNA'ları belirlendi.

Heterolog gen anlatımlarını translasyon düzeyinde analiz etmek için, rekombinant klonlardan (DR41-S22, MR4-S1 ve GR8-S2) ham protein özütleri elde edildi. *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerine ait heterolog proteinlerin varlığı denatüre-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western melezleme teknikleri ile saptandı. Ancak, yapılan enzim aktivitesi testleri ile bu heterolog proteinlerin aktif olmadıkları anlaşıldı.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan bitki β -glukozidazlarını şifreleyen genlerin *S. pombe*'de transkripsiyon ve translasyon düzeyinde anlatım yaptıkları halde aktif protein ürün oluşturamamalarının, translasyon sonrası bazı işlemlerde eksikliklerden veya *S. pombe* β -glukozidazı ile heterolog β -glukozidazlar arasındaki olumsuz etkileşimlerden kaynaklanabileceğini düşündürdü.

SUMMARY

EXPRESSION OF PLANT GENES IN *Schizosaccharomyces pombe*

In order to investigate whether *Schizosaccharomyces pombe* could be used as a model organism especially for the functional analysis of plant genes, the heterologous expressions of *dhr1* genes encoding β -O-glucosidase in *Sorghum bicolor*, *glu1* gene encoding β -O-glucosidase in *Zea mays* and *myr1* gene encoding β -S-glucosidase in *Sinapis alba* have been studied in this fission yeast

cDNA's of *dhr1*, *glu1* and *myr1* genes which had been cloned in pBluescript II KS (+) are amplified using PCR. PCR products of each gene are cloned in pART1 and pREP42 expression vectors of *S. pombe*. The recombinant plasmids (pDA27 and pGA2) carrying the *dhr1* and *glu1* genes in pART1 are constructed. These plasmids are then transferred to *S. pombe leu1-32* strain by lithium acetate and electroporation methods. The presence of foreign genes in *S. pombe* transformants are shown either with colony PCR or with PCR amplifications of genomic and plasmid DNA's isolated from the transformant colonies. By cloning of *dhr1*, *glu1* and *myr1* genes in pREP42 we have obtained recombinant plasmids pDR41, pGR8, pMR4, respectively, by electroporation method in *S. pombe ura4-D18* strain. The resulting transformants are screened using colony PCR technique. Consequently, 2 clones of *S. pombe* containing pDR41 (DR41-S22 and DR41-S25), 3 clones carrying pGR8 (GR8-S2, GR8-S6 and GR8-S9) and 5 clones carrying pMR4 (MR4-S1, MR4-S2, MR4-S3, MR4-S4, MR4-S5) have been obtained.

In order to analyze the heterologous expression of these genes at the level of transcription in *S. pombe* total RNA is isolated. mRNA products of the genes could not be detected by Northern hybridization technique. However, when the same clones were screened with RT-PCR technique using gene specific primers, mRNA products of *dhr1* genes in DR41-S22 clone and *myr1* gene in MR4-S1 clone could be detected.

Crude protein extracts prepared from the recombinant clones (DR41-S22, MR4-S1 and GR8-S2) are analyzed for the heterologous gene expression at the level of translation. The presence of heterologous proteins encoded by *dhr1*, *glu1* and *myr1* genes are detected by denaturing polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western hybridization methods. However when enzyme activities are tested these heterologous proteins are found to be inactive.

In this study, we have shown that although plant genes encoding β -glucosidase are expressed both at the levels of transcription and translation, proteins products are inactive. These results may point out for some deficiencies in the post translational modifications or negative interactions between the *S. pombe* and heterologous β -glucosidases.

1 GİRİŞ

Karbohidratlar biyosferde en yaygın bulunan organik moleküllerdir. Bu moleküllerin biyosferdeki çeşitliliği, sentez ve yıkım reaksiyonlarını gerçekleştiren çok sayıda enzim eşliğinde sağlanır. Bu enzimlerden glikozid hidrolazlar grubuna giren β -glukozidazlar, tüm canlılarda (bakteriler, arkeler ve ökaryotlar) evrensel olarak bulunurlar ve temel biyolojik ve biyoteknolojik süreçlerde anahtar rol oynarlar. β -glukozidazların, O-bağlı β -glukozidleri hidrolizleyen β -O-glukozidazlar (EC 3.2.1.21) ve S-bağlı β -glukozidleri hidrolizleyen β -S-glukozidazlar (mirosinazlar, EC 3.2.3.1) olmak üzere iki ana grubu bulunmaktadır.

β -glukozidazların yapı ve işlevlerinin anlaşılmasına yönelik olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bitki β -glukozidazları, aralarında yüksek dizi homolojisi olmasına rağmen, substrat özgülüğünde son derece farklılıklar gösterirler. Bu nedenden dolayı, özellikle substrat özgülüğü ile ilgili soruların çözümünde model sistem olarak, bitki β -glukozidazları kullanılmaktadır. Karmaşık yapılarından dolayı bitkilerde moleküler düzeyde çalışmaların uygulanması oldukça zordur. Bu nedenle, bitki β -glukozidazlarını şifreleyen genlerinin özellikle işlevsel analizlerinin araştırılmasında, basit yapıya tek hücreli organizmaların konak olarak kullanıldığı heterolog gen anlatım sistemlerinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır.

Genetik ve moleküler biyolojik yöntemlerin kolaylıkla uygulanabildiği, tek hücreli bir ökaryot olan *Schizosaccharomyces pombe* maya türü, hücresel ve moleküler özellikleri bakımından memeli hücrelerine benzemesi nedeniyle, özellikle hayvansal genlerin heterolog anlatımı için sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bitkisel genlerin heterolog anlatımına ilişkin çok az veri bulunmaktadır (Giga-Hama ve Kumagai, 1997).

Bu çalışmada, *S. pombe*'nin bitkisel kökenli genlerin moleküler düzeydeki çalışmalarının, özellikle işlevsel analizlerinin yapılmasında uygun bir model sistem olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Bu amaçla, *Sorghum bicolor* (akdarı)'un siyanogenik

bir β -O-glukozidazı şifreleyen *dhr1* geni, *Zea mays* (mısır)'ın siyanogenik olmayan bir hidroksamik asit β -O-glukozidazı şifreleyen *glu1* geni ve *Sinapis alba* (beyaz hardal)'nın bir β -S-glukozidazı şifreleyen *myr1* geninin *S. pombe*'deki heterolog anlatımları araştırıldı.

Genel Kısımlar'da β -glukozidazların genel özellikleri açıklandıktan sonra, hayvanlarda ve bitkilerdeki özellikleri ile endüstriyel kullanım alanları, kataliz mekanizmaları ve substrat özgülükleri hakkında ayrıntılı bilgi verildi. Ayrıca *S. pombe*'nin özellikleri ve heterolog gen anlatımında kullanımını açıklandı.

Malzeme ve Yöntem bölümünde çalışmada kullanılan organizmaların ve plazmidlerin özellikleri, β -glukozidaz enzimini şifreleyen genlerin klonlanmasına yönelik olarak DNA izolasyonu, elektroforetik analiz, PCR ve transformasyon teknikleri açıklandı. Ayrıca söz konusu genlerin heterolog anlatımlarının analizi için kullanılan RNA izolasyonu, Northern melezleme, RT-PCR, protein izolasyonu, denatüre jel elektroforezi, Western melezleme ve enzim aktivite analizlerine ilişkin yöntemler verildi.

Bulgular bölümünde verildiği gibi, β -glukozidaz enzimini şifreleyen *S. bicolor*'un *dhr1*, *Z. mays*'ın *glu1* ve *S. alba*'nın *myr1* genlerinin PCR ile çoğaltılıp *S. pombe*'ye ait ekspresyon vektörleri olan pART1 ve pREP42'de klonlanmasına ilişkin çalışmalar aktarıldı. Elde edilen rekombinant plazmidler *S. pombe*'ye transfer edildi. İlk olarak, bu transformant klonlarda yabancı genlerin DNA düzeyinde varlığı koloni PCR ile belirlendi. Ardından, bu genlerin *S. pombe* klonlarında heterolog anlatımları transkripsiyon düzeyinde izole edilen total RNA'daki Northern melezleme ve RT-PCR analizleri ile, translasyon düzeyinde ise proteinlerin SDS-PAGE'de ayrılmasını takiben Western melezleme ile belirlendi. Son olarak, *S. pombe* klonlarında aktif protein oluşup oluşmadığı enzim aktivitesi tayini ile araştırıldı.

Sonuç olarak, *S. pombe*'de klonlanan bitki β -glukozidaz genlerinin transkripsiyon ve translasyon düzeyinde heterolog anlatımlarının gerçekleştiği ancak, aktif proteinlerinin oluşmadığı saptandı. Bu durumun, *S. pombe*'nin β -glukozidaz enzimi ile heterolog enzimlerin olumsuz etkileşimlerinden ya da *S. pombe*'de translasyon sonrası meydana

gelen modifikasyonların bir kısmındaki eksiklik ya da hatalardan kaynaklanabileceği düşünöldü. Bu koşullarda bitki β -glukozidaz genlerinin *S. pombe*'de başarılı heterolog anlatımları için özel salgı tipi ekspresyon vektörlerinin kullanılması gibi ek çalışmaların yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

2 GENEL KISIMLAR

2.1 β -GLUKOZİDAZLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

β -glukozidazlar (β -D-glukozid glukohidrolazlar), iki karbohidrat (oligosakkarid) grubu veya biri karbohidrat diğeri karbohidrat olmayan (aril veya alkil) iki grup arasındaki glikozidik bağı hidrolizleyen, glikozid hidrolaz ailelerinden 1. ve 3. aile içinde yer alan büyük bir grubu oluştururlar (Henrissat, 2004). β -glukozidazlar, bakterilerden insanlara kadar tüm canlılarda bulunurlar. Örneğin, mikroorganizmalardaki β -glukozidazlar çoğunlukla 3. aileye, bitkilerdekiler ise 1. aileye dahildirler. β -glukozidazların, oksijen-bağlı β -glikozidleri hidrolizleyen β -O-glukozidazlar (EC 3.2.1.21) ve büyük ölçüde bitkilerdeki *Brassicaceae* ailesinde bulunan, kükürt-bağlı β -glikozidleri (glukosinolatlar, β -tiyoglukozidler) hidrolizleyen β -S-glukozidazlar (β -D-tiyoglukozid glukohidrolazlar veya mirosinazlar, EC 3.2.3.1) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (Burmeister ve diğ., 1997).

Bakteri ve mayalarda bulunan selülotik β -glukozidazlar selülozun glukoza indirgenmesinde (Fowler, 1993), hayvanlarda bulunan lizozomal glukoserebrozidazlar glikosifingolipidlerin metabolizmasında (Grabowski ve diğ., 1993), bitkilerde bulunan β -glukozidazlar ise bitki zararlılarına karşı savunmada, lignifikasyonda, fitohormon aktivasyonunda ve hücre duvarı bileşenlerinin katabolizmasında görev alırlar (Esen, 1993). Bakteri, mantar, insan ve örneğin *Sinapis alba* (beyaz hardal) gibi çift çenekli bitkilerin β -glukozidazlarının glikozillendiği, oysa *Zea mays* (mısır) ve *Sorghum bicolor* (akdarı) gibi tek çenekli bitkilerinkilerin glikozillenmediği ortaya çıkarılmıştır (Kakes, 1985).

Mikroorganizmalarda bulunan β -glukozidazların, hücre içinde yer alan (endojen), hücre dışına salgılanan veya hücre duvarına bağlı olarak yerleşim gösteren (ekstraselüler) tipleri vardır (Bhat ve Bhat, 1997). Çift çenekli bitkilerin β -glikozidazları özellikle tohum kısımlarında ya hücre duvarında ya da sitoplazmada bir protein cisimciği

(mirosin taneleri) halinde, bulunmaktadır (Falk ve diğ., 1992; Hoglund ve diğ., 1992). Tek çeneklilerdekiler ise genelde plastidlerde veya hücre duvarında yerleşim göstermektedirler (Tayler ve Conn, 1981; Esen ve Stetler, 1993; Hughes, 1993). Memelilerdeki β -glukozidazların, hücrede sitoplazmada ve lizozomda bulunan iki tipi bilinmektedir; sitoplazmik β -glukozidazlar, daha çok karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda yer almışlardır (Glew ve diğ., 1993; Grabowski ve diğ., 1993).

β -glukozidaz enzimlerinin yapısal ve işlevsel özellikleri genel olarak ortaktır. Farklı organizma gruplarına ait enzimlerin aktif formlarının, molekül ağırlıkları 50-70 kD arasında değişen alt birimlerden oluşan monomerik yapıdan homomültimerik yapıya değişkenlik gösterdikleri bilinmektedir (Hosel ve diğ., 1987; Esen ve Güngör, 1993; Grabowski ve diğ., 1993; Skory ve Fneer, 1995; Pandey ve Mishra, 1997). Farklı kökenli β -glukozidazların, aralarında % 17-44 dizi benzerliği göstermelerine karşın, $(\alpha/\beta)_8$ dönümleri ile katlanarak oluşan üç boyutlu yapılarının aynı olduğu belirlenmiştir. (Barrett ve diğ., 1995; Czjzek ve diğ., 2001). β -glukozidazların üç boyutlu yapılarına örnek olarak, *Zea mays*'a ait β -glukozidazlardan Glu1 izoziminin üç boyutlu yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir. Tüm β -glukozidazlar katalitik işlevlerini yapabilmek için, substrat olarak bir glikon (glukoz) ve ona bir β -glikozidik bağ ile bağlı olan glikon olmayan (aglikon, bir aril veya alkil) kısımlarından oluşan bir β -glukozide veya β -bağlı oligosakkaridlere gereksinim duyarlar ve bu işlevlerini pH 4-7 arasında gerçekleştirebilirler. Ancak, farklı organizmalardan izole edilen β -glukozidazların, β -glukozidlerin aglikon grupları için son derece yüksek substrat özgüllüğü gösterdiği saptanmıştır (Clarke ve diğ., 1993; Glew ve diğ., 1993; Babcock ve Esen, 1994).



Şekil 2.1: *Zea mays*'a ait β -glukozidazlardan Glu1'in üç boyutlu yapısal modeli (Czjzek ve diğ., 2001).

2.2 HAYVANSAL β -GLUKOZİDAZLAR

Hayvansal β -glukozidazlar daha çok memelilerde araştırılmakla beraber, böcek sistemlerine ait veriler de bulunmaktadır.

2.2.1 Memeli β -Glukozidazları

Memelilere ait lizozomal (asidik) β -glukozidazlar (glukoserebrozidazlar, EC 3.2.1.45), hem gen hem de protein düzeyinde tanımlanmışlardır ve bu enzimlerin doğal substratları sifingosilglukozid ile glukozilseramiddir. Lizozomal β -glukozidazların sadece doğal substratlarını değil, 4MUG ve pNPG gibi yapay substratları da hidrolizeyebildikleri gösterilmiştir. Bu enzimlerin membrana bağlı oldukları ve zayıf ölçüde glikozillendikleri saptanmıştır. Lizozomal β -glukozidazlar çoğu dokularda bulunurlar ve aktivitelerini pH 4.5-5.0'de gerçekleştirirler (Grabowski ve diğ., 1985). İnsanlarda bulunan lizozomal β -glukozidazı şifreleyen genin şifreleme yapan bölgesi ile yalancı geni arasında % 96, fare β -glukozidaz genlerinin şifreleme yapan bölgeleri ile de % 84 nukleotid dizi benzerliği gösterdiği, ancak bitkilerin ve mayalarınkilerle hiç bir homolojinin bulunmadığı saptanmıştır (O'Neil ve diğ., 1989).

İnsanda lizozomal β -glukozidazların eksikliği, glukozilseramidin birikmesi ile ortaya çıkan, otozomal resesif bir hastalık olan "Gaucher" hastalığına yol açmaktadır (Grabowski ve diğ., 1993). Bu hastalığının tedavisi, insan plasentasından izole edilerek

saflaştırılmış enzimin hastalara damardan enjeksiyonla verilmesi şeklinde uygulanmaktadır ve maliyeti çok yüksektir. Bakterilerde protein glikozilasyonu olmadığından, bu enzimin rekombinant DNA tekniği ile bakterilerde üretimi de mümkün olmamaktadır. Ohassi ve diğ. (1992) insan β -glukozidazını şifreleyen geni, retroviral bir vektör aracılığıyla fare hematopoietik kök hücrelerine aktarıp anlatımını yaptırabilmişlerdir. Bu bulgu, hastalığın tedavisi için gen terapisinin uygulanabilirliğini göstermiştir.

Memeli sitozolik β -glukozidazları, detoksifikasyon enzimlerini içeren karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda bulunmaktadır. Ayrıca, β -glukozidazların genel özelliklerinin aksine, hem glikon hem de aglikon kısımları çeşitlilik gösteren çok sayıda substratı hidrolizleyebilmektedirler (Gopalan ve diğ., 1992). İnsan sitozolik β -glukozidazının molekül ağırlığı 53 kD olan monomerik bir protein olduğu bilinmektedir (Daniels ve diğ., 1981). Berrin ve diğ. (2002) insana ait sitosolik β -glukozidaz enzimini şifreleyen geni *Pichia pastoris*'te klonlayıp heterolog anlatımını yaptırmayı başarmışlardır. Bunun yanı sıra, bu enzimin ayrıntılı olarak moleküler düzeyde incelenmesiyle üç boyutlu yapısının ve katalitik bölgesinde bulunan TFNEP ve IVTENG motiflerinin β -glukozidazların genel özellikleriyle uyumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır (Berrin ve diğ., 2003).

2.2.2 Böcek β -Glukozidazları

Böceklerin ökaryotlar arasında en fazla tür çeşitliliğine sahip olmaları ve bunların bir çoğunun bitkiler için zararlı olmaları nedeniyle, böceklerin β -glukozidaz sistemlerinin incelenmesinin bu enzimlerin genel yapı ve işlevleri hakkında önemli bulgular sağlayabileceğini düşündürmüştür. Böceklere ait β -glukozidazların tanımlanması ve işlevsel özelliklerinin aydınlatılmasına yönelik çok az çalışma rapor edilmiştir. Bu enzimlerin böceklerin daha çok sindirim sistemlerinde bulunan sellobiozu ya da salisin, helisin, amigdalin ve arbutin gibi β -glukozidlerini hidrolizledikleri tespit edilmiştir. Ancak, böceklerde kendi besinlerinden türevlenerek *de novo* sentezlenen ya da salgılanan doğal substratların nadir olduğu ortaya çıkarılmıştır (Baker, 1991). Fenolik bileşenlerce zengin bitkilerle beslenen *Papilio glaucus* (Lepidoptera)'da salisin ve salikortini yıkan 1,4 β -glukozidazların yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Lindroth, 1988). Benzer şekilde, şeftali kurdunda bulunan

β -glukozidazın konağın siyanogenik β -glukozidini (prunasini) hidrolizleyebildiği ve sonuçta siyanür açığa çıkarabildiği (siyanogenez) saptanmıştır (Reilly diğ., 1987). Nahrstedt ve Davis (1986) *Zygaena trifolii* güvesinin larvalarında bulunan bir β -glukozidazı ve substratlarını tanımlamışlardır. Bu enzimin ve substratlarının *Fabaceae* familyasına ait siyanogenik bitkilerinkine çok benzer olduğuna işaret etmişler ve enzimin tipik bir siyanogenik β -glukozidaz (linamaraz), fizyolojik substratlarının ise linamarin ve lotaustralin adlı iki siyanogenik glukozid olduğunu açıklamışlardır. Nahrstedt ve Mueller (1993) bu organizmada, kataliz işleminin gerçekleştiği yer olan hemolenfte, hem enzim hem de substratları bir arada bulunmaktadır. Ancak, hemolenfte bulunan Mg^{++} ve Ca^{++} metal iyonlarının normal konsantrasyonda linamarazın katalitik aktivitesini engellemesi nedeniyle, larva herhangi bir saldırıya uğramadıkça siyanogenesizin oluşmadığı, ancak bir saldırı durumunda metal iyonlarının konsantrasyonunun değişmesi sonucu linamarazın aktif duruma geçtiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, bu larvaların kendi substratlarını sentezlemekle birlikte yedikleri konak bitki kısımlarından gelen β -glukozidleri de substrat olarak biriktirebildikleri anlaşılmıştır.

Brevicoryne brassicae (lahana yaprak biti)'de alt birimleri 57-58 kD olan dimerik bir mirosinaz izole edilip tanımlanmıştır (Pontoppidan ve diğ., 2001). Benzer şekilde, Jones ve diğ. (2001) tarafından *Lipaphis erysimi* (şalgam yaprak biti) böceklerinden bitkilerdeki mirosinazlara benzeyen bir β -glukozidaz izole edilmiştir. Jones ve diğ. (2002)'nin yaptığı bir başka çalışmada, *L. erysimi* mirosinazının, (amino asit dizi benzerliği esasına göre) yapısal olarak bitki mirosinazlarına, işlevsel olarak da bitki β -O-glukozidazlarına benzediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, bu böcekteki enzimin bitki mirosinazlarının aksine, askorbik asit ile aktive edilmediği ve bu enzimin aktif bölgesinde bitki β -O-glukozidazlarındaki gibi iki katalitik glutamik asit kalıntısı bulunduğu tespit edilmiştir.

2.3 BİTKİSEL β -GLUKOZİDAZLAR

Bitkilerde bulunan β -glukozidazların büyük bir bölümünü β -O-glukozidazların ve diğer bölümünü de β -S-glukozidazların oluşturduğu bilinmektedir. β -O-glukozidazların oldukça büyük bir grubuna, en az 110 farklı bitki ailesine ait 3000'den fazla türde

bulunan ve siyanogenik β -glukozidleri hidrolizleyebilen siyanogenik β -glukozidazlar, diğer grubuna ise *Z. mays*, *Secale cereale* (çavdar), *Triticum aestivum* (buğday) gibi bitkilerde bulunan ve hidroksamik asit- β -glukozidlerini (HxG) hidrolizleyen β -glukozidazlar dahil edilmektedir.

Bitkilerde β -O-glukozidazların siyanogenik özellikte olanları ilk kez Liebig ve Wohler tarafından 1837 yılında badem ağacının lateksinde (süt borusu) amigdalin olarak bilinen siyanogenik β -D-gentiobiosidi hidrolizleyen enzimin ortaya çıkarılmasıyla tanımlanmıştır (Esen, 1993).

Prunus serotina'da bulunan amigdalinin, amigdalin hidrolaz (AH), prunasin hidrolaz (PH) ve mandelonitril liyaz olarak adlandırılan üç farklı enzimin katalizi ile siyanüre indirgendiği gösterilmiştir. *P. serotina*'daki siyanogenik monoglukozid (prunasin) yapraklarda ve olgunlaşmamış meyvelerde, siyanogenik diglukozid (amigdalin) ise olgun tohumlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Ayrıca, bu enzimlerin molekül ağırlıklarının 52-67 kD arasında değiştiği de bilinmektedir (Poulton, 1993). PH'nın bir multigen ailesi tarafından hidrolizlendiği, en az beş üyesinin (*Ph1-Ph5*) olduğu ve bu üyelerin kendi aralarında % 74-92 amino asit dizi benzerliği gösterdikleri açıklanmıştır. Aynı zamanda, *Ph* genlerinde ve AH'yı şifreleyen *Ah1* geninde, intron-ekson bağlantı bölgeleri aynı olan 12 adet intronun da bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Zhou ve diğ., 2002). Aynı araştırmacılar, bu genlerin şifrelediği izozimlerin N-uçlarında sinyal dizilerine sahip olduklarını, 2-8 arasında değişen N-glikozillenme kalıntısı içerdiklerini ve enzimin aktif bölgesinde NEP ve ITENG motiflerinin bulunduğunu göstermişlerdir.

Afrika ülkelerinde önemli bir besin olan *Manihot esculenta* (manyok) yüksek derecede siyanogenik özellikte bir bitkidir. Bitkinin yenilmesi durumunda, insanlarda siyanür zehirinin birikmesi sonucunda zehirlenmeye ve hatta ölüme neden olabileceği belirtilmiştir (Poulton, 1990). Siyanogenik bir β -glukozidaz olan linamaraz enzimi, 70 kD'luk bir glikoprotein molekülüdür ve bu molekülün molekül ağırlığının % 7-15'inin yüksek mannoz tipte glikozillenmeden ileri geldiği gösterilmiştir (Hughes ve diğ., 1992). Linamarazları içeren diğer bir siyanogenik bitki olan *Trifolium repens* (beyaz yonca)'te de linamarin ve lotaustralin adlı iki doğal substratın

bulunduğu ve bu substratların linamaraz tarafından hidrolizi ile glukoz ve siyanürün oluştuğu saptanmıştır. *T. repens*'deki 62 kD'luk enziminin de *M. esculenta*'daki linamaraz gibi glikozillendiği ve yapraklardaki epiderm hücrelerinin duvarlarında bulunduğu belirtilmiştir (Dunn ve Hughes, 1988). Bununla birlikte, Santana ve diğ. (2002), yüksek siyanogenik (HCV) ve düşük siyanogenik (LCV) *M. esculenta* kültürlerinde yaptıkları çalışmalarında LCV'deki linamarazın vakuolde de bulunduğunu göstermişlerdir. *M. esculenta* ve *T. repens* β -glukozidazlarının % 67 dizi benzerliği gösterdikleri saptanmıştır. Linamaraz enzimini şifreleyen *M. esculenta*'da bir (Hughes ve diğ., 1992), *T. repens*'de en azından üç farklı genin (Dunn ve Hughes, 1988) bulunduğu bilinmektedir. Enzimin aktif bölgesinde Glu-198'in asit/baz katalisti olarak iş gördüğü (Keresztessy ve diğ., 1996) ve Glu-413, Gln-339, Ala-201 ve Phe-269 kalıntılarının kataliz işlevinde görev yaptığı (Keresztessy ve diğ., 2001) yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır.

Bir başka siyanogenik bitki olan *Sorghum bicolor*'da ise doğal olarak sentezlenen dihurin glikozidini hidrolizleyen 58 ve 62 kD'luk monomerik iki dihurinaz izoziminin (Dhr1 ve Dhr2) bulunduğu saptanmıştır (Hösel ve diğ., 1987). Bunlardan Dhr1'in kök, mezokotil, nod ve koleoptilde, Dhr2'nin ise nod ve yapraklarda bulunduğu açıklanmıştır (Çiçek ve Esen, 1998a). Aynı araştırmacılar, *S. bicolor*'a ait β -glukozidaz izozimlerini şifreleyen *dhr1* ve *dhr2* cDNA'larının aralarında % 70 nükleotid dizi benzerliği gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, bu genlerin şifreledikleri 565 amino asitlik Dhr1 ve 571 amino asitlik Dhr2 izozimlerinin sırasıyla 51 ve 54 amino asitlik plastide taşıma sinyal dizileri içerdiklerini de belirlemişlerdir. Yine bu çalışmada bu izozimlerin aralarında % 75 amino asit dizi benzerliği gösterdiklerini de ortaya çıkarmışlardır. *S. bicolor*'un Dhr1 enziminde dihurinin bağlanması ve hidrolizi için önemli olan kalıntılar (Ser-462-Ser-463 ve Phe-469), *Z. mays*'ın Glu1 ve *S. bicolor*'un Dhr1 enzimlerinin C-ucundaki bölgeleri arasındaki 4-22 amino asitlik peptid dizilerinin karşılıklı değiştirilmesiyle elde edilen 8 farklı kimerik enzimin farklı substratlara karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çiçek ve diğ., 2000). Verdoucq ve diğ. (2004) tarafından, *S. bicolor*'a ait olan Dhr1'de Asn259, Phe261 ve Ser462 kalıntılarının aglikon bağlamada rol oynadıkları gösterilmiştir.

Dalbergia cochichinensis bitkisinde dalkokinin-8'-O- β -glukozidazın (dalkokinaz) izoflavonoidler için aglikon özgülüğüne sahip olduğu, β -glukozidleri ve β -fukozidleri hidrolizlediği belirtilmiştir. Dalkokinazı şifreleyen genin cDNA'sının 547 amino asitlik öncü bir proteini şifrelediği ve bunun 23 amino asitlik kısmının sinyal dizileri olduğu gösterilmiştir. Olgun enzimin siyanogenik *T. repens*'in β -glukozidazı ile % 60 oranında dizi benzerliği gösterdiği de ortaya çıkarılmıştır (Ketudat-Cains ve diğ., 2000).

Bitkilerde β -O-glukozidazların diğer bir grubunu, hidroksamik asit β -glukozidlerini (HxG) hidrolizleyen hidroksamik asit β -glukozidazları oluşturmaktadır. *Z. mays*, *T. eastivum* ve *S. cereale* gibi *Gramineae* bitkilerinin β -glukozidazlarının HxG (DIMBOAG veya DIBOAG)'lerini hidrolizledikleri bilinmektedir. Bu bitkilerde substratların (HxG) vakuolde, enzimlerinin (Hx β -glukozidazlarının) ise plastidlerde bulunduğu bilinmekle (Cuevas ve diğ., 1992) birlikte, *Z. mays*, *T. eastivum* ve *S. cereale* bitkilerinde bu enzimlerin plastidlerin dışında hücre duvarı ve sitoplazmada da bulunduğu gösterilmiştir (Nikus, 2003). Ancak, bu bitkilerdeki hücre duvarlarında bulunan enzimin glikozid hidrolaz ailelerinden 3. aileye dahil glukan 1,3- β -glukozidaz (EC 3.2.1.58) olduğu gösterilmiştir. Bu enzimin de DIMBOAG ve DIBOAG substratları ile aktiviteleri tespit edilmiştir (Nikus ve diğ. 2003).

Z. mays'da 60 kD'luk alt birimleri olan otohomodimerik yapıda iki β -glukozidaz izozimi (Glu1 ve Glu2) tanımlanmıştır (Esen, 1992). Bu izozimlerden Glu1'in tohumda, Glu2'nin ise yeşil yapraklarda anlatım yaptıkları anlaşılmıştır (Babcock ve Esen, 1994). *Z. mays*'da bulunan Glu1 ve Glu2 izozimlerini şifreleyen cDNA'ların aralarında % 88 dizi benzerliği gösterdikleri saptanmıştır. Glu1 ve Glu2'ye ait her biri 566 ve 563 amino asit içeren öncü proteinlerin sırasıyla 51 ve 52 amino asit uzunluğunda sinyal dizileri taşıdıkları belirlenmiştir (Bandaranayake ve Esen, 1996). Glu1 enziminde aglikonu tanıma ve bağlanmada rolü olan kalıntılar (W378, F198, F205 ve F466), *glu1* geninin aktif bölgesindeki glutamik asidi şifreleyen kodonun askorbik asiti şifreleyen kodona dönüştürülmesiyle elde edilen ZmGlu1E191D adlı inaktif mutant enzimin, DIMBOAG, DIMBOA ve dihurin ile oluşturduğu kompleksler kullanılarak X-ışını kristalografisi ile gerçekleştirilen yapısal incelemeler sonucunda açıklanmıştır (Czjzek ve diğ., 2000). Daha sonra, *Z. mays*'a ait Glu1 enziminin inhibitörü olan pNPTG ile oluşturulan kompleksin kristalografik incelemeleri ile enzimin Trp378 kalıntısının aglikonu tanıma

ve bağlanmada önemli olduğu belirlenmiştir (Czjzek ve diğ., 2001). Bu enzimlerin homomültimerik çözünmeyen formlarının oluşumundan sorumlu olan bir bağlama faktörü (BGAF) tanımlanmış ve enzimin primer yapısı üzerinde β -glukozidaz-bağlanma-proteinlerinin bulunduğu bölgelerin haritası çıkarılmıştır (Blanchard ve diğ., 2001).

S. cereale'ye ait β -glukozidazların bitkinin daha çok sürgün kısımlarında bulunduğu ve birkaç izozimi olduğu bilinmektedir. İzozimlerinin her birinin alt birimlerinin 60 kD ağırlığında olduğu ve enzimin yaklaşık 300 kD'luk homodimerik yapıda olduğu saptanmıştır. Ayrıca, enzimin DIMBOAG ve DIBOAG substratlarına karşı yüksek derecede aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir (Sue ve diğ., 2000a).

T. aestivum'da bulunan hidroksamik asit β -glukozidazının 60 ve 58 kD'luk alt birimlerinden ibaret olan 260-300 kD'luk bir heteromültimer olduğu ortaya çıkarılmıştır ve bu enzimin DIMBOAG substratına karşı yüksek aktivite gösterdiği açıklanmıştır (Sue ve diğ., 2000b).

Glikozid hidrolaz ailelerinden 1. aileye dahil olan β -O-glukozidazlarının *Hordeum vulgare* (arpa) ve *Oryza sativa* (pirinç) bitkilerinde farklı bir tipi bulunmaktadır. Bu enzimlerin bu bitkilerin gelişimi sırasında başka enzimler tarafından açığa çıkarılan hücre duvarı bileşenlerinden türevlenen oligosakkaridlerin hidrolizinde rol oynadıkları bilinmektedir. Bu oligosakkaridlerin kısa β -(1→2), β -(1→3) ve β -(1→4) bağlı gluko-oligosakkaridler olduğu ortaya çıkarılmıştır (Stone ve Clarke, 1992). *H. vulgare*'den 60 kD'luk tek bir enzim (BGQ60) bulunmuştur. Bu enzimi şifreleyen bgq60 geninin yaklaşık 5 kb'lık bir gen olduğu ve 9 intron içerdiği, cDNA'sının ise 1090 bç boyunda olduğu, ayrıca olgun polipeptidinin 485 amino asit içerdiği ve dört glikozillenme kalıntısına da sahip olduğu gösterilmiştir. Bu enzim bitkinin sadece tohumlarında bulunmaktadır (Leah ve diğ., 1995). *O. sativa*'nın ise iki β -glukozidaz izozimi (BGlu1 ve BGlu2) bulunmaktadır. Bunları şifreleyen genlerin (*bglu1* ve *bglu2*) sırasıyla 1909 ve 1797 nukleotidlik cDNA'larının, 504 ve 500 amino asitlik öncü proteinleri ve 476 ve 475 amino asitlik olgun proteinleri şifreledikleri ortaya çıkarılmıştır. Bu genlerin ikisi de bitki sürgünlerinde yüksek derecede anlatım yapmakta, ancak olgun bitkinin çiçeklerinde sadece *bglu1* bulunmaktadır.

BGlu1 ve BGlu2 izozimlerinin doğal substratları olan piridoksin-5'-O- β -D-glukozid ve kısa β -(1 \rightarrow 3) ve β -(1 \rightarrow 4) bağılı glukoz-oligosakkaridlerin yanında farklı substratları da hidrolizledikleri anlaşılmıştır. Ayrıca, BGlu1'in *H. vulgare*'nin BGQ60 enzimi ile % 66, *P. serotina*'nın AH1 izozimi ile de % 54 dizi benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Opassiri ve diğ., 2003).

Brassicaceae bitki ailesinde bulunan ve β -S-glukozidaz tipinde olan mirosinazlar, kükürt ve azot bağılı bir glukoz içeren glukozinolatları (tiyoglukozid) hidrolizlemektedirler. Mirosinazların glukozinolat içeren bitkilerin yaprak, gövde ve köklerindeki parenkima dokusunun özel idiyoblastlarında (mirosin hücreleri) bulunduğu bilinmekle beraber membrana bağılı sitozolik enzimlerin de varlığı tespit edilmiştir. Bu enzimlerin substratları olan glukosinolatların ise bitkilerin vakuollerinde depolandığı belirlenmiştir. Enzim-substrat etkileşimi ancak doku zarar gördüğünde oluşmakta ve izotiyosiyanatlar, tiyosiyanatlar ve nitriller gibi toksik bileşenler açığa çıkmaktadır. (Falk ve diğ., 1992; Hoglund ve diğ., 1992; Falk ve Rask, 1995; Xue ve diğ., 1995). Glukosinolatları içeren bitkilerde bu toksik maddelerin çeşitli böcekler ve mantarlar gibi patojenlere karşı bir savunma sistemi olduğu ileri sürülmektedir (Rask ve diğ., 2000; Pontoppidan ve diğ., 2001; Jones ve diğ., 2002). Ayrıca, bu aileye dahil olan bitkilerin sahip olduğu özel (ayırıcı) tadın, içerdikleri glukosinolatların tipine ve bunların hidrolizinden açığa çıkan ürünlerin miktarına bağılı olduğu bilinmektedir (Fenwick ve diğ., 1983).

Mirosinazlar MA (Myr1), MB (Myr2) ve MC olarak adlandırılan gen aileleri tarafından şifrelenmektedirler (Xue ve diğ., 1995; Rask ve diğ., 2000). Southern melezlemesiyle *S. alba*'da 3-4 adet MA ve 10 adet MB (Xue ve diğ., 1995), *Brassica napus* (kolza)'da da 5 adet MA, 10-15 adet MB ve 5 adet MC (Thangstad ve diğ., 1993; Falk ve Rask, 1995) geninin varlığı saptanmıştır. MA ailesine ait mirosinazların yaklaşık 140 kD'luk çözülebilir homodimer, MB ve MC ailelerine ait olanların ise moleküler ağırlıkları 250-800 kD olan homomültimerik yapıda oldukları ortaya çıkarılmıştır (Rask ve diğ., 2000). *B. napus*'da bu kompleks yapılı mirosinazların mirosinaz-bağlama-proteinleri ile oluşturuldukları gösterilmiştir (Eriksson ve diğ., 2002).

Yapısal ve işlevsel özelliklerinde belli farklılıklar olan bitki mirosinaz izozimlerinin glikoprotein yapıda olduğu ve bu karbohidrat birimlerinin enzimlerin yaklaşık % 10-20'sini oluşturduğu saptanmıştır. Yine aynı araştırmada tanımlanan tüm işlevsel mirosinazları şifreleyen genlerin, korunmuş 12 ekson ve 11 intron dizilerinden ibaret parçalı gen yapısında oldukları vurgulanmıştır (Rask ve diğ., 2000).

