T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

# POLEN ALERJENİ METİYONİN SENTAZIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

**Yunus AKSÜT**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

**Haziran, 2017**

**İSTANBUL**

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

# POLEN ALERJENİ METİYONİN SENTAZIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

**Yunus AKSÜT**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

**Haziran, 2017**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 22.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 57936 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

# ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sürenince kendisi ile çalışmaktan zevk aldığım ve bu süreçte bana her konuda yardımcı olan, beni her zaman dinleyen ve fikirlerime önem veren, deneyimleriyle yolumu aydınlatan, tez çalışmamın tamamlanması için her türlü imkanı sağlayan, güler yüzlü ve anlayışlı olmasıyla örnek aldığım ve bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim çok sevgili danışmanım **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca verdikleri fikirlerle yardımcı ve destek olan sevgili hocalarım **Doç. Dr. Evren ÖNAY-UÇAR, Yrd. Doç. Dr. Murat PEKMEZ** başta olmak üzere tüm eğitimim boyunca verdikleri bilgilerle yoluma ışık tutan bütün bölüm hocalarıma çok teşekkür ederim. Maya çalışmalarında bana yardımcı olan **Doç. Dr. Bedia PALABIYIK**'a, **Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER**'e ve **Arş. Gör. Merve YILMAZER**'e, bakteri çalışmalarında bana yardımcı olan **Doç. Dr. Özgür ÇAKIR**'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, her zaman manevi desteği ve inancı ile yanımda olan ve bütün çalışmalarıma katkı sağlayarak, bu tezin bitmesinde büyük bir payı olan, çok değerli meslektaşım **Aslıhan ŞENGELEN**'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca manevi desteğiyle her an yanımda olan, çok değerli dostlarım **Burcu ARIKAN**'a ve **Arş. Gör. Utku GÜNEŞ**'e ve ayrıca **Proteomik ekibi** çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca ve eğitimimin her aşamasında her zaman arkamda olan, bana her konuda maddi-manevi her türlü desteği sağlayan **aileme** sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Haziran 2017 Yunus AKSÜT

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No**

**ÖNSÖZ** ..... **i**
**İÇİNDEKİLER** ..... **ii**
**ŞEKİL LİSTESİ** ..... **v**
**TABLO LİSTESİ** ..... **vii**
**SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ** ..... **ix**
**ÖZET** ..... **xii**
**SUMMARY** ..... **xiv**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. GENEL KISIMLAR** ..... **5**
2.1. ALERJİ ..... 5
2.2. POLEN ALERJİSİ ..... 7
2.2.1. Ak Dut (*Morus alba* L.) Poleninin Alerjenik Özellikleri ..... 10
2.3. METİYONİN SENTAZ ..... 11
2.4. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ ..... 12
2.4.1. Rekombinant Alerjenler ..... 14
2.5. REKOMBİNANT ALERJEN ÜRETİMİNDE KULLANILAN ORGANİZMALAR ..... 17
2.5.1. *Escherichia coli* ..... 17
2.5.2. *Schizosaccharomyces pombe* ..... 17
**3. MALZEME VE YÖNTEM** ..... **19**
3.1. POLEN ÖRNEKLERİ ..... 19
3.2. KULLANILAN ORGANİZMALAR VE PLAZMİD ..... 19
3.3. BESİYERLERİ ..... 20
3.4. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI ..... 24
3.4.1. *E. coli DH5α* Irkının Üretimi ve Saklanması ..... 24
3.4.2. *S. pombe ura4-D18h*$^-$ Irkının Üretimi ve Saklanması ..... 24
3.5. RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ ..... 24
3.5.1. RNA İzolasyonu ..... 24
3.5.2. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon, Saflık ve Bütünlük Kontrolü ..... 25

3.6. TERS ("REVERSE") - TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR) ..... 25
3.6.1. cDNA Sentezi ..... 26
3.6.2. *metE* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü ..... 26
3.7. *metE* GENİNİN PLAZMİD İLE LİGASYONU ..... 28
3.7.1. *metE* Geninin ve pSLF1073 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi ..... 28
3.7.2. *metE* Geninin ve pSLF1073 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi ..... 28
3.7.3. *metE* Geninin pSLF1073 Plazmidi ile Ligasyonu ..... 29
3.8. PLAZMİDİN *E. coli*'DE ÇOĞALTILMASI ..... 30
3.8.1. *E. coli DH5α* Hücrelerinden Süper Yeterli Hücre Oluşturulması ..... 30
3.8.2. *E. coli DH5α* Hücrelerinin pSLF1073 Plazmidi ve Rekombinant Plazmid ile Tranformasyonu ..... 30
3.8.3. *E. coli DH5α* Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu ..... 31
3.8.4. pSLF1073 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesim Kontrolü ..... 31
3.8.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformantların Koloni PZR ile Belirlenmesi ..... 32
3.9. *S. pombe*'DE BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİM ..... 33
3.9.1. Rekombinant Plazmidin *S. pombe*'ye Transformasyonu ..... 33
3.9.2. Transformant Kolonilerin Seçilmesi ..... 34
3.10. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ ..... 35
3.11. PROTEİN ANALİZLERİ ..... 36
3.11.1. Protein İzolasyonu ..... 36
3.11.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ..... 37
3.11.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ..... 38
3.11.4. Coomassie Boyama Yöntemi ..... 39
3.11.5. Western-Blot Analizi ..... 40
**4. BULGULAR ..... 42**
4.1. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ ..... 42
4.2. TERS ("REVERSE")-TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ..... 42
4.2.1. cDNA Sentezi ..... 42
4.2.2. *metE* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü ..... 43
4.3. pSLF1073 PLAZMİDİNİN İZOLASYONU VE KONTROLÜ ..... 43

4.4. *metE* GENİNİN pSLF1073 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI ..... 45
4.5. REKOMBİNAT PLAZMİDİN *S. pombe*'YE TRANSFORMASYONU VE KONTROLÜ ..... 47
4.6. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI ..... 48
4.7. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI ..... 51
4.7.1. Protein Konsantrasyonları ..... 51
4.7.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları ..... 52
4.7.3. Western-Blot Analiz Sonuçları ..... 53
**5. TARTIŞMA VE SONUÇ ..... 54**
**KAYNAKLAR ..... 60**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 72**

# ŞEKİL LİSTESİ

**Sayfa No**

**Şekil 2.1:** Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının tipleri ve immün sistem patolojisi (STL – sitotoksik T lenfositi, Ig – immünoglobulin) (Abbas ve diğ., 2012). ..... 6

**Şekil 2.2:** Polen yapısının şematik gösterimi (Ukhanova ve Bogomolova, 2015). ..... 7

**Şekil 2.3:** Ak dut (*Morus alba* L.)'nin Türkiye'de yetişme alanları (TÜBİVES, 2011). ..... 10

**Şekil 2.4: a)** Ak dut ağacı çiçeği dişi ve erkek kısımları (OSU, 2017) **b)** ak dut poleninin mikroskop görüntüsü (APSA, 2017). ..... 11

**Şekil 2.5:** Rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak hedeflenen genin vektöre ligasyonu ve ligasyon ürününün transformasyonu (Soydemir ve Aksoy, 2017). ..... 13

**Şekil 2.6:** Alerjen kodlayan DNA dizisinden rekombinant alerjen temelli aşılara (Valenta ve diğ., 2011)..... 16

**Şekil 2.7:** Tip I alerjinin teşhisi için çoklu-alerjen testi (Mothes ve diğ., 2006). ..... 16

**Şekil 3.1:** pSLF1073 plazmidinin genetik haritası. ..... 20

**Şekil 3.2:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan "DNA Ladder"lar. **a)** "O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder" **b)** "1kb ladder"..... 36

**Şekil 4.1:** *Morus alba* poleninden izole edilen, bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA. ..... 42

**Şekil 4.2:** *Morus alba* poleninden izole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar (5 tekrar)..... 42

**Şekil 4.3:** PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific) **b)** *metE* geninin PZR ürünü. ..... 43

**Şekil 4.4:** İzole edilen pSLF1073 plazmidlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech) **b)**, **c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerden izole edilen plazmidler. ..... 44

**Şekil 4.5:** pSLF1073 plazmidinin SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli kesiminin agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech) **b)**, **c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin kesim sonuçları. ..... 44

**Şekil 4.6:** Transformasyondan sonra 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde üreyen bakteri kolonileri. ..... 45

**Şekil 4.7:** Koloni PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific), **b)**, **c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları. ..... 46

**Şekil 4.8:** Rekombinant plazmidin (pSLF1073 + *metE*) tekli ve çiftli RE kesim sonuçları. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech), **b)** pSLF1073 plazmidi, **c)** ligasyon ürününün SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli kesimi, **d)** rekombinant plazmid SalI ve NotI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesimi, **e)** metE geni PZR ürünü. ..... 47

**Şekil 4.9:** *S. pombe* transformantlarından yapılan koloni PZR sonucunun %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific), **b)**, **c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları. ..... 48

**Şekil 4.10:** *Morus alba* poleninde bulunan *metE* geninin cDNA dizisi. ..... 49

**Şekil 4.11:** *Morus alba*'nın poleninde bulunan *metE* geninin amino asit dizisi (Sistein = C, Histidin= H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin=L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E ,Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W) ..... 50

**Şekil 4.12:** *Morus alba* metE proteininin amino asit dizisi bilgisinin BLAST analizi sonuçları. ..... 51

**Şekil 4.13:** Sığır serum albümin (BSA) standartları ile çizilen standart grafik ($R^2$= 0.9963). ..... 52

**Şekil 4.14:** Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. **a)** Markır "SeeBlue® Pre-stained Protein Standard (Invitrogen LC5625)", **b)** Konak **c)** ve **d)** Transformant. ..... 53

**Şekil 4.15:** Western-blot analizi. **a)** Konak **b)** Transformant ..... 53

# TABLO LİSTESİ

**Sayfa No**

**Tablo 2.1:** Alerjik reaksiyonlara yol açtığı iyi bilinen polen alerjenleri ve kaynakları. ..9

**Tablo 2.2:** Rekombinant alerjenlerin geleneksel alerjen ekstrelerine göre avantajları (Valenta ve Nideberger, 2007). ..15

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan *S. pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri. ..19

**Tablo 3.2:** LB ve LBA besiyeri içerikleri. ..21

**Tablo 3.3:** SOB besiyeri içeriği. ..21

**Tablo 3.4:** YEL ve YEA besiyeri içerikleri. ..22

**Tablo 3.5:** MML ve MMA besiyeri içerikleri. ..23

**Tablo 3.6:** MML ve MMA besiyerlerinde kullanılan stok çözeltilerin hazırlanışı. ..23

**Tablo 3.7:** Total RNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları. ..26

**Tablo 3.8:** Total RNA'dan cDNA sentezi için reaksiyon koşulları. ..26

**Tablo 3.9:** *metE* geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları. ..27

**Tablo 3.10:** *metE* geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları. ..27

**Tablo 3.11:** RT-PZR'de kullanılan primerler. ..27

**Tablo 3.12:** NotI ve SalI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim reaksiyonunun bileşenleri. ..28

**Tablo 3.13:** Ligasyon işlemi reaksiyon bileşenleri. ..29

**Tablo 3.14:** TB tamponunun içeriği. ..30

**Tablo 3.15:** SalI RE ile tekli kesim reaksiyon bileşenleri. ..32

**Tablo 3.16:** Koloni PZR reaksiyon bileşenleri ve miktarları. ..32

**Tablo 3.17:** Koloni PZR için reaksiyon koşulları. ..33

**Tablo 3.18:** Transformasyonda kullanılan çözeltiler. ..34

**Tablo 3.19:** 50X TAE, EtBr ve 6X yükleme tamponunun hazırlanışı. ..... 35

**Tablo 3.20:** Protein izolasyonu için hazırlanan tampon içeriği. ..... 37

**Tablo 3.21:** SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler. ..... 38

**Tablo 3.22:** SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler). 39

**Tablo 3.23:** Elektrotransfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri. ..... 40

# SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler | Açıklama |
|---|---|
| **%** | : Yüzde |
| **~** | : Yaklaşık olarak |
| **µg** | : Mikrogram |
| **µL** | : Mikrolitre |
| **µm** | : Mikrometre |
| **µM** | : Mikromolar |
| **µmol** | : Mikromol |
| **Atm** | : Atmosfer |
| **CO** | : Karbonmonoksit |
| **fmol** | : Femtomol |
| **g** | : Gram |
| **kDa** | : Kilodalton |
| **L** | : Litre |
| **mµ** | : Milimikron |
| **mg** | : Miligram |
| **mL** | : Mililitre |
| **mM** | : Milimolar |
| **N** | : Normalite |
| **nm** | : Nanometre |
| **$NO_2$** | : Azot dioksit |
| **ºC** | : Derece Santigrat |
| **rpm** | : Dakikada devir sayısı “Revolutions per minute” |
| **$SO_2$** | : Kükürt dioksit |
| **U** | : Ünite |
| **v** | : Hacim (“Volume”) |
| **V** | : Volt |
| **w** | : Ağırlık (“Weight”) |
| **α** | : Alfa |

| | |
|---|---|
| **β** | : Beta |

| **Kısaltmalar** | **Açıklama** |
|---|---|
| **Amp** | : Ampisilin |
| **APS** | : Amonyum persülfat |
| **bç** | : Baz çifti |
| **BCA** | : Bişinkoninik asit |
| **BLAST** | : Basic Local Alignment Search Tool |
| **BSA** | : Sığır serum albumini ("Bovine Serum Albumin") |
| **cDNA** | : Komplementer DNA |
| **$CH_3$-$H_4$folat** | : N5-metil-5,6,7,8-tetrahidrofolat |
| **$dH_2O$** | : Distile su |
| **DNA** | : Deoksiribonükleik asit |
| **dNTP** | : Deoksiribonükleozid trifosfat |
| ***E. coli*** | : *Escherichia coli* |
| **EDTA** | : Etilendiamintetraasetik asit |
| **Hcy** | : L-homosistein |
| **IgE** | : İmmünoglobulin E |
| **IgG** | : İmmünoglobulin G |
| **IgM** | : İmmünoglobulin M |
| **LB** | : Luria-Bertani sıvı besiyeri |
| **LBA** | : Luria-Bertani katı besiyeri |
| **Mb** | : Megabaz |
| **MMA** | : Minimal katı besiyeri ("Minimal Medium Agar") |
| **MML** | : Minimal sıvı besiyeri ("Minimal Medium Liquid") |
| **PVDF** | : Polivinilidin diflorür |
| **PZR** | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| **RNA** | : Ribonükleik asit |
| ***S. pombe*** | : *Schizosaccharomyces pombe* |
| **SDS** | : Sodyum dodesil sülfat |
| **SDS-PAGE** | : Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ("Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis") |
| **SOB** | : "Super Optimal Broth" |
| **TAE** | : Tris-asetat EDTA tamponu |

**TB** : Transformasyon tamponu (“Transformation Buffer”)

**UV** : Ultraviyole

**YEA** : Maya ekstreli katı besiyeri (“Yeast Extract Agar”)

**YEL** : Maya ekstreli sıvı besiyeri (“Yeast Extract Liquid”)

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### POLEN ALERJENİ METİYONİN SENTAZIN BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

**Yunus AKSÜT**

**İstanbul Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

Alerji günümüzün temel sağlık sorunlarından biridir. Bu hastalıklar ülkemizdeki bireylerin %20-30 kadarını etkileyerek, kişilerin yaşam kalitesini düşürmekte ve oluşturduğu iş gücü kaybı ile de maddi zarara yol açmaktadır. Alerjik duyarlılığa ve alerjik hastalık bulgularının ortaya çıkmasına neden olan en önemli aeroalerjenlerden biri polenlerdir. Polenlerin alerjenik özellikleri, kimyasal bileşenleri ve atmosferdeki yoğunlukları, iklime, coğrafi lokasyona ve çevresel koşullara göre değişir. Muhtemelen bu varyasyonların bir sonucu olarak polen alerjisinin tanı ve tedavisinde bazı sorunlar yaşanmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile birçok biyolojik ürün ortaya çıkmıştır. Tanı ve tedavide kullanılma potansiyeline sahip rekombinant alerjenler de bu teknoloji ile üretilebilmektedir. Yapısal, fonksiyonel ve immünolojik olarak doğal alerjenleri taklit eden bu spesifik moleküller, biyoteknolojik yöntemleri kullanarak prokaryotik veya ökaryotik sistemler aracılığıyla çok hızlı bir şekilde, sabit kalitede, yeterli miktarda elde edilebilirler.

Bu tez çalışmasının temel hedefi yerel *Morus alba* (ak dut) poleninde bulunan potasiyel alerjen metiyonin sentazı *Schizosaccharomyces pombe*'de rekombinant olarak üretmektir.

Çalışmanın ilk aşamasında *M. alba*'daki metiyonin sentaz geninin dizisini belirlemek için polenlerden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA kullanılarak cDNA kütüphanesi oluşturuldu ve ilgili gen bu cDNA kütüphanesinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR ürününün nükleotit dizilemesi yapıldı, metiyonin sentazın tam gen dizisi belirlendi.

İkinci aşamada ise metiyonin sentaz geninin mekik tipi bir vektör olan pSLF1007 ile ligasyonu sağlandı. Daha sonra *S.pombe*'ye bu ligasyon ürününün transformasyonu yapıldı. Seçici besiyerine ekilen transforme kolonileri belirmek için koloni PZR yapıldı. Pozitif çıkan kolonilerden biri, protein analizleri için sıvı besiyerinde üretildi. Bu hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve rekombinant proteinin saptanması için elektroforezi takiben Western blot analizi yapıldı. Rekombinant protein histidin etiketine özgü antikor kullanılarak membranda saptandı.

Sonuç olarak, *M. alba* poleninde bulunan metiyonin sentaz proteini *S.pombe*'de başarıyla rekombinant olarak üretildi. Bu çalışmada *S. pombe*'nin rekombinant allerjen üretimi için alternatif bir sistem olduğu gösterildi. Rekombinant metiyonin sentaz ileri klinik çalışmalarda kullanılma, saflaştırıldıktan ve alerjik özellikleri doğrulandıktan sonra piyasada biyoteknolojik bir ürün olarak yer alma potansiyeline sahiptir.

Haziran 2017, 88 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *Morus alba*, metiyonin sentaz, rekombinant alerjen, *Schizosaccharomyces pombe,* klonlama.

# SUMMARY

## M.Sc. THESIS

### STUDIES on BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION of POLLEN ALLERGEN METHIONINE SYNTHASE

**Yunus AKSÜT**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

Allergy is one of major health problems of today. By affecting the 20-30% of the individuals in our country, these diseases reduce the life quality and evoke economical detriment by causing loss of workforce. One of the most important aeroallergens which causes allergic sensitivity and allergic disease symptoms is pollens. The allergenic properties, chemical constituents and atmospheric concentrations of pollens change by climate, geographic location and environmental conditions. There are some troubles in diagnosis and treatment of pollen allergy, probably due to these variations.

Many biological products emerge by the development of recombinant DNA technology. Recombinant allergens having potential to be used in diagnosis and treatment, also can be produced by this technology. These specific molecules mimic natural allergens structurally, functionally and immunologically, can be obtained very fast in consant quality and sufficient quantity, by using biotechnological methods through prokaryotic and eukaryotic systems.

The main purpose of this thesis is recombinant production of methionine synthase, a potential allergen found in local *Morus alba* (white mullberry) pollen, in *Schizosaccharomyces pombe*.

In the first step of the study, total RNA isolation was performed from the pollens to detect the sequence of methionine synthase gene in *M. alba*. cDNA library was set up by using total RNA and related gene was propagated from this cDNA library. PCR product was then subjected to nucleotide sequencing and whole gene sequence of methionine synthase was determined.

In the second step, methionine synthase gene was ligated with a shuttle type vector, pSLF1007. Then this ligation product was transformed to *S.pombe.* Colony PCR was applied to detect the transformant colonies in selective media. One of the positive colonies was grown in liquid media for protein analyses. Protein isolation was performed from these cells and Western blotting analysis was done followed by electrophoresis to detect the recombinant protein. This recombinant protein was detected on the membrane by using an antibody specific to the histidine tag.

As a result, methionine synthase protein found in *M. alba* was successfully produced in *S. pombe* recombinantly. In this study, *S. pombe* has been shown to be an alternative system for the production of recombinant allergens. Recombinant methionine synthase has a potential to be used further clinical studies, and to become a biotechnological product in the market after purification and approval of its allergenic properties.

June 2017, 88 pages.

**Keywords:** *Morus alba*, methionine synthase, recombinant allergen, *Schizosaccharomyces pombe,* cloning.

# 1. GİRİŞ

Alerjik hastalıklar günümüzün önemli sağlık sorunları arasında sayılmaktadır ve her yaş grubundan bireylerin %20-30 kadarını etkilemektedir. Dünya çapında Tip I alerjinin en önemli tetikleyicilerinden biri havadaki polenlerdir. Polen mevsiminde, özellikle pek çok ağaç, çimen ve yabani ot türünün polenlerinin havadaki konsantrasyonlarının yüksek olması, duyarlı kişilerde immün sistemin uyarılmasına, mevsimsel rinokonjonktivitten, bronşiyal astıma kadar çeşitli alerjik semptomların gelişmesine ve yaşam kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Puc, 2003; Celik ve diğ., 2005; Radauer ve Breiteneder, 2006).

Alerjenik tepkimelerin oluşmasında çoğunlukla polenlerin yapısında bulunan suda çözünebilir proteinler ya da glikoproteinler etkili olmaktadır (Puc, 2003). Majd ve diğ. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, immünolojik analizler sonucu olgunlaşmamış polen proteinlerinde herhangi bir alerjenik bant tespit edilmemiştir ve alerjenik proteinlerin çoğunun polen oluşumunun gelişim sürecinde üretildiği ve alerjen proteinlerin olgun polen tanelerinde biriktiği belirtilmiştir.

Dutgiller (Moraceae) ailesinin bir üyesi olan ak dut (*Morus alba* L.) ilkbaharda çiçeklenen bir bitkidir ve rüzgar yardımı ile polenlerini yaymaktadır. Endemik bir tür olmayan ak dut tüm dünya genelinde yetişmektedir. Ak dut polenlerinin alerjik rinit, alerjik konjonktivit ve astım gibi alerjik hastalıkları tetiklediği iyi bilinmektedir (Hurtado ve Riegler-Goihman, 1987; Singh ve diğ., 1987; Navarro ve diğ., 1997; Subiza ve diğ., 1995; Halonen ve diğ., 1997; Hernández Prietove ve diğ., 1998; Singh ve Kumar, 2003; de Benito Rica ve diğ., 2004; Gonzalo-Garjo ve diğ., 2006). Polen alerjisi ve alerjen proteinlerle ilgili çalışmalar referans alınarak duyarlı bireylerde ak duta karşı alerjik reaksiyonların gelişmesinde etkili alerjen protein(ler)in araştırılması amacıyla 2014 yılında yapılan "İstanbul'daki Ak Dut (*Morus alba L.)* ve Mavi Atlas Sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. Cv. 'Glauca'] Polenlerinin Alerjenik Proteinleri (İ.Ü. BAP No: 30217)" adlı tez çalışmasında *Morus alba*'nın poleninde bulunan kobalamin bağımsız

metiyonin sentaz (metE)'ın alerjen bir protein olabileceği öne sürülmüştür (Çeteresi, 2014).

Metiyonin sentaz, bir metil grubunun N5-metil-5,6,7,8-tetrahidrofolattan ($CH_3$-$H_4$folat) L-homosisteine (Hcy) transferini sağlayarak metiyonin biyosentezinin son basamağını katalizlemektedir ve bu enzimin alerjen bir protein olabileceğine ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır. Metiyonin sentazın alerjen bir protein olabileceğine dair ilk gösterge, Chardin ve diğ. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ortaya çıkmıştır. Çalışmada kanolanın (*Brassica napus*) poleninde bulunan yüksek (yaklaşık 80 kDa) molekül ağırlıklı alerjenik proteinin amino asit dizisinin, bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'daki kobalamin bağımsız metiyonin sentaz proteininin amino asit dizisine benzediği gösterilmiş ve metE'nin alerjenik bir protein olduğu belirtilmiştir. Assarehzadegan ve diğ. (2011) tarafından *Salsola kali* poleni üzerine yapılmış bir çalışmada ise *Salsola kali* polen ekstresi deri prik testi ile hasta ve kontrol gruplarına uygulanmış ve duyarlı bireylerden toplanan serum örneklerinin immünolojik ve kütle spektrometrik analiz sonuçlarına göre 85 kDa'lık protein seçilip rekombinant olarak üretilmiştir. Üretilen rekombinant proteinin duyarlı bireyler üzerinde test edilmesi sonucunda alerjenik olduğu sonucuna varılmış ve bu alerjen proteinin dizi analizi yapılarak *Arabidopsis thaliana*'nın metE proteinine benzer olduğu gösterilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisi uygun konakçı organizmaların kullanılması ile uygun yapıda ve işlevde doğal alerjenlerin rekombinant olarak üretilebilmesini mümkün kılmaktadır (Chua ve diğ., 1988; Fang ve diğ., 1988; Thomas ve diğ., 1988; Mothes ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2008; Assarehzadegan ve diğ., 2011; Zarinhadideh ve diğ., 2015). İlk rekombinant alerjen proteinler olarak *Der p 1* (*Dermatophagoides pteronyssinus*) (Chua ve diğ., 1988; Thomas ve diğ., 1988) ve *Dol m 5 (Dolichovespula maculata)* (Fang ve diğ., 1988) alerjenleri üretilmiş ve üretilen bu rekombinant alerjenlerin yaban tip alerjenler ile benzer alerjenik özelliklere sahip olduğu yapılan alerji testleri ile gösterilmiştir. Günümüzde birçok alerjen molekül rekombinant olarak üretilmektedir ve bu moleküllerin biyoteknolojik uygulamalarla sabit kalitede ve yeterli miktarlarda elde edilmesi mümkün olabilmektedir (Mothes ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2008; Assarehzadegan ve diğ., 2011; Zarinhadideh ve diğ., 2015).

