

***Tetrahymena thermophila* LİGAZ ENZİM AİLESİ
ÜYELERİNDEN BİRİNİN MOLEKÜLER
VE BİYOTEKNOLOJİK
KARAKTERİZASYONU**

Nurçin Küçükoğlu

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Haziran - 2010

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No:107T488

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurçin Küçükkoğlu'nun "*Tetrahymena thermophila* Ligaz Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Moleküler Ve Biyoteknolojik Karakterizasyonu" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 20/07/2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yrd.Doç. Dr. MUHİTTİN ARSLANYOLU
Üye	: Doç. Dr. CEMAL ÜN
Üye	: Doç. Dr. AZMİ YERLİKAYA

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tetrahymena thermophila LİGAZ ENZİM AİLESİ ÜYELERİNDEN BİRİNİN MOLEKÜLER VE BİYOTEKNOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Nurçin Küçükoglu

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2010, 143 sayfa

DNA ligazlar, DNA replikasyonu, tamiri ve rekombinasyonu esnasında meydana gelen DNA kırıklarının tamir ederler. Tüm DNA ligazlar aktif bölgelerinde KxDGxR motifi taşır ve kofaktör ihtiyaçlarına göre NAD ya da ATP bağımlı olup aynı reaksiyon mekanizmasını izler. *Tetrahymena thermophila* tekhücrelisinde, biyoteknolojik olarak üretilip kullanılan ATP bağımlı T4 DNA ligaz'a alternatif olabilecek bir enzimi belirlemek ve rekombinant olarak üretmek bu tezin amacını oluşturmaktadır. GenBankasında ve Tetrahymena Genom Veritabanında *Tetrahymena thermophila*'nın makronükleer genleri içinde yapılan BLAST analizi dört adet DNA ligaz geni bulunduğunu göstermiştir. Bunlardan *TtLIG11* ve *TtLIG12* adı verilen üyelerin ökaryotik DNA ligaz I, *TtLIG4*'ün ökaryotik DNA ligaz IV sınıfına dahil olduğu MEGA4 programı kullanılarak filogenetik analizler ile belirlenmiştir. Son üye olan *TtLIG13*'ün ise T4 gibi virüs ve prokaryotların ligazlarına benzerlik gösteren fakat sadece omurgasızlarda bulunan bir alt sınıfa ait olduğu bulunmuş ve bu guruba Ligaz II adının verilmesi önerilmiştir. DNA ligazlara özgü altı motifi taşıyan *Tetrahymena* DNA ligaz üyelerinden *TtLIG13*'ün *E. coli*'de rekombinant protein olarak ifade edilebilmesi için gerekli 22 nokta mutasyonu PZR ile yerleştirilerek kodon uyumu sağlanmıştır. Rekombinant *TtLIG13* cDNA'sı 6XHistidin takısını sağlayan pET16b vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21 (DE3) pLysS'e aktarılmıştır. Rekombinant *TtLIG13*'ün ilk IPTG indüksiyonu gerçekleştirilerek Ni-NTA tanecikleri ile afinitik saflaştırılma denemeleri gerçekleştirilmiş fakat toksik gen grubuna girmesinden dolayı zorluklarla karşılaşmıştır. Rekombinant *TtLig13p*'nin üretim ve saflaştırma çalışmaları sürmekte olup biyoteknolojik alternatif ürün potansiyelinin değerlendirmesi bu aşamanın başarılı olması durumunda sonuçlandırılabilir.

Anahtar kelimeler: Kodon uyumu, ATP bağımlı DNA ligaz, Ligaz II, Rekombinant, *T. thermophila*, Nokta Mutasyonu.

ABSTRACT

Master of Sciences Thesis

MOLECULAR and BIOTECHNOLOGICAL CHARACTERIZATION ONE OF *Tetrahymena thermophila* DNA LIGASE ENZYME FAMILY GENE

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Advance Technologies Program
Biotechnology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2010, 143 pages

DNA ligases join breaks in the phosphodiester backbone of DNA molecules during DNA replication, repair and recombination. All DNA ligases share the same active site KxDGxR motif, and follow the same reaction mechanism but they may use either ATP or NAD⁺ as a cofactor. The goal of this study is the recombinant production of an alternative DNA ligase enzyme determined among *Tetrahymena thermophila* macronuclear genes alternative to biotechnologically produced ATP dependent T4 DNA ligase. The results of BLAST analysis in GeneBank and Tetrahymena Genome Database showed that this unicellular organism contains four ATP dependent DNA ligase genes. According to phylogenetic analysis made by MEGA4 program, TtLIG11 and TtLIG12 ligases are under eukaryotic Ligase I group, TtLIG4 under eukaryotic ligase IV. The last member TtLIG13 located under viral and prokaryotic ATP dependent DNA ligase group with some invertebrate members and it is proposed in this thesis that this primitive invertebrate ligase group called as Ligase II. To express the TtLIG13 as a recombinant protein in *E.coli* the necessary codon adaptation was made by the introduction of 22 multiple point mutations with PCR into cDNA protein coding region. Recombinant TtLIG13 cDNA is cloned in to pET16b which provide 6x His tag then transformed to *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Recombinant TtLIG13 was induced with IPTG and isolation with Ni-NTA beads was implemented but encountered difficulties cause it is a toxic gene. Ones the underway experimental production and isolation of recombinant TtLig13p is successfully accomplished, the evaluation of biotechnological alternative DNA ligase enzyme potential will be finalized.

Key words: Codon adaptation, ATP dependent DNA ligase, Ligase II, Recombinant, *T. thermophila*, Multiple Point Mutation.

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince yenilikçi, özverili ve sabırlı yaklaşımıyla desteğini esirgmeden sınırlarımı zorlayarak diplomadan çok daha fazlasına sahip olmamı sağladığı için, değerli Hocam Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

Kattıkları samimiyetle, laboratuvarı çalışma ortamından aile ortamına dönüştürerek çalışma saatlerimin uzamasında rolü olan arkadaşlarım H. Açıya AKDAMAR, M.Taha YILDIZ, Erhan ASLAN, Emine DİNÇER, Hülya KARACA, Ozan KILIÇKAYA, Yunus ENSARİ, Fulya KARAKAŞ, A. Fulya ÜSTÜNTANIR ve Gürkan YILMAZ'a,

Maddi ve manevi destekleri ile yüksek öğrenimim süresince izole bir ortam sağlayan annem Günseli KÜÇÜKOĞLU ve babam Celal KÜÇÜKOĞLU'na,

Ülkeme,

Teşekkür sayfasındaki değerleri bir arada sunarak beni şanslı kılan ÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Nurçin Küçükoğlu

Temmuz, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
EK(ler)	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. DNA Ligaz Enzimleri	2
1.1.1. ATP Bağımlı DNA Ligaz Enzimlerinin Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması.....	3
1.1.2. Biyoteknolojik açıdan ligaz enzimleri	11
1.2. Model Organizma ve Biyolojik Kaynak <i>Tetrahymena thermophila</i>	11
1.2.1. Makronükleer Genom Projesi bulguları ve <i>Tetrahymena</i> <i>thermophila</i> ligazları	16
1.3. Amaç	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM	17
2.1. Biyoinformatik Analizler	17
2.1.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> DNA Ligazları'nın belirlenmesi.....	17
2.1.2. Filogenetik Ağacın Yapılandırılması.....	17
2.1.3. Benzerlik Matrisinin Oluşturulması.....	18
2.1.4. 3 Boyutlu Modellemenin Gerçekleştirilmesi	18
2.2. Deneysel Analizler	19
2.2.1. Gene özgün primerler kullanılarak TtBtlig geninin protein kodlayan cDNA bölgesinin klonlanması.....	19
2.2.2. BtLig mRNA'sının 5' ve 3' translyasyona girmeyen dizilerinin klonlanması ve dizi analizi	20
2.2.3. Protein kodlayıcı BtLig cDNA dizisinin <i>E.coli</i> kodon sözlüğüne çoklu nokta mutasyon PZR yöntemiyle uyumu	21
2.2.4. rBtLig gen versiyonlarının pET16b protein ifade vektörüne klonlanması	23

2.2.5. Rekombinant BtLig enzimlerinin üretilmesi ve saflaştırılması.....	24
2.2.6. <i>Tetrahymena</i> 'nın konjugasyonu esnasında TtBtLig'in transkripsiyon durumunun RT-PZR ile analizi	24
3. BULGULAR	26
3.1. Biyoinformatik Bulgular	27
3.1.1. Filogenetik Ağacın Yapılandırılması	27
3.1.2. Aktif ve İnaktif TtLIG13p'nin Üç Boyutlu Protein Yapı Modellemesi.....	46
3.2. Deneysel Bulgular	47
3.2.1. TtLIG13 Geninin Klonlanması	47
3.2.2. TtLIG13 mRNA'sının 3' Translasyona Girmeyen Bölgesinin klonlanması.....	49
3.2.3. Konjugasyon Durumundaki <i>T.thermophila</i> BtLigaz mRNA İfadesinin Var/Yok Analizi	53
3.2.4. <i>E.coli</i> 'de Rekombinant Protein Üretimi için TtLIG13 cDNA'sının Nokta Mutasyonları ile Kodon Optimizasyonu	54
3.2.5. TtLIG13 Geninin Üretilen 4 Formunun Protein İfade vektör ve hücrelerine Aktarılması	58
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ	76
KAYNAKLAR	77
EK(ler)	82

EK(ler)	
EK- 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	82
EK- 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzim Setleri.....	84
EK-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri: LB Broth (Sıvı), LB Agar (Kati) Amfisilin, SOC ve PPY.....	85
EK- 4 Klonlama Sistemi: Konakçı <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue Irkı ve pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü.....	88
EK- 5 Protein İfade Sistemi: Konakçı <i>Escherichia coli</i> BL-21 DE3 pLySs Irkı ve pET16b Vektörü.....	90
EK- 6 Uygulanan Deneysel Yöntemler.....	92
EK-7 Nokta Mutasyonlarının Yerleştirilmesi Amacıyla Kullanılan Primerlerin Listesi.....	110
EK -8 N Terminal Domainin Nokta Mutasyonlarının Yerleştirilmesi.....	112
Ek -9 Aktif TtLIG13-pGEMT Easy ve Aktif TtLIG13-KD-pGEMT Easy Plazmitlerinin Dizi analizi Sonuçları.....	115
Ek -10 İnaktif TtLIG13 ve İnaktif TtLIG13-KD'nin Oluşturulması.....	123
EK-11 Dizilerin İnaktif Duruma Getirilmesinin Dizi Analizi İle Teyit Edilmesi.....	126
Ek -12 <i>Tetrahymena thermophila</i> DNA Ligaz Dizileri	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. AMP'ye bağlı Chlorella virüs ligaz enziminin 3B şeritsel yapısı.....	4
Şekil 1.2. Nükleotidil transferaz süper ailesi enzimlerinin korunmuş motif dizileri.....	5
Şekil 1.3. DNA Ligaz enzimlerinin reaksiyon mekanizması.....	7
Şekil 1.4: PBCV1 mRNA şapka enziminin açık ve kapalı formasyonu.....	8
Şekil 1.5. DNA Ligaz enzimlerinin şematik yapısı.....	10
Şekil 1.6. Konjugasyon durumundaki <i>Tetrahymena</i> hücrelerindeki nükleer gelişim evreleri.....	14
Şekil 1.7. Konjugasyon esnasında MAK gelişiminin aşamaları.....	15
Şekil 3.1. <i>Tetrahymena</i> 'da bulunan DNA ligaz enzimlerinin kovalent nükleotidil transferaz enzim aile üyeleri ile filogenetik köklü ağaç ilişki yapısı.....	29
Şekil 3.2. <i>Tetrahymena</i> DNA ligaz enzimleri ile kovalent nükleotidil transferaz enzim ailesi üyelerinin köksüz filogenetik ağaç yapısı.....	32
Şekil 3.3. İlkel yapıdaki omurgasız DNA ligazlarının kovalent nükleotidil transferazlar arasındaki dağılımının filogenetik köklü ağaç yapısı.....	34
Şekil 3.4. Omurgasız DNA ligazlarının bakteri ve virüs ligazları arasındaki filogenetik dağılımının detaylı durumu.....	38
Şekil 3.5. <i>Tetrahymena</i> ligazları ile virüs ve prokaryotik ligazları arasındaki % benzerlik ilişkisi.....	40
Şekil 3.6. TtLig13p ve bakteri ligazlarının % benzerlik analizi.....	41
Şekil 3.7. TtLig13p ve virüs ligazlarının % benzerlik analizi.....	41
Şekil 3.8. İlkel yapıdaki omurgasız ligazlarının % benzerlik analizi.....	42
Şekil 3.9. TtLig13p peptid dizisinde DNA ligaz enzim motifleri ile biyolojik domainin yerleşimi.....	44
Şekil 3.10. Virüs, Prokaryotik, <i>Paramecium</i> ve <i>Tetrahymena</i> DNA ligaz enzimlerinin ligaz motiflerinin karşılaştırılması.....	45
Şekil 3.11. PBCV1 ve TtLig13p-KD dizilerinin 3B modellemesi.....	47
Şekil 3.12. TtLIG13 mRNA'sının protein kodlayıcı cDNA dizisinin klonlanması.....	48
Şekil 3.13. TtLIG13 cDNA'sının 3' UTR dizisinin klonlanması.....	49

Şekil 3.14. Dizi analizi ile elde edilen Tt <i>LIG13</i> 3' UTR bilgisi.....	50
Şekil 3.15. Tt <i>LIG13</i> 3' UTR dizi ile Tt <i>LIG13</i> genom dizisinin GeneTool programıyla hizalanması.....	51
Şekil 3.16. Tt <i>LIG13</i> geninin mRNA dizisi.....	52
Şekil 3.17. Tt <i>LIG13</i> geninin konjugasyon boyunca mRNA ifade analizi.....	54
Şekil 3.18. Tt <i>LIG13</i> C terminal'ine denk gelen bölgeye 7 nokta mutasyonunun iki aşamada yerleştirilmesi.....	55
Şekil 3.19. Tüm mutasyonları taşıyan Tt <i>LIG13</i> DNA parçalarının dizinin bütünleştirilmesi.....	57
Şekil 3.20: Aktif ve inaktif Tt <i>LIG13</i> -pGEMT Easy vektörlerinin NdeI-XhoI restriksiyon enzimleri ile ikili kesimleri, saflaştırılması ve aynı enzimler ile kesilmiş pET16b vektörüne klonlanması.....	59
Şekil 3.21: Aktif ve inaktif Tt <i>LIG13</i> -KD-pGEMT Easy vektörlerinin NdeI-XhoI restriksiyon enzimleri ile ikili kesimleri, saflaştırılması ve aynı enzimler ile kesilmiş pET16b vektörüne klonlanması.....	60
Şekil 3.22: E.coli BL21 DE3 pLySs konakçısından saflaştırılarak NdeI-XhoI ikili kesim reaksiyonuna alınan pET16b vektörleri.....	61
Şekil 3.23. pET16b-Tt <i>LIG13</i> -KD ve pET16b-in-Tt <i>LIG13</i> -KD'nin RBt15 primeri ile dizi analizi sonucu.....	62
Şekil 4.1. Tetrahymena DNA ligazlarının şematik yapısı.....	66
Şekil 4.2. TtLig13p DNA ligaz enziminin iki farklı deneysel kalıba göre 3B modellemesi ile T4 DNA Ligazın teorik 3B yapısı.....	70
Şekil 4.3. Aktif ve İnaktif TtLig13p DNA ligaz enziminin 3B yapılarının karşılaştırılması.....	72
Şekil 4.4. <i>Tetrahymena thermophila</i> II (B2086) ve VII (Cu428) çiftleşme tiplerinin açıklık ve konjugasyonları süresince Tt <i>LIG13</i> mRNA ifadesi.....	75

1.GİRİŞ

Canlıların genetik ve moleküler biyolojisinin anlaşılması, özünde insan yaşam kalitesinin artırılması olan biyoteknolojik uygulamalara fırsat verir. Biyolojik zenginliklerin biyomühendislik yöntemler kullanılarak insanoğlunun ihtiyaç duyduğu ürünlere dönüştürüldüğü disiplinler arası bilim dalı “**Moleküler Biyoteknoloji**” olarak bilinir. Tıbbi (kırmızı biyoteknoloji), tarımsal (yeşil biyoteknoloji) [1] ve endüstriyel (beyaz biyoteknoloji) [2] üretimde ihtiyaç duyulan enzimatik veya enzimatik olmayan biyo-materyallerin “**hücre sel üretim fabrikalarında**” doğal formlarına en yakın halde üretmek biyoteknolojinin temel amaçlarından biridir. Bu tez araştırmasının nihaiyi amacını oluşturan DNA bağımlı ligaz enzim üretimi; gen ürünlerinin (DNA, RNA ve protein) biyoteknolojik kullanım amaçlı üretimi olan “**Beyaz biyoteknoloji**” kapsamına girmekte olup rekombinant genetik ve moleküler biyoloji uygulamalarıyla üretilebilir [1].

Klasik biyoteknolojiden “Beyaz biyoteknolojiye” giden yolda atılan önemli adımlardan ilki 1966 yılında Gellert’in *E. coli*’den elde edilen hücre özütündeki DNA ligaz enziminin λ DNA’sını birleştirebildiğini bildirmesi ile başlamıştır [3]. Bunu takiben, Weiss ve arkadaşları 1967 yılında yaptıkları çalışma ile T4 fajı tarafından enfekte edilen *E. coli* hücrelerinden elde edilen T4 DNA ligazın tek zincir DNA kırıklarını ATP varlığında tamir edebildiğini göstermişlerdir [4]. 1972 yılında Mertz ve Davis’in restriksiyon endonükleazlar ile yapışkan uçlu (birbirine zayıf hidrojen bağlarla bağlanabilen) iki DNA parçası üretmesi ve bu uçları ligaz enzimi kullanarak birleştirmesiyle ilk DNA kesim/yapıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [5]. 1973 yılında Cohen ve arkadaşları, iki farklı organizmanın DNA’larını birleştirerek oluşturdukları rekombinant DNA’yı bir canlıya (*E.coli*) ürettirmeyi başarmıştır [6]. Günümüzde “**klonlama**” olarak bilinen bu tekniğin İNSÜLİN (1978, Genentech) [7] gibi bir tıbbi ürün geliştirmede kullanılması ise Moleküler Biyoteknolojinin temelini oluşturmuş ve restriksiyon endonükleaz ile DNA ligaz enzimlerine talep doğmasına neden olmuştur.

Bugün ticari olarak pazarlanan ligaz enzim genleri T4 bakteriyofaj ve *E. coli* biyolojik kaynaklarından elde edilmiş ve rekombinant olarak üretilmiş

enzimlerdir [8]. Satışa sunulan DNA ligaz enzimleri arasında yüksek sıcaklıkta ve NAD bağımlı olarak aktivite gösteren Taq DNA Ligaz enzimi de bulunmaktadır. Taq DNA Ligaz enzimi klasik ligasyon reaksiyonlarında kullanılan T4 ve *E. coli* DNA ligazlarına bir alternatif olarak değil, yüksek sıcaklıkta “ligaz zincir reaksiyonu” gibi bir amaçla kullanılmakta olup; NAD bağımlı aktivite gösteren *E. coli* DNA Ligazı ise, küt uçların birleştirilmesinde başarılı olmadığından, tercih edilmemektedir. Dünya biyoteknolojik pazarında restriksiyon enzimleri alternatif kaynaklı olarak [9] ve oldukça ucuza satılmaktayken; DNA ligaz enzim üretim ve pazarlamasında T4 DNA bağımlı ligaz enzimi alternatifsiz olarak bulunmaktadır. Türkiye araştırma-geliştirme kurumlarında kullanılan T4 DNA bağımlı ligaz enzimine yerli üretim alternatifi sunabilmek amacıyla DNA bağımlı ligaz üretim arayışı bu tezin ana amacını oluşturmaktadır.

1.1. DNA Ligaz Enzimleri

Enzim sınıflandırmasına göre EC6 numarası ile temsil edilmekte olan ligaz enzimleri katalizledikleri reaksiyona göre 6 gruba ayrılır [10]. Fosfodiester bağlarının oluşumunu katalizleyerek çift zincirli DNA’daki çentiklerin tamirini sağlayan DNA Ligaz enzimleri [11] ile fosforik ester bağı oluşumunu katalizleyen RNA-3'-fosfat siklaz enzimleri, EC6.5 numaralı “Ligazlar” alt sınıfını oluşturur. Bu alt sınıfta;

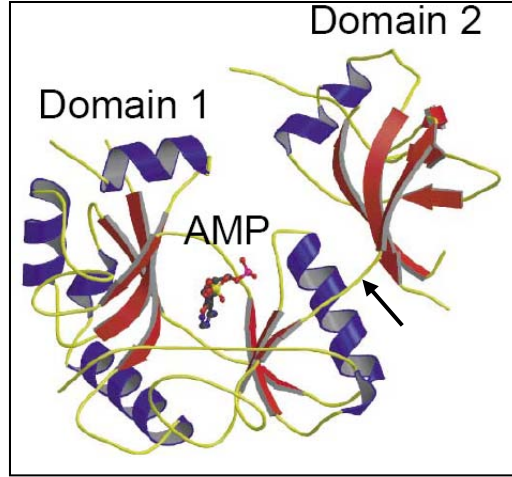
- ATP bağımlı DNA Ligaz enzimleri (EC6.5.1),
- NAD⁺ bağımlı DNA Ligaz enzimleri (EC6.5.2),
- ATP bağımlı RNA ligazlar (EC6.5.3) ve
- RNA-3' Fosfat siklazlar (EC6.5.4)

bulunur [9]. Bahsi geçen ligaz enzimleri (RNA-3' Fosfat siklazlar haricindeki) ile farklı bir enzim sınıfına dâhil olan mRNA guanilil transferazlar (mRNA şapka enzimleri) (EC2.7.7.50) [10], ortak motifler taşımaları ve aynı reaksiyon mekanizmasını izlemeleri nedeniyle “kovalent nükleotidil transferaz süper ailesini” oluşturur [12,13].

1.1.1. ATP bağımlı DNA Ligaz Enzimlerinin Yapısı ve Reaksiyon mekanizması

DNA ligazlar, DNA'nın replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirini içeren biyolojik olaylar esnasında çift zincirli DNA üzerinde oluşan çentiklerin (DNA'nın fosfat-riboz iskeletinde bir fosfodiester kovalent bağı eksikliği) tamirini gerçekleştirir. DNA ligazlar, kofaktör ihtiyaçlarına göre ATP bağımlı yâda NAD⁺ bağımlı olmak üzere ikiye ayrılır. Bakteriyofajlar, virüsler, arkeler, bazı öbakteriler, bakteriler ve ökaryotlarda ATP bağımlı DNA ligazlar bulunurken; NAD⁺ bağımlı DNA ligazlar sadece öbakteriler ve entomopoxvirüslerde bulunurlar.

Bilinen en küçük ve enzimatik olarak işlevsel DNA Ligaz enzimleri olan T7 bakteriyofaj ve *Chlorella spp.* virüs (PBCV-1) ATP bağımlı DNA ligaz proteinlerinin kristal yapısı, bu enzimlerin nükleotidil transferaz ve oligonükleotid bağlanma domaininden oluşan iki domainli bir katlanmaya sahip olduklarını göstermiştir (Şekil 1.1) [14]. İki domainden oluşan bu **katalitik çekirdek** “kovalent nükleotidil transferaz süper ailesi enzimleri” için karakteristik olan ve reaksiyonun katalizinde görev üstlenen 6 motif taşır (Şekil 1.2). N-ucu “nükleotidil transferaz domaini” korunmuş 5 motifde (I, III, IIIa, IV ve V) içine alan katlanmayla adenil-bağlanma-cebini oluşturur. Motif I; K(x)DG(x)R şeklinde dizilim gösterir ve dizideki lizin aminoasidi (K) katalitik merkez olarak rol oynar. Örneğin; *Chlorella spp.* virüs ATP bağımlı DNA ligaz enzimi Motif I (K₂₇xDGxR₃₂) 'de yer alan lizin₂₇'e (K veya Lis) AMP kovalent olarak bağlanır. Enzimde motif VI'nın bulunduğu karboksil ucu “oligonükleotid bağlanma (OB) domaini'dir” ve 5 adet anti-paralel β-plakası ve 1 adet alfa sarmaldan oluşmaktadır. OB domaini, nükleotidil transferaz domainine motif V'in içinde yer aldığı esnek bir bağlantı ile bağlanır (Şekil 1.1).

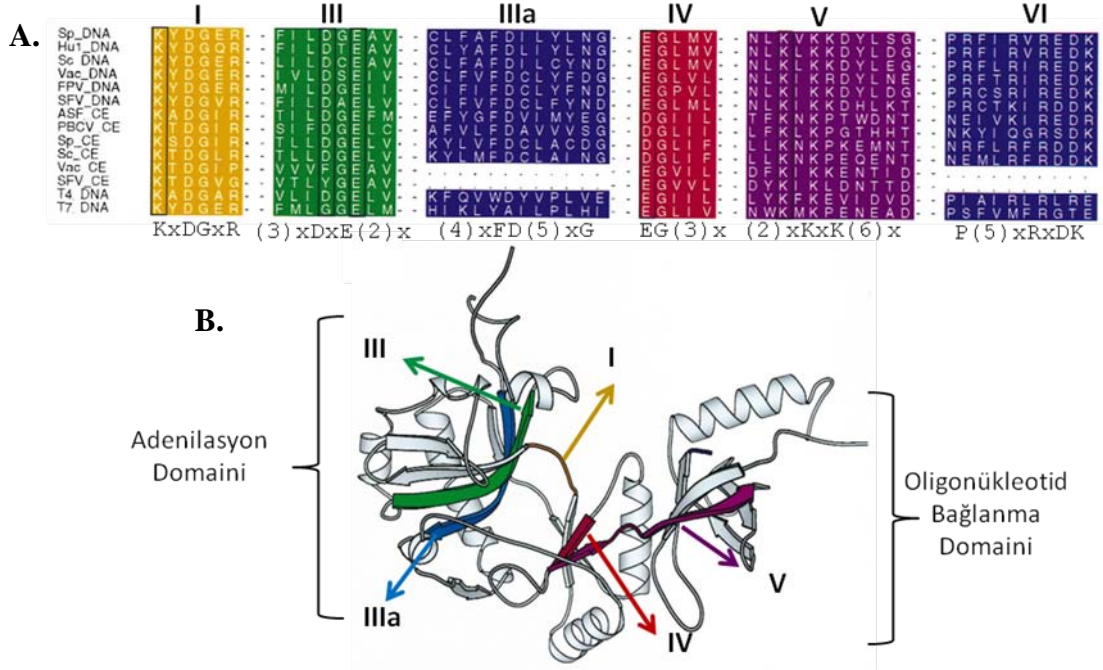


Şekil 1.1. AMP'ye bağlı Chlorella virüs ligaz enzim kompleksinin 3B şeritsel yapısı [15].

Şekilde Domain 1 olarak gösterilmiş domain, I,II, III ve IV. Domainleri bulunduran “Adenilasyon domaini”dir. Ok ile gösterilen bölge motif V’i işaret etmektedir, bu motif Domain 1 ve Domain 2’nin bağlantı bölgesidir. Domain 2 ise 5 β katlanması ile 1 α katlanmasından oluşan oligonükleotid bağlanma domainidir (OB) [15].

Enzimde var olan 6 motifin aktivitedeki rolü üzerine mutasyonel çalışmalar gerçekleştirilmiş ve birinci motifteki “K” Lizin aminoasidinin AMP’nin bağlandığı katalitik merkez olduğu görülmüştür. Deneysel çalışmalarda, motifin “L” Lösin aminoasidine dönüştürülmesi enzimin adenilasyonunu engellediği ve inaktif merkeze sahip ligaz enziminin adenillenmiş DNA substratının ligasyonunu gerçekleştirebildiği bildirilmiştir [16]. Üçüncü motifteki “D” Aspartik asit aminoasidinin, birinci motif ile bağ kurarak enzimin yapısının korunmasını sağladığı ve bu motifteki “E” Glutamik asit aminoasidinin, AMP ile etkileşim kurarak stabilizasyonunu sağladığı tespit edilmiştir [17]. Dördüncü motifteki “E” Glutamik asit aminoasidi metal iyonu ile etkileşim kurarak birinci motifteki lizin aminoasidini aktive ederken; motif V ve VI’nın silinmesi ile üretilen enzim ise işlevsizdir [17]. Çünkü Motif V taşıdığı K (Lizin) aminoasitleri ile reaksiyon esnasında ayrılması gereken grupların uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır [18]. Motif VI ise OB domainde yerleşim göstermektedir, bu motif reaksiyonun birinci adımında ATP’nin α ve β fosfatını

bükerek birinci motifteki aktif merkez lizinin lineer atak ile Ligaz-Adenilat kompleksini oluşturmasını sağlar (Şekil 1.2 A ve B) [14].

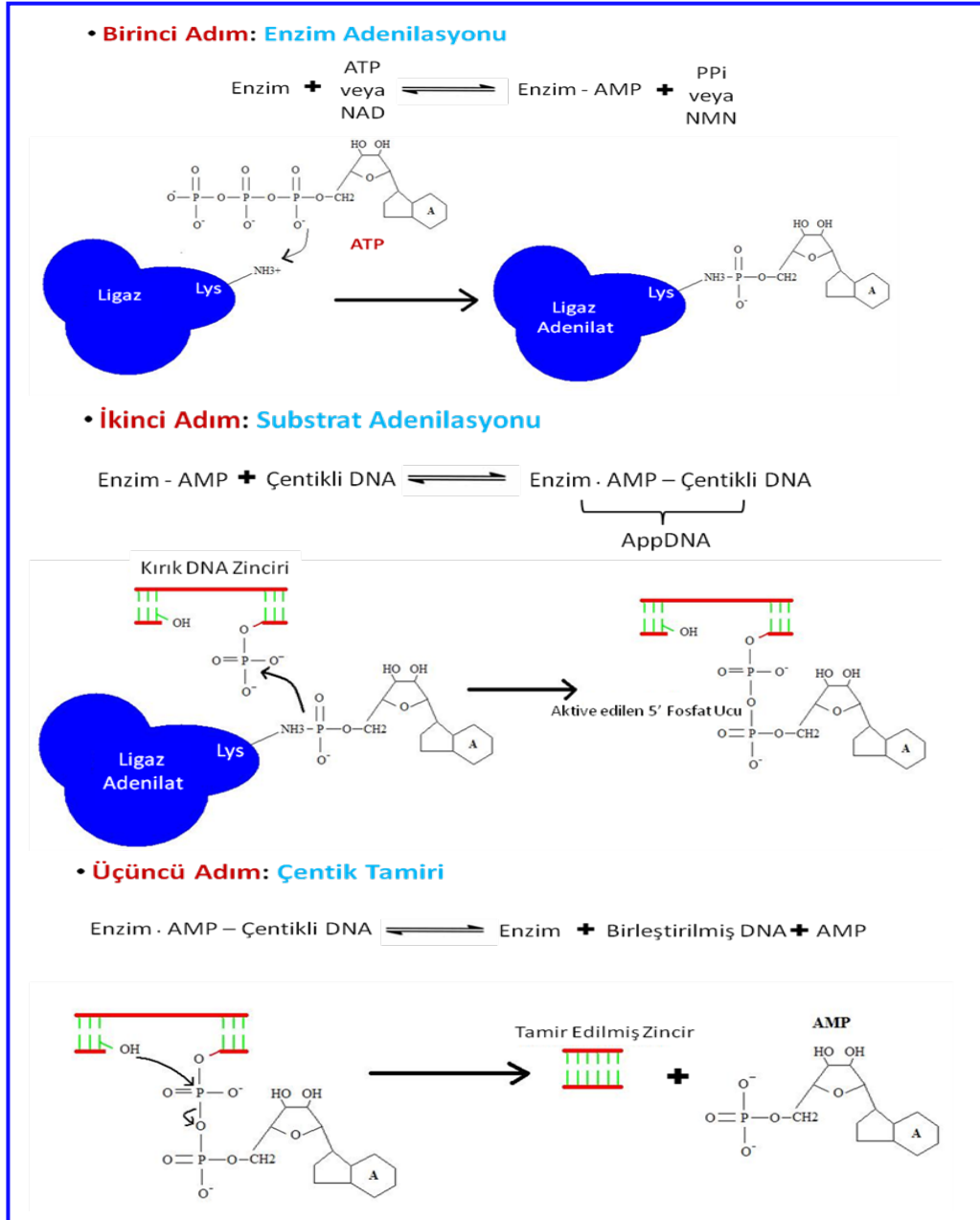


Şekil 1.2. Nükleotidil transferaz süper ailesi enzimlerinin korunmuş motif dizileri.