B. napus'dan alt birimi 64 kD olan 130 kD'luk homodimerik yapıda aktif bir mirosinaz izole edilip bu enzimin zeatin-O-glukozidi ve pNPG substratlarını hidrolizleyebildiği gösterilmiştir (Falk ve Rask, 1995). *S. alba*'da bulunan β -glukozidaz enziminin Myr1 ve Myr2 adlı farklı izozimleri tanımlamış; alt birimleri 75 ve 65 kD olan bu izozimlerden Myr1'in 135-150 kD'luk homodimerik, Myr2'nin ise homomültimerik yapıda oldukları ortaya çıkarılmıştır (Xue ve diğ., 1992). Aynı araştırmada, bu izozimlerden Myr1'i şifreleyen genin cDNA'sının 1742 bç uzunluğunda olduğu ve bunun 527 amino asitlik bir polipeptidi şifrelediği, Myr2'nin ise 1878 bç uzunluğunda olduğu ve bunun şifrelediği öncü proteinde 20 amino asitlik sinyal dizisi bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, Myr1 enziminin sinigrin ve benzilglukozinolat substratları ile yüksek katalitik etkinlik gösterdiği de belirlenmiştir (Conn, 1993). *Arabidopsis thaliana*'da da iki adet tiyoglukozid glukohidrolaz izozimi (TGG1 ve TGG2) tespit edilmiştir (Chadchawan ve diğ., 1993; Xue ve diğ., 1995).

2.4 β -GLUKOZİDAZLARIN İŞLEVLERİ VE ENDÜSTRİYEL KULLANIM ALANLARI

2.4.1 Savunma

Bitkiler, kendilerini bitki zararlılarından ve çevresel stres koşullarından toksik kimyasallar salgılayarak geliştirdikleri savunma mekanizmaları ile koruyabilmektedirler. Bu mekanizmalardan iyi araştırılmış olan β -glukozid- β -glukozidaz sistemindeki savunma, bitki zarar gördüğünde bitkinin farklı bölmelerinde bulunan enzim ve substratların bir araya gelerek acı ve toksik özellikte aglikonlar ile diğer yıkım ürünlerinin açığa çıkarılması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde, çeşitli bitki zararlılarının caydırıldığı, bitkilere girişlerinin ve gelişmelerinin engellendiği bilinmektedir. (Esen, 1993; Pontoppidan ve diğ., 2001). Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'da bulunan β -glukozidazları şifreleyen genlerin anlatımları, bu

bitkinin böcekler tarafından yenilmesinden (Stotz ve diğ., 2000) veya fosfat açlığı (Malboobi ve Lefebvre, 1997) ve soğuk (Callard ve diğ., 1996) gibi çevresel streslerle uyarıldıktan sonra artmaktadır. Benzer şekilde, patojenlerin saldırısı karşısında *Z. mays*, *T. aestivum* gibi bazı *Gramineae*'de hidroksamik asit glukozidi içeriğinin arttığı da rapor edilmiştir (Gutierrez ve diğ., 1988; Niemeyer ve diğ., 1989).

2.4.2 Büyüme ve Gelişme

β -glukozidazların, bitkilerde fitohormon glukokonjugantlarını ve aktif hormonları açığa çıkarabilmeleri nedeniyle, büyüme ve gelişmede rol oynadıkları düşünülmektedir. Örneğin, *Z. mays* β -glukozidazları bitkinin sürgün kısımlarında yüksek konsantrasyonda bulunurken, doğal substratlarının çok düşük konsantrasyonda olması nedeniyle bu enzimlerin bitkilerde fitohormon aktivasyonuna ve metabolizmasına da karıştıkları ileri sürülmüştür (Esen, 1993; Falk ve Rask, 1995). *O. sativa*'da bulunan BGlul1'in pridoksin-5'-O- β -D-glukozidini (B6 vitamini) hidrolizlemesi ve bitkinin sürgün kısımlarında bulunması, enzimin büyüme ve gelişmeyle ilgisinin olduğunu düşündürmüştür (Opasiri ve diğ., 2003).

2.4.3 Besinlerde Kalite Artırımı

Mikroorganizmalardaki β -glukozidazlar, meyvelerde ve fermentatif ürünlerde bulunan glikozidik öncüllerden aromatik bileşenlerin açığa çıkmasında rol alan anahtar enzimlerdir. Bu nedenle, mikrobiyal β -glukozidazlar oldukça iyi tanımlanmıştır ve bunların birçoğu biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Üzümdeki monoterpenerlerin linalol, geraniol, nerol, sitronelol, α -terpinol ve linalol oksit gibi şaraba tadını veren diglukozidler olduğu ve bu bileşenlerin bir seri enzimatik reaksiyonla monoglikozidlere indirgeniği bilinmektedir (Gunata ve diğ., 1985). Üzümde bulunan endojen β -glukozidazların, monoterpencil-glukozidler hidrolizleri için sınırlı aktivite göstermeleri nedeniyle, bu glukozidlerin büyük bir kısmının olgun meyvede işlenmeden kaldığı belirlenmiştir. Şarap yapımı sürecinde, üzümdeki glikozidleri hidrolizleyebilen, mantar kökenli glukoz-toleranslı endojen β -glukozidazların eklenmesiyle şarap kalitesinin artırıldığı gösterilmiştir. Örneğin, Sicilya'da üretilen şıra ve şaraplarda yapılan taramalarda 361 adet *S. cerevisiae* ırkı tanımlanmış ve bunlardan AL41 ve AL112 ırklarında yüksek endojen β -glukozidaz aktivitesi ortaya çıkarılmıştır. *S. cerevisiae*'ye özgü bu endojen β -glukozidazın şıra ve

şaraba özgü tad ve aromayı belirlediği ileri sürülmüştür (Spagna ve diğ., 2002a ve b). Benzer şekilde, depolanan zeytin yağlarında bulunan *S. cerevisiae* ve *C. wickerhamii* türlerinin β -glukozidazlarının, yağın acı tadını veren olöropeini hidrolizlemesi ile bu kötü tadın giderildiği ortaya çıkarılmıştır (Ciafardini ve Zullo, 2002).

Bitkilerde tanımlanan yüzlerce farklı β -glukozidik tat öncülleri bulunmaktadır. Bu β -glukozidlerin aglikon kısımlarının mevalonat ya da şikimat biyosentez yolunun ürünleri olduğu ve β -glukozidazların da bitki dokularında bulunan bu tat öncüllerini hidrolizleyebildikleri bilinmektedir (Vasserof ve diğ., 1995; Winterhalter ve Skouroumonis, 1997). Bundan dolayı, her bir β -glukozidin besindeki tat ve aromayı belirleyen aglikon kısmını açığa çıkaracak hidrolizi gerçekleştiren özel enzimin tanımlanmasının, besin kalitesinin artışı ile ilgili çalışmalara öncü olacağı düşünülmektedir.

Afrika, Asya ve Güney Amerikanın tropikal bölgelerinde temel besin kaynağı olarak *Manihot esculenta* kökleri ve yaprakları ile özellikle *Linum usitatissimum* tohumların tüketilmesi ve bu tüketimin aşırıya kaçması durumunda insanda solunum güçlüğü, felç, koma ve hatta ölüme yol açması nedeniyle, bu siyanogenik bitkilerin yenilen kısımlarının iyileştirilmesine ve kalite artışına yönelik yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla, linamarin ve laustralin biyosentezinde ilk basamağı katalizleyen enzim olan sitokrom P450'yi şifreleyen iki gen (CYP79D1 ve CYP79D2) izole edilmiş ve bu genlerin karşı anlamlı konumda *M. esculenta*'ya transferiyle siyanogenik bir β -glukozid olan linamarinin içermeyen transgenik *M. esculenta* bitkisi elde edilmiştir (Siritunga ve Sayre, 2003).

Brassicaceae ailesinde sebze olarak tüketimi yapılan bitkilerle özdeşleşen acı, keskin tat ve aromadan, mirosinaz-glukozinolat (β -tiyoglukozidaz- β -tiyoglukozid) sistemlerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Hatta, bu bitkilerle beslenen çiftlik hayvanlarının süt, et ve yumurtalarına glukosinolatlara özgü tat ve aromanın geçtiği anlaşılmıştır. Bu durumun, glukozinolatların mirosinazlar tarafından hidroliz edilmesi sonucu açığa çıkan aglikon kısımlarından ileri geldiği bilinmektedir (Fenwick ve diğ., 1983). Bu nedenle besin kalitesinin artırımı sürecinde mirosinazlar çok önemlidir. Ayrıca, insanda, glukosinolatların ve yıkım ürünlerinin antikanserojen etkilerinin olduğu da ileri

sürülmektedir. Epidemiyolojik ve farmakolojik çalışmalar glukosinolat içeren sebzelerin tüketiminin kolorektal kanser oluşum riskini engelleyebildiğini göstermiştir (Leoni ve diğ., 1997). Nastruzzi ve diğ. (2000) bazı glukosinolatlardan türevlenen izotiyosiyanat ve nitrillerin kanserli hücrelerin gelişimi üzerindeki etkilerini karşılaştırdıklarında, izotiyosiyanatların nitrillere oranla daha da etkin bir biçimde bu hücrelerin gelişimlerini engellediklerini göstermişlerdir.

2.4.4 Biokitle Dönüşümü

Polisakkaridler arasında özellikle selülozun, biyosferde en bol (yaklaşık 5×10^{10} ton/yıl üretim) bulunan karbohidratların başında gelmesi ancak, canlıların çok az bir grubu (selülotik mikroorganizmalar) tarafından kullanılabilmesi nedeniyle, bu bileşiğin glukozu endüstriyel boyutta indirgenmesi önem kazanmıştır. Bununla beraber, selülozun yüksek sıcaklıkta inorganik asit kullanılarak hidrolizinin hem ekolojik hem de ekonomik olarak uygun olmadığı bilinmektedir. Selülotik organizmaların sahip olduğu selülozu glukozu indirgeyen doğal komplekste endoglukonaz, eksoglukonaz (sellobiohidrolaz) ve β -glukozidaz olmak üzere üç enzim bulunmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997). Selülotik filamentli mantarların çeşitli türlerinde selülozun glukozu maksimum hidrolizinin, selülaz kompleksindeki üç enzimin optimum oranda bulunduğu koşullarda gerçekleştiği saptanmıştır. Burada hız sınırlayıcı basamağın, bir β -glukozidaz tarafından sellobiozun glukozu dönüştürüldüğü reaksiyon olduğu ve bu enzimin aktivitesinin son ürün (glukoz) tarafından engellenebildiği belirtilmiştir (Barnett ve diğ., 1991). Selülaz kompleksini oluşturan enzimleri şifreleyen genler, *Kluyveromyces fragilis*, *Clostridium thermocellum*, *Bacillus polymyxa* ve *Trichoderma reesei* gibi bir çok mikroorganizmadan izole edilip klonlanmıştır (Raynal ve Guerinneau, 1984; Benitez ve diğ., 1989; Adam ve diğ., 1995; Cummings ve Fowler, 1996). Ayrıca, Cho ve diğ. (1999) tarafından, selülaz kompleksinin üç geni de *S. cerevisiae*'ye aktarılarak selülaz içeren besi ortamında etanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

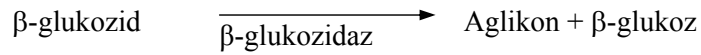
2.4.5 Lignin Biyosentezi ve Kağıt Kalitesi

Lignin biosferde selülozdan sonra en bol bulunan ikinci maddedir ve en önemli öncülü koniferil alkoldür. Örneğin, *Pinus contorta* bitkisindeki β -glukozidazların yine bu bitkide bulunan koniferini (4-O-koniferilglukozid) hidrolizlemesi sonucu koniferil alkolün açığa

çıkıldığı bilinmektedir (Dharmawardhana ve diğ., 1995). Bu tür bitki β -glukozidazlarının lignin biyosentezinde iş görmeleri nedeniyle, bu enzimin ağaç dayanıklılığını ve bu ağaçlardan elde edilecek kağıt kalitesini etkileyebileceği ileri sürülmektedir.

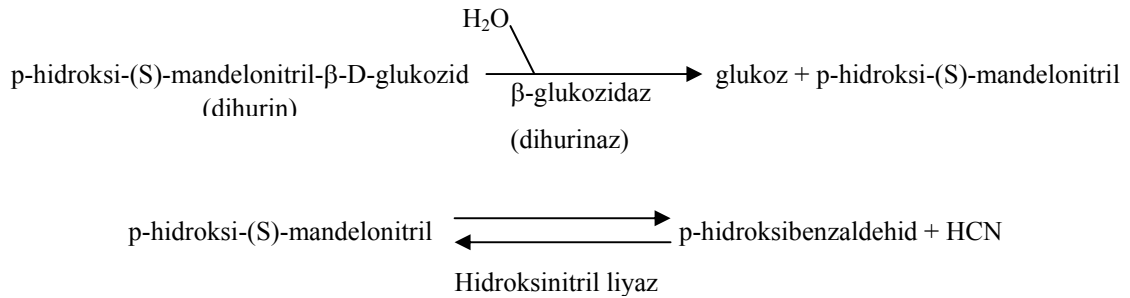
2.5 β -GLUKOZİDAZLARIN KATALİZ MEKANİZMALARI

β -glukozidazların biyokimyasal olarak, aril veya alkil β -glukozidlerin glikozidik bağlarının hidrolizini kataliz ettikledikleri ve bir aglikon ile bir β -glukoz açığa çıkardıkları bilinmektedir (Şekil 2.2).



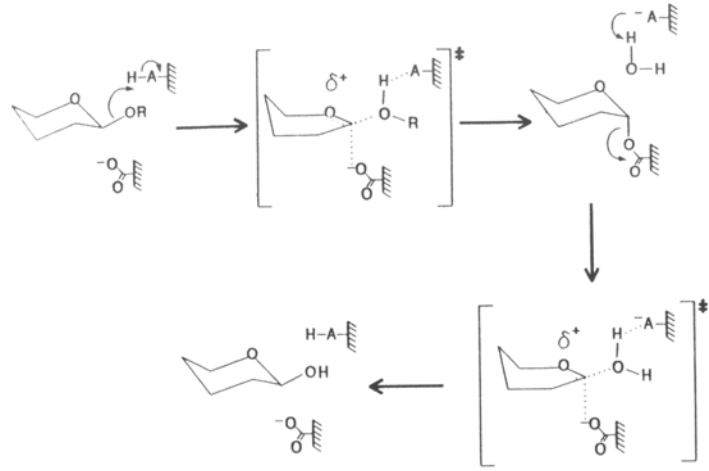
Şekil 2.2: β -glukozidazların genel kataliz reaksiyonu şeması.

β -glukozidlerin oldukça büyük ve ilginç bir grubunu oluşturan siyanogenik glukozidleri içeren canlılardaki (büyük ölçüde bitkilerdeki) siyanogenez olayının bu glukozidlerin iki aşamalı bir yıkım reaksiyonu ile meydana geldiği bilinmektedir. İlk basamakta β -glukozidaz tarafından siyanogenik glukozidlerin glukoz ve hidroksinitrile hidrolizlendiği, ikinci basamakta da, hidroksinitrilin bir hidroksinitril liyaz tarafından keton ve HCN'ye ayrıldığı gösterilmiştir (Conn, 1981) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Siyanogenik β -glukozidazların genel hidrolizi. Bu şemada bir siyanogenik β -glukozid örneği olarak dihurin, β -glukozidaz olarak da dihurinaz verilmiştir.

β -glukozidazlar substrat olarak kullandıkları β -glukozidlerdeki glikozidik bağının hidrolizini, "alıkoyma" adı verilen bir kataliz mekanizmasıyla gerçekleştirirler (Clarke ve diğ., 1993) (Şekil 2.4). Bu mekanizmada substrat iki basamakta hidrolizlenir. Birinci basamakta β -glukozidik bağ hidrolizlenir, enzim glikozillenir ve aglikon açığa çıkar; ikinci basamakta da glukozun enzimden ayrılmasıyla (deglikozilasyon) glikon açığa çıkar.



Şekil 2.4: Alkoyuma mekanizmasıyla glikozidik bağın hidrolizi (Clarke ve diğ., 1993).

Bir çok araştırmacı, β -glukozidazlarda bu enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan yüksek derecede korunmuş motifleri yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile tanımlamışlardır (Çiçek, 1999) (Şekil 2.5).

| | 191 | 461 |
|--------------|--|--|
| 1. ZMK55Glu1 | VKNWLT FNE PQTF T SF | NPPIYIT ENG IGD V D |
| 2. SBU33817 | VKNWLT FNE PE T FCS V | NPPMYIT ENG MG D ID |
| 3. ASLBDG | VKNW F TFNE P HS F CG L | NPPIYIT ENG TAD M D |
| 4. CSAF26G | V K H W ITL N E P WSL S T M | NP K IYIT ENG TAE V E |
| 5. ATU72153 | V K H W IT F NE P W V F S HA | NP E IMIM ENG Y C E-E |
| 6. BNBGL | VKNWIT FNE PW V F S RS | NP E IIIT ENG Y C E-D |
| 7. PAU39228 | V K H W ITL N E P YTIS N H | DP I MYIT ENG MDEF N |
| 8. TRBG104 | V K H W ITL N E P W G V S M N | NP V IYIT ENG RNE F N |
| 9. SalbaMyr | V K Y W LT I N Q LYSV P TR | NP L IY V T ENG IST P G |
| 10. OCLPH | V K L W V T FNE P W V M S Y A | NPPIY V T ENG V S H R G |
| 11. AB009410 | V K Q W IT F NE T W C V S F L | D V PIYIT ENG V H DA K |
| 12. ATUGLUB | LDA V A T FNE P W C A V W L | L P ECYIT ENG V N D Q P |
| 13. BACBGLA | I Q H W LT F NE P W C I A F L | N I D I YIT ENG V Q D D R |

Şekil 2.5: 1. Aileye ait β -glukozidazların amino asit dizilerinde, kataliz işlemlerinde görevi olan motif dizilerin karşılaştırılması. 1: *Zea mays*, 2: *Sorghum bicolor*, 3: *Avena sativa*, 4: *Coctus speciosus*, 5: *Arabidopsis thaliana*, 6: *Brassica napus*, 7: *Prunus avium*, 8: *Trifolium repens*, 9: *Sinapis alba* 10: *Oryctolagus cuniculus* (laktöz pirolizin hidrolaz), 11: *Bacillus spp*, 12: *Agrobacterium tumefaciens*, 13: *Bacillus polymyxa*. Rakamların yanında genlerin "GenBank"ta kullanılan simgeleri verilmiştir. Şeklin başında verilen numaralar ise ilk β -glukozidazın amino asit dizisindeki E kalıntılarının bulunduğu sırayı ifade etmektedir (Çiçek, 1999).

Kataliz işlemini alıkoyma mekanizmasına göre gerçekleştiren β -glukozidazlardan β -O-glukozidazların aktif bölgelerinde en azından iki karboksil grubu (glutamik asit) bulunmaktadır. Bunlardan biri asidik/bazik grup, diğeri nükleofilik gruptur. Asidik grup glikozidik oksijene bir proton verir, nükleofilik grup ise glukozun C1'ine atak yaparak bağın kesilmesini kolaylaştırır. β -glikozidik bağın hidrolizi ile substratın aglikon kısmı serbest kaldıktan sonra bir H₂O molekülü, baz katalizörü olan glutamik asite bir proton, glikon ile enzim arasındaki kovalent bağa da bir hidroksil grubu verir ve böylece glikon serbest kalır (Burmeister ve diğ., 2000). Asit-baz katalizörü olan glutamik asit, enzimin TFNEP motifinde, nükleofilik glutamik asit ise I/VTENG motifinde yer almaktadır (Şekil 2.5).

S-bağlı β -glukozidazların (mirosinazların) aktif bölgelerinde ise glutamik asit kalıntısı içeren I/VTENG motifi bulunmakla birlikte, TFNEP motifinin yerini glutamik asit içermeyen TINQL motifinin aldığı belirlenmiştir (Şekil 2.5). Mirosinazların substratları olan glukosinolatların, glikon ile aglikon kısımlarının birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen özellikte gruplar olmaları nedeniyle, bu enzimlerin kataliz sürecinde birinci basamakta bir asit/baz katalizine gereksinim duymadıkları, aynı şekilde ikinci basamakta da aktif bölgedeki TINQL motifinin Q kalıntısının H₂O molekülü ile deglikozilasyonuna yardım ettiği ortaya çıkarılmıştır (Burmeister ve diğ., 2000). Ayrıca, çok sayıda bitkiye ait mirosinazların çeşitli izozimlerinde yapılan araştırmalarda, ortamda bulunan askorbik asitin enzimin aktif bölgesinin konformasyonunu değiştirerek katalizi aktifleştirdiği belirlenmiştir (Shikata ve diğ., 1999; Burmeister ve diğ., 2000).

2.6 β -GLUKOZİDAZLARIN SUBSTRAT ÖZGÜLLÜĞÜ

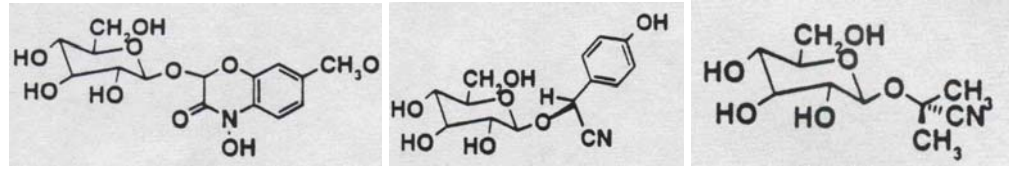
Doğada çok fazla sayıda β -glukozidin bulunduğu ve β -glukozidazların da farklı substratları tanıma ve bağlanma bakımından özgülük sergiledikleri bilinmektedir. β -glukozidazların doğal substratları, memelilerin steroid β -glukozidleri ve β -glukozil seramidleri, bitki sekonder metabolizmasının siyanogenik β -glukozidleri ve glukosinolatları ile bitki hücre duvarındaki selülozun yıkımından açığa çıkan oligosakkarid gibi ürünlerdir (Tablo 2.1) (Şekil 2.6.a). β -glukozidazlar doğal substratlarına karşı yüksek derecede özgülük gösterirler (Clarke ve diğ., 1993).

Tablo 2.1:Farklı organizmalarda doğal olarak oluşan substratlara ait örnekler.

| Substrat | Mono-/Di-glukozid | Kaynak organizma |
|------------------------------------|-------------------|---|
| Amigdalın | di- | <i>Prunus serotina</i> |
| Prunasin | mono- | <i>Manihot esculenta</i> Crantz |
| Linustatin | di- | <i>Linum usitatissimum</i> |
| Neolinustatin | di- | <i>Linum usitatissimum</i> |
| Dihurin | mono- | <i>Sorghum bicolor</i> Moench |
| Linamarin | mono- | <i>Linum usitatissimum</i> |
| Gentiobioz | mono- | <i>Prunus serotina</i> |
| Koniferin | di- | <i>Hevea brasiliensis</i> <i>Prunus serotina</i> |
| Sellobioz | di- | <i>Trichoderma reesei</i> |
| Sello-oligosakkarid | di- | <i>Trichoderma reesei</i> |
| DIMBOAGlc | mono- | <i>Zea mays</i> <i>Hordeum vulgare</i> |
| DIBOAGlc | mono- | <i>Secale cereale</i> |
| Piridoksin-5'-O- β -glukozid | mono- | <i>Oryza sativa</i> |
| Zeatin-O-glukozid | mono- | <i>Brassica napus</i> |
| Sinigrin | mono- | <i>Lepidium sativum</i> |
| Benzilglukosinolat | mono- | <i>Sinapis alba</i> |
| 2-Hidroksi-3-butenil-glukosinolat | mono- | <i>Sinapis alba</i> |
| Glukobrassicin | mono- | <i>Sinapis alba</i> |
| Glukosifingolipid | mono- | <i>Homo sapiens</i> |

β -glukozidazların yapay substratları ise, kromogenik yapıda olan benzil ve nitrofenil-glikozidleri ile florogenik yapıda olan metilumbelliferil-glikozidleridir (Clarke ve diğ., 1993) (Şekil 2.6.b)

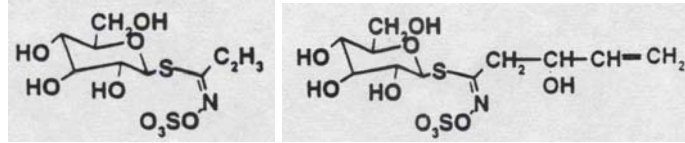
Yapay substratlar, enzimatik reaksiyonun hızını ve enzimin substrata olan ilgisini kolaylıkla test etme olanağı sağladıklarından β -glukozidazların biyokimyasal analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bununla beraber, β -glukozidazların yapay substratlarını nitel ve nicel olarak sınırlı bir şekilde hidrolizleyebildikleri bilinmektedir (Conn, 1993). Örneğin, Tablo 2.2'de değişik kaynaklardan elde edilen enzimlerin farklı substratları farklı hızlarda kataliz ettikleri görülmektedir.



DIMBOA-β-glukozid

Dihurin

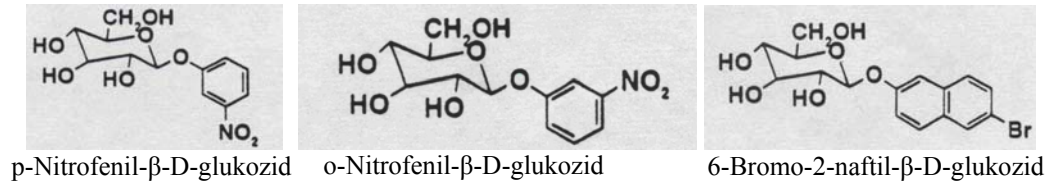
Linamarin



Sinigrin

2-Hidroksi-3-butenil-glukosinolat

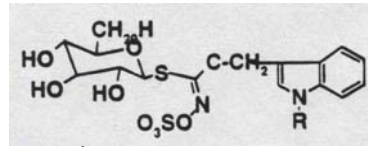
(a)



p-Nitrofenil-β-D-glukozid

o-Nitrofenil-β-D-glukozid

6-Bromo-2-naftil-β-D-glukozid



İndolglukosinolat

(b)

Şekil 2.6: β-glukozidazların substratlarına ait bazı örnekler. a) doğal; b) yapay substratlar

Tablo 2.2: Bazı bitkilerin linamaraz ve mirosinaz enzimlerinin farklı substratlar ile göreceli maksimum hidroliz aktivitesi (V_{max}) (Conn, 1993).

| | <i>L. usitatissimum</i> tohumundaki linamaraz | <i>M. esculenta</i> petiolündeki linamaraz | <i>S. alba</i> fideciklerindeki mirosinaz |
|--------------------|---|--|---|
| Linamarin | 100 | 100 | - |
| Linustatin | 1.3 | - | - |
| Prunasin | 140 | 0 | - |
| Amigdalın | 0 | 0 | - |
| Dihurin | 10 | - | - |
| p-NPG | 184 | 441 | 18 |
| o-NPG | - | - | 2 |
| Sinigrin | - | - | 100 |
| Benzilglukosinolat | - | - | 102 |

β -glikozidazlardaki substrat özgülüğü, β -glukozidik substratlardaki glikon grubun değişmemesi nedeniyle, genelde aglikon özgülüğü anlamına gelmektedir. β -glukozidazların kataliz mekanizmaları hakkında yeterli bilgi edinilebilmiştir. Hatta, enzimin aktif bölgesinde substratı tanımada ve kataliz işleminde rolü olan amino asit dizileri de tanımlanmıştır. Ancak, β -glukozidazların oldukça çok sayıdaki β -glukozidik substratları arasında değişik substratlara karşı özgüllüklerini neyin belirlediği ve bu substratlara nasıl son derece yüksek özgüllük gösterdikleri anlaşılamamıştır. Örneğin *Z. mays*'da bulunan Glu1 ve Glu2 izozimlerinin aralarında % 90 dizi benzerliği bulunmakla birlikte, Glu1'in doğal substratı olan DIMBOA-glukozidinin dışında yapay substratları olan aril β -glukozidleri, hatta aril β -fruktozidleri ve β -galaktozidleri de hidrolizlediği oysa, Glu2'nin yapay substratlarını ya çok az hidrolizlediği ya da hiç hidrolizleyemediği ortaya çıkarılmıştır (Babcock ve Esen, 1994; Çiçek ve Esen, 1998b).

Substrat özgülüğü, biyoteknolojik ve klinik uygulamalarda istenen katalitik etkinliğe sahip enzimleri tasarlamada çok önemlidir. Bu nedenle de araştırmacılar bu soruları, farklı substrat özgülüğü gösteren enzimler arasında bölge değiştirip kimerik β -glukozidazlar elde ederek, yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla mutant enzimler oluşturarak ve X-ışını kristalografisi kullanarak yanıtlamaya çalışmışlardır. Ancak, bitkilerin karmaşık yapıları ve bitkilerle çalışmanın zorlukları nedeniyle, bu çalışmaların doğrudan bitkilerle yapılması yerine bu enzimleri şifreleyen genlerin basit yapılı model organizmalarda klonlanıp aktif heterolog anlatımlarının yaptırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Böylece, bu enzimlerin işlevsel analizlerinin anlaşılması ve/veya bol ürün elde edilebilmesi de sağlanmış olmaktadır. Örneğin, *Z. mays*'ın doğal izozimleri ile kimerik veya mutant izozimleri *E. coli* heterolog anlatım sisteminde analiz edilebilmiştir (Çiçek ve Esen, 1998b; Çiçek ve diğ., 2000; Verdoucqve diğ., 2003). *Brassica napus*'un glikozillenen mirosinaz 1 enzimini şifreleyen *myr1* geni *S. cerevisiae*'de klonlanıp aktif heterolog proteinin anlatım yapabildiği gösterilmiştir. (Chen ve Halkier, 1999). Benzer şekilde, *Dalbergia cochinchinensis*'de dalkokinaz enzimini şifreleyen gen *Pichia pastoris*'de klonlanmıştır ve burada salgılanan heterolog enzim-aktivitesinin orjinal bitkiden izole edilenle aynı olduğu vurgulanmıştır (Ketudat-Cairns ve diğ., 2000). Yine *P. pastoris* ekspresyon sitemi kullanılarak *P. serotina*'da bulunan siyonogenik β -glukozidazlardan amigdalin hidrolaz (AH1) ve prunasin hidrolazlarını (PH2 ve PH4) şifreleyen üç genin heterolog anlatımları

yaptırılmış, katalitik aktiviteleri çeşitli substratlarla gösterilmiştir. İlginç bir çalışmada, *M. esculenta*'nın glikozillenen linamaraz enzimini şifreleyen gen önce *E. coli*'de pGEX-2T glutatyon S-transferaz vektörü kullanılarak klonlanmış ve oluşan glikozillenmemiş heterolog proteinin bozuk katlandığı ve stabil olmadığı gözlenmiştir (Keresztessy ve diğ., 1996). Daha sonra aynı gen, *S. cerevisiae* SUC2 salgı sinyal dizisini içeren pYX243 vektörü ile *S. cerevisiae*'de klonlandığında ise aktif heterolog proteini elde edilebildiği bildirilmiştir (Keresztessy ve diğ., 2001).

2.7 *Schizosaccharomyces pombe*'nin ÖZELLİKLERİ VE HETEROLOG GEN ANLATIM SİSTEMLERİNDE KULLANIMI

Schizosaccharomyces pombe mantarların *Ascomycetes* sınıfında bulunan bir maya türüdür. İlk olarak Doğu Afrika millet birasından izole edilmiş ve 1893 yılında Lindner tarafından saf kültürü üretilip “pombe” adı verilmiştir. Hücreleri yaklaşık 7-15x4 µm boyutlarında ve uçlarda yuvarlaklaşan silindir biçiminde olan bu tür, eşeysiz olarak ortadan ikiye bölünme şeklinde meydana gelen mitoz bölünme yoluyla çoğaldığından “fission yeast” olarak adlandırılır (Mitchison, 1970).

Genetik çalışmaları 1950 yılında Leupold tarafından başlatılan *S. pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* ile birlikte en iyi tanımlanmış ve moleküler genetik ve hücre biyolojisi bakımından üzerinde en yoğun çalışılan maya türlerindedir. *S. pombe*, basit hücre ve genom yapısına sahip olmasının yanında, hücre çevriminin G1, S, G2 ve mitoz fazlarından oluşması (Russell ve Nurse, 1986), hücre bölünmesinin simetrik biçimde meydana gelmesi ve mitoz sırasında kromozomların belirgin bir şekilde yoğunlaşması (Stainer ve diğ., 1993), intron içeren gen sayısının fazla olması ve rRNA genlerinin organizasyonu (Singer ve Berg, 1991), intronların kesilmesini katalizleyen protein ve snRNA (U2) moleküllerinin yapısı (Zhao ve Lieberman 1995; Egel, 2004), sentromerlerindeki 40-100 kb boyutundaki tekrarlanan dizilerin varlığı (Stainer ve diğ., 1993), mitokondri genomunun küçük olması (Stankoff, 1992), gen anlatım aygıtında ürünün hücre içindeki taşınması, aktifleştirilmesi ve salgılanması (Zhao ve Lieberman 1995; Giga-Hama ve Kumagai, 1999) gibi özellikleri açısından memelilere büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu nedenlerle, daha çok gelişmiş yapılı ökaryotların hücre biyolojilerinin özellikle hücre çevrimi

mekanizmasının aydınlatılmasında (Egel, 2004) model sistem olarak kullanılmaktadır (Sunnerhagen, 2002).

İlk kez Beach ve Nurse (1981) tarafından *S. pombe* transformasyonunun başarılması ve hem klasik (Gutz ve diğ., 1974) hem de moleküler genetik (Moreno ve diğ., 1991) tekniklerin bu organizmaya kolaylıkla uygulanabilmesi, gelişmiş ökaryotik genlerin heterolog anlatımlarında, *S. pombe*'nin konak olarak kullanımını gündeme getirmiştir. Ayrıca, *S. pombe*'nin zengin bir mutant koleksiyonuna sahip olması ve *S. cerevisiae*'den izole edilen birçok genin, *S. pombe* mutantlarıyla komplementer olması (Munz ve diğ., 1989) sayesinde, önceleri *S. cerevisiae* için geliştirilen vektörler bazı değişikliklerle *S. pombe*'de kullanılabilmiştir. Günümüzde ise bu maya için geliştirilen genel ve ekspresyon amaçlı çok sayıda vektör bulunmaktadır (Siam ve diğ., 2004).

S. pombe, moleküler düzeyde hücre yapısının memeli hücre yapısına olan büyük benzerliği nedeniyle, daha çok memeli genlerinin heterolog anlatımı için kullanılmıştır (Giga-Hama ve Kumagai, 1997). *S. pombe*'de klonlanan bitki genlerinin sayısı henüz oldukça azdır. Bunlardan ilki *A. thaliana*'nın glukoz taşıyıcı proteininin (STP1) *S. pombe*'de heterolog anlatımına ilişkin bir çalışmadır (Sauer, 1990). Daha sonra, *A. thaliana*'dan izole edilen glutatyon sentetazı şifreleyen genin cDNA'sı glutatyon sentetaz aktivitesi kusurlu *S. pombe*'ye aktarılıp aktif ürün elde edilebilmiştir (Wang ve Oliver, 1996). Xia ve diğ. (1996) ise *A. thaliana*'nın hücre şeklinden ve hücre çevriminden sorumlu olan proteinleri *S. pombe*'nin pREP5N vektöründe kurulan bir *A. thaliana* cDNA kitaplığını kullanarak araştırmışlar ve buradaki *S. pombe* klonlarının yaklaşık % 30'unun heterolog anlatım yaptığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, *A. thaliana*'nın fitokelatin sentaz geni (CAD1) izole edilip bu gen bakımından kusurlu *S. pombe*'ye transfer edilmiş ve çeşitli metal iyonlarının varlığında enzimin aktivitesi belirlenmiştir (Ha ve diğ., 1999). Son olarak, soya fasulyesinden elde edilen üreaz aktivasyonuna katılan yardımcı proteinlerden UreF'yi şifreleyen gen *S. pombe*'de klonlanmış ve heterolog anlatımı yaptırılmıştır (Bacanamwo ve diğ., 2002).

S. pombe'de bulunan β -glukozidaz enzim(ler)ini şifreleyen gen(ler) işlevsel olarak ne biyokimyasal ne de moleküler düzeyde tanımlanmamıştır. Sadece *S. pombe*'nin dizilenmesi tamamlanmış olan genomunda (Wood ve diğ., 2002) 2. kromozomda bulunan "SPBC1683.04" geninin şifrelediği proteinin *Kluyveromyces marxianus*'un β -glukozidaz (BGLS_KLUMA) enzimi ile aralarında gösterdikleri % 46,3 benzerlikten giderek β -glukozidaz enzimini (EC 3.2.1.21) şifreleyen gen olduğu, öngörülmüştür (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Ayrıca, molekül ağırlığı 93 kD olması gerektiği belirlenen bu enzimin glikozid hidrolaz ailelerinden 3. aileye dahil olduğu kabul edilmektedir.