Bu bilgiler referans alınarak, bu tez çalışmasında yerel *Morus alba* L. (ak dut) poleninden izole edilen *metE* geninin ökaryotik bir model organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'ye aktarımı ve metE proteininin ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere rekombinant olarak üretimi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında öncelikle *Morus alba* L. polenlerinden total RNA izolasyonunu takiben total RNA'lardan cDNA sentezi yapılarak cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu cDNA kütüphanesinden *metE* genini çoğaltmak için biyoinformatik analizlerle belirlenen, bu gene özgü ileri ("forward", F) primer olarak 5'ATGGCATCCCACATCGTCGGT3' dizisi ve geri ("reverse", R) primer olarak 5'TCACTTGGCACTGGCCAACTG3' dizisi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan gen parçası, elektroforetik analizi yapıldıktan sonra agaroz jelden geri kazanılarak dizilemeye gönderilmiştir. . Dizileme sonuçlarına ve yapılan biyoinformatik analizlere göre çoğaltılan genin cDNA'sının dizilenmesi ile metE geni olduğu doğrulanmıştır. Doğrulaması yapılan *metE* geninin pSLF1073 plazmidine ligasyonu yapıldıktan sonra ligasyon ürünleri (rekombinant plazmidler) transformasyon işlemleriyle *E. coli*'ye aktarılmıştır. Seçici besiyerinde seçilen transformant kolonilerin koloni PZR ile doğrulaması yapıldıktan sonra *E. coli*'de çoğaltılan ve izole edilen ligasyon ürünleri tekli ve çiftli restriksiyon endonükleaz kesimi ile kontrol edilmiş ve dizilemeye gönderilerek plazmide aktarılan genin *metE* olduğu doğrulanmıştır. *metE* geni aktarılmış rekombinant plazmidler lityum asetat yöntemi ile *S. pombe*'ye transforme edilmiştir. Seçici besiyerinden seçilen transformant koloniler koloni PZR ile doğrulandıktan sonra, minimal besiyerinde 1 gece 37°C'da çoğaltılmış ve hücreler toplanmıştır. Ekspresyon vektöründe klonlanan *metE* geninin anlatımı, toplanan hücrelerden izole edilen proteinlerin denatüre jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve ardından Western blot analizi ile doğrulanmıştır.

Bu tez çalışmasıyla, bir polen alerjeni olan ak dut metiyonin sentaz proteini ilk kez rekombinant olarak üretilmiştir. Sabit kalitede ve yeterli miktarlarda protein üretimini mümkün kılan rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak üretilecek rekombinant metiyonin sentaz ile geniş hasta gruplarında klinik çalışmalar yapmak mümkün olabilecektir. Bu tez sırasında kazanılan deneyimler biyoteknolojik üretimi

gerçekleştirilen metiyonin sentazın da içinde yer aldığı, alerjik hastalıklara spesifik, yeni tanı kitleri ve tedaviye yönelik yeni aşıların geliştirilmesine öncülük edecektir.

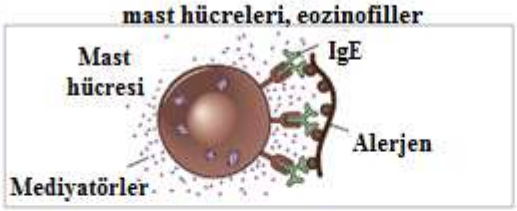
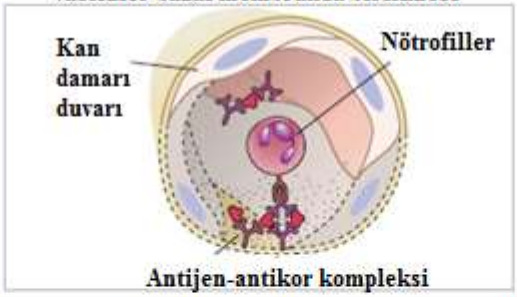
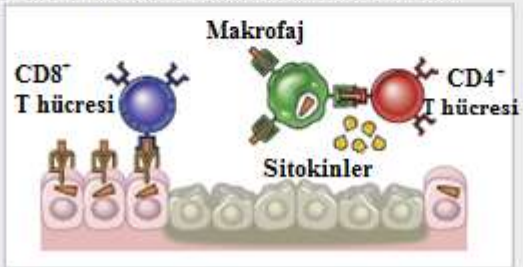
# 2. GENEL KISIMLAR

## 2.1. ALERJİ

*Alerji* kelimesi ilk olarak 1906 yılında Clemens von Pirquet tarafından hem konakçıyı koruyucu ("host-protective") hem de potansiyel olarak konakçıya zararlı ("host-injurious") bağışıklık reaksiyonları için kullanılmıştır (Rajan, 2003). Kelimenin kökeni Yunanca "allos" (diğer) ve "ergon" (aksiyon, hareket) sözcüklerden gelmektedir (Garfield, 1985). Antikor veya hücre aracılı olarak gerçekleşebilen alerji, immünolojik mekanizmalar tarafından başlatılan bir aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak da tanımlanmaktadır. Aşırı duyarlılık reaksiyonları, duyarlı bireylerde alerjik astım, alerjik rinokonjonktivit, alerjik rinit (saman nezlesi), egzama vb. problemlere neden olmaktadır (Peebles ve diğ., 2012). Alerjik reaksiyonlara neden olan alerjen (immün sistemi uyararak alerjik reaksiyonların oluşmasına neden olan antijen) kaynakları genellikle ev tozu akarları, ev hayvanlarının epidermisi, ağaç veya çiçek polenleri, bazı gıda ürünleri ve böcek zehirleridir (Puc, 2003; Abbas ve diğ., 2012).

Aşırı duyarlılık reaksiyonları 1963 yılında, İngiliz immünologlar Coombs ve Gell (1963) tarafından 4 grup altında sınıflandırılmıştır. Bu gruplar Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV alerjik reaksiyonlardır (Şekil 2.1) (Rajan, 2003; Abbas ve diğ., 2012). Alerjik reaksiyonlarda en çok görülen grup ani aşırı duyarlılık veya Tip I aşırı duyarlılık grubudur. Alerjen antijenlere karşı üretilen IgE antikorlarının mast hücrelerine bağlanması ve mediyatörlerin salgılanması ile Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları tetiklenir ve popülasyonun %25'ine etki ederek genellikle alerjik rinit şeklinde kendini gösterir (Mothes ve diğ., 2006; Abbas ve diğ., 2012). Tip II aşırı duyarlılık reaksiyonunda ise belirli bir hücre veya doku yüzeyinde bulunan antijenlere karşı oluşan IgE dışındaki (IgG, IgM sınıfı) antikorlar rol oynamaktadır ve bu hücre ya da dokulara hasar vererek işlevlerini bozabilirler. Tip III aşırı duyarlılıkta, antikorlar çözünür antijenlere karşı oluşur ve oluşan antikorlar bu antijenlerle kompleksler oluşturabilir. Bu duyarlılık reaksiyonu ile gelişen immün kompleksler çeşitli dokuların damarlarında birikerek enflamasyona (yangı) ve doku hasarına yol açabilirler. Tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonu

ise hücresel tip aşırı duyarlılık reaksiyonu (geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu) olup bu duyarlılık reaksiyonlarında T hücreleri rol oynamaktadır (Abbas ve diğ., 2012).

| Aşırı duyarlılık tipi | Patolojik immün düzenekler | Hastalığa ve doku hasarına neden olan mekanizmalar |
|---|---|---|
| Ani aşırı duyarlılık (Tip I) | $T_H2$ hücreleri, IgE antikou, mast hücreleri, eozinofiller   | Mast hücre kaynaklı mediyatörler (vazoaktif aminler, lipid mediyatörler, sitokinler)<br>Sitokin aracılı enflamasyon (eozinofiller, nötrofiller) |
| Antikor aracılı hastalıklar (Tip II) | Hücre yüzeyi veya hücredışı matriks antijenlerine karşı IgM, IgG antikorları   | Lökositlerin kompleman ve Fc reseptörü-aracılı toplanması ve etkinleşmesi (nötrofiller, makrofajlar)<br>Hücrelerin fagositozu ve opsonizasyon<br>Hücresel işlevlerde normalden sapmalar (örn; hormon reseptör sinyali) |
| İmmün-kompleks aracılı hastalıklar (Tip III) | Dolaşan antijenlerin ve IgM veya IgG antikorlarının immün komplekslerinin vasküler bazal membranda birikmesi   | Lökositlerin kompleman ve Fc reseptörü-aracılı toplanması ve toplanması ve etkinleşmesi |
| T hücre aracılı hastalıklar (Tip IV) | 1- $CD4^+$ T hücreleri (gecikmiş tip aşırı duyarlılık)<br>2- $CD8^+$ STL (T hücre-aracılı hücre lizisi)   | 1- Makrofaj etkinleşmesi, sitokin-aracılı enflamasyon<br>2- Hedef hücre lizisi, sitokin-aracılı enflamasyon |

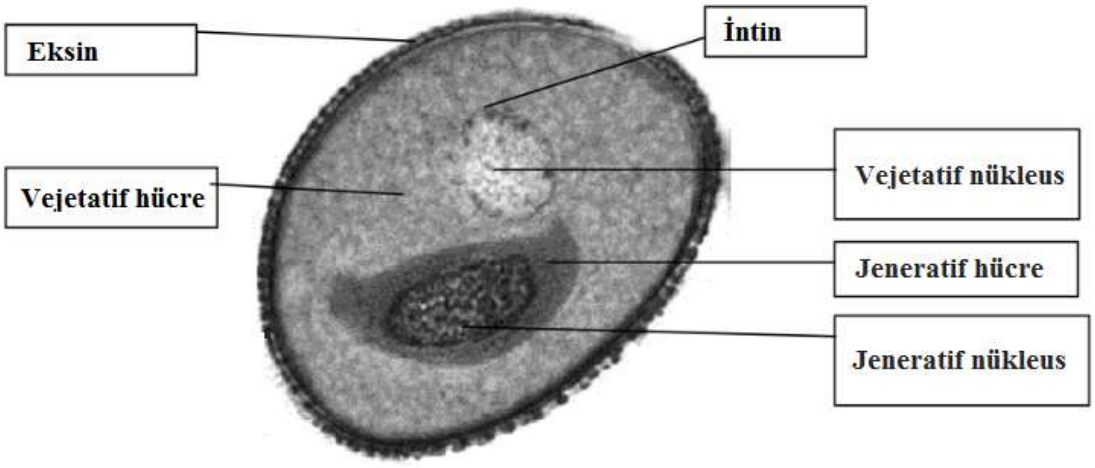
**Şekil 2.1:** Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının tipleri ve immün sistem patolojisi (STL – sitotoksik T lenfositi, Ig – immünoglobulin) (Abbas ve diğ., 2012).

Başlıca dört ana tipte olan bu aşırı duyarlılık reaksiyonları değişik immün etkili cevaplar yoluyla doku hasarı ve hastalıklara neden olmaktadır. Bu alerjik hastalıklar günümüzde

önemli bir sorun teşkil eden sağlık problemlerinden biri olup ülkemizdeki her yaş grubundan bireylerin %20-30 kadarını etkilemektedir. Bu hastalıklar ayrıca kişilerin yaşam kalitesini düşürmekte ve oluşturduğu iş gücü kaybı ile de maddi zarar oluşturmaktadır. Alerjik hastalıkların tedavilerinin daha iyi yapılabilmesi için yeni teknolojileri kullanarak hızlı ve doğru tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Johansson ve diğ., 2001; Puc, 2003).

## 2.2. POLEN ALERJİSİ

Alerjik duyarlılığa ve alerjik hastalık bulgularının ortaya çıkmasına neden olan en önemli aeroalerjenlerden biri polenlerdir. Polenler, çiçekli bitkilerin yaşam döngüsünün bir parçası olup erkek gametlerini içeren özel kısımlarıdır (Şekil 2.2). Doğada, polenler çeşitli şekillerde (sıklıkla küre şeklinde) ve boyutlarda (12-300 μm çapında) bulunmaktadır. Ekzin olarak adlandırılan dış duvarlarları sporopollenin adı verilen bir tabakadan oluşur ve bu tabaka polenin fiziksel ve kimyasal etkilerden korumasında büyük önem taşır (Taketomi ve diğ., 2006).




**Şekil 2.2:** Polen yapısının şematik gösterimi (Ukhanova ve Bogomolova, 2015).

Polen taneleri havadaki yüzen parçacıklar (aeroplankton) arasında en bol bileşendir ve kara ve su yüzeylerinin üzerinde sürüklenerek taşınırlar (Cresti ve Linskens, 2000). Rüzgarın yardımıyla tozlanan tohumlu bitkilerden gelen polenler, dünya çapında Tip I alerjinin en önemli tetikleyicilerinden birini teşkil eder. Polen mevsiminde, çok sayıda çimen, ağaç ve yabani ot türüne ait polenlerin yüksek konsantrasyonlarda olması özellikle

bu dönemlerde duyarlı kişilerde mevsimsel rinokonjonktivitten, bronşiyal astıma kadar çeşitli alerjik semptomlar gelişmesine neden olmaktadır (Radauer ve Breiteneder, 2006). Ayrıca, olgun polenlerin olgunlaşmamış polenlere göre daha alerjenik olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Majd ve diğ. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, immünolojik analizler sonucu olgunlaşmamış polen proteinlerinde herhangi bir alerjenik bant tespit edilmemiştir ve alerjenik proteinlerin çoğunun polen oluşumunun gelişim sürecinde üretildiği ve gelişmelerini tamamlayan olgun polen tanelerinde biriktiği öne sürülmüştür.

Polenler birçok protein içermektedir; ancak bunların küçük bir kısmı bağışıklık sistemi ile etkileşime girme özelliğine sahiptir ve alerjik semptomlara neden olmaktadır. Alerjenik tepkimelerin oluşmasında çoğunlukla polenlerin yapısında bulunan suda çözünebilir proteinler ya da glikoproteinler etkili olmaktadır. Bu proteinlerin molekül ağırlıkları genellikle 10-70 kDa arasında değişmektedir (Puc, 2003). Alerjik reaksiyon oluşumuna yol açan iyi bilinen polen alerjenleri ve kaynakları Tablo 2.1'de verilmiştir.

İnsan uygarlığının getirdiği çevresel koşullar ve değişimler polen alerjisi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Küresel iklim değişikliği; polen mevsiminin başlangıcını, süresini ve yoğunluğunu, bitki türlerinin dağılımını ve polen tanelerinin alerjen içeriğini etkilemektedir (Radauer ve Breiteneder, 2006). Hava kirliliği, dağınık bir şekilde havada bulunan polen tanelerinin üzerindeki stresin büyümesine, kontaminasyona ve polende şekil değişikliklerine neden olabilmektedir (Behrendt ve diğ., 1992; Knox ve Suphioglu, 1996; Knox ve diğ., 1997; Emberlin, 1998; Chehregani ve diğ., 2004). Hava kirliliğinin yoğun olduğu bölgelerde bazı polenlerin yapısının, ultrastrüktürünün, kimyasal bileşiminin ve alerjenitesinin değişikliklere uğradığı bildirilmiştir (Ghanati ve Majd 1995; Majd ve Kiabi, 1997). Yapılan çalışmalarda $NO_2$, $SO_2$ ve CO gibi kimyasalların polen tanelerinin çözünebilir protein kompozisyonu üzerinde değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise havadaki kirleticilerin polen proteinlerinin kırılmasına veya polenlerin yeni proteinler oluşturmasına neden olabilecekleri bildirilmiştir (Ruffin ve diğ., 1983; Chakraborty ve diğ., 1996; Majd ve diğ., 2004). Bu nedenlerle çevrede bulunan alerjenik polen yoğunluğunu ve kompozisyonunu tahmin etmek kolay değildir (Cresti ve Linskens, 2000; Radauer ve Breiteneder, 2006).

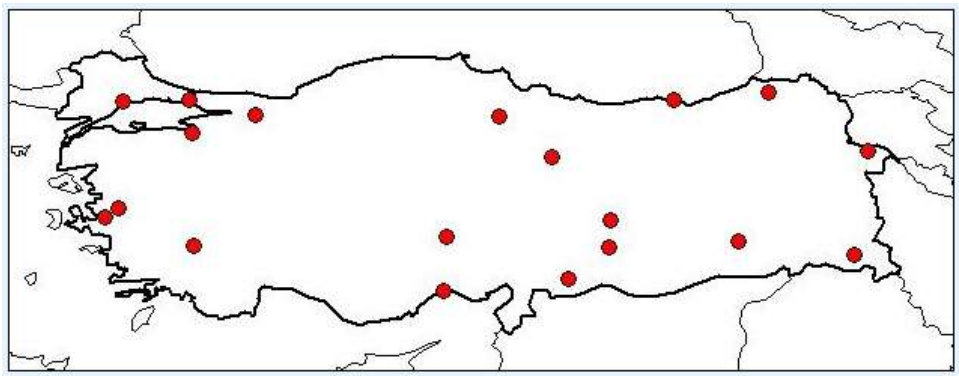
**Tablo 2.1:** Alerjik reaksiyonlara yol açtığı iyi bilinen polen alerjenleri ve kaynakları.

| Ağaçlar | Alerjenler | İlgili Literatür | Çayır Otları | Alerjenler | İlgili Literatür |
|---|---|---|---|---|---|
| **Huş Ağacı (*Betula verrucosa*)** | Bet v 1 17 kDa | Ipsen ve Løwenstein, 1983 | **Çayır yumağı (*Festuca Pratensis*)** | Fes p 4 60 kDa | Gavrović-Jankulović, ve diğ., 2000 |
| | Bet v 2 15 kDa | Movérare ve diğ., 2002 | **İngiliz Çimi (*Lolium Perenne*)** | Lol p 1 27 kDa Lol p 11 16 kDa | Griffith ve diğ., 1991 |
| | Bet v 3 24 kDa | Seiberler ve diğ., 1994 | | | |
| | Bet v 4 7-8 kDa | Engel ve diğ., 1997 | **Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata*)** | Dac g 1 32 kDa | Van Ree ve diğ., 1995 |
| | Bet v 6 35 kDa | Karamloo ve diğ., 1999 | | Dac g 4 60 kDa | Batard ve diğ., 1993 |
| | Bet v 7 18 kDa | Cadot ve diğ., 2000 | **Çayır Kelp Kuyruğu (*Phleum pratense*)** | Phl p 1 27 kDa Phl p 2 10-12 kDa Phl p 4 55 kDa | Valenta ve diğ., 1992 |
| **Zeytin ağacı (*Olea europaea*)** | Ole e 1 16 kDa | Asturias ve diğ., 1997 | | | |
| | Ole e 7 9-10 kDa | Tejera ve diğ., 1999 | | Phl p 7 6 kDa | Niederberger ve diğ., 1999 |
| | Ole e 9 46 kDa | Huecas ve diğ., 2001 | | | |
| | Ole e 10 11 kDa | Barral ve diğ., 2004 | | Phl p 11 20 kDa | Marknell DeWitt ve diğ., 2002 |
| **Çınar ağacı (*Platanus acerifolia*)** | Pla a 1 18 kDa Pla a 2 43 kDa | Asturias ve diğ., 2002 | | Phl p 12 14 kDa | Valenta ve diğ., 1994 |
| **Fındık ağacı (Corylus vellana)** | Cor a 1 17 kDa | Pastorello ve diğ., 2002b | **Çayır Salkım Otu (*Poa pratensis*)** | Poa p 1 33 kDa | Esch ve Klapper, 1987 |
| | | | | Poa p 5 34 kDa | Olsen ve diğ., 1991 |
| **Kauçuk ağacı (*Hevea brasiliensis*)** | Hev b 1 14 kDa | Chen ve diğ., 1997 | **Yabani Otlar** | **Alerjenler** | **Kaynaklar** |
| | Hev b 3 24 kDa | Wagner ve diğ., 1999 | **Kazayağı (*Chenopodium album*)** | Che a 1 17 kDa | Barderas ve diğ., 2002 |
| | Hev b 6 20 kDa | Bernstein ve diğ., 2003 | | Che a 2 14 kDa | Barderas ve diğ., 2004 |
| | Hev b 8 15 kDa | Nieto ve diğ., 2002 | **Dar Yapraklı Sinir Otu (*Plantago Lanceolata*)** | Pla l 1 18 kDa | Calabozo ve diğ., 2001 |
| | Hev b 51 15 kDa | Wagner ve diğ., 2000 | **Pelin Otu (*Artemisia vulgaris*)** | Art v 1 28 kDa | De La Hoz ve diğ., 1990 |
| **Meşe ağacı (*Quercus alba*)** | Que a 1 17 kDa | Niederberger ve diğ., 1998 | | Art v 3 12 kDa | Pastorello ve diğ., 2002a |
| **Gürgen ağacı (*Carpinus betulus*)** | Car b 1 17 kDa | Larsen ve diğ., 1992 | | Art v 4 14 kDa | Wopfner ve diğ., 2002 |
| **Sedir ağacı (*Cupressus arizonica*)** | Cup a 1 43 kDa | Aceituno ve diğ., 2000 | **Kanarya otu (*Ambrosia artemisiifolia*)** | Amb a 1 38 kDa | Adolphson ve diğ., 1978 |

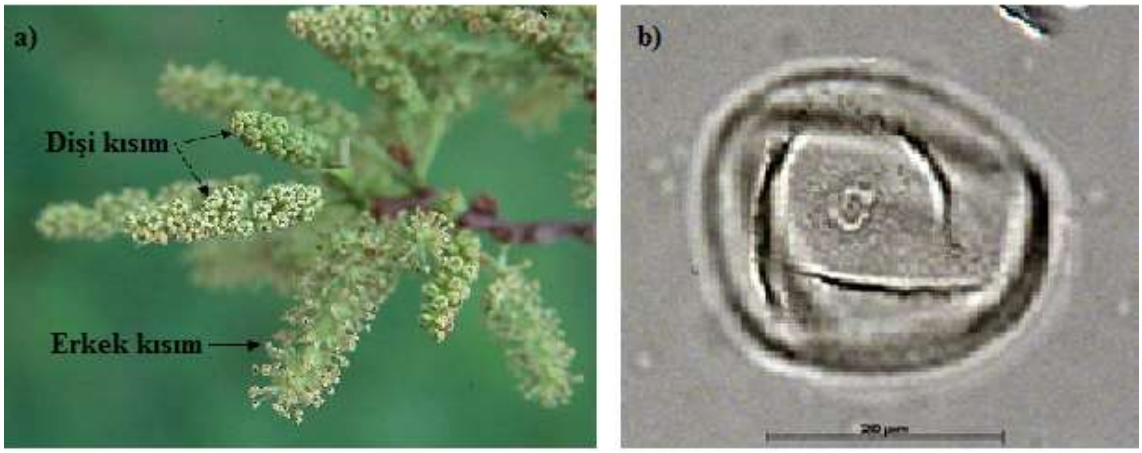
Saf doğal veya rekombinant alerjenler şu anda tanı testlerine (deri prik testi, nazal provokasyon testi vb.) dahil edilmiştir ve alerjen spesifik immünoterapi için de kullanılabilmektedirler. Bununla birlikte, tanısal testlerin doğruluğu ve terapötik yaklaşımların etkinliği hem polen hem de bitki kaynaklı besinler arasında olduğu kadar, farklı polen türleri arasında da alerjenik çapraz reaksiyon ile tehlikeye girmektedir. Polen alerjenlerinin sistematik bir moleküler sınıflandırması, teorik anlayışı kolaylaştıracak ve çapraz reaksiyonun öngörülmesini sağlayacaktır (Radauer ve Breiteneder, 2006).

### 2.2.1. Ak Dut (*Morus alba* L.) Poleninin Alerjenik Özellikleri

Ak dut (*Morus alba* L.) dutgiller (Moraceae) ailesinin bir üyesidir. İlkbaharda çiçeklenen ak dut ağacı kendiliğinden döllenme gösterir ve rüzgar yardımı ile polenlerini yayar. Endemik bir tür değildir. Asıl yetişme alanı Çin, Japonya, Tayland ve Malezya olsa da günümüzde, ak duta Doğu ve Orta-Batı Amerika da dahil olmak üzere tüm dünya genelinde rastlanmaktadır. Türkiye'de ise başta İstanbul, Bursa, Malatya ve Manisa olmak üzere her bölgede yetiştiği görülmektedir. Türkiye'de yetişme alanları Şekil 2.3'te (TÜBİVES, 2011; Gençer ve diğ., 2013), ak dut ağacının çiçeği ve poleni ise Şekil 2.4'te verilmiştir. Ak dut polenleri Türkiye'nin güneybatısındaki Didim ve çevresinde de kaydedilmiştir (Bilisik ve diğ., 2008). Girit adasının kuzey kıyısında yer alan Heraklion şehrinde yapılan bir araştırmada ise, polenleri kaydedilen dutgillerin arasında sayı bakımdan ak dutun yedinci sırada yer aldığı belirtilmiştir (Gonianakis ve diğ., 2006).