Şekil 1.2’de A. Birinci motif ATP ya da GTP’nin bağlandığı katalitik merkez olan lizin (K) aminoasidini taşır. Yapılan araştırmalar katalitik merkez dışındaki lizin aminoasitlerinin (motif V) ATP ya da GTP’nin fosfat grubu ile etkileşime girerek, ayrılacak grupların (PPi) uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığını göstermiştir. Aspartik asit (Asp, D, motif II) ve glutamik asit (Glu, E, motif III ve IV) ise divalent katyon kofaktörünün bağlanabilmesi için gereklidir. B. DNA Ligaz enzimlerinin sahip olduğu 6 motifin T7 DNA polimeraz kristal yapısı üzerindeki yerleşimleri. Motif I, Sarı; Motif III, Yeşil; Motif IIIa, Mavi; Motif IV, Kırmızı ve Motif V Pembe renkle gösterilmiş, OB domain üzerindeki Motif VI bu yapının arkasında kaldığından gösterilememiştir. Anahtar: CE: mRNA şapka enzimi, DNA: DNA ligaz. Vac, vaccinia virus; SFV, Shope fibroma virus; ASF, African swine fever virus; PBCV, Chlorella virus; FPV, fowlpox virus; Sc, *S.cerevisiae*; Sp, *S. Pombe*; Hu, *H. sapiens* ligaz I; T4, bakteriofaj T4; T7, bakteriofaj T7 [Kay. 19’den değiştirilerek kullanılmıştır],

Ligasyon reaksiyonu üç adımda tamamlanır: 1. Enzim adenilasyonu, 2. Substrat adenilasyonu, 3. Çentiğin birleştirilmesi. Enzimin adenilasyonu

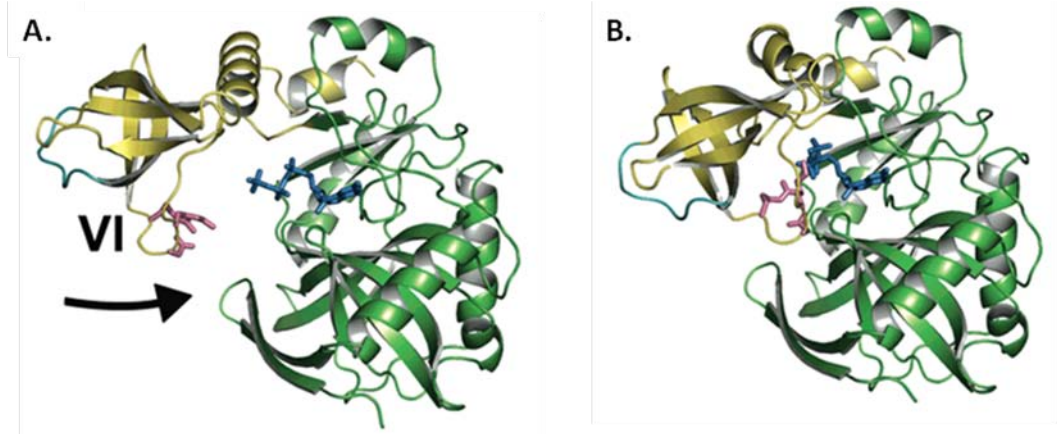
adımında, enzimin aktif merkezindeki lizin aminoasidine, ATP yada NAD^+ dan, AMP grubu aktarılır. Substrat adenilasyonu adımında AMP grubu çentigin 5' fosfat ucuna aktarılarak pirofosfat köprüsü kurulur (AppDNA). Son adımda ise çentigin birleşmesi ile fosfodiester bağı kurulur ve AMP serbest bırakılır [11. 14-16,19]. mRNA şapka enzimlerinin reaksiyon mekanizması da aynı olup, DNA ligazlardan farklılıkları kofaktör olarak GTP'yi kullanmaları ve reaksiyonun 3. basamağını gerçekleştirmemeleridir [12,13].



Şekil 1.3. DNA Ligaz enzimlerinin reaksiyon mekanizması. [Kaynak 20'den değiştirilerek kullanılmıştır].

Şekil 1.3’de birinci adım, enzimin 1. Motifinde bulunan Lizin amino asidinin adenillenerek Enzim-AMP kompleksinin oluştuğu “Enzimin Adenilasyonu” adımıdır. İkinci adımda, Ligaz-Adenilat kompleksindeki AMP’nin fosfat ucu ile çentiğin 5’ fosfat ucu arasında kimyasal bağ kurularak AppDNA’nın oluştuğu “Substrat Adenilasyonu” gerçekleşir. Reaksiyonun üçüncü adımında, çentiğin 3’ OH grubundaki oksijen atomu, nükleofilik atak ile 5’ fosfat grubu ile etkileşime geçerek bağ oluşturur. Bu yolla çentik tamir edilirken, AMP serbest kalır [11-16,19,20].

Ligasyon reaksiyonunun gerçekleştiği esnada enzimin 3B yapısında konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Reaksiyona girmemiş inaktif enzim, “açık konformasyon” adı verilen durumda bulunur, ki bu durumda adenilasyon ve oligonükleotid domaini birbirinden uzak, lineer yapıdadır. Reaksiyonun birinci basamağında OB domaini adenilasyon domaini üzerine doğru katlanır, OB domaindeki VI. Motif ve adenilasyon domaini üzerindeki I. Motif arasında etkileşim meydana gelir. “Kapalı formasyon” adı verilen bu aşamada enzim adenillenir ve reaksiyonun ikinci basamağı meydana gelir. Reaksiyonun birinci basamağından ikinci basamağına geçişin ilk adımında OB domainin kendi etrafında dönmesi ile VI. Motifin I. Motiften uzaklaşması gerçekleşir. Bu aşamada, enzimin kapalı formasyonu, insan DNA ligaz I enziminde OB domaindeki Arg871 ve Adenilasyon domainindeki Asp570 (Motif I) arasında kurulan tuz köprüsü ile muhafaza edilir. Ayrıca OB domain üzerindeki Phe872, çentiğin 5’ fosfat ucu ile etkileşim kurar ve enzim üzerindeki AMP’nin çentiğin 5’ fosfatına aktarılmasıyla reaksiyonun 2. basamağı tamamlanır. Reaksiyonun 3. basamağı da bu konformasyonda katalizlenerek AMP’nin motif V aracılığıyla salınmasıyla enzim açık formasyona geri döner [14].



Şekil 1.4. PBCV1 mRNA şapka enziminin açık ve kapalı formasyonu. [Kaynak 14'den değiştirilerek kullanılmıştır].

Şekil 1.4'de Adenilasyon domaini sarı, OB domain yeşil, Motif VI pembe ve GTP mavi renkli. **A.** Reaksiyonun 1. adımından önce, açık formasyondaki enzim yapısı. OB domain ve Adenilasyon domaini birbirinden uzak durumdadır. **B.** Reaksiyonun 1. adımında OB domain Adenilasyon domaini üzerine katlanır, motif VI α ve β fosfata bağlanarak motif I'deki aktif lizinin lineer atak ile GMP'yi bağlamasını sağlar. Reaksiyonun ikinci basamağına geçmeden önce OB domain, kapalı formasyon korunarak, motif VI'nın motif I'den uzaklaşacağı şekilde kendi etrafında döner. Bu formasyonda reaksiyonun ikinci basamağı ve DNA ligaz enzimleri için 3. Basamağı gerçekleşir [14].

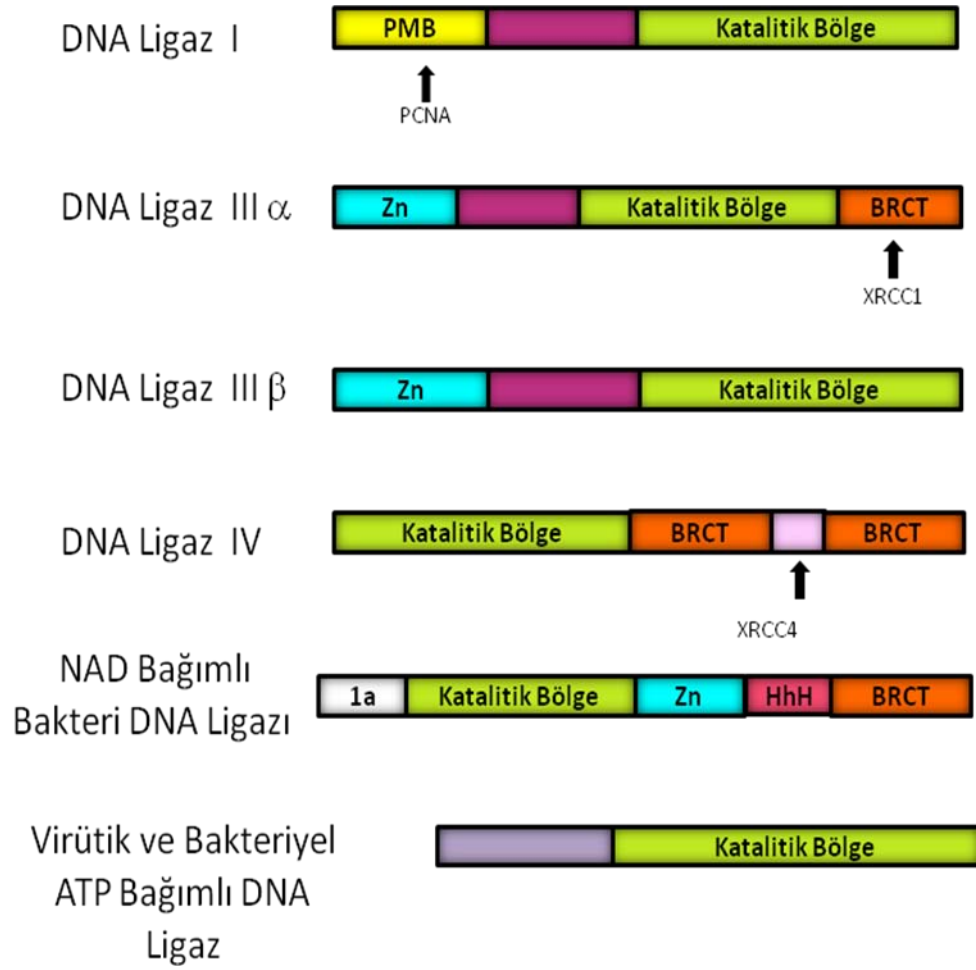
Ligaz enzimleri, ligaz katalitik domaine ilave biyolojik domainlerin füzyonu ile yapısal ve görevsel olarak çeşitlilik gösterirler [12,13]. Bilinen 4 çeşit ökaryotik DNA Ligaz vardır, I, III α , III β , ve IV. Ligaz II'nin ligaz III'ün parçalanma ürünü olduğu düşünülmektedir. Ligaz I, N terminalinde PCNA (çoğalan hücre nükleer antijeni- Proliferating Cell Nuclear Antigen) bağlanma motifi (PBM) taşır ve replikasyonun kesikli polimerizasyonunda oluşan Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde PCNA ile birlikte görev alır. Sadece omurgalılarda bulunan Ligaz III'ün mRNA'sının ekzonlarının alternatif ekleme-çıkarma (alternatif splicing) sonucu iki izoformu oluşur. Ligaz III α , C terminalinde BRCT domaini taşır. BRCT (C terminal Göğüs kanseri duyarlılık protein domaini - C terminal domain of a breast cancer susceptibility protein) domaini genellikle DNA zararı karşısında hücre döngüsü kontrol noktalarında görev yapan proteinlerde bulunur; örneğin, göğüs kanseri DNA tamir proteini

BRCA1'de bulunduğu gibi. Bu domain yaklaşık olarak 100 amino asit rastgele tekrarlarla sahiptir ve fosforile olmuş proteinlerin bağlandığı yapı olarak görev yapar. Bu domain DNA tamir faktörü Xrcc1 ile etkileşir. Ligaz III α ve β proteinleri N terminallerinde DNA'nın ikincil yapısının tanınmasında rol oynayan çinko parmak motifini taşır. Ligaz IV, homolog olmayan uçların birleştirilmesinde görev alır ve karboksil terminalinde iki adet BRCT domaini taşır. Bu iki domain arasındaki 100 aminoasit uzunluğunda DNA tamir faktörü Xrcc4 tarafından tanınan bir motif bulunur. Xrcc4, ligaz proteininin çift zincir kırıklarına hedeflenmesini sağlar (Şekil 1.5) [14,15,19].

Ligaz enzimlerinin amino asit dizilerinde yer alan hücre içi konumlandırıcı diziler, proteinin çekirdek yâda mitokondride konumlanmasını belirler. Ligaz I'in taşıdığı PCNA bağlanma motifi bu enzimin çekirdeğe konumlanmasını yönlendirir. Öte yandan mayalarda bulunan Cdc9 ligaz enzimini kodlayan gen dizisi iki adet translasyon başlangıç kodonu taşır; translasyon ilk başlangıç kodonundan başlarsa mitokondride, ikinciden başlarsa çekirdekte yerleşim gösterir. Ökaryotik canlılarda ise benzer bir durum ligaz III için geçerlidir [15].

Bakteri ve öbakteriler yaygın olarak NAD⁺ bağımlı ligaz enzimleri taşıyalar da *Haemophilus influenzae* bakterisinin aynı zamanda yaşamsal olarak önem arz eden ATP bağımlı ligaz geni de taşıdığı bildirilmiştir. NAD⁺ bağımlı ligaz enzimleri yapılarında, katalitik ligaz domaininin C terminalinde ayrıca 4 adet heliks-saçtokası-heliks motifi ve bir tane çinko parmak ile BRCT domainine sahiptir. Reaksiyon mekanizması kofaktör farkı haricinde ATP bağımlı ligazlar ile aynıdır (Şekil 1.5) [14,19].

Katalitik domaine ek olarak bulunan yukarı da açıklanan domainler *in vitro* ligasyon aktivitesi göstermezken *in vivo* hücreli ligasyon reaksiyonlarında rol oynadıkları düşünülmektedir. Örneğin; Rossi ve arkadaşları, T4 DNA ligaz katalitik domainin N terminalinde yer alan 80 aminoasitlik domaini sildiklerinde, rekombinant katalitik domaini içeren proteinde işlev kaybının olmadığını bildirmişlerdir. Fakat katalitik domain C terminalde yer alan korunmuş V-VI motifler ile sadece VI. motifin silinmesi durumunda enzimin işlevsel olarak inaktif olduğu görülmüştür [16].



Şekil 1.5. DNA Ligaz enzimlerinin şematik yapısı.

Şekil 1.5’de, DNA Ligaz I enzimleri katalitik bölgenin N terminalinde katalitik olmayan domain ve PBM (PCNA bağlanma motifi) dizisi taşır. PCNA bağlanma motifi (PBM) proteinin çekirdekte yerleşim göstermesini sağlar. DNA Ligaz III iki izoform olarak temsil edilmektedir. Her ikisi de katalitik bölgenin N terminalinde çinko parmak motifi taşırken, Ligaz III α , C terminalde Xrcc1 ile etkileşime giren BRCT domaini taşır. DNA ligaz IV, katalitik bölgenin C terminalinde iki adet BRCT domaini ve bu iki domain arasında Xrcc4 bağlanma motifi taşır. NAD bağımlı işlev gösteren bakteriyel ligazlar katalitik bölgesinin C terminalinde çinko parmak motifi, 4 adet heliks-saçtokası-heliks motifi ile BRCT domaini taşır. Ayrıca N terminalde NAD’ın aktif bölgeye bağlanması için katalitik bölge üzerine katlanarak yardımcı görev üstlenen ve bakteri ligazları için

karakteristik olan Motif Ia mevcuttur. Virüs DNA ligazları ile ATP bağımlı Bakteri Ligazları sadece Nükleotidil transferaz ve Oligonükleotid bağlanma domainini taşıyan “Katalitik bölge”den oluşur.

1.1.2. Biyoteknolojik açıdan ligaz enzimleri

DNA ligazlar, temelde moleküler klonlama çalışmalarında yeni nükleik asit moleküllerinin oluşturularak vektörler ile birleştirilmesinde kullanılır. Ayrıca ligaz enzimleri; cDNA'nın ikinci zincirinin sentezinde oluşan çentiklerin tamiri, DNA'nın bilinen dizilerinin dışındaki dizilerin çoğaltılması (ters-invers-PZR), DNA üzerindeki çentik varlığının AMP salınması ile tespit edilmesi ve ligaz zincir reaksiyonu ile DNA üzerindeki nokta mutasyonlarının keşfedilmesi gibi değişik amaçlar doğrultusunda kullanılır [21].

1.2. Model organizma ve Biyolojik Kaynak *Tetrahymena thermophila*

Tatlı sularda yaşayan tek hücreli model organizma olan *Tetrahymena thermophila*; *Paramecium sp.*, *Oxytricha sp.* ve *Ichthyophthirius sp.* ile birlikte Ciliophora filumunu oluşturur. Ülkemiz tatlı sularında varlığı literatürce bilinmemektedir. Ciliophora'nın dahil olduğu Alveolata'nın diğer üyeleri Dinoflogellatlar ve parazitik Apicomplexa'dır. Hızlı ve yüksek yoğunlukta kolayca üretilen bu organizma, genom projesinin tamamlanması sonucu makronükleer genom dizisinin öğrenilmesi ve *Plasmodium sp.* gibi parazitik gruplar ile yakın akraba olması nedeni ile moleküler genetik çalışmalarında bir model organizma olarak hedeflenmiş ve sayısız araştırma için kaynak oluşturmuştur [22]. İlk kez populasyonda bulunan *Tetrahymena* hücreleri arasında biyolojik eşitlemenin (sinkronizasyon) deneysel olarak sağlanması ile hücre döngüsünü aydınlatıcı bilgiler, RNA'nın katalitik işlevinin aydınlatılması, telomerlerin ve histon asetilasyonunun keşfi gibi önemli biyolojik bilgilere ulaşılmıştır [23]. Parazitik *Plasmodium falciparum*'un Circumsporozoite proteini olan yüzey antijenlerinin bu organizmada üretilebilmesi [24], onun aşı geliştirme çalışmalarında araç olma potansiyelini geliştirirken; insan DNase I enziminin

translasyon sonrası modifikasyonlarının bu organizma tarafından yapılabildiği gösterilmesiyle [23] ökaryotik protein üretim konakçı adayı olduğu önerilmiştir.

T. thermophila mikroçekirdek ile makroçekirdeğin hücre döngüleri ile Tetrahymena'ya özgü morfolojik hücre reorganizasyonları arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Posterior oral primodium gelişmeye başlarken mikroçekirdek bölünmeye başlar ve bölünmesini ise sitokinezden hemen önce bitirir. Kromozom gruplarının mitotik kutuplara ayrılması sitokinez esnasında fizyon zonu ile hücresel bölünmenin zamanına rastgelir. Mikroçekirdek S fazı mikroçekirdek bölünmesinin tamamlanmasından hemen sonra başlar ve hücre bölünmesinden kısa bir süre sonra sona erer. Makroçekirdek bölünmesi; mikroçekirdek bölünmesi sonlanırken başlar ve sitokinezin ortasında sonlanır. Makroçekirdeğin S fazı; kabaca hücre döngüsünün ortasına tekabül eder ve yaklaşık 1 saat süre alır. Uygun sıklıkta ısı şokları Tetrahymena hücre popülasyonundaki bireylerin hücre döngülerinin eşzamana (sinkronizasyon) getirmede yardımcı olur [25]. ATP bağımlı DNA ligazlar hücresel DNA replikasyonu esnasında ve vejetatif hayat boyunca özellikle hücre döngüsünün S fazında DNA replikasyon ve tamirine katılmaktadırlar [15].

Yedi eşey tipi bulunan *Tetrahymena thermophila* diğer tüm Siliyatlar gibi iki çekirdek taşır: makroçekirdek (MAK) ve mikroçekirdek (MİK). Mikroçekirdek, transkripsiyonel olarak inaktif olan diploit 5 çift kromozom taşır. Genetik bilginin saklanması ve konjugasyon esnasında yeni nesillere aktarılmasından sorumludur. Bu canlının hayat döngüsünün en önemli evresi olan eşeyssel üreme (konjugasyon) basitçe mayoz, gametlerin gelişimi, fertilizasyon ve makroçekirdek (MAK) gelişimi adımlarından oluşur (Şekil 1.6). Konjugasyon ile mikroçekirdekten farklılaşan makroçekirdeğin gelişimi dört evrede gerçekleşir, böylece haploid 5 kromozomdan oluşan ve transkripsiyonel olarak suskun olan mikronükleustan, transkripsiyonel olarak aktif 225 kromozomdan oluşan makronükleus üretilir (Şekil 1.7.) [22]:

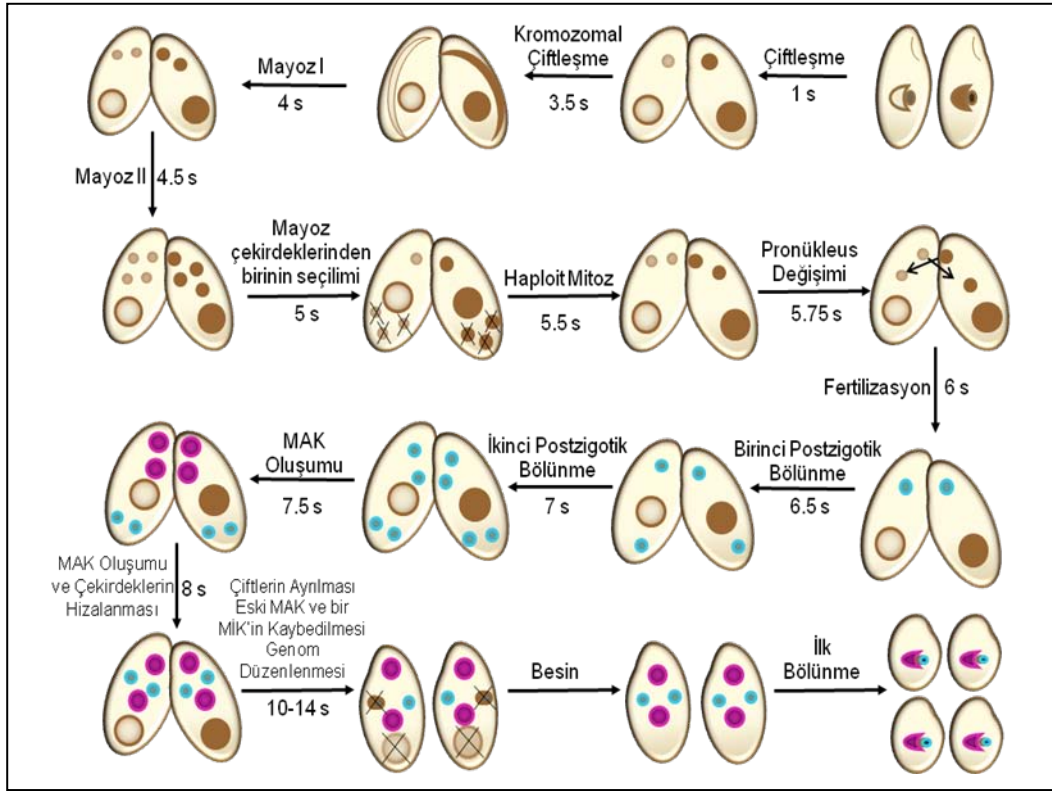
1. *Tekrar elementlerinin uzaklaştırılması:* Haploid MİK kromozomlarında bulunan AT'ce zengin yaklaşık 6000 “**Ç**ıkarılan **İ**çsel **D**iziler” (ÇİD veya IES: internally eliminated sequence) endonükleazlar ile kesildikten sonra DNA ligaz enzimleri DNA uçlarını tekrar

birleştirerek MAK yapılanmasını sağlar. Tekrar dizilerinin (sentromerler, transpozonlar ve diğer ökaryotik tekrar dizileri) % 90- 100'ünün silinmesi ile MİK genomunun % 15'i elenmiş olur. Bu basamakta görev yapan DNA ligaz enziminin hangi ligaz geni olduğu henüz bilinmemektedir.

2. *Kromozom parçalanması*: MİK kromozomlarının 200 noktasında bulunan 15 bç'lik "**K**romozom **K**ırılma **D**izilerinden (KKD veya Cbs: chromosome breakage sequence)" sadece (ligaz ile birleştirme olmaksızın) kesilmesiyle oluşan 20,000 ila 1,500,000 bç'den oluşan 225 minikromozom (180-250 kromozom arasında değişebilir) parçalarının uçlarına kırma-kompleksiyle birlikte hareket ettiği düşünölen telomeraz enzimiyle telomer dizileri eklenir ve sentromersiz **MAK** minikromozomların oluşumunu tamamlanır. Vejetatif yaşam boyunca minikromozomlar, hücre bölünmesinde kromozom yapılanmasına (kondenzasyona) girmezler.

3. *Endoreplikasyon*: Nökleus genomunun mitoz gerçekteşmeden DNA replikasyonu ile ploid genom katlarında artışına endoreplikasyon denir. MAK gelişimi esnasında diploid olan MİK genomu *Tekrar elementlerinin uzaklaştırılması* ve *Kromozom parçalanması* gerçekteştikten sonra 45 ploidide (poliploidide) endoreplikasyon ile ulaşır.

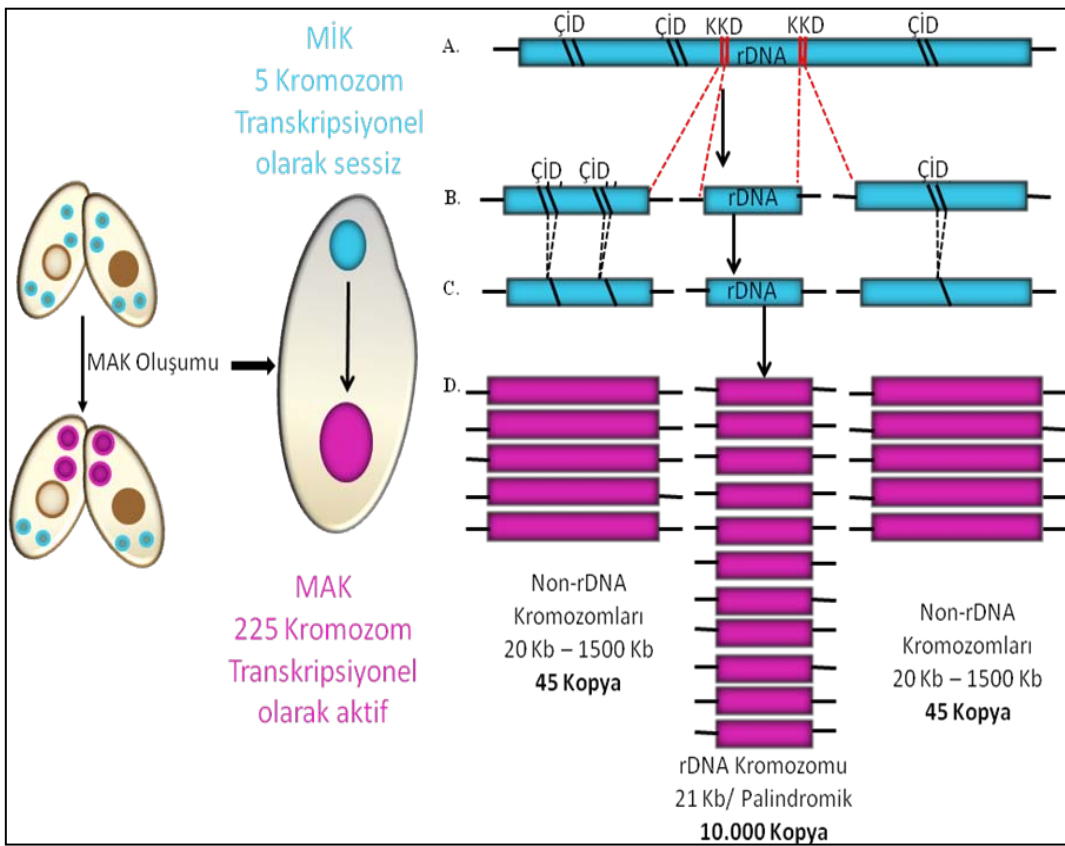
4. *Seçici artış*: Diploid MİK genomunda ökaryotik organizmalardan farklı olarak ribozomal RNA genlerinin bulunduğu lokus tek kopya olarak bulunur. MAK gelişim (1. ve 2. aşamalar) evresinde "*seçici*" bir mekanizma ile 21,000 bç'lik bir palandromik (lokus kopyasının aynısını ters yönde yapıştırılmış) minikromozom yapısı oluşturulur. Bu 2 kopya rRNA lokusunun ortasında ise 2 adet DNA replikasyon orijini yer alır. rDNA minikromozomun sahip olduğu orijinlere dayanan DNA replikasyon seçici mekanizması devreye girerek bu minikromozom kopyası her bir haploid MAK genom içinde 10,000 kopyaya çıkartılır [22].



Şekil 1.6. Konjugasyon durumundaki *Tetrahymena* hücrelerindeki nükleer gelişim evreleri.

Şekil 1.6’da, farklı eşey tipindeki hücreler açlık durumunda bir araya getirilir. Şekildeki hücrelerin farklı homozigot aleller taşıdıkları görülmekte. Aynı açlık ortamında bulunan farklı tipteki hücreler ortalama bir saat içinde çiftleşmeye başlar. Konjugasyonun 4. saatine gelindiğinde mayoz I tamamlanmış olur. Mayoz II’nin tamamlanmasıyla 4 haploit nükleus oluşur, bir nükleus hücre anterioruna ilerleyerek mayoz nükleusunu oluştururken, diğer üçü posteriora kalır ve parçalanır. Bu evre crossing-over’in gerçekleştiği evredir. Mikronükleusun mitoz geçirmesi ile identik iki mikronükleus oluşur, oluşan iki çekirdekten posterioradaki göç eder, diğeri gamet pronükleusu olarak kalır. Konjugasyonun 6. saatinde göç edecek olan nükleusların karşılıklı olarak değiştirilmesi ve yeni nükleusun eskisiyle birleşmesi ile zigotun oluşturulması sonucu fertilizasyon adımı tamamlanmış olur. Zigot nükleusun iki mitoz geçirmesiyle 4 identik diploit çekirdek oluşur. Anterior çekirdekler makronükleusa farklılaşırken posteriordakiler diploit mikronükleus olarak kalır.

Bu basamakta DNA düzenlenmeleri ve MAC'a bağlı eşey tipi belirlenmesi gerçekleşir ve bu süreç konjugasyonun 7.5 saatinden başlayarak 6-7 saat devam eder. Konjugasyonun 14. saatinde ekzokonjugantlar ayrılır, eski makronükleus ve mikronükleuslardan biri parçalanır. Ekzokonjugantların ilk hücre bölünmesi ile 4 karyonid hücre oluşturur. Bağımsız olarak farklılaşmış yeni makronükleus ve fonksiyonel mikronükleusun mitotik kopyasını taşıyan her bir karyonid, ikiye bölünerek vejetatif olarak çoğalır [22, 26].



Şekil 1.7. Konjugasyon esnasında MAK gelişiminin aşamaları:

Makronuleus bu aşamaları tamamladıktan sonra yeni nesil olarak isimlendirilecek bireyin fenotipini yeniden organize olmuş genom olarak transkripsiyonel seviyede aktif kontrole başlar.

1.2.1. Makronükleer Genom Projesi bulguları ve *Tetrahymena thermophila* ligazları

Tetrahymena thermophila makronükleus genom projesi ile SB210 ırkının minikromozomlarının genom dizilemesi 2002 yılında tamamlanmıştır. Projenin tamamlanması ile protein kodlayan gen sayısının 24.725 olduğu ve bu genlerin 15.000'inin diğer canlılar ile güçlü uyum gösterdiği bildirilmiştir. Tetrahymena Genom Veritabanı (TGD) ile Gen bankasına (NCBI) teslim edilen diziler arasında *Tetrahymena* DNA ligazları ile ilgili yapılan biyoinformatik ön araştırma sonucu ulaşılan dizilerden 4'ünün ligaz enzimlerine özel K(x)DG motifini taşıdığı görülmüştür. Bunlardan ikisi ligaz I (TTHERM_00348170 / XM_001022972.2 ve TTHERM_00865240 / XM_001026764.1), biri ligaz IV (TTHERM_00387050 / XM_001019308.1) ve sonuncusu ise tanımlanmayı bekleyen hipotetik protein (TTHERM_00392850 / XM_001011861.1) olarak varlık göstermektedir [27, 28].

1.3. AMAÇ

Bilim ve Teknoloji Yüksek Kurulunun 2001 yılında hazırladığı Vizyon 2023 belgesinin tanımladığı öncelikli temalar arasında yer alan Genetik mühendisliği, Protein Mühendisliği ve Rekombinant protein üretim teknik ve teknolojilerinin ülke çapında yaygınlaştırılarak temel biyoloji bilgisine dayanan Biyoteknolojik ürün geliştirme hedefi doğrultusunda bu tez amacı belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans araştırmasının amacı, tek hücreli silli ökaryotik organizma *T. thermophila*'nın makronükleer genomunun taranarak; biyoteknolojik ürünleşmeye uygun ATP bağımlı DNA ligaz enzimin belirlenmesi ve rekombinant protein olarak üretilmesi, enzimatik karakterizasyonu ile biyolojik mRNA ifade profilinin analizini içermektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar temelde iki gruba ayrılır: biyoinformatik çalışmalar ve deneysel çalışmalar. Biyoinformatik çalışmalar çalışılacak genin belirlenmesi, hizalanması, genin filogenetik ve 3 boyutlu yapı analizlerini kapsar. Deneysel çalışmalar ise genin klonlanması, mutasyonlarının yerleştirilmesi, proteinin üretilerek aktivitesinin test edilmesi ile bu proteinin biyolojik olarak rolünün aydınlatılmasına yönelik mRNA profilinin oluşturulmasını içerir.