3 MALZEME VE YÖNTEM

3.1 GENLER, ORGANİZMALAR VE PLAZMİDLER

Çalışmada, *Sorghum bicolor* Moench (akdarı)'un *dhr1* (GenBank, U33817), *Zea mays* L. (mısır)'ın *glul1* (GenBank, U25157) ve *Sinapis alba* L. (beyaz hardal)'nın *myr1* (GenBank, NF00684423) genleri kullanıldı (Tablo 3.1). Bu genlerin cDNA'ları *E. coli* için geliştirilmiş bir klonlama vektörü olan pBluescript II SK(+) plazmidinde klonlanmış olarak Prof. Dr. Asım Esen ("Virginia Polytechnic Institute and State University") tarafından sağlandı. *dhr1*, *glul1* ve *myr1* genlerinin cDNA'larına ait nükleotid dizileri Şekil 3.1'de verildi.

dhr1

```

1 tgaattcgtg ggcaactcac cactcaagca gctcaaacct ttagccacta cacagcagct
61 atagcaagaa atggctctac ttcttgcttc tgccataaat cacactgccc atccagcagg
121 ccttagaagc catcccaata atgagagttt ctcaaggcac cacctatggt cttcaccaca
181 aaacatcagt aagcgaaggt ctaaccttag ctttaggcca cga↓gctcaaaa cgataagcag
241 tgagtctgct ggaatccaca ggctgagccc ctgggaaatc cctaggaggg actgggtccc
301 tcctagcttt ctctcgggtg cggccacttc agcataccaa attgaagggt cttggaatga
361 agatgggaag gggccaagca catgggatca cttctgccac aattttccgg aatggatagt
421 ggacaggagc aatggggatg ttgcagcgga ttcgtaccat atgtacgctg aggatgtcag
481 gttgctgaag gaaatgggca tggacgccta taggttctcc atctctggc ccagaatact
541 gccgaagggg acgctcgctg gaggtattaa cgagaaaggt gtcgagtact acaacaagtt
601 gatcgacttg ttgtagaga acggcataga gccatatata acaattttcc actgggacac
661 gcctcaagcg ctgtagacg cgtatggcgg cttcttagat gaggaggatt ataaagatta
721 cacagacttc gctaaagtgt gctttgaaaa gtttggttaag acggtgaaa actggttgac
781 cttaaatgag ccggagacat tctgttctgt ttctatgga actggagtcc ttgcccggg
841 gcgggtgctc ccgggagtaa gttgtgctg tccaactgga aactcactca gcgagccata
901 cattgttgcc cacaaccttc tccgagctca tgctgagact gttgatattt acaacaagta
961 tcacaaggt gcggacggcc gtatagggtc tgcgttaaat gtatttgccc gtgtgccata
1021 cacaaatacg ttcttgatc aacaggccca agaaaggtcc atggacaaat gcctaggatg
1081 gttcttgag ccagtgggtc gtggtgacta ccccttctcc atgagagtgt cagcgagga
1141 ccgggtgccc tacttcaaag aaaaagagca agagaagcta gttggttctt acgatatgat
1201 cgggataaac tactacacct caacgttctc caagcacatc gacctctcac caaacaactc
1261 gccagtgctc aacctgacg acgcctatgc cagtcaagaa accaaagggc ctgacgggaa
1321 tgctattggt cctcctactg gaaatgcgtg gatcaatatg taccctaaag gcctacacga
1381 tatccttatg accatgaaga acaagtatgg aaaccacca atgtacatca ctgagaacgg
1441 gatgggggac attgacaagg gcgatctacc caaaccagtt gcggtggaag accacacaag
1501 gctagattac atccagcgcc acctctcagt tcttaacaa tcaatagact tgggagcaga
1561 cgtgcgcggc tacttcgcgt ggtctctgct ggacaacttc gaatggtcca gcggctacac
1621 cgagcgtttc ggcatcgtct acgtcgatcg cgagaatggc tgcgagcgca ccatgaagcg
1681 atcagccagg tggttgagg agttcaatgg agctgccaag aaggttgaaa ataacaagat
1741 tcttacgccc gcggccagc ttaactaaatt aagtagaaca cgtactgctt ctggctgatg
1801 tatggtatgg tggcaactgt tcttctgtgc atgcctgtat ggtctgaaac gacatatttt
1861 actttgcacg gctagaggta gtggaggcat attctccagc gccgcagcta ataatgcaat
1921 gctctgttcc agttcagtgat tatcttttta ttatgcaata aaacgaagtg ntcgatttgc
1981 aat

```

glul

1 tagttctagc tagctagcaa agggggggaa aatggctccg cttctcgtg ctgccatgaa
 61 ccacgctgca gccatcctg gccttaggag ccacctagta ggaccaaca atgagagttt
 121 ctcacggcac cacctgccgt cttctctcc acagagcagc aagcgaaggt gtaaccttag
 181 ctttactaca cga↓tctgcaa gagtaggcag ccaaaatgga gtccaaatgt tgagcccctc
 241 ggaaatccca caaagggact ggttccctc tgacttcacc ttcggtgccc ccaacttcagc
 301 gtaccaaatt gaaggtgctt ggaatgaaga tggaaaggg gaaagcaact gggatcactt
 361 ctgccacaat catccgaaa ggatactgga cgggagcaat tcagacattg gagcgaattc
 421 gtatcatatg tacaaaacgg acgtcagatt gctcaaggaa atgggcatgg acgcatatag
 481 gttctctatc tcttggccca gaatactgcc gaaggggaacc aaagaaggag gtattaacc
 541 tgatggcatc aagtactaca gaaacctcat caacttggtg ctggaaaacg gcatagacc
 601 atatgtaaca atttccact gggatgtacc tcaagcacta gaagagaagt acggcggctt
 661 cctagataag agtcataaga gcattgtaga agattacacc tacttcgcta aggtgtgctt
 721 tgataacttc ggcgacaagg tgaagaattg gttgacctt aatgagcccc agacatttac
 781 ttccctttcc tacggaactg gggctcttgc cccaggctcg tgctcacctg gactagactg
 841 tgcctaccca actgggaatt cactcgtcga gccttacct gctggccata acattctctc
 901 agcccacgct gaggctggtt atctttcaa caagcattac aagcgcgacg acaccgcat
 961 agggcttgcg tttgacgtaa tgggtcgtgt gccatacggg acatcgttc tggataaaca
 1021 ggccgaagaa aggtcatggg acatcaacct aggatgggtc ttagagccag tggttcgtgg
 1081 tgactacccc ttctccatga gatcattggc tagggaacga ctacccttct tcaaggacga
 1141 gcagaaggag aagctcgccg gttcctataa catggtgggg ttaaactact acacttcagc
 1201 gttctccaaa aacatcgaca tctcaccaaa ctactcacct gtgctcaaca ctgacgacgc
 1261 ctacgccagt caagaagtta acgggctga cgggaagccc attggtcctc ctatgggaaa
 1321 tccatggatc tacatgtacc ctgagggctt gaaggatctc cttatgataa tgaagaacaa
 1381 atacggaaac ccacctatct acatcaccga gaacggaatc ggggatggtt ataccaaaga
 1441 gacacctcta cccatggagg ctgacctaaa tgactacaaa aggctagatt acacttcagc
 1501 ccacatcgct actcttaagg aatcaataga cttgggatca aatgtgcaag gctacttcgc
 1561 ttggtctctg ctggacaact ttgaatggtt tgccggcttc accgaacggt atggcattgt
 1621 ctacgtcgac cgcaacaata actgcacgcg ctacatgaag gagtctgcca agtgggtgaa
 1681 agagttcaac accgcgaaaa agcccagcaa gaagattctt acgccagctt aaaaatcggg
 1741 ggctcatga tgtgggtgca gccataaaa acctgtgtgg tttggaaccg aagatcttct
 1801 cgttttttcc tgccacgaga ggttctctgg aggcatactc tccagcaccg tggctaataa
 1861 cgggttgttc caattcagtc tggccttgtc atgcatgcaa taaataaagt gatgggttcc
 1921 cctggttcaa t

myr1

1 cttgcaaagc taggc↓gaaga aataacttgt caagagaatc tgccattcac atgtggtaac
 61 atcgaccggt taacagtag cagtttcgag aaagacttca ttttcggtgt tgcattctct
 121 gcttaccaga tcgaaggtac cataggtcgt ggacttaaca tttgggatgg cttcactcac
 181 cgatacccaa ataaatcagg acccgatcat ggaaatggag acactacttg tgactcattt
 241 tcatactggc agaaagatat agatgtgctg gatgaactca acgcaactgg ctacagattc
 301 tccattgctg ggtcaagaat cattccaaga ggaaagagga gcaggggagt aaataaggag
 361 ggtattaaat actaccacgg actcataaag ggctcatcg acaaggggat aacaccttct
 421 gttacgctct ttactggga cttctctcaa gtactacaag atgagtatga aggttttttg
 481 gacccccgga tcatagaaga tttcaaagat tatgctggtc atgtttcca agaatttggg
 541 gataaagtaa agtactggct caccgatcaac cagctctact cagtcctac gagaggctac
 601 ggatcagcat tagatgcacc tggtagatgt tctccaacgg ttgatccttc ctgttacgcc
 661 ggaaattctt caactgaacc ctatatcggt gcacatcatc agcttctcgc tcatgccaaa
 721 gtggctgatc tttacaggaa aaattactcg catcaaggag gtaagattgg acctgtgatg
 781 ataactagat ggttcttctc atataatgac actgatcgac acagcatagc tgcaaccgag
 841 aggatgaaag aattcttctt gggatgggtc atggggccgc taacaaatgg aacatacct
 941 caaatcatga tagacactgt gggatgaacgg ctccatcct tctctccaga agaatctaac
 1021 ctcgtaaagg gttcatatga tttcttgggt ctcaactatt atttcactca gtatgccaaa
 1081 ccaagtccca atcaagttga ttcgactaat cacactgcca tgatggagcgc agggcgaag
 1141 ctcacatata ttaatgcaag tggctattac atgggtccac tgttcgagga aaacaaagct
 1201 gacgaaacca aaaacatcta ttactacct aaaggcattt attccgtaat ggactacttc
 1261 aaaaacaagt attataacc tttaatctat gtcaccgaga atggaatcag taccctcggt
 1321 gatgaaaacc gtaccagtc tatgttggat tacacgcgga ttgatctatc ctgagctcat
 1381 ctctgttttc tcaataaagt catcaaggag aaggatgtca acgtgaaagg ataccttgcg
 1441 tgggctcttg gggataatta tgaattcaac aaaggattta ccgtcagatt cggactcagt
 1501 tacattgatt ggaataatgt caccgacaga gacctcaaaa agtctggaca atggatcag
 1561 agttcataag cctggcatc aagagccctc taaagaaaga ttttctcgc tccagcctca
 1621 cttcgagaa gaataagaag ttggcagatg cataaaatac ccaacccact cgagttactt
 1681 catcaagatc atcttcatgt cttctcttcc tatagatata acaggagggt ctacctacca
 1741 ctctataaat tctcaataaa gctcttgcga gactataatg aaattatcaa taaaaaaaaa g

Şekil 3.1: *dhr1*, *glul* ve *myr1* genlerinin cDNA'larının nükleotid dizileri. ↓: atg başlangıç kodunun eklendiği yerler.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan bitki β -glukozidaz enzimlerini şifreleyen genler ve ait oldukları bitki türleri

| Gen | Enzim | Organizma |
|-------------|---|------------------------------------|
| <i>dhr1</i> | Dihurinaz (p-hidroksi-(S) mandelonitril- β -D-glukoz hidrolaz, EC 3.2.1.21) (Dhr1) | <i>Sorghum bicolor</i> (akdarı) |
| <i>glu1</i> | DIMBOAG-hidrolaz (2-O- β -D-glukopranozil-4-hidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on hidrolaz, EC 3.2.1.21) (Glu1) | <i>Zea mays</i> (mısır) |
| <i>myr1</i> | Mirosinaz (β -D-tioglukozid hidrolaz, EC 3.2.3.1) (Myr1) | <i>Sinapis alba</i> (beyaz hardal) |

Bu genlerin (*dhr1*, *glu1* ve *myr1*) heterolog anlatımlarının analizi için, *Schizosaccharomyces pombe* Linder str. *liquifaciens* maya türünün *leu1-32* ve *ura4-D18* oksotrof ırkları konak organizma olarak kullanıldı. Çalışma süresince oluşturulan rekombinant plazmidlerin çoğaltılması amacıyla *Escherichia coli* DH10B ırkından yararlanıldı. *S. pombe* ve *E. coli* ırklarına ait özellikler Tablo 3. 2' de verildi.

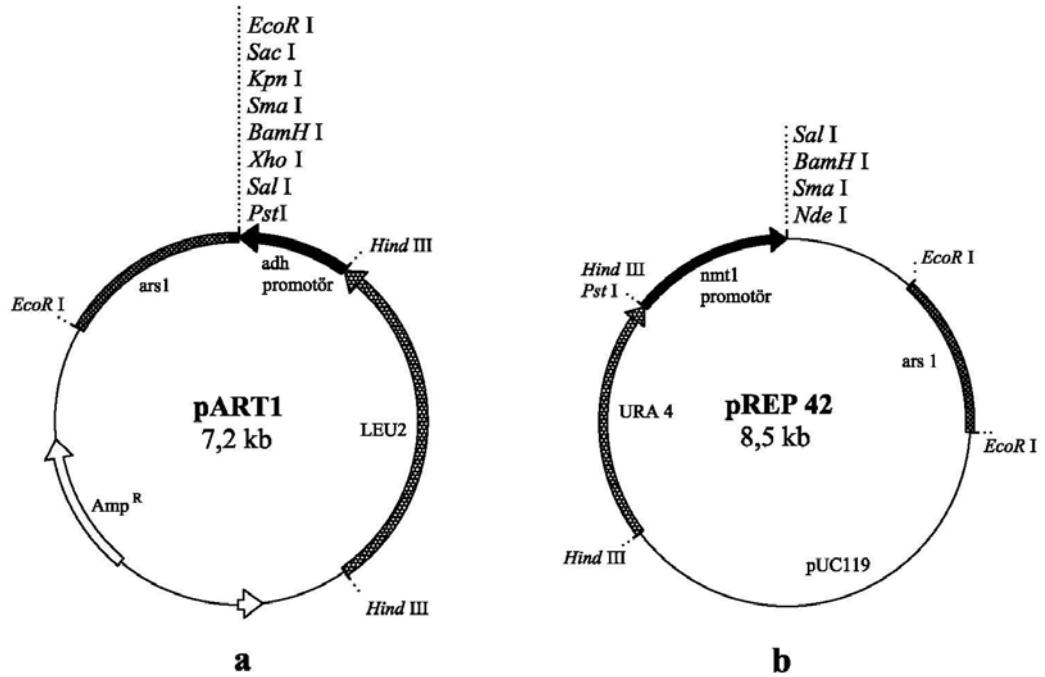
Tablo 3. 2: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri

| İrklar | Özellikleri |
|--------------------------|---|
| <i>S. pombe leu1-32</i> | İzopropilmalat dehidrogenaz enzimini şifreleyen gen nokta mutasyonlu (lösin oksotrofu) |
| <i>S. pombe ura4-D18</i> | Orotidin-5-fosfat (OMP) dekarboksilaz enzimini şifreleyen gen tam delesyonlu (urasil oksotrofu) |
| <i>E. coli</i> DH10B | F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZM15 lacX74 deoR recA1 endA1 ara139 D (ara, leu) 7697 galK l- rpsL nupG |

Bu üç genin, *S. pombe*'de klonlanmaları ve heterolog anlatımları için, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü koleksiyonunda bulunan, pART1 ve pREP42 *S. pombe* ekspresyon vektörleri kullanıldı. Bu vektörlerden pART1, sürekli anlatım yapan alkol dehidrogenaz enzimini (*adh1*) şifreleyen genin promotör dizisini içermektedir (McLeod, 1987). pREP42 ise tiamin biyosentezinde görev yapan ve tiamin ile anlatımı baskılanabilen *nmt1* geninin promotör dizisini taşımaktadır (Maundrell, 1993). Bu vektörlerin özellikleri Tablo 3.3' de, restriksiyon haritaları ise Şekil 3.2'de verildi.

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ekspresyon vektörlerinin özellikleri

| Adı | Replikasyon başlangıç noktası | Promotör | Maya işaret geni | Bakteri işaret geni | Özellikleri |
|--------|-------------------------------|--------------|------------------|---------------------|--------------------------------|
| pART1 | ars1 | <i>adh 1</i> | LEU 2 | amp ^R | sürekli anlatım yapar |
| pREP42 | ars1 | <i>nmt 1</i> | <i>ura 4</i> | amp ^R | anlatımı tiamin ile düzenlenir |



Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ekspresyon vektörlerinin restriksiyon haritaları. a) pART1; b) pREP42

pBluescript II SK (+) (Stratagene, 52325) *E. coli* klonlama plazmidinin klonlama bölgesinde laktozun parçalanmasında görev alan enzimi şifreleyen *lacZ* geni bulunmaktadır. Bu genin ürünü olan β -galaktozidaz enzimi, kromojenik bir bileşen olan X-gal'i hidrolizlediğinde mavi renk oluşumu gözlenmektedir. Klonlama çalışmalarında, pBluescript plazmidine bir gen sokulduğunda *lacZ* geni bozulduğundan, X-gal hidrolizlenememekte ve mavi renk ortaya çıkmamaktadır; buna göre, rekombinant pBluescript plazmidini içeren transformantlar, X-gal içeren seçici besi ortamlarında beyaz renkli koloniler oluşturmaktadırlar (Sambrook ve diğ., 1989).

3.2 ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

3.2.1 *Schizosaccharomyces pombe* Irklarının Üretilmesi

S. pombe ırklarının üretimi ve saklanması için Gutz ve diğ. (1974)'nin önerdiği yöntemler kullanıldı. Çalışmada kullanılan *S. pombe* ırkları, silika jel (çap: 0,2-0,5 mm) içinde, 4°C'da saklanan stoklardan alındı. YEA besi ortamı içeren petri kaplarında 30°C'da 2 gün üretilerek elde edilen kültür, Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı biçimde genotip kontrolü yapıldıktan sonra, eğri YEA besi ortamına ekildi ve çalışma süresince her ay

yenilenen kültür 4°C’da saklandı. *S. pombe* ırklarının üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamlarının içerikleri Tablo 3.4 ve Tablo 3.5’de verildi.

Tablo 3.4: *S. pombe*’nin üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamları

| <i>Adı</i> | <i>İçerik</i> | <i>Derişimi</i> |
|---|--|-----------------|
| Maya özütü sıvı besi ortamı (YEL) | “Bacto Yeast Extract” | 5 g/l |
| | Glukoz | 30 g/l |
| Maya özütü katı besi ortamı (YEA) | “Bacto Yeast Extract” | 5 g/l |
| | Glukoz | 30 g/l |
| | Agar | 20 g/l |
| Minimal sıvı besi ortamı (MML) | *A2 | 100 ml/l |
| | *3a | 1 ml/l |
| | *3b | 1 ml/l |
| | Glukoz | 10 g/l |
| | Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 1 g/l |
| Minimal katı besi ortamı (MMA) | *A2 | 100 ml/l |
| | *3a | 1 ml/l |
| | *3b | 1 ml/l |
| | Glukoz | 10 g/l |
| | Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 1 g/l |
| | Agar | 20 g/l |
| Otoklavda steril edildikten sonra lösin (100 µg/ml) ve urasil (50 µg/ml) eklendi | | |
| Sentetik minimal besi ortamı (YNB) | “Yeast nitrogen base” | % 0,1 (w/v) |
| | Glukoz | % 2 (w/v) |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | % 0,5 (w/v) |
| Zenginleştirilmiş sentetik besi ortamı (“Synthetic Complete Medium”-SCM) | “Yeast nitrogen base” (amino asitsiz) | % 0,17 (w/v) |
| | Glukoz | % 2 (w/v) |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | %0,5 (w/v) |
| Otoklavda steril edildikten sonra SCM besi ortamına adenin, arginin, histidin, metionin, triptofan ve urasil (20 µg/ml), izolösin, lizin ve tirozin (30 µg/ml), fenilalanin (50 µg/ml), lösin (60 µg/ml) ve valin (150 µg/ml) eklendi. | | |

*İçerikleri Tablo 3.5.’de verildi.

Tablo 3.5: MML ve MMA besi ortamlarında kullanılan stok çözeltiler

| Adı | İçerik | Derişim |
|-----|---|-------------|
| A1 | H ₃ BO ₄ | 5.4 g/l |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.4 g/l |
| | KCl | 1.0 g/l |
| | FeCl ₃ .6H ₂ O | 2.0 g/l |
| | MnSO ₄ .4H ₂ O | 5.3 g/l |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1.95 g/l |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 4 g/l |
| A2 | KH ₂ PO ₄ | 100 mg/l |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 50 mg/l |
| | NaCl | 10 mg/l |
| | CaCl ₂ .6H ₂ O | 15 mg/l |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 mg/l |
| | Stok A1 | 10 ml/l |
| 3a | Kalsiyum pantotenat | 10 mg/l |
| | Nikotinik asit | 100 mg/l |
| | Mezo-inositol | 100 mg/l |
| 3b | Biotin (%50 Etil alkol içinde hazırlandı) | 1 mg/100 ml |

3.2.2 *Escherichia coli* İrkının Üretilmesi

% 50 gliserin içinde -20°C’da saklanan *E. coli* stoklarından 5 µl alınıp 5 ml LB besi ortamına ekildi ve 1 gece çalkalamalı etüvde (37°C, 150 devir/dakika) üretilmesiyle elde edilen doymun kültürün Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı biçimde genotip kontrolü yapıldıktan sonra, eğri LBA besi ortamına ekimi yapıldı ve çalışma süresince her ay yenilenerek 4°C’da saklandı. *E. coli* ırkının üretiminde kullanılan besi ortamları Tablo 3.6’da verildi.

Tablo 3.6: *E. coli* ırkının üretiminde kullanılan besi ortamları

| Adı | İçerik | Derişim |
|---|-----------------------|-------------|
| “Luria Bertani” sıvı besi ortamı (LB) | “Bacto tryptone” | % 1 (w/v) |
| | “Bacto yeast extract” | % 0,5 (w/v) |
| | NaCl | % 1 (w/v) |
| “Luria Bertani” katı besi ortamı (LBA) | “Bacto tryptone” | % 1 (w/v) |
| | “Bacto yeast extract” | % 0,5 (w/v) |
| | NaCl | % 1 (w/v) |
| | Agar | % 1,5 (w/v) |
| Bütün maddeler karıştırıldıktan sonra 5 N NaOH ile pH 7,2’ye ayarlandıktan sonra agar eklendi. Otoklavda sterilizasyondan sonra LB ve LBA’ya gerektiğinde ampisilin (50 µg/ml) eklendi. | | |
| SOB besi ortamı | “Bacto tryptone” | % 2 (w/v) |
| | “Bacto yeast extract” | % 0,5 (w/v) |
| | NaCl | 10 mM |
| | KCl | 25 mM |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | MgSO ₄ | 10 mM |

Tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da (1 atmosferde) 20 dakika tutularak, besi ortamlarına eklenen metabolitler 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden (Millipore millex-GS) geçirilerek steril edildi.

3.2.3 Genotip Kontrolları

S. pombe ırklarının YEA besi ortamındaki 2 günlük kültürlerinden tek koloni elde etmek için azaltma yöntemiyle YEA içeren petri kaplarına ekim yapıldı. Petrilere üreyen kolonilerden rastgele seçilen birkaçı, oksotrofluk bakımından genotip kontrolü için, hem MMA hem de gerekli metaboliti (*S. pombe leu1-32* ırkı için lösin, *S. pombe ura4-D18* ırkı için urasil) içeren MMA petri kaplarına ekildi. 2 gün 30°C'da inkübe edildikten sonra üreme durumuna göre, istenilen genotipi taşıdığı doğrulanan koloniler eğri YEA'ya ekilerek 2 günlük kültürler elde edildi ve 4°C'da saklandı.

E. coli DH10B kolonilerinden ampisilin içeren ve içermeyen LBA besi ortamlarına ekim yapıldı. Sadece ampisilin içermeyen LBA besi ortamında üreyebilen kolonilerden alınarak eğri LBA'ya ekim yapıldı ve kültür 4°C'da saklandı.

3.3 *S. pombe* IRKLARINDA ÜREMENİN İZLENMESİ

Üremeleri izlenecek ırklara ait hücreler önce eğri YEA'da 30°C'da 2 gece üremeye bırakıldı. Kültürdeki hücreler 5 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildikten sonra 50 ml YNB içeren 250 ml'lik erlenlere 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. Çalkalamalı etüvde (30°C, 180 devir/dakika) üremeye bırakıldı.

Hücre sayısındaki artış 530 nm dalga boyundaki ışık kullanılarak bulanıklığın ölçülmesiyle saptandı. Ölçümler sırasında sterilitenin korunması ve besi ortamının hacminin azalmaması için yanlarına cam tüpler eklenmiş olan özel erlenler kullanıldı. Kültürlerdeki üreme fotoelektrik kolorimetrede (Erma) belirli zaman aralıklarında alınan optik yoğunluk (OD) değerleriyle izlendi. OD değerleri, hücre/ml cinsine çevrilerek zamana bağlı hücre/ml artışını gösteren grafik (üreme eğrisi) çıkarıldı. OD değerlerini hücre/ml cinsine çevirmek için aynı ırka ait kültürün mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımaların 530 nm dalga boyunda ölçülen OD değerlerine göre çizilen standart grafikten yararlanıldı.

3.4 TRANSFORMASYON

3.4.1 Süper Yeterli *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Bakteri transformasyonunda konak olarak kullanılan *E.coli* DH10B hücreleri Inoue ve diğ. (1990)'ne göre yüksek derecede (süper) yeterli duruma getirilerek hazırlandı. Bu amaçla, *E. coli* DH10B ırkına ait tek koloniden 5 ml LB'ye ekim yapıldı ve 37°C'da 1 gece 150 devir/dakikada üremeye bırakıldı. Elde edilen taze kültürden 0,5-1 ml alınarak 250 ml SOB besi ortamı (Tablo 3.6) içeren 2 litrelik erlene ekim yapıldı. 18°C'da, 200 devir/dakika hızda hücre yoğunluğu $A_{600} \cong 0.6$ olacak şekilde 2 gece üretildi. Kültür 10 dakika buz içinde tutulduktan sonra 500 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 1.500 xg'de 10 dakika 4°C'da santrifüjlendi. Çökelti 80 ml soğuk TB tamponunda (10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) yavaşça çözündürüldü ve 10 dakika buz içinde tutulduktan sonra 1.500 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 20 ml TB tamponunda tekrar çözündürüldü ve son konsantrasyonu % 7 olacak şekilde DMSO eklenerek yavaş şekilde karıştırıldı ve buz içinde 10 dakika bırakıldı. Daha sonra 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µl'lik kısımlar halinde bölünerek sıvı azot içerisinde donduruldu. Bu şekilde hücreler, transformasyona uğrama yeteneklerini kaybetmeden, -70°C'da yaklaşık 6 ay saklandı.

3.4.2 *E. coli* Transformasyonu

E. coli transformasyonunda ısı şoku tekniği kullanıldı (Hoffman ve Winston, 1987). Bu amaçla, -70°C'da saklanan 100 µl süper yeterli *E. coli* DH10B hücreleri buzda çözündürüldü. 100 µl hücre süspansiyonu üzerine 0,1-1 µg DNA içeren 1-10 µl plazmid çözültisi eklenerek 30 dakika buz içerisinde bekletildi. 90 saniye 42°C'da ısı şoku etkisinde bırakıldıktan sonra 2-3 dakika buz içinde tutuldu. Karışımın üzerine 0,5 ml LB besi ortamı eklenip 1 saat, 37°C'da 150 devir/dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak, 100-200 µl karışım, seçici besi ortamına ekilerek 37°C'da 1 gece inkübasyona bırakıldı. Seçici besi ortamı olarak, pART1 ve pREP42 için 50 mg/l ampisilin içeren LBA, pBluescript için 50 mg/l ampisilin, 4 mg/l X-gal, % 10 IPTG içeren LBA besi ortamları kullanıldı.

3.4.3 *S. pombe* Transformasyonu

S. pombe transformasyonu hem lityum asetat hem de elektroporasyon yöntemleri ile yapıldı.

Lityum asetat yöntemi Warskowsky ve Miller (1994)'in tekniğine göre uygulandı. Konak hücreler (*S. pombe leu1-32* ve *ura4 D-18* ırkları) 30°C'da 3 gün YEA'da üretildikten sonra, 5 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildi; 100 ml'lik YNB besi ortamına 10^6 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve çalkalamalı etüvde (30°C'da, 180 devir/dakika) üretildi. Logaritmik fazın ortalarındaki (*S. pombe leu1-32* için 16, *S. pombe ura4-D18* için 18 saatlik) kültürlerden alınan hücreler 7.500 xg 'de 4°C'da 10 dakika santrifüjlenerek toplandı. Çökelti üzerine 1 ml steril saf su eklenerek mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 μ l LiAc/EDTA tamponu (100 mM LiAc, 1 mM EDTA, pH 4,9) eklendi ve 6.000 xg 'de 10 dakika santrifüjlendi. Çökelti 50 μ l LiAc/EDTA tamponunda çözündürüldü ve üzerine % 40 PEG çözeltisinden [100 mM LiAc, 1 mM EDTA, % 40 (w/v) PEG] 300 μ l eklenerek iyice karıştırıldı. Karışımdaki hücrelere (toplam $\sim 10^9$ hücre) 1-2 μ g DNA içeren 1-10 μ l plazmid çözeltisi eklendi. 30 dakika süreyle 30°C'da bekletildikten sonra, 15 dakika 42°C'lık ısı şoku uygulandı. Hücreler santrifüjleme ile toplandı ve 1 ml TE (Tablo 3.9) içinde çözündürüldü. Süspansiyondan, seçici besi ortamlarına 200 μ l/petri olacak şekilde ekim yapıldı ve 30°C'da, yaklaşık 7 gün üremeye bırakıldı.

Elektroporasyon yöntemi ise Forsburg (2004) tarafından verilen protokole göre uygulandı. Konak olarak kullanılan *S. pombe* hücreleri 30°C'da, 3 gün YEA'da üretildikten sonra, 5 ml steril saf su ile süspansiyon haline getirildi ve gerekli metabolitler eklenmiş 100 ml MML besi ortamına 10^6 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve çalkalamalı etüvde (30°C'da, 180 devir/dakika) 10^7 hücre/ml (veya $OD_{595} = 0,5-1$) elde edilinceye kadar üretildi. Hücreler 4.000 xg 'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenerek toplandı. Hücre çökeltisi soğuk steril saf su ile yıkandıktan sonra 20 ml 1 M sorbitol ile tekrar süspansiyon haline getirilip 3.000 xg 'de 5 dakika 4°C'da santrifüjlenerek toplandı ve $1-5 \times 10^9$ hücre/ml olacak şekilde 1 M sorbitol ile süspansiyon haline getirildi. Buradan alınan 40 μ l hücre süspansiyonu, önceden soğutulmuş 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine yaklaşık 100 ng

plazmid içeren 1-10 µl DNA çözeltisi eklendi ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra 2 mm'lik elektroporasyon küvetine ("Eppendorf", 4307-000-593) aktarıldı ve elektroporator (Eppendorf Multiporator) içinde prokaryot modunda (1,5 kW, 25 µF) transformasyon gerçekleştirildi. Elektroporasyonun hemen ardından küvet içindeki transformasyon karışımına 0,6-0,9 ml 1 M soğuk sorbitol eklenerek, önceden soğutulmuş 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve buradan alınan 0,2 ml karışım, MMA içeren petrilere ekildi ve 30°C' da, 4-6 gün inkübasyona bırakıldı.

Transformasyon etkinliği aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (Sambrook ve diğ., 1989).

$$\text{Koloni Sayısı} / \mu\text{g DNA} = \frac{\text{Toplam Koloni Sayısı} \times \text{Sulandırım Faktörü}}{\text{Transformasyonda kullanılan Plazmid DNA Miktarı} (\mu\text{g})}$$

3.5 KOLONİ PCR TEKNİĞİ

Hem *E. coli*, hem de *S. pombe* transformasyonundan sonra oluşan transformant kolonilerde rekombinant plazmidin bulunup bulunmadığını hızlı ve kolay bir biçimde saptamak için koloni PCR (zincirleme polimeraz reaksiyonu) tekniğinden yararlanıldı (Amberg, 2004a). Bu amaçla, bir kürdan yardımı ile her bir koloniden alınan örnek 10 µl steril saf suyla karıştırıldı. Hücre süspansiyonunun 5 µl'si koloni PCR'nunda kalıp DNA olarak kullanıldı. Geri kalan 5 µl'sinin üzerine ampisilin içeren 1 ml LB eklenerek 37°C'da 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplam 50 µl hacimde bir araya getirilen koloni PCR karışımlarını oluşturan bileşenler ve derişimleri Tablo 3.7'de verildi. Çok sayıda transformant koloniyi tarayabilmek için, koloni PCR karışımlarında kalıp DNA olarak, 5 ayrı transformanta ait 2'şer µl hücre süspansiyonu (toplam 10 µl hücre süspansiyonu) kullanıldı. PCR işlemi "FPROG O5D Techne Progene" PCR makinesinde Tablo 3.8'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Örnekler, % 1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez işleminin ardından UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 3.7: Koloni PCR’da kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri.

| Reaksiyon Bileşenleri | Kullanılan Miktar (µl) | Derişimi |
|--------------------------------|------------------------|----------|
| Steril saf su | 26,6 | - |
| 10X ExTaq™ tamponu | 5 | 1X |
| dNTP karışımı (10 mM) | 4 | 0,8 mM |
| Primer 1* (10 µM) | 2 | 0,4 µM |
| Primer 2* (10 µM) | 2 | 0,4 µM |
| TaKaRa ExTaq™ 5 U/µl | 0,4 | 0,04 µM |
| Kalıp DNA (hücre süspansiyonu) | 10 | - |

**dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerine özgü oligonükleotid primer çiftleri Tablo 3.12’de verildi.

Tablo 3.8: Koloni PCR koşulları

| Döngüler | | Sıcaklık | Süre |
|----------|--------------|---|-----------|
| 1 | Başlama | 94°C | 2 dakika |
| 35 | Denatürasyon | 94°C | 45 saniye |
| | Bağlanma | <i>dhr1</i> 55°C <i>glu1</i> ve <i>myr1</i> 44°C | 1 dakika |
| | Uzama | 72°C | 2 dakika |
| 1 | Tamamlanma | 72°C | 5 dakika |
| | Saklama | 4°C | |

Rekombinant plazmid içeren *E. coli* transformantları Bölüm 3.2.2’de, *S. pombe* transformantları ise Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde üretilerek uygun koşullarda saklandı.

3.6 DNA İZOLASYONU

3.6.1 *E. coli* Transformantlarından Plazmid İzolasyonu

Sambrook ve diğ. (1989)’nin önerdiği yönteme göre uygulanan plazmid izolasyonu için, transformant kolonilerden 50 mg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besi ortamına ekim yapıldı. 37°C’da, 150 devir/dakika çalkalamalı etüvde, bir gece üretildi. Hücreler 6.000 *xg*’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve 100 µl soğuk lizis tamponunda (A çözeltisi) süspansiyon haline getirildi (Tablo 3.9). 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 µl alkali SDS tamponu (B çözeltisi) eklendi; tekrar 5 dakika oda sıcaklığında tutularak hücrelerin parçalanması ve genomik DNA’nın denatürasyonu sağlandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan lizat üzerine 4°C’da soğutulmuş 150 µl 5 M potasyum asetat (C çözeltisi) eklendi ve 5 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 20.000 *xg*’de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjleme yapıldı. Alınan üst sıvıya

1 ml saf etil alkol eklenerek 20.000 xg'de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenerek plazmid DNA'sı çöktürüldü. Çökelti 150 µl TE tamponunda çözündürüldü; son hacim 20 µg/ml olacak şekilde RNaz eklenerek 37°C'da 1 saat bekletildi. Toplam hacim 400 µl'ye tamamlanıp fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) özütlemesi yapılarak saflaştırıldı. Hacmi belirlenerek temiz bir tüpe aktarılan üst faza, saf etil alkolde hazırlanmış 0,2 M potasyum asetat çözeltisinden 2,2 hacim olacak şekilde eklendi ve -20°C'da 1 saat bekletildi. Santrifüjleme (49.000 xg, 20 dakika, 4°C) sonucunda elde edilen plazmid çökeltisi 50 µl steril saf suda çözündürülerek miktarı belirlendikten sonra, gerektiğinde kullanılmak üzere -20°C'da saklandı. Kullanılan çözeltiler Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.9: *E. coli* transformantlarından plazmid izolasyonunda kullanılan çözeltiler

| Adı | İçerik | Derişim/Miktar |
|---|---------------------------------|----------------|
| A çözeltisi (lisis tamponu) (pH 8,0) | Glukoz | 50 mM |
| | Tris-HCL | 25 mM |
| | EDTA | 10 mM |
| B çözeltisi (alkali SDS) | NaOH | 0,2 N |
| | SDS | % 1 (w / v) |
| C çözeltisi | KAc | 29,442 g |
| | glasiyel asetik asit | 11,5 ml |
| | Saf su ile 100 ml'ye tamamlandı | |
| RNaz | RNaz | 20 mg / ml |
| | Tris-HCl | 10 mM |
| | NaCl | 15 mM |
| TE tamponu (pH 8,0) | Tris-HCl (pH 8,0) | 10 mM |
| | EDTA (pH 8,0) | 1 mM |

3.6.2 *S. pombe* Transformantlarından Plazmid İzolasyonu

S. pombe'den plazmid izolasyonunda Hoffman ve Winston (1987) tarafından önerilen yöntem uygulandı. *S. pombe* transformantlarından alınan hücreler 10 ml SCM besi ortamında, çalkalamalı etüvde (30°C, 180 devir/dakika) 2 gece üretildi. Kültür, 6.000 xg'de 10 dakika santrifüjlenip hücreler çöktüldü. Çökelti üzerine 200 µl STET tamponu ve % 97'lik nitrik asitte yıkanmış 0,3 g cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) eklenerek tüp karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldı. Kaynar su içinde 5 dakika bırakıldıktan sonra, buz içinde soğutuldu. 1.000 xg'de 4°C'da 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvının 100 µl'si alınıp üzerine 50 µl 7,5 M amonyum asetat eklendi. -20°C'da, 1 saat tutulduktan sonra 12.000 xg'de 4°C'da 5 dakika santrifüjlendi; üst sıvı hacmi belirlenerek temiz mikrosantrifüj tüpüne alındıktan sonra üzerine iki hacim soğuk saf etil alkol eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

49.000 *xg*'de 4°C'da 15 dakika santrifüjlenerek plazmid DNA'sı çöktürüldü ve çökelti 20 µl steril saf su içerisinde çözündürüldü. Plazmid DNA'ları *E. coli*'ye transfer edilip transformantlardan plazmid DNA'larının izole edilmesiyle (Bölüm 3.6.1) geri kazanıldı.