**Şekil 2.3:** Ak dut (*Morus alba* L.)'nin Türkiye'de yetişme alanları (TÜBİVES, 2011).




**Şekil 2.4: a)** Ak dut ağacı çiçeği dişi ve erkek kısımları (OSU, 2017) **b)** ak dut poleninin mikroskop görüntüsü (APSA, 2017).

Ak dut polenleri alerjik rinit, alerjik konjonktivit ve astım gibi alerjik hastalıkları tetikleyebilmektedir (Navarro ve diğ., 1997). Amerika Birleşik Devletleri'nin Arizona eyaletinde yapılan bir araştırmada, dut polenlerinin yarı kurak bir çevrede yaşayan çocuklarda görülen astım ve alerjik rinitle ilişkili bir alerjen olduğu gösterilmiştir (Halonen ve diğ., 1997). Tropikal iklime sahip olan Venezüella'nın başkenti Caracas'da da dut ağaçlarının polenlerinin sıklıkla karşılaşılan aeroalerjenlerden olduğu gösterilmiştir (Hurtado ve Riegler-Goihman, 1987). İspanya ve Hindistan'da yapılan çalışmalarda da dut ağacı polenlerinin önemli bir aeroalerjen olduğu bildirilmiştir (Singh ve diğ., 1987; Hernández Prietove ve diğ., 1998; Subiza ve diğ., 1995; Singh ve Kumar, 2003; Gonzalo-Garjo ve diğ., 2006). İspanya'nın Santander bölgesinde yaşları 13-69 arasında olan ve mevsimsel rinokonjonktivit semptomları görülmüş 30 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, bu hastaların %27'sinin sinir otu, %20'sinin meşe ağacı, %13'ünün ise dut ağacı polenlerine alerjenik olduğu belirlenmiştir (de Benito Rica ve diğ., 2004).

## 2.3. METİYONİN SENTAZ

Metiyonin sentaz, metiyonin biyosentezinin son basamağı olan bir metil grubunun N5-metil-5,6,7,8-tetrahidrofolattan ($CH_3$-$H_4$folat) L-homosisteine (Hcy) transferini katalizler. Birbiri ile bağlantısı olmayan iki protein grubu bu reaksiyonu katalize eder. Bunlar kobalamin bağımlı metiyonin sentaz (metH) ve diğeri ise kobalamin bağımsız metiyonin sentaz (metE)'dır. Benzer işlevleri yerine getiren metH ve metE benzer diziler

taşımamaktadırlar. Hem metE hem de metH bakterilerde bulunurken, mantarlar ve bitkilerde sadece metE bulunmaktadır. metE'nin farklı bir çinko metalloenzim ailesine ait olduğu düşünülmektedir (Drummond ve diğ., 1995; Ferrer ve diğ., 2004; Taurog ve Matthews, 2006).

Metiyonin sentazın alerjen bir protein olabileceğine dair ilk gösterge Chardin ve diğ. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada kanolanın (*Brassica napus*) poleninde bulunan yüksek molekül ağırlıklı alerjenik proteinin (yaklaşık 80 kDa) amino asit dizisinin *Arabidopsis thaliana*'da bulunan kobalamin bağımsız metiyonin sentaza benzediği gösterilmiş ve metE'nin alerjenik bir protein olduğu belirtilmiştir.

*Salsola kali*'nin poleni ile yapılan bir çalışmada ise, *Salsola kali*'nin polenine duyarlı bireylere bu polenler verilerek IgE üretimi sağlanmış ve daha sonra hasta bireylerin serumları alınarak immünolojik analizler ile *Salsola kali*'nin poleninde bulunan protein alerjenler (IgE'ye bağlanan antijenler) belirlenmiştir. Kütle spektrometresinde alınan sonuçlar doğrultusunda 85 kDa'lık protein seçilip rekombinant olarak üretilmiş ve üretilen bu rekombinant alerjene duyarlı bireylerde deneme sonucunda pozitif sonuç alınmıştır. Yapılan dizi analizleri sonucunda bu proteinin *Arabidopsis thaliana*'nın metE proteinine benzer olduğu gösterilmiş ve metE'nin alerjen bir protein olabileceği rapor edilmiştir (Assarehzadegan ve diğ., 2011).

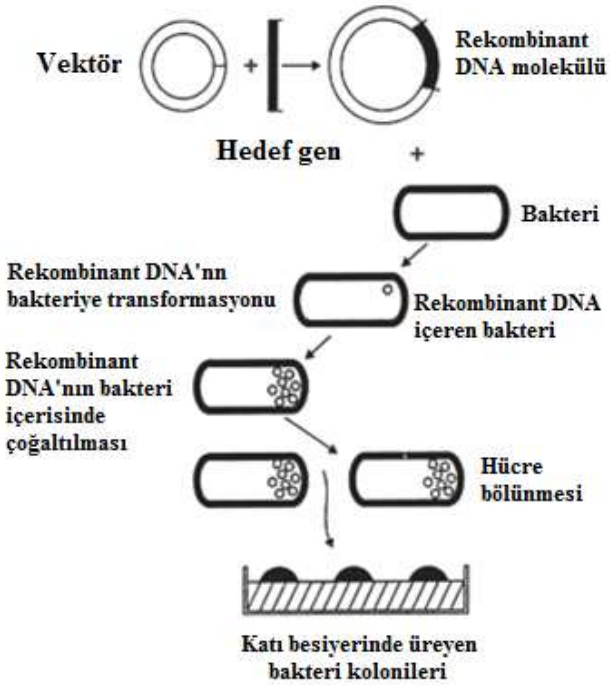
Çetereisi (2014)'nin yaptığı yüksek lisans tez çalışmasında polen alerjisi olan bireylerin serumlarıyla gerçekleştirilen Western blot analizleri, *M. alba*'daki 75-85 kDa ve ≤30 kDa (muhtemelen 15-16 kDa) olan proteinlerin spesifik IgE'lere bağlandığı belirlenmiştir. IgE ile reaksiyon veren 75-85 kDa ağırlığındaki bir protein 2D-elektroforez ile saflaştırılmış ve kütle spektrometresi analizlerine göre 85 kDa'lık proteinin metE proteini olduğu bulunmuştur. *M. alba* polen metiyonin sentazının Türk popülasyonu üzerinde alerjen bir protein olabileceği kanaatine varılmıştır.

## 2.4. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Rekombinant DNA teknolojisi, bir hücreden izole edilen DNA molekülünden çeşitli yöntemler kullanılarak istenen özellikte yeni DNA molekülünün oluşturulmasıdır. Bu

tekniklerle genetik yapı değiştirilebilmekte ve istenen ürünün bol miktarda biyosentezi gerçekleştirilebilmektedir. Genetik mühendisliği yöntemleri ile *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis, Schizosaccharomyces pombe, Pichia pastori, Saccharomyces cerevisiae* vb. organizmalar konak olarak kullanılarak istenen protein ürününün saf ve yüksek verimde rekombinant olarak üretimi mümkün olabilmektedir (Griffiths ve diğ., 1999). Rekombinant DNA teknolojisinin temel aşamaları Şekil 2.5'te verilmiştir.

Genetik mühendisliği teknikleriyle oluşturulan yapı vektör (örneğin, plazmid) ve istenen DNA parçası olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır. Plazmidler bakterilerde, mayalarda ve bazı ökaryotik hücrelerde bulunan, genomik DNA'dan ayrı halkasal veya lineer yapıda bulunabilen çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmid vektörlerin, bir genin veya DNA molekülünün çok sayıda kopyasını üretme, aynı vektörün farklı organizmalarda çalışabilmesi, hücre içinde bulunan bir genin anlatımını susturma, ilaç hedeflenmesi için kapsid üretme vb. birçok özelliği bulunmaktadır. Plazmid ve hedeflenen DNA molekülü DNA ligaz enzimi ile birleştirilir (ligasyon) ve oluşan rekombinant DNA transformasyon olarak adlandırılan belirli metotlar ile hücrelere aktarılır (Lodish ve diğ., 2000).




**Şekil 2.5:** Rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak hedeflenen genin vektöre ligasyonu ve ligasyon ürününün transformasyonu (Soydemir ve Aksoy, 2017).

### 2.4.1. Rekombinant Alerjenler

Moleküler biyolojideki gelişmeler, uygun konakçı organizmalar aracılığıyla yapısal, fonksiyonel ve immünolojik olarak doğal alerjenlere benzeyen molekülleri rekombinant olarak üretmeyi mümkün kılmaktadır. Bu tip moleküller biyoteknolojik uygulamalarla sabit kalitede ve yeterli miktarlarda elde edilebilirler (Mothes ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2008; Assarehzadegan ve diğ., 2011; Zarinhadideh ve diğ., 2015).

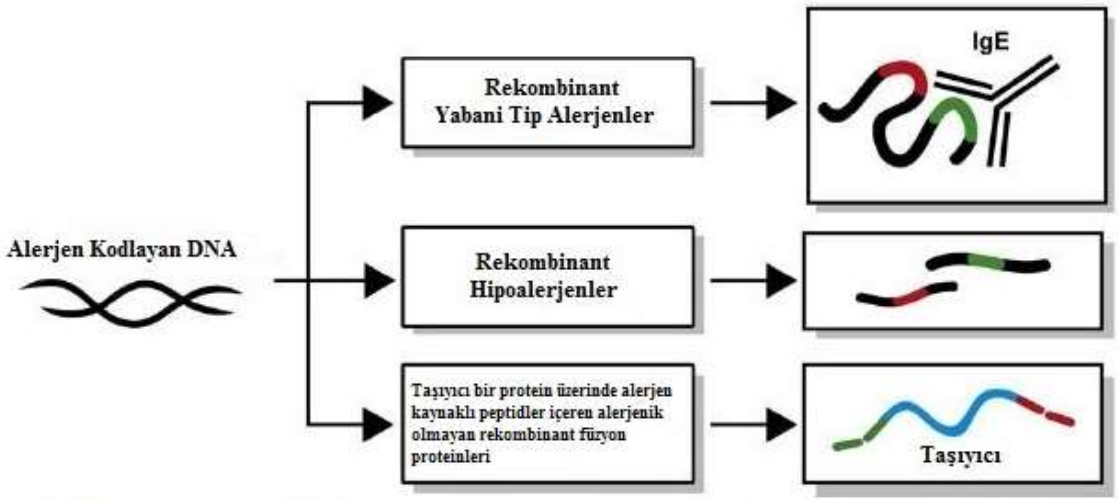
1988 yılında, ilk rekombinant alerjen proteinler olarak bir ev tozu akarı olan *Dermatophagoides pteronyssinus*'un 1 numaralı majör alerjeni ("*Dermatophagoides pteronyssinus* major allergen number 1") *Der p 1* ve beyaz yüzlü eşek arısı *Dolichovespula maculata*'nın majör 5 numaralı alerjeni ("*Dolichovespula maculata* major allergen number 5") *Dol m 5* üretilmiş ve rekombinant alerjenlerin doğal alerjen ile benzer alerjenik özelliklere sahip olduğu yapılan alerji testleri ile gösterilmiştir (Chua ve diğ., 1988; Fang ve diğ., 1988; Thomas ve diğ., 1988). İlerleyen yıllarda pek çok alerjen molekülü prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda üretilmiştir. Bu iki sistem de birbirlerine göre farklı avantajlar içermektedir. Ökaryotik sistemlerin en önemli avantajları, rekombinant alerjenlerin üretildiği ortamda çözünür halde olmasından dolayı kolaylıkla izole edilmesi, ürünlerin çok yüksek saflık derecesine sahip olması ve protein konformasyonlarını sağlayabilmesidir (Cortegano ve diğ., 2004).

Doğal kaynaklardan hazırlanan geleneksel alerjen ekstreleri, tanı ve tedavi için kullanılan tekniklerde çok sayıda dezavantaj bulundurmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için biyoteknolojik uygulamalar ile rekombinant alerjen üretmek iyi bir çözüm yoludur. Rekombinant alerjenlerin geleneksel alerjen ekstreleri üzerindeki avantajları Tablo 2.2'de verilmiştir (Valenta ve Nideberger, 2007).

**Tablo 2.2:** Rekombinant alerjenlerin geleneksel alerjen ekstrelerine göre avantajları (Valenta ve Nideberger, 2007).

| Doğal Alerjen Ekstrelerinin Dezavantajları | Rekombinant Alerjenlerin Avantajları |
|---|---|
| ▪ Çok sayıda tanımsız bileşenler içerir ve bazıları alerjik immün yanıtları teşvik edebilir. | ▪ Moleküller tanımlanmış fizikokimyasal ve immünolojik özelliklere sahiptir ve avantajlı karakteristikleri geliştirmek için modifiye edilebilir. |
| ▪ Önemli alerjenlerden düşük ya da eksik miktarda olabilir. | ▪ Miktarları kolaylıkla birim kütle bazında kontrol edilebilir. |
| ▪ Büyük ölçüde farklı güçte ve oranda alerjen içerebilir. | ▪ Etki ve oranlar tam olarak her bir molekül için ayarlanabilir. |
| ▪ Diğer kaynaklardan istenmeyen materyaller veya alerjenler bulaşmış olabilir. | ▪ Saf molekülleri içerir. |
| ▪ Hastanın hassasiyet profiline uygun olmayabilir. | ▪ Alerjen aşıları hastanın tam hassasiyet profiline göre uyarlanabilir. |
| ▪ Yeni duyarlılıklara neden olabilir. | ▪ Alerjen aşılar için uluslararası kalite standartlarına uygundur. |
| ▪ Alerjen aşılar için uluslararası kalite standartlarına uygun değildir. | ▪ Mekanizmaya göre düzenlenecek tedavinin izlenmesi ve incelenmesine imkan sağlar. |
| ▪ Farklı ürünler ve gruplar arasında mukayese edilemez. | ▪ Tekrarlanabilecek farklı tedavi stratejilerine uyacak şekilde değiştirilebilir. |
| ▪ Mekanizmaya göre düzenlenecek tedavinin izlenmesi ve incelenmesine imkan vermeyebilir. | ▪ Yeniden üretilebilen ürünler diğer gruplar ile tam olarak kıyaslanabilir. |
| ▪ Çok sayıda çapraz reaksiyon verebilecek molekül olabileceği için sorun yaratabilir. | |

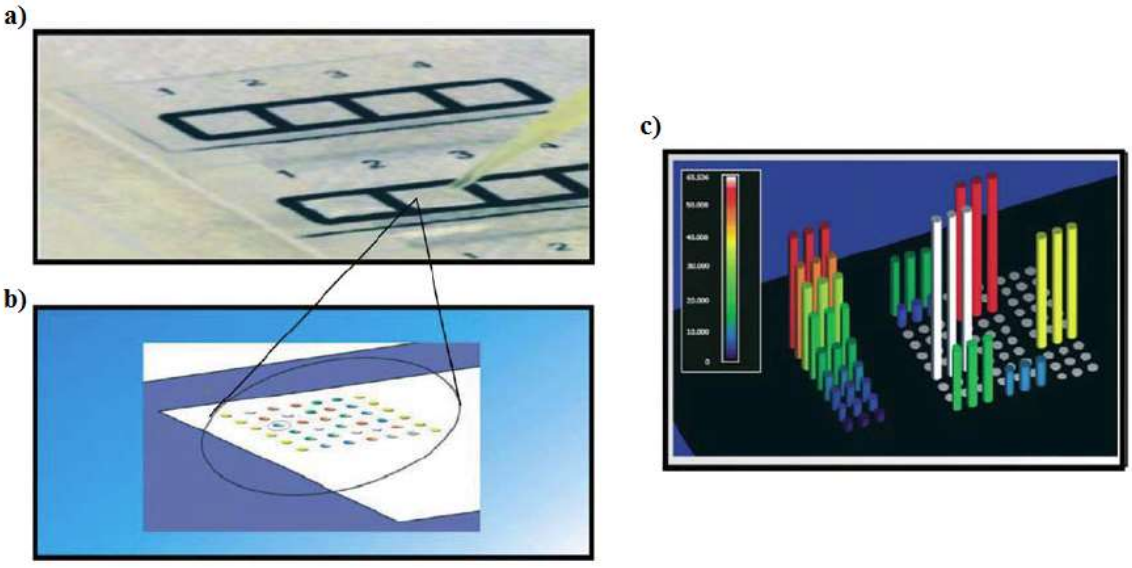
Rekombinant alerjenlere karşı oluşan spesifik IgE'lerin belirlenmesi ile hastanın moleküle karşı bireysel reaksiyon profili sınıflandırılabilmekte ve gerçek hastalık yapıcı moleküller tam ve doğru şekilde tanımlanabilmektedir (Mothes ve diğ., 2006). Günümüzde rekombinant teknolojilerle sadece tanıda değil, tedavide de kullanılabilecek füzyon proteinlerini üretmek olası hale gelmiştir (Şekil 2.6).




**Şekil 2.6:** Alerjen kodlayan DNA dizisinden rekombinant alerjen temelli aşılara (Valenta ve diğ., 2011).

Yabani tip alerjenlerden konformasyonel IgE epitoplarını oluşturan alerjen bölümleri kırmızı ve yeşil ile kalan alerjen dizisi ise siyah ile gösterilmiştir. Füzyon proteinlerinde alerjenin büyük parçaları yabancı bir taşıyıcı protein (mavi) ile yer değiştirmiştir.

Son yıllarda hızlı bir şeklide gelişen çip teknolojisi sayesinde rekombinant alerjenlere dayalı mikroçipler geliştirilmektedir. Rekombinant alerjenli çipler ile tek bir aşamada ve az miktarda serumla çok sayıda alerjene karşı IgE reaktivitesi tespit etmek mümkün olmuştur (Şekil 2.7) (Mothes ve diğ., 2006).




**Şekil 2.7:** Tip I alerjinin teşhisi için çoklu-alerjen testi (Mothes ve diğ., 2006).

**a)** Saflaştırılmış ya da rekombinant alerjenler, tamamen otomatik "spotter" kullanılarak teflon kaplı cam bir taşıyıcı üzerine monte edilmiştir. **b)** Yuvarlak içinde gösterilen alan bir spotu temsil etmektedir ve bu alan üzerinde yüzlerce farklı molekül olabilir**. c)** Serumdan 20 µL kadar test alanına eklemek yeterlidir ve floresan işaretli IgE antikoru kullanarak, alerjene özgü IgE antikorları tespit edilir. Ardından özel bir yazılım ile bir hastanın kesin reaksiyon profili belirlenebilir ve analiz edilebilir.

## 2.5. REKOMBİNANT ALERJEN ÜRETİMİNDE KULLANILAN ORGANİZMALAR

Günümüze kadar rekombinant alerjen üretimi için birçok organizma kullanılmıştır. *Escherichia coli, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Baculovirus, Nicotiana benthamiana* gibi organizmalar buna örnek verilebilir (Schmidt ve Hoffman, 2002). Aşağıda bu çalışmada konakçı olarak kullanılan organizmalar hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.5.1. *Escherichia coli*

Prokaryotik bir model organizma olan *Escherichia coli*, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarında özellikle rekombinant DNA çalışmalarında konak organizma olarak yaygın bir kullanım alanı bulur (Singleton, 1999). Karakterizasyonu çok iyi yapılmış olan *E. coli*, rekombinant protein üretimi için de en çok kullanılan mikroorganizmadır (Cornelis, 2000).

*E. coli*'de rekombinant proteinlerin üretimine uygun çeşitli protein anlatım sistemleri mevcuttur. Plazmidlerin kullanımı yüksek düzeyde protein anlatımlarına olanak sağlamakta ve böylece endüstriyel fermentasyon süreçlerinde bol miktarda protein üretimi gerçekleştirilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk yararlı uygulamalarından biri insan insülininin *E. coli*'de üretimidir (Goeddel ve diğ., 1979).

*E. coli* interferonlar, interlökinler, koloni stimülan faktörler, büyüme hormonları, insülin benzeri büyüme faktörleri ve insan serum albümini gibi proteinlerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte *E. coli*'nin prokaryotik bir hücre olması sebebiyle protein üretimi sırasında bazen doğru olmayan katlanmalar oluşabilmektedir. Aktif olmak için post-translasyonel modifikasyonlara gereksinim duyan ve bazı büyük kompleks yapılı proteinlerin üretiminde *E. coli* kullanılamamaktadır. (Choi ve Lee, 2004).

### 2.5.2. *Schizosaccharomyces pombe*

*Schizosaccharomyces pombe,* "fisyon mayası" olarak adlandırılan, 13.8 megabaz (Mb) genom boyutuna sahip, ökaryotik tek hücreli bir organizmadır (Hoffman ve diğ., 2015). *S.pombe*, Lindner (1893) tarafından ilk defa bir Doğu Afrika birasında saptanmış ve

Osterwalder (1924) tarafından Güney Fransa'daki üzüm sularından izole edilmiştir. Organizmanın karakterizasyonu ise Leupold (1950) tarafından yapılmıştır.

*S.pombe*, Fungi aleminin Ascomycota şubesinin bir türüdür. Bu şubenin belirgin özelliği, "askus" adı verilen özelleşmiş bir yapı içerisinde sporlarının bulunmasıdır. 3-4 µm çapında ve 7-15 µm uzunluğunda olan ve silindirik bir morfolojisi bulunan *S. pombe*, tipik ökaryotik hücre döngüsünde bulunan G1, S, G2 ve M fazlarına sahiptir (Hoffman ve diğ., 2015). *S. pombe* genomu dizilenen 6. model organizma olup 5.7 Mb (Kromozom I), 4.6 Mb (Kromozom II) ve 3.5Mb (Kromozom III) boyutunda üç büyük kromozomu bulunmaktadır (Wood ve diğ., 2002). Kromozomları yüksek ökaryotik organizmalara benzer şekilde büyük kompleks sentromer yapısına sahiptir (Rumpf ve diğ., 2010).

Pek çok ökaryotik proteinin üretimi ve saflaştırılması için araştırmacılar bakteriyel organizmalar yerine konak olarak *S. pombe* gibi ökaryotik organizmalara yönelmişlerdir. Çünkü bakteriyel konakçılarda ökaryotik genlerin anlatımının yapılmasında bazı problemler ile karşılaşılabilmektedir. Bunlar; bakteriden gelebilecek toksisite, anlatımı yapılan proteinlerin inklüzyon cisimciği oluşturabilmesi, fosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşememesi gibi durumlardır. *E.coli*'de yaşanan bu gibi problemlerin yüksek ökaryotik organizmalara benzeyen *S. pombe*'de görülmemesi sebebiyle *S. pombe* rekombinant protein üretiminde genellikle kullanımı tercih edilen bir organizma haline gelmiştir (Hosfield ve Lu, 1999). Ayrıca yeşil floresan protein, insan büyüme hormonu, insan transferrini gibi yüksek ökaryotlara ait heterolog proteinlerin üretimi için de *S. pombe*'nin uygun bir konak olduğu düşünülmektedir (Takegawa ve diğ., 2009; Sasaki ve diğ., 2013).

# 3. MALZEME VE YÖNTEM

## 3.1. POLEN ÖRNEKLERİ

Bu tez çalışmasında, "İstanbul'daki Ak Dut (*Morus alba L.)* ve Mavi Atlas Sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. Cv. 'Glauca'] Polenlerinin Alerjenik Proteinleri, (İ.Ü. BAP No: 30217)" başlıklı yüksek lisans tezi (Çetereisi, 2014) kapsamında toplanmış *Morus alba* polen örnekleri kullanıldı. Bu polenler İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki uzmanlar tarafından 2012 yılında Nisan-Mayıs aylarını kapsayan disseminasyon döneminde İ.Ü. Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenler kullanılarak kağıt zarflara toplandı. Erkek çiçek kurullarının ayrılması için bir gün boyunca kurutma kağıdının üzerinden bekletilen polenler farklı gözeneklere (90 mμ, 180 mμ, 250 mμ) sahip elekler bulunduran polen eleme cihazından geçirilerek toplama kabına biriktirildi ve dijital hassas terazide ağırlıkları belirlendikten sonra RNA izolasyonu için kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-80°C) özel tüplerde saklandı.