2.1. Biyoinformatik Analizler

2.1.1. *Tetrahymena thermophila* DNA Ligazları'nın belirlenmesi

Tetrahymena Genom Veritabanında (TGD) [29] “DNA ligaz” anahtar kelimeleri ile yapılan arama sonucu, 5 adet diziye ulaşılmış ve bu diziler ligaz motifi taşıma durumlarına bakılarak sonraki analizlerde kullanılmıştır. Buna göre, BLAST [30] analizi ile DNA Ligaz I sınıfına girdiği teyit edilen TtLig1 ve TtLig2; Ligaz IV sınıfına girdiği belirlenen TtLig4 ve virüs ve prokaryotlara yakınlık gösteren TtBtLig olmak üzere 4 ligaz genine ulaşılmış ve verilen bu geçici isimleri ile adlandırılmışlardır.

2.1.2. Filogenetik Ağacın Yapılandırılması

PSI-BLAST [31] programında bulucu dizi olarak *Tetrahymena* DNA ligazları arasında en küçük ve intronsuz olan TtBtLig genine ait protein dizisi kullanılmış ve işlem üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Benzer üyelerin büyük yoğunluğunu bakteri ligazları oluşturduğu için Ligaz I üyelerinin oluşturulması amacıyla ön araştırmalar sonucu DNA Ligaz I ailesine yakınlık gösterdiği tespit edilen TtLig1 dizisi bulucu olarak kullanılmıştır. NAD bağımlı ligaz üyelerinin bulunması amacıyla *Pseudomonas mendocina* NAD bağımlı DNA Ligaz genine ait proteini dizisi bulucu olarak kullanılmıştır. Ligaz III'ün sadece omurgalılarda

bulunması sebebiyle bulucu olarak insan DNA Ligaz III enzimi tercih edilmiştir. Seçilen üyeler ile ClustalW2 [32] programı aracılığıyla hizalama çalışması gerçekleştirilmiştir. Hizalama sonucu elde edilen bilgi GBLOCKS [33] programında yüksek, orta ve düşük seçicilikte (katılıkta) temizlendiğinde kalan karakterler, güvenilirliği düşük bir ağaç oluşturacak kadar az sayıda olduğundan hizalama verilerinin temizlenmesi Jalview kullanılarak göz ile taranarak gerçekleştirilmiştir. Temizlenen diziler MEGA4 [34, 35] programında açılarak Neighbour Joining (Komşuların birleştirilmesi) metodu ile köklü ve köksüz ağaç yapılandırılması gerçekleştirilmiştir.

2.1.3. Benzerlik Matrisinin Oluşturulması

Yapılandırılan filogenetik ağacın sayısal ifadesi olabilecek bu analizde seçilen üyelerin sadece birinci ve altıncı motiflerinin arasındaki diziler PepTool programı ile hizalanmış ve daha sonra benzerlik matrisi oluşturulmuştur.

2.1.4. 3 Boyutlu Modellemenin Gerçekleştirilmesi

Yapılan biyoinformatik araştırmalar sonucu aranan kriterlere uygunluk gösteren dizinin N terminal bölgesi tanımlanmış ve kristallendirilmiş hiçbir protein yapısı ile benzerlik göstermediğinden, sadece katalitik bölgesi (EK -12) Espasy veritabanındaki SWISS-MODEL Repository [36, 37] programına gönderilerek, veri tabanında bulunan ve deneysel olarak oluşturulmuş 3 boyutlu yapılara ait diziler ile karşılaştırılmış ve en benzer dizinin program tarafından baz alınması ile modelleme gerçekleştirilmiştir. Çalışma sayfasındaki dizi .pdb formatında kaydedilmiş ve Deepview spdbv programında açılarak işlenmiştir.

2.2. Deneysel Analizler

2.2.1. Gene özgün primerler kullanılarak TtBtlig geninin protein kodlayan cDNA bölgesinin klonlanması

Tetrahymena thermophila TtBtLig geni (XM_001011861.1) cDNA bilgisi NCBI veritabanından elde edilmiş. Protein kodlayıcı bölgenin tümünü kapsayacak şekilde dış primer bölgeleri seçilmiş ve ileri primerlerin 5' uçlarına NdeI (gri gölgeli dizi) ve geri primerde XhoI (gri gölgeli dizi) enzimleri için tanıma dizileri pET16b protein ifade vektörüne klonlamada kolaylık sağlaması amacıyla eklenmiştir. Primer dizileri aşağıdaki gibidir:

```
FBtBütpETNdeI 5' gcgcatatgatgatcaaaattgatttaacaaaacct 3'  
RBtpETXhoI    5' gcgctcgaggggccctcattcgtcttctttattctcaa 3'
```

BtLig'in cDNA kopyası, 30°C'de büyütülmüş *T. thermophila* SB210 hücrelerinden RNeasy Mini Kit (Qiagene) ile elde edilen toplam RNA, RQ1 DNase (Promega) muamelesi [38] ve RNA temizleme işlemlerinden geçtikten sonra Geri-transkripsiyon reaksiyonuna dT₁₈ primeri ve M-MLV Geri-transkriptaz ile 42°C'de alınmış [39] ve cDNA PZR ile elde edilmiştir (EK 1). Kalıp olarak bu elde edilen cDNA topluluğu kullanılarak, FTtBtlig-SacI ve RTtBtlig-PstI primerleri ve PrimeStar (Takara) enzimi kullanılarak, 1668 bp'lik cDNA ürünü 58°C bağlanma sıcaklığında elde edilmiştir. pGEMT-Easy vektörüne TA klonlaması için jelden saflaştırılmış ürün uçlarına Taq Polymerase (Fermentas) enzimi kullanılarak -A eklenmiştir. PZR -A ekleme reaksiyonu direk olarak pGEMT-E plazmiti ile ligasyon reaksiyonuna alınmıştır. Ligasyon ürünleri elektrotransformasyon ortamında tuz bulunmaması gerektiğinden PZR saflaştırma kiti (Qiagene) ile saflaştırılmış, yoğunlaştırılmış ve 5 µl distile suda çözülmüştür. Bu çözeltinin 1:5 dilüsyonununun 2 µl'si ile *E. coli* XL-1 Blue suşuna BIORAD elektroporasyon aleti ile elektrotransformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon tabağındaki beyaz koloniler ile hazırlanan master tabağında beyazlığı devam eden 6 koloni ile koloni ön PZR taraması alınmış, ürün veren PZR reaksiyonunda kullanılan koloniden plazmit izolasyonuna alınmış ve

pGEMTAEasy vektörü üstünde yer alan NotI enzimi ile kesilerek, agaroz jel elektroforezi ile pozitif klonlar tayin edilmiştir. Klonların DNA dizi analizi; Beckman Coulter GenomeLab DTCS Quick Start Kit kitinin önerdiği şartlarda, pGEM-T Easy plazmitine uygun olarak dizi analizi çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanmış ileri primer (F-DizianalizipGemcgacgtcgcgatgctcccggcc) ile reaksiyon kurulmuş ve Becman CEQ8000 dizi analizi cihazı ile okumalar gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonucunda elde edilen dizi içinde yer alabilecek yapay vektör ve primer dizileri NCBI veri tabanındaki VecScreen programı ile belirlenmiş ve uzaklaştırılmıştır. Temizlenen DNA klon dizisi BlastX programı ve GeneTool hizalama programları kullanılarak ön analizler gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. BtLig mRNA'sının 5' ve 3' translasyona girmeyen dizilerinin klonlanması ve dizi analizi

Elde edilen geri-transkripsiyon cDNA havuzu 1/10 oranında seyreltikten sonra 3' RACE-PZR'de 2 µl'si 50 µl reaksiyon hacminde kaynak olarak kullanılmıştır. Fermentas Taq DNA polimeraz enziminin kullanıldığı reaksiyonda geri primer olarak mRNA'nın polyA kuyruğuna uygun şekilde tasarlanmış dT₁₈ primeri ile gene özgün ileri primer olarak FBt19 primeri FBt19 5' agagaacaacttgaatcagagc 3' (T_A 55°C) kullanılmıştır. Burada üretilen ürün sonraki reaksiyon için kalıp olarak kullanılarak genin 3' ucuna daha yakın ileri primer olan FBt20 5' gatgaccaaagaagaaggccacc 3' (T_A 55°C) ile aşamalı (nested) PZR ve ürünün güçlendirilmesi için aynı primer ile tekrar-PZR kurulmuştur. Translasyona girmeyen mRNA bölgesinin (TGB=UTR: untranslated mRNA region) yaklaşık olarak 150 bç uzunluğunda olduğu tahmin edildiğinden tekrar-PZR sonucu beklenen ürün büyüklüğü primere kadar olan bölgeyle birlikte 270 bç civarı olarak hesaplanmıştır. Reaksiyonlar sonucu elde edilen ürünler yukarıdaki anlatılan klonlama aşamalarından geçirilerek pGEMT Easy vektörü kanalıyla *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine aktarılmıştır. EcoRI enzimi ile kesim reaksiyonları kurularak beklenen büyüklüğe sahip hedef cDNA parçası

içeren plazmitler (10 adet) tayin edilmiş ve yukarıdaki gibi 2 klon DNA dizi ve ön-biyoinformatik analizlere alınmıştır.

2.2.3. Protein kodlayıcı BtLig cDNA dizisinin *E.coli* kodon sözlüğüne çoklu nokta mutasyon PZR yöntemiyle uyumu

Tetrahymena genlerinin *E. coli*'de protein ifadesi *Tetrahymena*'da glutamin kodlayan DUR TAA ve TAG kodonlarının *E.coli*'de glutamin kodlayan CAA ve CAG kodonlarına nokta mutasyonu ile çevrilmesiyle mümkündür [40-42]. Primerle mutasyon yerleştirme ve uçlarında örtüşen bu mutasyon taşıyan DNA parçalarının PZR ile birleştirilerek çoklu mutasyon yerleştirme yöntemi özellikle bu tür kodon uyumu ihtiyacı duyulan organizma genlerinde yaygın kullanılmaktadır [21, 43-45]. *Tetrahymena* BtLig geni (NCBI ulaşım numarası XM_001011861) cDNA'sının GeneTool programı ile transkripsiyon analizi sonucunda, mutasyon gerektiren 22 kodon taşıdığı belirlenmiş; gerekli nokta mutasyonlar için 20 adet nokta mutasyonu primeri ile iki dış primer tasarlanmıştır. Üretilen genin daha sonra pET16b protein ifade vektörüne klonlanması planlandığı için BtLig ve klonlama vektörü içinde tanıma/kesme bölgesi bulunmayan fakat pET16b çoklu klonlama bölgesi enzimlerinden NdeI (ileri primerde) ve XhoI (geri primerde) enzimlerinin tanıma dizileri dış primerlerin 5' uçlarına eklenmiştir. Mutasyonların hangi PZR stratejisi ile uygulandığı ve primer listesi Ek-7,8 ve 10'da verilmiştir.

Üretilen DNA Ligaz enziminin aktivite gösterebilecek en küçük parçasının belirlenebilmesi amacıyla Rossi ve ark. larının [16] T4 DNA Ligaz ile yaptıkları çalışmadan yola çıkılarak BtLigaz'ın katalitik domaini ve tüm motiflerini taşıyan parçasının üretilmesine karar verilmiş ve bu dizinin 5' ucu olarak FBt14 primerinin karşılık geldiği bölge belirlenmiştir. Diğer dış ileri primer gibi bu primere de pET16b vektörüne klonlama için gerekli NdeI enzimi tanıma dizisi eklenmiştir. Bu diziyeye çalışma süresince BtLig Katalitik Bölge (BtLig KB) ismi verilmiştir. BtLig geninin oluşturulan formlarının rekombinant olarak ifadesi sonucu 33 kD büyüklüğünde pBtLig Katalitik Bölge (pBtLig KB) proteini ile 63 kD büyüklüğünde pBtLig proteininin elde edileceği tahmin

edilmektedir. Üretilen bu proteinler aktivite deneylerinde test edildiğinde, kurulacak olan kontrollü deneylerde pozitif kontrol olarak Takara T4 DNA Ligaz enziminin kullanılması planlanmışken, “negatif kontrol” ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu ihtiyacı karşılamak üzere, Rossi ve ark.larının [16] T4 DNA Ligaz enzimi ile yaptıkları çalışmadan yola çıkılarak, üretilecek her iki protein formunun aktif merkezindeki Lizin amino asidinin inaktif Lösin amino asidine DNA dizisi üzerinden nokta mutasyon primerleri kullanılarak dönüştürülmesi ile negatif kontrol olarak kullanılabilir inaktif BtLig Katalitik Bölge (İn-BtLig-KB) ve inaktif BtLig (İn-BtLig) dizilerinin üretilmesi planlanmıştır.

PZR çalışmalarında, replikasyon enzimi olarak 5'→3' hata tamir özelliğine sahip ve kalıptan bağımsız –A ekleme yeteneği olmayan Pfu DNA Polimeraz veya PrimeStar DNA Polimeraz (BioBasic) tercih edilmiştir. Elde edilen ürünlerin jelden saflaştırılmasında Qiagene QiaQuick Gel Extraction Kiti kullanılmıştır. Üretilen diziler polimerik replikasyon aşaması olmayan –A ekleme reaksiyonuna Taq Pol ile alındıktan sonra pGEM-Easy vektörü aracılığı ile *E. coli* XL-I Blue konakçısına klonlanmış, koloni PZR ile olasılıkla pozitif klonlardan plazmit izole edilmiş, NotI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildiğinde beklenen büyüklükte vektör ve insertü serbest bırakan plazmitler dizi analizi reaksiyonuna alınmıştır.

BtLig genine mutasyon yerleştirilerek aktif ve inaktif parçaların üretilme çalışmasında, N terminal ve C terminal domainleri (BtLig KB) mutant olarak ayrı parçalar halinde üretilmiş, pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış ve mutasyonların yerleşimi dizi analiziyle teyit edildikten sonra bu iki parçanın da birleştirilmesiyle mutasyon taşıyan bütün dizi elde edilmiştir. Bütün genin dizi analizi nokta mutasyonu için tasarlanmış olan FBt7 ve RBt8 primerleri ile vektöre uygun tasarlanan FDiziAnalizpGem primeri; BtLig KB'nin dizi analizi reaksiyonunda ise FDiziAnalizpGem primeri kullanılmıştır. İnaktif BtLig'in dizi analizi çalışmasında vektöre uygun F primeri ve İnaktif BtLig KD'nin dizi analizinde FpGEMDiziAnalizi ve RBt19 primerleri tercih edilmiştir.

Reaksiyonlar, 100 fmol DNA ile kurulmuş, okumalar Becman CEQ8000 dizi analizi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen dizilerin sadece doğruluk oranı yüksek olan kısımları kullanılarak VecScreen

programında vektör bilgileri uzaklaştırılmıştır. GeneTool programı ile tersi ve ters komplementeri alınarak diğer formları oluşturulan diziler, gen bankasından elde edilen cDNA bilgisi ile EBI ClustalW2 programında hizalanmıştır.

2.2.4. rBtLig gen versiyonlarının pET16b protein ifade vektörüne klonlanması

T7 promotörü taşıyan pET16b ifade vektörü ve mutasyonların yerleşimi dizi analizi ile teyit edilmiş olan BtLig DNA parçaları, ilk önce NdeI-XhoI restriksiyon enzimleri ile kesilerek pGEMT-Easy vektöründen alınmış, agaroz jele yüklenmiş ve jelden saflaştırılmıştır. Aynı şekilde NdeI- XhoI ile kesilmiş ve saflaştırılmış pET16b vektörünün BtLig ve İn-BtLig insertleri ile ligasyonu 2:1 (insert:vektör) oranında, BtLig-KD ve İn-BtLig-KD insertleri ile ligasyonu ise 3:1(insert:vektör) oranında Takara T4 DNA ligaz ile PZR cihazında 16°C'de 3-4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. T4 DNA ligaz 65°C'de 10 dk. inaktive edildikten sonra ligasyon ürünlerinin 8'er µl'si 200 µl'lik *E. coli* XL-1 Blue kimyasal kompetent hücrelerine sıcaklık şoku ile transfer edilmiştir. Transformasyon hücrelerinden hazırlanan master tabaklardaki koloniler, koloni PZR ile taranmış, olasılıkla pozitif klonlardan plazmit izole edilmiş ve plazmitlerin kontrolü BamHI-NdeI ikili kesim reaksiyonu ile sağlanmıştır. Kesim sonucu pozitif ürün veren plazmitlerin 0.5'er µl'si 200 µl'lik *E. coli* BL-21 DE3 pLySs konakçısına sıcaklık şoku ile transforme edilmiş ve kloramfenikol (50 µg/ml) ve amfisilin tabağına (100 µg/ml.) ekilmişlerdir. Transformasyon hücrelerinden hazırlanan master tabaktaki hücreler koloni PZR ile taranmış ve pozitif klonlar sıvı SOC (%1 glukozca zengin) besiyeri içinde 50 µg/ml kloramfenikol ile 100 µg/ml amfisilin baskısında büyütülerek klasik metod ile plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş, izole edilen plazmitler restriksiyon kesim reaksiyonu ve dizi analizi reaksiyonlarında kullanılmıştır.

2.2.5. Rekombinant BtLig enzimlerinin üretilmesi ve saflaştırılması

Klonlar 10 ml'lik 50 µg/ml kloramfenikol ve 100 µg/ml amfisilin içeren SOC (%1 glukozca zengin) besiyerine inoküle edilerek gece boyu 37°C'de 130 rpm'de çalkalamalı olarak büyütülür. Gece boyunca büyütülmüş kültürün 500 µl'si 10 ml taze SOC besiyeri içine aktarılır ve 50 µg/ml Kloramfenikol ve 100 µg/ml amfisilin baskısı altında 1-2 saat süreyle büyütülerek yoğunluğunun OD₆₀₀'de 0.5'e ulaşması sağlanır. Beklenen yoğunluğa ulaşan hücrelerin 1 – 2 ml'si ile gliserol stoğu hazırlanırken kalan kültür peletlenir ve kloramfenikol içermeyen fakat 100 µg/ml amfisilin içeren (peletlemeye alınan hacimde) LB besiyerinde çözülür ve finalde 0.1 mg/ml IPTG ile finalde 0.1 µg/ml olacak şekilde 3 saat süre ile 37°C'de 130 rpm'de çalkalanarak rekombinant protein üretimi indüklenir. Sıfır zamanı da dâhil olmak üzere her saat 1.5 ml örnek peletlenerek saflaştırma aşamasına kadar buzda bekletilir. Protein saflaştırması denatüre veya doğal halde protein ihtiyacına göre iki farklı protokol ile gerçekleştirilir. Proteinlerin denatüre durumda saflaştırılması QiaExpressionist klavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Denatüre durumdaki proteinler SDS-PAGE ile koşturulmuş ve komassi mavisini ile boyanarak analiz edilmiştir.

2.2.6. *Tetrahymena*'nın konjugasyonu esnasında TtBtLig'in transkripsiyon durumunun RT-PZR ile analizi

DNA yapım-yıkım olaylarının periyodik olarak gerçekleştiği konjugasyon esnasında, BtLig geninin transkripsiyonel değişiminin RT-PZR ile semi-kantitatif olarak belirlenmesi planlanmıştır. Deneyde, bir gece nem çemberinde büyütüldükten sonra 18 saat açığa alınan *T.thermophila* çiftleşme paneli üyesi TipIV ve SB210-VI (Cornell Üniversitesi, Tetrahymena Stok Merkezi) hücreleri bir araya getirildikleri andan itibaren 13 saat süresince her saat 1.5 ml hücre alınmıştır. Bu örneklerden RNeasy Midi Kit (Qiagen,75144) ile RNA izole edilmiş ve Promega RQ1 RNase-Free DNase ile enzimin protokolünde tavsiye edilen şekilde DNase uygulaması gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon kitindeki şartlarda RNA CleanUp çalışması ile temizlenen RNA'ların 2'şer µg'ı RevertAid

First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Fermentas) ile 40 µl hacminde Geri-transkripsiyon reaksiyona alınarak cDNA üretilmiştir. Geri-transkripsiyon ürünlerinin 0.35 µl'si (17.5 ng) RT-PZR çalışmasında kalıp olarak kullanılmıştır. Reaksiyonda Taq Polimeraz enzimi ile katalitik bölgenin üretilmesinde kullanılan dış primerler ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PZR reaksiyonu 95°C'de 30 sn ön denatürasyon ile başlayıp 26 döngü boyunca 94°C'de 40 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn aşamaları ve 5 dk final uzama ile sonlandırılmıştır. Ayrıca 37°C'de büyütülmüş hücrelerden elde edilen RNA'ların Geri-transkripsiyon ürünü ile en az 3 kez tekrarlanmış ve beklenen ürün büyüklüğü 897 bç'dir. Deneylerde pozitif kontrol olarak Tetrahymena thermophila hücre döngüsü esnasında transkripsiyon seviyesi değişmediği bilinen 17S rDNA gen [27] primerlerinin (FTt17S ve RTt17S) kullanıldığı 55°C bağlanma sıcaklığında PZR reaksiyonların da 1700 bç uzunluğunda ürün beklenmiştir. Ürünlerin 15'er µl'si %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 90V'da 45 dk elektroforez ile agaroz jel analizi gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

Tetrahymena Makronükleer Genom projesi bulguları ATP bağımlı DNA ligaz motiflerini taşıyan DNA ligazlar için PSI-BLAST analizi ile tarandığında deney uygulamalarında kullanılmak üzere verilen geçici isimleriyle TtLig1 (gen ulaşım numarası: XM_001026764.1), TtLig2 (XM_001022972.2), BtLig (XM_001011861.1) ve Lig4 (XM_001019308.1) olası ligaz genleri bulunmuştur. *Paramecium* ve *Tetrahymena* genetik isimlendirme kurallarına göre [46] bu ligaz genlerine “**T**tetrahymena **t**hermophila ATP bağımlı DNA **l**igaz” kalıcı adı verilmiştir. Gen adının kısaltması LİG olup bu kısaltmanın sonuna gen numarası eklenmesiyle dört gen TtLIG11 (XM_001026764.1), TtLIG12 (XM_001022972.2), TtLIG13 (XM_001011861.1) ve TtLIG4 (XM_001019308.1) olarak isimlendirilmiştir. Bu gen isimlerinin baş kısmına yerleştirilen “Tt” rumuzu bu literatür tarafından önerilmediği halde tarafımızdan diğer türlerin benzer genlerinin isimleriyle karışıklık oluşmasını engellemek için kullanılması tavsiye ektir. Bu genlerin aminoasit dizileri ise sırası ile TtLig11p, TtLig12p, TtLig13p ve TtLig4p şeklinde italik olmaksızın isimlendirilmiş olup tezin kalan kısmında bu yeni gen kısaltmaları kullanılmıştır.

Tetrahymena DNA ligaz üyeler ile diğer türlerin ligazları ve ticari olarak satılan T4 DNA ligaz arasında yapılan filogenetik analizler ve yüzde benzerlik değerlendirmeleri, T4 DNA ligaza en yakın *Tetrahymena* DNA ligaz üyesinin TtLIG13 olduğunu göstermiştir. Biyoteknolojik ürünleşme hedefi doğrultusunda yapılan tüm araştırma ve analizler TtLIG13 üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

3.1. Biyoinformatik Bulgular

3.1.1. Filogenetik Ağacın Yapılandırılması

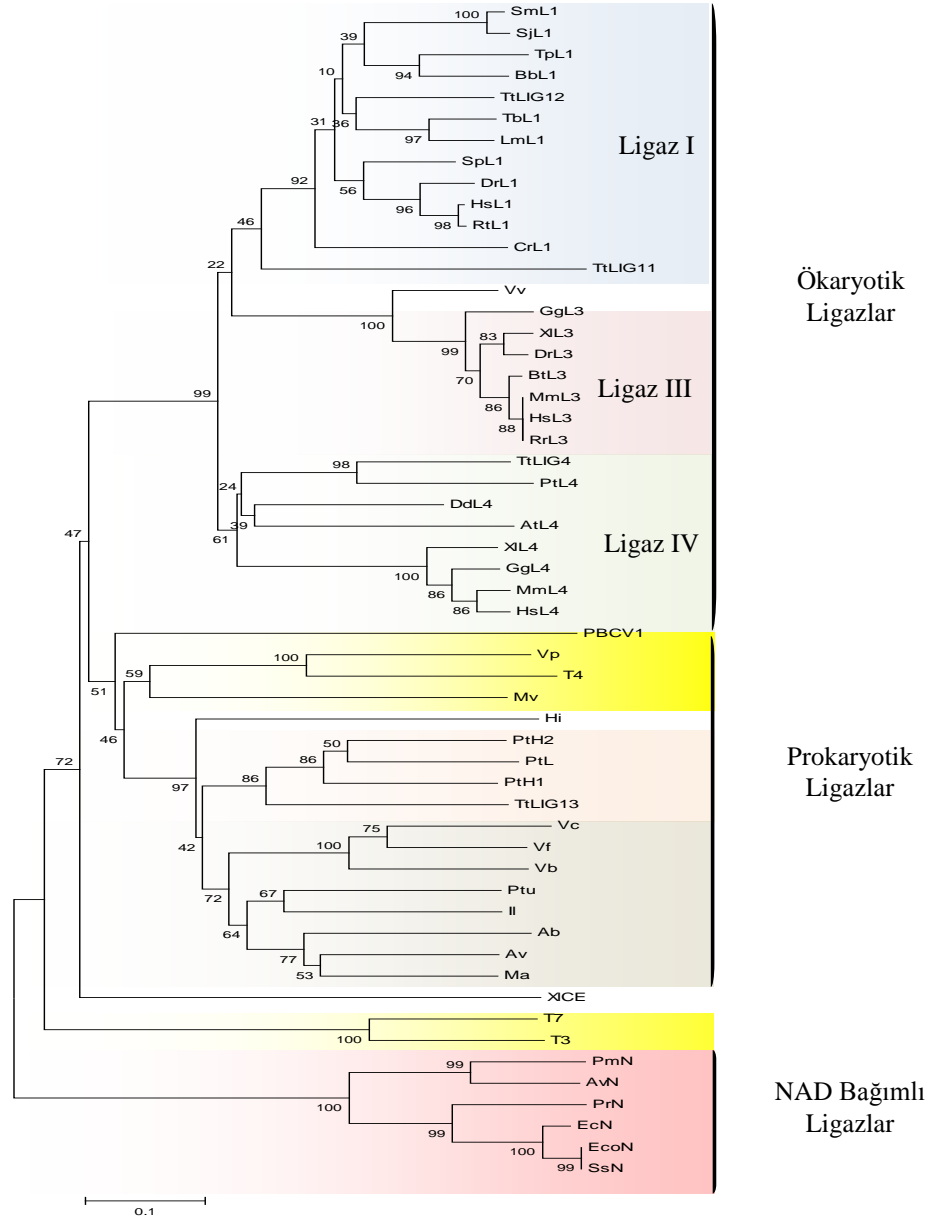
Ağaçta yer alacak üyelerin belirlenmesi, hizalanması ve motif analizi yardımı ile homolog olmayan üyelerin temizlenmesi “Materyal ve Yöntem” bölümünde bahsedildiği şekilde gerçekleştirilerek filogenetik çalışma popülasyonu oluşturulmuştur. Bu popülasyon üyelerinin CLUSTALW2 ile hizalanmasından sonra filogenetik olarak anlam taşımayan karakter blokları (boşluk bulunduran, hizalama problemi olan, korunmamış) JalView programında göz yardımıyla temizlenmiş ve MEGA4 programında “komşuların birleştirilmesi” yöntemi ile 1000 tekrarlı SEÇ-BAĞLA istatistik analizi yapılarak köklü veya köksüz filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 3.1 ve 3.2). Şekil 3.1 incelendiğinde, NAD bağımlı DNA ligazların ağaçta “en dış grup” olarak davrandığı, en yakın dış grubun ise T3 ve T7 virüs DNA ligazları ile mRNA şapka enzimi (% 72 seç-bağla desteği) olduğu görülmektedir. Ağacın kalan kısmı oldukça düşük olan % 47 seç-bağla desteği ile iki ana dala ayrılmaktadır: Ökaryotik DNA ligazlar ve prokaryotik DNA ligazlar.

Prokaryotik DNA ligazlar; bakteri ligazları, virüs ligazları ve “prokaryotlara yakınlık gösteren ökaryotik ligazlar”dan oluşmaktadır. Bu üç grubun kendi üyeleri arasında oluşturduğu topolojik ilişki yüksek seç-bağla değerleri ile desteklenirken bu üç grubun birleşme noktalarında düşük seç-bağla değerleri bulunduğu görülmektedir. Prokaryotik DNA ligaz dalının en dış üyesi % 51’lik seç-bağla değeri ile *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 (PBCV-1) hipotetik DNA Ligazıdır. Bu dış üye Marseillevirüs (Mv), Vibrio phage (Vp) ve T4 DNA Ligaz’dan oluşan virüs ligazları, Paramecium-Tetrahymena ligazlarından oluşan ökaryotik orijinli ligazlar ile bakteri ligaz gruplarına dallanmaktadır. Bakteri ligazları mRNA Şapka enzimi ile T3 ve T7 atasal virüs ligazlarından evrimleşmiş olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasının konusunu teşkil eden *Tetrahymena thermophila* DNA ligazlarından TtLig13p ökaryotik bir organizmada bulunmasına rağmen prokaryotik ve virüs gruplarına yakın filogenetik ilişki göstermesinin yanında silli tek hücreliler sınıfı üyesi

Paramecium tetraurelia'ya ait ikisi hipotetik olan üç adet DNA Ligaz ile özgün bir filogenetik ilişki göstermektedir. *Tetrahymena* ve *Paramecium*'da bulunan bu grup ATP bağımlı DNA ligaz enzimlerine yapılan BLAST veya literatür araştırmalarında rastlanmamıştır.

Ökaryotik ligaz ana dalı; % 99'luk bir seç-bağla değeri ile Ligaz I-III ve Ligaz IV gruplarına ayrılmaktadır. *Tetrahymena* DNA ligazlarından TtLig11p ve TtLig12p, DNA Ligaz I grubunda; TtLig4 ise DNA ligaz IV grubunda yer almaktadırlar. *Tetrahymena* DNA ligaz III grup üyesi bir DNA ligaz bulundurmamaktadır. Ökaryotik DNA Ligaz gruplarının oluşturduğu dalların uç noktalarına yaklaştıkça yüksek seç-bağla değerleri görülmekteyken bu dallarının ana ayrılma noktalarında düşük seç bağla değerlerine de rastlanılmaktadır.

Kovalent nükleotidil transferaz enzim ailesi üyeleri ile gerçekleştirilen köklü ağaç (Şekil 3.1) yapısı köksüz olarak yapılandırıldığında Şekil 3.2'de görülen bulgu elde edilmiştir. Bu ağaç yapısı; dış grup olan mRNA şapka enzimlerinden 1) ökaryotik DNA ligazlar, 2) prokaryotik DNA ligazlar ve 3) NAD bağımlı DNA ligazlar olmak üzere üç ana grup enzimin dallandığını daha net anlatmaktadır. Kökten bu 3 ana grup evrimleşmeden önce T3-T7 ile PBCV-1, Marseillevirus, Vibrio phage ve T4 virüs DNA Ligazlarının evrildiği görülmektedir. Prokaryotik ligazların oluşturduğu ana dalın kök olarak evrildiği virüs grubu ise PBCV-1 ile Marseillevirus, Vibrio phage ve T4 DNA Ligazıdır. Ökaryotik *Tetrahymena* ve *Paramecium* ATP bağımlı DNA ligaz enzimleri bu atasal virüs grubu ile prokaryotik DNA ligaz enzim dalı arasında yer almaktadır. Bu topoloji ise TtLIG13'ün viral ve prokaryotik kökenli bir evrimselleşme geçirdiği hipotezini ortaya koymaktadır.