3.6.3 *S. Pombe* Transformantlarından Genomik DNA İzolasyonu

S. pombe'den genomik DNA izolasyonunda Amberg (2004b) tarafından önerilen yöntem uygulandı. *S. pombe* transformantlarından alınan hücreler 100 ml MML besi ortamında, çalkalamalı etüvde (30°C, 180 devir/dakika) 2 gece üretildi. Elde edilen kültürün, 4.000 *xg*'de 5 dakika santrifüjlenmesiyle toplanan hücreler 5 ml saf suda süspansiyon haline getirildi ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Aynı koşullarda santrifüjlenerek çöktürülen hücrelerin üzerine 200 µl G çözeltisi, 200 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ve % 97'lik nitrik asitte yıkanmış 0,3 g cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) eklenerek 2 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 200 µl TE eklendi ve 20.000 *xg*'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı alındı ve üzerine 1 ml etil alkol eklendikten sonra 20.000 *xg*'de 5 dakika santrifüjlendi. Çökelti 0,4 ml TE de süspansiyon haline getirildi, üzerine son hacimde 30 µg/ml olacak şekilde RNaz eklenerek 5 dakika 37°C' da inkübasyona bırakıldı. Bu karışımın üzerine 18 µl 5 M amonyum asetat ve 1 ml saf etil alkol eklenerek 1 saat -20°C' da bırakıldı. 27.000 *xg*'de 10 dakika, 4°C' da santrifüjleme yapılarak genomik DNA çöktürüldü. Çökelti, 25-50 µl saf suda çözündürüldü ve -20°C'da saklandı.

Tablo 3.10: *S. pombe* transformantlarından plazmid ve genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

| Adı | İçerik | Derişim |
|--|--------------------|-----------|
| Sukroz-tris EDTA-triton (STET) tamponu, (pH 8,0) | Sukroz | % 8 (w/v) |
| | Tris-HCl, (pH 8,0) | 50 mM |
| | EDTA, (pH 8,0) | 50 mM |
| | Triton X-100 | % 5 (v/v) |
| G çözeltisi | Triton X-100 | % 2 (w/v) |
| | SDS | % 1 (w/v) |
| | NaCl | 0,1 M |
| | Tris-HCl, (pH 8,0) | 0,01 M |
| | EDTA | 1 mM |

3.7 DNA DERİŞİMİNİN VE SAFLIĞININ BELİRLENMESİ

Çalışmada kullanılan DNA'ların derişimlerinin belirlenmesi ve saflıklarının kontrolü için spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Steril saf su ile 1/200 oranında sulandırılan DNA örneklerinin spektrofotometrede (Shimadzu UV 160) 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri ölçüldü. Derişimleri, aşağıda gösterilen formüle göre hesaplandı (Sambrook ve diğ., 1989).

$$\text{DNA derişimi (mg/ml)} = \text{OD}_{260} \times 50^* \times \text{sulandırım faktörü}$$

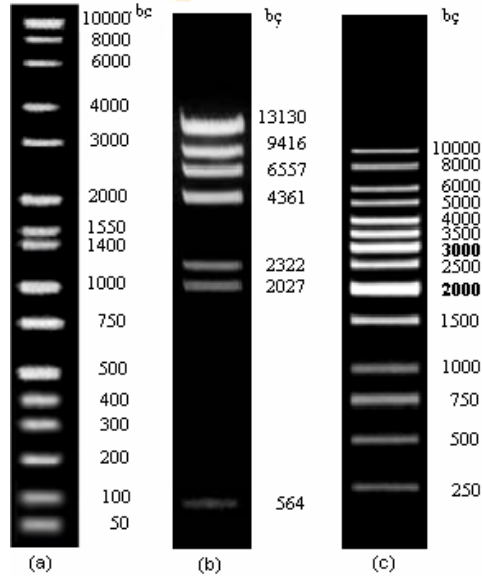
(*Çift zincirli DNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon katsayısı)

DNA molekülünün saflığı, 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine oranından ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) belirlendi. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1,6 ile 1,8 arasındadır.

3.8 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Çalışmada kullanılan DNA'ların varlıkları ve boyutları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Agaroz jel, çalışılan DNA'ların boyutlarına göre, 1X TAE tamponu içinde % 0,8-1 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Agaroz kaynatma yolu ile eritildikten sonra elle tutulabilir sıcaklığa (55-50°C) geldiğinde içerisine son derişimi 0,5 µg/ml olacak şekilde Etidyum Bromid (10 mg/ml) eklendi ve yatay jel kasetine döküldü. Polimerizasyon olduktan sonra jel, içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. 0,1 hacim elektroforez yükleme çözeltisi eklenen DNA örnekleri ile standart DNA'lar (Şekil 3.3) agaroz jelin ceplerine uygulandı. Elektroforez işlemi, yatay elektroforez aletinde (E-C Minicell EC 370M) yaklaşık 1-1,5 saat, 80V/40mA akımda yürütülerek gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.11'de verildi.



Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan standart DNA'ların % 1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.
a) "Hi-Lo DNA", b) "Lambda DNA/Hind III", c) "1 kb DNA Ladder"

Tablo 3.11: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

| Adı | İçerik | Derişim/Miktar |
|---|----------------------|----------------|
| Tris-asetat tamponu (TAE, pH 8,0) (50X stok) | Trizma | 242 g |
| | Glasiyel asetik asit | 57,1 ml |
| | 0,5 M EDTA (pH 8,0) | 100 ml |
| Elektroforez yükleme çözeltilisi (Bromofenol mavisi) | Üre | 4 M |
| | EDTA | 0,025 M |
| | Sukroz | % 60 |
| | Bromofenol mavisi | % 0,025 |
| | Ksilen | % 0,025 |

Elektroforez sonunda jelde 302 nm UV ışık altında gözlenen DNA bantlarının değerlendirmesi, polaroid kameralı transillüminatörde (Camag Reprostar II) yapıldı.

3.9 DNA'LARIN JELDEN GERİ ALINMASI

Bu amaçla kullanılan jeller Bölüm 3.8'de verilen şekilde, sadece EB eklenmeksizin, hazırlandı.

Elektroforez sonunda, jel içinde 20 ml 1X TAE bulunan bir kabın içine alındı. Üzerine 2 µl 10.000X SYBR ("Gold Nucleic Acid Gel Strain", S-11494) boyası eklendi. Boyanın ışık ile temasını engellemek için kabın üzeri alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 50 devir/dakika hızda 20 dakika çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra, 300 nm dalga boyunda, FOTO/UV 450 transillüminatörde (FotoDyne, Inc., Hortland, WI)

belirlenen istenen uzunluktaki DNA parçalarının ayrıldığı jel bölgesi kesilerek temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

DNA'nın geri kazanılması için jel özütleme kiti ("QIAEX II", QIAGEN, 20021) kullanıldı. Mikrosantrifüj tüpünün içine jelin ağırlığının 3 katı kadar hacimde QX1 ve 10 µl QIAEXII konuldu. Her 2 dakikada bir karıştırılarak 10 dakika 50°C'da tutuldu. 30 saniye 24.000 *xg*'de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Çökelti üzerine 500 µl QX1 eklenip tüp karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 24.000 *xg*'de 30 saniye santrifüjleme yapıldı. Bunun ardından, 2 kere 500 µl PE çözeltisi ile yıkandı ve çözelti 24.000 *xg*'de santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Çökelti 10-15 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve üzerine 20 µl steril saf su eklenip her 2 dakikada bir karıştırılarak 10 dakika 50°C'da tutulduktan sonra 30 saniye 24.000 *xg*'de santrifüj edildi. Suda çözünen DNA temiz bir tüpe alındı ve buradan 1 µl alınarak % 1'lik agaroz jelde varlığı ve göreceli olarak derişimi belirlendi. DNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

3.10 GENLERİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI

S. bicolor'a ait *dhr1*, *Z. mays*'a ait *glul* ve *S. alba*'ya ait *myr1* genlerinin cDNA'ları Tablo 3.12'de verilen oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltıldı. Bu genlere özgü primerlerin tasarımında iki noktaya dikkat edildi. (1) her üç genin proksimal uçlarını oluşturan ileri primerlerine, genlerin okuma çerçevelerini sağlamak üzere, başlangıç kodonu (ATG) eklendi. (2) primerlere, klonlanan genlerin içinde tanıma noktası olmayan ancak pART1 ve pREP42 plazmidlerinin klonlama bölgesinde birer tanıma bölgesi bulunan restriksiyon enzimleri tanıma dizisi eklendi.

PCR' de, 5'-PO₄ grubu içermeyen küt uçlu PCR ürünü oluşturan, *Pfu* DNA polimeraz enzimi (Stratagene, 600252) kullanıldı.

Tablo 3.12: Çalışmada kullanılan β -glukozidaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan oligonükleotid primer çiftleri.

| Pirimerin Adı | Nükleotid Dizisi | Restriksiyon Endonükleazı | İleri/Geri | Kaynak |
|------------------|---|---------------------------|------------|--------------------------|
| Dhr1-SBF | 5'-CCG GAT CCA TGG CTC AAA CGA TAA GCA GTG AG-3' | <i>Bam</i> H I | İleri | <i>S. bicolor</i> |
| Dhr1-SBR | 5'-AAA GGA TCC TTA GTT AAG CTG GCC GGC CG-3' | <i>Bam</i> H I | Geri | <i>S. bicolor</i> |
| Glu1-SBF | 5'-TTT CTC GAG ATG TCT GCA AGA GTA GGC AGC C-3' | <i>Xho</i> I | İleri | <i>Z. mays</i> |
| Glu1-SBR | 5'-CCG GAT CCT TAA GCT GGC GTA AGA ATC-3' | <i>Bam</i> H I | Geri | <i>Z. mays</i> |
| Myr1-SBF | 5'-CAC TCG AGA TGG AAG AAA TAA CTT GTC AAG AG-3' | <i>Xho</i> I | İleri | <i>S. alba</i> |
| Myr1-SBR | 5'-TGG GAT CCT TAT GCA TCT GCC AAC TTC-3' | <i>Bam</i> H I | Geri | <i>S. alba</i> |
| β -glu-119 | 5'-CGA AGT TGT CCA GCA GAG ACC A-3' | - | Geri | universal |
| β -glu-120 | 5'-TGG TTC GTG GTG ACT ACC C-3' | - | İleri | universal |
| PREP-SBF | 5'-TTT CAA TCT CAT TCT CAC TTT CTG-3' | - | İleri | <i>nmt1</i> promotörü |
| T7 Primeri | 5'-GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA C-3' | - | İleri | T7 promotörü |

PCR bileşenleri, 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içinde, toplam 50 μ l'lik reaksiyon hacminde, Tablo 3.13'de belirtildiği biçimde bir araya getirildi ve PCR Tablo 3.8'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.13: PCR'de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri.

| Reaksiyon bileşenleri | Kullanılan Miktar (μ l) | Derişimi |
|--|------------------------------|----------------|
| Steril saf su | 35 | - |
| 10X <i>Pfu</i> reaksiyon tamponu | 5 | 1X |
| dNTP karışımı (10 mM) | 4 | 0,8 mM |
| Primer 1* (10 μ M) | 2 | 0,4 μ M |
| Primer 2* (10 μ M) | 2 | 0,4 μ M |
| <i>Pfu</i> DNA polimeraz 10 U/ μ l | 1 | 0,2 U/ μ l |
| Kalıp DNA (0,5 μ g/ μ l) | 2 | 20 ng/ μ l |

**dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerine özgü oligonükleotid primer çiftleri Tablo 3.12'de verildi.

PCR döngülerindeki yüksek sıcaklık uygulamalarında meydana gelebilecek buharlaşmayı önlemek amacıyla PCR karışımının üzerine 30 μ l mineral yağ eklendi.

Genlerin PCR ile çoğaltılan ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez işleminin ardından fotoğrafları çekildi. PCR ürünleri, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere agaroz jelden geri kazanıldı (Bölüm 3.9), derişimleri belirlendi ve 10-20 ng/ μ l olacak şekilde sulandırılarak -20°C' da saklandı.

3.11 REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN OLUŞTURULMASI

S. pombe ekspresyon sistemine aktarılmak üzere, *dhr1*, *glu1* ve *myr1* PCR ürünleri, ya doğrudan ya da uygun restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra pART1 ve pREP42 ekspresyon vektörlerinde klonlandı.

3.11.1 Vektörlerin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

E. coli klonlama plazmidi pBluescript ile *S. pombe* ekspresyon plazmidleri pART1 ve pREP42, uygun restriksiyon endonükleazları ile tekli ya da ikili kesilerek doğrusal duruma getirildiler. Bu amaçla, toplam 100-200 µl'lik hacimde, 2 µg plazmid DNA'sı, 1 µl enzim(ler) ve 1X reaksiyon tamponu olacak şekilde hazırlanan karışımlar *Sma* I için 30°C'da, *Bam*H I ve *Sal* I için 37°C'da bir gece inkübasyona bırakıldılar.

Ertesi gün reaksiyon karışımları, EB içermeyen % 0,8'lik agaroz jele uygulandı. Doğrusal hale getirilmiş plazmidler jelden geri alındı ve derişimleri belirlenip 20 ng/µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra -20°C'da saklandı.

3.11.2 pART1-*dhr1* ve pREP42-*dhr1* Rekombinantlarının Oluşturulması

*Bam*H I restriksiyon enzimi ile kesilen *dhr1* PCR ürünü ile pART1 ve pREP42 plazmidlerinin, gen/vektör oranları 10/1 olacak şekilde karışımları yapıldı. Bu ligasyon karışımları, 2 µl *dhr1* (20 ng/µl) (*Bam*H I/*Bam*H I), 1 µl plazmid DNA'sı (20 ng/µl) [pART1 (*Bam*H I/*Bam*H I) veya pREP42 (*Bam*H I/*Bam*H I)], 1 µl T4 DNA ligaz (5 U/µl) (MBI-Fermentase, EP0061) ve 2 µl 10X reaksiyon tamponu ve 14 µl steril saf su ile bir araya getirilerek hazırlandı. Toplam 20 µl'lik reaksiyon karışımları PCR makinesinde, 5 dakika 15°C'da, 5 dakika 25°C'da olacak şekilde 1 gece ligasyona bırakıldı.

3.11.3 pART1-*glu1* Rekombinantının Oluşturulması

glu1 geninin küt uçlu PCR ürünü ile küt uçlu pBluescript plazmidi, gen/vektör oranı 10/1 olacak şekilde ligasyona bırakıldı. Ligasyon karışımı, 10 µl *glu1* DNA'sı (10 ng/µl), 1 µl doğrusal pBluescript DNA'sı (20 ng/µl) (*Sma* I/*Sma* I), 1µl T4 DNA Ligaz (5 U/µl), 2 µl 10X reaksiyon tamponu ve 6 µl steril saf su ile 20 µl'ye

tamamlanarak hazırlandı. Karışım PCR makinesinde, 5 dakika 15°C’da, 5 dakika 25°C’da olacak şekilde 1 gece ligasyona bırakıldı.

Ligasyon karışımı *E.coli* DH10B’ye transfer edildi (Bölüm 3.4.2). Seçici besi ortamında oluşan koloniler arasından rastgele seçilen beyaz renkli koloniler Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde plazmidde özel T7 ve gene özel Glu1-SBR primerleri kullanılarak, Tablo 3.8’de belirtilen PCR koşullarında, koloni PCR tekniği ile tarandı. *glu1* genini içeren pBluscript-*glu1/E.coli* DH10B transformantlarından plazmid izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.6.1). Elde edilen rekombinant plazmid DNA’ları *Xho* I ve *Bam*H I restriksiyon endonükleazları ile kesilerek *glu1* cDNA’sı çıkarıldı. Bu amaçla, hazırlanan 100 µl’lik reaksiyon karışımına; son hacimde 1 µg pBluscript-*glu1* DNA’sı, 1 µl *Xho* I (10 U/µl) ve 1 µl *Bam*H I (10 U/µl), 10 µl 10X “buffer O⁺” olacak şekilde bileşenler eklendi ve 1 gece 37°C’da inkübasyona bırakıldı. Kesim ürünleri EB içermeyen agaroz jele uygulandı. *glu1* cDNA (*Xho* I/*Bam*H I)’sı Bölüm 3.9’da belirtildiği biçimde, jelden geri alındı ve derişimi belirlenerek 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra -20°C’da saklandı.

glu1 cDNA (*Xho* I/*Bam*H I)’sı doğrusal duruma getirilmiş pART1 (*Sal* I/*Bam*H I) plazmidine sokuldu. Bu amaçla, gen/vektör oranı, 5/1 olacak şekilde toplam 20 µl’lik hacimde, 0,5 µl *glu1* (50 ng/µl) (*Xho* I/*Bam*H I) geni, 1 µl pART1 (20 ng/µl) (*Sal* I/*Bam*H I), 1 µl T4 DNA ligaz, 2 µl 10X reaksiyon tamponu ve 15,5 µl steril saf su eklenerek hazırlanan reaksiyon karışımı PCR makinesinde, 5 dakika 15°C’da, 5 dakika 25°C’da olacak şekilde 1 gece ligasyona bırakıldı.

3.11.4 pREP42-*glu1* Rekombinantının Oluşturulması

glu1’e ait küt uçlu PCR ürünü ve küt uçlu pREP42 plazmidi gen/vektör oranı 10/1 olacak şekilde karıştırıldı. 20 µl’lik reaksiyon karışımı, 4 µl *glu1* (20 ng/µl), 3 µl pREP42 (15 ng/µl) (*Sma* I/*Sma* I), 1 µl T4 DNA ligaz, 2 µl 10X reaksiyon tamponu ve 10 µl steril saf su bir araya getirilerek hazırlanan reaksiyon karışımı, PCR makinesinde, 5 dakika 15°C’da, 5 dakika 25°C’da olacak şekilde 1 gece ligasyona bırakıldı.

3.11.5 pART1-*myr1* ve pREP42-*myr1* Rekombinantlarının Oluşturulması

myr1'e ait PCR ürünü, *Sma* I ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş pART1 ve pREP42 plazmidleri ile gen/vektör oranı, yaklaşık 10/1 olacak şekilde ayrı ayrı ligasyona bırakıldılar. Bu amaçla, 3 µl *myr1* (20 ng/µl), 2 µl plazmid DNA'sı (15 ng/µl) [pART1 (*Sma* I/*Sma* I) veya pREP42 (*Sma* I/*Sma* I)], 1 µl T4 DNA ligaz ve 2 µl 10X reaksiyon tamponu ile hazırlanan reaksiyon karışımı, PCR makinesinde, 5 dakika 15°C'da, 5 dakika 25°C'da olacak şekilde 1 gece ligasyona bırakıldı.

Bütün ligasyon karışımları *E.coli* DH10B'ye transfer edildi (Bölüm 3.4.2). Seçici besi ortamlarında belirlenen transformantlardan rekombinant plazmidi içerenler, Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde koloni PCR tekniği ile taranarak belirlendikten sonra *E. coli* transformantlarından plazmid izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.6.1).

3.12 RNA İZOLASYONU VE ANALİZLERİ

S. pombe transformantlarından ve konak olarak kullanılan ırklarından total RNA izole edilip spektrofotometrik ve elektroforetik olarak kontrolleri yapıldı. RNA'lar Northern melezleme ve ters transkriptaz-PCR ile analiz edildi.

3.12.1 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu "EMBO Practical Course, Molecular Genetics with the Fission Yeast *S. pombe*" (1996) kitabında önerilen yöntemle göre yapıldı. İzolasyon sırasında kullanılan tüm plastik ve cam eşyalar % 0,1'lik DEPC'li sudan geçirildi. Ayrıca, çözeltiler DEPC'li su ile hazırlandı ve otoklavlanarak steril edildi. RNA izolasyonu ve analizi sırasında kullanılan tüm tampon ve çözeltiler Tablo 3.14'de verildi.

Tablo 3.14: RNA izolasyonunda ve analizinde kullanılan tampon ve çözeltiler

| <i>Adı</i> | <i>İçerik</i> | <i>Derişim/Miktar</i> |
|---------------------------------------|--|-----------------------|
| 20 X SSC çözeltisi | NaCl | 200 mM |
| | Na-sitrat | 300 mM |
| Melezleme standart çözeltisi | SSC | 5 X |
| | SDS | % 0,002 (w/v) |
| | Na lorilsarkosin | % 0,1 (w/v) |
| | Bloklama reaktifi stok çözeltisi* | % 0,1 (w/v) |
| Yıkama çözeltisi-I | SSC | 2 X |
| | SDS | % 0,1 (w/v) |
| Yıkama çözeltisi-II | SSC | 0,1 X |
| | SDS | % 0,1 (w/v) |
| Tampon-I (pH 7,5) | Maleik asit | 150 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| Tampon-II (pH 9,5) | Bloklama reaktifi stok çözeltisi | % 1 (v/v) |
| Tampon-III (pH 9,5) | Tris-HCl (pH 7,5) | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |
| | MgCl ₂ | 50 mM |
| Denatürasyon çözeltisi | NaOH | 50 mM |
| | NaCl | 10 mM |
| Nötralizasyon çözeltisi | Tris-HCl (pH 7,5) | 100 mM |
| NBT çözeltisi | “Nitroblue tetrazolium” tuzu | 75 mg/ml |
| | Dimetilformamid | % 70 (v/v) |
| X-fosfat çözeltisi | 5-bromo-4-kloro-3-indolid fosfat toluidium | 50 mg/ml |
| | Dimetilformamid | % 100 (v/v) |
| LETS tamponu (pH 7,4) | LiCl | 0,1 M |
| | EDTA | 0,01 M |
| | Tris-HCl (pH 7,5) | 0,01 M |
| | SDS | % 0,02 (w/v) |
| 10 X MOPS tamponu (pH 7,0) | MOPS | 41,86 g |
| | NaOAc-3H ₂ O | 6,80 g |
| | EDTA | 0,01 M |
| RNA jele yükleme çözeltisi (SB) | 10X MOPS | 100 µl |
| | Formaldehit | 175 µl |
| | Formamid | 500 µl |
| Elektroforez yürütme tamponu (pH 7,0) | 10X MOPS | 30 ml/300 ml |
| | 0,2 M formaldehit | 5,4 ml/300 ml |
| | Saf su | 264,6 ml/300 ml |

*Kit içerisinde bulunan bloklama reaktifi % 10 olacak şekilde tampon-I' in içinde çözündürülerek hazırlandı.

Çalışmada elde edilen *S. pombe* klonlarından total RNA izolasyonu, bu klonların içerdikleri vektörlere göre üretilen kültürlerinden yapıldı. Konstitütif promotörü olan pART1 rekombinant plazmidlerini içeren transformantların ve konak *S.pombe leu1-32* ırkının MMA besi ortamında üreyen tek kolonilerinden 5 ml MML besi ortamına ekim yapıldı ve çalkalamalı etüvde (180 devir/dakika, 30°C'da) bir gece üretildi. Daha sonra 0,5 ml hücre süspansiyonu, 30 ml MML besi ortamında aynı şartlarda üretildi. Tiamin ile düzenlenebilir promotörü olan pREP42 rekombinant plazmidlerini içeren transformantların ve konak *S.pombe ura4-D18* ırkının ise tiamin (5 mM/l) içeren

MMA petrilerindeki tek kolonilerinden, 5 ml YEL besi ortamına ekim yapılarak çalkalamalı etüvde (180 devir/dakika, 30°C'da) bir gece üretildi. Ertesi gün 0,5 ml'lik hücre süspansiyonu 10 ml YEL besi ortamına aktarılıp aynı şartlarda bir gece üretildi. 10 ml'lik kültür, 3.000 *xg*'de 5 dakika, 4°C'da santrifüj edilerek toplandı. Hücreler, 10 ml soğuk steril saf su ile iki kez yıkandı ve son olarak 5 ml MML besi ortamında sulandırılarak 0,5 ml hücre süspansiyonu, 30 ml MML besi ortamına aktarıldı ve çalkalamalı etüvde (180 devir/dakika, 30°C'da) bir gece üretildi.

30 ml'lik *S. pombe* kültürü 40 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpün üzerine buz katıldıktan sonra 12.000 *xg*'de 0°C'da 10 dakika santrifüjlendi. Çökelti 500 µl soğuk LETS tamponunda çözündürüldü ve % 97'lik nitrik asitte yıkanmış 2,2 g cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) eklendikten sonra 0,3 ml LETS tamponu ile doyurulmuş soğuk fenol ve 0,3 ml soğuk kloroform eklenerek, 30 saniye tüp karıştırıcıda tutulup, 30 saniye buzda dinlendirilerek toplam 3 dakika karıştırıldı. Daha sonra, üzerine 0,5 ml soğuk LETS tamponu eklendi ve yeniden karıştırılarak 12.000 *xg*'de 10 dakika, 0°C'da santrifüjlendi. Üst sıvı hacmi belirlenerek temiz bir tüpe alındı ve üzerine eşit hacim TE tamponu ile doyurulmuş fenol:kloroform (1:1) eklendi ve 49.000 *xg*'de 0°C'da 5 dakika santrifüjlendi. Ara faz yok oluncaya kadar fenol:kloroform özütlemesi işlemine devam edildi. Hacmi belirlenerek alınan üst faz üzerine, eşit hacim kloroform eklenerek, 12.000 *xg*'de 0°C'da 2 dakika santrifüjleme yapıldı. Üst faz, hacmi belirlenerek temiz tüpe alındı ve üzerine 1/10 oranında 5 M LiCl eklendi, tüp alt üst edilerek karıştırıldı, -20°C'da gece boyunca bırakıldı. Ertesi gün 49.000 *xg*'de 20 dakika, 0°C'da santrifüjlenerek elde edilen RNA çökeltisi buz içinde tutularak kurutulduktan sonra, 100 µl steril saf su içinde çözündürüldü ve derişimi belirlendi. Küçük hacimlere bölünüp -70°C'da saklandı.

3.12.2 RNA Derişiminin Belirlenmesi

Hücrelerden izole edilen total RNA derişiminin belirlenmesi için steril saf su ile 1/100 oranında sulandırılan örneklerin 260 nm dalga boyundaki absorpsiyonları spektrofotometrede (Shimadzu UV 160) ölçüldü. RNA derişimi aşağıda gösterilen formüle göre hesaplandı (Sambrook ve diğ., 1989). RNA örneğinin saflığı OD_{260}/OD_{280} değeri hesaplanarak saptandı.

RNA konsantrasyonu (mg/ml)=OD₂₆₀ x 40* x sulandırım faktörü

(* RNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon katsayısı)

3.12.3 RNA'nın Elektroforetik Analizi

İzole edilen total RNA örnekleri % 1,2'lik formaldehitli agaroz jelde yürütüldü. Jelin içeriği aşağıda verildi (Sambrook ve diğ., 1989).

| | |
|--------|---------|
| Agaroz | 0.4 g |
| 10X | 3 ml |
| MOPS | 24,6 ml |
| saf su | 24,6 ml |

(mikrodalga fırında 2 dakika tutularak eritildikten sonra, yaklaşık 50°C'ye kadar

soğutulup aşağıdaki çözeltiler eklendi)

| | |
|-------------|--------|
| Formaldehit | 2,4 ml |
| EB | 1 µl |

Formaldehitli agaroz jel, yatay jel kasetine döküldü ve polimerize olduktan sonra içinde elektroforez yürütme tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Jele uygulanacak RNA örnekleri önce, denatürasyonlarının sağlanması için her 10 µl RNA örneği üzerine 15 µl SB çözeltisi eklenip 55°C'da 10 dakika tutuldu. Daha sonra üzerlerine 5 µl bromofenol mavisi çözeltisi eklendi. Hazırlanan 30 µl'lik karışımlar ve 10 µl RNA standardı (RNA Ladder, High Range; Fermentas, SM0421) (Şekil 3.4), formaldehitli agaroz jelin ceplerine yüklendi. Elektroforez işlemi, yatay elektroforez aletinde (E-C Minicell EC 370M) yaklaşık 4-5 saat, 60 Volt, 30 mA akımda yürütülerek gerçekleştirildi.



Şekil 3.4: Standart RNA ("RNA Ladder")'nin % 1'lik formaldehitli agaroz jeldeki görünümü.

3.12.4 Northern Melezleme

S. pombe transformantlarından elde edilen total RNA içerisinde *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerine ait mRNA moleküllerinin varlığının araştırılmasında Northern melezleme tekniğinden yararlanıldı. Melezleme, “DIG DNA Labelling and Detection Kit” (Boehringer Mannheim, 1093657) kullanımıyla gerçekleştirildi.

3.12.4.1 Probuñ İşaretlenmesi

Prob olarak, PCR yöntemi ile çoğaltılan *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin cDNA bölgeleri kullanıldı. Bu genlerin her biri jelden geri alındıktan sonra (Bölüm 3.9), üretici firmanın önerdiği yöntem izlenerek prob haline getirildi. Bu amaçla, 0,5-3,0 µg saf DNA parçaları 100°C’deki su banyosunda 10 dakika tutulduktan hemen sonra buz içine alınıp üzerine 5 µl heksanükleotid karışımı, 5 µl dNTP karışımı, 2,5 µl Klenow enzimi eklendi; toplam hacim saf su ile 50 µl’ye tamamlanıp karıştırıldı ve 1 gece 37°C’da su banyosunda bırakıldı. Ertesi gün, reaksiyonu durdurmak için karışımın üzerine 5 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0), DNA’yı çöktürmek için 6,25 µl 4 M LiCl ve 200 µl saf etil alkol eklendikten sonra iyice karıştırıldı ve -70°C’da 30 dakika bekletildi. Daha sonra 4°C’da 20.000 .xg’de 20 dakika santrifüjlendi. Çökelti kurutulup 50 µl TE’de çözündürüldü ve -20°C’da saklandı.

3.12.4.2 Melezleme

Northern melezleme için membrana aktarımda, RNA örneklerinin yürütüldüğü jel 10 dakikada bir yenilenerek ikişer defa DEPC’li su ile yıkandı. Daha sonra denatürasyon çözeltisinde iki defa 15’er dakika çalkalandı. Denatürasyon çözeltisi döküldü. Jel saf sudan geçirilerek üzerine nötralizasyon çözeltisi eklendi ve iki defa 15’er dakika oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Jel ile aynı boyutta kesilen naylon membran DEPC’li suda ıslatıldıktan sonra 10X SSC’den geçirildi.

Jeldeki RNA’ların naylon membrana aktarımda, kapiler sistem oluşturan bir düzenekten yararlanıldı. İçinde 30 ml 10X SSC çözelti bulunan yaklaşık 15x10x6 cm boyutlarındaki bir kabın içine ters olarak daha küçük (yaklaşık 7x5x3 cm boyutlarında) bir kap yerleştirildi. Küçük kabın üzerine, önce iki ucu çözeltiye degecek biçimde jelin boyutundan daha uzun kesilmiş 5-6 adet Whatmann kağıdı, yükleme yapılan yüzey alta gelecek şekilde jel, jel boyutunda kesilen naylon membran (Sigma, N1264), 6-7 adet kuru Whatmann ve emici kağıtlar, bir cam plaka ve yaklaşık 1 kg ağırlık yerleştirilip

4°C’da bir gece bırakıldı. Ertesi gün naylon membran ters çevrilerek filtre kağıdı üzerine alındı. Oda sıcaklığında kurutuldu ve daha sonra 80°C’da 15 dakika bekletildi.

-20°C’da tutulan işaretlenmiş prob 100°C’deki kaynar suda 10 dakika bırakıldı ve üzerine ön melezleme (prehibridizasyon) çözeltisinden 20 ml eklendi. Jeldeki RNA’nın aktarıldığı membran melezleme tüpüne alındı ve tüpe prob içeren ön melezleme çözeltisinden eklendi. 50°C’da bir gece melezleme etüvünde (Hybaid Midi Dual 14) bırakıldı. Ertesi gün prob çözeltisi döküldü ve membranlar yıkama çözeltisi-I içerisinde iki kez 5’er dakika oda sıcaklığında yıkandı. Daha sonra tüpe yıkama çözeltisi-II eklenerek membran melezleme etüvünde 68°C’da 15 dakika bırakıldı.

Melezlemenin oluşumu, problemlerin yapısında bulunan DIG-11-dUTP’lerin taşıdığı digoksinin ile alkalik fosfataz enzime bağlı anti-digoksinin antikoru arasındaki immunolojik reaksiyona göre belirlendi. Meydana gelen kompleksteki alkalik fosfatazın substratlarının eklenmesiyle membran üzerindeki renk oluşumu gözlenerek RNA’nın varlığı saptandı.

Yıkama işlemlerinin ardından membran, kurumadan temiz bir kaba alınarak üzerini örtecek şekilde tampon-I eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tampon-1 uzaklaştırıldı. Daha sonra tampon-II etkisinde oda sıcaklığında 50 devir/dakikada 30 dakika karıştırılarak bekletildi ve tampon-II döküldü. Bu arada, anti-DIG alkalik fosfataz, tampon-II ile 1/5.000 oranında sulandırıldı ve membran bu çözelti içinde oda sıcaklığında 50 devir/dakika hızda 2 saat bekletildi. Membranlar temiz bir kaba alındı ve tampon-I ile 50 devir/dakika hızda 15’er dakika iki kez yıkanarak bağlanmayan antikolar uzaklaştırıldı. Daha sonra membran tampon-III’de 2 dakika tutuldu. Bu arada, 200 µl NBT/BCTP 10 ml tampon-III içerisine eklenerek renk tayini çözeltisi hazırlandı ve membran bunun içerisine alındı. Çalkalama yapmadan karanlıkta bir gece oda sıcaklığında bırakıldı. Melezlemenin belirtisi olan renk görünümü ortaya çıktıktan sonra membran tampon-I ile iki kez yıkandı ve kurutulmuş olarak saklandı. Kullanılan tüm tampon ve çözeltiler Tablo 3.14’de verildi.

3.12.5 Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR)

S. pombe transformantlarından izole edilen total RNA'da, genlerin (*dhr1*, *glul* ve *myr1*) transkripsiyon ürünleri olan mRNA'lar "Access RT-PCR system" kiti (Promega, A1250) kullanılarak ters transkriptaz-PCR (RT-PCR) ile analiz edildi. Bu teknikte, Albayrak ve Gözükırmızı (2001)'nin RT-PCR kitinden yararlanarak geliştirdikleri yöntem uygulandı .

RT-PCR işlemi için bileşenler, 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplam 25 µl hacimde bir araya getirildi (Tablo 3.15). mRNA moleküllerinin AMVRT enzimi tarafından ters transkripsiyonu ile cDNA sentezi ve genlere ait cDNA moleküllerinin Tfl DNA polimeraz enzimi tarafından PCR ile çoğaltılması aynı tüpte, Tablo 3.16'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. RT-PCR örnekleri % 1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez işleminin ardından UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 3.15: RT-PCR'de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve derişimleri.

| Reaksiyon Bileşenleri | Kullanılan Miktar (µl) | Derişimi |
|---------------------------------|------------------------|-------------|
| Steril saf su | 13 | - |
| 5XAMV/Tfl reaksiyon tamponu | 5 | 1X |
| dNTP karışımı (100 mM) | 0,5 | 2mM |
| Primer1* (10 µM) | 0,5 | 0,2 µM |
| Primer2* (10µM) | 0,5 | 0,2 µM |
| Primer oligo dT15 (0,625 µg/µl) | 1 | 0,025 µg/µl |
| MgSO4 (25 mM) | 2,5 | 2,5 mM |
| AMVRT (5 U/µl) | 0,5 | 0,1 U/µl |
| Tfl DNA polimeraz (5 U/µl) | 0,5 | 0,1 U/µl |
| Total RNA (1 µg/µl) | 1 | 40 ng/µl |

**dhr1*, *glul* ve *myr1* genlerine özgü oligonükleotid primer çiftleri Tablo 3.12'de verildi.

Tablo 3.16: RT-PCR koşulları

| Döngüler | | Sıcaklık | Süre |
|----------|--|----------|-----------|
| 1 | AMV-RT enziminin ters transkriptaz aktivitesi ile cDNA zincirinin sentezi | 48°C | 45 dakika |
| 1 | AMV-RT enziminin aktivitesini durdurmak ve RNA/cDNA/primer üçlü kompleksinin denatürasyonu | 94°C | 2 dakika |
| | Denatürasyon | 94°C' | 30 saniye |
| 40 | Bağlanma <i>dhr1</i> | 55°C | 1 dakika |
| | <i>glul</i> ve <i>myr1</i> | 44°C | |
| | Uzama | 68°C | 2 dakika |
| 1 | Tamamlanma | 68°C | 7 dakika |
| | Saklama | 4°C | |

3.13 PROTEİN İZOLASYONU VE ANALİZLERİ

S. pombe transformantlarında ve konak olarak kullanılan ırklarda nitel ve nicel protein analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle *S. pombe* hücrelerinden protein özütleri hazırlanarak protein derişimleri belirlendi. Daha sonra bu örneklere denatüre koşullarda elektroforetik ayırım uygulandı ve ayrıca enzim aktivitesine bakıldı.

3.13.1 *S. pombe* Hücrelerinden Ham Özüt Hazırlanması

Konstitütif promotörü olan pART1 transformantlarının ve konağın MMA petriyelerindeki tek kolonilerinden 5 ml YEL besi ortamına ekim yapıldı ve 30°C’da, 180 devir/dakika, bir gece üretildi. Buradan 10⁶ hücre/ml olacak şekilde 1 litrelik MML besi ortamına ekildi ve 30°C’ da, 180 devir/dakika hızda 1 gece üretildi. Tiamin ile düzenlenebilir promotörü olan pREP42 transformantlarının ve konağın tiamin (5 mM/l) içeren MMA petriyelerindeki tek kolonilerinden 5 ml YEL besi ortamına ekim yapıldı. Bir gece 30°C’da, 180 devir/dakikada üretildi. Kültür 200 ml YEL besi ortamına aktarıldı ve aynı koşullarda bir gece üretildi. 200 ml’lik kültür 4.000 xg’de 5 dakika, 4°C’ da santrifüj edildi. Hücre çökeltisi iki defa soğuk su ile yıkandı ve son olarak 20 ml MML besi ortamında sulandırıldı. Buradan alınan 2 ml hücre kültürü 1 litre MML besi ortamına aktarıldı ve çalkalamalı etüvde 30°C’ da, 180 devir/dakika hızda bir gece üretildi.

Kültürdeki hücreler 4°C’da, 4.000 xg santrifüjlenerek toplandı. Hücrelerin yaş ağırlıkları belirlendi. Hücre çeperlerini enzimatik olarak parçalamak için Wright ve diğ., (1986)’nin uyguladığı yöntemden yararlanıldı. 5 g hücre çökeltisi, 40 ml 100 mM fosfat-50 mM sitrat tamponunda (pH 5,6) yıkandıktan sonra 20 ml A çözeltisinde süspansiyon haline getirildi ve 30°C’ da 30-45 dakika inkübasyona bırakıldı. Kültürdeki hücrelerin % 80-90’ının sferoblast haline döndüğü ışık mikroskopunda kontrol edildi ve sferoblastlar 4.000 xg’de 4°C’ da 5 dakika santrifüjlenerek toplandı.