## 3.2. KULLANILAN ORGANİZMALAR ve PLAZMİD

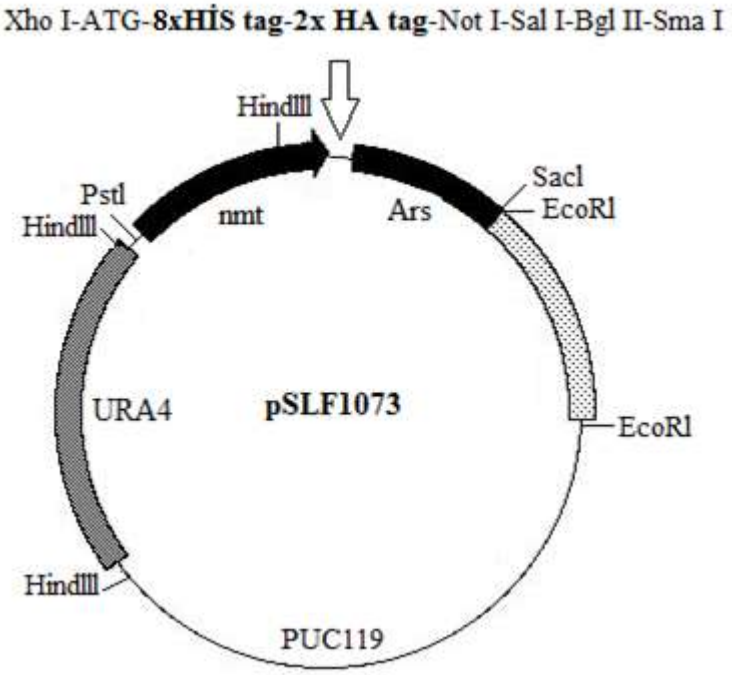
Çalışmada rekombinant protein üretmek için mantarların Ascomycetes sınıfında yer alan tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'nin urasil geni delesyonlu mutant ırkı (*ura4-D18h*$^-$) ve plazmidin çoğaltılması için ise *Escherichia coli DH5α* ırkı kullanıldı. Organizmalar İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koloksiyonundan temin edildi. Bu organizmalara ait özellikler Tablo 3.1'de verildi.

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan *S. pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri.

| Irklar | Özellikleri |
|---|---|
| *S. pombe ura4-D18h*$^-$ | Orotidin-5′-fosfat (OMP) dekarboksilaz geni delesyonlu |
| *E. coli DH5α* | F/endA1hsdR17($r^-_k m_k^+$)supE44thi$^-$ 1recA1 gyrA($nal^r$)relA1Δ(lacZYA$^-$arg FU169deoR[ø80 dLacΔ(LacZ)M15] |

Bu tez kapsamında kullanılan pSLF1073 plazmidi Prof. Dr. Susan L Forsburg tarafından tasarlanmış olup Japonya'daki bir araştırma merkezinden [National Bioresource Project

Yeast Genetic Resource Center Japan (YGRC/NBRP)] elde edildi. Tiamin ile kontrol edilen güçlü "nmt1 promotörü" içeren, 8X His (Histidin) ve HA (İnsan influenza hemagglütinin, "Human influenza hemagglutinin") etiketi bulunduran pSLF1073'ün genetik haritası Şekil 3.1'de verildi. Bu plazmit daha sonraki çalışmalar için "Bölüm 3.8"de anlatıldığı gibi *E. coli DH5α* ırkına aktarıldı ve çoğaltıldı.




**Şekil 3.1:** pSLF1073 plazmidinin genetik haritası.

## 3.3. BESİYERLERİ

*E. coli* hücreleri Sambrook ve Russell (2001)'in, *S. pombe* hücreleri ise Gutz ve diğ. (1974)'nin önerdiği şekilde besi ortamlarında üretildi. Tüm besi ortamları 121°C'da, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika otoklavlanarak (Nüve OT 012 Masa Üstü Buharlı Sterilizatör) steril edildi. Kullanılan besi ortamlarının içerikleri aşağıdaki tablolarda verildi.

*E. coli*'nin üretimi için Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri ve LBA katı besiyeri kullanıldı. LB ve LBA besiyerlerinin içerikleri Tablo 3.2'de verildi ve besiyerleri bu içeriğe göre hazırlandı. LB ve LBA besi ortamları hazırlanırken (LBA için agar hariç) Tablo 3.2'deki

miktarlarda bileşenler distile suda çözdürüldü ve besiyerinin pH'ı 1 N NaOH kullanılarak 7.2'ye ayarlandı. pH ayarından sonra LBA için agar eklendi. Otoklavlanarak steril hale getirilen besi ortamlarına filtreden (0.22 µm, Millipore Millex-GS) geçirilerek steril hale getirilen ampisilin [50 mg/mL stok olacak şekilde hazırlandı, Sigma-Aldrich A9393] 50 mg/L olacak şekilde eklendi. *E. coli* üretimi LB besiyeri içeren 15 mL'lik steril tüplerde ve LBA besiyeri içeren steril petrilerde gerçekleştirildi.

**Tablo 3.2:** LB ve LBA besiyeri içerikleri.

| İçerik | LB (0.2L) | LBA (0.2L) | Miktar |
|---|---|---|---|
| Tripton (Biomatik, A8566) | + | + | 2 g |
| Maya Ekstresi ("Yeast Extract") (Becton Dickinson, 212750) | + | + | 1 g |
| NaCl (Merck, 106404) | + | + | 2 g |
| Agar (Becton Dickinson, 214010) | - | + | 3 g |
| $dH_2O$ | + | + | 200 mL'ye tamamlandı. |

*E. coli* hücrelerini transformasyona hazır halde uzun süre saklayabilmek (yaklaşık 6 ay) için *E. coli* hücrelerinin süper yeterli hücre haline getirilmesinde "Super Optimal Broth (SOB)" besiyeri kullanıldı. SOB besiyerinin içeriği Tablo 3.3'de verildi.

**Tablo 3.3:** SOB besiyeri içeriği.

| İçerik | Miktar |
|---|---|
| Tripton | 10 g |
| Maya Ekstresi ("Yeast Extract") | 2.5 g |
| NaCl | 0.292 g |
| KCl (Merck, 104936) | 0.932 g |
| $MgCl_2$ (Merck, 814733) | 1.02 g |
| $MgSO_4$ (Merck, 106067) | 1.23 g |
| $dH_2O$ | 500 mL'ye tamamlandı. |

*S. pombe* ile yürütülen deneylerde 4 farklı besiyeri kullanıldı: Maya özütlü zengin sıvı besiyeri ("Yeast Extract Liquid", YEL), maya özütlü zengin katı besiyeri ("Yeast Extract Agar", YEA), minimal sıvı besiyeri ("Minimal Medium Liquid", MML) ve minimal katı besiyeri ("Minimal Medium Agar", MMA).

YEL ve YEA besiyerlerinin içerikleri Tablo 3.4'te verildi ve besiyerleri bu içeriğe göre hazırlandı. YEL ve YEA besiyeleri hazırlanırken (YEA için agar hariç) tabloda verilen miktarlarda bileşenler distile suda çözündürüldü. YEA besiyerine agar, diğer bileşenler çözündürüldükten sonra eklendi. Sterilizasyon işleminden sonra YEL besiyeri hücrelerin çoğaltılması için kullanıldı. YEA besiyeri, sterilizasyon sonrası cam tüplere dökülerek eğri besi ortamları ve steril tek kullanımlık plastik petrilere dökülerek katı besi ortamları hazırlandı.

**Tablo 3.4:** YEL ve YEA besiyeri içerikleri.

| İçerik | YEL (1L) | YEA (1L) | Miktar |
|---|---|---|---|
| Maya ekstresi ("Yeast Extract") | + | + | 5 g |
| Glukoz (Sigma-Aldrich, G8270) | + | + | 30 g |
| Agar | - | + | 20 g |
| $dH_2O$ | + | + | 1000 mL'ye tamamlandı. |

MML ve MMA besiyerlerinin içerikleri Tablo 3.5'te verildi ve bileşenler (MMA besiyeri için agar hariç) uygun miktarlarda distile suya sırasıyla eklenip çözündürülerek hazırlandı. Çözündürme işleminden sonra MMA besiyerine agar eklendi ve otoklavlanarak steril hale getirildi. Seçici besiyeri olarak kullanılacak olan MMA besiyerine seçici besiyeri için gerekli olan urasil (filtreden geçirilerek steril edildi) son konsantrasyonu 50 mg/L olacak şekilde ilave edildi. Deneyler, MML besiyeri içeren 15 mL'lik steril tüplerde ve MMA besiyeri içeren steril petrilerde gerçekleştirildi.

**Tablo 3.5:** MML ve MMA besiyeri içerikleri.

| İçerik | MML (1L) | MMA (1L) | Miktar |
|---|---|---|---|
| Stok A2 | + | + | 100 mL |
| Stok B1 | + | + | 1 mL |
| Stok B2 | + | + | 1 mL |
| Glukoz | + | + | 10 g |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ (Merck, 106579) | + | + | 1 g |
| Agar | - | + | 20 g |
| $dH_2O$ | + | + | 1000 mL'ye tamamlandı. |
| MML ve MMA besiyerlerinin hazırlanmasında gerekli olan stok çözeltilerin hazırlanışı Tablo 3.6'da verildi. | | | |

**Tablo 3.6:** MML ve MMA besiyerlerinde kullanılan stok çözeltilerin hazırlanışı.

| **Stok A1 çözeltisi (100 mL)** | | **Stok A2 çözeltisi (100 mL)** | |
|---|---|---|---|
| **İçerik** | **Miktar** | **İçerik** | **Miktar** |
| $H_3BO_4$ (Sigma-Aldrich, B6768) | 50 mg | $KH_2PO_4$ (Merck, 104873) | 1 g |
| $CuSO_4.5H_2O$ (Merck, 102787) | 4 mg | $MgSO_4.7H_2O$ (Merck, 105886) | 0.5 g |
| KI (Merck, 105043) | 10 mg | NaCl | 0.1 g |
| $FeCl_3.6H_2O$ (Merck, 103943) | 20 mg | $CaCl2.6H_2O$ (Merck, 102382) | 0.15 g |
| $MnSO_4.4H_2O$ (Merck, 102786) | 53 mg | $(NH_4)2SO_4$ (Sigma-Aldrich, A4418) | 5 g |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ (Merck, M1003) | 19.5 mg | Stok A1 | 1 mL |
| $ZnSO_4.7H_2O$ (Sigma-Aldrich, Z4750) | 40 mg | $dH_2O$ | 100 mL'ye tamamlandı. |
| $dH_2O$ | 100 mL'ye tamamlandı. | | |
| **Stok B1 çözeltisi (100 mL)** | | **Stok B2 çözeltisi (100 mL)** | |
| **İçerik** | **Miktar** | **İçerik** | **Miktar** |
| Kalsiyum pantotenat | 100 mg | Biotin | 1 mg |
| Nikotonik asit | 1 g | %50 etanol | 100 mL |
| Mezoinositol | 1 g | | |
| $dH_2O$ | 100 mL'ye tamamlandı. | | |

## 3.4. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

### 3.4.1. *E. coli DH5α* Irkının Üretimi ve Saklanması

-80°C'da gliserol stoklarında [1:1 (v:v)] saklanan *E. coli DH5α* ırkından 500 µL alınarak 5 mL LB besiyerine ekildi ve 37°C'da 150 rpm'de çalkalamalı etüvde bir gece üremeye bırakıldı. Daha sonra hücreler Bölüm 3.8.2'de açıklanan plazmid transformasyonu işlemleri için kullanıldı.

### 3.4.2. *S. pombe ura4-D18h*$^-$ Irkının Üretimi ve Saklanması

Bu tez kapsamında kullanılan *S. pombe ura4-D18h*$^-$ ırkı +4°C'da, silika jelde (çap: 0.2-0.5 mm) saklanan stoktan alınarak YEA besiyeri içeren petrilere ekildi ve 2 gün etüvde (30°C) bekletildi. Oluşan kolonilerden azaltma ekim yapılarak tek koloniler elde edildi. Bir koloni seçilerek eğri YEA besiyerine ekildi ve 30°C'da 2 gün bekletilerek tek koloninin çoğaltımı yapıldı. *Ura4-D18h*$^-$ mutantlarının genotipleri MMA besiyeri ve urasil içeren MMA besiyerinde kontrol edildi ve tek koloniden çoğaltılan kültürler eğri YEA besiyerlerine ekildi. Çalışma boyunca +4°C'da bekletilen bu hücrelerin genotip kontrolleri belirli aralıklarla yapıldı.

## 3.5. RNA İZOLASYONU ve KONTROLÜ

### 3.5.1. RNA İzolasyonu

-80°C'da saklanan *Morus alba* polenlerinden total RNA izolasyonu yapılmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı. RNA izolasyonunda oluşabilecek RNaz kontaminasyonunu engellemek için izolasyonda kullanılacak pipet uçları, mikro tüpler gibi plastik ve diğer malzemeler iki kez otoklavlanarak steril hale getirildi. RNA izolasyonu "GenElute$^{TM}$ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, 088K6092)" kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

*Morus alba* polenleri sıvı nitrojen ve steril soğuk havan kullanılarak toz haline getirildi. Kit içeriğindeki total RNA lizis solüsyonuna 10 µL/mL olacak şekilde β-merkaptoetanol (AppliChem, A1108) eklendi ve toz haline getirilen polenlerin üzerine 100 mg örnek başına 1 mL lizis solüsyonundan ("Lysis solution for total RNA kit") konuldu. Havanda homojenize edilen polen örneği "Filtration Column" tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm'de 2

dakika santrifüjlendi (Sigma 3-30K). Santrifüj sonrası tüpte bulunan kolon çıkarıldı ve altta kalan sıvıya %70'lik etanolden (EtOH) 1 mL eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım "Nucleic Acid Binding Column" tüpüne yüklendi ve 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Tüpte bulunan filtreli kolona 250 µL kit içeriğindeki yıkama solüsyonu I ("Wash Solution I") eklendi ve ardından 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Tüpte bulunan filtreli kolon yeni bir tüpe alındı ve kolona "Wash Solution II Concentrate" solüsyonundan 500 µL aktarılarak 14000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. Bu son işlem bir kez daha tekrar edildi. Filtreli kolon en son olarak yeni bir steril 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerine kitin elüsyon solüsyonundan ("Elution solution") 50 µL eklendi. Daha sonra 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 14000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. 1.5 mL'lik tüpte bulunan filtreli kolon atıldı ve alttan sıvıya geçen RNA çözeltisi, miktar ve saflık ölçümünü takiben elektroforetik analiz yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -80°C'da saklandı.

### 3.5.2. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon, Saflık ve Bütünlük Kontrolü

İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının kontrolü spektrofotometrede (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülerek yapıldı. Konsantrasyon tayini için 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri "Denklem 3.1"deki yerine konularak hesaplama yapıldı. Saflık kontrolünde ise $A_{260}/A_{280}$ oranı kullanıldı. $A_{260}/A_{280}$ oranı 1.8-2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi.

$$\text{RNA } (\mu g/mL) = A_{260} \text{ x sulandırım kat sayısı x } 40 \qquad \text{(Denklem 3.1)}$$

Total RNA'ların bütünlüğünün kontrolü için ise "Bölüm 3.10"da anlatıldığı gibi %1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforetik analizi yapıldı.

## 3.6. TERS ("REVERSE") - TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)

Geri ("reverse") transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) iki aşamalı bir PZR çeşididir. Bu PZR işlemi, ilk aşamada RNA'dan tamamlayıcı DNA ("complementary DNA", cDNA) sentezi, ikinci aşamada ise tamamlayıcı DNA'nın standart PZR yolu ile çoğaltılması işlemlerini kapsar (Arı, 2012).

### 3.6.1. cDNA Sentezi

*Morus alba* polen örneğinden elde edilen total RNA'lardan cDNA kütüphanesi oluşturmak için ticari bir kit olan "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, 4368814)" kullanıldı ve prosedür üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Total RNA konsantrasyonu 2 µg/µL olacak şekilde sulandırıldı ve reaksiyon 2 µg total RNA ile başlatıldı. cDNA sentezi sırasında kit içeriğinde yer alan "RT Random Primer"ler kullanıldı. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler Tablo 3.7'de ve reaksiyon koşulları Tablo 3.8'de verildi. cDNA kalitatif analizi için "Bölüm 3.10"da anlatıldığı gibi %0.8'lik agaroz jel kullanılarak elektroforetik analiz yapıldı.

**Tablo 3.7:** Total RNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

| Reaksiyon Bileşenleri | Konsantrasyon | Son Konsanstrasyon | Hacim (µL) |
|---|---|---|---|
| RT Tamponu | 10X | 1X | 2 µL |
| dNTP Mix | 100 mM | 4 mM | 0.8 µL |
| RT Random Primer'leri | 10X | 1X | 2 µL |
| MultiScribe™ Ters Transkriptaz | 50 U/µL | 50 U | 1 µL |
| RNA | 2 µg/µL | 100 ng/µL | 2 µL |
| $dH_2O$ | - | - | 12.2 µL |
| | | **TOPLAM HACİM ⟶** | **20 µL** |

**Tablo 3.8:** Total RNA'dan cDNA sentezi için reaksiyon koşulları.

| | 1. Basamak | 2. Basamak | 3. Basamak |
|---|---|---|---|
| **Sıcaklık** | 25°C | 37°C | 85°C |
| **Süre** | 10 dakika | 120 dakika | 5 dakika |

### 3.6.2. *metE* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü

*Morus alba* poleninde bulunan kobalamin bağımsız metiyonin sentaz geninin (*metE*) hem dizisini belirlemek hem de pSLF1073 plazmidine klonlamak için total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak RT-PZR'nin ikinci basamağı gerçekleştirildi. Daha sonraki basamaklarda ilgili gen protein anlatımı yapacağı için gen dizisi çoğaltılırken hatanın en aza indirgenmesi gerekmektedir. Bunun için i-pfu$^{TM}$ DNA polimeraz (iNtRON Biotechnology, 25181) üretici firmanın önerdiği yönteme göre

kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.9'da, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.10'da verildi. RT-PZR'de kullanılan primerler [ileri ("forward", F) primer, geri ("reverse", R) primer] ise Tablo 3.11'de verildi. Reaksiyon ürünlerinin elektroforetik analizi "Bölüm 3.10"da anlatıldığı gibi %0.8'lik agaroz jel kullanılarak yapıldı.

**Tablo 3.9:** *metE* geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

| Reaksiyon Bileşenleri | Konsantrasyon | Son Konsanstrasyon | Hacim (µL) |
|---|---|---|---|
| 10X PCR Buffer | 10X | 1X | 2 µL |
| dNTP Mix | 10 mM | 0.8 mM | 1.6 µL |
| $MgCl_2$ | 25 mM | 1.25 mM | 1 µL |
| Primer (F1-F2) | | 10 pmol | 1 µL |
| Primer (R1-R2) | | 10 pmol | 1 µL |
| i-Pfu DNA Polymerase | 2.5 U/µL | 1 U | 0.4 µL |
| cDNA | | | 1 µL |
| $dH_2O$ | - | - | 12 µL |
| | | **TOPLAM HACİM ⟶** | **20 µL** |

**Tablo 3.10:** *metE* geninin PZR ile çoğaltımı için reaksiyon koşulları.

| Aşama | Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü Sayısı |
|---|---|---|---|
| Başlangıç Denatürasyonu | 94 | 2 dk. | 1 |
| Denatürasyon | 94 | 30 sn. | 35 |
| Bağlanma (F1-R1)/(F2-R2) | 62 / 64.5 | 45 sn. | |
| Uzama | 72 | 1 dk. | |
| Son Uzama | 72 | 5 dk. | 1 |

**Tablo 3.11:** RT-PZR'de kullanılan primerler.

| Primerin Kısa Gösterimi | G+C Oranı (%) | Primerin Dizisi |
|---|---|---|
| F1 | 57.1 | 5' ATG GCA TCC CAC ATC GTC GGT 3' |
| F2 | 60.6 | 5' TTT TGC GGC CGC ATG GCA TCC CAC ATC GTC GGT 3' |
| R1 | 57.1 | 5' TCA CTT GGC ACT GGC CAA CTG 3' |
| R2 | 60.6 | 5' TTG CCC GTCGAC TCA CTT GGC ACT GGC CAA CTG 3' |

## 3.7. *metE* GENİNİN PLAZMİD İLE LİGASYONU

### 3.7.1. *metE* Geninin ve pSLF1073 Plazmidinin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi

F2 ve R2 primerleri ile yapılan RT-PZR sonucu *metE* geninin 5' ucunda NotI restriksiyon endonükleaz (RE) kesim noktası, 3' ucunda ise SalI endonükleaz kesim noktası oluşturuldu. Daha sonra çoklu klonlama bölgesinde NotI ve SalI RE kesim noktaları bulunduran pSLF1073 plazmidinin ve oluşturulan PZR ürününün ayrı ayrı NotI (Invitrogen, IVGN0014) ve SalI (Invitrogen, IVGN0146) RE ile 37°C'da 1 saat çiftli kesimi yapıldı. Çiftli kesim reaksiyon bileşenleri Tablo 3.12'de verildi.

**Tablo 3.12:** NotI ve SalI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim reaksiyonunun bileşenleri.

| Reaksiyon Bileşenleri | Hacim (µL) |
|---|---|
| Anza™ 10X Buffer | 2 µL |
| PZR ürünü / pSGP573 / pSLF1073 | 1 µL |
| Anza™ SalI | 1 µL |
| Anza™ NotI | 1 µL |
| $dH_2O$ | 15 µL |
| **TOPLAM HACİM ⟶** | **20 µL** |

### 3.7.2. *metE* Geninin ve pSLF1073 Plazmidinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Dizilenmesi

NotI ve SalI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesim yapılan *metE* geni PZR ürününün ve pSLF1073 plazmidinin elektroforetik analizi "Bölüm 3.10"da anlatıldığı gibi %0.8'lik agaroz jel kullanılarak yapıldı. Bu kesim ürünleri ile ligasyon işlemini yapmak için kesim ürünlerinin agaroz jelden geri kazanımı, ticari bir kit olan "PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, K210012)" ile üretici firmanın önerdiği yönteme göre yapıldı.

%0.8'lik agaroz jelde yürütülen kesim ürünlerinin istenen boyuttaki bantları bir bistüri yardımı ile kesildi ve 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Ağırlıkları tartılan jel parçalarının üstüne ağırlığının 3 katı olacak şekilde "Gel Solubilization Buffer"dan eklendi ve 50°C'da olan ısıtıcı bloğa (Wisd, HP-48P) yerleştirildi. Isıtıcı blokta 10 dakika bekletilirken 3 dakika ara ile karıştırıldı. Daha sonra ısıtıcı bloktan alındı ve oda

sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Jel bantlarının üstüne ağırlığının 1 katı kadar 2-Propanol (Fluka, 59307) eklendi. Oluşan bu karışım "Quick Gel Extraction Columns" adlı kit içeriğinde bulunan filtreli kolonlara yüklendi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Daha sonra alt sıvılar atıldı ve kolonların üstüne 500 µL "Wash Buffer" solüsyonu eklendi ve tekrar 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Kolonların altında kalan sıvılar atıldı ve kolonlar 15000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Kolonlar yeni steril 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine alındı ve üstlerine 50 µL "Elution Buffer" eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. 1.5 mL'lik santrifüj tüplerinde bulunan filtreli kolonlar atıldı ve altta kalan sıvılardaki kesim ürünleri ligasyon işlemine kadar -20 °C'da saklandı. Ayrıca agaroz jelden geri kazanılan bu ürünler DNA dizileme analizleri yapılması için Medsantek (İstanbul, Türkiye) firmasına gönderildi.

### 3.7.3. *metE* Geninin pSLF1073 Plazmidi ile Ligasyonu

NotI ve SalI RE'leri ile çiftli kesim yapılarak yapışkan uç oluşturulan *metE* geninin PZR ürünü ile aynı şekilde çiftli kesime uğratılan pSLF1073 plazmidinin ligasyon işlemi ticari bir kit olan "T4 DNA Ligase (Invitrogen, 15224017)" ile üretici firmanın önerdiği yöntemle yapıldı. Tablo 3.13'de reaksiyon bileşenleri verilen ligasyon işlemi 24°C'da 6 saat olacak şekilde yapıldı. Ligasyon işlemi bittikten sonra oluşacak doğru yapıdaki plazmidleri çoğaltmak için "Bölüm 3.8.2"de *E. coli DH5α*'ya anlatılan transformasyon işlemi uygulandı.

**Tablo 3.13:** Ligasyon işlemi reaksiyon bileşenleri.

| Reaksiyon Bileşenleri | Son Konsantrasyonları |
|---|---|
| "5X Ligase Reaction Buffer" | 1X |
| Plazmid | 30 fmol |
| PZR Ürünü | 90 fmol |
| "T4 DNA Ligase" | 1 U |
| $dH_2O$ | Son Hacim 10 µL olacak şekilde eklendi. |

## 3.8. PLAZMİDİN *E. coli*'DE ÇOĞALTILMASI

### 3.8.1. *E. coli DH5α* Hücrelerinden Süper Yeterli Hücre Oluşturulması

-80°C'da, 1:1 (v/v) gliserol stoğunda saklanan *E. coli DH5α* hücrelerinden 500 µL alınarak 5 mL LB besiyerine ekildi ve 180 rpm'de 37°C'da bir gece boyunca üretildi. Bu kültürden 100 µL örnek alınarak LBA besiyerine yayma ekim yapıldı ve 37°C'da bir gece bekletildi. LBA besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele 10 tanesi seçildi ve Inoue ve diğ. (1990) tarafından önerilen yöntem ile süper yeterli hücre oluşturuldu. Seçilen bu 10 tane koloni 250 mL'lik SOB besiyerine ekildi ve 18°C'da 200 rpm'de $OD_{600}$=0,6 oluncaya kadar üretildi. Kültür 10 dakika buzda bekletildi. Hücreler 4°C'da 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Oluşan pelletin üzerine Tablo 3.14'te içeriği verilen soğuk transformasyon tamponundan ("transformation buffer", TB) 80 mL eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hücreler tekrar 4°C'da 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlemeyle çöktürüldü. Pelletin üzerine son konsantrasyonu %7 olan dimetilsülfoksit (DMSO, Merck 116743) içeren 20 mL soğuk TB tamponu eklenerek, pellet süspanse edildi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hücre süspansiyonu 200 µL'lik hacimlere bölünerek sıvı azotta şok dondurma yapıldı ve transformasyon işlemlerine kadar -80°C'da saklandı.