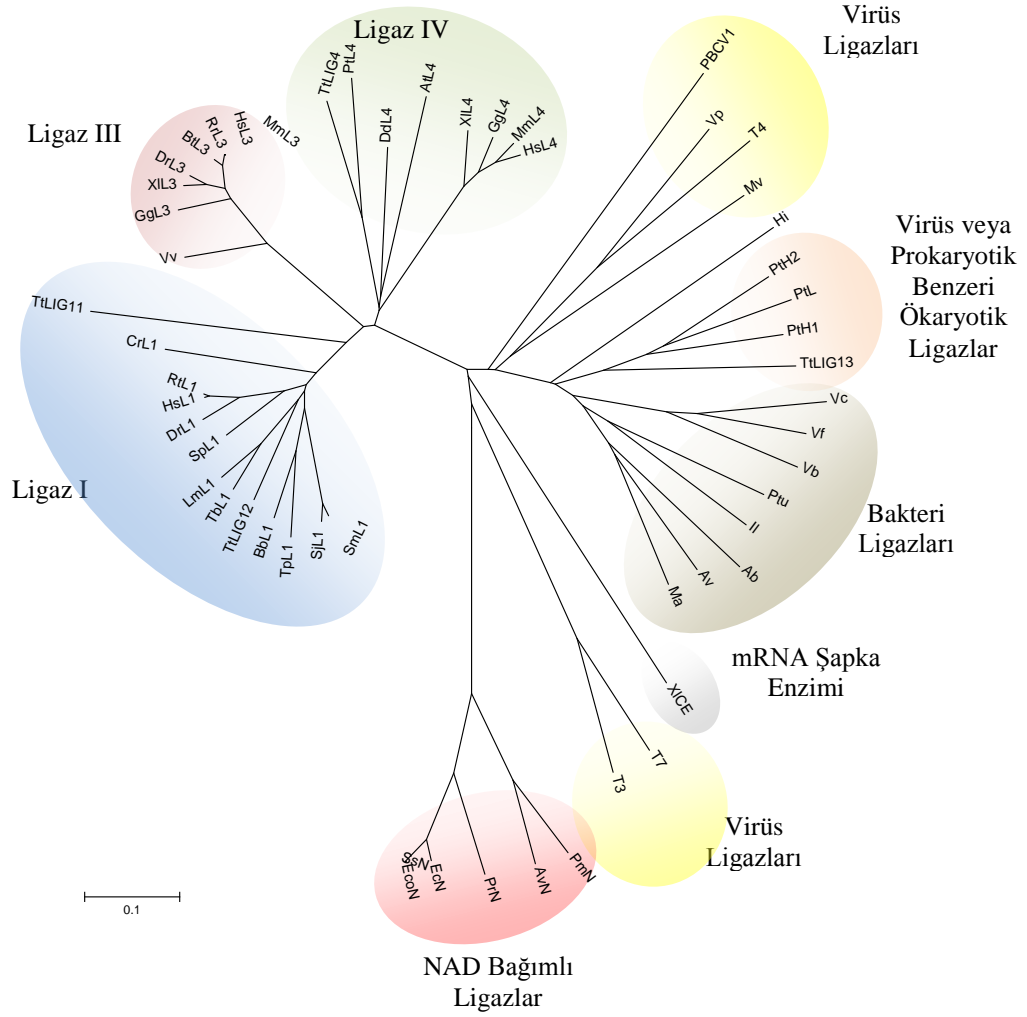


Şekil 3.1. *Tetrahymena*'da bulunan DNA ligaz enzimlerinin kovalent nükleotidil transferaz enzim aile üyeleri ile filogenetik köklü ağaç ilişki yapısı.

Şekil 3.1'de Üyelerin evrimsel ilişkileri komşuların birleştirilmesi [47] metodu ile 1000 tekrarlı seç bağla analizi olarak gerçekleştirilmiştir [48]. Kötu hizalama ve boşluk içeren tüm blok karakterler silinmiş ve 55 üyeye ait kalan 91 karakterin MEGA4'te kullanılması ile köklü filogenetik ağaç yapılandırılmıştır [34]. Ağaçta yer alan üyelerin, ağaçta kullanılan kod isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları şöyledir: **TtLIG11**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı

DNA ligaz I (XP_001026764.1); **TtLIG12**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001022972.1); **TtLIG4**, *T. thermophila* DNA ligaz IV (XP_001019308.1); **TtLIG13**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz domaini taşıyan protein (XP_001011861.1); **PtH1**, *Paramecium tetraurelia* strain d4-2 hipotetik protein (XP_001460273.1); **PtH2**, *P. tetraurelia* strain d4-2, hipotetik protein (XP_001431968.1); **PtL**, *P. tetraurelia* strain d4-2 DNA ligase (XP_001347270.1); **LmL1**, *Leishmania major* DNA ligaz I (XP_001684953.1); **TbL1**, *Trypanosoma brucei* DNA ligase I (XP_845595.1); **BbL1**, *Babesia bovis* T2Bo DNA ligase I (XP_001609317.1); **TpL1**, *Theileria parva* DNA ligase I (XP_763577.1); **CrL1**, *Chlamydomonas reinhardtii* DNA ligase (XP_001702891.1); **SjL1**, *Schistosoma japonicum* ligase I, DNA, ATP-dependent (CAX72885.1); **RtL1**, *Rattus norvegicus*, ATP-bağımlı DNA ligaz I, izoform CRA_a (EDL83753.1); **HsL1**, *Homo sapiens* ATP bağımlı DNA ligase 1 (NP_000225.1); **DrL1**, *Danio rerio* ATP bağımlı DNA ligase 1 (NP_001119860.1) **DrL3**, *D. rerio* DNA ligaz 3 (NP_001025345.1); **BtL3** *Bos taurus* DNA ligaz (ATP) 3 (DAA19132.1); **RrL3**, *Rattus norvegicus* DNA ligaz 3 (NP_001012011.1); **MmL3**, *Mus musculus* DNA ligaz 3 (NP_034846.2); **XiL3**, *Xenopus laevis* DNA ligaz III alfa izoform (NP_001082183.1); **GgL3**, *Gallus gallus* DNA ligaz (ATP) 3 (NP_001006215.1); **HsL3**, *Homo sapiens* ATP-bağımlı DNA ligase III, (AAL91592.1); **PtL4**, *Paramecium tetraurelia* DNA ligaz IV (CAI39048.1); **MmL4**, *Mus musculus* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_795927.2); **XiL4**, *Xenopus laevis* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_001081114.1); **HsL4**, *Homo sapiens* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_002303.2); **GgL4**, *Gallus gallus* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_001025987.1); **DdL4**, *Dictyostelium discoideum* DNA ligaz IV (XP_629472.1); **AtL4**, *Arabidopsis thaliana* ATLIG4 DNA ligaz (ATP) protein binding (NP_568851.2); **Hi**, *Haemophilus influenzae* DNA ligaz (ZP_05849906.1); **Ab**, *Alcanivorax borkumensis* SK2 DNA ligaz (YP_694422.1); **Ptu**; *Pseudoalteromonas tunicata* DNA ligaz (ZP_01135002.1); **Vb**, *Vibrionales bacterium* DNA ligaz (ZP_01812881.1); **Il**, *Idiomarina loihiensis* DNA ligaz (YP_156435.1); **Av**, *Allochromatium vinosum* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003442259.1); **Ma**, *Marinobacter aquaeolei* DNA ligaz VT8 (YP_960951.1); **Vc**, *Vibrio cholerae* bv. *albensis* ATP bağımlı DNA ligaz

(ZP_04413034.1); **Vf**, *Vibrio furnissii* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_05877323.1); **T7**, *Enterobacteria phage T7* DNA ligaz (NP_041963.1); **T3**, *Enterobacteria phage T3* DNA ligaz (NP_523305.1); **Vp**, *Vibrio phage* DNA ligaz (NP_899305.1); **Vv**, *Vaccinia virus* DNA ligaz (ABZ80139.1); **Mv**, *Marseillevirus* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003406819.1); **T4**, *Enterobacteria phage T4* DNA ligaz (NP_049813.1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900.1); **XICE**, *Xenopus laevis* mRNA şapka enzimi (NP_001084232.1); **EcN** *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_003614224.1); **PrN** *Providencia rettgeri* NAD bağımlı DNA ligaz (ZP_06127383.1); **SsN** *Shigella sonnei* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_311366.1); **EcoN** *Escherichia coli* NAD bağımlı DNA ligaz (NP_416906.1); **AvN** *Azotobacter vinelandii* NAD bağımlı DNA ligaz (P_002800169.1); **PmN** *Pseudomonas mendocina* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_001188233.1).



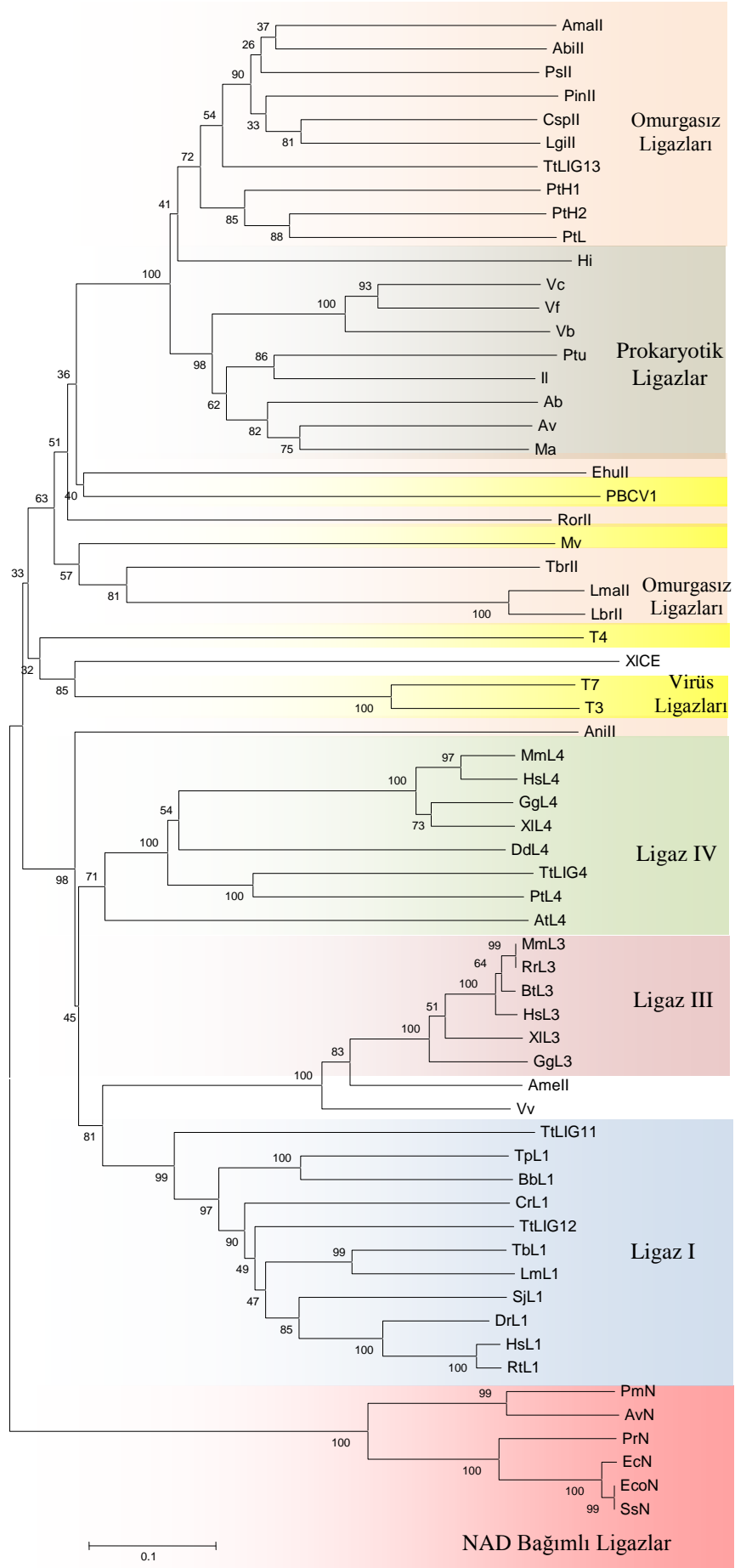
Şekil 3.2. *Tetrahymena* DNA ligaz enzimleri ile kovalent nükleotidil transferaz enzim ailesi üyelerinin köksüz filogenetik ağaç yapısı.

Şekil 3.2’de ağacı oluşturan üyeler ve ağacın yapılış bilgisi köklü ağaç ile aynı olduğundan gerekli gen bilgisi için Şekil 3.1’e bakınız. Dış grup olarak NAD bağımlı DNA ligaz enzimleri ile mRNA şapka enzimi kullanılmıştır.

Oluşturulan ağaçlarda TtLig13p’nin yerleşimi ve bir arada bulunduğu guruplar göz önüne alındığında, bakteri ve virüslere oldukça yakın ökaryotik bir grubun var olabileceğine dair elde edilen veriler, bu grubun aydınlatılması için filogenetik çalışmaların detaylandırılmasını gerektirmiş; ve bu amaçla SuperFamily veri tabanında TtLig13p’ye yapısal olarak benzerlik gösteren

ökaryotik üyeler araştırılmış ve bulunmuştur. Bulunan bu üyelerin en önemli ortak özelliği üyelerin hepsinin **omurgasızlar** gurubunda yer almasıdır. Bu üyelerin filogenetik ilişkilerinin belirlenebilmesi amacıyla “Nükleotidil Transferaz Süperailesi” ağacı (Şekil 3.3) oluşturulmuştur. İlkel karakterdeki omurgasız DNA ligazlarının bakteri ve virüs ligazları ile ilişkilerinin daha yakından incelenebilmesi amacıyla diğer ökaryotik ligazlar ile NAD bağımlı ligazları içermeyen ikinci bir ağaç oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Ağaç oluşturulduktan sonra seçilen üyeler ClustalW2 ile hizalandıktan sonra Jalview ile temzilenmiş ve 1000 tekrarlı seç-bağla değeriyle Neighbour Joining ağacının oluşturulması için MEGA4 programı kullanılmıştır.

Nükleotidil transferaz süperaile ağacı (Şekil 3.3) incelendiğinde NAD bağımlı ligazların yine dış grup olarak yerleşim gösterdiği görülmektedir. Ağaç iki ana dal üzerinde küçük dallara ayrılmaktadır. Birinci ana dal Ligaz I, Ligaz III ve Ligaz IV'den oluşan ökaryotik DNA ligaz gurubudur. Diğer ana dalda ise bakteri ve virüs DNA ligazları ile ilkel yapıdaki omurgasız ligazları bulunmaktadır. İlkel karakterdeki omurgasız ligazlarından AmeII (*Apis mellifera*) üyesi, Ligaz III dalında, *Vaccinia virüs* ligazı ile bir arada bulunmakta ve bu yerleşim %100 seç-bağla değeri ile desteklenmektedir. Diğer ilkel karakterdeki omurgasız ligazları ise iki ana guruba ayrılmıştır. TtLig13p ve Paramecium ligazlarında içinde olduğu gurup, bakterilere yakın kararlı bir dallanma göstermiştir. Diğer gurup ise virüs ligazları arasında dağılım göstermektedir.



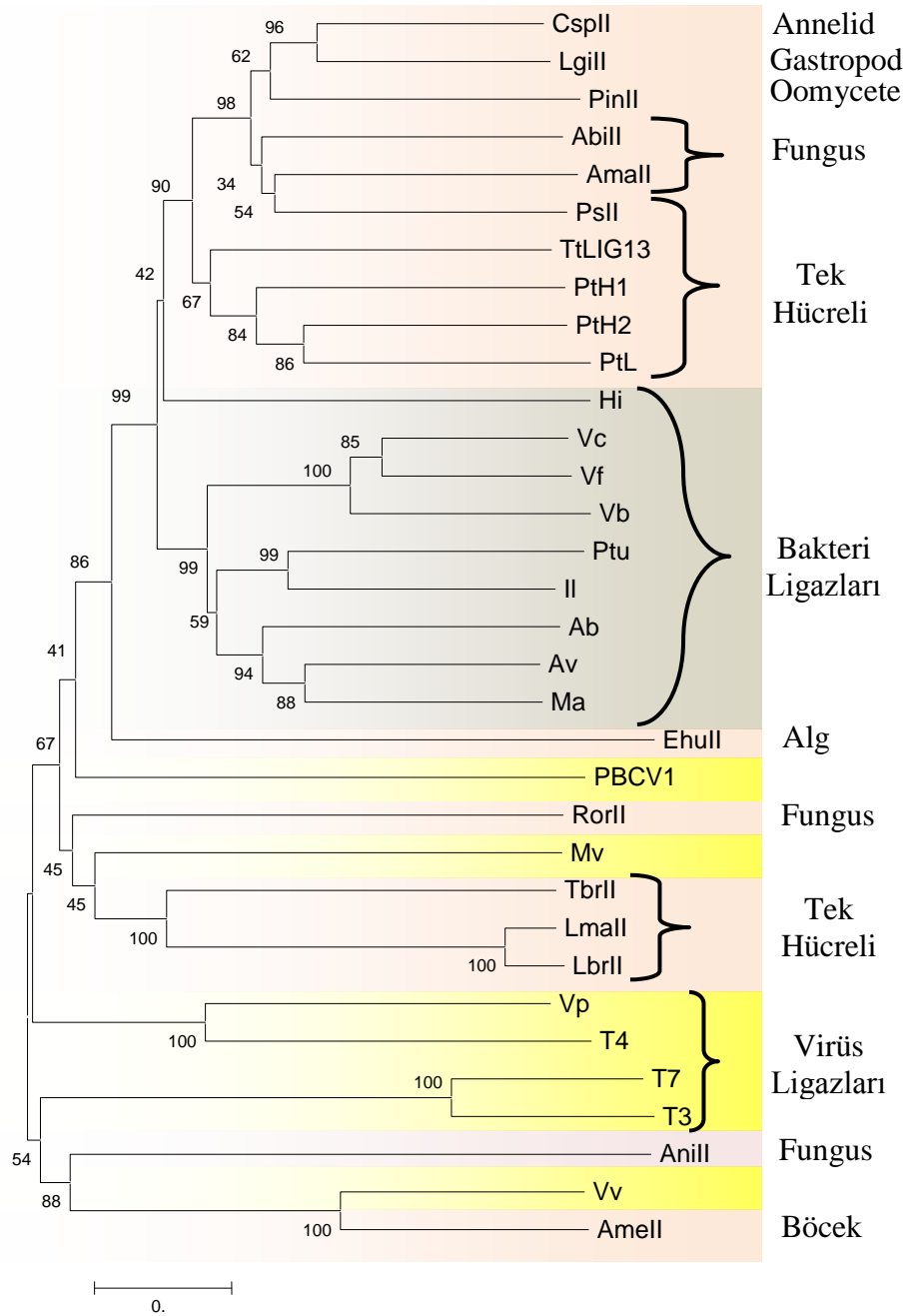
Şekil 3.3. İlkel yapıdaki omurgasız DNA ligazlarının kovalent nükleotidil transferazlar arasındaki dağılımının filogenetik köklü ağaç yapısı.

Şekil 3.3’de üyelerin evrimsel ilişkileri komşuların birleştirilmesi [47] metodu ile 1000 tekrarlı seç bağla analizi olarak gerçekleştirilmiştir [48]. Kötü hizalama ve boşluk içeren tüm blok karakterler silinmiş ve 64 üyeye ait kalan 184 karakterin MEGA4’te kullanılması ile köklü filogenetik ağaç yapılandırılmıştır [34]. Ağaçta yer alan üyelerin, ağaçta kullanılan kod isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları aşağıda verilmiştir: Ağaçta yer alan üyelerin, ağaçta kullanılan kod isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları aşağıda verilmiştir: **TtLIG11**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001026764.1); **TtLIG12**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001022972.1); **TtLIG4**, *T. thermophila* DNA ligaz IV (XP_001019308.1); **TtLIG13**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz domaini taşıyan protein (XP_001011861.1); **PtH1**, *Paramecium tetraurelia* strain d4-2 hipotetik protein (XP_001460273.1); **PtH2**, *P. tetraurelia* strain d4-2, hipotetik protein (XP_001431968.1); **PtL**, *P. tetraurelia* strain d4-2 DNA ligase (XP_001347270.1); **LmL1**, *Leishmania major* DNA ligaz I (XP_001684953.1); **TbL1**, *Trypanosoma brucei* DNA ligase I (XP_845595.1); **BbL1**, *Babesia bovis* T2Bo DNA ligase I (XP_001609317.1); **TpL1**, *Theileria parva* DNA ligase I (XP_763577.1); **CrL1**, *Chlamydomonas reinhardtii* DNA ligase (XP_001702891.1); **SjL1**, *Schistosoma japonicum* ligase I, DNA, ATP-dependent (CAX72885.1); **RtL1**, *Rattus norvegicus*, ATP-bağımlı DNA ligaz I, izoform CRA_a (EDL83753.1); **HsL1**, *Homo sapiens* ATP bağımlı DNA ligase 1 (NP_000225.1); **DrL1**, *Danio rerio* ATP bağımlı DNA ligase 1 (NP_001119860.1); **BtL3** *Bos taurus* DNA ligaz (ATP) 3 (DAA19132.1); **RrL3**, *Rattus norvegicus* DNA ligaz 3 (NP_001012011.1); **MmL3**, *Mus musculus* DNA ligaz 3 (NP_034846.2); **XiL3**, *Xenopus laevis* DNA ligaz III alfa izoform (NP_001082183.1); **GgL3**, *Gallus gallus* DNA ligaz (ATP) 3 (NP_001006215.1); **HsL3**, *Homo sapiens* ATP-bağımlı DNA ligase III, (AAL91592.1); **PtL4**, *Paramecium tetraurelia* DNA ligaz IV (CAI39048.1); **MmL4**, *Mus musculus* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_795927.2); **XiL4**, *Xenopus*

laevis DNA ligaz (ATP) 4 (NP_001081114.1); **HsL4**, *Homo sapiens* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_002303.2); **GgL4**, *Gallus gallus* DNA ligaz (ATP) 4 (NP_001025987.1); **DdL4**, *Dictyostelium discoideum* DNA ligaz IV (XP_629472.1); **AtL4**, *Arabidopsis thaliana* ATLIG4 DNA ligaz (ATP) protein binding (NP_568851.2); **Hi**, *Haemophilus influenzae* DNA ligaz (ZP_05849906.1); **Ab**, *Alcanivorax borkumensis* SK2 DNA ligaz (YP_694422.1); **Ptu**; *Pseudoalteromonas tunicata* DNA ligaz (ZP_01135002.1); **Vb**, *Vibrionales bacterium* DNA ligaz (ZP_01812881.1); **Il**, *Idiomarina loihiensis* DNA ligaz (YP_156435.1); **Av**, *Allochromatium vinosum* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003442259.1); **Ma**, *Marinobacter aquaeolei* DNA ligaz VT8 (YP_960951.1); **Vc**, *Vibrio cholerae* bv. *albensis* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_04413034.1); **Vf**, *Vibrio furnissii* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_05877323.1); **T7**, *Enterobacteria phage* T7 DNA ligaz (NP_041963.1); **T3**, *Enterobacteria phage* T3 DNA ligaz (NP_523305.1); **Vp**, *Vibrio phage* DNA ligaz (NP_899305.1); **Vv**, *Vaccinia virus* DNA ligaz (ABZ80139.1); **Mv**, *Marseillevirus* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003406819.1); **T4**, *Enterobacteria phage* T4 DNA ligaz (NP_049813.1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900.1); **XICE**, *Xenopus laevis* mRNA şapka enzimi (NP_001084232.1); **EcN** *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_003614224.1); **PrN** *Providencia rettgeri* NAD bağımlı DNA ligaz (ZP_06127383.1); **SsN** *Shigella sonnei* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_311366.1); **EcoN** *Escherichia coli* NAD bağımlı DNA ligaz (NP_416906.1); **AvN** *Azotobacter vinelandii* NAD bağımlı DNA ligaz (P_002800169.1); **PmN** *Pseudomonas mendocina* NAD bağımlı DNA ligaz LigA (YP_001188233.1); **AbiII**, *Agaricus bisporus* (jgi|Agabi_varbisH97_2|122838|Genemark.9306_g); **AmaII**, *Allomyces macrogynus* ATCC 38327 DNA ligase (AMAG_03500); **PsII**, *Proterospongia* sp. ATCC 50818 (PTSG_05144T0); **AmeII**, *Apis mellifera* 37.2d (**ENSAPMP00000007945**); **AniII**, *Aspergillus niger* ATCC 1015(**e_gw1_2.126**); **LmaII**, *Leishmania major* strain *Friedlin* (LmjF26.1350); **EhuII**, *Emiliania huxleyi* CCMP1516 (jgi|Emihu1|196791|gm1.400913); **CspII**, *Capitella* sp.I (gi|Capca1|196397|fgenesh1_pg.C_scaffold_83000041); **PinII**,

Phytophthora infestans T30-4 (PITG_08606); **RorII**, *Rhizopus oryzae* RA 99-880 (RO3G_07429); **TbrII**, *Trypanosoma brucei* (Tb927.7.610/Tb07.29K4.760); **LgiII**, *Lottia gigantea* (jgi|Lotgi1|234827|estExt_fgenesh2_pg.C_sca_560013); **LbrII**, *Leishmania braziliensis* (LbrM26_V2.1370 MHOM/BR/75/M2904).

Bakteri ve virüs ligazları ile ilkel omurgasız ligazları ile oluşturulan ağaç (Şekil 3.4), daha daha küçük bir filogenetik gurubu temsil etmesi sonucunda yükselen seç-bağla değerleri ile üyelerin dağılımını desteklemiştir. İlkel karakterdeki omurgasız DNA ligaz üyeleri kararlı bir şekilde bakteri ve virüs grupları arasında iki ana gurup oluştururken, çok hücreli, tek hücreli, fungus dağılımı homojen değildir. Önceki ağaçta Vv ile birlikte Ligaz III kladında yer alan ve grubun en gelişmiş organizmal üyesi olan AmeII (böcek) bu ağaçta da Vv ile birlikte dallanmıştır. Bir alg olan EhuII üyesi DNA ligazı, %86 seç-bağla değeri ile bakteri ve bakterilere yakınlık gösteren omurgasız ligazlarına dış grup olarak davranmıştır. TtLig13p, Paramecium ligazları ile %90 seç-bağla değeri ile desteklenerek bakteri ligazlarına yakın yerleşim göstermiştir.



Şekil 3.4. Omurgasız DNA ligazlarının bakteri ve virüs ligazları arasındaki filogenetik dağılımının detaylı durumu.

Şekil 3.4’de üyelerin evrimsel ilişkileri komşuların birleştirilmesi [47] metodu ile 1000 tekrarlı seç bağla analizi olarak gerçekleştirilmiştir [48]. Kötü hizalama ve boşluk içeren tüm blok karakterler silinmiş ve 33 üyeye ait kalan 212 karakterin MEGA4’te kullanılması ile köklü filogenetik ağaç yapılandırılmıştır

[34]. Ağaçta yer alan üyelerin, ağaçta kullanılan kod isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları aşağıda verilmiştir: Ağaçta yer alan üyelerin, ağaçta kullanılan kod isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları aşağıda verilmiştir: **TtLIG13**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz domaini taşıyan protein (XP_001011861.1); **PtH1**, *Paramecium tetraurelia* strain d4-2 hipotetik protein (XP_001460273.1); **PtH2**, *P. tetraurelia* strain d4-2, hipotetik protein (XP_001431968.1); **PtL**, *P. tetraurelia* strain d4-2 DNA ligase (XP_001347270.1); **Hi**, *Haemophilus influenzae* DNA ligaz (ZP_05849906.1); **Ab**, *Alcanivorax borkumensis* SK2 DNA ligaz (YP_694422.1); **Ptu**; *Pseudoalteromonas tunicata* DNA ligaz (ZP_01135002.1); **Vb**, *Vibrionales bacterium* DNA ligaz (ZP_01812881.1); **Il**, *Idiomarina loihiensis* DNA ligaz (YP_156435.1); **Av**, *Allochromatium vinosum* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003442259.1); **Ma**, *Marinobacter aquaeolei* DNA ligaz VT8 (YP_960951.1); **Vc**, *Vibrio cholerae* bv. *albensis* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_04413034.1); **Vf**, *Vibrio furnissii* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_05877323.1); **T7**, *Enterobacteria phage* T7 DNA ligaz (NP_041963.1); **T3**, *Enterobacteria phage* T3 DNA ligaz (NP_523305.1); **Vp**, *Vibrio phage* DNA ligaz (NP_899305.1); **Vv**, *Vaccinia virus* DNA ligaz (ABZ80139.1); **Mv**, *Marseillevirus* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003406819.1); **T4**, *Enterobacteria phage* T4 DNA ligaz (NP_049813.1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900.1); **AbiII**, *Agaricus bisporus* (jgi|Agabi_varbisH97_2|122838|Genemark.9306_g); **AmaII**, *Allomyces macrogynus* ATCC 38327 DNA ligase (AMAG_03500); **PsII**, *Proterospongia* sp. ATCC 50818 (**PTSG_05144T0**); **AmeII**, *Apis mellifera* 37.2d (**ENSAPMP00000007945**); **AniII**, *Aspergillus niger* ATCC 1015(**e_gw1_2.126**); **LmaII**, *Leishmania major* strain *Friedlin* (**LmjF26.1350**); **EhuII**, *Emiliana huxleyi* CCMP1516 (jgi|Emihu1|196791|gm1.400913); **CspII**, *Capitella* sp. (gi|Capca1|196397|fgenes1_pg.C_scaffold_83000041); **PinII**, *Phytophthora infestans* T30-4 (PITG_08606); **RorII**, *Rhizopus oryzae* RA 99-880 (RO3G_07429); **TbrII**, *Trypanosoma brucei* (Tb927.7.610/Tb07.29K4.760); **LgiII**, *Lottia gigantea* (jgi|Lotgi1|234827|estExt_fgenes2_pg.C_sca_560013); **LbrII**, *Leishmania braziliensis* (LbrM26_V2.1370 MHOM/BR/75/M2904).

Filogenetik ağaç yapısından elde edilen bulguların ışığında *Tetrahymena* ligazlarının yakın olduğu düşünülen ligazlar ile ne kadar benzerlik gösterdiği sorgulanmalıdır. Doğru bir benzerlik analizi yapılabilmesi için sadece korunmuş ligaz katalitik bölgesi ile sınırlı olmak üzere amino asit seviyesinde benzerlik yüzdeleri PepTool programı yardımıyla araştırılmış elde edilen % benzerlik değerleri Şekil 3.5’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi TtLig13p % 40.8 ile en fazla *H. influenza* (Hi) ligazına benzerlik göstermektedir. Hatta bu benzerlik *Tetrahymena* ökaryotik ligazları olan TtLig11p, TtLig12p ve TtLig4p’den sırasıyla % 14.1, % 8.6 ve % 18.3 daha fazladır. Ayrıca TtLig13p, PBCV-1 virüs DNA ligazına % 26.3 benzemekte olup bu değer TtLig11p ve TtLig4p’ye benzerliklerinden daha fazladır. *Tetrahymena* ligazları arasında T4 DNA ligazına % 19.5’luk bir değer ile en fazla benzerlik gösteren ligazın TtLig13p enzimi olduğu belirlenmiştir.

	TtLig13p	Hi	TtLig12p	TtLig11p	TtLig4p	PBCV-1	T4
TtLig13p							
Hi	40.8						
TtLig12p	32.2	28.1					
TtLig11p	23.3	26.3	38.0				
TtLig4	22.5	19.7	25.6	25.9			
PBCV-1	26.3	24.6	17.0	16.6	14.4		
T4	19.5	20.2	15.6	17.5	15.6	18.8	

Şekil 3.5. *Tetrahymena* ligazları ile virüs ve prokaryotik ligazları arasındaki % benzerlik ilişkisi. Şekildeki yüzde benzerlik analizi, üyelerin birinci ve altıncı motifleri arasında kalan diziler kullanılarak PepTool programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, *T. thermophila* ligazları içinde prokaryot ve virüslere olan benzerliği filogenetik ağaç ve benzerlik matrisi ile desteklenen TtLig13p’nin hangi gruba daha yakın olduğu, bu gruplar ile ayrı olarak oluşturulan % benzerlik analizi ile araştırılmıştır (Şekil 3.6 ve 3.7). Analize göre TtLig13p’nin bakteri ligazlarına benzerliği yaklaşık % 40 (en fazla % 41.1 ile Vb ve II’ye benzer) iken; en az % 28.6 ile Pfu’ya (*Pyrococcus furiosus*) benzemektedir. TtLig13p’nin virüs ligazlarına benzerliği ise (en fazla % 26.1 ile Vp’ye benzer) yaklaşık olarak % 20’dir.