Sferoblastları parçalamak için Stratagene firmasının “ESP[®]Yeast Protein Expression and Purification System” (251600) kitinde önerilen teknik uygulandı. Buna göre, sferoblast haline gelen hücre çökeltisi üzerine, 7 ml sorbitol tamponu ve asitte yıkanmış

5 g cam boncuk (çap: 0,45–0,50 mm) eklenerek yaklaşık 5 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Hücre lizatı 35.000 xg 'de 15 dakika santrifüj edildi. Suda çözünebilen proteinlerin bulunduğu üst sıvı (ham özüt) $-70^{\circ}C$ ' da saklandı. Ham özüt elde etmede kullanılan çözelti ve tampon Tablo 3.17'de verildi.

Ham özüt, % 35-55 aseton uygulaması ile kısmen saflaştırıldı (Çiçek ve Esen, 1998a). 6,5 ml protein çözeltisi üzerine 3,5 ml aseton eklenerek $4^{\circ}C$ 'da 35.000 xg 'de 15 dakika santrifüjlendi. Buradan 4,5 ml üst sıvı alınarak üzerine 5,5 ml aseton eklenip yeniden $4^{\circ}C$ 'da 35.000 xg 'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen çökelti, kurutulduktan sonra 0,5-1 ml saf suda çözündürülerek $-20^{\circ}C$ ' da saklandı.

Tablo 3.17: Protein özütlemesinde kullanılan çözelti ve tampon

| <i>Adı</i> | <i>İçerik</i> | <i>Derişim</i> |
|------------------|---|----------------|
| A çözeltisi | 50 mM sitrat-100 mM fosfat tamponu (pH 5,6) | 20 mM |
| | Sorbitol | 1,2 M |
| | “Novozym” (NovoSP234, NovoBioLabs) | 10 mg/ml |
| Sorbitol tamponu | Sorbitol | 0,3 M |
| | NaCl | 0,1 M |
| | MgCl ₂ | 5 mM |
| | Tris-HCl (pH 7,4) | 10 mM |
| | PMSF | 1 mM |

3.13.2 Protein Derişiminin Belirlenmesi

Hazırlanan protein özütlerinin derişimlerinin belirlenmesinde, duyarlılık sınırı 0,1-1 mg/ml protein olan, geliştirilmiş Lowry yöntemi kullanıldı (Waterborg, 2002). Fosfomolibdotungstik asitin (Folin-Ciocalteau belirteci, Sigma F-9252) tirozin kalıntılarıyla reaksiyona girerek mavi renk oluşturması temeline dayanan bu yöntemin uygulanması için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

- Su içinde hazırlanmış % 2 (w/v) Na₂CO₃
- Su içinde hazırlanmış % 1 (w/v) CuSO₄.5H₂O
- Su içinde hazırlanmış % 2 (w/v) sodyum potasyum tartarat
- 100 hacim A:1 hacim B:1 hacim C çözeltisi karışımı
- 1 hacim Folin-Ciocalteau belirteci: 1 hacim steril saf su karışımı

Duyarlılık sınırlarına uygun olarak hazırlanmış sığır serum albumini (BSA) standartlarından (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ve 2000 µg/ml), 10 kez sulandırılan protein özütlerinden ve protein özütlerinin hazırlandığı tampondan (kör örnek) 0,1'er ml alındı. Üzerlerine 0,1 ml 2 N NaOH eklenerek 100°C'lik su banyosunda 10 dakika tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen karışımların üzerine 1'er ml taze hazırlanan D çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Son olarak, tüp karıştırıcıda hızla karıştırılan karışımların üzerine 0,1 ml E belirteci eklendi ve 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda spektrofotometrede 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Standart protein çözeltileri kullanılarak çizilen standart grafik yardımıyla, özütlerdeki protein derişimleri belirlendi.

3.13.3 Proteinlerin Denatüre Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ile Analizi

S. pombe transformantlarından izole edilen protein özütleri denatüre jel elektrofözezi (Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi, SDS-PAGE) ile nitel olarak analiz edildi. SDS-PAGE'de Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Buna göre, Tablo 3.18'de verilen A, B, C, D ve E çözeltileri Tablo 3.19'daki oranlarda karıştırılarak elde edilen karışımlar, boyutları 82x100x2 mm (mini) ve 165x180x5 mm (maks) kasetlere, 1 mm kalınlığında kesikli jel olacak şekilde döküldü. Bunun için önce ayırma jeli hazırlanıp kasetlere döküldükten hemen sonra jel yüzeyi suyla doyurulmuş n-BuOH çözeltisi ile kapatıldı. Polimerizasyondan sonra n-BuOH dökülüp yüzey saf su ile yıkandı. Ayırma jelinin üzerine, yükleme jeli hazırlanıp döküldükten sonra tarak yerleştirildi. Polimerizasyon tamamlandığında, mini jel içinde 1X H çözeltisi bulunan mini jel elektroföze aletine (Hoefler® Mighty Small SE 245), maks) jel için de 1X H çözeltisi bulunan maks) jel elektroföze aletine (EC 175 Adjustable Vertical Gel System) yerleştirildi.

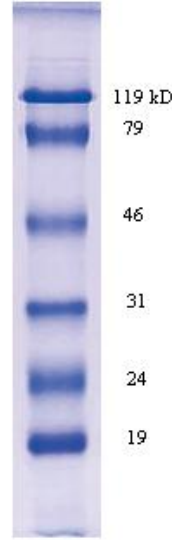
Tablo 3.18: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler

| <i>Adı</i> | <i>İçerik</i> | <i>Derişim</i> |
|--|-------------------|----------------|
| (A) Monomer (Akrilamid/Bis) Çözeltisi | Akrilamid | % 30 (w/v) |
| | Bis | % 2,7 (w/v) |
| (B) 4X Ayırma Jeli Tamponu (pH 8,8) | Trizma-Base | 1,5 M |
| (C) 4X Yükleme jeli tamponu (pH 6.8) | Trizma-Base | 0,5 M |
| (D) SDS | SDS | % 10 (w/v) |
| (E) Amonyum Persülfat | APS | % 10 (w/v) |
| (F) Ayırma Jeli Yüzey Çözeltisi (pH 8,8) | Trizma-Base | 0,375 M |
| | SDS | % 0,1 (w/v) |
| (G) 2X Örnek Uygulama Tamponu (pH 6,08) | Trizma-Base | 0,125 M |
| | SDS | % 4(w/v) |
| | Gliserol | % 20 (v/v) |
| | 2-Merkaptoetanol | % 10 (v/v) |
| | Bromofenol Mavisi | 0,001 g/ml |
| (H) 5X Tank Tamponu (pH 8,3) | Trizma-Base | 0,025 M |
| | Glisin | 0,192 M |
| | SDS | % 0,1 (w/v) |

Tablo 3.19: SDS-PAGE'de kullanılan jellerin içeriği

| <i>Ayırma jeli (% 12 Akrilamid)</i> | <i>Yükleme jeli (% 5 Akrilamid)</i> |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 12 ml A çözeltisi | 1,6 ml A çözeltisi |
| 7,5 ml B çözeltisi | 2,5 ml C çözeltisi |
| 0,3 ml D çözeltisi | 0,1 ml D çözeltisi |
| 10,2 ml saf su | 5 µl TEMED |
| 15 µl TEMED | |
| Karışımın havası alındı | |
| 300 µl E çözeltisi | 100 µl E çözeltisi |
| Jel kasetine döküldü | |

Uygulanacak örnekler ve Sigma'nın MW-70L Molekül Ağırlığı Belirleme Kitindeki standart proteinler G tamponu ile 1/1 oranında karıştırılarak, 2-3 dakika 100°C'da tutularak denatüre edildi ve oda sıcaklığına getirildikten sonra 15 µg/cep olacak şekilde jele uygulandı. Örneklerle birlikte, standart proteinler ["Prestained Protein Molecular Weight Marker", MBI-Fermentas, SM0441 (Şekil 3.5) ve Sigma, MW-70L Molekül Ağırlığı Belirleme Kiti] de yüklendi.



Şekil 3.5: SDS-PAGE’de kullanılan “Prestained Protein Molecular Weight Marker” protein standardı.

Elektroforez işlemi 1 mA/cep akım verilerek başlatıldı. Bantlar yükleme jelinden ayırma jeline geçtiğinde, akım 2 mA/cep’e artırıldı. Elektroforez bromofenol mavisi jelin alt kenarına yaklaşık 0,5 cm yaklaşıncaya kadar sürdürüldü. İşlem sonunda jel, Bölüm 3.13.4'deki yöntemle boyandı.

3.13.4 Protein Jellerinin “Coomassie” Yöntemi ile Boyanması

Elektroforez sonunda jelde ayrılmış proteinler “Coomassie” boyama yöntemi kullanımıyla boyandı. Bu amaçla, jel içinde boyama çözeltisi [% 50 (v/v) metanol, % 10 (v/v) glasiyel asetik asit, % 0,5 (w/v) Coomassie parlak mavisi (“Coomassie Brilliant Blue” R-250)] bulunan bir kabın içine alındı ve oda sıcaklığında, 50 devir/dakika hızda, yaklaşık 4 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda jelde ayrılan proteinlerle birlikte jel de boyandı. Jeldeki boyanın uzaklaştırılması için, boyama çözeltisi döküldükten sonra, kabın içine boyayı uzaklaştırma (“destaining”) çözeltisi konuldu ve oda sıcaklığında, 50 devir/dakika hızda, yaklaşık 12 saat süreyle “destaining” çözeltisi sık sık değiştirilerek çalkalandı. Jelde oluşan protein bantlarının fotoğrafı çekildi.

3.13.5 Western Melezleme

SDS-PAGE ile ayrılan denatüre proteinlerin Western melezleme analizleri Pluskal ve diğ. (1986)’nin önerdiği yöntemle yapıldı. Western melezlemede kullanılan çözelti ve tamponlar Tablo 3.20’de verildi.

Tablo 3.20: Western melezlemede kullanılan çözelti ve tamponlar

| <i>Adı</i> | <i>İçerik</i> | <i>Derişim/Miktar</i> |
|-------------------------------|---|-----------------------|
| Melezleme tamponu | Trizma-Base | 25 mM |
| | Glisin | 125 mM |
| | SDS | % 0,25 |
| | Metanol | % 20 |
| 10X PBST tamponu | KH ₂ PO ₄ | 15,9 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 84 mM |
| | KCl | 26,8 mM |
| | NaCl | 1,37 M |
| | Tween-20 | % 0,5 |
| 10X PBS tamponu | KH ₂ PO ₄ | 15,9 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 84 mM |
| | KCl | 26,8 mM |
| | NaCl | 1,37 M |
| Substrat çözeltisi | PBS | 21 ml/25 ml |
| | 4-kloro-1-naftol (3 mg/ml %100 Metanol) (Sigma, C-8890) | 5,5 ml/25 ml |
| | %30 hidrojen peroksid | 15 µl/25 ml |
| ABTS (peroksidazın substratı) | ABTS (Sigma, A-1888) | 10 mg/10 ml |
| | 0,1 M sitrat tampon (pH 4,0) | 10 ml |
| | %30 hidrojen peroksid | 2 µl/10 ml |

3.13.5.1 Proteinlerin Membrana Aktarılması

SDS jel 1X melezleme tamponunda 20 dakika bekletildi. Jele uygun boyutlarda kesilen PVDF membran (Sigma, P0682) önce 10 ml metil alkol ile 10 saniye kadar yıkandıktan sonra metil alkolü uzaklaştırmak için, su ile 10 dakika yıkandı ve ardından 10 dakika melezleme tamponunda tutuldu.

Jeldeki protein bantlarının PVDF membrana aktarılması, EC140 “Mini Blot Module” sistemi kullanılarak, elektro-emdirim (“electro-blotting”) uygulaması ile gerçekleştirildi. Elektro-emdirim aletinin katodu üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı, sünger ve en üste de anod (kapak) konuldu. Alet özel klipslerle sıkıştırılıp kapatıldıktan sonra içinde 1X melezleme tamponu bulunan elektro-emdirim tankına yerleştirildi. Jeldeki proteinlerin membrana aktarımı, oda sıcaklığında, 1,5 saat süreyle 15 Volt-120 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi.

3.13.5.2 Melezleme ve İmmunolojik Belirleme

Membrana aktarılan proteinler, antikor olarak, anti-mısır β-glukozidaz serumu (R340) ile melezlendi. Mısır protein özütü enjekte edilmiş tavşandan alınan kan serumunda bulunan R340’ın optimal sulandırım oranı, ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) yöntemi ile belirlendi (Mohammed ve Esen, 1989). Bunun için antijen olarak kullanılan *Z. mays* protein özütü 100 kere sulandırıldı ve 96 kuyucuklu mikrotitrasyon

kabının her bir kuyucuğuna 100 µl konularak 2 saat, oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Antijen döküldükten sonra, kuyucuklar 1X PBST tamponu ile dört kez yıkandı. R340 antikor, 1X PBST tamponunda 1/1.000'den 1/64.000'e sulandırılarak her kuyucuğa 100 µl kondu ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Antikor döküldükten sonra, kuyucuklar dört kez 1X PBST ile yıkandı ve 1X PBST tamponunda, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 1/2.000 oranında sulandırılan keçi anti-tavşan peroksidaz ("goat antirabbit-peroxidase", GAR-P) ikincil antikorundan her kuyucuğa 100 µl konularak oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. GAR-P döküldükten sonra kuyucuklar, dört kez 1X PBST tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa peroksidazın substratı olan ABTS'den 100 µl eklenip renk oluşumu görülünceye kadar çalkalayıcı etüvde yavaş şekilde çalkalamaya bırakıldı. Reaksiyon, her kuyucuğa 0,01 M sodyum azid çözeltisinden 100'er µl eklenerek durduruldu. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve yaklaşık 1,5 absorbans değerinin alındığı 1/4.000 sulandırım oranı, Western melezleme için optimal sulandırım olarak belirlendi.

Transfer işleminden sonra, membran iki kez PBST tamponunda yavaşça çalkalanarak 10 dakika yıkandı. Ardından 3 µl R340 serumu içeren 12 ml PBST tamponuna alınarak, oda sıcaklığında, yavaşça çalkalanarak, 1 gece melezlemeye bırakıldı. Ertesi gün membran, PBST tamponunda üç kez 10'ar dakika yıkanarak birincil antikor (R340) uzaklaştırıldıktan sonra ikincil antikor olarak kullanılan 10 µl GAR-P içeren 20 ml PBST tamponu ile oda sıcaklığında 2 saat melezlemeye bırakıldı. İkincil antikorun uzaklaştırılması amacıyla, PBST tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkandıktan sonra iki kez de 10'ar dakika PBS tamponu ile yıkandı. Son olarak, melezlemeyi belirten renk oluşumu için, membran, 25 ml substrat çözeltisi içine alındı. 15-60 dakika arasında oluşan reaksiyon PBS tamponu ile durduruldu ve membran su içinde 4°C' da saklandı.

3.13.6 β-Glukozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

S. pombe transformantlarından elde edilen protein özütlerinde enzim aktivitesi, enzimin kromogenik substratlarının hidrolizi ile açığa çıkan aglikon veya glikon ürünlerinin miktarlarının ölçülmesi ile hesaplandı. pREP42-*dhr1* rekombinant plazmidlerini içeren transformantlardan elde edilen protein özütlerindeki dihurinaz (Dhr1) aktivitesi, dihurinin doğal substratı ile, pREP42-*glu1* klonlarından izole edilen protein

özütlerindeki β -glukozidaz (Glu1) aktivitesi pNPG (Sigma, N7006) ve oNPG (Sigma, N8016) yapay substratları ile, pREP42-*myr1* transformantlarından izole edilen protein özütlerindeki mirosinaz (Myr1) aktivitesi ise sinigrin (Sigma, S1647) doğal substratı ile test edildi.

3.13.6.1 Enzim Aktivitesinin Spektrofotometrik Belirlenmesi

Bu yöntem, *S. pombe* transformantlarından elde edilen protein özütlerinde β -glukozidaz enzimlerinin aktivitesinin belirlenmesi için uygulandı. Bu amaçla, reaksiyonlar 96 kuyucuklu mikrotitrasyon kabında, toplam 140 μ l hacimde ve dört tekrarlı olarak gerçekleştirildi (Çiçek ve Esen, 1999). Reaksiyonlarda 50 mM sitrat-100 mM fosfat tamponu (pH 5,8) kullanıldı. Kullanılan substratların derişimleri 5 mM olacak şekilde aynı tamponda hazırlandı. Aktivitenin belirlenmesi amacıyla, her bir kuyucuğa 70 μ l substrat ve enzim kaynağı olarak da, aynı tampon içinde 50 kez sulandırılan 70 μ l protein özütü eklendi. Kör örnek olarak, içinde protein özütü bulunmayan 70 μ l tampon kullanıldı. Reaksiyon karışımları 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 70 μ l 0,4 M Na_2CO_3 çözeltisi eklendi. β -glukozidazların, bu kromojenik substratları hidrolizlemesi sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin spektrofotometrede (μ Quant, Bio-Tek Instruments, Inc.) 410 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü.

3.13.6.2 Glukoz Belirlenmesi

β -glukozidazların, substratlarını hidrolizlemesi ile açığa çıkan glukoz, peroksidaz-glukoz-oksidad (PGO, Sigma Diagnostics, 510-6) enzim karışımı ve ABTS substratı ile belirlendi. PGO, β -glukozidazların enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan glukozu hidrolizlemektedir. Bu reaksiyonla oluşan hidrojen peroksit de ABTS'yi oksitleyerek reaksiyonun yeşil rengini veren oksitlenmiş ABTS'yi oluşturmaktadır (Raabo ve Terkildsen, 1960).

Reaksiyonlar, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon kabı kullanılarak ve dört tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Dhr1 ve Glu1 reaksiyon karışımları, her kuyucuğa 40 μ l tampon [50 mM Sitrat-100 mM fosfat (pH 5,8)], 50 μ l 5 mM substrat (pNPG veya oNPG veya dihurin), 50 μ l PGO enzim karışımı, 50 μ l 2 mg/ml ABTS ve 10 μ l protein özütü eklenerek hazırlandı. Kullanılan substratlar 50 mM sitrat-100 mM fosfat (pH 5,8) tamponu içinde hazırlandı. Myr1 reaksiyon karışımı ise her bir kuyucuğa sırasıyla;

25 µl substrat, 15 µl tampon, 10 µl protein özütü, 100 µl su içinde hazırlanan PGO enzim karışımı ve 50 µl su içinde hazırlanan 1 mg/ml ABTS eklenerek hazırlandı. Substrat olarak, 50 mM sitrat-100 mM fosfat (pH 5,8) tamponunda hazırlanan 5 mM sinigrin ve 1 mM askorbik asit karışımı kullanıldı. Reaksiyon karışımları, 37°C' da 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kör örnek, 10 µl protein özütü yerine 10 µl tampon eklenerek hazırlandı. Reaksiyon ürünlerinin, spektrofotometrede 410 nm dalga boyundaki absorbansları ölçüldü.

4 BULGULAR

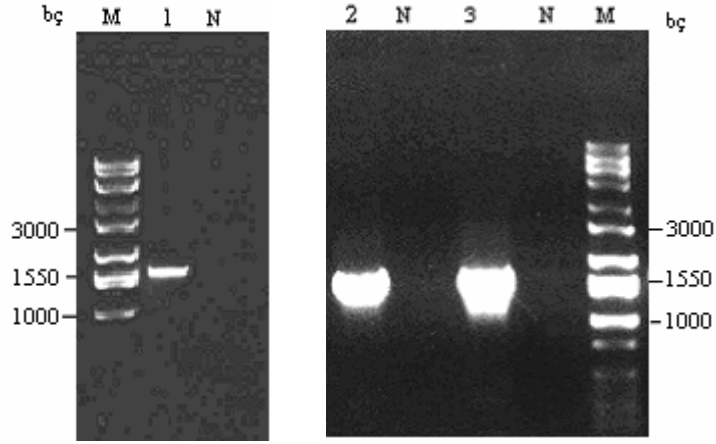
4.1 BİTKİ β -GLUKOZİDAZ GENLERİNİN *S. pombe* EKSPRESYON VEKTÖRLERİNDE KLONLANMASI

Çalışmada, *Sorghum bicolor*'un *dhr1*, *Zea mays*'ın *glu1* ve *Sinapis alba*'nın *myr1* genlerine ait cDNA'lar *Schizosaccharomyces pombe* ekspresyon sistemi için geliştirilen pART1 ve pREP42 plazmidlerinde klonlandı.

4.1.1 *dhr1*, *glu1* ve *myr1* Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

pART1 ve pREP42 ekspresyon vektörlerinde klonlanacak olan, pBluescript II KS (+) plazmidinde bulunan *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin cDNA'ları, her bir gene özgü olarak tasarlanan primer çiftleri (Tablo 3.12) kullanılarak, PCR ile çoğaltıldı. Bu genlere özgü tasarlanan primerlerin 5'uçlarına birer restriksiyon enzimi tanıma dizisi eklendi. *dhr1* için tasarlanan her iki primerde *BamH* I, *glu1* ve *myr1* genleri için tasarlanan ileri primerlerde *Xho* I, geri primerlerde de *BamH* I restriksiyon enzimlerini tanıma dizileri bulunmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin seçiminde, genlerin içinde tanıma bölgesi olmamasına ve aynı zamanda, pART1 ve pREP42 plazmidlerinin klonlama bölgelerindeki restriksiyon enzimlerinden biri olmasına dikkat edildi. Ayrıca, genlerin plazmidlere klonlandıktan sonra, okuma çerçevelerinin kaymaması için ileri primerlere, genlere özgü tamamlayıcı diziler (yaklaşık ilk 15 nükleotid) ile restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri arasına birer başlangıç kodonu (ATG) yerleştirildi.

dhr1, *glu1* ve *myr1* genlerinin çoğaltılması için hazırlanan PCR tüplerine, kalıp DNA olarak genlerin pBluescript'de klonlanmasıyla oluşturulan rekombinant plazmid DNA'ları (pBluescript-*dhr1*, pBluescript-*glu1* ve pBluescript-*myr1*) eklendi. Negatif kontrol tüplerine ise kalıp DNA eklenmedi. Reaksiyonlar, 5'-PO₄ grubu içermeyen küt uçlu PCR ürünü oluşturan *Pfu* DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: *dhr1*, *glul* ve *myr1*'in PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. M: Hi-Lo standart DNA, N: negatif kontrol, 1: *dhr1*, 2: *glul*, 3: *myr1* genlerine ait PCR ürünleri.

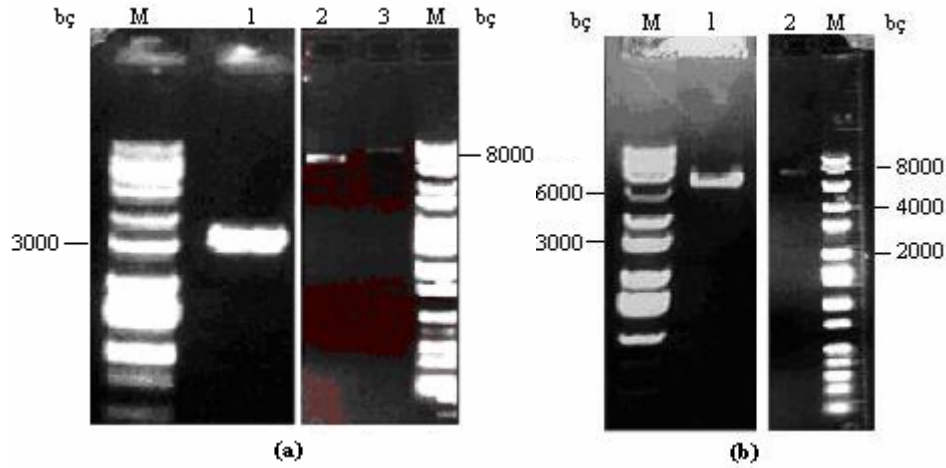
Şekil 4.1'de izlendiği gibi, negatif kontrollerde hiç bir bant oluşumu gözlenmedi. *dhr1*, *glul* ve *myr1* genlerine ait PCR ürünlerinin ise yaklaşık 1500 bç'lik birer bant oluşturduğu gözlemlendi. Çalışmada kullanılan genlerin, olgun protein ürünlerini şifreledikleri bölgelerin uzunluklarının *dhr1* için 1542 bç (Çiçek ve Esen, 1998a), *glul* için 1536 bç (Esen ve Shahid, 1992) ve *myr1* için 1581 bç (Xue ve diğ., 1992) olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, jelde ortaya çıkan yaklaşık 1500 bç'lik DNA bantlarının bu genlere ait olduğu anlaşıldı.

4.1.2 Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

S. pombe ekspresyon sisteminde vektör olarak kullanılan pART1 ve pREP42 plazmidleri ile *E. coli* klonlama vektörü olan pBluescript plazmidinin Bölüm 3.11.1'de anlatıldığı biçimde uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile tekli ya da ikili kesimleri yapıldı. Uygun restriksiyon enziminin seçimi, klonlanacak genlerin 5' ve 3' uçlarında sahip oldukları restriksiyon enzimi tanıma dizilerine göre belirlendi. Buna göre, pART1 plazmidinin *BamH* I ve *Sma* I restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı, *Sal* I ve *BamH* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ikili kesimleri yapıldı. Böylece, uçları farklı olan üç çeşit doğrusal pART1 elde edildi: Bunlar, (1) Her iki ucunda *Sma* I'in oluşturduğu küt uçları olan [pART1 (*Sma* I/*Sma* I)], (2) her iki ucunda *BamH* I enziminin meydana getirdiği aynı yapışkan uçları olan [pART1 (*BamH* I/*BamH* I)], (3) bir tarafında *BamH* I diğer tarafında *Sal* I enzimlerinin oluşturduğu farklı yapışkan uçları olan [pART1 (*BamH* I/*Sal* I)] doğrusal plazmidlerdir. pREP42 plazmidini de *BamH* I ve *Sma* I restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesilerek birinde her iki ucunda

BamH I enziminin oluşturduğu yapışkan uçları [pREP42 (*BamH I/BamH I*)], diğerinde ise *Sma I* enziminin oluşturduğu küt uçları [pREP42 (*Sma I/Sma I*)] bulunan doğrusal plazmidler elde edildi. Ayrıca, pBluescript plazmidini de *Sma I* restriksiyon enzimi ile küt uçlu doğrusal [pBluescript (*Sma I/Sma I*)] duruma getirildi.

Tüm reaksiyon karışımlarından 1-5'er µl örnek alınıp standart DNA ile birlikte % 0,8'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforezin ardından, kesim ürünlerinin tek bant oluşturması, plazmidlerin tam olarak kesildiğini ve doğrusal duruma geçtiğini gösterdi. Ayrıca, bu bantlar standart DNA'ya ait bantlarla karşılaştırıldığında, pBluescript'in 2961 bp'lik (Stratagene, 52325) ve Şekil 3.1'de verilen, pART1'in 7200 bp'lik, pREP42'nin 8500 bp'lik boyutlarıyla uygun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).



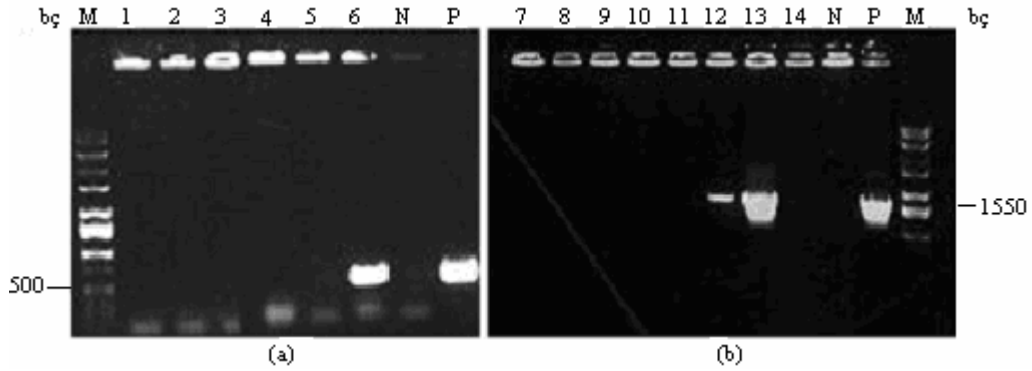
Şekil 4.2: pART1, pREP42 ve pBluescript II KS (+) plazmidlerinin *Sma I*, *BamH I* ve *Sal I* restriksiyon endonükleazları ile tekli ya da ikili kesim ürünlerinin % 0,8'lik agaroz jeldeki görünüşleri.

M: Hi-Lo standart DNA, a) 1: pBluescript (*Sma I/Sma I*), 2: pREP42 (*BamH I/BamH I*), 3: pART1 (*BamH I/BamH I*), b) 1: pART1 (*Sma I/Sma I*), 2: pART1 (*Sal I/BamH I*)

4.1.3 *dhr1* Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması

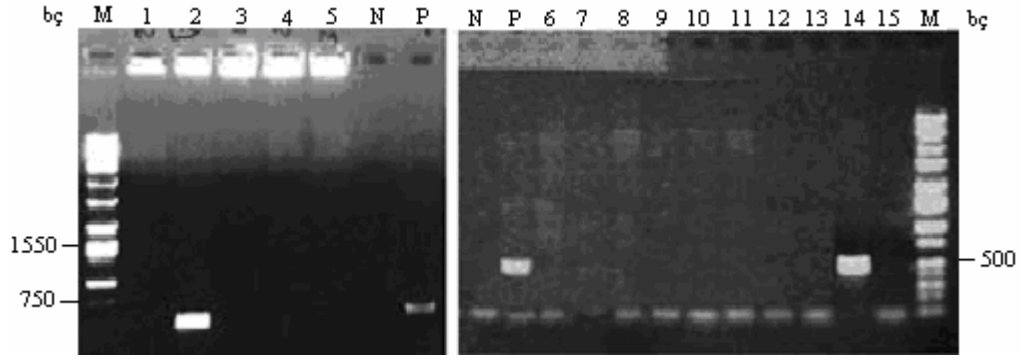
BamH I ile kesilmiş *dhr1*'e ait PCR ürünü, yapışkan uçlu pART1 (*BamH I/BamH I*) ve pREP42 (*BamH I/BamH I*) plazmidleri ile ayrı ayrı, Bölüm 3.11.2'de anlatıldığı gibi, ligasyona uğratıldı. Genin, plazmidlerde doğru konumlu olarak (genin proksimal tarafının plazmidin promotör tarafında olması) klonlanıp klonlanmadığı rekombinantlar elde edildikten sonra araştırıldı. Ligasyon karışımları *E.coli*'nin DH10B ırkına Bölüm 3.4.2'de belirtildiği gibi transfer edildi. Transformasyon karışımlarından 100'er µl, 50 mg/l ampisilin içeren LBA petrilere ekildi ve 37°C'da bir gece inkübasyona bırakıldı.

pART-*dhr1*/*E.coli* DH10B transformantlarından yaklaşık 3000 koloni elde edildi ve bu transformant kolonilerden iki ayrı aşamada toplam 70 koloni rastgele seçilerek, koloni PCR tekniği ile tarandı (Bölüm 3.5). PCR örnekleri, % 1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez gerçekleştirildi (Şekil 4.3.a ve b).



Şekil 4.3: pART1-*dhr1*/*E.coli* DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması sonucu elde edilen görüntü. a) β -Glu119 ve β -Glu120 primer çifti kullanılarak, b) Dhr1-SBF ve Dhr1-SBR primer çifti kullanılarak tarandı. M: Hi-Lo standart DNA, a) 1-6: 1-30, b) 7-14: 31-70 no.lu transformantlara ait koloni PCR örnekleri, N: negatif kontrol (kalıp DNA yok) P: pozitif kontrol (kalıp DNA olarak pBluescript-*dhr1* kullanıldı).

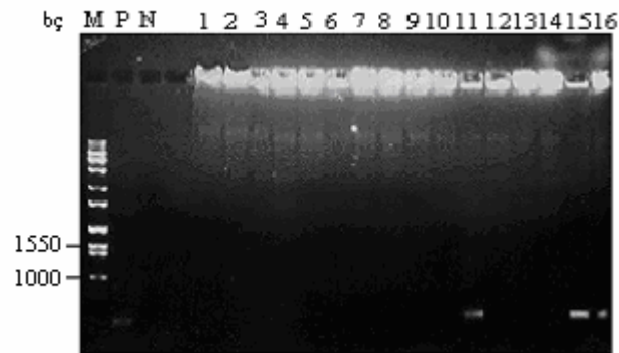
PCR'de kullanılan β -Glu119 ve β -Glu120 primer çifti, *dhr1* geninin içinde 500 bç'lik bir bölgeyi, Dhr1-SBF ve Dhr1-SBR primer çifti ise bu genin tümünü çoğaltmaktadır. Şekil 4.3.a'da 6 no.lu örnekte yaklaşık 500 bç, Şekil 4.3.b'de ise 12 ve 13 no.lu örneklerde yaklaşık 1500 bç'lik birer DNA bantı izlendi. Ancak, bu şekilde görülen agaroz jelin 6, 12 ve 13 no.lu ceplerine yüklenen PCR karışımlarının her birinde kalıp olarak 5 farklı transformant koloni kullanıldığından, hangi ya da hangilerinin *dhr1* genini içeren rekombinantlar olduğunu saptamak için, bu üç tüp açılarak 15 farklı koloni ayrı ayrı aynı koşullarda koloni PCR ile tekrar tarandı. Bu PCR işleminde ise sadece β -Glu119 ve β -Glu120 primer çifti kullanıldı.



Şekil 4.4: pART1-*dhr1*/*E.coli* DH10B transformantlarına ait koloni PCR'nin açılımı. M: Hi-Lo standart DNA, 1-5: 26-30, 6-15: 57-65 numaralı transformant kolonilere ait koloni PCR örnekleri, N:negatif kontrol, P:pozitif kontrol.

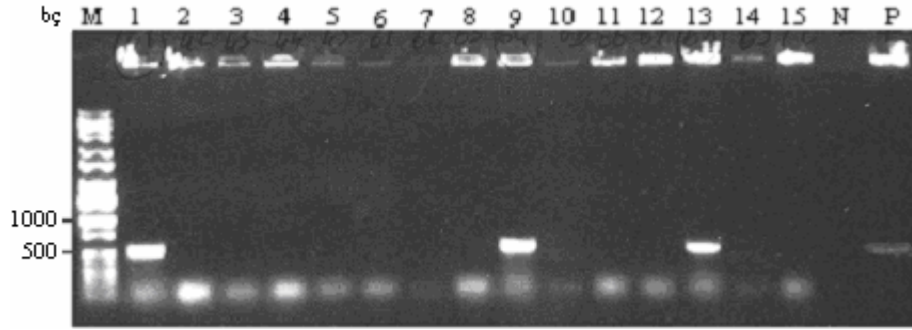
2. ve 14. örneklerde 500 bç'lik birer DNA bantı gözlemlendi (Şekil 4.4). Buna göre, taranan 70 transformant koloniden sadece 2 adet pART1-*dhr1*/*E. coli* DH10B rekombinantı elde edildi. *E. coli* rekombinantlarındaki bu plazmidler, klonlanan gen ile klonlandığı plazmidin adının ilk harflerine bu rekombinantlara verilen numaraların eklenmesiyle pDA27 ve pDA64 olarak adlandırıldı.

pREP42-*dhr1*/*E.coli* DH10B transformantlarından da yaklaşık 2500 koloni elde edildi. Bu transformantlardan rastgele seçilen 80 koloni β -Glu119 ve β -Glu120 primer çifti kullanılarak koloni PCR ile tarandı. Pozitif kontrol tüpüne kalıp DNA olarak, pBluescript-*dhr1* DNA'sı eklenirken, negatif kontrol tüpüne kalıp DNA eklenmedi. PCR ürünleri, % 1'lik agaroz jelde ayrıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: pREP42-*dhr1*/*E.coli* DH10B transformantlarının Koloni PCR tekniği ile taranması ile elde edilen sonuçlar. M: Hi-Lo standart DNA, P:pozitif kontrol (kalıp DNA olarak, pBluescript-*dhr1*), N:negatif kontrol, 1-16: 1-80 nolu transformantlara ait koloni PCR örnekleri.

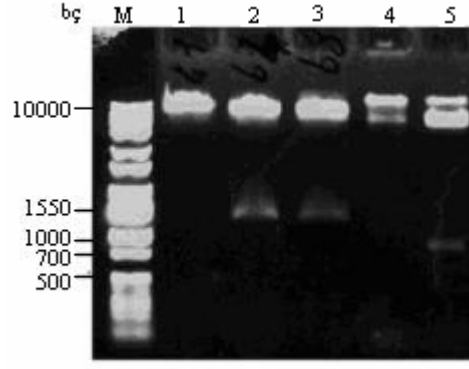
Şekil 4.5’de gözleendiği gibi, sadece 11, 15 ve 16 no.lu örneklerde 500 bç’lik DNA bantları saptandı. Bu PCR tüplerinde kalıp olarak bulunan toplam 15 transformanta ait hücre solüsyonları için ayrı ayrı tekrar aynı koşullarda koloni PCR yapıldı. Bu PCR’nin agaroz jel sonuçları da Şekil 4.6’da verildi.



Şekil 4.6: pREP42-*dhr1*/ DH10B transformantlarında koloni PCR sonuçları. M: Hi-Lo standart DNA, 1-15.ceplere sırasıyla:41, 42,43,44,45,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70 no.lu transformant örnekler, N:negatif kontrol, P:pozitif kontrol.