**Tablo 3.14:** TB tamponunun içeriği.

| Tampon Bileşenleri | Son Konsatrasyonları |
|---|---|
| PIPES (Sigma-Aldrich, P6757) | 10 mM |
| $CaCl_2$ (Merck, 102378) | 15 mM |
| KCl | 250 mM |
| $MnCl_2$ (Merck, 105927) | 55 mM |

### 3.8.2. *E. coli DH5α* Hücrelerinin pSLF1073 Plazmidi ve Rekombinant Plazmid ile Tranformasyonu

Tez kapsamında kullanılan pSLF1073 plazmidi ile bu plazmidin *metE* geninin PZR ürünü ile oluşturduğu rekombinant plazmidi çoğaltmak için *E. coli DH5α* hücrelerine transformasyonları yapıldı. Transformasyon işlemleri ısı şoku yöntemi ile gerçekleştirildi. 100 µL hücre süspansiyonu bulunan 1.5 mL'lik santrifüj tüplerinin içerisine plazmid örneğinden 2 µL, rekombinant plazmid örneğinin ise tamamı eklendi. Transformasyonun kontrolü için bir tüpe de plazmid içermeyen hücre süspansiyonu

eklendi ve bütün bu örnekler 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 90 saniye 42°C'da ısı şoku uygulandı ve örnekler tekrar buz üstüne alındı. Tüplere 900 µL LB besiyeri eklendi ve plazmidlerin içerisinde bulunan ampisilin direnç geninin ($amp^R$) anlatım yapması için hücreler 1 saat 37°C'da çalkalamalı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücre süspansiyonları 100 µL olacak şekilde 100 µg/mL ampisilin içeren LBA besi yerine cam baget ile yayma ekim yöntemiyle ekildi.

### 3.8.3. *E. coli DH5α* Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu

pSLF1073 plazmidinin ve rekombinant plazmidin ligasyon ürünlerinin izolasyonu ticari bir kit olan "GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermantes, K0502)" ile üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Transformasyon işlemi sonucunda ampisilin içeren LBA besiyerinde üreyen kolonilerden rastgele alınan koloniler 100 µg/mL ampisilin içeren 5 mL LB besiyerine ekildi ve 180 rpm'de çalkalamalı etüvde 37°C'da gece boyu üretildi. Bir gece boyunca üretilen kültürler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücreler çöktürüldü. Hücrelerin üzerine 250 µL "Resuspension Solution" eklendi ve karıştırılıp 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Konsantrasyonu 20 mg/mL olan RNaz solüsyonundan 4 µL eklendi. Daha sonra 250 µL "Lysis Solution" ilave edilerek tüpler 6 kez ters düz edildi. 350 µL "Neutralization Solution" eklendi ve tüpler tekrar 6 kez ters düz edildikten sonra 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Tüplerin üst kısımda oluşan sıvılar kit içeriğinde bulunan filtreli kolonlara ("GeneJET Spin Columns") aktarıldı ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt sıvı atıldı, kolonların üstüne "Wash Solution" eklenip 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve bu basamak 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Filtreli kolonlar steril tüpe alındı ve ardından 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Daha sonra kolonlara 50 µL "Elution Buffer" eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvıda bulunan saf plazmid ve rekombinant plazmidi kullanılana dek çalışma boyunca -20°C'da saklandı.

### 3.8.4. pSLF1073 Plazmidinin ve Rekombinant Plazmidin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesim Kontrolü

İzole edilen pSLF1073 plazmidi ile rekombinant plazmidinin kontrollerini yapmak üzere 37°C'da 1 saat SalI endonükleaz ile tekli kesim işlemi gerçekleştirildi. Tekli kesim reaksiyon bileşenleri Tablo 3.15'te verildi.

**Tablo 3.15:** SalI RE ile tekli kesim reaksiyon bileşenleri.

| Reaksiyon Bileşenler | Hacim (µL) |
|---|---|
| Anza™ 10X Tamponu | 2 µL |
| PZR ürünü / pSGP573 / pSLF1073 | 1 µL |
| Anza™ SalI | 1 µL |
| $dH_2O$ | 16 µL |
| Toplam Hacim ⟶ | **20 µL** |

### 3.8.5. Rekombinant Plazmid İçeren Transformantların Koloni PZR ile Belirlenmesi

Ligasyon işleminden sonra yapılan transformasyonu takiben sonra ampisilin içeren LBA besiyerinde üreyen koloniler seçildi. Seçilen kolonilerdeki plazmidlerde *metE* geninin bulunup bulunmadığını anlamak için bu koloniler kalıp olarak kullanılarak koloni PZR yapıldı. 10 µL distile su içerisine steril kürdan yardımıyla kolonilerden hücre alındı ve süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonları 1 µL alınıp, kalıp olarak kullanıldı. Tablo 3.11'de verilen primerlerden F1 ile R1 koloni PZR'de kullanıldı. Koloni PZR "i-pfu$^{TM}$ DNA polimeraz" ile gerçekleştirildi. Tablo 3.16'da verilen bileşenler 0.2 mL'lik PZR tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyon koşulları Tablo 3.17'de verildi.

**Tablo 3.16:** Koloni PZR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

| Reaksiyon Bileşenleri | Konsantrasyon | Son Konsanstrasyon | Hacim (µL) |
|---|---|---|---|
| 10X PCR Tamponu | 10X | 1X | 2 µL |
| dNTP Mix | 10 mM | 0.8 mM | 1.6 µL |
| $MgCl_2$ | 25 mM | 1.25 mM | 1 µL |
| Primer F1 | | 10 pmol | 1 µL |
| Primer R1 | | 10 pmol | 1 µL |
| i-Pfu DNA Polimeraz | 2.5 U/µL | 1 U | 0.4 µL |
| Kalıp | | | 1 µL |
| $dH_2O$ | | | 12 µL |
| | | **TOPLAM HACİM** ⟶ | **20 µL** |

**Tablo 3.17:** Koloni PZR için reaksiyon koşulları.

| Aşama | Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü Sayısı |
|---|---|---|---|
| Başlangıç Denatürasyonu | 94 | 2 dk. | 1 |
| Denatürasyon | 94 | 30 sn. | 35 |
| Bağlanma | 62 | 45 sn. | |
| Uzama | 72 | 1 dk. | |
| Son Uzama | 72 | 5 dk. | 1 |

## 3.9. *S. pombe*'DE BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİM

### 3.9.1. Rekombinant Plazmidin *S. pombe*'ye Transformasyonu

*S. pombe ura4-D18h*$^-$ ırkına rekombinant plazmidin transformasyonu kimyasal bir yöntem olan lityum asetat yöntemiyle gerçekleştirildi (Gregan ve diğ., 2006). Transformasyon aşamasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.18'de gösterildiği şekilde hazırlandı ve 121°C'da, 1.2 atm basınçta 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildi.

Eğri YEA besiyerinde tek koloniden çoğaltılan *S. pombe ura4-D18h*$^-$ hücrelerinin YEL sıvı besiyerine (10 mL) ekimi yapıldı ve 180 rpm'de 32°C'da çalkalamalı etüvde bir gün boyunca üretildi. Ertesi gün bu kültürden 50 mL YEL sıvı besiyeri içeren erlene $10^6$ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve tekrar hücreler gece boyunca 180 rpm'de 32°C'da çalkalamalı etüvde üretildi. Bu kültür 100 mL'lik YEL besiyerine 3 mL olacak şekilde ekildi ve ekim sonrası 4-4.5 saat boyunca 180 rpm'de 32°C'da çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Ardından hücreler 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Çöken hücrelerin üzerine 20 mL lityum asetat (LiAc, Sigma-Aldrich 517992) eklendi ve 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Çökelti üzerine 2 mL LiAc eklenerek hücre süspansiyonları 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 30 dakika boyunca 32°C'da çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası hücre süspansiyonlarından 150 µL alındı ve yeni steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 150 µL'lik hücre süspansiyonu üzerine rekombinant plazmid ilave edilerek karıştırıldı. Kontrol grubuna ise dışarıdan DNA eklenmedi. 375 µL lityum asetat-polietilen glikol [LiAc-PEG, (PEG Sigma-Aldrich, 202444)] ve 2 µL Salmon Sperm DNA'sı (10 mg/mL) (Invitrogen, AM9680) eklenerek karıştırıldıktan

sonra 45 dakika boyunca 32°C'da bekletildi. Ardından ısı şoku için 5 dakika 42°C'da bırakıldı. 10 dakika daha oda sıcaklığında bekletilen hücreler 5000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 100 µL YEL besiyeri ile resüspanse edildi ve YEL besiyeri ile 1 mL'ye tamamlandı. 1 mL'lik YEL besiyeri içerisindeki hücreler gece boyu 180 rpm'de 32°C'da çalkalamalı etüvde bekletildi.

**Tablo 3.18:** Transformasyonda kullanılan çözeltiler.

| Çözelti | İçerik |
|---|---|
| LiAc solüsyonu | 0.1 M LiAc, 1X TE (pH 7.5) |
| LiAc-PEG solüsyonu | 0.1 M LiAc , %40 PEG 3350, 1X TE (pH 7) |

### 3.9.2. Transformant Kolonilerin Seçilmesi

*S. pombe ura4-D18h*$^{-}$ ırkına plazmidlerin transforme edilip edilmediğini belirlemek için koloni seçimi yapıldı. Bu seçim işlemi *S. pombe ura4-D18h*$^{-}$ mutantlarının minimal besiyerinde transformasyon işlemi olmuşsa üreyebilmeleri (transforme edilen pSLF1073 plazmidinin urasil geni içermesi nedeniyle), transformasyon olmamış ise üreyememeleri temeline dayanmaktadır. Bu seçim işlemi için, transformasyon sonrası MMA besiyerine YEL besiyerindeki 1 mL'lik hücre süspansiyonundan ve kontrol grubundan 100 µL yayma ekim yapılarak ekildi ve 5 gün boyunca 32°C'lık etüvde üremeye bırakıldı. Süre sonunda transformantları kontrol etmek için ise Tablo 3.16'da reaksiyon bileşenleri, Tablo 3.17'de ise reaksiyon koşulları verilmiş olan koloni PZR işlemi yapıldı.

Koloni PZR ile doğruluğu kontrol edilen transformant koloniler MML besiyerine, kontrol (*ura4-D18h*$^{-}$) koloniler ise urasil içeren MML yerine ekildi ve 30°C'da 180 rpm'de 24 saat boyunca çalkalamalı etüvde bekletildi. Daha sonra hücreler 10000 rpm'de +4°C'da 10 dakika santrifüj ile çöktürülüp protein analizleri yapılana kadar -20°C'da muhafaza edildi.

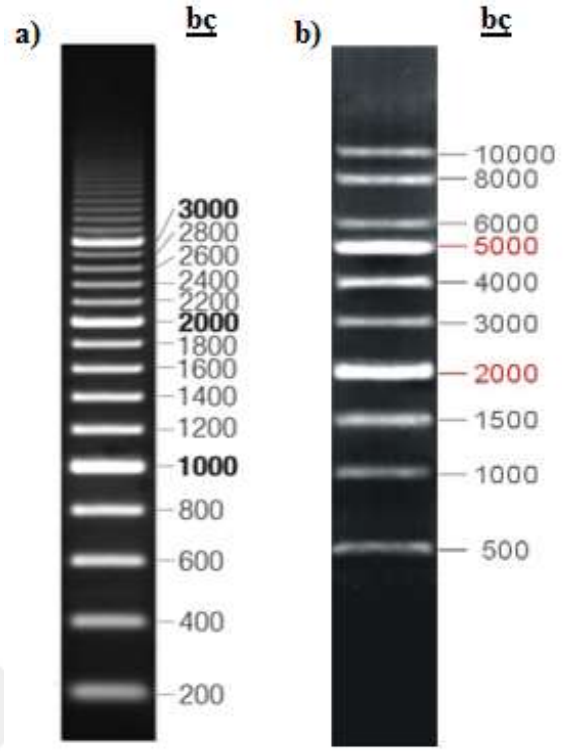
## 3.10. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ

Tez çalışması boyunca *Morus alba*'nın polenlerinden elde edilen RNA örneklerinin %1'lik, cDNA örnekleri, PZR ürünleri ve plazmid örneklerinin ise % 0.8'lik agaroz jelde kalitatif kontrolü yapıldı. İşlem Maniatis ve diğ. (1982)'nin belirttiği gibi uygulandı.

%0.8'lik agaroz jel hazırlamak için, 50X Tris-asetat EDTA (etilendiamintetraasetik asit) tamponu (TAE) 1X olacak şekilde hazırlandı ve 0.32 g agaroz (Sigma-Aldrich, Tip II, A9918) ile 40 mL 1X TAE tamponu bir erlende karıştırılarak 2 dakika mikrodalga fırında çözündürüldü. Oluşan agaroz çözeltisi oda sıcaklığında ~50-55°C'a gelinceye kadar bekletildi ve üzerine 10 mg/mL stok etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich E1510) solüsyonundan jelin 1 mL'sinde 0.5 µg EtBr olacak şekilde eklenerek karıştırıldı. Bu karışım "Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio-Rad, 170-4406)" yatay elektroforez sisteminin kasetine döküldü ve kasete kuyucuk oluşturması için tarak takıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerizasyonu sağlanan jelden tarak çıkarıldı ve kaseti ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına tampon olarak 1X TAE ilave edildi. 5 µL nükleik asit örnekleri, 1 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Bant boyutlarının anlaşılabilmesi için "O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0633)" ve "1kb ladder (Dongsheng Biotech, M1181) kullanıldı (Şekil 3.2). Elektroforez sabit voltajda (70 V) 1 saat sürdürüldü ve jel UV tablasında görüntülendi. 50X TAE, EtBr ve 6X yükleme tamponunun hazırlanışı Tablo 3.19'da verildi.

**Tablo 3.19:** 50X TAE, EtBr ve 6X yükleme tamponunun hazırlanışı.

| Çözeltiler | Bileşenler |
|---|---|
| 50X TAE Tamponu | Trizma-Baz (Sigma-Aldrich, T1503), ..... 242 g<br>EDTA (Invitrogen, 15576) ..... 14.61 g<br>Glasiyel asetik asit (Sigma-Aldrich, 537020)..... 57.1 mL<br>$dH_2O$ ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. |
| 10 mg/mL stok EtBr | EtBr ..... 10 mg<br>1mL $dH_2O$'da çözdürüldü. |
| 6X Yükleme Tamponu | Trizma-Baz (10 mM) ..... 6 mg<br>EDTA (60 mM) ..... 876 mg<br>Bromo-fenol mavisi (%0.3 (w/v) stok, Merck 108122) ..... 600 µL<br>Gliserol (%60 v/v, Sigma-Aldrich G5516)..... 30 mL<br>$dH_2O$ ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı. |




**Şekil 3.2:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan "DNA Ladder"lar. **a)** "O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder" **b)** "1kb ladder".

## 3.11. PROTEİN ANALİZLERİ

### 3.11.1. Protein İzolasyonu

metE proteininin analizini yapmak üzere transformant ve kontrol grubu *S. pombe ura4-D18h*$^{-}$ ırkından protein izolasyonu yapıldı. İzolasyon işleminde kullanılan tamponun içeriği (Arda ve Ertan, 2012) Tablo 3.20'de verildi. "Bölüm 3.9.2"de belirtildiği şekilde toplanan ve -20°C'da saklanan hücre çökeltisinden 0.5 g alındı ve 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre çökeltisi $dH_2O$ ile yıkandı ve 10000 rpm'de +4°C'da 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar çöktürülen pellet hazırlan tampon ile yıkanıp 10000 rpm'de +4°C'da 10 dakika santrifüj ile tekrar çöktürüldü. Pelletin üstüne 800 µL tampon eklendi ve tüpün 0.5 mL çizgisine gelecek şekilde cam boncuk (0.25 mm, B. Braun Melsungen AG) eklendi. Tüpler "Mikro-Dismembrators (Sartorius)"da 3000 rpm'de 1 dakika boyunca tutulup 3 dakika buzda bekletildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Tüplerin altlarına iğne ile küçük bir delik açılarak yeni bir tüpe yerleştirildi ve kısa bir süre düşük bir rpm'de santrifüj yapıldı. Yeni tüpe geçen sıvılar, 10000 rpm'de +4°C'da 10 dakika santrifüjlendi

ve üst sıvı yeni bir 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Proteomik analizler için -20°C'da saklandı.

**Tablo 3.20:** Protein izolasyonu için hazırlanan tampon içeriği.

| Tampon Bileşenleri | Konsantrasyonları |
|---|---|
| Tris-HCl | 100 mM (pH 8.0) |
| DTT (Ditiyotreitol) | 1 mM |
| Gliserol | %20 (v/v) |

### 3.11.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonunu belirlemede Smith ve diğ. (1985) tarafından önerilen bişinkoninik asit (BCA) yöntemi tercih edildi. Yöntemin temeli alkali çözeltide proteinlerdeki peptid bağlarının Cu(II) iyonlarını Cu(I) iyonlarına indirgemesi [kit içeriğindeki bakır (II) sülfat indirgenir] ve Cu(I) iyonlarının BCA (suda-çözünür kararlı bir bileşik, sodyum tuzu) ile oluşturduğu koyu mor renkli kompleksin 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır (Walker, 2002a).

Bu yöntem için ticari bir kit ("SMART$^{TM}$ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology") kullanıldı. İşlemler üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Öncelikle kit içeriğindeki BSA ("Bovine Serum Albumin", Sığır Serum Albümini) protein standartı $dH_2O$ ile uygun oranlarda seyreltilerek (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL) hazırlandı. Daha sonra protein konsantrasyon tayini yapılacak olan örnekler ile kör örnek ("blank", örneklerin çözgeni olan parçalama tamponu) 5 kat $dH_2O$ ile seyreltildi. Kit içeriğindeki reaktif A ve reaktif B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazırlanan BCA belirtecinden 96 kuyucuklu mikroplaka kuyucuklarına 200'er µL konuldu. Bu belirtecin üzerine seyreltilmiş örneklerden, kör örnekten veya standartlardan 25'er µL eklendi. Tüm örnekler ve standartlar 3 tekrarlı olarak değerlendirildi. Belirteç ile örneklerin karışması için mikroplaka bir dakika çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) çalkalandı. 30 dakika 37°C'lık etüvde (Thermo Scientific, Heracell™ 240) bekletildikten sonra oluşan renkli ürünün 562 nm dalga boyundaki absorbansı mikroplaka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) ile ölçüldü ve kör örneğin absorbansı çıkarılarak gerçek absorbans değerleri belirlendi. BSA standartlarına ait konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart bir grafik

oluşturuldu ve protein örneklerine ait absorbans değerleri standart grafiğin doğru denklemine yerleştirilerek protein konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.11.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

İzole edilen ve konsantrasyonu belirlenen proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002b) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Elektroforez sistemi olarak "Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad)" kullanıldı ve jel kasetleri üretici firmanın ürün kitapçığına uygun olarak hazırlandı. Jelin dökületeceği kaset hazırlanmadan önce camlar ("1.0 mm spacer plates" ve "short plates"), taraklar (1.0 mm) ve contalar %70'lik etanol (EtOH) ile temizlendi. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.21'de ve hazırlanan jellerin içeriği Tablo 3.22'de verildi.

**Tablo 3.21:** SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

| Çözeltiler | Bileşenler |
|---|---|
| 1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8) | Trizma-Baz (150 mL $dH_2O$'da çözdürüldü)..... 45.43 g<br>3N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı.<br>$dH_2O$ ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı. |
| 0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8) | Trizma-Baz (150 mL $dH_2O$'da çözdürüldü)..... 14.54 g<br>3N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.<br>$dH_2O$ ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı. |
| %30 Akrilamid Stok Solüsyonu | Akrilamid (Sigma-Aldrich A3553) ..... 30 g<br>Bis-Akrilamid (Sigma-Aldrich M2022) ..... 0.8 g<br>$dH_2O$'da son hacim 100 mL olacak şekilde çözündürüldü. |
| %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) | SDS (AppliChem A2263)..... 10 g<br>$dH_2O$'da son hacim 100 mL olacak şekilde çözündürüldü. |
| %10 Amonyum Persülfat (APS) | APS (AppliChem A2941)..... 0.1 g<br>$dH_2O$'da son hacim 1 mL olacak şekilde çözündürüldü<br>Jel dökületeceği zaman taze hazırlandı. |
| 1X Yürütme Tamponu (pH 8.3) | Trizma-Baz..... 3.03 g<br>Glisin (AppliChem A1067) ..... 14.4 g<br>SDS ..... 1 g<br>$dH_2O$'da son hacim 1 L olacak şekilde çözündürüldü. |
| 2X Örnek Yükleme Tamponu | 0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8) .....5 mL<br>SDS ..... 0.5 g<br>Sukroz (Sigma-Aldrich S0389) ..... 14.54 g<br>β-Merkaptoetanol .....0.25 mL<br>Bromo-fenol mavisi (%0.5 (w/v) stok, Merck 108122) .....5 mL<br>$dH_2O$'da son hacim 50 mL olacak şekilde çözündürüldü. |

**Tablo 3.22:** SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).

| Jel İçerikleri | Ayırma Jeli (%10 Akrilamid) | Yükleme Jeli (%5 Akrilamid) |
|---|---|---|
| Tris-HCl (1.875 M, pH 8.8) | 1 mL | - |
| Tris-HCl (0.6 M, pH 6.8) | - | 250 µL |
| $dH_2O$ | 2.262 mL | 1.875 mL |
| %30 Stok Akrilamid Çözeltisi | 1.662 mL | 337.5 µL |
| %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) | 50 µL | 25 µL |
| %10 Amonyum persülfat (APS) | 25 µL | 12.5 µL |
| Karışımın havası alındı. | | |
| TEMED | 1.75 µL | 3.5 µL |

%10'luk ayırma jelinin hazırlanması için Tablo 3.22'de belirtilen miktarlarda Tris-HCl (pH 8.8), $dH_2O$, akrilamid çözeltisi, SDS ve APS karıştırıldı ve çözünmüş oksijenin karışımdan uzaklaştırılması için 5 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi. Ardından TEMED (Fluka 87689) eklendi ve hazırlanan ayırma jeli karışımı, jel kasetinin iki camı arasına 1 mm kalınlığında, 6 cm yüksekliğinde jel oluşturacak şekilde enjektör yardımıyla döküldü. Jelin üst kısmının düz olmasını sağlamak ve polimerizasyonu engelleyen oksijenle jelin temasını engellemek için jelin üst yüzeyi 1 mL $dH_2O$ ile kapatıldı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra jelin üzerine konulan $dH_2O$ uzaklaştırıldı. Hazırlanan %5'lik yükleme jeli ayırma jelinin üzerine döküldü ve kuyucukların oluşması için tarak takıldı. Üst jelin de polimerizasyonundan sonra tarak çıkarıldı ve jel kaseti 1X yürütme tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilip kuyucuklar tamponla yıkandı. Jele yüklenecek örnekler 1:1 (v:v) oranında 2X örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatıldı ve her bir kuyucuğa 30 µg protein olacak şekilde jele uygulandı. Protein bantlarının molekül ağırlıklarının belirlenebilmesi için "SeeBlue® Pre-stained Protein Standard (Invitrogen LC5625)" kullanıldı. Elektroforez sabit voltajda (200 V) yaklaşık 40 dakika gerçekleştirildi.

### 3.11.4. Coomassie Boyama Yöntemi

Elektroforez işlemi sonrasında jeldeki protein bantlarını görünür hale getirmek için Coomassie parlak mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı (Ausubel, 1989). Yöntemin hassasiyeti 0.3-1 µg protein/banttır. Boyama çözeltisi, 50:10:40 hacim oranlarındaki MeOH (Metanol, Sigma-Aldrich 24229) : AcOH (Asetik asit, Sigma-Aldrich 27225) :

$dH_2O$ karışımı içinde %0.05 (w/v) Coomassie parlak mavisi (“Coomassie brilliant blue" R-250, Merck 112553) olacak şekilde hazırlandı. Boya uzaklaştırma (“destaining”) işlemi 5:7:88 hacim oranlarında hazırlanan MeOH:AcOH:$H_2O$ karışımı ile gerçekleştirildi.

SDS-PAGE sonrasında jel boyama çözeltisi içinde 2 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Fazla boyayı uzaklaştırmak için jel, boya uzaklaştırma (“destaining”) çözeltisi içinde 12 saat süreyle jelin alt zemini boyadan tamamen arınıncaya kadar çözelti sık sık değiştirilerek, 50 devir/dakika hızda çalkalanarak bekletildi. Jelde oluşan bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntülüme sisteminde ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntülendi.

### 3.11.5. Western-Blot Analizi

İzole edilen ve %10 poliakrilamid içeren jelde ayrılan proteinler, elektroblot yöntemiyle “Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad)” kullanılarak polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Elektrotransfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan tüm tamponlar ve içerikleri Tablo 3.23’te verildi.