	Vb	Il	Vf	Vc	Ptu	Ma	Ab	Av	TtLig13p	Hi
Vb										
Il	100									
Vf	51.5	51.5								
Vc	48.1	48.1	71.4							
Ptu	57.6	57.6	49.8	49.4						
Ma	49.4	49.4	48.1	45.9	47.2					
Ab	45.9	45.9	46.8	45.0	45.0	57.1				
Av	52.4	52.4	45.0	45.5	52.8	60.6	52.8			
TtLig13p	41.1	41.1	38.5	36.8	36.8	38.1	38.8	38.5		
Hi	41.2	41.2	39.5	38.2	38.2	38.2	36.8	42.5	40.4	
Pfu	26.0	26.0	26.0	27.7	27.7	23.4	26.7	27.7	28.6	24.1

Şekil 3.6. TtLig13p ve bakteri ligazlarının % benzerlik analizi. Yukarıdaki matrisi oluşturan üyelerin birinci ve altıncı motiflerinin arasındaki diziler kullanılarak PepTool programında hizalanması ile benzerlik yüzdeleri elde edilmiştir.

	T7	T3	Vp	T4	Mv	TtLig13	PBCV1	Vv
T7								
T3	70.0							
Vp	27.1	26.4						
T4	22.3	21.2	32.2					
Mv	23.8	24.2	25.4	23.8				
TtLig13	25.2	20.5	26.1	22.2	24.4			
PBCV1	23.5	20.9	19.4	21.6	18.4	23.9		
Vv	21.3	20.3	20.5	19.0	18.0	23.5	20.2	

Şekil 3.7. TtLig13p ve virüs ligazlarının % benzerlik analizi. Matrisi oluşturan üyelerin birinci ve altıncı motiflerinin arasındaki diziler kullanılarak PepTool programında hizalanması ile benzerlik yüzdeleri elde edilmiştir. Benzerlik değerleri % olarak verilmiştir.

Omurgasız DNA ligazları ile oluşturulan filogenetik ağaçlar TtLig13p'nin bu grup içindeki yerini gösterse de grup üyelerinin birbirleri ile olan ilişkisinin sayısal olarak ifade edilebilmesi amacıyla % benzerlik analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). İlkel yapıdaki omurgasız ligazlarının filogenetik ağaçta bakterilere veya virüslere yakınlık gösterecek şekilde ikiye dallanan topolojisi, benzerlik matrisinde de anlam bulmuştur. Bakterilere yakınlık gösteren grubun kendi içinde benzerlik yüzdeleri %35-40 civarında iken, bu grup üyelerinden herhangi birinin (Örn: TtLig13p) virüslere yakın dallanan omurgasızlara olan benzerliği %20'lere

varan bir düşüş sergilemiştir. Virüslere yakınlık gösteren ve homojen dağılım göstermeyen üyelerin birbirleri içindeki benzerliği %20 civarında olsa da bazı üyelerin birbirine %100 benzediği bulunmuştur. Birbirine % 100 benzeyen üyelerden sadece biri analiz sonucunda gösterilmiştir. Bu üyeler şöyledir: EhuII, PinII ve CspII'ye; LmaII, AniII ve AmeII'ye %100 benzerlik göstermektedir. Analizin sadece birinci ve altıncı motif arasındaki aminoasit dizilerinin kullanılarak yapıldığı unutulmamalıdır.

	EhuII	LmaII	PtL	PtH2	PtH1	PsII	AbiII	LgiII	TtLig13	TbrII	LbrII
LmaII	24.9										
PtL	30.6	26.7									
PtH2	32.5	25.5	52.0								
PtH1	28.7	23.5	43.5	52.6							
PsII	30.6	23.8	31.5	39.0	37.8						
AbiII	31.2	24.4	33.6	38.5	37.4	44.9					
LgiII	32.0	23.8	32.0	38.5	41.7	47.6	48.4				
TtLig13	29.1	26.9	36.2	41.1	44.8	41.9	41.5	48.1			
TbrII	20.1	17.7	27.2	29.0	30.9	25.1	28.6	29.0	28.2		
LbrII	24.5	19.2	25.4	27.7	27.0	28.9	25.6	28.1	26.5	31.5	
RorII	23.7	21.0	25.9	23.8	25.2	26.0	32.1	28.6	27.4	23.6	22.5

Şekil 3.8. İlkel yapıdaki omurgasız ligazlarının % benzerlik analizi. Matrisi oluşturan üyelerin birinci ve altıncı motiflerinin arasındaki diziler kullanılarak PepTool programında hizalanması ile benzerlik yüzdeleri elde edilmiştir. Benzerlik değerleri % olarak verilmiştir.

Analizde kullanılan enzimlerin kısaltılmış isimlerinin anlamları ve protein dizisi ulaşım numaraları şöyledir: **Tetrahymena Ligazları:** **TtLig11p**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001026764,1); **TtLig12p**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001022972,1); **TtLig4p**, *T. thermophila* DNA ligaz IV (XP_001019308,1); **TtLig13p**, *T. thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz domaini taşıyan protein (XP_001011861,1); **Bakteri Ligazları:** **Hi**, *Haemophilus influenzae* NT127 DNA ligaz (ZP_05849906,1); **Ab**, *Alcanivorax borkumensis* SK2 DNA ligaz (YP_694422.1); **Ptu**, *Pseudoalteromonas tunicata* DNA ligaz (ZP_01135002.1); **Vb**, *Vibrionales bacterium* DNA ligaz (ZP_01812881.1); **Il**, *Idiomarina loihiensis* DNA ligaz (YP_156435.1); **Av**, *Allochromatium vinosum* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003442259.1); **Ma**, *Marinobacter aquaeolei* DNA ligaz VT8

(YP_960951.1); **Vc**, *Vibrio cholerae* *bv. albensis* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_04413034.1); **Vf**, *Vibrio furnissii* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_05877323.1); Pfu, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 ATP bağımlı DNA ligaz (NP_579364.1). **Virüs Ligazları:** **T4**, *Enterobacteria phage T4* DNA ligaz (NP_049813,1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900,1). **T7**, *Enterobacteria phage T7* DNA ligaz (NP_041963.1); **T3**, *Enterobacteria phage T3* DNA ligaz (NP_523305.1); **Vp**, *Vibrio phage* DNA ligaz (NP_899305.1); **Vv**, *Vaccinia virus* DNA ligaz (ABZ80139.1); **Mv**, *Marseillevirus* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003406819.1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900.1). **Omurgasız Ligazları:** **PtH1**, *Paramecium tetraurelia* strain d4-2 hipotetik protein (XP_001460273.1); **PtH2**, *P. tetraurelia* strain d4-2, hipotetik protein (XP_001431968.1); **PtL**, *P. tetraurelia* strain d4-2 DNA ligase (XP_001347270.1); **AbiII**, *Agaricus bisporus* (jgi|Agabi_varbisH97_2|122838|Genemark.9306_g); **AmaII**, *Allomyces macrogynus* ATCC 38327 DNA ligase (AMAG_03500); **PsII**, *Proterospongia* sp. ATCC 50818 (**PTSG_05144T0**); **LmaII**, *Leishmania major* strain Friedlin (**LmjF26.1350**); **EhuII**, *Emiliania huxleyi* CCMP1516 (jgi|Emihu1|196791|gm1.400913); **RorII**, *Rhizopus oryzae* RA 99-880 (RO3G_07429); **TbrII**, *Trypanosoma brucei* (Tb927.7.610/Tb07.29K4.760); **LgiII**, *Lottia gigantea* (jgi|Lotgi1|234827|estExt_fgenes2_pg.C_sca_560013); **LbrII**, *Leishmania braziliensis* (LbrM26_V2.1370 MHOM/BR/75/M2904).

Filogenetik ağaç ve yüzde benzerlik analizlerine göre virüs ve prokaryotik ligazlara yakın olduğu belirlenen TtLig13p dizisi, DNA ligaz enzimlerinin taşıdığı 6 motif açısından analiz edilmiş (Şekil 3.9); tüm motifleri ligaz katalitik domain kısmında taşıdığı ve bu domainin N-ucu yönünde yer alan ilave bir biyolojik domain bulundurduğu görülmüştür. Bu biyolojik domainin amino asit dizisi GenBankasında BLAST programları ile analiz edildiğinde görevi literatüre girmiş herhangi bir diziye benzerlik göstermemesi nedeniyle henüz görevi belirlenemeyen bir domain olabileceği düşünülmektedir (BLAST analiz bulguları

verilmemiştir). Katalitik ligaz domaininde yer alan KMDGVR 1. Motifi öncesi yer alan bu biyolojik domain dizisinin büyüklüğü 319 amino asittir.

```

MIKIDLTQPVFLNFNQSKFWEISLLDGNKSQIRYGKLVQGEIEEKTQIVQKQHKDTD
SCLDYIIRVIENKKLKGYSGDIPMKKNEPEIIPANNASGFISIAPKSVENNANDD
KDSKVDSNTQAYLQENKTWSSQFVILTLSGNEVEEIIIGKLGIKKTWEKSSTILSANQC
KLYFKNQIEEYERKGYVRDDSQYNFQLNEVNKHFSAQNGSSNNQLDLNQGKKNFN
KDSGLYDDSHSNISGISDQSDLTARSGGSQDLDSFDKGDGDDDDGNSSVVVTGEIKKGSL
                                     I
GANGSMDSGVLLAQAMPDEMDPTGWYASEKMDGVRVAVWTGKTFYSRNGNEFYPPFFFI
      II                                     III
QNFPNCTLDGELFTKRDDFQRCVGIKTKNGNEEKDERWKDIVVYLVYDCPKLLKPKFD
                                     IV
RIKALQEQIPKLGNKYIKVLPKIVESREQLESELDRVLKNNGEGLMLRDPNSMYECR
      V
RSKTLKVKTFTEDEEATVIGSERGEGRCADMMGALVCRMKNGKEFKIGSGFNDDQRRR
                                     VI
PPKKGSVITFKYQNLTKDGKPRFPIFLRIKEDE*

```

Şekil 3.9. TtLig13p peptid dizisinde DNA ligaz enzim motifleri ile biyolojik domainin yerleşimi. Dizide tüm korunmuş ligaz motifleri gri gölgelendirme ve motif numarası ile verilmiştir. Birinci motif, DNA ligaz enzimleri için karakteristik aktif enzim merkezi olup aktif lizin aminoasidini içeren K(x)DG(x)R motifidir. Görevi bilinmeyen N terminal biyolojik bölge altı çizili olarak verilmiştir.

Tetrahymena DNA ligazlarının taşıdığı altı motifin aminoasit dizileri ile virüs ve prokaryot DNA ligaz enzimleri karşılaştırıldığında; prokaryotik gruptan T3 ve T7 ligazları tüm motifler açısından birbirine yüksek benzerlik gösterirken tüm grup içinde birinci ve dördüncü motiflerin bazı aminoasitleri dışında birebir benzerlik görülmemektedir (Şekil 3.10). *Tetrahymena* DNA ligazlarından TtLig11p ve TtLig12p'nin motifleri birbirine diğer üyelerden daha fazla benzemektedir. Ligasyon reaksiyonunda kritik işleve sahip olan birinci motifin beşinci aminoasidi tüm *Tetrahymena* grubunda "E" iken TtLig13p'nin aynı pozisyonunda, T3 ve T7 ve *H. influenza*'daki gibi "V" bulunmakla birlikte grup içi benzerlik prokaryotik grubunkinden fazladır

Organizma	MOTİF					
	I	III	IIIa	IV	V	VI
Hi	KLDGVR	FAIDGELF	KLYVFDVPDAEG	EGVVV	LKLKTARDEE	PRFATYWRERK
Vp	KADGAR	FVIDGELV	IFQVWDIIPEDV	EGTIL	VKYKEVHDGD	PIFVQFRDDKD
Ma	KLDGVR	QPLDGELW	RFYVFDLPEPDR	EGLML	LKVKKHQDAE	PRFASFLRIRN
Vb	KLDGIR	TPMDGELW	RYKVFDLPASGA	EGLML	LKVKTYQDAE	PRFARFLRIRR
Ab	KLDGVR	YSLGELW	SLMLFDMPEAAG	EGVMI	LKLKRHQDAE	PRFARFVRVRE
Vc	KLDGIR	YPLEGELW	DFMLFDMPEAAG	EGVMI	LKLKKYQDAE	PRFARFVRVRT
Vf	KLDGIR	VHLEGELW	EFMLFDMPEAAG	EGLML	LKLKRHHDAE	PKFARFVREKS
Mv	KLDGVR	IPLDGELW	SYRVFDLPMDA	EGLML	LKVKPYLDAE	PRFASFLRVRD
Av	KLDGVR	IILDGELY	EYWVFDIVDTKK	EGTIL	LKYKDFEDAE	PRAKAIRDYEG
T7	KYDGVR	FMLDGELM	HIKLYAILPLHI	EGLIV	WKMKEPNEAD	PSFVMFRGTED
T3	KYDGVR	FMLDGELM	SVRLYAVMPIHI	EGLIV	WKLKPECEAD	PSFEKFRGTED
T4	KADGAR	VLDGELV	KFQVWDYVPLVE	EGTIL	YKFKEVIDVD	PIAIRLRREDKT
PBCV1	KIDGIR	EGSDGEIS	DYVTTDDPLKYID	EGVMI	LKMKQFKDAE	PVFIGIRHEED
PtL	KLDGMR	TYLDGELW	KYMVFDAPFLQE	EGLML	LKVKSSLDAE	PKFPEFVRIYP
PtH1	KLDGMR	SYLDGELW	KYMVFDAPGLKL	EGLML	LKVKTTFMDEE	PRFPIYLRERP
PtH2	KLDGMR	TYLDGELW	KFMVFDAPLLDE	EGLML	LKVKTTFMDEE	PRFPVFERIR-
TtLIG11	KYDGER	CILDGEIV	KIYLFDIILFLNA	EGAMV	AKLKKQVLSG	PRFLRVRDDKT
TtLIG12	KYDGLR	FILDSEIV	CVFMFDLIYIND	EGLMV	LKLKKDYLDS	PRLIRVRDDKD
TtLIG13	KMDGVR	CTLDGELF	VYLVYDCPKLLK	EGLML	LKVKTFTDEE	PRFPIFLRIKE
TtLIG4	KFDGER	CILDGEMV	CYKIFDILYLKT	EGIVI	IKMKGDYYEG	PRFEKFRDDKD

Şekil 3.10. Virüs, Prokaryotik, *Paramecium* ve *Tetrahymena* DNA ligaz enzimlerinin ligaz motiflerinin karşılaştırılması. Motifleri oluşturan aminoasit dizileri alt alta verilmiş ve prokaryotik grubu oluşturan ortak aminoasitler ile *Tetrahymena* ligazlarını oluşturan ortak diziler ilgili motif sütununun en alt satırında özetlenmiştir. Şekil ile ilgili açıklama metin içindedir.

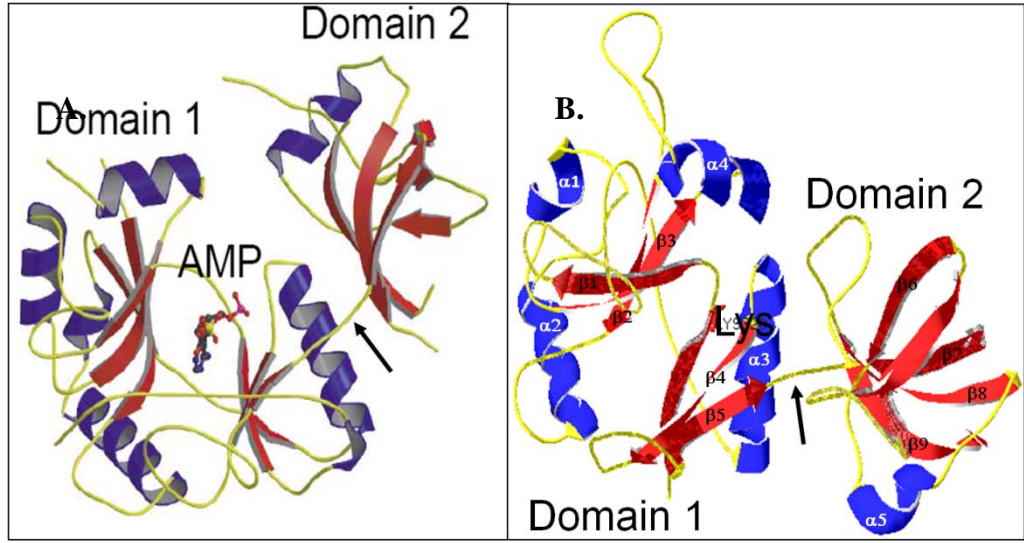
Şekil 3.10'da Kullanılan üyelerin isimleri ve protein dizisi ulaşım numaraları şöyledir: **TtLig11p**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001026764.1); **TtLig12p**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz I (XP_001022972.1); **TtLig4p**, *Tetrahymena thermophila* DNA ligaz IV (XP_001019308.1); **TtLig13p**, *Tetrahymena thermophila* ATP-bağımlı DNA ligaz domaini taşıyan protein (XP_001011861.1); **PtH1**, *Paramecium tetraurelia* strain d4-2 hipotetik protein (XP_001460273.1); **PtH2**, *P. tetraurelia* strain d4-2, hipotetik protein (XP_001431968.1); **PtL**, *P. tetraurelia* strain d4-2 DNA ligase (XP_001347270.1); **Hi**, *Haemophilus influenzae* DNA ligaz (ZP_05849906.1); **Ab**, *Alcanivorax borkumensis* SK2 DNA ligaz (YP_694422.1); **Ptu**; *Pseudoalteromonas tunicata* DNA ligaz (ZP_01135002.1); **Vb**, *Vibrionales bacterium* DNA ligaz (ZP_01812881.1); **II**, *Idiomarina loihiensis* DNA ligaz (YP_156435.1); **Av**, *Allochromatium vinosum* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003442259.1); **Ma**, *Marinobacter aquaeolei* DNA ligaz VT8

(YP_960951.1); **Vc**, *Vibrio cholerae* *bv. albensis* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_04413034.1); **Vf**, *Vibrio furnissii* ATP bağımlı DNA ligaz (ZP_05877323.1); **T7**, *Enterobacteria phage* T7 DNA ligaz (NP_041963.1); **T3**, *Enterobacteria phage* T3 DNA ligaz (NP_523305.1); **Vp**, *Vibrio phage* DNA ligaz (NP_899305.1); **Vv**, *Vaccinia virus* DNA ligaz (ABZ80139.1); **Mv**, *Marseillevirus* ATP bağımlı DNA ligaz (YP_003406819.1); **T4**, *Enterobacteria phage* T4 DNA ligaz (NP_049813.1); **PBCV1**, *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 hipotetik protein (NP_048900.1).

3.1.2. TtLIG13p'nin Üç Boyutlu Protein Yapı Modellemesi

TtLig13p dizisinin olası üç boyutlu yapısının belirlenmesi amacıyla Expasy/ SwissProt veritabanında yapılan analiz sonucu elde edilen yapısal model bilgisi Pdb formatında kaydedilmiş ve deepview programı ile görüntülenerek Şekil 3.8'de görülen yapısal bilgiler eklenmiştir.

Expasy/SwissProt program verileri TtLig13p'nin olası protein 3B modelini deneysel olarak 3B yapısı; katalitik ligaz domain bölgesine % 26 benzerlik ile Chlorella virüs DNA ligaz (Swiss-Prot protein yapı numarası: *1fviA*) veya % 24 benzerlik ile *Pyrococcus furiosus*'un prokaryotik ATP bağımlı DNA Ligazına (Swiss-Prot protein yapı numarası: *2cfmA*) göre protein dizisindeki 298 ile 555. amino asitleri arasındaki bölge kullanılarak belirlenmiştir. TtLig13p'nin Chlorella virüs DNA ligazına göre şekillendirilmiş olan genel yapı modeline (Şekil 3.11) bakıldığında ligaz katalitik bölgesinin N-ucunda yer alan adenilasyon (nükleotidil transferaz) domaininde 4 α -heliks ve 5 β -plaka yapısı (α 1-4, β 1-5); C-uçta yer alan oligonükleotid bağlanma cebi domaininde ise bir α -heliks ve 4 β -plaka (α 5, β 6-9) katlanması bulunmaktadır. Aktivasyonda görev yapan motif olan KMDGER motifi β 1 katlanması içinde kalan ilmik (loop- dönüş) üzerinde (Şekil 3.11'de siyah ok ile işaret edilmiştir) yer almaktadır.



Şekil 3.11. PBCV1 ve TtLig13p-KD dizilerinin 3B modellemesi. **A.** PBCV-1 DNA Ligaz-Adenilat kompleksinin deneysel olarak oluşturulmuş kristal yapısı; **B.**TtLig13p-KD'nin biyoinformatik olarak gerçekleştirilmiş PBCV-1 kaynaklı protein yapısının şerit formundaki genel 3B topolojileri. Domain 1, Adenilasyon domainini; Domain 2 Oligonükleotid bağlanma domainini göstermekte, siyah oklar 5. motifi işaret etmektedir. Şekil A'da AMP'nin bağlı olduğu 1.motif, Şekil B.'de birinci motifin aktif aminoasidi olan "Lys" (Lizin) ile gösterilen bölgededir.

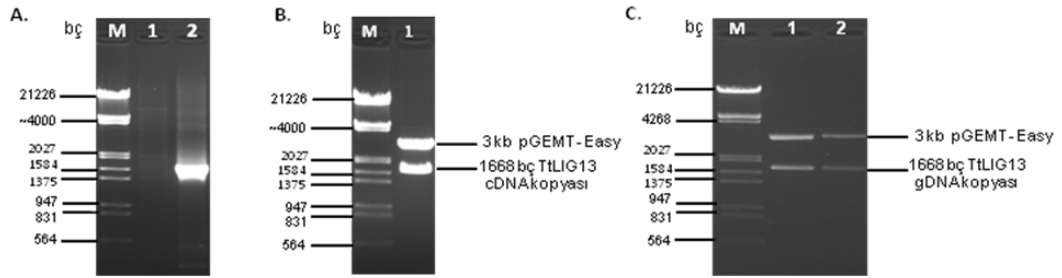
3.2. Deneysel Bulgular

3.2.1. TtLIG13 Geninin Klonlanması

TtLIG13'ün cDNA kopyası, 30°C'de büyütülmüş T.thermophila hücrelerinden RNeasy Mini Kit (Qiagene) ile elde edilen toplam RNA, DNase treatment ve RNA cleanup adımlarından geçirildikten sonra RT reaksiyonuna alınmış ve cDNA elde edilmiştir. Kalıp olarak burada elde edilen RT ürünü, gen spesifik primerler (Fdış ve Rdış) ve PrimeStar (Takara) enzimi kullanılarak 1668 bp ürün elde edilmiş, ürün jelden saflaştırılmış ve Taq Polymerase (Fermentas) enzimi kullanılarak -A ekleme reaksiyonu kurulmuştur. A ekleme reaksiyonu ürünü direk olarak pGEMT-Easy plazmidi ile ligasyon reaksiyonu alınmıştır. Ligasyon reaksiyon ürünü, elektrotransformasyon ortamında tuz bulunmaması gerektiğinden PCR saflaştırma kiti (Qiagene) ile saflaştırılarak, konsantre edilmiş, distile suda çözülmüştür. TtLIG13 cDNA kopyasının ligasyonunun

elektrotransformasyon tabağında 6 beyaz koloni kullanılarak yapılan koloni PCR sonucunda sadece bir kolonide (10 numaralı) 1600 bç büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 3.12 A) ve bu koloniden plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitin NotI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu pozitif klon olduğu görülmüştür (Şekil 3.12 B). Elde edilen klonların dizi analizi ve restriksiyon enzim kesim analizleri, klonlanan DNA parçalarının hedef gen olduğunu teyit etmiştir.

TtLIG13 1668 bç gDNA ürününün klonlanması deneyinde elde edilen transformasyon tabağındaki 2 beyaz koloninin 2'sinin de pozitif olduğu, gerçekleştirilen plazmit izolasyonu ve restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel analizi ile teyit edilmiştir (Şekil 3.12 C). Elde edilen bu klonun restriksiyon enzim kesim analizleri, klonlanan DNA parçalarının hedef gen olduğunu teyit etmiştir.



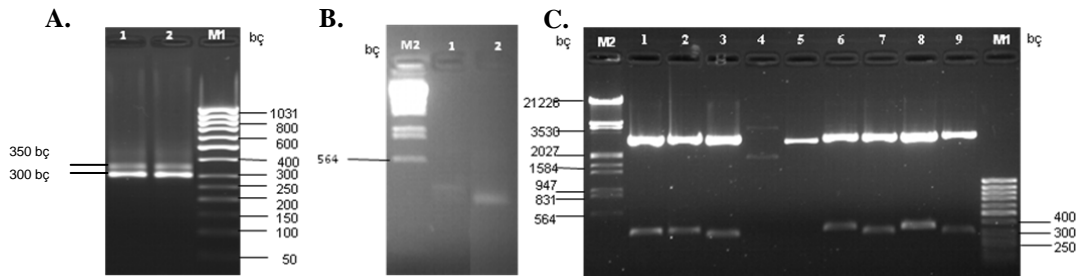
Şekil 3.12. *TtLIG13* mRNA'sının protein kodlayıcı cDNA dizisinin klonlanması.

Şekil 3.12'de **A.** *TtLIG13* cDNA klonlama LB-agar tabağında beyaz renkli 6 koloni kullanılarak yapılan koloni PCR sonucunda sadece 10 numaralı koloni pozitif 1600 bç büyüklüğünde ürün taşımaktadır. 1; 6 nolu koloni negatif, 2; 10 no'lu pozitif koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. **B.** Koloni PCR sonucu beklenen büyüklükte ürün veren 10 no'lu koloniden plazmit izolasyonu ve NotI enzimi ile kesim sonucu 3 kb'de pGEMT-E vektörüne ait bant ile 1668 bç'de *TtLIG13*'e ait bant görülmektedir (kuyu 1), **C.** *TtLIG13* gDNA kopyasının klonlanması deneyinde elde edilen plazmitin NotI restriksiyon enzimi ile kesimi 2 ve 3 no'lu kolonilerden elde edilen plazmitlerin restriksiyon ürünleri olan 3 kb'de pGEMT-E vektörüne ait bant ile 1668 bç'de g*TtLIG13*'e ait bant görülmektedir. M. Marker λ EcoRI/ HindIII(Fermentas).

3.2.2. *TtLIG13* mRNA'sının 3' Translasyona Girmeyen Bölgesinin klonlanması

Kurulan ilk 3' RACE PZR reaksiyonunda bantlaşma şeklinde ürünleşme görülmemiştir. Bu ürün kalıp olarak kullanılarak nested PZR ve nested PZR ürünü de kalıp olarak kullanılarak rePZR kurulmuş ve tahmini beklenen büyüklükte (yaklaşık 280 bç-alt bant) ve beklenenin biraz üzerinde (yaklaşık 350 bç-üst bant) iki bant elde edilmiştir (Şekil 3.13 A). Kesilen bantlar alt ve üst bant olarak isimlendirilerek ayrı ayrı saflaştırılmıştır (Şekil 3.13 B).

Saflaştırma ürünlerinin pGEMT-E vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiş ve transforme edilmiştir. Transformantlardan alt ve üst bant için 5'er koloniden plazmit izole edilmiş ve plazmitlerin insert taşıdığı *EcoRI* enzimi ile kurulan restriksiyon reaksiyonu ile teyit edilmiştir (Şekil 3.13 C).



Şekil 3.13. *TtLIG13* cDNA'sının 3' UTR dizisinin klonlanması.

Şekil 3.13'de **A:** *TtLIG13* 3' RACE Nested PZR'dan rePZR ürünleri. **B:** *TtLIG13* 3' RACE cDNA ürünlerinin jelden saflaştırmasını kontrol jel sonucu, 1) *TtLIG13* 3' RACE çalışması üst bant saflaştırma ürünü 2) *TtLIG13* 3' RACE çalışması alt bant saflaştırma ürünü. **C:** İzole edilen pGEMT- *TtLIG13* 3' UTR plazmitlerinden insert taşıyanların *EcoRI* restriksiyon reaksiyonu ile kontrolü; 1-5) alt bant klonu, 6-9) üst bant klonu. Plazmitlerin *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan 3 kb büyüklüğündeki pGEMT-E vektörüne ait ürün bandı ile 300-350 bç büyüklüğündeki insert bantları görülmektedir. M1: Fermentas 50 bp DNA ladder ve M2: Marker λ EcoRI/ HindIII

Restriksiyon reaksiyonlarının agaroz jel ile kontrolünde 3 kb büyüklüğünde pGEMT-E vektörüne ait bant ile kesim sonucu salınan insert bantları Şekil 3.13 C’de görülmektedir. 4 ve 5 no’lu kuyularda insert bandı görülmemesi bu plazmitlerin negatif olduğunu göstermektedir. Alt bant klonu 3 no’lu koloni ve üst bandı temsil eden 9 no’lu koloniden izole edilen plazmitler dizi analizi reaksiyonuna alınmıştır. Bu gruba ait üst bandı temsil eden 9 no’lu plazmitin kesim reaksiyon ürünü ise ayrı bir jele yüklenmiş, plazmitin pozitif olduğu görülmüş, fakat bu figüre eklenmemiştir. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler önce NCBI veri tabanında bulunan VecScreen programı ile vektöre ait bilgilerinden arındırılmıştır (Şekil 3.14). Temizlenmiş dizi analizi verileri, yine NCBI veritabanında bulunan BlastX programı ile analiz edilmiş sadece alt bandın dizi analizi verileri *Tetrahymena*’ya ait TtLIG13’ün ligaz geninin 3’UTR bölgesi ile uyum göstermiştir. Bu elde edilen deneysel dizi bilgisi Şekil 3.14’de yer alan mRNA dizisinde gösterilmiştir.

```

AAAAAAGGAAGTGTGATAACTTCAAATACCAAATCCTTACCAAAGATGGTAAACCAAGATTCC
CTATTTTCTTGAGAATAAAAGAAGACGAATGAATGAATTAATTAATAGATTGATGGAGAGATT
ATAGCAAAGTTTAATTGATACAATTTATTTTCATATAATAATATTTTTTACGCATNTAAAAAG
CAAAATTTATAAATATTTGTCTTTCAATTGAATAATTTCTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAATTAAGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCC
CAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATACTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT
GGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA

```

Şekil 3.14. Dizi analizi ile elde edilen TtLIG13 3’ UTR bilgisi. pGEMTEasy vektör dizisine yüksek oranda benzerlik gösteren 264-484. nükleotidler gri ile gölgelendirilmiştir. Bu bölge silinmiş ve sonraki analizlerde temizlenmiş dizi kullanılmıştır.

BLASTX ile yapılan BLAST analizi sonucu bulucu olarak gönderilen elde edilen dizinin uyum gösterdiği ilk dizi *Tetrahymena thermophila* TtLIG13 genom bilgisinin karşılık geldiği görülmüş ve elde edilen 3’ bölgesi ile GeneTool programı kullanılarak TtLIG13’ün genom dizisi ile hizalanmıştır (Şekil 3.15). Hizalama sonucu genin 3’ UTR sınırları belirlenmiştir (Şekil 3.16).

gDNA 3' UTR	GGATTCAATGATGACTAAAGAAGAAGGCCACCTAAAAAGGAAGTGTGATAACATTC -----AAAAAGGAAGTGTGATAAC--TTC	1596 23
gDNA 3' UTR	AAATACCAAAATCTTACCAAAGATGGTAAACCAAGATTCCTATTTTCTTGAGAATA AAATACCAAAATCTTACCAAAGATGGTAAACCAAGATTCCTATTTTCTTGAGAATA	1653 80
gDNA 3' UTR	AAAGAAGACGAATGAATGAATTAATTAATAGATTGATGGAGAGATTATAGCAAAGTT AAAGAAGACGAATGAATGAATTAATTAATAGATTGATGGAGAGATTATAGCAAAGTT	1710 137
gDNA 3' UTR	TAATTGATACAATTTATTTTCATATAATAATATTTTTTACGCATTTAAAAAGCAAAA TAATTGATACAATTTATTTTCATATAATAATATTTTTTACGCATNTAAAAAGCAAAA	1767 194
gDNA 3' UTR	TTTATAAATATTTGTCTTTCAATTGAATAATTTCTCTTTAATTCTAGCTATTAATTA TTTATAAATATTTGTCTTTCAATTGAATAATTTCTCTTT-polyA	1824 251

Şekil 3.15. *TtLIG13* 3' UTR dizi ile *TtLIG13* genom dizisinin GeneTool programıyla hizalanması. 3'UTR olarak isinlendirilmiş 3'RACE-RT-PCR sonunda klonlanan dizidir. gDNA olarak adlandırılmış dizi ise *TtLIG13* genom dizisidir. Siyah ile işaretlenmiş kodon translasyonun DUR kodonuna karşılık gelmektedir. 3'UTR dizisi 138 baz uzunluğundadır.