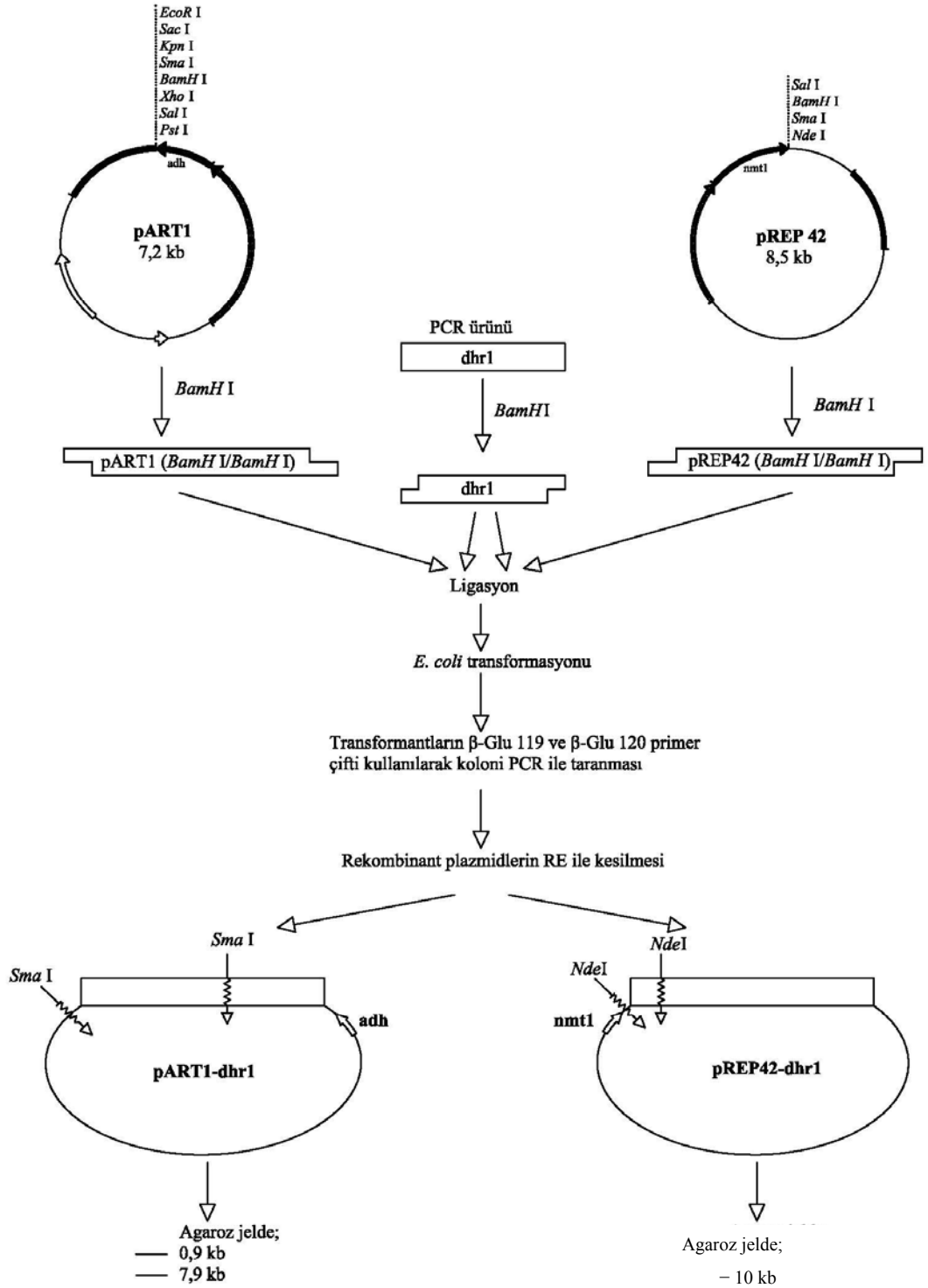
dhr1'in varlığını gösteren 500 bç’lik DNA bantı, 41, 64 ve 68 no.lu transformantlara ait örneklerde gözleendi. Elde edilen 3 farklı pREP42-*dhr1*/*E. coli* DH10B rekombinantında bulunan plazmidler, pR41, pR64 ve pR68 olarak adlandırıldılar.

Elde edilen toplam 5 adet rekombinant klondan plazmid izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.6.1). Bu rekombinant plazmidlerdeki *dhr1* geninin doğru konumlu olarak bulunup bulunmadığını anlamak için pDA27 ve pDA64 plazmidleri *Sma* I, pDR41, pDR64 ve pDR68 plazmidleri ise *Nde* I restriksiyon enzimleri ise kesildiler. Kesim ürünleri % 1’lik agaroz jelde ayrıldı (Şekil 4.7). *Sma* I restriksiyon enzimi hem *dhr1* genin içinde 612. nükleotidde hem de pART1’in klonlama bölgesinde (pDA27 ve pDA64 plazmidlerinde yabancı genin distal tarafında), *Nde* I restriksiyon enzimi ise hem genin içinde 234. nükleotidde hem de pREP42’nin klonlama bölgesinde (pDR41, pDR64 ve pDR68 plazmidlerinde yabancı genin proksimal tarafında) kesim yapmaktadır.



Şekil 4.7: pDA27, pDA64, pDR41, pDR64 ve pDR68 plazmidlerinin restriksiyon endonükleazları ile kesimi. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1:pDR41+Nde I, 2:pDR64+Nde I, 3:pDR68+Nde I, 4: pDA64+Sma I, 5: pDA27+Sma I.

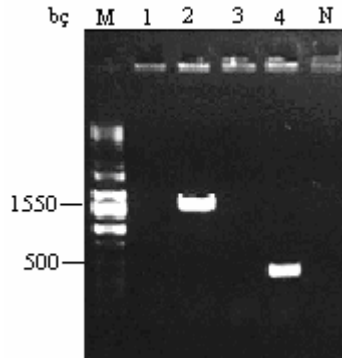
pDR41, pDR64 ve pDR68 plazmidlerinden sadece pDR41 plazmidinde *dhr1* geninin doğru, diğerlerinde ise ters konumlu olarak bulunduğu, Şekil 4.7 verilen jel fotoğrafında 1 no.lu örnekte yaklaşık 10 kb'lik tek bir bant, 2 ve 3 no.lu örneklerde ise yaklaşık 8500 ve 1500 bç'lik ikişer bantın gözlenmesi ile anlaşıldı. Aynı şekilde 4. örnekte yaklaşık 9000 bç'lik tek bant ve 5. örnekte yaklaşık 900 ve 7900 bç'lik iki bantın gözlenmesi ile pDA27 ve pDA64 plazmidlerinden *dhr1* genini, pDA27'nin doğru, pDA64'ün ise ters konumlu olarak içerdiği saptandı. Buna göre, 1 ve 5 no.lu örneklerde bulunan, sırasıyla pDR41 ve pDA27 plazmidlerinin doğru rekombinant plazmidler olduğu sonucu çıkarıldı. *dhr1* geninin pART1 ve pREP42 vektörlerindeki klonlanma çalışmaları Şekil 4.8'de şematik olarak verildi.



Şekil 4.8: *dhr1* geninin pART1 ve pREP42 ekspresyon vektörlerinde klonlanması.

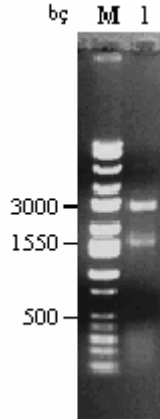
4.1.4 *gluI* Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması

Klonlama sonrasında doğru konumlu *gluI* genini içeren pART1 rekombinant(lar)ının kolaylıkla seçilebilmesi amacıyla, *gluI* geni bir *E. coli* klonlama vektörü olan pBluescript plazmidini vasıtasıyla pART1 plazmidinde klonlandı. Bu amaçla, küt uçlu *gluI* PCR ürünü, küt uçlu pBluescript (*Sma* I/*Sma* I) plazmidini ile Bölüm 3.11.2’de anlatıldığı gibi ligasyona bırakıldı. Ligasyon karışımları *E.coli*’nin DH10B ırkına Bölüm 3.4.2’de belirtildiği şekilde transfer edildi. Transformasyon sonrasında seçici besi ortamında kendi üzerine kapanan plazmidleri içeren transformantların oluşturduğu mavi renkli koloniler ile rekombinant plazmidleri içeren transformantların oluşturduğu beyaz renkli koloniler gözlemlendi. Beyaz kolonilerin arasından rastgele seçilen 4 tanesi Tablo 3.12’de verilen pBluescript plazmidinin T7 promotörüne özgü T7 ve *gluI* geninin 3’ ucuna (distal) özgü Gu1-SBR primer çifti kullanılarak koloni PCR ile tarandı.



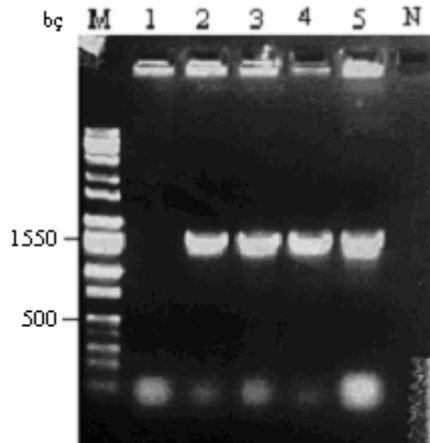
Şekil 4.9: pBluescript-*gluI*/*E.coli* DH10B transformantlarının koloni PCR ürünleri.
M: Hi-Lo standart DNA, N: negatif kontrol, 1-4: beyaz kolonilerin PCR ürünleri.

Koloni PCR ürünlerinin ayrıldığı agaroz jelde 2. hatta yaklaşık 2000 bç’lik, 4. hatta ise yaklaşık 400 bç’lik PCR ürünlerinin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.9). Farklı boyutlarda PCR ürünlerinin oluşmasının, koloni PCR’de kalıp olarak kullanılan kolonilerdeki plazmidlerden birinin *gluI* genini doğru, diğerinin ise ters konumlu olarak içermesinden kaynaklandığını düşündürdü. Bunlardan 2 numaralı rekombinanttan plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmid DNA’sı *Xho* I ve *Bam*H I restriksiyon endonükleazları ile kesildi ve % 1’lik agaroz jelle yüklendi. Elektroforetik olarak ayrılan *gluI* (*Xho* I/*Bam*H I) geni (Şekil 4.10), Bölüm 3.9’da belirtildiği biçimde jelden geri alındı.



Şekil 4.10: pBluescript-*glu1* plazmidinin *Xho* I ve *Bam*H I restriksiyon endonükleazları ile ikili kesimi. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1: *glu1* (*Xho* I/*Bam*H I) DNA'sı.

5' ucunda *Xho* I, 3' ucunda da *Bam*H I restriksiyon endonükleazlarının oluşturduğu yapışkan uçlar bulunan *glu1* (*Xho* I/*Bam*H I) geni, *adh1* promotörü tarafında *Sal* I'in, terminatörü tarafında *Bam*H I'in oluşturduğu yapışkan uçları taşıyan pART1 plazmidi (*Sal* I/*Bam*H I) ile ligasyona bırakıldı. Bu çalışmada, izoşizomer olan *Xho* I ve *Sal* I enzimlerinin meydana getirdikleri uçlar birbirlerinin tamamlayıcısı olması nedeniyle kullanıldılar. Ligasyon karışımı *E. coli*'ye transfer edildi ve seçici besi ortamında yaklaşık 2000 koloni elde edildi. Bunlar arasından rastgele seçilen 5 adet transformant koloni Glu1-SBF ve Glu1-SBR primer çifti (Tablo 3.12) kullanılarak koloni PCR ile tarandı (Şekil 4.11).

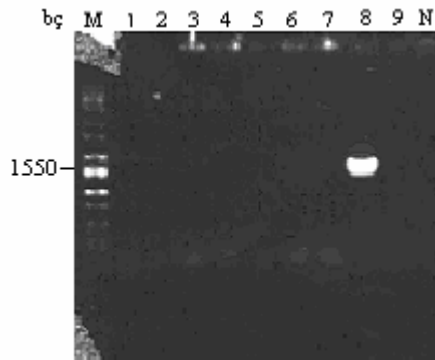


Şekil 4.11: pART-*glu1*/*E. coli* DH10B transformantlarının koloni PCR sonuçları. M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1-5: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: negatif kontrol.

Jel elektroforezinde 2, 3, 4 ve 5 no.lu PCR ürünlerinin her birinde yaklaşık 1500 bp'lik DNA bantı gözlemlendi (Şekil 4.11). Jelde gözlenen bu bantların, koloni PCR'de kalıp olarak kullanılan 2, 3, 4 ve 5 no.lu kolonilerin içerdiği plazmidlerdeki *glu1* genine ait

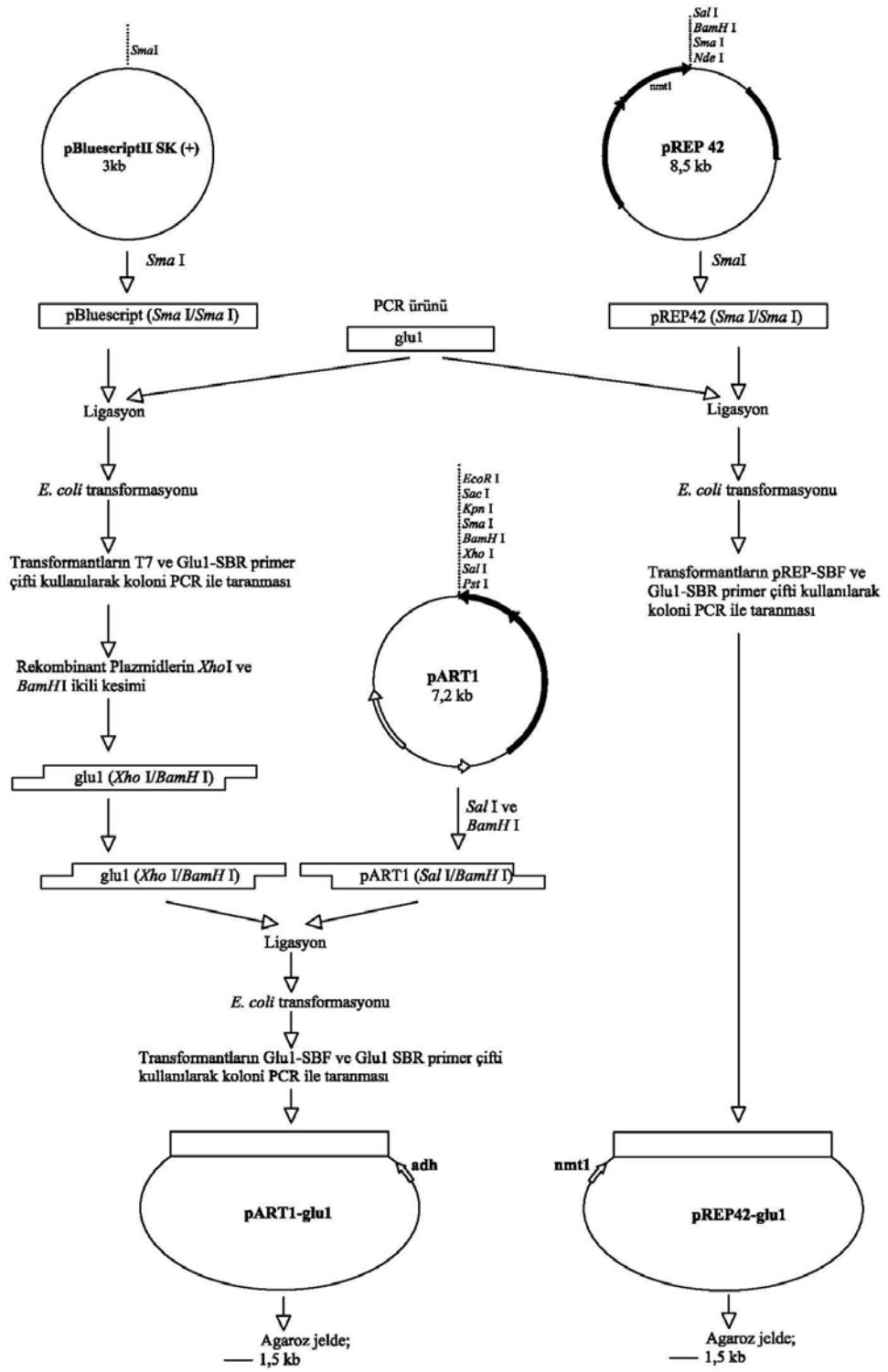
olduğu düşünöldüğünden, bu kolonilerdeki rekombinant plazmidler pGA2, pGA3, pGA4 ve pGA5 olarak adlandırıldılar.

glu1 geninin küt uçlu PCR ürünü, doğrudan küt uçlu pREP42 (*Sma* I/*Sma* I) plazmidi ile ligasyona bırakıldı. Ligasyon karışımı, *E. coli* DH10 B ırkına transfer edildi. Seçici besi ortamında yaklaşık 700 transformant koloni elde edildi. Bu kolonilerin arasından rastgele seçilen 9 tanesi, plazmidin *nmt1* promotörüne özgü pREP-SBF ve genin 3' ucuna özgü Glu1-SBR primer çifti (Tablo 3.12) kullanılarak koloni PCR ile tarandı.



Şekil 4.12: pREP42-*glu1*/*E. coli* DH10B transformantlarının koloni PCR sonuçları.
M: Hi-Lo standart DNA'sı, 1-9:transformant kolonilerin PCR ürünleri, N:negatif kontrol.

Şekil 4.12'de izlendiği gibi, jelde sadece 8 numaralı transformanta ait koloni PCR ürününde yaklaşık 1500 bç'lik bir bant gözlemlendi. PCR'de kullanılan primerlerden birinin vektörün promotör dizisine özgü bir primer (5' primer) diğerinin ise genin 3'ucuna özgü bir primer olduğundan, jelde görölen bu bantın *glu1* genine ait olduğunu hatta, bu PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan 8 no.lu transformanttaki plazmidin, *glu1* genini doğru konumlu olarak bulundurduğunu düşündürdü ve bu plazmid pGR8 olarak adlandırıldı. *glu1* geninin pART1 ve pREP42 plazmidleridde klonlanmasında izlenen tüm çalışmaların şemetik özeti Şekil 4.13'de verildi.

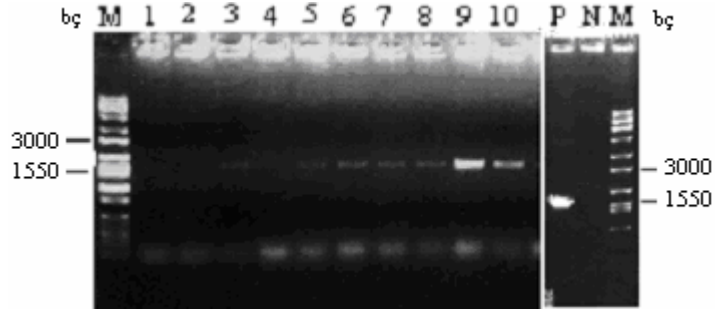


Şekil 4.13: *glu1* geninin pART1 ve pREP42 plazmidlerinde klonlanması.

4.1.5 *myr1* Geninin pART1 ve pREP42 Plazmidlerinde Klonlanması

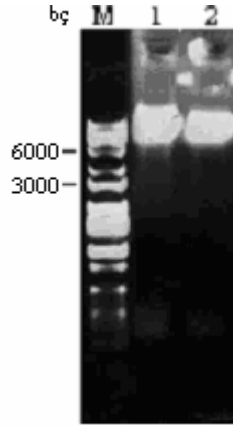
Küt uçlu *myr1* PCR ürünü küt uçlu pART1 (*Sma* I/*Sma* I) ve pREP42 (*Sma* I/*Sma* I) plazmidleri ile ayrı ayrı ligasyona bırakıldı. Küt uçlu plazmidlerin kendi üzerlerine kapanmalarını engellemek için ligasyon ortamına, *myr1* geninde tanıma noktası bulunmayan *Sma* I restriksiyon enzimi de eklendi. Her iki ligasyon karışımı, *E. coli* DH10B ırkına transfer edildi (Bölüm 3.4.2).

pART1-*myr1*/*E. coli* DH10B transformasyonundan toplam 14 transformant koloni elde edildi. Bu transformantlardan 10 tanesi, MYR-SBF ve MYR-SBR primer çifti (Tablo 3.12) kullanılarak koloni PCR ile tarandı.



Şekil 4.14: pART1-*myr1*/*E. coli* DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması. M: Hi-Lo standart DNA, 1-10: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P: kalıp DNA olarak, 50 ng/μl pBluescript-*myr1* içeren pozitif kontrol.

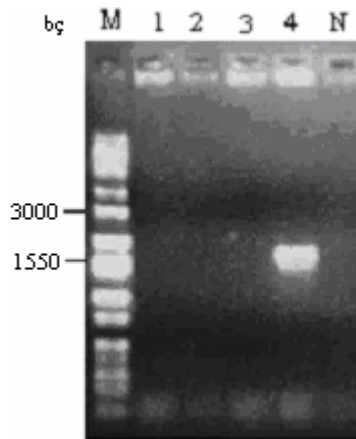
Jele uygulanan PCR ürünlerine ait, 9 ve 10 no.lu örneklerde 1500 bç'lik belirgin birer bant gözlemlendi (Şekil 4.14). Bu örneklere ait rekombinant klonlardan plazmid izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.6.1) ve bu plazmidler, *myr1* geninin doğru konumlu olarak girip girmediğini anlamak için, *Bam*H I restriksiyon enzimi ile kesildiler. *Bam*H I restriksiyon enziminin PCR ile çoğaltılan *myr1* geninin 3' ucunda (MYR1-SBR primerinde) ve pART1'de klonlama bölgesinin *adh1* promotörü tarafında birer tanıma noktası bulunmaktadır. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı ve fotoğrafları çekildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: pART1-*myrI*/*E. coli* DH10B rekombinantlarının *BamH*I restriksiyon endonüleazı ile kesimi. M: Hi-Lo standart DNA, 1: 9 numaralı transformantın *BamH*I ile kesimi, 2: 10 numaralı transformantın *BamH*I ile kesimi

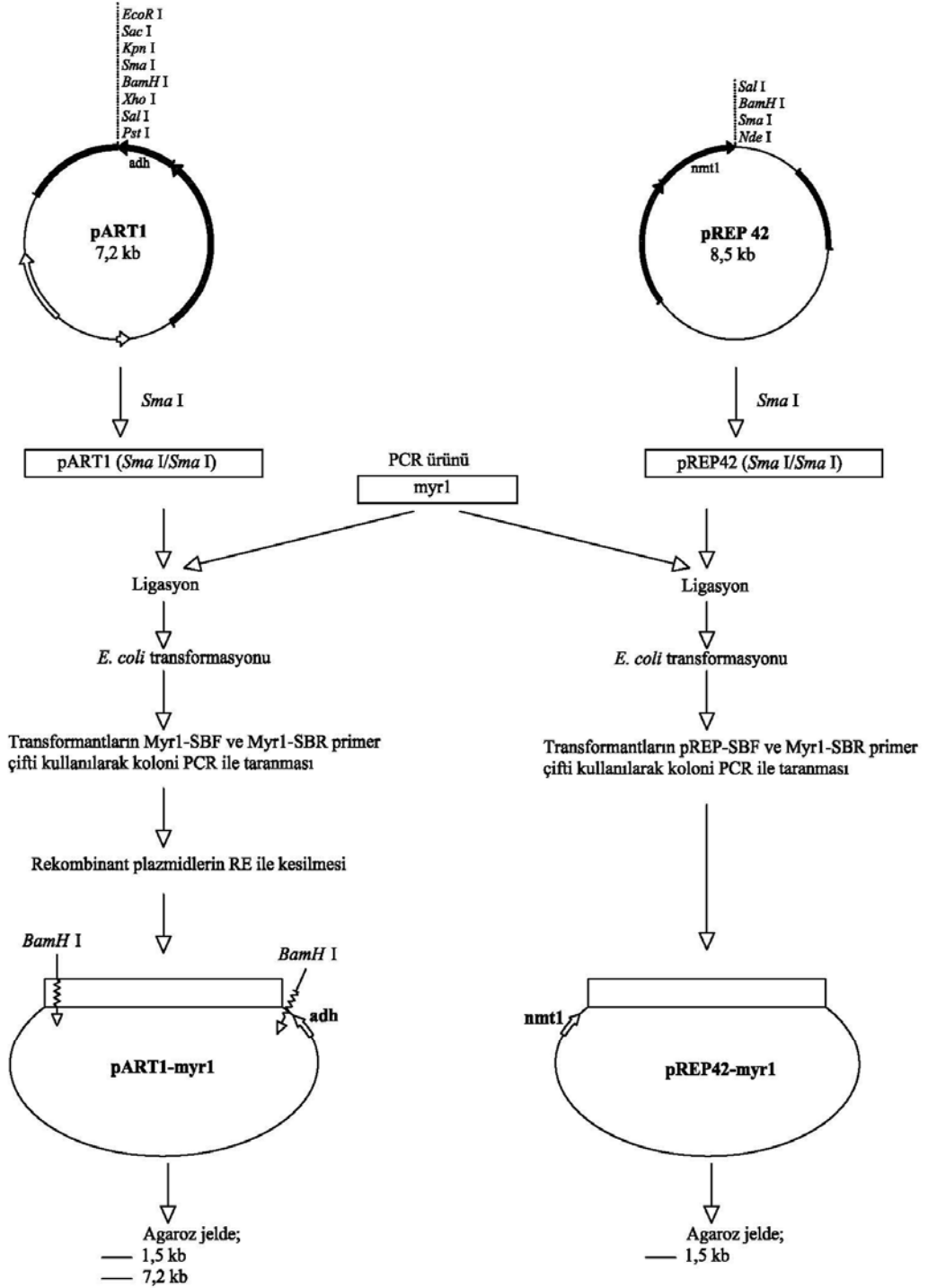
*BamH*I enzimi ile kesilen rekombinant plazmidlerin agaroz jellerinde genin doğru konumlu olması durumunda, *myrI*'e ait yaklaşık 1500 bç'lik ve plazmide ait 7200 bç'lik birer bantın oluştuğu, yanlış konumlu olarak girmesi durumunda da yaklaşık 9000 bç'lik tek bantın oluştuğu bilinmektedir. Her iki transformantın kesim ürünlerinin elektroforezinde yaklaşık 9000 bç'lik tek bant gözlemlendi (Şekil 4.15). Buna göre, iki rekombinant plazmidde de *myrI* geninin ters konumlu yerleşmiş olduğu anlaşıldı.

pREP42-*myrI*/*E. coli* DH10B transformasyonundan 6 koloni elde edildi. Bu kolonilerin 4 tanesi plazmidin *nmtI* promotörüne özgü PREP-SBF ve *myrI* geninin 3' ucuna özgü Myr1-SBR primer çifti kullanılarak koloni PCR ile tarandı.



Şekil 4.16: pREP42-*myrI*/*E. coli* DH10B transformantlarının koloni PCR ile taranması. M: Hi-Lo standart DNA, 1-4: transformant kolonilerin PCR ürünleri, N: kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

Şekil 4.16'da gözleendiği gibi, sadece 4 no.lu örneğin PCR ürününde yaklaşık 1500 bç'lik bir bant ortaya çıktı ve bu örneğe ait transformanttaki plazmid pMR4 olarak adlandırıldı. Bu genin *S. pombe* ekspresyon vektörlerindeki klonlama çalışmaları şeması Şekil 4.17'de verildi.



Şekil 4.17: *myr1* geninin pART1 ve pREP42 plazmidlerinde klonlanması.

Bölüm 4.1.3-5’de açıklandığı biçimde çalışma süresinde elde edilen ve genleri doğru konumlu olarak içeren tüm rekombinant plazmidler Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: Çalışmada elde edilen rekombinant plazmidler.

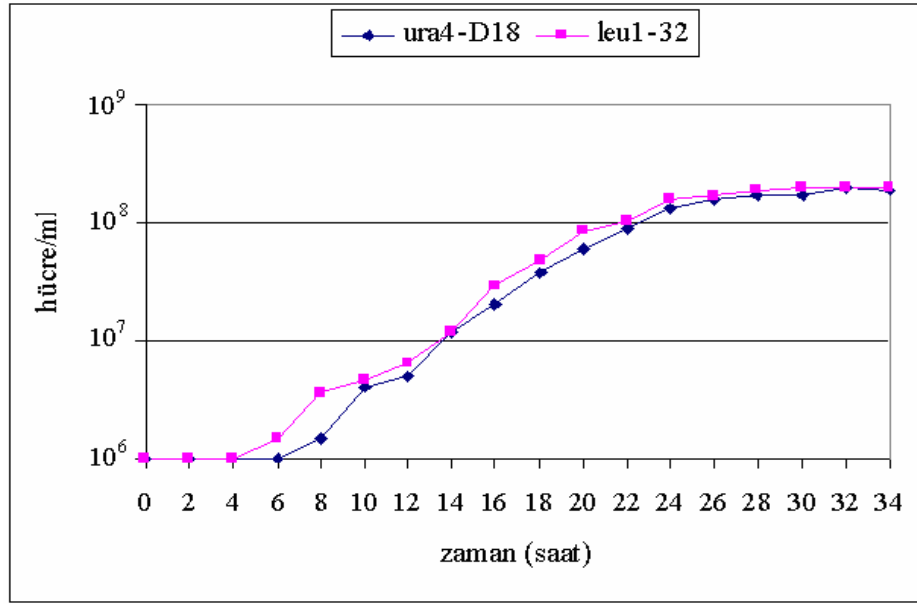
| Bitkiler | Genler | Ekspresyon Vektörleri | Rekombinant Plazmidler |
|------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Sorghum bicolor</i> | <i>dhr1</i> | pART1 | pDA27 |
| | | pREP42 | pDR41 |
| <i>Zea mays</i> | <i>glu1</i> | pART1 | pGA2 |
| | | | pGA3 |
| | | | pGA4 |
| | | pREP42 | pGR8 |
| <i>Sinapis alba</i> | <i>myr1</i> | pREP42 | pMR4 |

4.2 BİTKİ β -GLUKOZİDAZ GENLERİNİN *S. pombe*'de KLONLANMASI

4.2.1 *S. pombe* Irklarında Üremenin İzlenmesi

S. pombe'de transformasyon etkinliğinin, logaritmik evrenin ortalarında en yüksek değerde olduğu bilindiğinden, bitki β -glukozidazlarını şifreleyen genlerin aktarımında konak olarak kullanılan *S. pombe leu1-32* ve *S. pombe ura4-D18* ırklarının YNB besi ortamındaki üremeleri izlendi.

Üreme sırasında hücre sayılarındaki artışlar, 34 saat boyunca 2’şer saat aralıklarla 530 nm dalga boyundaki optik yoğunluklarının (OD) ölçülmesi ile izlendi. Elde edilen OD değerlerini hücre/ml cinsine çevirmek için, aynı ırklara ait kültürlerin mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımaların OD değerlerine göre çizilen standart grafiğinden yararlanıldı. Üç kez tekrarlanan denemelere ait ölçüm değerlerinin ortalaması alındı ve kültürlerin zamana bağlı üreme profili çıkartıldı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: *S. pombe leu1-32* ve *S. pombe ura4-D18* ırklarının YNB besi ortamındaki üreme grafiği.

Logaritmik evrenin ortasına yaklaşık 16 saatte ulaşan *S. pombe leu1-32* ile 18 saatte ulaşan *S. pombe ura4-D18* kültürleri transformasyonda kullanıldı.

4.2.2 pDA27 ve pGA2 Rekombinant Plazmidlerinin *S. pombe*'de Klonlanması

pART1'de klonlanmış *dhr1* ve *glu1* genlerini içeren, sırasıyla pDA27 ve pGA2 olarak adlandırılan rekombinant plazmidler, işaret gen olarak *S. cerevisiae* LEU2 genini taşıdıklarından lösin oksotrofu olan *S. pombe leu1-32* ırkına hem lityum asetat hem de elektroporasyon yöntemleri ile aktarıldılar (Bölüm 3.4.3). *myr1* genini doğru konumlu olarak içeren bir pART1 rekombinant plazmidi elde edilemediğinden, *myr1* geninin bu vektörün aracılığı ile *S. pombe*'ye transferi yapılamadı.

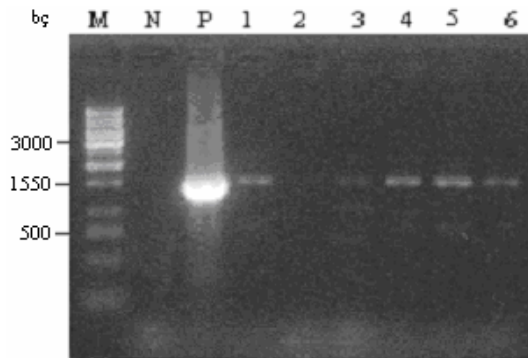
İlk denemelerde, transformasyon etkinliği lityum asetat yöntemi için yaklaşık 10^2 koloni/ μg plazmid, elektroporasyon yöntemi için de yaklaşık 10^4 koloni/ μg plazmid olarak hesaplandı. Bu nedenle, sonraki denemelerde elektroporasyon yöntemi uygulandı. Her iki plazmidle yapılan 5 farklı transformasyon denemesi sonunda elde edilen transformantlarda her biri için 300'er koloni, Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi, koloni PCR ile tarandı. Bununla birlikte, PCR ürünlerinin elektroforetik analizi sonunda, *dhr1* veya *glu1* genlerini içeren rekombinantların varlığı saptanamadı.

Aynı taramalar, transformantlardan rastgele seçilen 10'ar koloniden hem plazmid (Bölüm 3.6.2) hem de genomik (Bölüm 3.6.3) DNA izolasyonları yapıldıktan sonra bu DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR tekniği ile de yapıldı. Ayrıca, izole edilen plazmid DNA'ları, Bölüm 3.4.2'de açıklandığı gibi, *E.coli* DH10B' ye transfer edildi. Farklı transfer denemelerinin her birinde seçici besi ortamlarında ortalama 20'şer koloninin ürettiği gözlemlendi. Bu kolonilerden rastgele seçilen 10'ar örnek, genlere özgü primer çifti kullanılarak koloni PCR ile tarandı. PCR ürünlerinin elektroforetik analizi sonunda hiç bir rekombinant bulunamadı.

4.2.3 pDR41, pGR8 ve pMR4 Rekombinant Plazmidlerinin *S. pombe*'de Klonlanması

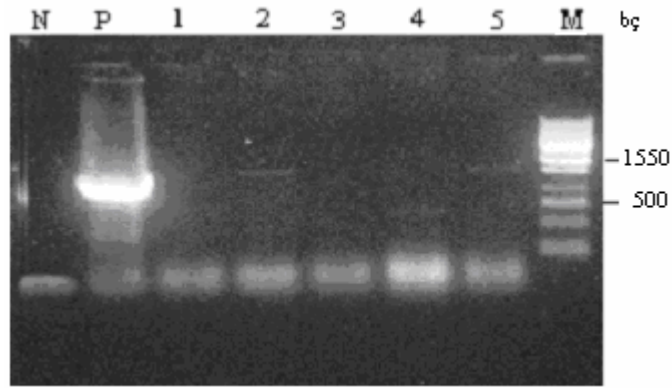
pREP42 ekspresyon vektöründe *dhr1* geninin klonlanmasıyla oluşturulan pDR41, *glu1* geninin klonlanmasıyla oluşturulan pGR8 ve *myr1* geninin klonlanmasıyla oluşturulan pMR4 rekombinant plazmidleri, işaret gen olarak *S. pombe ura4* genini içerdikleri için, *ura4* geni delesyonlu olan *S. pombe ura4-D18* ırkına elektroporasyon yöntemi ile transfer edildi (Bölüm 3.4.3).

pDR41 rekombinant plazmidini ile *S. pombe ura4-D18* ırkının transformasyonu sonucunda yaklaşık 2000 transformant koloni elde edildi ve transformasyon etkinliği yaklaşık 10^5 transformant/ μg DNA olarak hesaplandı. Bunların arasında rastgele seçilen 30 koloni, 5'er koloniye ait örnekler bir PCR tüpünde olacak şekilde, Tablo 3.12'de verilen Dhr1-SBF ve Dhr1-SBR primer çifti kullanılarak koloni PCR ile tarandı (Şekil 4.19).



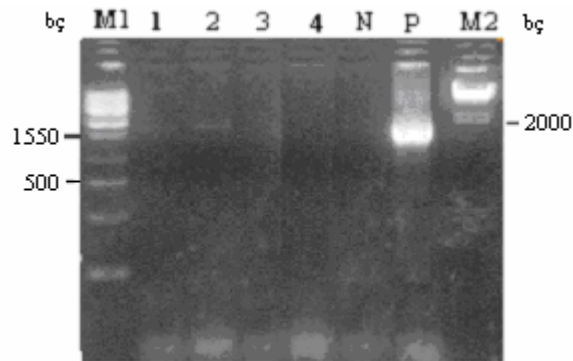
Şekil 4.19: pDR41/*S. pombe ura4-D18* transformantlarında koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: 1kb Standart DNA, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*dhr1* DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-6: 1-30 numaralı transformant kolonilerin PCR ürünleri.

Şekil 4.19’da görüldüğü gibi, 2 numaralı örnek hariç diğer örneklerde *dhr1* genine özgü yaklaşık 1500 bç’lik birer bant gözlemlendi. Daha sonra, en yoğun DNA görünümünü veren 5 numaralı tüpte bulunan koloniler, ayrı ayrı tekrar koloni PCR ile tarandılar. Agaroz jel elektroforezi sonunda, Şekil 4.20’de görüldüğü gibi 2. ve 5. örneklerde yaklaşık 1500 bç’lik birer bantın gözlenmesi ile 22 ve 25 olarak numaralandırılmış kolonilerin pDR41 plazmidini içeren rekombinantlar olduğu sonucuna varıldı ve bu klonlar DR41-S22 ve DR41-S25 olarak adlandırıldılar.