**Tablo 3.23:** Elektrotransfer ve Western blotlama yöntemlerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

| Çözeltiler | Bileşenler |
|---|---|
| 1X Transfer Tamponu | Trizma-Baz ..... 3.03 g<br>Glisin ..... 14.4 g<br>$dH_2O$’da son hacim 1 L olacak şekilde çözündürüldü. |
| %5’lik Bloklama Tamponu | Yağsız süt tozu (Fluka 70166) ..... 5 g<br>Son hacim 1X yıkama solüsyonu ile 100 mL’ye tamamlandı. |
| Yıkama (TBST) Tamponu | Trizma-Baz (20 mM, pH 7.5) ..... 2.42 g<br>NaCl (150 mM) (Merck 106400) ..... 8.77 g<br>Tween-20 (%0.1) ..... 1 mL<br>$dH_2O$’da son hacim 1 L olacak şekilde çözündürüldü. |

Elektrotransfer işlemi için Trans-Blot Turbo kasetinin tabanı 1X transfer tamponu ile ıslatıldı ve aynı tamponla ıslatılmış “Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (0.2 µm, Bio-Rad 1704156)” kaset tabanına yerleştirildi. PVDF membran (0.22 µm, “West-lott™ PVDF Transfer membrane”, iNtRON Biotechnology ITM-P3032) metanolde 30 saniye kadar tutularak doyuruldu ve 1X transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra “transfer packs” üzerine konuldu. Membranın üzerine proteinlerin ayrıştırıldığı jel ve jelin üzerine ise 1X transfer tamponu ile ıslatılan “transfer packs”, katmanlar arasında

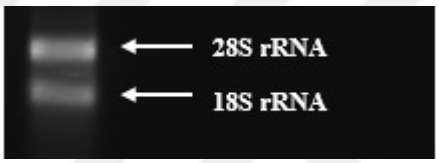
hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzgünce yerleştirildi. Kasetin kapağı kapatılıp kaset yan tutularak kaset içindeki fazla transfer tamponunun akıtılarak uzaklaştırılması sağlandı. Membran başına 2.5 A ve 25 V elektrik akımı uygulanarak 10 dakika süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi.

Transfer işlemi sonrasında membranda protein olmayan boş alanların kapatılması için %5'lik bloklama tamponu [%0.1 (v/v) Tween-20 içeren TBST ("Tris-buffered saline with Tween-20")'de hazırlanan %5 (w/v) süt tozu] içinde, membran 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından bloklama tamponu içinde 1:2000 (v:v) oranında hazırlanan HRP (yaban turpu peroksidazı) işaretli "His Tag Antibody (Novus Biologicals, NBP1-42785)" antikoru ile membran +4°C'da 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, TBST tamponu ile 5 kez 5'er dakika düşük devirde çalkalanarak tekrar yıkandı. Spesifik protein bantlarının görüntülenmesi için "ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133)" üretici firmanın önerilerine göre kit içeriğindeki A reaktifi ve B reaktifi 1:1 (v:v) oranında karıştırılıp kullanıldı. Membran üzerine bu karışım karanlık odada, kırmızı ışık altında eklendi ve 5 dakika bekletildi. Süre sonunda membran iki asetat kağıdı arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu ve membran üzerinde fazla görüntüleme karışımı ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Membran "ChemiDoc MP (Bio-Rad)" cihazında ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntülendi ve analiz edildi.

# 4. BULGULAR

## 4.1. TOTAL RNA İZOLASYONU VE KONTROLÜ

*Morus alba* poleninden metiyonin sentaz genini çoğaltmak için uygulanan ilk işlem (polen örneğinden total RNA izolasyonu) başarıyla tamamlandı. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının kontrolü spektrofotometrik olarak yapıldı. Elde edilen veriler Denklem 3.1'deki formüle uygulanarak total RNA konsantrasyonu hesaplandı. Total RNA konsantrasyonun ortalama 650 ng/µL olduğu tespit edildi. İzole edilen total RNA'nın $A_{260}/A_{280}$ değerinin 1.8-2 aralığında olduğu ve saf olarak elde edildiği belirlendi. Ayrıca total RNA'nın 5 µL'si %1 agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve RNA'ların izolasyon sırasında bütünlüğünü koruduğu doğrulandı (Şekil 4.1)

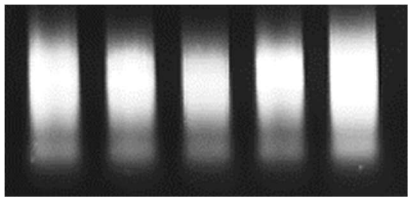



**Şekil 4.1:** *Morus alba* poleninden izole edilen, bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA.

## 4.2. TERS ("REVERSE")-TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

### 4.2.1. cDNA Sentezi

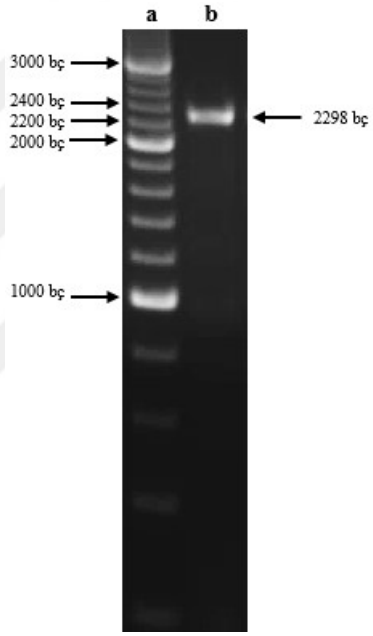
Total RNA izolasyonunu takiben "Bölüm 3.6.1"de anlatıldığı gibi cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyon sonrasında örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile 5 tekrarlı olarak analiz edildi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2:** *Morus alba* poleninden izole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar (5 tekrar).

### 4.2.2. *metE* Geninin PZR ile Çoğaltımı ve Kontrolü

*metE* geninin dizisini tanımlamak ve geni çoğaltmak için Tablo 3.11'de gösterilen F1 ve R1 primerleri ile "Bölüm 3.6.2"de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen ters-transkiptaz PZR (RT-PZR) başarıyla tamamlandı. RT-PZR sonrasında PZR ürünü (cDNA kopyaları) %0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Yapılan biyoinformatik analizler sonrası *Moraceae* ailesine ait *metE* geninin cDNA'sının 2298 bç olduğu tespit edildi. Elektroforetik analiz sonucunda PZR ürününün 2298 bç uzunluğunda tek bant olduğu görüldü (Şekil 4.3). Analiz sonucunda cDNA'lardan istenen *metE* geninin başarıyla çoğaltıldığı ve örnekte herhangi bir DNA kontaminasyonu olmadığı belirlendi.

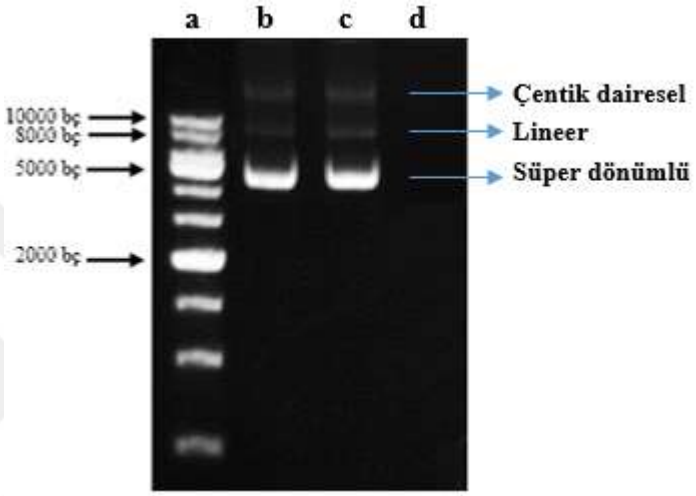



**Şekil 4.3:** PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific) **b)** *metE* geninin PZR ürünü.

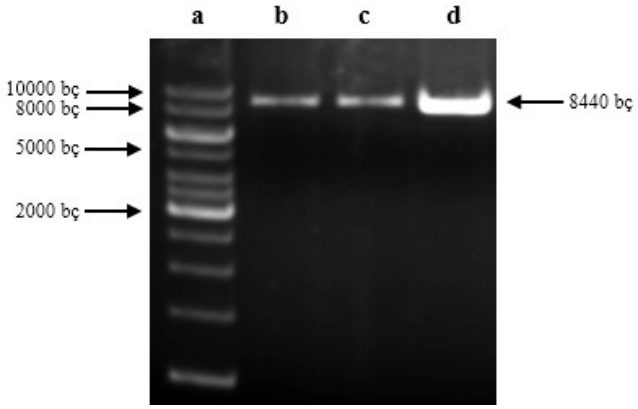
## 4.3. pSLF1073 PLAZMİDİNİN İZOLASYONU VE KONTROLÜ

pSLF1073 plazmidinin çoğaltılması amacıyla "Bölüm 3.8.2"de anlatıldığı gibi *E.coli*'de gerçekleştirilen transformasyon sonucunda LBA+amp besiyerinde oluşan kolonilerden rastgele 3 örnek alınarak plazmid izolasyonu yapıldı ve "Bölüm 3.8.3"te anlatıldığı şekilde izole edilmiş plazmidlerin saflığı ve konsantrasyonu 260 nm ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Plazmid konsantrasyonunun 300 ng/µL olduğu tespit edildi ve $A_{260}/A_{280}$ değerinin 1.8-2 aralığında olduğu ve saf olarak elde edildikleri

belirlendi. Plazmidler %0.8'lik jel elektroforezi ile analiz edildi. Agaroz jelde plazmidin çentik dairesel, lineer ve süper dönümlü hali 3 bant şekilinde görüldü (Şekil 4.4). Plazmid izolasyonunun doğrulanması için "Bölüm 3.8.3"te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen SalI restriksiyon endonükleazı ile kesim reaksiyonunun %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.5'te verildi. Oluşan bantın pSLF1073 plazmidinin lineer boyutu olan 8440 bç'ye denk geldiği görüldü.



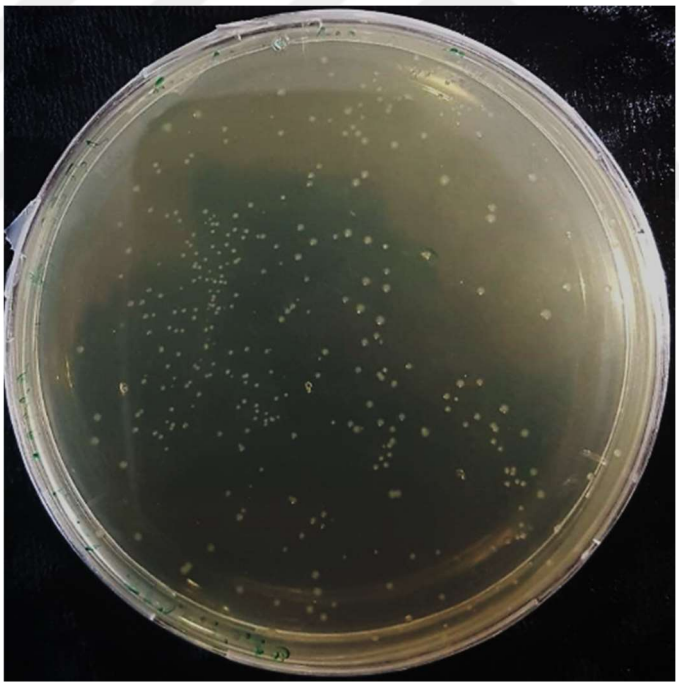

**Şekil 4.4:** İzole edilen pSLF1073 plazmidlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech) **b), c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerden izole edilen plazmidler.




**Şekil 4.5:** pSLF1073 plazmidinin SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli kesiminin agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech) **b), c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin kesim sonuçları.

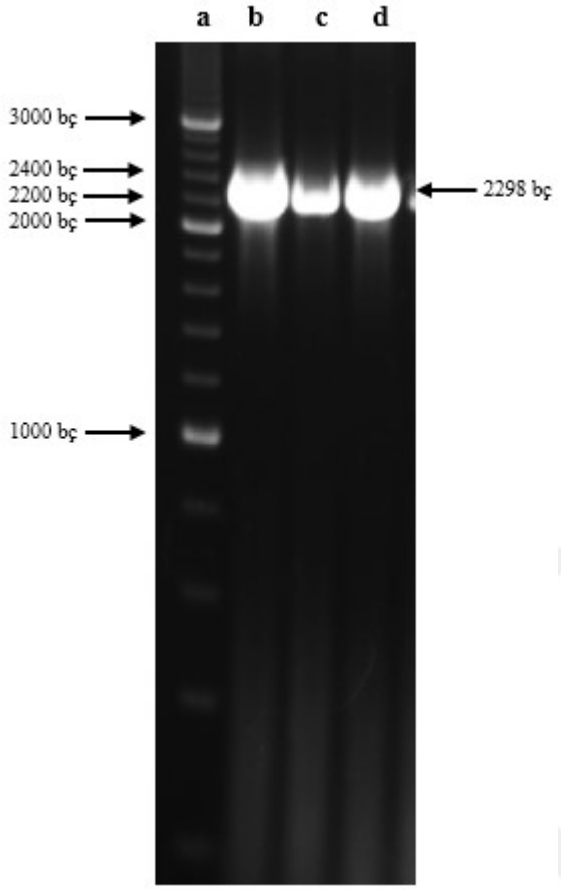
## 4.4. *metE* GENİNİN pSLF1073 PLAZMİDİNE LİGASYONU VE RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM SONUÇLARI

*Morus alba*'nın poleninden izole edilen *metE* genine ait cDNA ürünü, Tablo 3.11'de gösterilen F2 ve R2 primerleri ile "Bölüm 3.6.2"de anlatıldığı gibi PZR ile çoğaltıldı. Bu PZR ürünü ve pSLF1073 plazmidi NotI ve SalI restriksiyon endonükleazları ile "Bölüm 3.7.1"de anlatıldığı şekilde kesime uğratılarak yapışkan uçlar oluşturuldu. "Bölüm 3.7.3"te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen ligasyon tamamlandı ve süper yeterli *E. coli DH5α* ırkına transformasyon işlemi yapıldı. Normal olarak ampisilin direnç geni içermeyen *E. coli DH5α* hücrelerinin, plazmidi alarak ampisiline dirençli hale gelmeleri ve ampisilinli seçici besiyerinde üremeleri transformasyonun gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.6).



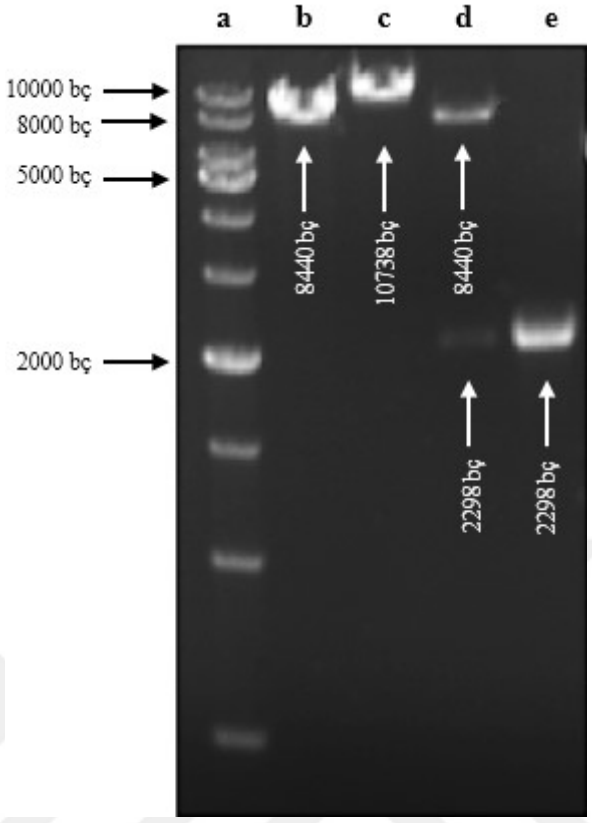
**Şekil 4.6:** Transformasyondan sonra 100 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde üreyen bakteri kolonileri.

Petrilerde üreyen transformant kolonilerden rastgele 3'ü seçildi ve "Bölüm 3.8.5"de anlatıldığı gibi F1 ve R1 primerleri ile koloni PZR yapıldı. Koloni PZR sonuçları Şekil 4.7'de verildi. Koloni PZR sonucu oluşan bandın *metE* geninin boyutu olan 2298 bç'ye denk geldiği görüldü.




**Şekil 4.7:** Koloni PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific), **b), c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları.

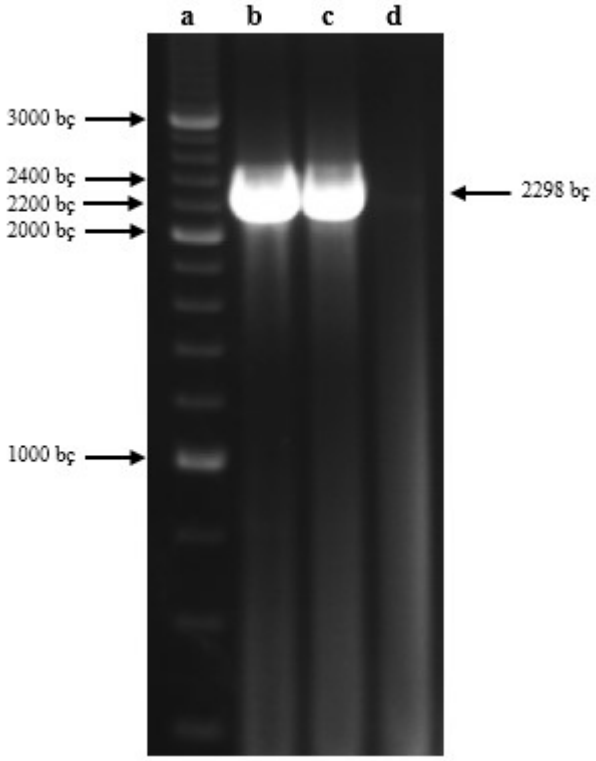
Koloni PZR sonucunda agaroz jelde istenen bant görüntüsünü oluşturan koloniler seçildi ve bu koloniler LB besiyerinde 37°C'da gece boyu 180 rpm'de üretildi. Bu hücrelerden "Bölüm 3.8.3"te belirtildiği gibi plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen ligasyon ürünlerinin boyutlarını kontrol etmek için "Bölüm 3.7.1"de anlatıldığı şekilde restriksiyon enzimleri ile tekli ve çiftli kesimleri yapıldı. Agaroz jelde tekli kesim sonucunda pSLF1073 plazmidinin lineer boyutu 8440 bç, rekombinant plazmidinki ise 10738 bç olarak gözlendi; rekombinant plazmidin çiftli kesiminde ise 8440 bç'lik (pSLF1073 plazmidi) ve 2298 bç'lik (*metE* geni) 2 bant görüldü (Şekil 4.8).




**Şekil 4.8:** Rekombinant plazmidin (pSLF1073 + *metE*) tekli ve çiftli RE kesim sonuçları. **a)** Markır (1kb, Dongsheng Biotech), **b)** pSLF1073 plazmidi, **c)** ligasyon ürününün SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli kesimi, **d)** rekombinant plazmid SalI ve NotI restriksiyon endonükleazları ile çiftli kesimi, **e)** metE geni PZR ürünü.

## 4.5. REKOMBİNAT PLAZMİDİN *S. pombe*'YE TRANSFORMASYONU VE KONTROLÜ

*S.pombe ura4-D18h*$^{-}$ ırkına rekombinant plazmidin (pSLF1073 + *metE*) transformasyonu LiAC yöntemi ile "Bölüm 3.9.1"de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra transformant hücreler MMA besiyerine ekildi ve kolonilerin oluşması için dört gün boyunca 30°C'da bekletildi. Oluşan kolonilerden rastgele seçim yapıldı ve bu kolonilerden "Bölüm 3.8.5"te anlatıldığı gibi F1 ve R1 primerleri ile koloni PZR yapıldı. Agaroz jele yüklenen PZR ürününün *metE* geninin boyutu olan 2298 bç'ye denk geldiği görüldü (Şekil 4.9).




**Şekil 4.9:** *S. pombe* transformantlarından yapılan koloni PZR sonucunun %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **a)** Markır (200 bç, Thermo Scientific), **b), c)** ve **d)** rastgele seçilen kolonilerin koloni PZR sonuçları.

## 4.6. PZR ÜRÜNÜNÜN DİZİ ve HOMOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI

Ters-transkriptaz PZR sonucunda oluşan *metE* geninin (2298 bç) dizisinin belirlenmesi için dizileme işlemi ticari bir firmaya (MedSanTek) yaptırıldı. 2298 bç'lik gen dizisinin dizileme sonucu Şekil 4.10'da verildi. Elde edilen dizi analizine göre amino asit dizisi (Şekil 4.11) belirlendi ve amino asit dizi bilgisi karşılaştırılması (BLAST analizi) sonuçlarına göre protein veri bankasında (Expasy) bulunan biyoinformatik veriler Şekil 4.12'de verildi.

ATGGCATCCCACATCGTCGGTTATCCCCGTGTGGGGGGACAGAGAGAGCT 50
CAAGTTTGCCTTGGAATCTTTCTGGGATGGGAAGAGTAGTGCTGAGGATT 100
TGCAAAAGGTGGCAGCAGACCTCAGGGCATCCATCTGGAAGCAAATGTCT 150
GAAGCTGGGATCAAGTATATTCCTAGCAACACCTTCTCCTACTATGATCA 200
GGTGTTGGACGCCACAGCCATGCTTGGTGCTGTACCCCCAAGATATGGTT 250
GGAACGGTGGTGAGATTGGCTTTGATGTTTACTTCTCCATGGCTAGGGGA 300
AATGCCTCTGTTCCGGCCATGGAAATGACCAAGTGGTTTGACACCAACTA 350
CCACTACATTGTCCCTGAATTGAGCCCAGAAATTAAGTTCTCTTATGCAT 400
CACACAAGGCAGTCGAGGAATACAAGGAGGCAAAAGCTCTTGGGGTTGAG 450
ACTGTACCAGTCCTTGTTGGCCCAGTATCTTACTTGTTGCTATCAAAACC 500
AGCAAAGGGAGTTGAGAAGTCCTTTTCCGTATTGTCTCTCATTGGCAATA 550
TTCTTCCTGTCTACAAGGAGGTTCTGGCTGAACTCAAGGCTGCGGGGGCT 600
ACTGGGTCCAGTTTGATGAGCCCACTCTTGTGAAGGATCTTGATGCTCAC 650
CAACTTGCAAGCATTTACTCACGCCTACTCTGAGCTTGAATCATCTTTAT 700
CCAGTTTGAATGTTGTGATTGAAACGTACTTTGCTGATGTTACTGCTGAG 750
GCATTCAAAACACTTACTGGTTTGAAGGGTGTTACTGGGTATGGATTTGA 800
CCTGGTCCGAGGAACAAAGACCCTTGATTTGATCAAGGGCGGATTTCCTT 850
CTGGGAAATACTTATTTGCTGGGGTGGTTGATGGAAGGAATATATGGGCC 900
AATGATCTTGCATCTTCCCTCAGTACTCTGGAGGCTCTGGAGGGAATCGT 950
TGGAAAAGACAAGCTTGTTGTCTCCACATCCTGCTCTCTTCTCCACACTG 1000
CTGTTGATCTCGTGAATGAGACCAAGTTAGACAAAGAGATCAAGTCATGG 1050
CTTGCATTTGCTGCTCAAAAAGTAGTTGAAGTAAATGCCTTGGCTAAGGC 1100
CCTGGCTGGACAAAAGGATGAGGCTTTCTTCACTGCCAATGCTGGAGCTC 1150
AGGCCTCAAGAAGATCCTCCCCCAGGGTGACAAATGAGGCTGTCCAGAAA 1200
GCTGCTGCTGCTTTGAAGGGCTCTGACCACCGTCGTGCCACAAATGTGAG 1250
TTCCAGGCTCGATGCCCAGCAAAAGAAGTTGAACCTTCCTGCTCTTCCGA 1300
CCACCACAATCGGTTCCTTCCCTCAGACCCTCGAGCTAAGAAGAGTCCGT 1350
CGTGAATACAAGGCTAAAAAAATCTCTGAGGAAGAATATGTGAATGCCAT 1400
TAAAGAGGAAATTAAGAAAGTGGTCAAGCTCCAAGAGGAGCTGGACATTG 1450
ATGTTTTGGTACATGGAGAGCCCGAGAGGAATGATATGGTTGAATACTTT 1500
GGAGAGCAATTGTCTGGTTTTGCCTTCACTGTCAATGGGTGGGTCCAATC 1550
TTATGGGTCCCGTTGTGTCAAGCCACCTATCATCTATGGTGATGTCAGTC 1600
GCCCCAAGCCCATGACCGTCTTCTGGTCGTCGTTTGCTCAGAGTACAACT 1650
AAGCGACCTATGAAAGGAATGCTCACTGGTCCTGTAACCATTCTGAACTG 1700
GTCGTTTGTTAGAAATGATCAGCCAAGGTTTGAGACCTGCTATCAGATTG 1750
CTTTGGCCATCAAGGATGAAGTTGAGGATCTTGAGAAAGCTGGTATCACT 1800
GTTATCCAGATTGACGAGGCTGCTTTGAGAGAAGGTTTGCCTCTTAGGAA 1850
GTCCGAGGGGGCTTTCTATCTCAATTGGGCTGTTCACTCTTTTAGAATCA 1900
CCAATTGCGGTGTCCAAGACACTACCCAGATTCACACCCACATGTGCTAT 1950
TCAAACTTCAATGACATCATCCACTCGATTATCGACATGGATGCCGATGT 2000
GATCACTATTGAGAACTCGAGATCAGACGAGAAGCTCCTGTCGGTGTTCC 2050
GCGAGGGAGTGAAGTATGGTGCGGGCATTGGCCCTGGTGTGTACGACATC 2100
CACTCTCCAAGGATCCCATCCACAGAGGAAATCGCAGACCGAATCAACAA 2150
AATGCTCGCTGTACTCGAGAGCAACATCCTCTGGGTCAATCCTGACTGTG 2200
GCCTCAAGACACGCAAGTATTCTGAAGTCAAGCCTGCCCTTAGCAACATG 2250
GTTGCCGCTGCCAAGCTTCTTCGCTCCCAGTTGGCCAGTGCCAAGTGA 2298