Dizi analizi ve hizalama çalışmaları sonunda elde edilen *TtLIG13* 3' UTR dizisindeki mRNA'nın transkripsiyon sonrası sitoplazmik ömrünü belirlemede yardımcı olan elementlerin belirlenmesi, dizinin UTRdb veri tabanında analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir [49]. Analiz neticesinde 138 baz uzunluğundaki 3' UTR dizisinde veri tabanında bulunan diziler ile tutarlılık gösteren 3 element bulunmuştur: IRES (Ribozomun içsel bağlanma dizisi-Internal Ribozom Entry Site), uORF (açık okuma çerçevesinin üst dizisi-Upstream of open reading frame) ve PAS (poliadenilasyon sinyali-polyadenylation site). Bu elementlerden IRES ve uORF, mRNA dizilerinin genellikle 5' UTR'ında bulunmaktadır [50, 51], burada elde edilen verinin dizi benzerliğinden kaynaklandığı düşünülüp, analizlerde dikkate alınmamıştır. PAS'nin dizi içindeki yeri *TtLIG13* mRNA dizisinde gri gölgeli olarak belirtilmiştir (Şekil 3.16).

Dizinin veri tabanından elde edilen genom bilgisinden 5' UTR dizisi tahmini olarak belirlenmiş ve bu bölgedeki 180 nükleotidin UTRdb analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda bu bölgede IRES, uORF ve MBE (Nöral kök hücrelerinin yenilenmesinde rol oynayan sinyal proteini olan Musashi bağlanma

elementi- Musashi Binding Element) elementlerinin olduğuna dair bilgi edinilmiştir (Şekil 3.16).

```

attatggatggataatgataaaaaataatcatttagtagaaaaattttataaaatgcttt -301
taaaaaatacaaaagtagtcaaaatatacttatttataataaaaaataaaggatgaatagat -241
aatcagatagattaactttaatgaaatagaagatgtgactgtttgtttttattctttttt -181
gataaaatattatgacttcgcttttaattaaaaatagcgcgtagaatattcatatatatat -121
aaatacatacattgtcatttaattagttacttttatatttgaataaaaagattattagtaaa -61
taaaaaataaaattaaattcaaaaagatagatagatttcaatttctaattaagtaaatctaag -1
M I K I D L T K P V F L N F N Q S K F W
atgatcaaaattgatttaacaaaacctgtatttcttaattttaatcaatcaaagttttgg 60
E I S L L D G N K S Q I R Y G K L V Q G
gaaatcagcctgcttgatggaaataaatcttaaatcagatagggaaagttggtttaaggt 120
E E I E E K T Q I V Q K Q H K D T D S C
gaagagattgaagagaaaacttaaatgtccaaaagtagcacaaaagacactgactcttgt 180
L D Y I I R V I E N K K L K G Y S G D I
ttagattacataataagagtgattgaaaacaaaaaattgaaaggatatagcggagatt 240
P M K K N E P Q I I I P A N N A S G F S
cccatgaaaagaatgagccttaaatcatcattcctgcaaataacgcaagtggattttca 300
I Q I S A P K S V E N N A N D D K D S K
atttaaatcagcacctaaatctgttgaaaataatgtaaacgatgataaagattctaaa 360
V D S N T Q A Y L Q E N K T W S S Q F V
gttgattcaaaactcaagcgtattttaggaaaacaaaacttggtcatcataaatttga 420
I L T L S G N E V E E I I G K L G I K K
attttaactctgtctggcaatgaagtagaagaaattataggcaaaactaggaataaaaaag 480
T W E K S S T I L S A N Q C K L Y F K N
acatgggaaaaaagttctacaatattaagtgcaaactagtgtaaattgtatttcaaaaat 540
Q I E E Y E R K G Y V R D D S Q Y N F Q
taaatgaggaatacgaagaaggatagtgagagatgatagtcataataattttag 600
L N E V N K H F S A Q N G S S N N Q L
ctaaatgaagttaataaacacttttcagcattaaatggatctagtaataataattagctt 660
D L N Q K G K K K N F N K D S G L Y D D
gatctcaactagaaaggcaaaaagaaaaattttaataaagattcagggtatatacgacgat 720
S H S N I S G I S D Q S D L T A R S G G
tcacattcaaatatcaggtatctcagattagtcagatttaactgctaggtctgggtgc 780
S Q L D L S F D K G D D D D G N S S V V
tcttaattagatttatcattcgcacaagggtgatgatgatggtaaatagctcagttgtt 840
V T G E I K K G S L G A N G S M D S G V
gtaactggagaaattaaaaaaggttcttttaggtgctaacggaagatggattcaggtgta 900
L L A Q A M P D E M D P T G W Y A S E K
cttttagcttaagcaatgccagatgaaatggatccaactggctggatgcaagtgaaaaa 960
M D G V R A V W T G K T F Y S R N G N E
atggatggagtcagagctgtttgactggaaagacattttattctaggaatggtaacgaa 1020
F Y P P P F F I Q N F P N C T L D G E L
ttctaccctcctccatttttcatttaaaatcccaaattgcacttttagatggggaattg 1080
F T K R D D F Q R C V G I V K T K N G N
tttcaaaaagagatgatttctagcgttgtgtgggtattgttaagacaaaaaattggaat 1140
E E K D E R W K D I V Y L V Y D C P K L
gaagaaaaagatgaaaggtgaaagatattgtttacttagtttacgactgtcctaaatta 1200
L K P F K D R I K A L Q E Q I P K L G N
ttaaaccctttaagatagaataaaaagctttacaagaataaattccaaaacttggtaac 1260
K Y I K V L P H K I V E S R E Q L E S E
aagtacattaaagttctccacataagatagtgaggagcagagaaataactgaaatcagag 1320
L D R V L K N N G E G L M L R D P N S M
cttgatagagctttaaaaaataatggcgaaggtttgatgtaagagatcctaattcaatg 1380
Y E C R R S K T L L K V K T F T D E E A
tatgaatgcagaagatcaaaaacccttctaaggtaaaaacatttacagatgaagaagct 1440
T V I G S E R G E G R C A D M M G A L V
acagtaattgggagtgaaagaggtgaaggaagatgtgcagatagatgggtgcttttgta 1500
C R M K N G K E F K I G S G F N D D Q R
tgccgtatgaaaaatggaaaagaattcaaaataggatcaggattcaatgatgactaaaga 1560
R R P P K K G S V I T F K Y Q N L T K D

```

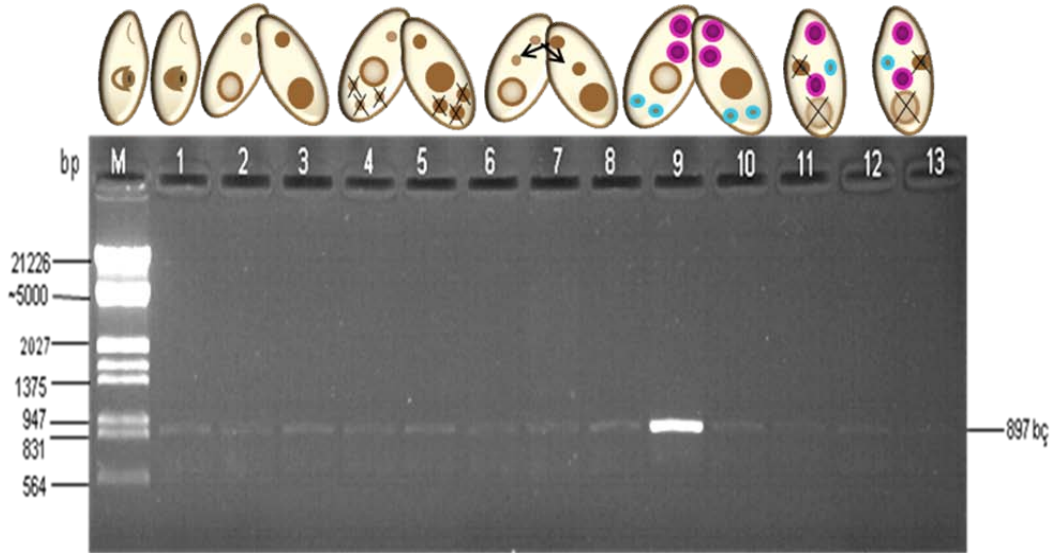
```
agaaggccacctaaaaaaggaagtgtgataacattcaataacccaaatcttaccaaagat 1620
G K P R F P I F L R I K E D E *
ggtaaccaagattccctatcttcttgagaataaaagaagacgaatgaatgaattaatta 1680
atagattgatggagagattatagcaaagttaattgatacaatttatttcatataataa 1740
tattttttacgcatttaaaagcaaaattataaatatttgcctttcaattgaataatt 1800
ctcttt
```

Şekil 3.16. TtLIG13 geninin mRNA dizisi.

Yukarıdaki şekilde altı çizilmiş olan diziler UTR bölgesini temsil etmektedir. 5' UTR bölgesindeki koyu gri gölgeli kısım IRES dizisini, kırmızı harflendirilmiş kısım uORF elementini, beyaz harfli gösterilen bölgeler MBE elementini göstermektedir. 3' UTR dizisindeki açık gri gölgeli bölge PAS dizisini temsil etmektedir. Dizinin açık okuma çerçevesinde nükleotidler ile aminoasitler bir arada verilmiştir. Aminoasit dizisi içinde glutamin ile gösterilen bazı kodonlar nokta mutasyonu ile değiştirilerek *E. coli* kodon sözlüğüne uygun duruma getirilmiştir, değiştirilen nükleotid italik olarak gösterilmiştir. Proteinin 3B yapı analizinde SWISS-PROT programı 298. Serin amino asitinden (kalın ve altı çizili) sonra gelen katalitik ligaz domain kısmının modelini oluşturabilmiştir.

3.2.3. TtLig13p Geni mRNA'sının Konjugasyon esnasında ifadesi

Tetrahymena thermophila SB210 ve TipIV hücrelerinin konjugasyonları esnasında her saat örnek alınmış ve toplamda 13 saatlik kısımdan saflaştırılan RNA'lardan elde edilen cDNA ürünleri, TtLIG13 geninin 897 bç'lik katalitik bölgesinin RT-PZR ile üretilmesinde kalıp olarak kullanılmıştır. Gerçekleştirilen agaroz jel analizi sonucunda konjugasyonun tüm evrelerinde bazal olarak transkripsiyonu gerçekleştiren genin, konjugasyonun 9. saatinde transkripsiyon seviyesinde fark edilir bir artış olduğu görülmüştür.

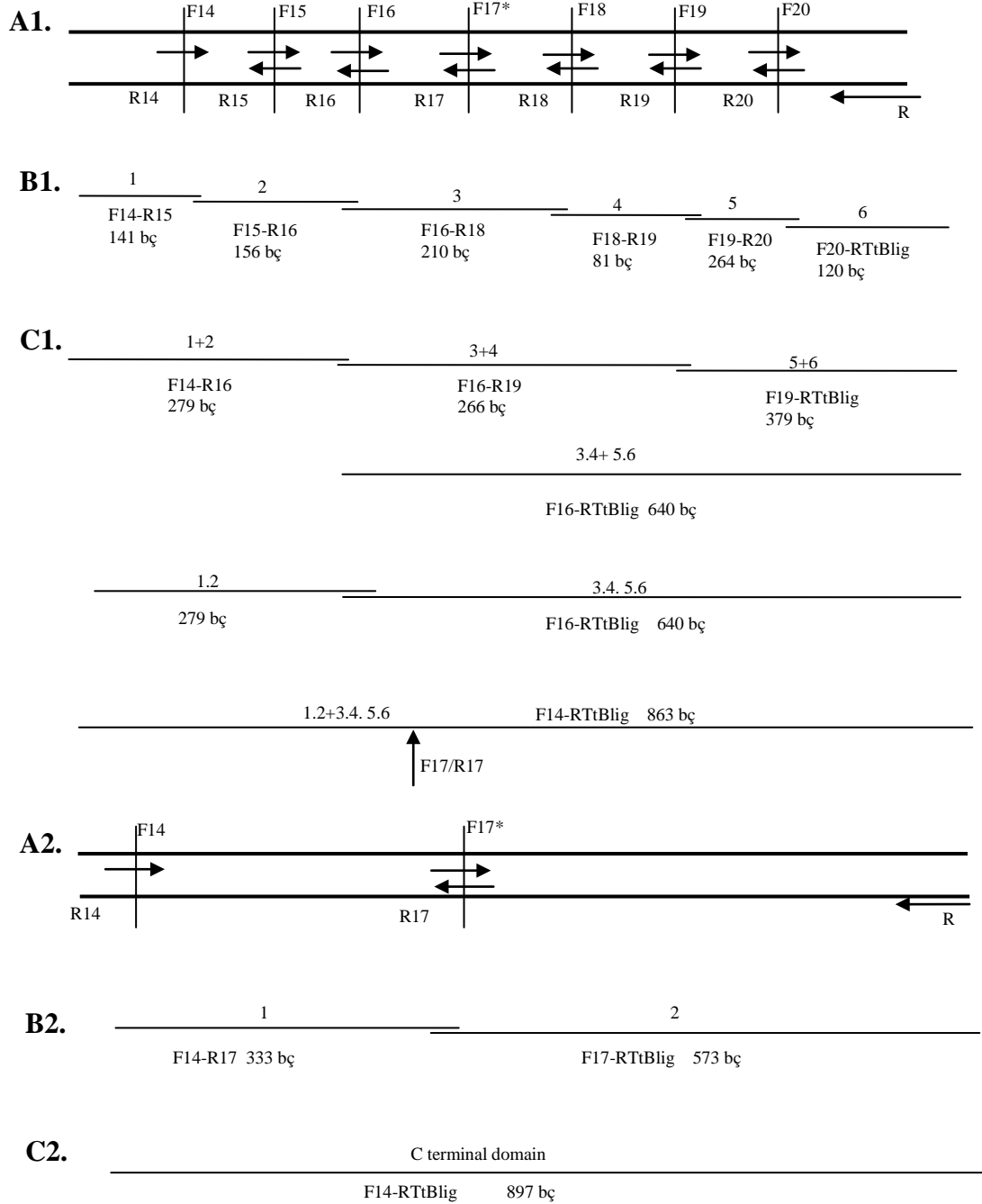


Şekil 3.17. TtLIG13 geninin konjugasyon boyunca mRNA ifade analizi. Şekilde 1-13. kuyular konjugasyonun 1-13. Saatlerini temsil etmektedir. Konjugasyonun her saatinde bazal bir mRNA ifadesinin varlığı ile 9. saatinde transkripsiyon seviyesinin artışı gözlenmiştir. Reaksiyonların 15'er µl'si %1'lik agaroz jele yüklenmiş, 90 V'da 50 dk elektroforez edilmiştir. M. Marker λEcoRI/HindIII (Fermentas).

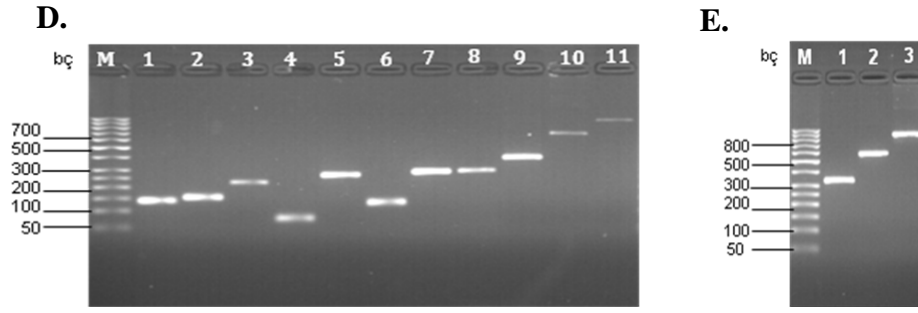
3.2.4. *E.coli*'de Rekombinant Protein Üretimi için TtLIG13 cDNA'sının Nokta Mutasyonları ile Kodon Optimizasyonu

TtLIG13 cDNA' sının mutasyon yerleştirilmesi gereken 22 adet bazının yerleri belirlenmiş ve gerekli primerler tasarlanmıştır. Genin büyük olması sebebiyle, mutasyonların cDNA'nın protein kodlayan dizinin protein üstünde N terminal ve C terminal bölgelerine denk gelen iki büyük parçasına ayrı ayrı yerleştirilmesine ve en son bu iki büyük parçanın birleştirilmesi ile bütün genin elde edilmesine karar verilmiştir. Buna uygun tasarlanan mutasyon yerleştirme stratejisine göre N-terminal bölgesine 15, C terminal bölgesine 7 mutasyonun (Şekil 3.18 A1 ve A2) yerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Mutasyonların hangi primerler vasıtasıyla ürünlere entegre edildiği, beklenen ürün büyüklükleri (Şekil 3.18 B1 ve B2), bu saflaştırılmış ürünlerin hangilerinin hangi sırayla PZR'de birleştirilme primerleri ile beklenen ürün büyüklükleri (Şekil 3.18 C1 ve C2) verilmiştir. C terminale tekabül eden bölgenin kodon optimizasyonun deneysel aşamalarda PZR ile elde edilen mutasyonlu ürünleri ve bu ürünlerin uzatılmış

dizileri Şekil 3.18 D ve E’de görülmektedir. N terminal bölgesinde benzer şekilde bir yaklaşı ile kodon optimizasyonuna alınmıştır (EK-8). Tüm mutasyonları taşıyan bu iki büyük parçanın birleştirilmesinin deneysel bulguları Şekil 3.19’de verilmiştir.

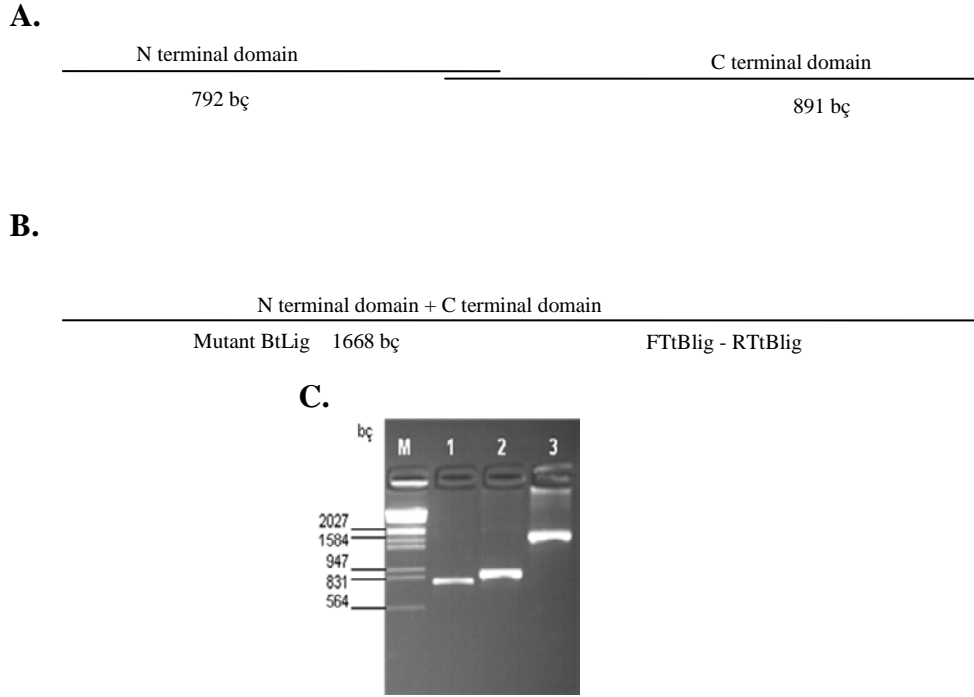


Şekil 3.18. *TtLIG13* C terminal’ine denk gelen bölgeye 7 nokta mutasyonunun iki aşamada yerleştirilmesi.



Şekil 3.18. TtLIG13 C terminal'ine denk gelen bölgeye 7 nokta mutasyonunun iki aşamada yerleştirilmesi (devam).

Şekilde, **A1 ve A2.'de Mutasyon yerleştirilmesi gereken bölgeler ve gerekli primerlerin belirlenmesi** görülmekte. Dizide mutasyon gerektiren bölgeler (dik çizgiler), kullanılacak ileri (sağ yönelmiş ok) ve geri (sola yönelmiş ok) primerler gösterilmiştir. Hedef mutasyonun TtLIG13 dizisine aktarılabilmesi için ileri ve geri primerlerin çiftler halinde (F14-R15, F15-R16) kullanıldığı PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çizimde, üzerinde “*” işareti bulunan F17/R17 primerleri, kullanılması durumunda elde edilecek ürünün çok küçük olması sebebiyle, ilk aşamada kullanılamamıştır. İşaretsiz primerler kullanılarak parçalar üretilmiş, birleştirilmiş ve mutasyon taşıyan bu parça kullanılarak “*” işaretli F17/R17 primerleri ile eksik mutasyonlar yerleştirilmiştir. **B1 ve B2. Mutasyon taşıyan parçaların PZR ile üretilmesi.** Şekilde çizgiler üretilen parçaları, çizgi üstüne parça numarası ve altında parçanın üretilmesi için kullanılan primer çifti ile ürün büyüklüğü gösterilmiştir. B1’de parçaların üretilmesi için işaretsiz primerler kullanılmış, B2’de ilk aşamada kullanılamayan F17/R17 primerleri kullanılmıştır. **C1 ve C2. Tüm mutasyonları taşıyan hedef ürünün elde edilmesi.** Üretilerek saflaştırılan parçalar, komplementer 3’ uçlarından birbirilerine megaprimer gibi davranması prensibi ile birleştirilmiş ve mutasyon taşıyan bütün parça elde edilmiştir. **D.** İlk aşama PZR çalışması ile mutasyon taşıyan ürünler elde edilmiştir (1-6. Kuyular). Bu ürünlerin birleştirilmesi ile ilk 6 mutasyonu taşıyan bütün parça üretilmiştir (7-11. Kuyular). **E.** İlk aşama PZR çalışması ile 6 mutasyonun yerleştirildiği parça kullanılarak F17/R17 primerleri ile kalan mutasyonu taşıyan 2 parça üretilmiş (1 ve 2), birleştirilmiş ve 7 mutasyonu taşıyan C terminal bölgesi elde edilmiştir (3. Kuyu). M. Marker Fermentas 50 bp DNA Ladder.



Şekil 3.19. Tüm mutasyonları taşıyan TtLIG13 DNA parçalarının dizinin bütünleştirilmesi.

A. Mutasyonların yerleştirilmesi çalışmasında N ve C terminal bölgeleri ayrı parçalar halinde üretildiler. **B.** N ve C terminal bölgelerinin birleştirilmesiyle 22 mutasyonu taşıyan TtLIG13 geni elde edildi. **C.** M. Marker λEcoRI/HindIII (Fermentas), 1. Mutasyon taşıyan TtLIG13 N terminal bölgesi, 2. Mutasyon taşıyan TtLIG13 C terminal bölgesi, 3. N ve C terminal bölgelerin birleştirilmesi ile üretilen mutant TtLIG13 geni.

Dizi analizi sonucunda elde edilen verideki vektör bilgisi NCBI veri tabanındaki VecScreen programı ile uzaklaştırılmış, bu bilginin veri tabanından elde edilen dizi ile hizalanmasında, EBI ClustalW2 programından yararlanılmıştır. Hizalama çalışmalarında, TtLIG13 bütün dizi için FBt7 primeri kullanılarak elde edilen veri doğrudan, RBt8 ve FDiziAnalizpGem primeri kullanılarak elde edilen dizi ise ters komplementleri alınarak kullanıldığında; TtLIG13 kısa dizi verileri ise doğrudan kullanıldığında örtüşme elde edilmiştir.

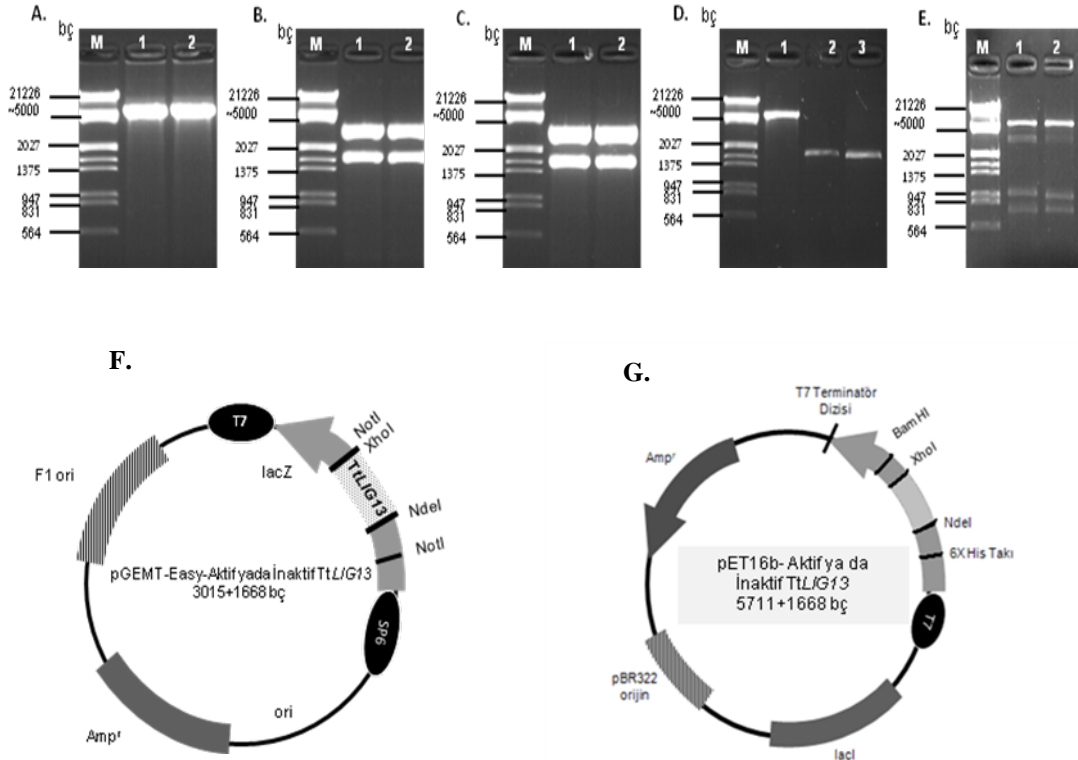
Hizalama çalışması sonrası tüm mutasyonların doğru şekilde yerleştiği görülmüştür. Fakat hatalı tasarlandığı mutasyon çalışmalarından sonra fark edilen FBt4 ve RBt4 ile oluşturulan beşinci mutasyonda, genin bu bölgesinin glutamin yerine glutamat kodlayan kodona değiştirildiği görülmüştür. Ayrıca FBt16 primerinin 3' ucundaki 9 nükleotidin primerin 5' ucuna yazılarak sipariş edildiği

ve mutasyon çalışmalarında da bu şekilde kullanıldığı fark edilmiştir. *TtLIG13* geninin mutasyon yerleştirilmiş kısa ve uzun dizilerinin dizi analizi sonucunda elde edilen verilerin *TtLIG13* cDNA'sı ile hizalanması sonucu, 18. mutasyona denk gelen bu bölgede, primer hatası nedeniyle oluşması beklenen translokasyon görülmemiş; yerleştirilmiş olan mutasyonun dışında, genin cDNA'sından farklı bir diziye rastlanmamıştır.

Materyal ve Yöntem bölümünde bahsedildiği şekilde genin 4 formunun (*TtLIG13*, *TtLIG13-KD*, *in-TtLIG13*, *in-TtLIG13-KD*) aynı yöntem ile oluşturulması planlanmış ve başarılı olunmuştur. Dizinin tüm formlarının üretilmesine yönelik çalışma stratejileri, bulguları ile dizi analizi çalışmasından elde edilen veriler ve histogramları EK- 9, 10 ve 11'de mevcuttur.

3.2.5. *TtLIG13* Geninin Üretilen 4 Formunun Protein İfade vektör ve hücrelerine Aktarılması

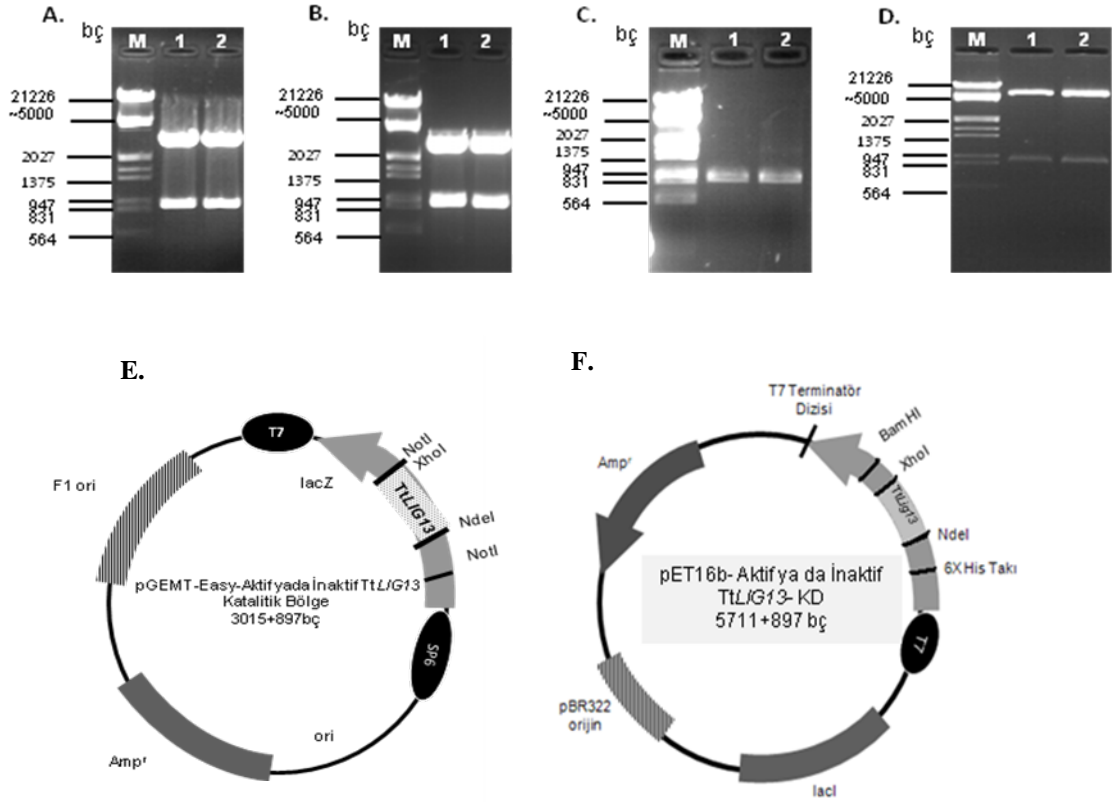
Rekombinant protein olarak 6XHis afinite takısı ile üretilmesi *E.coli*'de planlanan diziler, bu takıyı bulunduran pET16b vektörünün çoklu klonlama bölgesinde yer alan NdeI ve XhoI kısımlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Tüm mutasyonlu gen formlarının dış primerlerine NdeI (ileri primer) ve XhoI (geri primer) restriksiyon endonükleaz enzimi tanıma dizisi yerleştirilmiş ve PZR ile çoğaltılarak tekrar pGEM-TEasy vektörüne klonlanmıştır. pET16b vektörü (Şekil 3.20 A) ve mutasyonu DNA'ları içeren pGEMT-Easy vektörleri (Şekil 3.20 B ve C) bu iki enzim ile kesim reaksiyonuna alınmış (Şekil 3.20 A, B, C, ve 3.21 A, B) ve jelden ilgili bantlar saflaştırılarak (Şekil 3.20 D) ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Oluşturulan pET16b vektör formları (pET16b-*TtLIG13*, pET16b-*TtLIG13-KD*, pET16b-*in-TtLIG13*, pET16b-*in-TtLIG13-KD*) *E.coli* XL-1 Blue konakçısına sıcaklık şoku ile transforme edilmiş, pozitif klonlardan izole edilen plazmitler kesim reaksiyonu ile kontrol edildikten (Şekil 3.20 E) sonra *E.coli* BL21 DE3 pLySs konakçısına sıcaklık şoku ile transforme edilmiştir.



Şekil 3.20: Aktif ve inaktif *TtLIG13*-pGEMT Easy vektörlerinin NdeI-XhoI restriksiyon enzimleri ile ikili kesimleri, saflaştırılması ve aynı enzimler ile kesilmiş pET16b vektörüne klonlanması.

Şekilde, **A.** pET16b vektörünün ikili kesimi sonucu oluşan 5711 bç büyüklüğündeki lineer ifade vektörü. **B** ve **C** Sırası ile *TtLIG13*-pGEMT Easy ve İn-*TtLIG13*-pGEMT Easy vektörlerinin ikili kesimi sonucu oluşan 3kb büyüklüğündeki pGEMT-Easy vektörü ile 1668 bç büyüklüğündeki insert bantları. Şekil A'daki vektör bantları ile B ve C'deki insert bantları jelden kesilerek saflaştırılmış ve saflaştırma ürünleri ile **D** figürü elde edilmiştir. D1, D2 ve D3 sırasıyla ikili enzim kesim reaksiyonundan sonra jelden saflaştırılmış pET16b, *TtLIG13* ve İn-*TtLIG13*. E1 ve E2. pET16b vektörüne aktarılarak *E. coli* XL-1 hücrelerine klonlanan sırası ile pET16b- *TtLIG13* (2. Koloniden) ve pET16b-in- *TtLIG13* (9. Koloniden) plazmitlerinin saflaştırılarak BamHI-NdeI ikili kesimi ile kontrolü. Kesim sonucu, beklendiği gibi 5711 bç'de vektör bandı, 930 ve 730 bç'de insert bantları görülmekte. F. *TtLIG13*-pGEMT Easy ve İn-

TtLIG13- pGEMT Easy vektörleri ve G. pET16b-TtLIG13 ve pET16b-in-TtLIG13 vektörleri görülmekte. M. Marker λ EcoRI/HindIII (Fermentas).