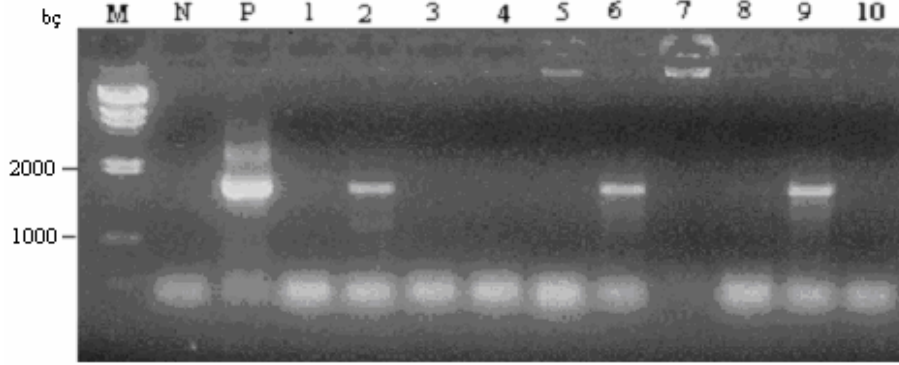
Şekil 4.20: pDR41/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından 5 numaralı PCR tüpteki kolonilerin ayrı ayrı koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: 1kb Standart DNA, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*dhr1* DNA’sı kullanılan pozitif kontrol, 1-5: 21-25 numaralı transformant koloniler.

pGR8 rekombinant plazmidini ile *S. pombe ura4-D18* irkının transformasyonu sonucunda yaklaşık 1000 koloni elde edildi; bunların arasından rastgele seçilen 20 koloni, 5’er koloniye ait örnek bir PCR tüpünde olacak şekilde, Glu1-SBF ile Glu1-SBR primer çiftleri kullanılarak koloni PCR ile tarandılar (Bölüm 3.9). PCR ürünlerinin gözlemlendiği jel fotoğrafı Şekil 4.21’de verildi.



Şekil 4.21: pGR8/*S. pombe ura4-D18* transformantlarının koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: 1kb Standart DNA, M2: λ /Hind III standart DNA’sı, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*glu1* DNA’sı kullanılan pozitif kontrol, 1-4: 1-20 numaralı transformant koloniler.

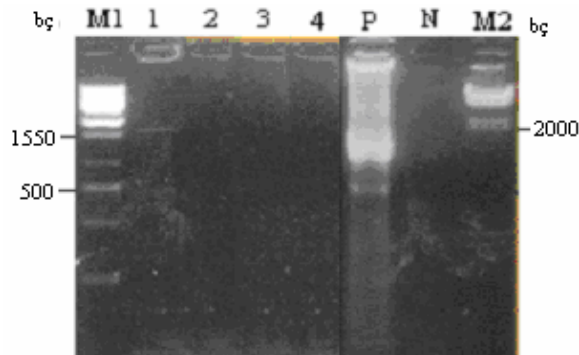
Jel elektroforezinde, 1. ve 2. örneklerde yaklaşık 1500 bp'lik birer bant görüldü (Şekil 4.21). 1 ve 2 no.lu tüplerde kalıp olarak kullanılan kolonilerin her biri ayrı ayrı yeniden koloni PCR ile tarandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: pGR8/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından 1 ve 2 numaralı PCR tüplerinde bulunan 10 farklı koloniye ait PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M: λ /*Hind* III standart DNA'sı, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*glu1* DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-10: 1'den 10'a kadar numaralandırılan transformant koloniler.

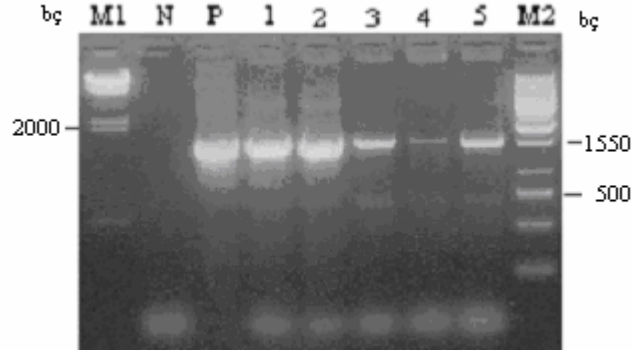
Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, 2., 6. ve 9. no.lu PCR ürünlerinde yaklaşık 1500 bp'lik birer bantın gözlenmesi ile 2, 6 ve 9 no.lu transformantların pGR8 plazmidini içeren rekombinantlar oldukları düşünüldü; bu klonlar sırasıyla GR8-S2, GR8-S6 ve GR8-S9 olarak adlandırıldılar.

pMR4 rekombinant plazmidinin *S. pombe ura4-D18* ırkına aktarımı sonucunda yaklaşık 1000 transformant koloni elde edildi. Bunların arasında rastgele seçilen 20 koloni, 5'er koloniye ait örnekler bir PCR tüpünde olacak şekilde ve Myr1-SBF ile Myr1-SBR primer çifti kullanılarak Bölüm 3.9'da anlatıldığı biçimde koloni PCR ile tarandılar (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: pMR4/*S. pombe ura4-D18* transformantlarının koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: 1kb Standart DNA, M2: λ /*Hind* III standart DNA'sı, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*myr1* DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-4: 1-20 no.lu transformant kolonilerin PCR ürünleri.

Jel elektroforezinde, sadece 1. örnekte yaklaşık 1500 bp'lik bir bant gözlemlendi (Şekil 4.23). Bu tüpte kalıp olarak kullanılmış 5 farklı koloni için ayrı ayrı yeniden aynı koşullarda koloni PCR yapıldı.



Şekil 4.24: pMR4/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından 1 numaralı PCR tüpündeki 5 farklı koloninin ayrı ayrı koloni PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: λ /Hind III standart DNA'sı, M2: 1kb Standart DNA'sı, N:kalıp DNA içermeyen negatif kontrol, P:kalıp olarak pBluescript-*myr1* DNA'sı kullanılan pozitif kontrol, 1-5: 1'den 5' kadar numaralandırılan transformant koloniler.

Şekil 4.24'de görüldüğü gibi özellikle 1 ve 2 numaralı örneklerde daha belirgin olmak üzere hepsinde yaklaşık 1500 bp'lik birer bant elde edildi. Buna göre klonlar sırasıyla MR4-S1, MR4-S2, MR4-S3, MR4-S4 ve MR4-S5 olarak adlandırıldılar.

Çalışma sürecinde elde edilen, *S. bicolor*'un *dhr1*, *Z. mays*'ın *glu1* ve *S. alba*'nın *myr1* genlerini içeren tüm rekombinant *S. pombe* klonları Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Bitki genlerini içeren rekombinant *S. pombe* klonları.

| Bitkiler | Genler | Vektör | Rekombinant Plazmidler | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Klonu |
|------------------------|-------------|--------|------------------------|--|
| <i>Sorghum bicolor</i> | <i>dhr1</i> | pREP42 | pDR41 | DR41-S22 |
| | | | | DR41-S25 |
| <i>Zea mays</i> | <i>glu1</i> | pREP42 | pGR8 | GR8-S2 |
| | | | | GR8-S6 |
| | | | | GR8-S9 |
| <i>Sinapis alba</i> | <i>myr1</i> | pREP42 | pMR4 | MR4-S1 |
| | | | | MR4-S2 |
| | | | | MR4-S3 |
| | | | | MR4-S4 |
| | | | | MR4-S5 |

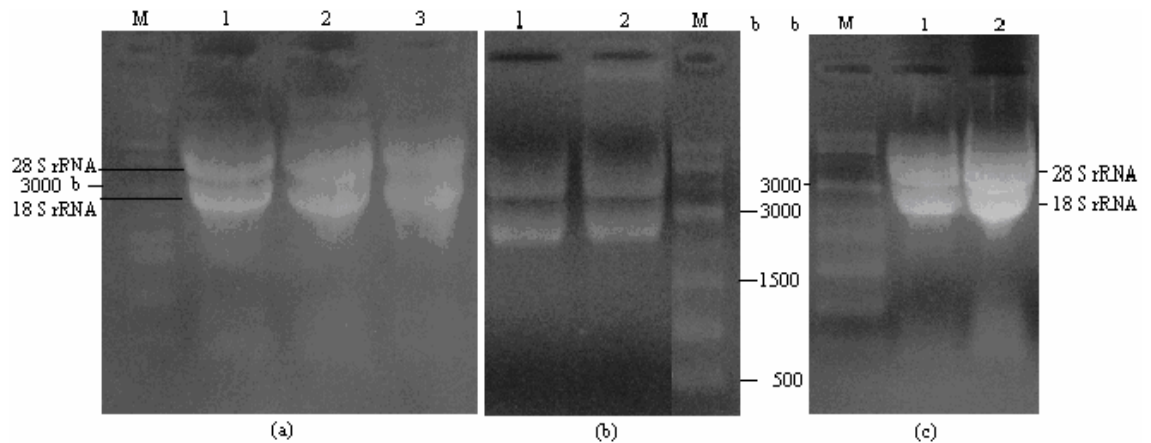
4.3 BİTKİ β -GLUKOZİDAZLARININ *S. pombe*'de HETEROLOG ANLATIMI

Çalışmada elde edilen *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerini içeren *S. pombe* klonlarında bu genlerin, heterolog anlatım yapıp yapmadıkları, Northern melezleme ve RT-PCR teknikleri ile transkripsiyon düzeyinde, SDS-PAGE ve Western melezleme teknikleri ile de translasyon düzeyinde analiz edildi.

4.3.1 Northern Melezleme Tekniği ile Transkripsiyon Analizi

Northern melezlemede ve daha sonra RT-PCR analizinde kullanılmak üzere, *dhr1*'i içeren DR41-S22 ve DR41-S25, *glu1*'i içeren GR8-S2, GR8-S6 ve GR8-S9 ile *myr1*'i içeren MR4-S1 ve MR4-S2 adlı *S. pombe* rekombinantlarından ve pREP42'yi içeren *S. pombe ura4-D18* klonundan Bölüm 3.12.1'de açıklandığı şekilde total RNA izolasyonu yapıldı ve derişimleri belirlendi.

Ayrıca, tüm *S. pombe* klonlarından izole edilen RNA'ların % 1,2'lik formaldehitli agaroz jelde elektroforetik analizlerinde izolasyonları sırasında yıkılmadıkları da doğrulandı. Şekil 4.25.a'da DR41-S22, DR41-S25 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18*, Şekil 4.25.b'de GR8-S2, pREP42/*S. pombe ura4-D18*, Şekil 4.25.c'de ise MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* klonlarından elde edilen total RNA görüntülerinin fotoğrafları verildi.



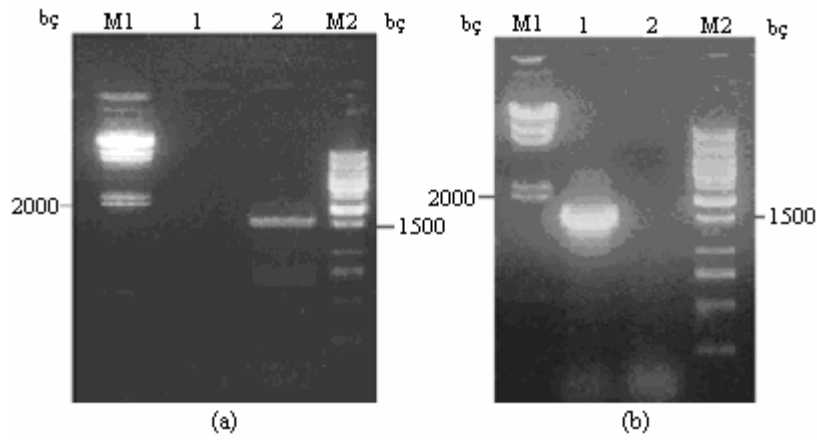
Şekil 4.25: *S. pombe* rekombinantlarından izole edilen total RNA'ların % 1,2'lik formaldehitli agaroz jeldeki görünümü. M: "High Range" standart RNA, a) 1: DR41-S22, 2: DR41-S25, 3: pREP42/*S. pombe*, b) 1: GR8-S2, 2: pREP42/*S. pombe*, c) 1 MR4-S1, : 2: pREP42/*S. pombe* klonlarından elde edilen total RNA'lar.

Şekil 4.25.a,b ve c'de gözlenen RNA'lar kapiller sistem kullanılarak naylon membranlara aktarıldılar (Bölüm 3.13.2). Northern melezlemede Bölüm 3.13.1'de açıklandığı şekilde DIG ile işaretlenen *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genleri prob olarak kullanıldı. Membranlar, yıkama işlemlerinin ardından anti-DIG alkalin fosfataz substratı ile reaksiyona sokuldular (Bölüm 3.13.3).

Membranlarda, *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerine özgü mRNA'ların varlıklarını kesin biçimde işaret edecek belirgin bir renk oluşumu gözlenemedi.

4.3.2 RT-PCR Tekniği ile Transkripsiyon Analizi

DR41-S22, GR8-S2, MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* klonlarından izole edilen total RNA'ların, Tablo 3.15'de içeriği verilen karışımlar hazırlanarak ve Tablo 3.16'da verilen koşullarda, RT-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda kalıp olarak DR41-S22 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* ırklarına ait RNA'ların kullanımıyla elde edilen sonuçlar Şekil 4.26.a'da, kalıp olarak MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* ırklarına ait RNA'ların kullanımıyla elde edilen sonuçlar da Şekil 4.26.b'de verildi.



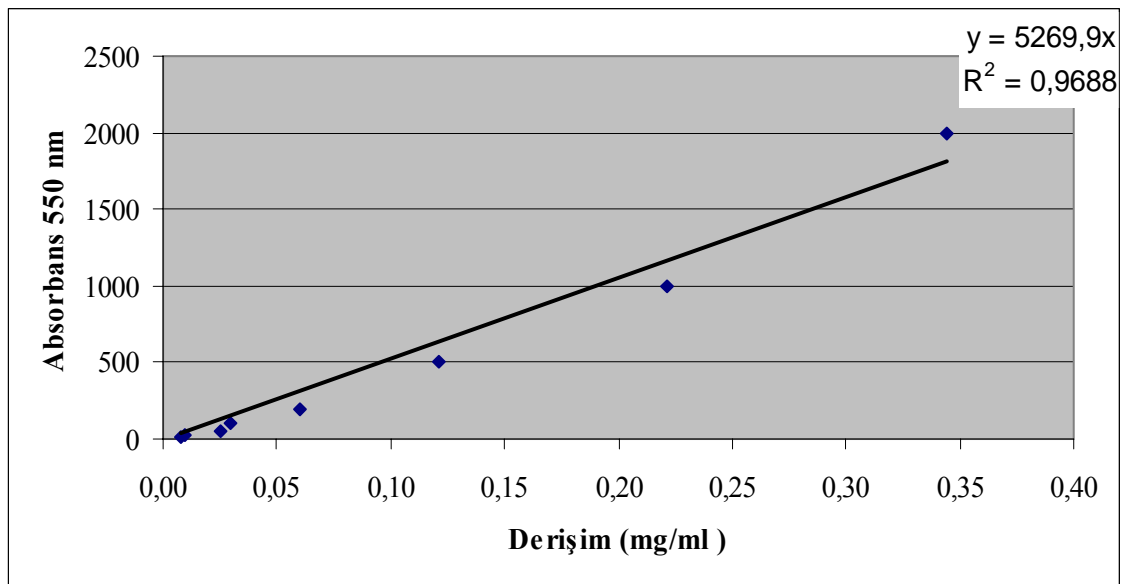
Şekil 4.26: DR41-S22, MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* klonlarından izole edilen RNA'larının RT-PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü. M1: λ /Hind III standart DNA'sı, M2: 1kb Standart DNA'sı, a)1: pREP42/*S. pombe ura4-D18*, 2: DR41-S22, b) 1: MR4-S1, 2: pREP42/*S. pombe ura4-D18* ırklarının RT-PCR örnekleri.

Şekil 4.26.a'da *dhr1* genini içeren DR41-S22 ile Şekil 4.26.b'de *myr1* genini içeren MR4-S1 klonlarında bu genlerin transkripsiyon ürünleri olan mRNA'larının sentezlendiği yaklaşık 1500 bç'lik DNA bantlarının gözlenmesi ile belirlendi. Bununla birlikte, aynı analiz, *glu1* genini içeren GR8-S2 ırkı için de yapıldığında RT-PCR ürünlerinin ayrıldığı agaroz jelde bant oluşumu gözlenemedi.

4.3.3 SDS-PAGE ve Western Melezleme ile Translasyon Analizi

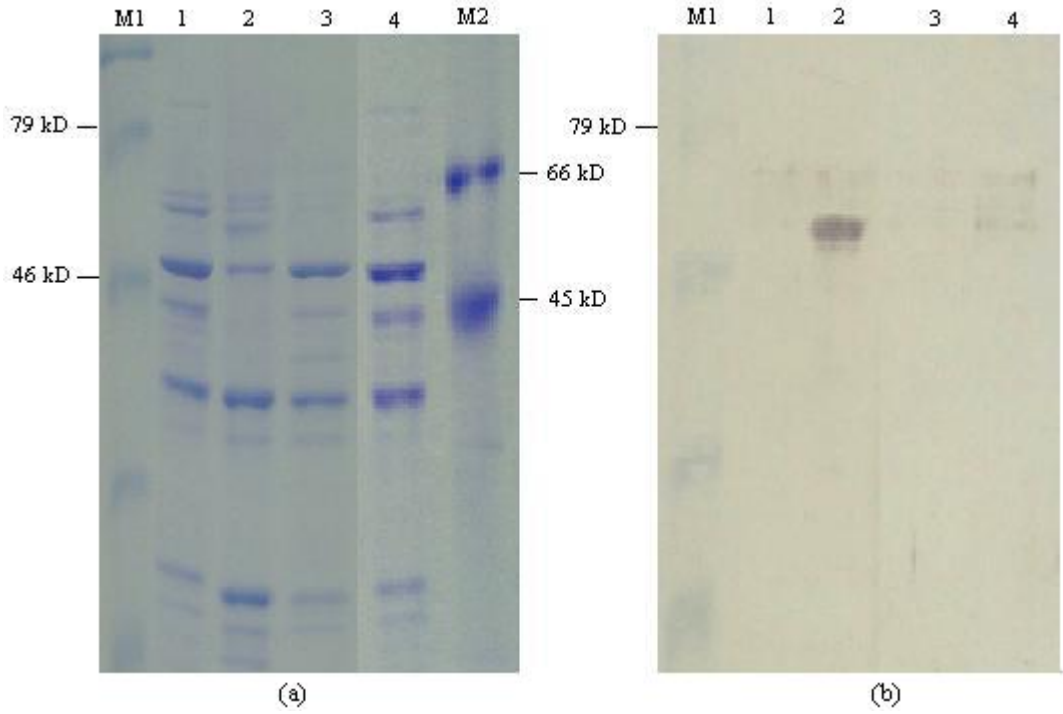
Tablo 4.2’de verilen rekombinant *S. pombe* klonları arasında, DR41-S22, GR8-S2, MR4-S1 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18* klonlarından Bölüm 3.14.1’de açıklandığı şekilde hazırlanan protein özütlerinin hem ham olarak hem de % 35-55 aseton uygulamasından sonraki derişimleri, Şekil 4.24’de verilen standart grafik kullanılarak belirlendi.

Standart grafik, derişimi bilinen BSA çözeltilerinin 550 nm dalga boyunda alınan absorbans değerlerine göre çizildi (Şekil 4.27). Daha sonra, protein örneklerinin 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen bu değerlerden suda çözünebilen proteinlerin derişimleri, standart grafik yardımıyla hesaplandı.



Şekil 4.27: Derişimi bilinen BSA çözeltilerinin 550 nm dalga boyunda alınan absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik.

S. pombe transformantlarından (DR41-S22, MR4-S1, GR8-S2 ve pREP42/*S. pombe ura4-D18*) izole edilen protein özütleri, % 35-55 aseton uygulamasıyla kısmi olarak saflaştırıldıktan (Bölüm 3.13.1) sonra, Bölüm 3.13.3’de belirtildiği gibi hazırlanan 2 adet maxi jele, her bir cebe 10 µg protein olacak şekilde uygulandı. Her iki jele aynı koşullarda elektroforez işlemi uygulandı. Daha sonra, bu jellerden biri “Coomassie” boyama yöntemi ile boyanırken (Bölüm 3.13.4) (Şekil. 4.28.a), diğeri anti-mısır β-glukozidaz serumunun kullanıldığı Western melezleme işleminde kullanıldı (Bölüm 3.13.5) (Şekil 4.28.b).



Şekil 4.28: *S.pombe* rekombinant klonlarından elde edilen protein özütlerinin elektroforetik analizi. a): SDS-PAGE’de ayrılan proteinlerin “Coomassie” boyama ile elde edilen sonuçları. b): Western melezleme sonuçları. M1: Standart proteinler (“MBI-Prestaining Molecular Weight Marker”), M2: Sigma-MW-70L standart proteinleri, 1: pREP42/*S. pombe ura4-D18*; 2: DR41-S22; 3: MR4-S1; 4: GR8-S2. Uygulanan örnekler, % 35-55 aseton çöktürmesi ile elde edildi ve her bir cepte 10’ar μg protein olacak şekilde yükleme yapıldı.

Şekil 4.28.a’da 46-66 kD’luk proteinlerin bulunduğu aralıkta, 2 (DR41-S22), 3 (MR4-S1) ve 4 (GR8-S2) no.lu örneklerin oluşturduğu protein bantları 1 (pREP42/*S. pombe ura4-D18*) no.lu örneğin oluşturduğu protein bantlarıyla karşılaştırıldı. Tüm örneklerde yaklaşık 50 kD’luk birer bant görüldü. Ayrıca, 1 no.lu örneğin yaklaşık 60 ve 65 kD’luk iki bant, 2 no.lu örneğin bu iki banta ek olarak daha hafif bir protein bantına daha sahip olduğu gözlemlendi. Ancak, 3. örnekte bantlar belirgin olarak görülemedi. 4. örnekte ise yaklaşık 60 ve 65 kD’luk iki bant gözlemlendi ve hafif olan bantın daha belirgin olduğu belirlendi.

Western melezlemede tüm örneklerde, farklı yoğunlukta olmakla birlikte, yaklaşık 65 kD’luk protein(ler)in biriktiği bölgede bir işaretlenmenin olduğu gözlemlendi. 2, 3 ve 4 no.lu örneklerde ise bu işarete ek olarak daha küçük molekül ağırlıklı proteinlerin bulunduğu bölge iki işaretlenmenin daha bulunduğu görüldü. 4. örnekte bu işaretlenme(ler)in belirgin, 3. örnekte ise belirgin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.28.b).

4.3.4 Enzim Aktivitesi Analizi

S. bicolor'un *dhr1*'i içeren DR41-S22, *Z. mays*'ın *glu1*'i içeren GR8-S2, ve *S. alba*'nın *myr1*'i içeren MR4-S1 *S. pombe* rekombinantlarından ve sadece pREP42'yi içeren *S. pombe ura4-D18* klonundan elde edilen ham ve % 35-55 aseton uygulamasıyla kısmi olarak saflaştırılmış protein özütleri (Bölüm 3.13.1), Bölüm 3.13.6'da belirtilen enzim aktivitesi ölçümlerinde, enzim kaynağı olarak kullanıldı.

DR41-S22 ile pREP42/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından elde edilen protein özütlerindeki dihurinaz (β -glukozidaz) aktivitesi, dihurin doğal substratı kullanılarak, GR8-S2 ile pREP42/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından elde edilen protein özütlerindeki β -glukozidaz aktivitesi, pNPG ve oNPG yapay substratları kullanılarak, hem spektrofotometrik olarak (Bölüm 3.13.6.1) hem de glukoz belirlemesi testi (Bölüm 3.13.6.2) ile araştırıldı.

MR4-S1 ile pREP42/*S. pombe ura4-D18* transformantlarından elde edilen protein özütlerindeki mirosinaz aktivitesi ise sinigrin doğal substratı kullanılarak glukoz belirlemesine dayanan yöntem ile analiz edildi.

Rekombinant klonların hiç birinde uygulanan iki yöntemle de β -glukozidaz aktivitesi saptanamadı. Aynı şekilde, kontrol olarak kullanılan *S. pombe*'nin yabani ırkı (972 h) ve sadece pREP42'yi içeren urasil mutantında (*S. pombe ura4-D18*) çalışmada kullanılan tüm substratlarla (dihurin, pNPG, oNPG ve sinigrin) yapılan enzim aktivitesi testlerinde de aktivite belirlenemedi. Bununla birlikte, *Z. mays*'ın *glu1* genini *E. coli* için geliştirilmiş olan pET21 ekspresyon vektöründe klonlanmış olarak taşıyan rekombinant *E. coli* klonundan (Çiçek ve Esen, 1998b) elde edilen ham protein özütünde aynı analiz spektral yöntemle yapıldığında ise iki substrat içinde anlamlı derecede β -glukozidaz aktivitesi belirlendi (oNPG için $OD_{410} = 0,954$, pNPG için de $OD_{410} = 0,795$). Kısmen saflaştırılan protein özütlerinde bu aktivitenin yaklaşık iki kat arttığı bulundu.

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerde genetik düzeyde çalışmaların uygulanması karmaşık yapıları nedeniyle zor olduğundan, bitkisel genlerin özellikle işlevsel analizlerinin yapılmasında, konak olarak basit yapılı tek hücreli organizmaların kullanıldığı heterolog gen anlatım sistemlerinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Moleküler biyolojik yöntemlerin kolaylıkla uygulanabildiği tek hücreli bir ökaryot olan *Schizosaccharomyces pombe*, özellikle memelilere ait genlerin heterolog anlatımı için son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. (Giga-Hama ve Kumagai, 1999).

Bu çalışmada, *S. pombe*'nin bitkisel kökenli genlerin heterolog anlatımında uygun bir model sistem olarak kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla, β -glukozidaz enzimini şifreleyen *Sorghum bicolor*'un *dhr1*, *Zea mays*'ın *glu1* ve *Sinapis alba*'nın *myr1* genleri iki farklı ekspresyon vektöründe klonlandıktan sonra *S. pombe*'ye transfer edildi. Elde edilen *S. pombe* rekombinantlarında bu yabancı genlerin anlatım yapıp yapmadığı transkripsiyon ve translasyon düzeylerinde araştırıldı.

Çalışmada kullanılan *dhr1* geni dihurinaz 1 (Dhr1), *glu1* geni DIMBOA- β -glukozidaz 1 (Glu1) ve *myr1* geni de mirosinaz 1 (Myr1) izozimlerini şifrelemektedir (Esen, 1993). Glukozid hidrolaz ailelerinden 1.'sine dahil olan bu enzimlerden Dhr1 ve Glu1 O-bağlı β -glukozidazlar, Myr1 ise S-bağlı β -glukozidazlar grubuna girerler; ayrıca, Dhr1 siyanogenik özelliktedir. Anlatımları araştırılacak genler, şifreledikleri enzimlerin yapılarının farklı olmasının yanı sıra, farklı substrat özgüllüğü sergilemeleri ve hidrolizledikleri substratlarına bağlı olarak önemli işlevler yapmaları nedenleriyle seçildiler.

dhr1, *glu1* ve *myr1* genlerinin cDNA'ları, *S. pombe* ekspresyon vektörlerinde klonlanmak için önce genlere özgü primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. PCR işleminde DNA polimeraz enzimi olarak *Pfu* DNA polimeraz kullanıldı. Bu enzim aktivite göstermesi için, *Taq* DNA polimeraza göre daha duyarlı olarak hazırlanan

reaksiyon koşullarını gerektirmekle beraber, çok doğru biçimde sentez yapabildiği ve 5'-PO₄ grubu içermeyen küt uçlu PCR ürünleri oluşturabildiği için tercih edildi. *Pfu* DNA polimeraz küt uç oluşturma işlevini, sentezlediği PCR ürünlerinin her iki ucuna ortamda bulunan 4 çeşit dNTP'den ekleyerek ("PCR Polishing") gerçekleştirmektedir (Costa ve Weiner, 1994). Böylece bu enzimle elde edilen PCR ürünleri, herhangi bir enzim uygulamasına gerek duyulmadan doğrudan küt uçlu doğrusal bir plazmidde klonlanabilmektedir. Bu genlere özgü primerlerle gerçekleştirilen PCR'de elde edilen ürünlerin, % 1'lik agaroz jelde oluşturdukları yaklaşık 1500 bç'lik bantların gözlenmesiyle (Şekil 4.1), *dhr1*, *glu1* ve *myr1*'e ait oldukları sonucuna varıldı. 1983 bç uzunluğunda olan *dhr1* geni cDNA'sının 1542 bç'lik bölgesinin (Çiçek ve Esen, 1998a), 1931 bç'lik *glu1* geni cDNA'sının 1536 bç'lik bölgesinin (Esen ve Shahid, 1992) ve 1742 bç'lik *myr1* geni cDNA'sının da 1581 bç'lik bölgesinin (Xue ve diğ., 1992) aktif proteinlere ait amino asit dizilerini şifrelediği bilinmektedir.

S. pombe'de heterolog anlatımları yapılması hedeflenen bitki β -glukozidazlarının bu yabancı konakta toksik etki gösterip göstermeyeceği bilinmediğinden, bu enzimleri şifreleyen genlerin *S.pombe*'de klonlanmalarında sürekli anlatım yapan (konstitütif) promotörü olan pART1 ve kontrol edilebilir promotörü olan pREP42 ekspresyon plazmidleri kullanıldı. pART1'de, alkol dehidrogenaz enzimini şifreleyen genin sürekli anlatım yapan (konstitütif) *adh1* promotörü (McLeod, 1987), pREP42'de ise, tiamin pirofosfatı şifreleyen genin anlatımı tiamin ile düzenlenebilen *nmt1* promotörü (Maundrell, 1993) bulunmaktadır.

S. pombe'de transformasyon ilk olarak Beach ve Nurse (1981) tarafından sferoblast yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, elektroporasyon (Hood ve Stachow, 1989; Prentice, 1992) ve lityum asetat (Okazaki ve diğ.,1990; Broker, 1993; Warshawsky ve Miller, 1994) yöntemleri geliştirmiştir. Bu çalışmada, *dhr1* ve *glu1* genlerinin pART1 ekspresyon vektöründe klonlanması ile oluşturulan rekombinant plazmidlerden pDA27 ve pGA2 DNA'ları önce lityum asetat yöntemi ile *S. pombe leu1-32* ırkına transfer edildi ve transformasyon etkinliğinin, yaklaşık 10^2 transformant/ μ g DNA olduğu hesaplandı. Prentice (1992), elektroporasyonla transformasyon etkinliğinin daha yüksek (10^4 - 10^5 transformant/ μ g DNA) olduğunu bildirdiği için, bu plazmidler daha sonra

Forsburg (2004) tarafından verilen elektroporasyon yöntemine (<http://pingu.salk.edu/~forsburg/lab.html>) göre *S. pombe*'ye aktarıldılar. Bu yöntemle daha yüksek transformasyon etkinliğinin (10^4 transformant/ μg DNA) elde edilmesi nedeniyle, *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin pREP42 vektöründe klonlanması ile elde edilen plazmidlerden pDR41, pGR8 ve pMR4'ün de *S. pombe*'ye transferinde elektroporasyon yöntemi uygulandı ve transformasyon etkinliğinin 10^5 transformant/ μg DNA olduğu belirlendi.

pART1 ekspresyon vektörünün kullanıldığı klonlama çalışmalarında, *dhr1* ve *glu1* genlerini içeren pDA27 ve pGA2 rekombinant plazmidlerinin *S. pombe leu1-32*'ye aktarılması sonucu oluşan transformantlarda yabancı genlerin (*dhr1*, *glu1*) varlığı, önce doğrudan koloni PCR ile daha sonra da rastgele seçilen transformantlardan izole edilen plazmid ve genomik DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR ile araştırıldı. Yüksek sayılabilecek transformasyon etkinliğine (yaklaşık 10^4 transformant/ μg DNA) rağmen *S. pombe* transformantlarında *dhr1* ve *glu1* genlerinin varlığı gösterilemedi.

pREP42 ekspresyon vektöründeki klonlama çalışmaları ile elde edilen *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerini içeren, sırasıyla pDR41, pGR8 ve pMR4 rekombinant plazmidlerinin *S. pombe ura4-D18* ırkına aktarımıyla oluşan transformantlar arasından rastgele seçilenler, bu genlere özgü primerlerin kullanıldığı koloni PCR ile tarandı. pDR41 rekombinant plazmidini içeren 2 adet (DR41-S22 ve DR41-S25) (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17), pGR8 rekombinant plazmidini içeren 3 adet (GR8-S2, GR8-S6 ve GR8-S9) (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19) ve pMR4 rekombinant plazmidini içeren 5 adet (MR4-S1, MR4-S2, MR4-S3, MR4-S4 ve MR4-S5) (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21) *S. pombe* klonunun elde edildiği, koloni PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde oluşturdukları yaklaşık 1500 bp'lik bantların gözlenmesiyle kanıtlandı.

S. pombe'nin pDA27 ve pGA2 rekombinant plazmidleriyle transformasyona uğratılması sonucu elde edilen transformantlarda yabancı genlerin bulunmamasının, bu rekombinant plazmidlerin oluşturulduğu pART1 vektöründeki *adh1* promotöründen kaynaklanabileceği düşünüldü. Bu plazmidlerle yapılan klonlama çalışmalarında *S. pombe* transformantlarının ilk seçimi, minimal besi ortamında yapıldı. Transformantların arasında yabancı genleri taşıyan klonlarda bu genlerin anlatımlarının

da *adh1* promotörü ile konstitütif olarak yapıldığından heterolog proteinlerin, transformasyon sonrasında daha ilk aşamada konak hücre üzerinde olumsuz bir etki yaratarak yaşama şansını azaltmış olabileceği biçiminde yorumlandı. Düzenlenebilen *nmt1* promotörünü içeren pREP42’de oluşturulan rekombinant plazmidlerle gerçekleştirilen transformasyonlarda, yabancı genleri (*dhr1*, *glu1* ve *myr1*) içeren rekombinant klonların elde edilmiş olması, bu yorumu kanıtlayabilecek bir bulgu olarak kabul edildi. pREP42 kullanımıyla elde edilen transformantların ilk seleksiyonunun tiamin içeren minimal besi ortamında yapılması nedeniyle bu transformantlarda heterolog gen anlatımı tiamin tarafından baskılandığından, rekombinant klonlarda bu genlerin ürünlerinin yabancı konaktaki olası toksik etkilerinin engellendiği düşünüldü.

pREP42 vektöründe oluşturulan rekombinant plazmidlerle elde edilen *S. pombe* klonlarında *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin heterolog anlatımları, öncelikle transkripsiyon düzeyinde Northern melezleme ve RT-PCR teknikleri ile analiz edildi. DIG ile işaretli problemlerin kullanıldığı, Northern melezlemede membranlarda yabancı genlere özgü mRNA’ların varlığını kesin biçimde işaret edecek belirgin bir renk oluşumu gözlenmedi. Northern melezleme tekniğinin duyarlılığı, kullanılan problemlerin işaretlenmesinin radyoaktif ve immünolojik olarak yapılmasına göre değişmektedir. Digoksijenin veya biotin işaretli problemlerin, çalışmalarda özel laboratuvar koşulları gerektirmemeleri nedeniyle sıklıkla kullanılmakla birlikte, radyoaktif işaretli olanlardan daha düşük duyarlılık gösterdikleri bilinmektedir (Rzezutka ve Mızak, 2003). RT-PCR tekniği ise, tek bir hücrede bulunan RNA miktarının bile saptanabilmesine olanak verdiğinden, RNA analizinde çok daha duyarlı ve kuvvetli bir araç olarak kabul edilmektedir (Freeman ve diğ., 1999). Bu çalışmada da *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerinin varlığı bu genlere özgü primerlerin kullanıldığı RT-PCR ile kesin biçimde gösterildi. Şekil 4.26.a ve b’de görüldüğü gibi, *dhr1* genini içeren DR41-S22 ve *myr1* genini içeren MR4-S1 klonlarında genlerin transkripsiyon düzeyinde anlatım yaptığı, genlere özgü yaklaşık 1500 bp’lik cDNA bantlarının gözlenmesi, buna karşın, negatif kontrol olarak kullanılan sadece pREP42’yi taşıyan *S. pombe* transformantında (pREP42/*S. pombe ura4-D18*) hiç bir bant oluşumunun görülmemesi ile belirlendi. İki ayrı teknikte elde edilen bulgular arasındaki farklılık, bu genlerin yabancı konaktaki transkripsiyon aktivitelerinin düşük olduğunu düşündürdü.

Transkripsiyon aktivitesi gösterilen *dhr1* genini içeren DR41-S22, *myr1* genini içeren MR4-S1 klonları ile *glu1* genini içeren GR8-S2 klonunda bu genlerin anlatımları protein düzeyinde elektroforetik analiz ve enzim aktivite deneyleri ile araştırıldı. % 35-55 aseton uygulamasıyla kısmen saflaştırılmış suda çözünebilen proteinlerin SDS/PAGE’de yapılan analizlerinde, 46-66 kD’luk proteinlerin ayrıldığı bölgede *dhr1* genini içeren DR41-S22 transformantına ait örnekte, diğer rekombinant klonlara ait örneklerde bulunmayan ek bir bant gözlemlendi (Şekil 4. 28.a). SDS-PAGE’de ayrılan protein bantlarının immünolojik olarak belirlenmesinde her üç genin şifrelediği polipeptid dizileri için anti-mısır β -glukozidaz serumu kullanıldı. Western melezleme sonucunda tüm protein örneklerinde, farklı yoğunluklarda olmakla birlikte, yaklaşık 65 kD’luk protein(ler)in bulunduğu bölgede işaretlenmenin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.28.b). Bu bölgedeki proteinlerde meydana gelen işaretlenmenin çapraz aktiviteden (Stewart ve Schuler, 1989; Mithöfer ve diğ., 1999) ileri gelebileceği düşünüldü.

S. pombe’de bulunan β -glukozidaz enzim(ler)ini şifreleyen gen(ler) işlevsel olarak ne biyokimyasal ne de moleküler düzeyde henüz tanımlanmamıştır. Sadece, *S. pombe*’nin dizilenmesi tamamlanmış olan genomunda (Wood ve diğ., 2002), II. Kromozom da SPBC1683.04 olarak adlandırılan bir genin glikozid hidrolaz ailelerinden 3. aileye dahil β -glukozidaz enzimini şifrelediği öngörülmüştür (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Bu olası β -glukozidaz enziminin amino asit dizisi ile Dhr1, Glu1 ve Myr1 enzimlerinin dizileri “ClustalW” programı (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>) kullanılarak karşılaştırıldı. *S. pombe*’nin β -glukozidazı ile Dhr1 arasında % 6, Glu1 arasında % 4, ve Myr1 arasında % 12 gibi çok düşük oranlarda amino asit dizi benzerliği saptandı. Çapraz aktivitenin gözlenebilmesi için en azından % 30 dizi benzerliğinin gerekli olduğu bilindiğinden (Asım Esen, kişisel iletişim) Western melezlemede tüm örneklerde gözlenen ortak işaretlenmenin *S. pombe* β -glukozidazına ait olmadığını düşündürdü. *S. pombe* “Blast Server” (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast>) kullanılarak, Glu1’in amino asit dizisi ile *S. pombe*’de şifrelenen tüm proteinlerin amino asit dizileri karşılaştırıldığında, yüksek derecede benzerlik gösteren iki gen belirlendi. Bunlar, % 68 benzerlik gösteren, fosfotidilinositolün transferi ile ilgili olduğu düşünülen sec14 sitosolik faktöre ait SPAC3H8.02 geni ve % 66 benzerlik gösteren, gliserofosfolipid sentezi ile ilgili olduğu düşünülen kolin fosfat sitidililtransferaza ait

SPCC1827.02c genleridir. Bu benzerliğin, Western melezlemede tüm örneklerde görülen ortak işaretlenmeye yol açmış olabileceği kabul edildi.