**Şekil 4.10:** *Morus alba* poleninde bulunan *metE* geninin cDNA dizisi.

MASHIVGYPRVGGQRELKFALESFWDGKSSAEDLQKVAADLRASIWKQMS 50
EAGIKYIPSNTFSYYDQVLDATAMLGAVPPRYGWNGGEIGFDVYFSMARG 100
NASVPAMEMTKWFDTNYHYIVPELSPEIKFSYASHKAVEEYKEAKALGVE 150
TVPVLVGPVSYLLLSKPAKGVEKSFSVLSLIGNILPVYKEVLAELKAAGA 200
TWVQFDEPTLVKDLDAHQLQAFTHAYSELESSLSSLNVVIETYFADVTAE 250
AFKTLTGLKGVTGYGFDLVRGTKTLDLIKGGFPSGKYLFAGVVDGRNIWA 300
NDLASSLSTLEALEGIVGKDKLVVSTSCSLLHTAVDLVNETKLDKEIKSW 350
LAFAAQKVVEVNALAKALAGQKDEAFFTANAGAQASRRSSPRVTNEAVQK 400
AAAALKGSDHRRATNVSSRLDAQQKKLNLPALPTTTIGSFPQTLELRRVR 450
REYKAKKISEEEYVNAIKEEIKKVVKLQEELDIDVLVHGEPERNDMVEYF 500
GEQLSGFAFTVNGWVQSYGSRCVKPPIIYGDVSRPKPMTVFWSSFAQSTT 550
KRPMKGMLTGPVTILNWSFVRNDQPRFETCYQIALAIKDEVEDLEKAGIT 600
VIQIDEAALREGLPLRKSEGAFYLNWAVHSFRITNCGVQDTTQIHTHMCY 650
SNFNDIIHSIIDMDADVITIENSRSDEKLLSVFREGVKYGAGIGPGVYDI 700
HSPRIPSTEEIADRINKMLAVLESNILWVNPDCGLKTRKYSEVKPALSNM 750
VAAAKLLRSQLASAK 765

**Şekil 4.11:** *Morus alba*'nın poleninde bulunan *metE* geninin amino asit dizisi (Sistein = C, Histidin= H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin=L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E ,Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W)

| Eşleşen Protein | E değeri |
|---|---|
| 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Morus notabilis] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Ziziphus jujuba] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Cucumis sativus] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Cucumis melo] | 0.0 |
| 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Prunus persica] | 0.0 |
| methionine synthase [Carica papaya] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Gossypium arboreum] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Theobroma cacao] | 0.0 |
| hypothetical protein MANES_08G154700 [Manihot esculenta] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Gossypium raimondii] | 0.0 |
| Cobalamin-independent synthase family protein isoform 1 [Theobroma cacao] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Eucalyptus grandis] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Populus euphratica] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Gossypium hirsutum] | 0.0 |
| hypothetical protein MANES_09G138200 [Manihot esculenta] | 0.0 |
| 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Jatropha curcas] | 0.0 |
| hypothetical protein POPTR_0004s20220g [Populus trichocarpa] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Gossypium hirsutum] | 0.0 |
| 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Gossypium arboreum] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Juglans regia] | 0.0 |
| PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Populus euphratica] | 0.0 |

**Şekil 4.12:** *Morus alba* metE proteininin amino asit dizisi bilgisinin BLAST analizi sonuçları.

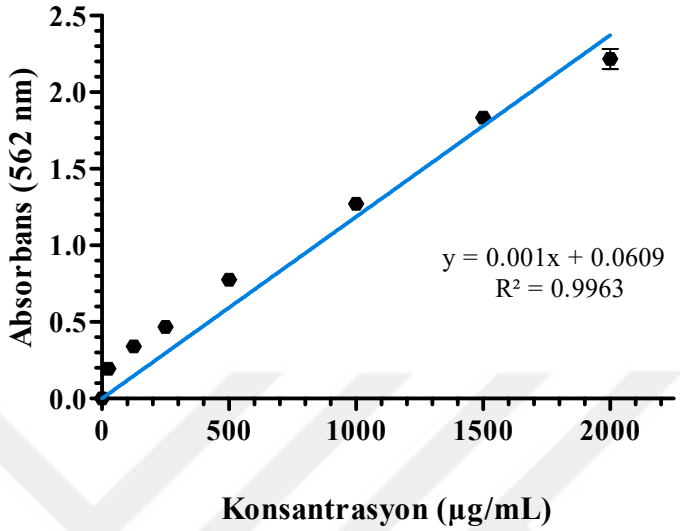
metE proteini ile benzerlik oranı çok yüksek olan 21 farklı bitkiye ait metE proteinleri görülmektedir.

## 4.7. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI

### 4.7.1. Protein Konsantrasyonları

Ligasyon ürününü taşıdığı doğrulanmış olan ve MML besiyerinde 24 saat inkübe edilen *S. pombe* kolonilerinden "Bölüm 3.11.1"de anlatıldığı gibi protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonunun sonucunda protein konsantrasyon tayini için Smith ve diğ. (1985) tarafından önerilen BCA yöntemine uygun olarak üretilmiş ticari bir kit (SMART$^{TM}$ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) kullanıldı. Kit içeriğindeki BSA stoğundan 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlandıktan sonra BCA analizi ile standart bir grafik elde edildi. Elde edilen lineer grafik ve doğru denklemi (Şekil 4.13) kullanılarak tüm örneklerin protein

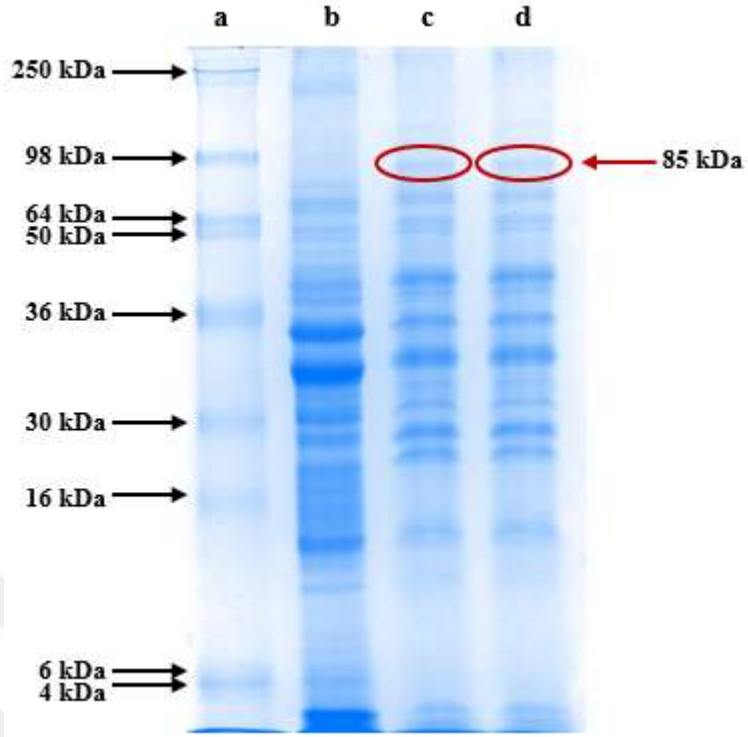
konsantrasyonları belirlendi. Çalışma süresince protein konsantrasyonlarının 2500-7000 µg/mL aralığında olduğu tespit edildi.




**Şekil 4.13:** Sığır serum albümin (BSA) standartları ile çizilen standart grafik ($R^2$= 0.9963).

### 4.7.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları

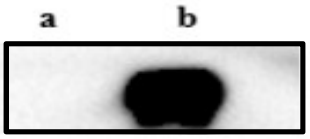
Protein konsantrasyonları belirlenen protein ekstreleri, örnek yükleme tamponu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırıldı ve her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde jele yüklendi. Jeldeki proteinler 200V sabit voltajda ayrıştırıldı ve jel üzerindeki proteinlerin görünür hale getirilmesi için Coomassie boyama yöntemi uygulandı. Boyama sonucunda jel üzerinde görülen bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) sistemiyle görüntülendi ve ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.14). Jeldeki bantların molekül ağırlıkları, molekül ağırlığı bilinen standart proteinler "SeeBlue® Pre-stained Protein Standard (Invitrogen LC5625)" yardımıyla belirlendi. Jelde metE proteinin ağrılığı olan 85 kDa'luk bantın transformantda bulunurken konakta yer almadığı gözlendi.




**Şekil 4.14:** Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüsü. **a)** Markır "SeeBlue® Pre-stained Protein Standard (Invitrogen LC5625)", **b)** Konak **c)** ve **d)** Transformant.

### 4.7.3. Western-Blot Analiz Sonuçları

SDS-PAGE'de ayrılmış proteinler "Bölüm 3.11.5"te anlatıldığı gibi "Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi" kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. Membran HRP (yaban turpu peroksidazı) işaretli "His Tag Antibody (Novus Biologicals, NBP1-42785)" antikoru ile işleme sokuldu. Hedef olarak 6X His etiketli protein bantlarının saptanması için proteinlere ait kemilüminesans ışımalar görüntüleme kiti ("ECL Plus Western Blotting Detection System", Amersham) kullanılarak ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme cihazında (ImageLab 5.2.1 yazılımı) görüntülendi (Şekil 4.15).




**Şekil 4.15:** Western-blot analizi. **a)** Konak **b)** Transformant

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alerji günümüzde oldukça yaygın görülen bir hastalıktır. Yaklaşık 150 yıl önce astım vakaları nadir olarak görülürken, alerjik rinit ise neredeyse hiç duyulmamıştı. Günümüzde Avrupa'da, 80 milyondan fazla kişinin alerjik hastalığa sahip olduğu tahmin edilmektedir. Her yaş grubunda beşinci en büyük kronik hastalık olarak kabul edilen (Peebles ve diğ. 2012), alerjik hastalıklar birçok farklı şekilde görülebilir. Ancak alerjinin en yaygın belirtileri arasında alerjik rinokonjonktivit (saman nezlesi), alerjik astım ve egzama yer almaktadır (Johansson ve diğ., 2001; Puc, 2003; Peebles ve diğ. 2012).

Alerjik hastalıklar, hasta bireylerin sağlığını olumsuz etkilemekle birlikte, önemli parasal maliyetler de getirmektedir. Avrupa'da, sadece astım için doğrudan toplam tıbbi maliyetin yıllık 17.7 milyar avro olduğu, astım hastalığının kontrolünden dolayı üretkenlik kaybının ise yılda yaklaşık 9.8 milyar avro olacağı tahmin edilmektedir. ABD'de ise tek başına alerjik rinit ile ilişkili yıllık toplam tıbbi maliyetin yaklaşık 11.5 milyar dolara, verimlilik kaybının ise 4.28 milyar dolara vardığı öngörülmektedir. Kanser ve kalp rahatsızlığı gibi bazı hastalıkların, yaşam sonlarına yakın kişileri etkileyerek daha yüksek yıllık sağlık maliyetleri vardır; ancak alerjik hastalık sıklıkla yaşamın erken evrelerinde başlamakta, ölene kadar devam edebilmekte ve böylece yıllık sağlık harcamalarında belirgin olmasa da birikimle toplamda daha büyük bir sağlık maliyeti ortaya çıkmaktadır (Peebles ve diğ. 2012). Bu sağlık sorunlarını ve bu sorunların doğurduğu maliyetleri azaltmak için daha etkin tıbbi tedaviler geliştirmeye ve gelişmiş tanı yöntemlerine gereksinim vardır (Johansson ve diğ., 2001).

Tip I alerji en sık rastlanan alerjik hastalıklardan birisidir. Tip I alerjiye yol açan alerjenler çoğunlukla aeroalerjen olan polenlerdir. Pek çok ağaç, çimen ve yabani ot türünün polenlerinin (bkz. Tablo 2.1) atmosferdeki yoğunluklarının artması, duyarlı kişilerde saman nezlesi ve astım gibi alerjik hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Radauer ve Breiteneder, 2006). Polenlerin içeriğinde bulunan moleküllerden alerjiye neden olanları sıklıkla suda çözünebilir proteinler ya da glikoproteinlerdir (Puc, 2003). Polenlerde bulunan bu proteinlerin değişen çevre koşularına bağlı olarak alerjenik özelliklerinde farklılıklar meydana gelebilmektedir (Radauer ve Breiteneder, 2006). Hava kirliliği nedeniyle polenlerin yapısının, kimyasal bileşiminin ve alerjenik özelliklerinin

değişime uğradığı rapor edilmiştir (Ghanati ve Majd 1995; Majd ve Kiabi, 1997; D'Amato ve diğ., 2007). Hava kirliğine sebep olan $NO_2$, $SO_2$ ve CO gibi moleküllerin polen tanelerinin çözünebilir proteinleri üzerinde değişime neden olabileceği gösterilmiştir. Hava kirleticilerinin, polen proteinlerinin bozulmasına veya bu polenlerin yeni proteinler oluşturmasına neden olabilecekleri bildirilmiştir (Ruffin ve diğ., 1983; Chakraborty ve diğ., 1996; Majd ve diğ., 2004).

Bu verilerden hareketle deri prik testlerinde kullanılan panellerde hastaların bulunduğu habitattaki alerjen polenlerden hazırlanmış ekstrelerin ve bu ekstrelerden izole edilmiş alerjen proteinlerin yer alması tanıyı güçlendirecektir. Benzer bir yaklaşımla tedavi amaçlı aşıların da yerel alerjenlere göre geliştirilmesi başarı oranını arttıracaktır. Bu öngörülere dayanarak, bölgesel alerjenik polenlerin ve sorumlu moleküllerin tanımlanması ve bol miktarda elde edilmesi gelecekte daha da büyük önem kazanacaktır.

Günümüzde moleküler biyolojideki gelişmelerin hızla artması ile rekombinant DNA, mikrodizileme ("microarray") ve omik teknolojileri kullanarak hastalıklar için çeşitli tanı testleri ve tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Bu gelişmelerin alerji alanına yansıması ise bu tekniklerle rekombinant alerjenlerin üretilebilmesi olarak ortaya çıkmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, uygun konakçı organizmalar vasıtasıyla yapısal, fonksiyonel ve immünolojik olarak doğal alerjenlere benzeyen molekülleri rekombinant olarak üretmeyi mümkün kılmaktadır. Bu tip moleküller biyoteknolojik uygulamalarla sabit kalitede ve yeterli miktarlarda elde edilebilir hale gelmiştir (Mothes ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2008; Assarehzadegan ve diğ., 2011; Zarinhadideh ve diğ., 2015). Bu moleküllerin doğal alerjen kaynaklarından hazırlanan ekstrelerin tanı ve tedavide oluşturduğu sorunlara (bkz. Tablo 2.2) karşı iyi bir çözüm olabileceği rapor edilmiştir (Valenta ve Nideberger, 2007).

1988 yılında, iki farklı çalışma grubu iki farklı rekombinant alerjen proteini *E. coli*'de üretmeyi başarmışlardır. Thomas ve diğ. (1988) bir ev tozu akarı olan *Dermatophagoides pteronyssinus*'un 1 numaralı majör alerjenini (Der p 1) üretip immünolojik analiz ile doğrulamışlardır. Fang ve diğ. (1988) ise beyaz yüzlü eşek arısının (*Dolichovespula maculata*) majör 5 numaralı alerjenini (Dol m 5) rekombinant olarak üretip alerjenik özellikte olduğunu göstermişlerdir.

Prokaryotik rekombinant protein üretim sistemi olan *E. coli* günümüze kadar birçok polende bulunan alerjenik proteinlerin rekombinant olarak üretimi için kullanılmıştır. Bunlara örnek olarak; fındık ağacı (*Corylus avellana*) polenindeki rCor a I (Breiteneder ve diğ.,1993), huş ağacı (*Betula verrucosa*) polenindeki rBet v 1 (Swoboda ve diğ., 1995), yapışkan otu (*Parietaria judaica*) polenindeki rPar j 3 (Asturias ve diğ., 2004), soda otu (*Salsola kali*) polenindeki rSal k 3 (Assarehzadegan ve diğ., 2011) rekombinant alerjenleri verilebilir.

*E. coli* gibi bakteriyel rekombinant protein üretim sistemleri, rekombinant alerjen üretmek için kullanım kolaylığı, düşük maliyet ve yüksek verim sağlamaktadır. *E. coli* için çok sayıda protein anlatım vektörü bulunmaktadır ve etiketli protein ve füzyon proteini üretimine geniş bir seçenek sunmaktadır. Ancak *E. coli*'de yabancı proteinlerin aşırı üretilmesi, sitoplazmasında inklüzyon cisimlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Ayrıca proteinlerin *in vitro*'da yeniden katlama gereksinimi olabilir, ancak *in vitro*'da katlanma kısmen mümkündür. Bu işlemler hem zaman kaybına neden olmakta hem de fonksiyonel protein verimi düşük olmaktadır (Schmidt ve Hoffman, 2002).

Genetik olarak iyi karakterize edilmiş bazı maya türlerinin, rekombinant protein üretimi için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Ökaryotik proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarını mayalarda gerçekleştirilebildiği bilinmektedir. Tek hücreli ökaryotik organizmalar minimal gereksinimlerle hızla büyümektedirler ve daha iyi karakterize edilmiş prokaryotik sistemlerle rekabet edebilecek düzeyde rekombinant protein üretim sistemleri olmuşlardır (Hosfield ve Lu, 1999; Schmidt ve Hoffman, 2002; Feldmann, 2009).

Rekombinant alerjen üretiminde *Pichia pastoris* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları sıklıkla kullanılmaktadır. *Pichia pastoris*'de köpek dişi ayrığı otunun (*Cynodon dactylon*) poleninden rCyn d 1 (Smith ve diğ., 1996), *Alternaria alternata* küfünün alerjeni rAlt a 1 (De Vouge ve diğ., 1996), hamam böceğinin (*Blattella germanica*) alerjeni olan rBla g 4 (Vailes ve diğ., 1998), ev akarı (*Dermatophgoides pteronyssinus*) alerjeni olan rDer p 1 (Van Oort ve diğ., 2002), Sedir ağacın (*Cupressus arizonica*) poleninde bulunan rCup a 3 (Cortegano ve diğ., 2004) gibi rekombinant alerjenler üretilmiştir. *Saccharomyces*

*cerevisiae'*de ise ev akarı (*Dermatophgoides pteronyssinus*) alerjenleri olan rDer p 1 (Chua ve diğ., 1992) ve rDer p 2 (Hakkaart ve diğ., 1998) gibi rekombinant alerjenler üretilmiştir.

Rekombinant alerjenin, ökaryotik ve prokaryotik sistemlerden hangisinde üretileceğini belirleme alerjenin yapısı, üretim kapasitesi, laboratuvar ekibinin deneyimi gibi durumlara bağlıdır. Bu sistemler ile çalışmak için deneyim çok önemlidir. Prokaryotik anlatım sistemlerinde *E. coli*'ye ait büyük miktarda literatür bilgisi vardır. Ticari anlatım sistemleri çeşitli, hızlı ve ucuzdur. Bununla beraber, prokaryotik sistemlerde birçok ökaryotik proteinin posttranslasyonal modifikasyonu gerçekleştirilemez ve protein düzgün şekilde katlanamaz. Ek olarak, *E. coli'*de kodon kullanım sorunları olabilir. Rekombinant proteinin etkinliği için doğal konformasyon veya posttranslasyonel modifikasyon gerekliyse, ökaryotik ekspresyon sistemleri tercih edilmektedir. Mayalarda rekombinant protein anlatımı yüksek verimle sağlanabilmektedir (Schmidt ve Hoffman, 2002).

Bu tez çalışması, *Morus alba* polenindeki alerjenleri tespit etmek için daha önce çalışma grubumuz tarafından yürütülen bir yüksek lisans tezinin (Çetereisi, 2014) devamı niteliğindedir. *Morus alba* poleninde bulunan proteinlerden 75-85 kDa ve ≤30 kDa (muhtemelen 15-16 kDa) olan bazılarının alerjen olabileceği rapor edilmiştir. Proteomik analizler IgE bağlayan proteinlerden birinin 80-85 kDa'lık metiyonin sentaz (metE) olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ise *M. alba* poleninde bulunan potansiyel alerjen metE'nin *S.pombe* mayasında rekombinant olarak üretilmesi hedeflenmektedir.

Rekombinant alerjen üretimde şu ana kadar literatürde *S. pombe*'nin kullanıldığına dair bir veri yoktur. Bu çalışmada konak organizma olarak *S. pombe*'nin kullanılması çalışmanın özgün yönlerinden birini oluşturmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi rekombinant alerjen üretmek için kullanılacak organizma hakkında teorik ve pratik iyi bir donanıma sahip olmak gerekmektedir. Çalışma grubumuz yıllardır bu organizmayla ilgili araştırmalar ve yayınlar yapmaktadır. Bu organizma ile çalışmanın bir diğer avantajı ise üretilecek alerjenin doğru bir şekilde katlanmasını sağlayabilecek olmasıdır.

Çalışmanın ilk basamağında alerjiye sebep olan *Morus alba* polenlerinden 650 ng/µL konsantrasyonunda total RNA izole edilmiştir. Bu total RNA'lardan çalışmanın amacı

doğrultusunda cDNA kütüphanesi oluşturulmuş, daha sonra biyoinformatik çalışmalar ile *metE* geninin olası dizisine göre primerler tasarlanmış ve PZR işlemi ile bu gen çoğaltılmıştır. PZR ürününün *metE* genine ait olduğu dizileme analizi ile ortaya konulmuştur.

Çalışmanın ikinci basamağında ise *metE* geni mekik ("shuttle") tipi bir vektör olan pSLF1007 plazmidine entegre edilmiştir. Bu plazmidin genel özellikleri güçlü nmt promotörüne sahip olması ve protein saflaştırılmasında kullanılacak histidin etiketi içermesidir. Gen-plazmid entegrasyonu amacıyla *metE* geninin PZR ürünleri, NotI ve SalI restriksiyon enzimlerinin tanıyacağı dizilerin oluşumunu sağlayacak primerler kullanılarak elde edilmiş ve daha sonra plazmid ve PZR ürünleri bu restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar oluşturulmuş ve ligasyon gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 4 aylık optimizasyon çalışması sonucunda ligasyonda en iyi sonucu, restriksiyon kesimi sonrası 10 µL'lik son hacimde PZR ürününün (45 ng/µL) 90 fmol ve plazmidin (50 ng/µL) 30 fmol olacak şekilde 24°C'da 6 saat boyunca reaksiyona sokulması vermiştir. Ligasyon işlemi sonrası oluşan rekombinant plazmidin çoğaltılması için *E. coli*'ye kimyasal yöntem ile transformasyonu sağlanmıştır.

Son basamakta *E. coli*'de üretilen ligasyon ürünü izole edilmiş ve *S.pombe ura4-D18h*$^{-}$ ırkına kimyasal yöntemle aktarılmıştır. Plazmidi taşıyan transformantlar seçici besiyerinde ayırt edildikten sonra koloni PZR ile doğrulanmıştır. Koloni PZR sonucu pozitif çıkan kolonilerden biri protein üretimi için MML besiyerine ekilip 30°C'da 24 saat boyunca 180 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra bu örnekten protein izolasyonu yapılmış ve protein içeriğindeki rekombinant metE'yi kanıtlamak için SDS-PAGE'yi takiben "Western blotlama" tekniği kullanılmıştır. *S. pombe*'de metE proteini doğal olarak da bulunduğundan aktarılan gen ürününü işaretlemek için 6X histidin etiketine özgü antikor kullanılmıştır. İmmunolojik analiz sonucu *metE* geninin rekombinant üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak ak dut (*Morus alba*) metiyonin sentaz (*metE*) geni ilk kez *S.pombe*'de klonlanmıştır. Daha önce *E.coli*'de klonlanan *Salsola kali* polen metE'sinden sonra bu rekombinant metE'nin de alerjenitesi ileride gerçekleştirilecek klinik çalışmalarla doğrulanmalıdır. Bu çalışma kapsamında rekombinant alerjen üretimde *S. pombe*'nin de etkin bir şekilde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Üretilen rekombinant alerjen saflaştırıldıktan sonra klinik testlerde kullanılabilecektir. *S. pombe*'de üretilen ak dut metiyonin sentazı, alerjenik özellikleri doğrulandığı taktirde ak dut alerjisinin tanı ve tedavisinde kullanılabilecek biyoteknolojik bir ürün olma potansiyelini taşımaktadır. Bu tez çalışması yeni nesil tanı testlerinin ve alerji aşılarının geliştirilmesi yönündeki çalışmaların önünü açmıştır. Eldeki verilerden ve kazanılmış deneyimlerden yola çıkarak ileride gerçekleştirilecek tanı kiti ve aşı üretimi çalışmaları hastaların tedavi şansını artıracak, %100 ithal farmasotiklere dayalı alerji tanı ve tedavi maliyetlerini ve dışa bağımlılığı düşürecektir.