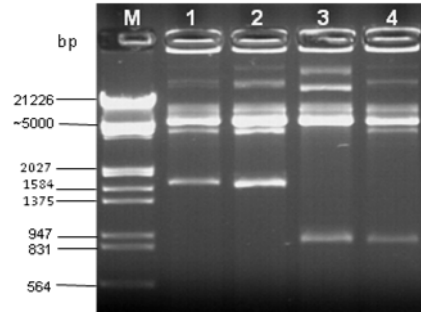


Şekil 3.21: Aktif ve inaktif TtLIG13-KD-pGEMT Easy vektörlerinin NdeI-XhoI restriksiyon enzimleri ile ikili kesimleri, saflaştırılması ve aynı enzimler ile kesilmiş pET16b vektörüne klonlanması.

Şekilde A. ve B sırası ile TtLIG13-KD-pGEMT Easy ve İn-TtLIG13-KD-pGEMT Easy vektörlerinin ikili kesimi sonucu oluşan 3kb büyüklüğündeki pGEMT-Easy vektörü ile 897 bç büyüklüğündeki insert bantları. C.Jelden kesilerek saflaştırılan insert bantları görülmekte. Şekil X. D1'de görülen saflaştırılmış vektör ile Şekil Y.C1 ve C2'deki insertlerin ligasyon ürünleri *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine transforme edilmiş, klonlardan plazmit izolasyonu ile elde edilen plazmitler NdeI-XhoI ikili kesimi ile kontrol edilmiştir. Şekil D1 ve D2'de pET16b- TtLIG13-KD (5. Koloniden) ve pET16b-in- TtLIG13-KD (5.

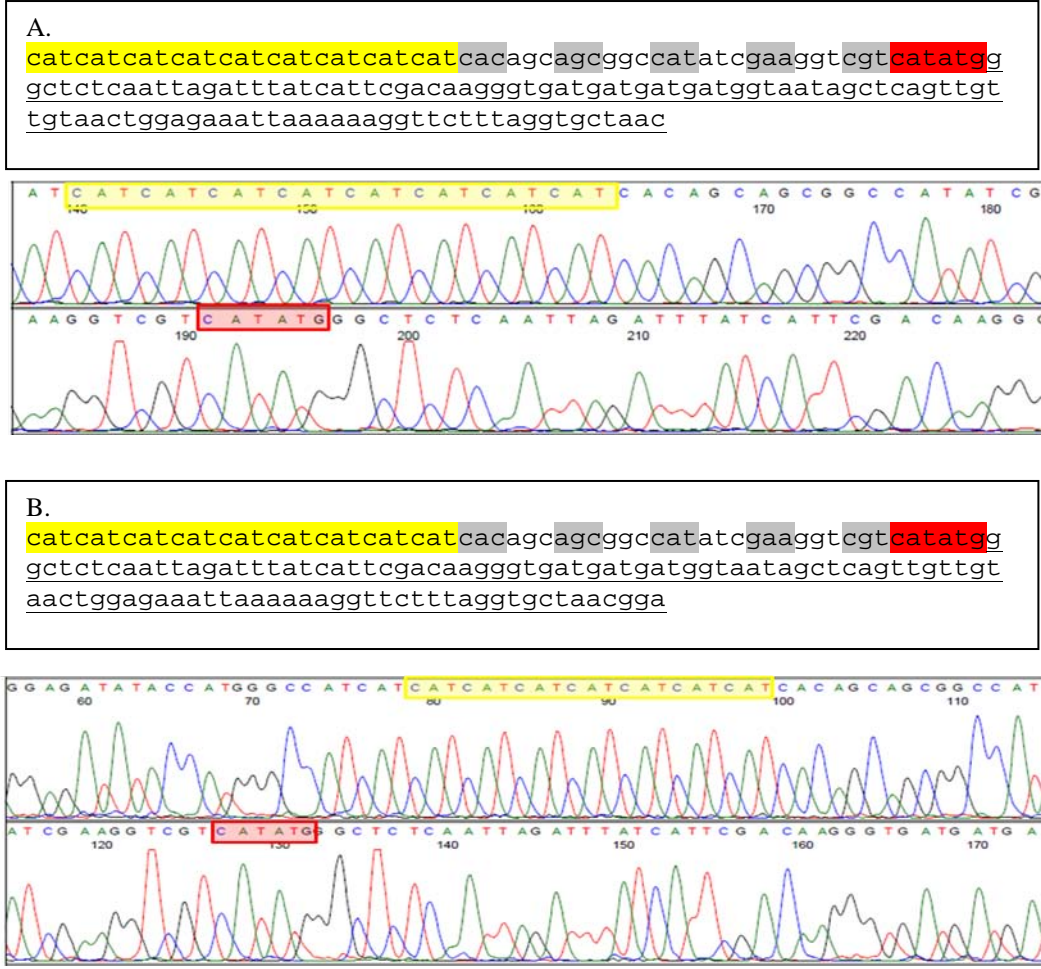
Koloniden) plazmitlerinin ikili kesimi sonucu, beklenendiği gibi 5711 bç'de vektör bandı ve 897 bç'de insert bantları oluştuğu görülmekte. E. Tt*LIG13*-KD-pGEMT Easy ve İN-Tt*LIG13*-KD-pGEMT Easy vektörleri ve F. pET16b-Tt*LIG13*-KD ve pET16b-in- Tt*LIG13*-KD vektörleri görülmekte. M. Marker λ EcoRI/HindIII (Fermentas).

Transformasyon ürünü oluşan kolonilerden izole edilen plazmitler NdeI-XhoI ikili kesimi ile teyit edilmiş (Şekil 3.22) ve başlangıç kodonlarının pET16b vektöründe bulunan Histidin kuyruğu ile aynı çerçevede bulunduğu dizi analizi ile belirlenmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.22: *E.coli* BL21 DE3 pLySs konakçısından saflaştırılarak NdeI-XhoI ikili kesim reaksiyonuna alınan pET16b vektörleri.

Şekilde 1 ve 2.'de sırası ile pET16b-Tt*LIG13* ve pET16b-in-Tt*LIG13* vektörlerinin kesim reaksiyonu sonucu 5711 bç'de vektör bandı ve 1668 bç'de insert bandı oluşmuştur. 3 ve 4.'de pET16b-Tt*LIG13*-KD ve pET16b-in-Tt*LIG13*-KD vektörlerinin kesim reaksiyonu sonucu oluşan 5711 bç'de vektör bandı ile 897 bç'de insert bantlarının oluştuğu görülmekte. M. Marker λ EcoRI/HindIII (Fermentas).



Şekil 3.23. pET16b-TtLIG13-KD ve pET16b-in-TtLIG13-KD'nin RBt15 primeri ile dizi analizi sonucu.

Şekilde sarı renkle gölgelendirilmiş dizi histidin kuyruğu, kırmızı ile gölgelendirilmiş dizi ise insertlerin ve çoklu klonlama bölgesinde 5' ucunda yer alan NdeI enzimi tanıma dizisini belirtmektedir. Kromotogram üzerinde histidin kuyruk sarı çerçeve ile, enzim tanıma bölgesi ise kırmızı çerçeve ile gösterilmiştir. Enzim tanıma bölgesindeki ATG ile histidin kuyruk arasındaki 3'lü çerçeveler sırayla gri gölgeli ve gölgesiz olarak gösterilmiş ve çerçeve kayması olmadığı görülmüştür. İnserte ait diziler altı çizili olarak gösterilmiştir. Şekilde A. Üstte, pET16b-TtLIG13-KD'nin dizi analizi sonucu elde edilen dizi ve altta kromotogramı; B. Üstte, pET16b-in-TtLIG13-KD'nin dizi analizi sonucu elde edilen dizi ve altta bu diziye ait kromotogram verilmiştir.

4.TARTIŞMA

Genom bilgisi deşifre edilmiş tek hücreli *Tetrahymena thermophila*'nın, konjugasyon sonrası makronükleer gelişimi, ploidi oluşumu gibi farklılaşma evreleri ve yaklaşık üç saatte bir tekrarlanan eşeysiz üremesinde gerçekleşen DNA yapım ve onarımı sürecinde, ihtiyaç duyduğu enzimlerin başında DNA kırıklarının birleştirilmesinde görev alan DNA ligaz enzimi gelmektedir [19]. DNA ligaz enziminin iki DNA parçasının in vitro koşullarda birleştirilmesinde sergilediği etkin enzimatik yeterlilik, onu moleküler ve biyoteknoloji laboratuvar çalışmalarının vazgeçilmez enzimi kılmıştır [4, 12, 13]. Biyoteknolojik ürünleşme hedefli planlanan bu tez kapsamında yapılan in silico araştırmalar; *Tetrahymena thermophila* ligazlarından TtLig13p'nin rekombinant üretilmesi durumunda, *Chlorella* ve T4 virüs ligazlarına yakın benzerlikler göstermesinden dolayı benzer ligaz enzim özelliklerine sahip olabileceğini ve biyoteknolojik ürün olarak pazarlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Tetrahymena genom veritabanında yapılan araştırmalar, *Tetrahymena*'nın, biri Ligaz IV grubuna giren toplam 4 adet ATP bağımlı DNA ligaz enzimi bulundurduğunu göstermiştir. TGD'de "DNA Ligaz" anahtar kelimesiyle yapılan aramada, bulunan beş diziden birinin (TTHERM_00659030 / XM_001024104) DNA ligazlara özgü KxDGxR motifini KxDG şeklinde taşıdığı için yapılan aramada sonuçlar arasına girdiğini; fakat ilk motifin tamamını taşımadığı gibi diğer beş motifi de taşımadığından *Tetrahymena* DNA ligazları arasında değerlendirilmemiş, bu nedenle üye sayısı dört olarak belirlenmiştir.

Belirlenmiş olan bu dört *Tetrahymena* DNA ligazını içeren, "Kovalent nükleotidil transferaz" süperenzim ailesini temsil eden üyeler [12,13] ile oluşturulan köklü ve köksüz filogenetik ağaçlar (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3) incelendiğinde, NAD bağımlı DNA ligazların atasal grup olarak davrandığı görülmüştür. Yutin ve Koonin [52] NCLDV (Nükleo-sitoplazmik Büyük DNA Virüsleri/ Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses) DNA ligazları ile yaptıkları filogenetik çalışmalar sonucunda, atasal NCLD virüsünün NAD bağımlı DNA ligaz taşıdığı çıkarılmasına ulaşmışlardır. Detaylandırılan çalışmalar sonucunda, bazı NCLD virüslerinin, ökaryogenezisin bir etkisi olarak, konakçıları ile etkileşimleri esnasında gerçekleşen horizontal gen transferi ile ATP bağımlı ligaz

geni kazanarak, NAD bağımlı ligazlarını kaybettiği ileri sürülmüştür [52]. Bu çalışmada oluşturulan filogenetik ağaçta, NAD bağımlı ligazların atasal grubu oluşturmaları (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3), Yutin ve Koonin'in biyoinformatik araştırma sonuçlarına dayanan bu önerilerinin yanında; deneysel literatürlere dayanan şu veriler ile desteklenmektedir: 1) NAD bağımlı ligazların canlılar ailemindeki dağılımları öbakteriler ile sınırlıdır. 2) Öbakteri olmasına karşın *H. influenzae*, eksikliğinde ölümüne neden olacak bir görev üstlenmiş olan ATP bağımlı DNA ligaz enzimi taşımaktadır [11]. Ayrıca yine bir öbakteri olan *Bacillus subtilis*'de hayati önemi olmamasına karşın ATP bağımlı DNA ligaz taşımaktadır [11,13]. ATP bağımlı DNA Ligaz genlerinin öbakterilerde bulunması, bakteriyofajlar ile gerçekleşen gen transferi ile açıklanmaya çalışılmıştır [13]. Bu tez çalışmasında ise, *H. influenzae* ATP bağımlı DNA ligaz enziminin, bakteri ligazları ve “bakteri ve virüs ligazlarına yakınlık gösteren omurgasız ligazlarından” önce evrimleştiği görülmüştür. Bu grubun bulunduğu ana dal yakından incelendiğinde; PBCV1'in farklılaşmasından sonra bir dalın % 46 ile desteklenen bir değer ile ikiye dallanarak bir grubun *Vibrio phage*, T4 DNA ligaz ile ökaryotik virüs olan *Marseille virus*'lere farklılaştığı; diğer bir dalın ise *H. Influenzae*'nin dış grup olarak davrandığı bakteri ve silli ligazlarını oluşturduğu görülmektedir. Farklılaşmanın bu sıra ile gelişmiş olması, virüslerin önce ATP bağımlı DNA ligaz enzimini kazanmaları ve bunu *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Vibrio sp.* bakterileri gibi konakçıları ile etkileştikleri esnada konakçılarına aktardığını düşündürmektedir. Zira PBCV-1 ve *Marseille virus*'ün atasal NAD bağımlı ligazlarını, evrimsel gelişimleri esnasında kaybederek, bakteri ve aynı konakçının iki farklı faj tarafından enfekte edilmesi ile faj kaynaklı ATP bağımlı DNA ligaz geni kazanmış olabileceği önceki çalışmalarda belirtilmiştir [52].

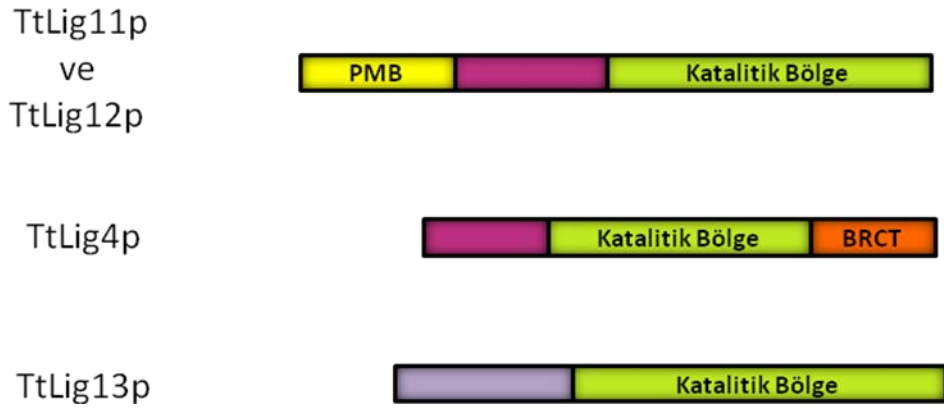
Filogenetik ağaçta dikkat çeken bir diğer husus ise *Vaccinia virus* DNA ligazının, omurgalılara özgü Ligaz III grubunda yer almasıdır. Yutin ve Koonin bu duruma dikkat çekerek; koanoflagellatlardan *Monosiga brevicola* ile bir amip olan *Dictyostelium discoideum* DNA ligazının da bu grupta yer aldığını belirtmişlerdir [52]. Bu duruma, Ligaz III'ün, ökaryotik hücrelerin atası olan silli ve kamçılı tek hücreliler yani unikontların evrimi esnasında, Ligaz IV'ün duplikasyonu ile oluşarak, evrimin ilerleyen evrelerinde fungi ve çeşitli hayvan

hatlarında kaybedilmiş olabileceği ile açıklama getirmişlerdir [52]. Yapılarına bakıldığında Ligaz IV ile süperkoil mitokondri DNA'sının tamirinde de görev yapan Ligaz III'ün, tüm ligazların ortak yapısı olan katalitik bölgeye ek olarak BRCT domaini taşıdığı görülmektedir [11-13]. BRCT domaini, NAD bağımlı bakteri ligazlarında süperkoil yapıdaki DNA'nın tamirinde önemli alternatifsiz görev alan temel bir domain olarak yer almıştır [53]. Tetrahymena ligazlarından sadece Ligaz IV grubunda yer alan TtLig4p'nin BRCT domaini taşıdığı NCBI çalışmalarında belirlenmiş olup (Şekil 4.1), bu enzimin *Tetrahymena*'da bulunmayan Ligaz III'ün görevini üstelenerek mitokondri DNA'sında görev yapabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezin lokalizasyon çalışmaları ile teyit edilmesi Tetrahymena ve Ligaz III taşımayan diğer omurgasız ökaryotlar için önem taşımaktadır.

Ağacın kalanı incelendiğinde Tetrahymena'nın Ligaz I olarak tanımlanmış olan iki ligaz enzimi TtLig11p ve TtLig12p'nin Ligaz I grubunda; Ligaz IV olarak tanımlanmış olan TtLig4p enziminin de Ligaz IV grubunda yerleşim gösterdiği görülmüştür. TtLig4p'nin Ligaz IV grubundaki yeri BRCT domaini taşıdığı belirlenmesi ile kesinlik kazanmış olup; TtLig11p ve TtLig12p'nin Ligaz I grubundaki yerinin teyit edilmesi amacıyla bu iki proteinin Ligaz I'ler için karakteristik olan PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen/Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni) bağlanma domainine ait motifleri taşıyıp taşımadığı analiz edilmiştir. PCNA bağlanma domainleri genellikle PIP-kutusu yada KA-kutusu taşıdığı önceki çalışmalarda belirtilmiş olup; PIP-kutusu **Q-xx-(h)-x-x-(a)-(a)** şeklindedir [54]. Dizide (h) şeklinde belirtilen pozisyonda hidrofobik yan zincir taşıyan aminoasitler (A, Alanin; I, İzolösin; L, Lösin; M, Metionin; F, Fenilalanin; W, Triptofan; Y, Tirozin; V, Valin) ; (a) şeklinde belirtilen pozisyonda ise aromatik hidrofobik yan zincir taşıyan aminoasitler (F, Fenilalanin; W, Triptofan, Y, Tirozin) dizilim göstermelidir. KA-kutusu ise **K-A-(A/L/I)-(A/L/Q)-x-x-(L/V)** şeklinde dizilim göstermektedir [54]. PIP-kutusunu TtLig11 **QDPLEIQYF** şeklinde; TtLig 12 ise **QGTIKNFF** şeklinde taşırken; KA-kutusunu TtLig11p taşımamakta ve TtLig12p ise **KSIQVIL** şeklinde taşımaktadır. Analiz sonucu TtLig11'in PIP-kutusuna yüksek benzerlik gösteren motifinde bir aminoasit (altı çizilerek gösterilmiş olan E, I yada Q) fazlası

vardır. TtLig11p, ayrıca insan p21 proteini PCNA bağlanma bölgesinde bulunan siklin bağlanma motifi olan **KRLIFS**'a benzer **SSLIFS** motifi taşımaktadır [55]. Bu enzimin filogenetik ağaçta Ligaz I'lere dış grup olarak yerleşim göstermiş olması ve PIP kutusundaki düşük benzerlik LigI'in ilkel bir üyesi olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan domain ve motif analizleri TtLig13p'nin Adenilasyon domaini ve Oligonükleotid bağanma domaininden oluşan katalitik bölge dışında tanımlanmış herhangi bir domain yada motif taşımadığı görülmüş ve *Tetrahymena* DNA ligazlarının temsili yapısı Şekil 4.1'deki gibi şematize edilmiştir.



Şekil 4.1. *Tetrahymena* DNA ligazlarının şematik yapısı.

Şekilde, TtLig11p ve TtLig12p filogenetik ağaçta Ligaz I üyeleri ile birlikte yerleşim göstermesi ve ökaryotik DNA Ligaz I enzimlerine karakteristik PCNA bağlanma motifi (PBM) taşıması itibari ile Ligaz I grubunda; TtLig4 filogenetik ağaçta Ligaz 4 kladında yer alması Zn motifi taşımazken BRCT domaini taşıması nedeni ile Ligaz 4 grubunda yer almaktadır. TtLig13p DNA ligaz enziminin filogenetik ağaçtaki bakteri ve virüs ligazları arasındaki yerleşimi tanımlanmış hiçbir ek motif yada domain taşıması ile netlik kazanmıştır.

DNA Ligazların biyolojik görevleri ve aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma mevcutken; filogenetik ilişkilerine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur [52]. Bu çalışma kapsamında Nükleotidil Transferaz Süperailisi enzimlerinin filogenetik ilişkileri ortaya koyulmaya çalışılmış ve prokaryot\virüs ligazları ile güçlü yakınlık gösteren ökaryotik DNA ligazların var olduğu görülmüştür.

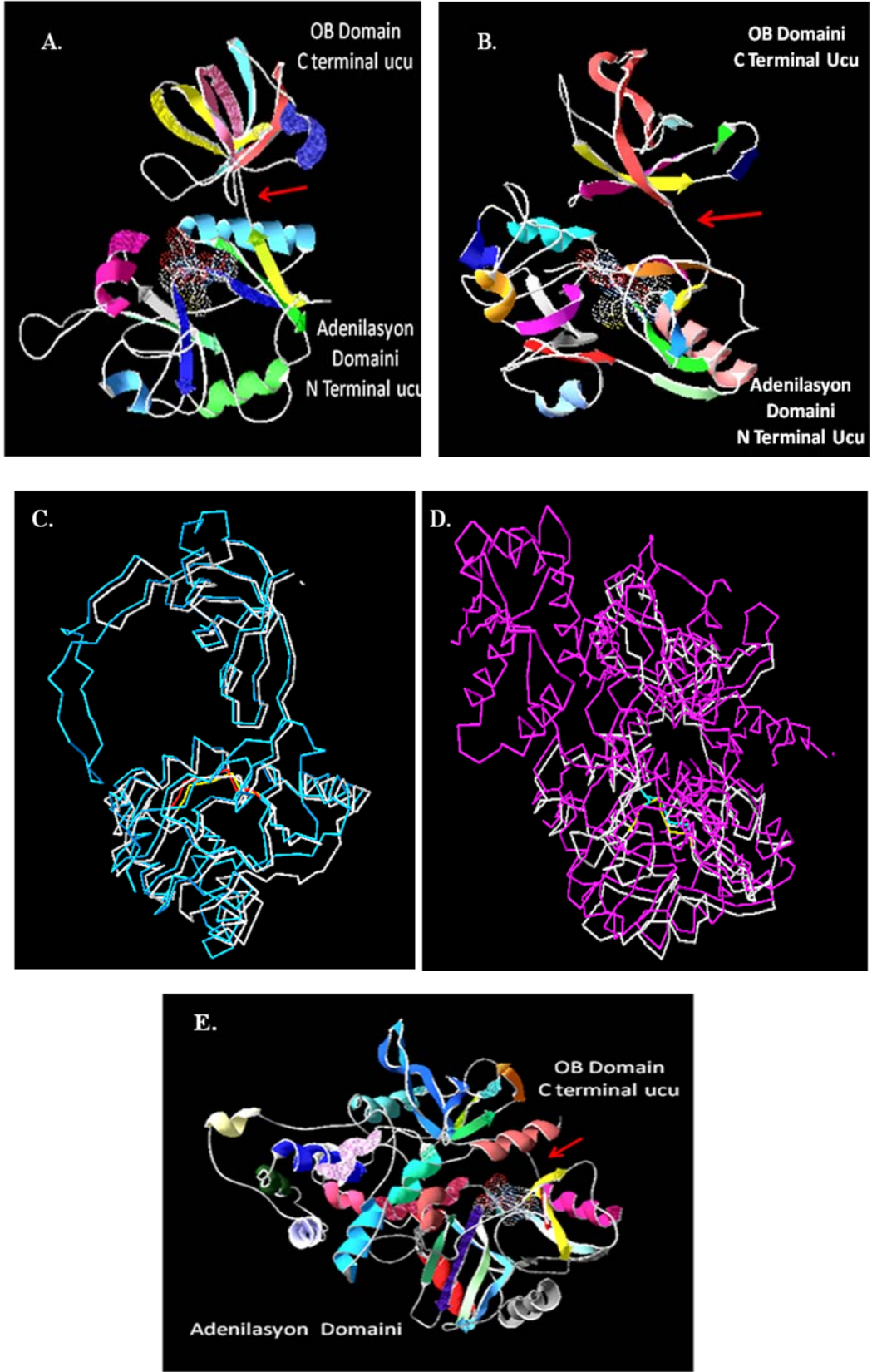
Yapılan ek analizler bu üyelerin tamamının omurgasız canlılarda var olduğunu göstermiştir. DNA Ligaz III enziminin evrimin ilerleyen safhalarında fungi ve çeşitli hayvan hatlarında kaybolarak yalnızca omurgalılarda temsil edilmesi hipotezine [52] benzer bir hipotez ile omurgasızlar ile sınırlı dağılım gösteren bu ligaz türünün yüksek organizmalara hiç aktarılamamış yada evrimsel gelişim esnasında kaybolmuş olabileceği öne sürülmekte ve bu ligazlara **DNA Ligaz II** isminin verilmesi önerilmektedir. Böyle bir ligaz grubuna giren TtLig13p'nin yüksek seç-bağla değeri ile bakteri gruplarına yakınlık gösterdiği görülmüş (Şekil 3.3 ve 3.4), bu sonuç % benzerlik analizleri ile desteklenmiştir.

Filogenetik analiz ve benzerlik matrisi bulguları ile ticari olarak pazarlanan T4 DNA ligazı ile birçok DNA ligaz özelliği bilinen PBCV-1 ligazına yakınlığı belirlenen TtLig13p tüm DNA ligaz motiflerini taşımaktadır (Şekil 3.9). TtLig13p'ün KMDGVR 1. motifindeki “Valin” aminoasidinin T3, T7 ve *H. influenzae* ile aynı olduğu görülmüş fakat taşıdığı önemin ne olduğu henüz anlaşılamamıştır (Şekil 3.10). PBCV-1 DNA ligazının motifleri üzerindeki korunmuş diziler ile yapılan mutasyonel analizler sonucunda [17], birinci motifteki K27 -lizin- aminoasidinin, AMP'nin bağlanması ile enzim-adenilat kompleksi oluşumunda kritik rol oynarken; D29 -Aspartik asit- aminoasidinin ise reaksiyonun ikinci basamağında AMP'nin enzimden DNA'ya aktarılmasındaki rolünün kritik olmasının yanında aynı basamakta divalent metal iyonu bağladığı bulunmuştur. Bu motifteki G30 -Glisin- ve R32 -Arjinin- amino asitleri ve üçüncü motifteki D65 -Aspartik asit- arasında, adenilasyon ve ligasyonun gerçekleşmesindeki önemi mutasyonel analizler yoluyla gösterilmiş olan, tuz köprüsü oluşur. Arjinin aminoasidi, ayrıca reaksiyonun birinci basamağında AMP'nin 3'-O'ni ile bağ kurar, reaksiyonun üçüncü adımında ise bu bağın 3'-O'den 2'-O'e taşınmasıyla, AMP'nin 3' ucunun DNA substranının 5' ucuna bağlanması için enzim tarafından serbest bırakıldığı deneysel olarak aydınlatılmıştır. Şekil 3.10 incelendiğinde, motif III'deki D -Aspartik asit-, G -Glisin- ve E -Glutamik asit- aminoasitlerinin tüm gruplarda korunduğu söylenebilir. PBCV-1'deki detaylı mutasyonel analizler ile Aspartik asitin (D65) motif I'deki arjinin ve glisin ile tuz köprüsü kurarak enzimin bu pozisyonunu koruduğunu; Glutamik asitin (G67) enzime bağlanmış olan AMP'nin

stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Bu pozisyondaki Glutamik asit, T7 DNA ligazında, AMP'nin 2'-O' ni ile etkileşime girer [17]. PBCV-1'e daha yakın olması sebebiyle TtLIG13p'nin Motif III'de bulunan glutamik asidinin de stabilizasyonda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu motifteki Glisin aminoasidinin rolü henüz aydınlatılamamıştır. Motif IIIa'da PBCV-1 DNA ligazında, enzime bağlı AMP'nin pürin bazı ile etkileşim durumunda bulunan F(98) -Fenilalanin- aminoasidi bulunurken, TtLIG13p'nin aynı pozisyonunda pürin bazı ile etkileşim kurabilecek yapıda aromatik yan grup taşıyan Y – Tirozin- aminoasidi bulunur ve her ikisi de hidrofobik yan zincir taşıyan aminoasitlerdir [17]. Motif IV E – Glutamik asit- ve G –glisin- aminoasitleri ile başlayarak 3 hidrofobik aminoasit ile sonlanır. Glutamik asidin reaksiyonun birinci basamağında metal iyonu bağlayarak motif I'deki lizin amino asidini aktive ettiği tahmin edilmekte olup reaksiyonun diğer basamaklarındaki görevinin kritik olmadığı belirlenmiştir. Metal bağlanma bölgeleri reaksiyon adımları süresince yer değiştirerek ikinci adımda bu rolü birinci motifteki Arjinin üstlenir [17].

Deneysel çalışmalarda kullanılan TtLig13p'nin 3B modellemesi Expasy veri tabanında PBCV-1 ve *Pyrococcus furiosus* DNA ligazının deneysel 3B yapılandırılması sonucuna göre gerçekleştirilmiş olup; iki yapının da genel topolojilerinde belirgin farklılık olmadığı görülmektedir (Şekil 4.2 A ve B). Benzerlik matrisleri (Şekil 3.6 ve 3.7) incelendiğinde TtLig13p'nin PBCV1'e benzerliği 23.9, *P. furiosus*'a benzerliği ise 28.6 olup, bu derece yakın benzerlik değerleri 3B yapı topolojisine de uygunluk göstermektedir. Şekiller yakından incelendiğinde *Pyrococcus furiosus* temelinde gerçekleştirilmiş 3B yapılandırmasının Adenilasyon domaninde α katlanmalarının ve OB domaininde β katlanmalarının zenginliği söz konusudur. Biyoinformatik olarak şekillendirilmiş olan TtLig13p'nin 3B yapısının, kristal yapıları deneysel olarak elde edilmiş PBCV1 ve *Pyrococcus furiosus* DNA ligazları ile örtüştürülerek elde edilen karşılaştırmalı yapı analizi ise (Şekil 4.2 C ve D) TtLig13p'nin PBCV1'e genel topoloji itibari ile daha çok benzediğini göstermektedir. Her iki biyoinformatik değerlendirmede de bulucu olarak gönderilen TtLig13p dizisinin sadece katalitik bölgesi değerlendirmeye alınmış olduğundan; 569 aa

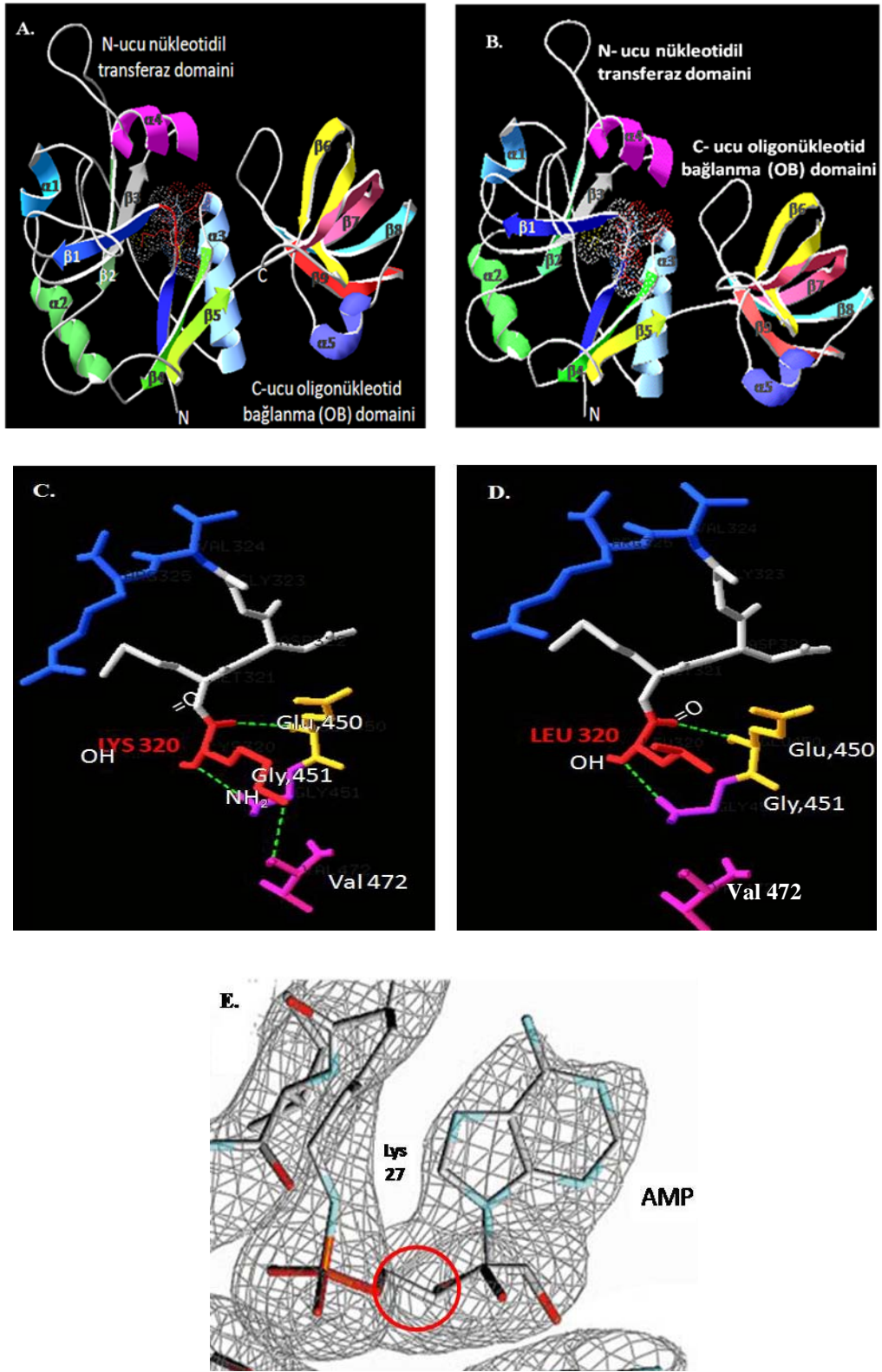
uzunluğundaki *Pyrococcus furiosus* DNA ligazına göre oluşan bilgi kaybı Şekil 4.2 D’de göze çarpmaktadır. Bu iki biyoinformatik yapılandırma sonucu deneysel olarak elde edilmiş PBCV-1 ve ticari olarak satılmakta olan biyoinformatik olarak şekillendirilmiş T4 DNA ligazı ile karşılaştırıldığında ise (Şekil 4.2 E); daha az sayıda α katlanması göstermesi ve β katlanmalarının daha kısa olması nedeniyle TtLig13p’nin T4 DNA ligazına göre daha küçük bir katalitik bölgesinin bulunduğu düşünülmektedir. Bulucu olarak gönderilen dizinin kalıp dizilere benzerliği 3B modelleme açısından %26 (PBCV1) ve %24 (*Pyrococcus furiosus*) olduğundan oluşturulmuş 3B yapılandırmalar TtLig13p’nin gerçek topolojisini yansıtmamaktadır. Sahip olduğu bu yapı ve dizi farklılıkları yanında üyesi bulunduğu viral-prokaryotik orijinli karakterler taşıyan ökaryotik enzim ailesinin hiçbir üyesinin kristallografik yapı analizlerinin bulunmaması, TtLig13’ün kristallografik yapı analiz deneyleri ile araştırılması ihtiyacını ortaya koymuştur.