DR41-S22'ye ait protein örneğinde 65 kD'dan daha küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ayrıldığı bölgede iki ayrı işaretlenme daha gözlemlendi. Bunlar arasında da özellikle küçük molekül ağırlıklı olanın çok yoğun olduğu görüldü. MR4-S2 klonunun protein örneğinde ise daha hafif proteinlere ait olan oldukça silik iki işaret gözlenirken, GR8-S2'ye ait örnekte aynı yerde daha belirgin 2 işaretin olduğu görüldü. (Şekil 4.28.b). Western melezlemede gözlenen bantlar arasındaki yoğunluk farkının melezleme çalışmasında kullanılan anti-mısır β -glukozidaz serumunun Dhr1, Glu1 ve Myr1 enzimlerine ait polipeptid dizileriyle olan amino asit dizi benzerliğinden ileri geldiği düşünüldü. Dhr1 ile Glu1 enzimleri arasında % 70 amino asit dizi benzerliği (Çiçek ve Esen, 1998a) bulunurken, Glu1 ile Myr1 arasında % 35 amino asit dizi benzerliği (Burmeisster ve diğ., 1997) olduğu bilinmektedir. *S. bicolor*'un *dhr1* geninin şifrelediği Dhr1 enziminin 58 kD (Hösel ve diğ., 1987) ve *Z. mays*'ın *glu1* geninin şifrelediği Glu1'inin de 60 kD (Esen, 1992) olduğu, bilinmektedir. *S. alba*'nın *myr1* geninin şifrelediği Myr1'in 75 kD olduğu anlaşılmıştır (Xue ve diğ., 1992).

Western melezlemede elde edilen bulgulara göre, *myr1* geninin *S. pombe*'de translasyon düzeyinde heterolog anlatım yaptığı tam olarak belli olmamakla birlikte, *dhr1* ve *glu1* genlerinin başarılı şekilde anlatım yaptıkları ortaya çıktı. Bununla birlikte, *dhr1*, *glu1* ve *myr1* genlerini içeren sırasıyla DR41-S22, GR8-S2 ve MR4-S1 klonlarından elde edilen protein özütlerinde yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde klonların hiçbirinde aktivite belirlenemedi; buna göre heterolog proteinlerin aktif olmadıkları anlaşıldı.

Tek çenekli bitkilere ait DIMBOA- β -glukozidaz ve dihurinaz enzimlerinin aktif formlarının oluşturulmasında translasyon sonrası glikozillenmeleri gerekmediği için bu genlerin prokaryotik organizmalarda aktif rekombinant proteinleri meydana getirebildikleri bilinmektedir. Örneğin, *Z. mays*'ın Glu1 ve Glu2 enzimlerini şifreleyen genlerin cDNA'ları *E. coli*'de klonlanmış ve oluşan heterolog enzimlerin doğal (DIMBOA-Glc) ve yapay (oPNG ve pNPG) substratları ile aktiviteleri gösterilmiştir (Çiçek ve Esen, 1998b). Aynı şekilde, DIMBOA- β -glukozidaz ve dihurinaz enzimlerinin substrat özgülüklerinin araştırılmasında, *E. coli* heterolog anlatım sistemi

kullanılmıştır (Çiçek ve diğ., 2000; Verdoucqve diğ., 2003). Ancak, translasyon sonrası glikozillenen β -glukozidazların aktif heterolog anlatımları maya türü ökaryotik bir organizmada yaptırılabilir. Örneğin, *M. esculenta*'nın glikozillenen linamaraz enzimi önce *E. coli*'de pGEX-2T glutatyon S-transferaz vektörü kullanılarak klonlandığında oluşan glikozillenmemiş heterolog proteinin bozuk şekilde katlandığı ve stabil olmadığı gözlenmiş (Kereszteessy ve diğ., 1996), ancak aynı enzimi şifreleyen gen, *S. cerevisiae* SUC2 salgı sinyal dizisini içeren pYX243 vektörü ile *S. cerevisiae*'de klonlandığında aktif heterolog protein elde edilebilmiştir (Kereszteessy ve diğ., 2001). Chen ve Halkier (1999) *Brassica napus*'tan izole edilen mirosinaz (Myr1) enzimini şifreleyen geni, *S. cerevisiae*'de klonladıklarında aktif proteine çevrilebildiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, *Dalbergia cochinchinensis*'de dalkokinaz enzimini şifreleyen gen *Pichia pastoris*'de klonlanmış; bu yabancı konakta salgılanan heterolog enzimin aktivitesinin orjinal bitkiden izole edilenle aynı olduğu vurgulanmıştır (Ketudat Cairns ve diğ., 2000). Yine *Pichia pastoris* ekspresyon sistemi kullanılarak *Prunus serotina*'da bulunan siyonogenik β -glukozidazlardan amigdalin hidrolazı (AH1) ve prunasin hidrolazı (PH2 ve PH4) şifreleyen toplam üç genin heterolog anlatımları yaptırılmış ve katalitik aktiviteleri çeşitli substratlarla gösterilmiştir (Zhou ve diğ., 2002).

Bu çalışmada ise ne glikozillenen *myr1* geninin ne de glikozillenmeyen *dhr1* ve *glul* genlerinin *S. pombe*'de aktif protein ürünleri gösterilemedi. Oysa *S. pombe*'de translasyon sonrası modifikasyonların (örneğin glikozillenme) meydana geldiği bilinmektedir (Giga-Hama ve Kumagai, 1997; Egel, 2004). Buna göre, klonlanan genlerin hiçbirine ait aktif proteinlerin varlığının saptanamamasında daha başka nedenlerin olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Özellikle translasyon sonrası meydana gelen değişikliklerde bazı eksikliklerin ya da hataların olabileceği izlenimini uyandırmıştır. Bu noktaları açığa çıkarmak için örneğin, sentezlenen polipeptidlerin hücre dışına salınmasını sağlayan, *S. pombe* için geliştirilmiş salgı tipi ekspresyon vektörlerinde (Siam ve diğ., 2004) klonlanmaları gerektiği yargısına varıldı. Bundan başka, *S. pombe*'nin kendi β -glukozidaz enzimi ile klonlanan genlerin heterolog protein ürünleri arasındaki etkileşimlerinin birtakım olumsuz etkiler yapabileceği ya da *S. pombe*'de β -glukozidaz aktivitesini kontrol eden bir düzenleme sisteminin bulunmasıyla heterolog proteinlerin aktif ürünlerinin oluşumunun engellendiği

düşünüldü. Çünkü, çok yeni bir çalışmada *Capsicum annum* (kırmızı biber)'a ait olan ve karotenoid biyosentez yolunda yer alan geranil geranil profosfat sentaz (GGPPS) enziminin cDNA'sının karotenoid biyosentez yolu bulunmayan *S. pombe*'de anlatımı konstitütif promotörü olan pART1 aracılığıyla başarılmıştır (Günel, 2004).

Sonuç olarak, *S. pombe*'de klonlanan bitki β -glukozidaz genlerinin heterolog anlatımları aktif proteinlerin oluşması şeklinde başarıldığında, β -glukozidazların özellikle işlevsel analizlerinin yapılmasına olanak verecek düzeyde bol aktif enzimler elde edilebilecektir. Bu şekilde, yönlendirilmiş mutagenез, ya da kimerik enzim elde etme gibi çalışmalarda istenen özelliklerde enzimlerin elde edilmesi ve çoğaltılması da sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

- ADAM, A.C., RUBIO-TEXEIRA, M., POLAINA, J., 1995, Induced expression of bacterial β -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 11(5), 395-406.
- ALBAYRAK, G., GÖZÜKIRMIZI, N., 2001, Assessment of differential expression of chitinase genes using RT-PCR in chickpea, *Biotechnol. And Biothechol. Eq.*, 15, 90-92.
- AMBERG, D., 2004a, colony PCR. http://www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/colony_pcr.html
- AMBERG, D., 2004b, Izolation of yeast genomic DNA. http://www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/yeast_genomic_DNA.html
- BABCOCK, G., ESEN, A., 1994, Substrat specificity of maize β -glucosidase, *Plant Sci*, 101, 31-39.
- BACANAMWO, M., WITTE, C.P., LUBBERS, M.W., POLACCO, J.C., 2002, Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean, *Mol. Genet. Genomics*, 268, 525-534.
- BAKER, J. E., 1991, Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, *Insect Biochem.*, 21, 615-621.
- BANDARANAYAKE, H., ESEN, A., 1996, Nucleotide sequence of a second β -glucosidase (glu2) cDNA from maize (*Zea mays* L.) (Accession Number: U44087), *Plant Physiol*, 110, 1048.
- BARBET, N., MURIEL, W.J., CARR, A.M., 1992, Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*, *Gene*, 114(1), 59-66.
- BARNETT, C.B., BERKA, R., FOWLER, T., 1991, Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates, *Bio./Techn.*, 9, 562-567.
- BARRETT, T., SURESH, C.G., TOLLEY, S.P., DODSON, E.J. HUGHES, M.A., 1995, The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase, *Structure*, 3, 951-960.
- BEACH, D., NURSE, P., 1981, High frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 290,140-142.

BENITEZ, J., SILVA, A., VASQUEZ, R., NOA, M.D., HOLLENBERG, C.P., 1989, Secretion and glycosylation of *Clostridium thermocellum* endoglucanase A encoded by the *celA* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 5, 299-306.

BERRIN, J.G., McLAUCHLAN, W.R., NEEDS, P., WILLIAMSON, G., PUIGSERVER, A., KROON, P.A., JUGE, N., 2002, Functional expression of human liver cytosolic β -glucosidase in *Pichia pastoris*: insights into its role in the metabolism of dietary glucosides, *Eur. J. Biochem.*, 269, 249-258.

BERRIN, J.G., CZJZEK, M., KROON, McLAUCHLAN, W.R., P. PUIGSERVER, A., A., WILLIAMSON, G., JUGE, N., 2003, Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic β -glucosidase, *Biochem. J.*, 373, 41-48.

BHAT, M.K., BHAT, S., 1997, Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnology Advances*, 15(3/4), 583-620.

BLANCHARD, D.J., ÇİÇEK, M., CHEN, J., ESEN, A., 2001, Identification of β -glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize β -glucosidase, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11895-11901.

BLAST SERVER, 2004, (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast>)

BROKER, M., 1993, Rapid transformation of cryopreserved competent *Schizosaccharomyces pombe* cells, *Biotechniques*, 15, 598-600.

BURMEISTER, W.P., COTTAZ, DRIGUEZ, H., IORI, R., PALMIERI, S., HENRISSAT, B., 1997, The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase, *Structure*, 5(5), 663-675.

BURMEISTER, W.P., COTTAZ, S., ROLLIN, P., VASELLA, A., HENRISSAT, B., 2000, High resolution x-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39385-39393.

CALLARD, D., AXELOS, M., MAZZOLINI, L., 1996, Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence, *Plant Physiol.*, 112, 705-715.

CHADCHAWAN, S., BISHOP, J., TANGSTAD, O. P., BONES, A.M., MITCHELL-OLDS, T., BRADLEY, D., 1993, *Arabidopsis* cDNA sequence encoding myrosinase, *Plant Physiol*, 103, 671-672.

CHEN, S., HALKIER, B., 1999, Functional expression of the myrosinase MYR1 from *Brassica napus* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*. 17, 414-420.

CHO, K.M., YOO, Y.J., KANG, H.S., 1999, δ -integration of endo/exo-glucanase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 23-30.

CIAFARDINI, G., ZULLO, B.A., 2002, Microbiological activity in stored olive oil, *International Journal of Food Microbiology*, 75, 111-118.

CLARKE A.J., BRAY, M.R., STRATING, H., 1993, β -glucosidases, β -glucanases and xylanases, 27-41, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

CLUSTALW, 2004, (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>)

CONN, E.E., 1981, Cyanogenic glycosides, 7, 479-500, *The Biochemistry of plants: Secondary plant products*, Academic Press, New York.

CONN, 1993, β -glucosidase in plants: substrate specificity, 15-26, *β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

COSTA, G. L., WEINER, M. P., 1994, Polishing with T4 or polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments, *Nucleic Acids Research*, 22(12), 2423.

CUEVAS, L., NIEMEYER, H. M., JONSSON, L. M. V., 1992, Partial purification and characterization of hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from maize, *Phytochem*, 31, 2609-2612.

CUMMINGS, C., FOWLER, T., 1996, Secretion of *Trichoderma reesei* β -glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, 29(3), 227-133.

CZJZEK, M., ÇIÇEK, M., ZAMBONI, BURMEISTER, W.P., BEVAN, D.R., HENRISSAT, B., ESEN A., 2001, Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl β -D-thioglucoside, *Biochem. J.*, 354, 37-46.

CZJZEK, M., ÇIÇEK, M., ZAMBONI, V., BEVAN, D.R., HENRISSAT, B., ESEN A., 2000, The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *PNAS*, 97(25), 13555-13560.

ÇIÇEK, M., ESEN, A. 1998a, Structure and expression of dhurrinase (β -glucosidase) from sorghum. *Plant Physiol.*, 116, 1469-1478.

ÇIÇEK, M., ESEN, A. 1998b, Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) β -glucosidases in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(4), 392-400.

ÇİÇEK, M., 1999, *Mechanism of substrate specificity and catalysis I retaining β -glucosidases from maize and sorghum*, Thesis (PhD), Virginia Polytechnic Institute and State University.

ÇİÇEK, M., BLANCHARD, D., BEVAN, D.R., ESEN, A. 2000, The aglycone specificity-determining sites are different in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (maize β -glucosidase) and dhurrinase (sorghum β -glucosidase), *J. Biol. Chem.*, 275(26), 20002-20011.

DANIELS, L.B., COYLE, P.J., CHIAO, Y.B., GLEW, R.H., LABOW, R.S., 1981, Purification and characterization of cytosolic broad specificity β -glucosidase from human liver, *J. Biol. Chem.*, 256, 13004-13013.

DHARMAWARDHANA, D.P., ELLIS, B.E., CARLSON, J.E., 1995, A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin, *Plant Physiol.*, 107, 331-339.

DUNN, M.A., HUGHES, M.A., SHARIF, A.L., 1988, Synthesis of the cyanogenic beta-glucosidase, linamarase, in white clover. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 561-568.

EGEL R., 2004. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Springer-Verlag, Berlin, 3-540-00693-1.

EMBO Practical Course, Molecular genetics with the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, 1996-June-Copenhagen-Denmark.

ERIKSSON, S., ANDREASSON, E., EKBOM, B., GRANER, G., PONTOPPIDAN, B., TAIPALENSUU, J., ZHANG, J., RASK, L., MEIJER, J., 2002, Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins, *Plant Physiology*, 129, 1592-1599.

ESEN, A., BANDARANAYAKE, H., 1998, Insertional polymorphism in introns 4 and 10 of the maize β -glucosidase gene *glu1*. *Genome*, 41, 597-604.

ESEN, A., BLANCHARD, D., 2000, A specific β -glucosidase-aggregating factor is responsible for the β -glucosidase null phenotype in maize, *Plant Physiology*, 122, 563-572.

ESEN, A., GÜNGÖR, G., 1993, Stability and activity of plant and fungal β -glucosidases under denaturing conditions, 214-239, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

ESEN, A., 1992, Purification and characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase, *Plant Physiol.*, 98, 174-182.

ESEN, A., 1993, β -Glucosidases, 1-14, *β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington, 0-8412-2697-0.

ESEN, A., SHAHID, M., 1992, Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.), *Plant Physiol*, 98, 174-182.

ESEN, A., STETLER, D.A., 1993, Subcellular localization of maize β -glucosidase, *Maize Genet. Coop. News lett.*, 67, 19-20.

FALK, A., XUE, J., LENMAN, M., RASK, L., 1992, Sequence of a cDNA clone encoding the enzyme myrosinase and expression of myrosinase in different tissues of *Brassica napus*, *Plant Science*, 83, 181-186.

FALK, A., RASK, L., 1995, Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*, *Plant Physiol*, 108, 1369-1377.

FENWICK, G.R., HEANEY, R.K., MULLIN, W.J., 1983, Glucosinolates and their breakdown products in food plants, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18, 123-201.

FORSBURG, S., 2004, Electroporation, <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/tfmn.html>

FOWLER, T., 1993, Deletion of the *Trichoderma reesei* β -glucosidase gene bgII, 56-65, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

FREEMAN, W., WALKER, S.J., VRANA, K.E., 1999, Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential, *BioTechniques*, 26, 112-125.

GENEDB, 2004, Sanger Institute, <http://www.genedb.org>

GIGA-HAMA, Y., KUMAGAI, H., 1997, *Foreign gene expression in fission yeast: Schizosaccharomyces pombe*, Springer-Verlag and Landes Bioscience, Germany, 3-540-63270-0.

GIGA-HAMA, Y., KUMAGAI, H., 1999, Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 235-244.

GLEW, R. H., GOPALAN, V., FORSYTH, G. W., VANDERJAGT, D. J., 1993, The mammalian cytosolic broad-specificity β -glucosidase, 83-112, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

GOPOLAN, V., PASTUSZYN, A., GALEY, W.R., GLEW R.H., 1992, Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic β - glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 14027-14032.

GRABOWSKI, G.A., BERG-FUSSMAN, A., GRACE, M., 1993, Molecular biology and enzymology of human acid β -glucosidase, 66-82, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

GRABOWSKI, G.A., DINUR, T., OSIECKI, K. M., KRUSE, J.R., LEGLER, G., GATT, S., 1985, Gaucher disease types 1, 2 and 3: differential mutations of the β -glucosidase active site identified with conduritol B epoxide derivatives and sphingosine, *Am. J. Hum Genet*, 37, 499-510.

GUNATA, Y.Z., BAYONOVE, C.L., BAUMES, R., CORDONNIER, R., 1985, The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components, *J. Chromatogr.*, 331, 83-90.

GUTIERREZ, C., CASTANERA, P., TORRES, V., 1988, Wound-induced changes in DIMBOA (2,4 dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4 benzoxazin-3(4H)-one) concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), *Ann. Appl. Biol.*, 113, 447-454.

GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., LOPRIENO, N. 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, 395-446. Handbook of Genetics. King, R.C., Plenum Press, New York.

GÜNEL, T., 2004, (Yayınlanmadı), Biberdeki (*Capsicum annum*) karotenoid genlerinin *Schizosaccharomyces pombe*'de anlatımı, tez (PhD), Fen Bilimleri Enstitüsü.

HA, S-B., SMITH, A.P., HOWDEN, R., DIETRICH, W.M., BUGG, S., O'CONNELL, L., GOLDSBROUGH, P.B., COBBETT, S., 1999, Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *The Plant Cell*, 11, 1153-1163.

HENRISSAT, 2004, Glucoside Hyrolase Families, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/pedro/CAZY/ghfl.html>

HOFFMANN, S.C., WINSTON, F., 1987, A ten minute DNA preparation from efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*, *Gene*, 57, 267-272.

HOGLUND, A.S., LENMAN, M, RASK, L., 1992, Myrosinase is localized to the interior of myrosine grains and is not associated to the surrounding tonoplast membrane, *Plant Sci*, 85, 165-170.

HOOD, M.T., STACHOW, C., 1990, Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation, *Nucleic Acids Res.*, 18 (3), 688.

HOSEL, W., TOBER, I., EKLUND, S.H., CONN, E.E., 1987, Characterization of β -glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L) Moench seedlings, *Arch of Biochem Biophy*, 252, 152-162.

HUGHES, M.A., 1993, Molecular genetics of plant cyanogenic β -glucosidases, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

HUGHES, M.A., BROWN, K., PANCORO, A., MURRAY, S.B., OXTOBY, E., HUGHES, J., 1992, A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz), *Arch. Biochem. Biophys.*, 295, 273-279.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H., 1990, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, 96, 23-28.

JONES, A. M.E., BRIDGES, M., BONES, A.M., COLE, R., ROSSITER, J.T., 2001, Purification and characterization of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 1-5.

JONES, A. M.E., WINGE, P., BONES, A.M., COLE, R., ROSSITER, J.T., 2002, Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 275-284.

KAKES, P., 1985, Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves, *Planta* 166, 156-160.

KERESZTESSY, Z., HUGHES, J., KISS, L., HUGHES, M.A., 1996, Co-purification from *Escherichia coli* of a plant β -glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEL, *Biochem. J.*, 314, 41-47.

KERESZTESSY, Z., BROWN, K., DUNN, M.A., HUGHES, M.A., 2001, Identification of essential active-site residues in the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis, *Biochem. J.*, 353, 199-205.

KETUDAT CAIRNS, J.R., CHAMPATTANACHAI, V., SRISOMSAP, C., WITTMAN-LIEBOLD, B., THIEDE, B., SVASTI, J., 2000, Sequence and expression of Thai rosewood β -glucosidase/ β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein, *Journal of Biochemistry*, 128(6), 999-1008.

LAEMMLI, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

LEAH, R., KIGEL, J., SVEDSEN, I., MUNDY, J., 1995, Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase, *J. Biol. Chem.*, 270, 15789-15797.

LEONI, O., IORI, R., PALMIERI, ESPOSITO, E., MENEGATTI, E., CORTESI, R., NASTRUZZI, 1997, Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and in vitro antiproliferative studies, *Bioorg. Med. Chem.*, 5(9), 1799-1806.

LINDROTH, R.L., 1988, Hydrolysis of phenolic glucosides by midgut β -glucosidases in *Papilio glaucus*, *Insect Biochem* 18, 789-792.

MALBOOBI, M.A., LEFEBVRE, D.D., 1997, A phosphate-starvation inducible β -glucosidase gene (prs3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family, *Plant Mol. Biol.*, 34, 57-68.

MAUNDRELL, K., 1993, Construction of the pREP and pRIP thiamine repressible expression vectors for fission yeast, *Gene*, 123, 127-130.

McLEOD, M., STEIN, M., BEACH, D., 1987, The product of the mei3+ gene expressed under control of the mating type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast, *EMBO J.*, 6, 729-736.

MITCHISON, J. M., 1970, Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol.* 4, 131-165.

MITHOFER, A., FLIEGMANN, J., EBEL, J., 1999, Isolation of a French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) homolog to the β -glucan elicitor-binding protein of soybean (*Glycine max* L.), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418, 127-132.

MOHAMMED, K., ESEN., 1989, A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and Western blots., *J. Immunol. Method.*, 117, 141-145.

MORENO, S., KLAR, A., NURSE, P. 1991., Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the fission yeast S. pombe*, 795-823, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York.

MUNZ, P., WOLF, K., KOHLI, J., LEUPOLD, U., 1989, Genetic overview, 1-30, *Molecular biology of the fission yeast*, Academic Press, SanDiego. 0-12-514085-1.

NAHRSTEDT, A., DAVIS, R. H, 1986, Uptake of linamarin and lotaustralin from their foodplant by larvae of *Zygaena trifolii*, *Phytochemistry*, 25, 2299-2302.

NAHRSTEDT, A., MUELLER, E., 1993, β -glucosidase (linamarase) of the larvae of the moth *Zygaena trifolii* and inhibition by some alkaline earth metal ions, 132-144, *β -glucosidases: biochemistry and molecular biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

NASTRUZZI, C., CORTESI, R., ESPOSITO, E., MENEGATTI, E., LEONI, O., IORI, R., PALMIERI, 2000, S., In vitro antiproliferative activity of isothiocyanates and nitriles generated by myrosinase-mediated hydrolysis of glucosinolates from seeds of cruciferous vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, 48(8), 3572-3575.

NIEMEYER, H.M., PESEL, E., COPAJA, S.V., BRAVO, H.R., FRANCKE, S., FRANCKE, W., 1989, Changes in hydroxamic acid levels of wheat plants induced by aphid feeding, *Phytochemistry*, 28, 447-449.

NIKUS, J., 2003, *β -glucosidases and hydroxamic acid glucosides – a proposed defensesystem in rye (*Secale cereale*)*, Thesis (PhD), Swedish University.

NIKUS, J., ESEN, A., JONSSON, L.M.: V., 2003, Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) β -glucosidase cDNA and its expression in *E.coli*, *Physiol. Plant.*, 118, 337-345.

O'NEILL, R.R., TOKORO, T., KOZAK, C.A., BRADY, R.O., 1989, Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5049-5053.

OHASSI, T., BOGGS, S., ROBBINS, P., BAHNSON, A., PATRENE, K., WEI, F., WEI, J., LI, J., LUCHT, L., FEI, Y., CLARKE, A.J., KIMAX, M., HE, H., MOWERY-RUSHTON, P. VE BARRANGER, J.A., 1992, Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of the bone marrow transduced by a retroviral vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11332-11336.

OKAZAKI, K., OKAZAKI, N., KUME, K., JINNO, S., TANAKA, K., OKAYAMA, H., 1990, High frequency transformation methods and library transducing for cloning mammalian cDNA by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Res.*, 18(22), 6485-6489.

OPASSIRI, R., HUA, Y., WARA-ASWAPATI, O., AKIYAMA, T., SVASTI, J. ESEN, A., KETUDAT CAIRNS, J.R., 2004, β -glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice Bglu1, *Biochem. J.*, 379, 125-131.

OPASSIRI, R., KETUDAT CAIRNS, J.R., AKIYAMA, T., WARA-ASWAPATI, O., SVASTI, J. ESEN, A., 2003, Characterization of rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot, *Plant Science*, 165, 627-638.

PANDEY, M., MISHRA, S., 1997, Expression and characterization of *Pichia etchellsii*, β -glucosidase in *Escherichia coli*, *Gene*, 190, 45-51.

PLUSKAL, M.G., PRZEKOP, M.B., KAVONIAN, M.R., VECOLI, C., HICKS, D. A., 1986, ImmobilonTM PVDF transfer membrane: a new membrane substrate for Western blotting of proteins. *Biotechniques*, 4, 272-282.

PONTOPPIDAN, B., EKBOM, B., ERIKSSON, S., MEIJER, J., 2001, Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a brassica herbivore, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1041-1048.

POULTON, J.E., 1990, Cyanogenesis in plants, *Plant Physiol*, 94, 401-405.

POULTON, J.E., 1993, Enzymology of cyanogenesis in rosaceous stone fruits, 170-190, β -glucosidases, β -glucanases and xylanases, 27-41, *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology*, American Chemical Society, Washington D. C., 0-8412-2697-0.

PRENTICE, H.L., 1992, High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation, *Nucleic Acids Res.*, 20(3), 621.

RAABO, E., TERKILDSEN, T.C., 1960, On The Enzymatic determination of blood glucose. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, 402.

RASK, L., ANDREASSON, E., EKBOM, B., ERIKSSON, S., PONTOPPIDAN, B., MEIJER, J., 2000, Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*, *Plant Molecular Biology*, 42, 93-113.

RAYNAL, A., GUERINEAU, M., 1984, Cloning and expression of the structural gene for β -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen Genet.*, 195(1-2), 108-115.

REILLY, C.C., GENTRY, C.R., McVAY, J.R., 1987, Biochemical evidence for resistance of rootstocks to the peachtree borer and species separation of peachtree borer and lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae) on peach trees. *J. Econ. Entomol.* 80, 338-343.

REZUTKA, A., MIZAK, B., 2003, Comparative studies on sensitivity of digoxigenin-labelled probes and detection systems confirming replication of CDV in vero cells, *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 47, 3-8.

RUSSELL, P.R., 1989, Gene cloning and expression in Fission Yeas, 243-271, *Molecular Biology of the Fission Yeast*. Nasim, A., Young, P., ve Johnson, B.F., Academic Press, Inc., New York, 0-12-514085-1.

RUSSELL, P., NURSE, P., 1986, Cdc254 functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast, *Cell*, 45, 145-15

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manuel*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 0-87969-309-6.

SANTANA, M.A., VASQUEZ, V., MATEHUS, J., ALDAO, R.R., 2002, Linamarase expression in cassava cultivars with roots of low- and high-cyanide content, *Plant Physiology*, 129, 1686-1694.

SAUER, N., FRIEDLANDER, K., GRAML-WICKE, U., 1990, Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*, *EMBO J.*, 9(10), 3045-3050.

SHIKITA, M., FAHEY, J.W., GOLDEN, T. R., HOLTZCLAW, D., TALALAY, P., 1999, An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings, *Biochem. J.*, 341, 725-732.

SIAM, R., DOLAN, W.P., FORSBURG, S.L., 2004, Choosing and using *Schizosaccharomyces pombe* plasmids, *Methods*, 33, 189-198.

SINGER, M., BERG, P., 1991, Molecular anatomy, expression and regulation of eukaryotic genes, *Genes and Genomes*, University Science Books, New York, 0-935702-17-2.

SIRITUNGA, D., SAYRE, R. T., 2003, Generation of cyanogens-free transgenic cassava, *Planta*, 3, 1005-1008.

SKORY, C.D., FREER, S.N., 1995, Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular β -glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*, *Appl. and Envir. Micr.*, 61(2), 518-525.

SPAGNA, G., BARBAGALLO R.N., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., GIUDICI, P., 2002a, Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* stain isolated from Sicilian musts and wines, *Enzyme and Microbiol Technology*, 31, 1030-1035.

SPAGNA, G., BARBAGALLO R.N., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., GIUDICI, P., 2002b, Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* stain isolated from Sicilian musts and wines, *Enzyme and Microbiol Technology*, 31, 1036-1041.

STAINER, N.C., HAHNENBERGER, K.M., CLARKE, L., 1993, Centromeres of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are highly variable genetic loci, *Mol. Cell Biol.*, 13, 4578-4587.

STANKOFF, D., LEDUC, G., ANTOINE, N., 1992, Gene order comparisons for phylogenetic inference; evolution of the mitochondrial genome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 65-75.

STEWART, C.B., SCHULER, M.A., 1989, Antigenic crossreactivity between bacterial and plant cytochrome P-450 monooxygenases, *Plant Physiol*, 90, 534-541.

STONE, B.A., CLARKE, A.E. (1992) in *Chemistry and Biology of (1-3)- β -Glucans*, 431-489, La Trope University Press, Victoria, Australia.

STOTZ, H.U., PITTENDRIGH, B.R., KROYMANN, J., WENIGER, K., FRITSCHKE, J., BAUKE, A., MITCHELL-OLDS, T., 2000, Induced plant defence responses against chewing insects. Ethylene signaling reduced resistance of *Arabidopsis* against Egyptian cotton worm but not diamondback moth, *Plant Physiol.*, 124, 1007-1017.

SUE, M., ISHIHARA, A., IWAMURA, H., 2000a, Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L) seedlings, *Plant Science*, 155, 67-74.

SUE, M., ISHIHARA, A., IWAMURA, H., 2000b, Purification and characterization of hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, *Planta*, 210, 432-438.

SUNNERHAGEN, P., 2002, Prospects for functional genomics in *Schizosaccharomyces pombe*, *Curr. Genet*, 42, 73-84.

TAYLER, S.S., CONN, E.E., 1981, Subcellular localization of dhurrin β -glucosidases and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades, *Plant Physiol*, 67, 617-622.

THANGSTAD, O.P., WINGE, P., HUSEBYE, H., BONES, A., 1993, The thioglucoside glucohydrolase (myrosinase) gene family in Brassicaceae, *Plant. Mol. Biol.*, 23, 511-524.

VASSEROF, Y., ARNOUD, A., GALZY, P., 1995, Monoterpenyl glycosides in plants and their biotechnological transformation, *Acta. Biotechnol.*, 15, 77-95.

VERDOUCQ, L., CZJZEK, M., MORINIERE, J., BEVAN, D., ESEN, A., 2003, Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β -glucosidases, *J. Biol. Chem.*, 278(4), 25055-25062.

VERDOUCQ, L., MORINIERE, J., BEVAN, D.R., ESEN, A., VASELLA, A., HENRISSAT, B., CZJZEK, M., 2004, Structural determination of substrate specificity in family 1 β -glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant β -glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate, *J. Biol. Chem.*, 279, 31796-31803.

WANG, C.L., OLIVER, D.J., 1996, Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of a gsh2 mutant in fission yeast, *Plant Mol. Biol.*, 31(6),1093-1104.

WARSHAWSKY, D., MILLER, L., 1994, Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells, *Biotechniques*, 16, 798-800.

WATERBORG, J.H., 2002, The protein protocols handbook, 2nd ed., J. M. Wolker and Humana Press Inc., Totowa, NJ, 0-89603-940-4.

WINTERHALTER, P., SKOUROUMONIS, G.K., 1997, Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 55, 73-105.

WOOD, V., GWILLIAM, R. RAJANDREAM, M.A. ve diğeri, 2002, The genome sequenes of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415(21), 871-880.

WRIGHT, A.P., MAUNDREL, K., HEYER, W-D., BEACH, D., NURSE, P., 1986, Vectors for the construction gene banks and the integration of cloned genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmide*, 15, 156-158.

XIA, G., RAMACHANDRAN, S., HONG, Y., CHAN, Y.S., SIMANIS, V., CHUA N.H., 1996, Identification of plant cytoskeletal, cell cycle-related and polarity-related proteins using *Schizosaccharomyces pombe*, *Plant J.*, 10(4), 761-769.

XUE, J.P., LENMAN, M., FALK, A., RASK, L., 1992, The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase in *Brassicaceae* is encoded by a gene family, *Plant Molecular Biology*, 18(2), 387-398.

XUE, J., JORGENSEN, M., PIHLGREN, U., RASK, L., 1995, The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization and evolution, *Plant Molecular Biology*, 27, 911-922.

ZHAO, Y., LIEBERMAN, H.B. 1995, *Schizosaccharomyces pombe*: A model for molecular studies for eukaryotic genes, *DNA and Cell Biology*, 14(5), 359-371.

ZHOU, J., HARTMANN, S., SHEPHERD, B.K., POULTON, J., 2002, Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases, *Plant Physiology*, 129, 1252-1264.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Rize’de doğdum. İlk öğrenimimi İstanbul Sururi İlk Okulu’nda, orta öğrenimimi Mecidiyeköy Lisesi’nde 1987 yılında tamamladım. Aynı yıl girmiş olduğum İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1991 yılında mezun oldum. 1992 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu Moleküler Biyoloji-Genetik Yüksek Lisans programına girmeye hak kazandım. Temmuz 1995 tarihinde “*Schizosaccharomyces pombe*’nin Genom Kitaplığının Kurulması” başlıklı yüksek lisans tezimi tamamladım. Aynı yıl İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak Moleküler Biyoloji ve Genetik programına kayıt oldum.

1993-2003 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji, 2003 yılından bu yana da İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde çalışmaktayım.

Bedia GEMİCİ PALABIYIK

YAYINLAR

TOPAL-SARIKAYA, A., ARDA, N., GEMİCİ, B., ULUSOY, S., TEMİZKAN, G., 1998, *Schizosaccharomyces pombe*’nin furfural metabolizması üzerine araştırmalar, III. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu’98 Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Tebliğler Kitapçığı, 1-5.

ARDA, N., TOPAL-SARIKAYA, A., GEMİCİ, B., TEMİZKAN, G., 2000, A rapid technique for the determination of the fission yeast culture media, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 14, 41-43.

BİLDİRİLER

ALBAYRAK (ÇOBANOĞLU), G., KARAER, S., TOPOHAN, G., CAN, Ö., GÖZÜKIRMIZI, N., RAPD Markırları ile değişik organizmalarda DNA parmak izi çıkarılması, 9. KÜKEM Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, DENİZLİ, 20-22 Eylül 1995, 8-9.

TOPAL, A., GEMİCİ, B., KARAER, S., TEMİZKAN, G., İnsan P450 geninin *Schizosaccharomyces pombe*'de klonlanması, XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 17-20 Eylül 1996.

TOPAL, A., GEMİCİ, B., KARAER, S., ARDA, N., TEMİZKAN, G., Recombinant fission yeast in xenobioticmetabolism, 8th European Congres on Biotechnology, 17-21, Ağustos 1997, Budapeşte, Özet Kitabı, 183, TU.

TOPAL-SARIKAYA, A., ARDA, N., GEMİCİ, B., ULUSOY, S., TEMİZKAN, G., Investigation on the furfural metabolism by *Schizosaccharomyces pombe*, Current Genetics, XIX International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Rimini, Italya, 25-30 May 1999, 35, 319.

TOPAL-SARIKAYA, A., KARAER, S., ULUSOY, S., GEMİCİ, B., ENGİN, S., TEMİZKAN, G., PCR-based thymidylate synthase gene distruption in *Schizosaccharomyces pombe*, The First International Fission Yeast Meeting, Edinburg, UK, 25-30 Eylül 1999, 226.

PALABIYIK, B.G., ESEN, A., TEMİZKAN, G., Bitki genlerinin *Schizosaccharomyces pombe*'de anlatımı, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale.

PROJE

Mayada Heterolog Gen Ekspresyonu, TBAG-1486 No.lu TÜBİTAK Projesi, 1998 yılında tamamlandı. Yürütücü: TOPAL-SARIKAYA, A., Yardımcı Araştırmacılar: GEMİCİ, B., KARAER, S., TEMİZKAN, G.

AKADEMİK DENEYİM

Maya Teknolojisinde Rekombinant DNA Yöntemleri, 12-16 Eylül 1994, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN) (Kurs Asistanı).

Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 29 Eylül-3 Ekim, 6-10 Ekim 1997, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN) (Kurs Asistanı).

Bioinformatics Training Workshop, 26-30 Haziran 2000, TÜBİTAK, (Kursiyer).

“Virginia Polytechnic Institute and State University, Plant Molecular Biology”, ABD. 16 Temmuz-28 Ekim 2001.