# KAYNAKLAR


Abbas, A., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2012, *Hypersensitivity*, Basic Immunology, In: Abbas, A., Lichtman, A.H., Pillai, S. (ed.), Chapter 11, Fourth Edition, Elsevier, ISBN: 978-1-4557-0707-2.

Aceituno, E., Del Pozo, V., Mínguez, A., Arrieta, I., Cortegano, I., Cárdaba, B., Gallardo, S., Rojo, M., Palomino, P., Lahoz, C., 2000, Molecular cloning of major allergen from *Cupressus arizonica* pollen: Cup a 1, *Clinical & Experimental Allergy*, 30 (12), 1750-1758.

Adolphson, C., Goodfriend, L., Gleich, G.J., 1978, Reactivity of ragweed allergens with IgE antibodies. Analyses by leukocyte histamine release and the radioallergosorbent test and determination of cross-reactivity, *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 62 (4), 197-210.

APSA, 2017, Polar view image of *Morus alba* MORACEAE, http://apsa.anu.edu.au/location/China%20(tropical)/sample/61-2-1/image/polar%20view?order=asc&sort=pic, [Ziyaret tarihi: 20.05.2017].

Arda, N. ve Ertan, H., 2012, *Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması*, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (ed.), Bölüm 7, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 978-975-420-583-1, 172-173.

Arı, Ş., 2012, *DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması*, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (ed.), Bölüm 5, Nobel Tıp Kitabevleri, Türkiye, ISBN: 978-975-420-583-1, 114.

Assarehzadegan, M.A., Sankian, M., Jabbari, F., Tehrani, M., Falak, R., Varasteh, A., 2011, Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen, *Molecular Biology Reports*, 38 (1), 65-73.

Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez-Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., Palacios, R., 1997, Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100 (3), 365-372.

Asturias, J.A., Ibarrola, I., Bartolomé, B., Ojeda, I., Malet, A., Martínez, A., 2002, Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen, *Allergy,* 57 (3), 221-227.

Asturias, J.A., Ibarrola, I., Eseverri, J.L., Arilla, M.C., González-Rioja, R., Martínez, A., 2004, PCR-based cloning and immunological characterization of *Parietaria judaica* pollen profilin, *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 4 (1), 43-48.

Ausubel, F.M., 1989, *Protein expression,* Current protocols in molecular biology, In: Ausubel, F.M. Brent, R., Kıngston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl K. (ed.), John Wiley & Sons.

Barderas, R., Villalba, M., Lombardero, M., Rodríguez, R., 2002, Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen, *International Archives of Allergy and Immunology,* 127 (1), 47-54.

Barderas, R., Villalba, M., Pascual, C.Y., Batanero, E., Rodríguez, R., 2004, Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (6), 1192-1198.

Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M., Rodríguez, R., 2004, A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity, *The Journal of Immunology*, 172 (6), 3644-3651.

Batard, T., Basuyaux, B., Lambin, P., Brémard-Oury, C., Hamilton, R.G., David, B., Peltre, G., 1993, Isotypic analysis of grass pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 1. Specialization of certain classes and subclasses in the immune response, *International Archives of Allergy and Immunology*, 100 (1), 68-78.

Behrendt, H., Becker, W.M., Friedrichs, K.H., Darson, V., Tomingas, R., 1992, Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter, *International Archives of Allergy and Immunology*, 99, 425-428.

Bernstein, D.I., Biagini, R.E., Karnani, R., Hamilton, R., Murphy, K., Bernstein, C., Arif, S.A., Berendts, B., Yeang, H.Y., 2003, *In vivo* sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (3), 610-616.

Bilisik, A., Yenigun, A., Bicakci, A., Eliacik, K., Canitez, Y., Malyer, H., Sapan, N., 2008, An observation study of airborne pollen fall in Didim (SW Turkey): years 2004-2005, *Aerobiologia*, 24 (1), 61-66.

Breiteneder, H., Ferreira, F., Hoffman-Sommergruber, K., Ebner, C., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O., 1993, Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties, *European Journal of Biochemistry*, 212, 355–362.

Cadot, P., Diaz, J.F., Proos,t P., Van Damme, J., Engelborghs, Y., Stevens, E.A., Ceuppes, J.L., 2000, Purification and characterization of an 18-kd allergen of birch (*Betula verrucosa*) pollen: identification as a cyclophilin, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105 (2), 286-291.

Calabozo, B., Barber, D., Polo, F., 2001, Purification and characterization of the main allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla l 1, *Clinical & Experimental Allergy,* 31 (2), 322-330.

Celik, A., Guvensen, A., Uysal, I., Ozturk, M., 2005, Differences in concentrations of allergenic pollens at different heights in Denizli, Turkey, *Pakistan Journal of Botany*, 37 (3), 519-530.

Chakraborty, P., Gupta-Bhattacharya, S., Chanda, S., 1996, Comparative aerobiology, allergenicity and biochemistry of three palm pollen grains in Calcutta, India, *Journal Aerobiologia*, 12, 47-50.

Chardin, H., Mayer, C., Senechal, H., Tepfer, M., Desvaux, F.X., Peltre, G., 2001, Characterization of high-molecular-mass allergens in oilseed rape pollen, *International Archives of Allergy and Immunology*, 125 (2),128-134.

Chehregani, A.H., Majde, A., Moin, M., Golami, M., Shariatzadeh, S.M., Mohsenzae, F., 2004, Effect of air pollution on some cytogenetic characteristics, structure, viability and proteins of *Zinnia elegans* pollen grains, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (1), 118-122.

Chen, Z., Cremer, R., Posch, A., Raulf-Heimsoth, M., Rihs, H.P., Baur, X., 1997, On the allergenicity of Hev b 1 among health care workers and patients with spina bifida allergic to natural rubber latex, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100 (5), 684-693.

Choi, J.H. ve Lee, S.Y., 2004, Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 625-635.

Chua, K.Y., Kehal, P.K., Thomas, W.R., Vaughan, P.R., Macreadie, I.G., 1992, High-frequency binding of IgE to the Der p allergen expressed in yeast*, Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 89, 95-102.

Chua, K.Y., Stewart, G.A., Thomas, W.R., Simpson, R.J., Dilworth, R.J., Plozza, T.M. ve diğ., 1988, Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases, *The Journal of Experimental Medicine*, 167 (1), 175-182.

Coombs, R.R.A. ve Gell, P.H.G., 1963*, Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease*, Gell, P.H.G. and Coombs, R.R.A. (eds.) Clinical Aspects of Immunology, 1, 575, (Oxford: Blackwell Scientific Publications).

Cornelis, P., 2000, Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments, *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (5), 450–454.

Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A., López, E., Lombardero, M., del Pozo, V., Lahoz, C., 2004, Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment, *Allergy*, 59 (5), 485-490.

Cresti, M. ve Linskens, H., 2000, Pollen-allergy as an ecological phenomenon: A review, *Plant Biosystems*, 134 (3), 341-352.

Çeteresi, D., 2014, İstanbul'daki Ak Dut (*Morus alba L.)* ve Mavi Atlas Sediri [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr. Cv. 'Glauca'] Polenlerinin Alerjenik Proteinleri, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., van Cauwenberge, P., 2007, Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, 62 (9), 976-990.

De Benito Rica, V., Menchaca Riesco, J.M., Rubio del Val, M.C., Sánchez Alonso, Y., Rodríguez Lázaro, B., Soto Torres, J., 2004, Identification of the allergenic taxa of pollen in patients with pollinosis to determine the risk season. [Spanish] *Allergol Immunopathol (Madr)*, 32 (4), 228-232.

De la Hoz, F., Polo, F., Moscoso del Prado, J., Sellés, J.G., Lombardero, M., Carreira, J., 1990, Purification of Art v I, a relevant allergen of *Artemisia vulgaris* pollen, *Molecular Immunology,* 27 (7), 651-657.

De Vouge, M.W., Thaker, A.J., Curran, I.H., Zhang, L., Muradia, G., Rode, H., Vijay, H.M., 1996, Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *International Archives of Allergy and Immunology*, 111: 385-395.

Drummond, J.T., Jarrett, J., González, J.C., Huang, S., Matthews, R.G., 1995, Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes, *Analytical Biochemistry*, 228 (2), 323-329.

Emberlin, J., 1998, The effect of air pollution on allergic pollen, *European Respiratory Review*, 53, 164-167.

Engel, E., Richter, K., Obermeyer, G., Briza, P., Kungl, A.J., Simon, B., Auer, M., Ebner, C., Rheinberger, H.J., Breitenbach, M., Ferreira, F., 1997, Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains, *The Journal of Biological Chemistry,* 272 (45), 28630-28637.

Esch, R.E. ve Klapper, D.G., 1987, Cross-reactive and unique grass group I antigenic determinants defined by monoclonal antibodies, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 79 (3), 489-495.

Fang, K.S., Vitale, M., Fehlner, P., King, T.P., 1988, cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 85 (3), 895-899.

Feldmann, H., 2009, *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Wiley, Germany, ISBN-13: 978-3527332526.

Ferrer, J.L., Ravanel, S., Robert, M., Dumas, R., 2004, Crystal structures of cobalamin-independent methionine synthase complexed with zinc, homocysteine, and methyltetrahydrofolate, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 44235-44238.

Garfield, E., 1985, Allergies are nothing to sneeze at: Part 1. Epidemiology and Etiology, *Essays of an Information Scientist,* 8, 119-131.

Gavrović-Jankulović, M., Cirković, T., Bukilica, M., Fahlbusch, B., Petrović, S., Jankov, R.M., 2000, Isolation and partial characterization of Fes p 4 allergen, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 10 (6), 361-367.

Gençer, A., Şirin, G., Gül, H., Özgül, U., 2013, Determination of the product conditions of pulp and paper from white mulberry (*Morus alba* L.) by kraft method, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi,* 15, 1-2.

Ghanati, F. ve Majd, A., 1995, The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus eldarica* pollen, *Grains*, 34, 208-221.

Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A.D., 1979, Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, 76 (1), 106-110.

Gonianakis, M.I., Baritaki, M.A., Neonakis, I.K., Gonianakis, I.M., Kypriotakis, Z., Darivianaki, E., Bouros, D., Kontou-Filli, K., 2006, A 10-year aerobiological study (1994-2003) in the Mediterranean island of Crete, Greece: trees, aerobiologic data, and botanical and clinical correlations. *Allergy & Asthma Proceedings,* 27 (5), 371-377.

Gonzalo-Garjo, M.A., Tormo-Molina, R., Muñoz-Rodríguez, A.F., Silva-Palacios, I., 2006, Differences in the spatial distribution of airborne pollen concentrations at different urban locations within a city, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology,* 16 (1), 37-43.

Gregan, J., Rabitsch, P.K., Rumpf, C., Novatchkova, M., Schleiffer, A., Nasmyth, K., 2006, High-throughput knockout screen in fission yeast, *Nature Protocols*, 1 (5), 2457-2464.

Griffith, I.J., Smith, P.M., Pollock, J., Theerakulpisut, P., Avjioglu, A., Davies, S., Hough, T., Singh, M.B., Simpson, R.J., Ward, L.D. ve diğ., 1991, Cloning and sequencing of Lol pI, the major allergenic protein of rye-grass pollen, *FEBS Letters*, 279 (2), 210-215.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C., 1999, Modern Genetic Analysis, New York: W. H. Freeman, ISBN-10: 0-7167-3118-5.

Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, Handbook of Genetics, 1, New York and London, 395-446.

Hakkaart, G.A.J., Harmsen, M.M., Chua, K.Y., Thomas, W.R., Aalberse, R.C., van Ree, R., 1998, Expression of the house dust mite allergen Der p 2 in the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae, Clinical & Experimental Allergy*, 28, 45-52.

Halonen, M., Stern, D.A., Wright, A.L., Taussig, L.M., Martinez, F.D., 1997, Alternaria as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155 (4), 1356-1361.

Hernandez Prieto, M., Lorente Toledano, F., Romo Cortina, A., Davila Gonzalez, I., Laffond Yges, E., Calvo Bullon, A., 1998, Pollen calendar of the city of Salamanca (Spain). Aeropalynological analysis for 1981-1982 and 1991-1992, *Allergologia et Immunopathologia (Madr)*, 26 (5), 209-222.

Hoffman, C.S, Wood, V., Fantes, P.A, 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics*, 201, 403-423.

Hosfield, T. ve Lu, Q., 1999, *S. pombe* expression vector with 6x(His) tag for protein purification and potential for ligation-independent cloning, *Biotechniques,* 27 (1), 58-60.

Huecas, S., Villalba, M., Rodríguez, R., 2001, Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity, *The Journal of Biological Chemistry,* 276 (30), 27959-27966.

Hurtado, I. ve Riegler-Goihman, M., 1987, Air sampling studies in a tropical area. Four year results, *Experientia Supplementum*, 51, 49-53.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990, High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids, *Gene*, 96 (1), 23-28.

Ipsen, H. ve Lewenstein, H., 1983, Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*), *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72 (2), 150-159.

Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wüthrich, B., 2001, A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 56 (9), 813-824.

Karamloo, F., Schmitz, N., Scheurer, S., Foetisch, K., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S., 1999, Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (5), 991-999.

Knox, R.B. ve Suphioglu, C., 1996, Pollen allergens: development and function, *Sexual Plant Reproduction*, 9, 318–323.

Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.L., Bursill, L.A., 1997, Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution, *Clinical & Experimental Allergy,* 27 (3), 246-251.

Larsen, J.N., Strøman, P., Ipsen, H., 1992, PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam, *Molecular Immunology*, 29 (6), 703-711.

Leupold, U., 1950, Die vererbung von homothallie und heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe, C R Lab Carsberg Sér Physiol*, 24, 381-480.

Lindner, P., 1893, *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer gahrungserreger, *Wochenschr Brauerei*, 10, 1298-1300.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000, *Recombinant DNA and Genomics,* In: Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (ed.), Chapter 7, Fourth Edition, Molecular Cell Biology, ISBN-10: 0-7167-3136-3.

Majd, A. ve Kiabi, S., 1997, The effect of Tehran's polluted atmosphere on ultrastructural changes and allergenicity of *Cupressus arizonica* pollen grains, *Aerobiology*, 407-417.

Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., Shariatzade, M.A., 2004, The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains, *Aerobiologia*, 20 (2), 111-118.

Marknell DeWitt, A., Niederberger, V., Lehtonen, P., Spitzauer, S,, Sperr, W.R., Valent, P., Valenta, R., Lidholm, J., 2002, Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11, *Clinical & Experimental Allergy,* 32 (9), 1329-1340.

Mothes, N., Valenta, R., Spitzauer, S., 2006, Allergy testing: the role of recombinant allergens, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (2), 125-132.

Movérare, R., Westritschnig, K., Svensson, M., Hayek, B., Bende, M., Pauli, G., Sorva, R., Haahtela, T., Valenta, R., Elfman, L., 2002, Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization, *International Archives of Allergy and Immunology*, 128 (4), 325-335.

Navarro, A.M., Orta, J.C., Sánchez, M.C., Delgado, J., Barber, D., Lombardero, M., 1997, Primary sensitization to *Morus alba*, *Allergy*, 52 (11), 1144-1145.

Niederberger, V., Hayek, B., Vrtala, S., Laffer, S., Twardosz, A., Vangelista, L., Sperr W.R., Valent, P., Rumpold, H., Kraft, D., Ehrenberger, K., Valenta, R., Spitzauer, S., 1999, Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7, *The FASEB Journal*, 13 (8), 843-856.

Niederberger, V., Pauli, G., Grönlund, H., Fröschl, R., Rumpold, H., Kraft, D., Valenta, R., Spitzauer, S., 1998, Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102 (4), 579-591.

Nieto, A., Mazón, A., Boquete, M., Carballada, F., Asturias, J.A., Martínez, J., Martínez, A., 2002, Assessment of profilin as an allergen for latex-sensitized patients, *Allergy*, 57 (9), 776-784.

Olsen, E., Zhang, L., Hill, R.D., Kisil, F.T., Sehon, A.H., Mohapatra, S.S., 1991, Identification and characterization of the Poa p IX group of basic allergens of Kentucky bluegrass pollen, *The Journal of Immunology,*147 (1), 205-211.

Osterwalder, A., 1924, *Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schweflige saure widerstandsfahige garhefe, *Mitt Gebiete Lebensmittelunters Hyg*, 15, 5-28.

OSU, 2017, Landscape Plants: *Morus alba,* http://landscapeplants.oregonstate.edu /plants/morus-alba, [Ziyaret tarihi: 20.05.2017].

Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Conti, A., Ispano, M., Fortunato, D., Bengtsson, A., Bianchi, M., 2002a, Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110 (2), 310-317.

Pastorello, E.A., Vieths, S., Pravettoni, V., Farioli, L., Trambaioli, C., Fortunato, D., Lüttkopf, D., Calamari, M., Ansaloni, R., Scibilia, J., Ballmer-Weber, B.K., Poulsen, L.K., Wütrich, B., Hansen, K.S., Robino, A.M., Ortolani, C., Conti, A., 2002b, Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109 (3), 563-570.

Peebles, R.S., Church, M.K., Durham, S.R., 2012, *Principles of allergy diagnosis*, In: Holgate, S.T., Church, M.K., Broide, D.H., Martinez, F.D. (ed.), Chaper 6, Elsevier, China, ISBN-13: 9780723436584.

Puc, M., 2003, Characterisation of pollen allergens, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2), 143-149.

Radauer, C. ve Breiteneder, H., 2006, Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117 (1), 141-147.

Rajan, T.V., 2003, The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation, *Trends in Immunology*, 24 (7), 376-379.

Ruffin, J., Williams, D., Banerjee, U., Pinnix, K., 1983, The effect of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain airborne pollen grains, *Grana*, 22, 171-175.

Rumpf, C., Cipak, L., Novatchkova, M., Li, Z., Polakova, S., Dudas, A., Kovacikova, I., Maidokova, E., Ammerer, G., Gregan, J., 2010, High-throughput knockout screen in *Schizosaccharomyces pombe* identifies a novel gene required for efficient homolog disjunction during meiosis I, *Cell Cycle*, 9 (9), 1802-1808.

Sambrook, J.F ve Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, In: Sambrook, J.F ve Russell, D.W. (ed.), Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki, M., Kumagai, H., Takegawa, K., Tohda, H., 2013, Characterization of genome-reduced fission yeast strains, *Nucleic Acids Research*, 41, 5382-5399.

Schmidt, M., Hoffman, D.R., 2002, Expression systems for production of recombinant allergens, *International Archives of Allergy and Immunology*, 128 (4), 264-270.

Seiberler, S., Scheiner, O., Kraft, D., Lonsdale, D., Valenta, R., 1994, Characterization of a birch pollen allergen, Bet v Ill, representing a novel class of $Ca^{2+}$ binding proteins; specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound $Ca^{2+}$, *The EMBO Journal,* 13 (50), 3481-3486.

Singh, A.B. ve Kumar, P., 2003, Aeroallergens in clinical practice of allergy in India. An overview, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2), 131-136.

Singh, B.P., Singh, A.B., Nair, P.K., Gangal, S.V., 1987, Survey of airborne pollen and fungal spores at Dehra Dun, India, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 59 (3), 229-234.

Singleton, P., 1999, *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, Fifth edition., Wiley, 444-454, England, ISBN: 978-0-470-09027-5.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.

Smith, P.M., Suphioglu, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B., Singh, M.B., 1996, Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 98, 331–343.

Song, J., Zhang, H., Liu, Z., Ran, P., 2008, Mango profilin: cloning, expression and cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2, *Molecular Biology Reports*, 35 (2), 231-237.

Soydemir, E. ve Aksoy, Z.B., 2017, Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı, *Güncel Gastroenteroloji*, 21 (1), 14-17.

Subiza, J., Jerez, M., Jimenez, J.A., Narganes, M.J., Cabrera, M., Varela, S., Subiza, E., 1995, Allergenic pollen pollinosis in Madrid, *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 96 (1), 15-23.

Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittauer, E., Schmid, E., Vicente, O., Heberle-Bors, E., Ahorn, H., Breitenbach, M., 1995, Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 2607-2613.

Takegawa,K., Tohda,H., Sasaki,M., Idiris,A., Ohashi,T., Mukaiyama,H., Giga-Hama,Y., Kumagai,H., 2009, Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53, 227–235.

Taketomi, E.A., Sopelete, M.C., de Sousa Moreira, P.F., de Assis Machado Vieira, F., 2006, Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology,* 72 (4), 562-567.

Taurog, R.E. ve Matthews, R.G., 2006, Activation of methyltetrahydrofolate by cobalamin-independent methionine synthase, *Biochemistry*, 45 (16), 5092-5102.

Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E., Rodríguez, R., 1999, Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (4), 797-802.

Thomas, W.R., Stewart, G.A., Simpson, R.J., Chua, K.Y., Plozza, T.M., Dilworth, R.J. ve diğ., 1988, Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*, *International Archives of Allergy & Applied Immunology*, 85 (1), 127-129.

TÜBİVES, 2011, *Morus alba* Distribution of The Taxon Over Turkey, http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=8424, [Ziyaret tarihi: 09.05.2017].

Ukhanova, O. ve Bogomolova, E., 2015, *Pollen allergens,* Airborne Allergens, In: Pereira, C. (ed.), Chapter 2, ISBN 978-953-51-2044-5.

Vailes, L.D., Kinter, M.T., Arruda, L.K., Chapman, M.D., 1998, High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101, 274-280.

Valenta, R. ve Niederberger, V., 2007, Recombinant allergens for immunotherapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (4), 8268-30.

Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchêne, M., Kraft, D., Scheiner, O., 1994, cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin, *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 199 (1), 106-118.

Valenta, R., Niespodziana, K., Focke-Tejkl, M., Marth, K., Huber, H., Neubauer, A., Niederberger, V., 2011, Recombinant allergens: what does the future hold?, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127 (4), 860-864.

Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O., 1992, Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens, *International Archives of Allergy and Immunology*, 97 (4), 287-294.

Van Oort, E., de Heer, P.G., van Leeuwen, W.A., Derksen, N.I., Muller, M., Huverneers, S., Aalberse, R.C., van Ree, R., 2002, Maturation of *Pichia pastoris* derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural cysteine protease Der p 1 from house dust mite, *European Journal of Biochemistry*, 269, 671-679.

Van Ree R., Brewczyński, P.Z., Tan, K.Y., Mulder-Willems, H.J., Widjaja, P., Stapel, S.O., Aalberse, R.C., Kroon, A.M., 1995, Grass pollen immunotherapy induces highly cross-reactive IgG antibodies to group V allergen from different grass species, *Allergy,* 50 (3), 281-283.

Wagner, B., Krebitz, M., Buck, D., Niggemann, B., Yeang, H.Y., Han, K.H., Scheiner, O., Breiteneder, H., 1999, Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (5), 1084-1092.

Wagner, S., Breiteneder, H., Simon-Nobbe, B., Susani, M., Krebitz, M., Niggemann, B., Brehler, R., Scheiner, O., Hoffmann-Sommergruber, K., 2000, Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from hevea latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression, *European Journal of Biochemistry*, 267 (24), 7006-7014.

Walker, J.M, 2002a, *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M (ed.), Chapter 3, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 11-14.

Walker, J.M, 2002b*, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M (ed.), Chapter 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-68.

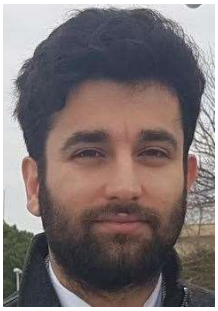
Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S. ve diğ., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871-880.

Wopfner, N., Willeroidee, M., Hebenstreit, D., van Ree, R., Aalbers, M., Briza, P., Thalhamer, J., Ebner, C., Richter, K., Ferreira, F., 2002, Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen, *Biological Chemistry,* 383 (11), 1779-1189.

Zarinhadideh, F., Amini, A., Assarehzadegan, M.A., Borsi, S.H., Sepahi, N., Sadeghi, H.A., 2015, Immunochemical and molecular characterization of allergenic profilin (Koc s 2) from *Kochia scoparia* pollen, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58 (3), 443-451.

# ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler | |
|---|---|
| Adı Soyadı | Yunus AKSÜT |
| Doğum Yeri | İstanbul |
| Doğum Tarihi | 21.12.1988 |
| Uyruğu | ☑ T.C. ❒ Diğer: |
| Telefon | 0535 633 10 85 |
| E-Posta Adresi | yunus.aksut@ogr.iu.edu.tr |
| Web Adresi | |



| Eğitim Bilgileri | |
|---|---|
| **Lisans** | |
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Fakülte | Fen Fakültesi |
| Bölümü | Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü |
| Mezuniyet Yılı | 18.07.2013 |

| Yüksek Lisans | |
|---|---|
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı |
| Programı | Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı |
| Mezuniyet Tarihi | 22.06.2017 |