Şekil 4.2. TtLig13p DNA ligaz enziminin iki farklı deneysel kalıba göre 3B modellemesi ile T4 DNA Ligazın teorik 3B yapısı.

Şekil 4.2’de TtLig13p DNA ligaz enziminin **A.** PBCV-1 DNA Ligaz enziminin deneysel olarak oluşturulmuş kristal yapısına göre **B.** *Pyrococcus furiosus* DNA Ligaz enziminin deneysel olarak oluşturulmuş kristal yapısına göre biyoinformatik olarak şekillendirilmiş 3B yapı analizi görülmektedir. **C.** TtLig13p (beyaz) ve PBCV1 (mavi) DNA ligaz enzimi 3B yapılarının üst üste örtüştürülmesi ile elde edilen karşılaştırmalı alfa karbon iskelet yapısı temsil edilmektedir. Şekilde sarı hat TtLig13p katalitik merkezini, kırmızı hat ise PBCV1 katalitik merkezini belirtmektedir. **D.** TtLig13p (beyaz) ve *Pyrococcus furiosus* (pembe) DNA ligaz enzimi 3B yapılarının üst üste örtüştürülmesi ile elde edilen karşılaştırmalı alfa karbon iskelet yapısı temsil edilmektedir. Şekilde sarı hat TtLig13p katalitik merkezini, mavi hat ise PBCV1 katalitik merkezini belirtmektedir. **E.** T4 DNA Ligaz’ın biyoinformatik olarak üretilmiş 3B yapısı. Şekillerdeki kırmızı oklar Adenilasyon domaini ile OB domaininin bağlanma bölgesi olan Motif V’i göstermektedir.

Aktif ve inaktif TtLig13p’nin birbiri ile karşılaştırılması sonucu lokal farklılıklar haricinde büyük bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Rossi ve ark. T4 DNA ligazının aktif merkezini inaktif duruma getirdiklerinde, enzimin adenillenmediği için aktivite göstermediğini fakat adenillenmiş bir substratı birleştirebildiğini bildirmişlerdir [17]. Şekil 4.3 incelendiğinde aktif dizideki Lizin aminoasidinin (Lys 320), Glu (450), Gly (451) ve Val (472) ile zayıf H bağı etkileşimine girebildiği fakat inaktif dizideki Lösin aminoasidinin (Leu 320) Glu (450) ve Gly (451) ile etkileşim kurarken; Val (472) bağ yapamadığı görülmektedir. PBCV1-adenilat kompleksinin kristallendirilmesi ile elde edilmiş 3B yapı incelendiğinde, adenilasyonun Val ile kurulmuş bağı sonlandırılarak AMP’nin 3’-O’nine yönlendirilmesi ile gerçekleştiği [56], ürettiğimiz TtLig13p ve TtLig13p-KD’nin reaksiyonun bu basamağını gerçekleştirebilecekken inaktif dizilerin gerçekleştiremeyerek adenilasyon yapamamasından dolayı enzimatik olarak görev icra edemeyeceği düşünülmektedir.



Şekil 4.3. Aktif ve İnaktif TtLig13p DNA ligaz enziminin 3B yapılarının karşılaştırılması.

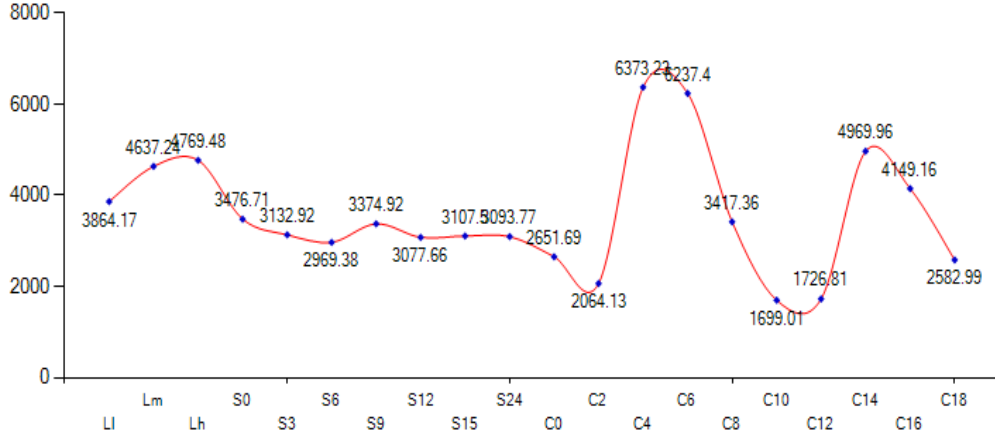
Şekil 4.3’de, **A.** Aktif TtLig13p DNA ligaz enzimi (PBCV1 temelli) **B.** İnaktif TtLig13p DNA ligaz enzimi (PBCV1 temelli) genel yapısı **C.** Aktif TtLig13p’nin katalitik merkezindeki Lizin320 (Lys, K) **D.** İnaktif TtLig13p’nin katalitik merkezindeki Lysin320 (Leu, L) yapısal ilişkide bulunduğu komşu aminoasitler. **E.** PBCV1 DNA Ligaz – Adenilat kompleksindeki Lizin-AMP ilişkisinin deneysel 3B kristal yapısı [Şekil E Kaynak 56’ya göre yeniden şekillendirilmiştir].

Örtüşen bölgelerin uzatılması ile yönlendirilmiş/spesifik mutageniz yöntemi kullanılarak 1668 bç uzunluğundaki TtLIG13 geninin 22 bölgesine nokta mutasyonu yerleştirilmiştir. Bir primer çiftinin hatalı tasarlanmış olması ve deneyler sırasında bunun fark edilememesi nedeniyle 5. mutasyon bölgesinde hidrofilik gruptan olan polar glutamin yerine anyonik glutamat aminoasidi [48] kodlayan kodon değişimi söz konusudur. Fakat bu değişim, enzimin fonksiyonunda her ikisinin hidrofilik ve R gruplarının benzer büyüklükte olmasından dolayı büyük bir etki oluşturmayacağı düşünülmektedir. Rossi ve arkadaşları T4 DNA ligaz ile ilgili yaptıkları çalışmada, proteinin N terminalindeki ilk 80 aminoaside denk gelen bölgedeki dizinin silinmesi ile elde edilen proteinde (BtLig1’in bu amino asiti bu bölgede yer almaktadır) işlev kaybının olmadığını bildirmiştir [17]. İşte bu glutamin’dan glutamata değişim bölgesi BtLIG13p’in N terminalinde bulunmaktadır. Glutamin ve glutamat aminoasitlerinin polar olması ve hatalı aminoasidin proteinin katalitik bölgesine uzakta yerleşim göstermesi, proteinin bu haliyle de işlevsel olacağına işaret etmektedir.

Diğer bir hatalı primer ise 3’ ucundaki 9 nükleotidin yanlışlıkla 5’ ucuna yazılarak sipariş edilen FBt16 primeri olup, bu primerin neden olması beklenen insersiyon ve delesyonun aynı bölgenin iki dizi analizi sonucunda da gözlenmemesi, kullanılan yöntem ve enzimin hata düzeltme mekanizması sayesinde bertaraf edilmesine bağlanmıştır. Primerin 5’ ucu hatalıdır, bu primer ile üretilen ürün birleştirme reaksiyonuna alındığında, hatalı kısım, reaksiyona giren zincirin 3’ ucunda bulunacaktır. Sambrook ve arkadaşları, böyle bir çalışmada, ürünün 3’ ucuna kalıptan bağımsız –A ekleyen bir enzim ile üretilen parçanın, birleştirme reaksiyonuna alınmasında bir sakınca olmadığını, enzimin

bu hatayı düzeltmesi sayesinde dizinin doğru şekilde üretileceğini bildirmiştir [18]. Zira, 3' poliA ekleme özelliği olan Taq polimeraz enzimleri ile gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, dizi analizi sonucu, diziye beklenmeyen bir mutasyonun yerleşmediği bildirilmiştir [40, 49]. Dizi analiz bulgularımız bu 9 insersiyon probleminin literatürde bahsedildiği gibi ürüne intikal etmediği anlaşılmıştır.

Tt*LIG13*'ün konjugasyon hücrelerindeki mRNA ifade durumunun belirlenmesi amacıyla; 13 saatlik konjugasyon profiline ait cDNA kaynağından kalıp olarak kullanılarak iki RT-PZR gerçekleştirilmiştir. İlk RT-PZR deney bulguları 13 saatin tümünde seviyesi değişmeyen bazal bir üretimin var olduğunu; aynı kalıpla ikinci RT-PZR deney sonucunda mRNA ifadesi tüm saatlerde bazal seviyede iken 9. saatte mRNA miktarında artış olduğu görülmüştür. Fakat Tetraymena Gen Ekspresyon Veritabanında (TGED) yapılan araştırmalar sonucu; *T. thermophila* TipII (B2086) ve Tip VII (Cu428) hücrelerinin konjugasyonu süresince Tt*LIG13* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin 6. saatte daha yüksek olmak üzere 16. saatte de ikinci kez artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.4) [26]. *T. Thermophila*'nın çifleşme tipi V olan ve bizim de çalışma organizmamız olan SB210 hücrelerinin konjugasyonu esnasında Tt*LIG13* mRNA ifadesinin durumu, 17S rRNA kontrol grubunun bulunmaması, bağımsız tekrar deneylerinin henüz yapılmamış olması nedenleri ile belirsizliğini korumaktadır. Tek deney seti ile gerçekleştirilen bu iki RT-PZR çalışması kalıpların bozulması nedeniyle tekrar edilememiştir. Yeni bir deney seti ile deneyin tekrar edilmesi ve kontrol gruplarının oluşturularak deneyin güvenilirliğinin sağlanması gerekmektedir.



Şekil 4.4. *Tetrahymena thermophila* II (B2086) ve VII (Cu428) çiftleşme tiplerinin açlık ve konjugasyonları süresince TtLIG13 mRNA ifadesi [26].

Şekilde L1, Lm ve Lh sırası ile ml'de 1.10^5 , 3.10^5 ve 1.10^6 hücreden elde edilen TtLIG13 mRNA seviyesini göstermektedir. Açık durumunda hücre yoğunluğu ml'de 2.10^5 olup S0-S24 açlık sürelerini temsil etmektedir [26]. Hücreler 18 saatlik açlık sonrasında konjugasyona alınmıştır. C0-C18 konjugasyon aşamalarını göstermektedir. Şekilde konjugasyonun 2. saatine kadar bazal bir mRNA ifadesi göze çarpmakta, konjugasyonun 6 ve 16. saatlerinde ise ifade durumunda büyük bir artış olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, *Tetrahymena thermophila* makronükleer genom projesi sonuçlarından yararlanılarak *Tetrahymena*'nın ikisi ligaz I, biri ligaz IV ve biri bakteri ve virüslere yakınlık gösteren yapıda olmak üzere dört adet ligaz geni bulundurduğu belirlenmiştir.

Biyoinformatik analizler ile ticari olarak üretilmeye en uygun *Tetrahymena* ligazı TtLIG13p olarak belirlenmiş, *E. coli*'de ifade edilmesi için gerekli 22 adet nokta mutasyonu ile kodon uyumu sağlanmıştır. Protein ifade vektörü pET16b'ye TtLIG13'ün rekombinant cDNA'sı klonlanmış ve *E.coli* BL21 (DE3) pLysS konakçısına aktarılmıştır. Toksik olan bu rekombinant proteinin *E. coli*'de üretilme ve saflaştırma deneylerine devam edilmektedir.

Yapılmış olan filogenetik çalışmalar sonucunda, TtLig13p dışındaki TtDNA ligaz enzimlerinin literatüre uygun dağılım gösterdiği domain analizleri ile teyit edilerek gösterilmiştir. Bu organizmanın TtLig13p gibi bir enzime sahip olması farklı bir noktaya odaklanılmasını sağlamış ve ökaryotik organizmalarda bulunmalarına rağmen filogenetik analizde ökaryotik gruplar ile dağılım göstermek yerine prokaryot ve virüsler ile dallanan bir ligaz grubunun varlığı ortaya çıkarılmıştır. Bu grup yakından incelendiğinde tüm üyelerin omurgasız olduğu görülmüş ve bu ilkel karakterli omurgasız DNA ligaz grubuna “DNA Ligaz II” ismi verilmesi önerilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] *White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future*, EuropaBio, 2003
- [2] Sijbesma F.; *Industrial (White) Biotechnology An Effective Route To Increase Eu Innovation And Sustainable Growth*, DSM
- [3] Gellert M.; *Formation Of Covalent Circles of Lambda DNA by E. coli Extracts*, *Biochemistry*, 1967.
- [4] Weiss B., Richardson C. C.; *Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid, I. Repair of Single-Strand Breaks in DNA by an Enzyme System From Escherichia Coli Infected With T4 Bacteriophage*, *Biochemistry*, 1967.
- [5] Mertz J. E. And. Davis R. W.; *Cleavage Of Dna By R_I Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends*; *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa* 69, 1972.
- [6] Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W., And Helling R. B.; *Construction Of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro*; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1973.
- [7] <http://www.gene.com/gene/news/press-releases/display.do?method=detail&id=4160>
- [8] Zachariah S. M., Pappachen L. K.; *A Study Of Genetic Engineering Techniques In Biotechnology Based Pharmaceuticals*; *The Internet Journal of Nanotechnology*, 2009.
- [9] Pingoud A., Fuxreiter M., Pingoud V. and Wende W.; *Type II restriction endonucleases: structure and mechanism*; *Cellular and Molecular Life Sciences*; 2005.
- [10] Webb, E. C.; *Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*, 1992.
- [11] Cao W.; *DNA Ligases: Structure, Function and Mechanism*; *Current Organic Chemistry*, 2002.
- [12] Shuman S., Schwer B.; *RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases* *Molecular Microbiology*, 1995.
- [13] Shuman S., Lima C. D.; *The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases*; *Current Opinion in Structural Biology*, 2004.

- [14] Tomkinson A. E., Vijayakumar S., Pascal J. M., and Ellenberger T.; *DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function*; Chem. Rev. 2006.
- [15] Martin I. V., MacNeill S. A.; *ATP Dependent DNA Ligases*; Genome Biology 2002.
- [16] Rossi R., Montecucco A., Ciarrocchi G. ve Biamonti G., *Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action*, Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 11
- [17] Sriskanda V. and Shuman S.; *Role of nucleotidyltransferase motifs I, III and IV in the catalysis of phosphodiester bond formation by Chlorella virus DNA ligase*. Nucleic Acids Res., 2002.
- [18] Sriskanda V. and Shuman S.; *Role of Nucleotidyl Transferase Motif V in Strand Joining by Chlorella Virus DNA Ligase*; The Journal Of Biological Chemistry, 2002.
- [19] Timson D. J., Singleton M. R., Wigley D. B.; *DNA ligases in the repair and replication of DNA*; Mutation Research 460, 2000.
- [20] Undergraduate course at Davidson College; *Molecular Tool: Ligation*; Department of Biology, Davidson College, 2002.
- [21] Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
- [22] Asai D. J.; Forney J. D.; *Tetrahymena thermophila*, Methods in Cell Biology, Vol.62, 1999.
- [23] Weide T, Herrmann L, Bockau U, Niebur N, Aldag I, Laroy W, Contreras R, Tiedtke A, Hartmann MW.; *Secretion of functional human enzymes by Tetrahymena thermophila*; BMC Biotechnol. 2006.
- [24] Peterson DS, Gao Y, Asokan K, Gaertig J.; *The circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate Tetrahymena thermophila*; Mol Biochem Parasitol. 2002.
- [25] Wu M., Allis C. D., and Gorovsky M. A.; *Cell-cycle regulation as a mechanism for targeting proteins to specific DNA sequences in Tetrahymena thermophila* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, pp. 2205-2209, April 1988.
- [26] Miao W, Xiong J, Bowen J, Wang W, Liu Y, et al.; *Microarray Analyses of Gene Expression during the Tetrahymena thermophila Life Cycle*; PLoSONE (2009)

- [27] Eisen A. E. et al.; *Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate Tetrahymena thermophila, a Model Eukaryote*, Plos Biology, 2006.
- [28] Coyne R.S. et al.; *Refined annotation and assembly of the Tetrahymena thermophila genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure*; BMC Genomics. 2008
- [29] Stover N. A. et al. ; *Tetrahymena Genome Database (TGD): a new genomic resource for Tetrahymena thermophila research*; Nucleic Acids Research, 2006
- [30] Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. and Lipman,D.J.; *Basic local alignment search tool*; J. Mol. Biol. 1990.
- [31] Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. and Lipman,D.J.; *Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs*; Nucleic Acids Res., 1997.
- [32]. Larkin M.A.; et. al.; *Clustal W and Clustal X version 2.0*; Bioinformatics; 2007.
- [33] Dereeper A.*, Guignon V.*, Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Res. 2008.
- [34] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.; *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*; Mol Biol Evol. 2007
- [35] Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K.; *MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences.*; Brief Bioinform. 2008
- [36] Jürgen Kopp and Torsten Schwede; *The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models*; Nucleic Acids Res.;2004.
- [37] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T; *The SWISS-MODEL Repository and associated resources*; Nucleic Acids Res.; 2009.
- [38] Yıldız M.T.; *Tetrahymena thermophila MAPK Enzim Ailesinden Birinin cDNA'sının Klonlanması ve mRNA İfadesinin Karakterizasyonu*; Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2009.
- [39] RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Protokolü, <http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-labeling-detection/enzymes/ep044-revertaid-transcriptase>
- [40] Stuart Horowitz And Martin A. Gorovsky, *An unusual genetic code in nuclear genes of Tetrahymena*, Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, pp. 2452-2455

- [41] David M. Prescott, *The DNA of the Ciliated Protozoa*, Microbiological Reviews, June 1994, p. 233-267
- [42] Hannah M.W. Salim, Karen L. Ring, ve Andre R.O. Cavalcant, *Patterns of Codon Usage in two Ciliates that Reassign the Genetic Code: Tetrahymenathermophila and Paramecium tetraurelia*, Protist, 2008.
- [43] Russell Higuchi, Barbara Krummel ve Randall K.Saiki, *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*, Nucleic Acids Research, 1988.
- [44] Anthony N. Warrens, Michael D. Jones and Robert I. Lechler, ***Splicing*** by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest, Gene 1997.
- [45] Steffan N. Ho, Henry D. Hunt , Robert M. Horton , Jeffrey K. Pullen ve Larry R. Peasea, *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*, Gene, 1989.
- [46] Allen S. L. et al.;*Proposed Genetic Nomenclature Rules for Tetrahymena thermophila, Paramecium primaurelia and Paramecium tetraurelia*, Genetics Society of America,1998.
- [47] Saitou N & Nei M; *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*; Molecular Biology and Evolution; 1987.
- [48] Felsenstein J; *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*; Evolution; 1985.
- [49] Grillo G. et al.; *UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs*; Nucleic Acids Res.; 2010
- [50] Hellen C. U.T. and Sarnow P.; *Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules*; Genes Dev. 2001
- [51] Dever T. E.; *Gene-Specific Regulation by General Translation Factors*; Cell, Vol. 108, 545–556, 2002.
- [52] Yutin N.and Koonin E. V.; *Evolution of DNA ligases of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes: a case of hidden complexity*; Biology Direct 2009.

- [53] Wang L. K., Nair P. A., and Shuman S.; *Structure-guided Mutational Analysis of the OB, HhH, and BRCT Domains of Escherichia coli DNA Ligase*; THE JOURNAL OF Biological Chemistry; 2008.
- [54] Maga G. ve Hübscher U.; *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners*; J Cell Sci. 2003.
- [55] Warbrick E.; *A functional analysis of PCNA-binding peptides derived from protein sequence, interaction screening and rational design*; Oncogene; Nature Publishing Group; 2006.
- [56] Odell M. et. al.; *Analysis of the DNA joining repertoire of Chlorella virus DNA ligase and a new crystal structure of the ligase-adenylate intermediate*; Nucleic Acids Research, 2003.

EK- 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Amfisilin, (Sigma, A0104)

1000X stok solüsyon için 1ml steril dH₂O'da 100 mg amfisilin çözülür, filtre ile steril edilir ve 100 - 500 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanır.

- Etidyum bromür (EtBr), (Sigma, E8751)

Son yoğunluğu 10 mg/ml (0.01 gr/ml) olacak şekilde dH₂O'da çözülerek stok solüsyonu hazırlanır ve 4°C'de saklanır. Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde (10 ml agaroz için 10 µl EtBr) kullanılır.

- X-Gal, (Bio Basic, 12872)

100 mg (0.1 gr) X-Gal 2 ml N,N'-dimethylformamid ile çözülerek son yoğunluğu 50 mg/ml olacak şekilde stok hazırlanır. Steril edilmesine gerek olmayan X-Gal alüminyum folyo ile kaplanmış tüplere bölünerek -20°C'de saklanır. Bir petrideki katı besiyerine doğrudan 20 µl ya da kullanım kolaylığı sağlaması açısından, kendi çözücüsü ile 1:1 oranında seyreltilip 40 µl yayılarak kullanılır.

- Gliserol (Sigma, G2289; Merck, 1.04092).

% 80 yada %10 oranında dH₂O ile seyreltilir ve otoklav edildikten sonra kullanılır. %80'lik gliserol hücre stoklarının ya da kimyasal kompetent hücre hazırlığında, %10'luk gliserol ise elektrokompotent hücrelerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

- Tris HCl (Sigma, 05432).

Distile su ile çözülerek genellikle 50 mM yoğunluğunda ve 8.8 pH'da hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanan çözelti, gerekirse seyreltilerek hücrelerin yıkanmasında veya açlık tamponu olarak kullanılır.

- Trizma Base (Applichem A2264).

- Borik Asit (BioBasic, BB0044).

- EDTA (Fluka, 03620).

Genellikle 0.5 M yoğunluğunda kullanılır. EDTA, pH ayarlaması yapılmadıkça suda çözünmediği için başlangıçta son hacmin yarısı kadar su ile çözülmesi ve yüksek yoğunlukta NaOH ile pH'sının 8.0'a getirilmesi gerekir.

- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA)

108 gr trizma base ve 55 gr borik asit 600 ml dH₂O da çözüldükten sonra 40 ml 0,5 M EDTA eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanan stok TBE'nin çökmemesi için 4°C'de saklanması ve deneylerde 1X (900 ml dH₂O + 100 ml 10X TBE) yoğunluğunda kullanılması gerekir.

- Etanol (Riedel, 071029)

Etanol, dH₂O ile seyreltilerek farklı yoğunluklarda kullanılmıştır (% 70, % 75, % 90 ve %100).

- Kalsiyum Klorür, CaCl₂ 2H₂O (Sigma, C1016, Duchefa C0504).

7.34 gr CaCl₂ üzerine 1 lt steril su ile hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır.

- İzopropanol (Riedel de Haen, 24137).

Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (24:23:1) (Sigma, P2069). Birçok amaç için kullanılan bu solüsyon Equilibration Buffer içermektedir. Genomik DNA izolasyonu gibi yüksek pH gerektiren uygulamalarda Equilibration Buffer ile fenolik fazın pH'sı 8 civarına yükseltilmelidir (Fenolik faz sarı ya da kahverengi ise kullanılmamalıdır). Bunun için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol solüsyonuna Equilibration Buffer'ın tümü katılarak yavaşça karıştırılır ve yaklaşık 2-4 saat içinde (tercihen gece boyu) fazlar ayrıldıktan sonra DNA izolasyonunda kullanılabilir. Sonuçta pH, 6.7± 0.2'den 8.0 ± 0.2 ye yükselecektir. Tampon eklendikten sonra ışıktan koruyarak -20'de 1 yıl saklanabilir. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol'ün pH'nın pH metre ile doğru şekilde ölçülmesi çok güçtür, bunun amaç için pH kağıtları kullanılabilir.

- Kloroform (Sigma, C2432).
- Fenol (Sigma, P4557)
- Agaroz A (BioBasic, D0012), (Promega, V3125).
- Sodyum Klorür NaCl (Merck, 1.06400).

EK- 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzim Setleri

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Helena Thermal Cycler; Techne) , Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Orion), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Nanodrop (Metek ND-100), Spektofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazı (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6), Konsantratör (Labconco, CentriVab DNA Concentrator), Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, CEQ8000)

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

QIAquick PCR purification kiti (Qiagen, 268106), QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene, 28706), pGEMTeasy plazmit sistemi (Promega, 212440), RNeasy Midi Kit (Qiagen,75144), RevertAid first strand cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622), Qiagene RNeasy Mini Kit (Qiagene, 74106), Dizi Analizi Kiti (Beckman Coulter, GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, 608120), Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, A29151).

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Enzim Setleri

Taq DNA Polymerase, (Fermentas, EP0401), Pfu DNA Polymerase (Fermentas, EP0501), PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara, R010A), Rnase A Solution (BioBasic), RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega, M610A), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant (Promega, M828A), T4 DNA Ligase (Takara, 2011A).

EK-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri: LB Broth (Sıvı), LB Agar (Katı) Amfisilin, SOC ve PPY

LB Broth (Sıvı) Besiyeri

LB kısalması ile bilinen Lizojen Broth 1951'den (1,2) beri bakteri büyütmek için sıkça tercih edilen bir besiyeridir (3). İçeriğinde üç ana bileşen bulunur: Pepton ve kazeinin pankreatik sindirimi ile oluşan peptidleri içeren Tripton; yoğun organik bileşikler ve iz elementler içeren maya ekstraktı, ozmotik dengeyi sağlayan tuz (1, 2, 3). LB Sıvı Besiyeri aşağıdaki gibi hazırlanır:

10 gr Sodium Klorür (Merck, katalog no 567441)

10 gr Tripton (Fluka, katalog no T9410)

5 gr Maya Ekstraktı (Sigma,katalog no Y1625)

Distile su ile 800 mL'ye tamamlanır, pH. 8.0'a getirilir ve son hacim 1 L'ye tamamlanır (4). Gerekli hacimlerde bölümdükten sonra 121°C'de 15 dk otoklav edilerek steril hale getirilir (5).

Solüsyon hazırlandıktan sonra pH genellikle tavsiye edildiği değerde olduğundan pH ayarlaması yapılmadığı durumlarda hücre büyümesinde bir farklılık görülmemiştir.

1. Giuseppe Bertani, Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems, Journal Of Bacteriology, , p. 595–600, 2004
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Lysogeny_broth
3. <http://everything2.com/title/Luria-Bertani+broth>
4. G. Bertani, Studies on Lysogenesis I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli, J. Bacteriol. 62:293-300, 1951.
5. <http://www.usbio.net/technicalSheet.php?item=L1520-01>

LB Agar (Kati) Besiyeri

37 gr LB Agar distile su ile 1 L'ye tamamlanır ve 121°C'de 15 dk otoklav edilir. Otoklavdan çıkan besiyeri 55°C'ye (1) ayarlanmış su banyosunda birkaç saat bekletilir.

Tabaklara dökülmeden önce 1000X antibiyotik stoğundan 1X'e indirecek hacimde (1 mL) eklenir ve steril koşullarda tabaklara aktarılır. Bir gece oda sıcaklığında donması beklenen tabaklar, 4°C'de ve karanlıkta 3 ay boyunca bozulmadan saklanabilir (2).

1. www.eeb.ucla.edu
2. www.goldbio.com/pdf/541-Protocol%201.pdf

SOC Besiyeri

SOB besiyeri Hazırlığı: 2.0 g Tripton, 0.5 g Pepton, 0.2 ml 5 M NaCl, 0.25 ml 1M KCl 90 ml suda çözülür ve pH'sı 7.0'a ayarlanır. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak otoklav edilir. Üzerine otoklav edilmiş, 1'er mL 1 M MgCl₂ ve 1 M MgSO₄ eklenir.

SOC besiyeri Hazırlığı: 100 mL SOB besiyerine 2 mL filtre ile steril edilmiş 1 M Glukoz eklenir.

PPY Besiyeri

Tetrahymena, canlı olmayan bir besiyerinde kültüre edilen ilk silli hücre gurubudur. Besiyerinde enzimatik olarak parçalanmış etten oluşan proteaz pepton, maya ekstraktı ve bölünme hızının 2.5 saatin altına inmesini sağlayan demir iyonu kullanılır. Proteaz pepton oranı toplam besiyeri hacminde %2 oranında olmalıdır, bu oran uzun süre %1'in altında kalırsa bireyler infertil duruma geldiğinden konjugasyon ve çaprazlama çalışmalarında kullanılamazlar (1).

10 gr Proteose pepton

1,5 gr Maya ekstraktı 900 mL dH₂O içinde çözülür ve üzerine, 1 mL 10 mM FeCl₂.6H₂O eklenerek toplam hacim 1 L'ye tamamlanır ve küçük hacimlere bölünen besiyeri 121°C'de 15 dk otoklav edildikten sonra kullanılır.

1. David J. Asai, James D. Forney, *Tetrahymena thermophila*, Methods in Cell Biology, VOLUME 62, 2000

EK- 4 Klonlama Sistemi: Konakçı *Escherichia coli* XL-1 Blue Irkı ve pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü

Klonlama konakçısı olan *Escherichia coli* XL I – Blue ırkı satın alınarak çalışmada kullanılmıştır (Stratagene, katalog no 2000249). Bu ırkın genotipinde, insert stabilitesini arttırmaya yönelik geliştirilmiş rekombinasyon hasarı (*recA*), saflaştırılan plazmitin kalitesini arttırmak amacıyla oluşturulmuş endonükleaz hasarı (*endA*) ve klonlanan DNA'nın EcoK endonükleaz sistemi ile parçalanmasını önleyen *hsdR* mutasyonu bulunmaktadır. Ayrıca taşıdığı F epizomunda bulunan *tn10* geni tetrasikline direnç sağlarken, *lacIqZΔM15* geni ise mavi-beyaz seçilimine izin vermektedir (1).

Mavi-beyaz seçilimi α komplementasyon sisteminin uygulanabilmesi ile gerçekleşir. α komplementasyon, inaktif iki β galaktosidaz parçasının birleşerek aktif proteini oluşturması durumudur. Bu parçalardan biri yani β galaktosidaz'ın C terminali konakçının F' plazmitinde bulunan *lacIqZΔM15* geninin kodladığı α akseptör proteinidir (ω -omega- peptidi). Diğer parça yani N terminal ise klonlama vektöründe bulunan *lacZ* geni ile kodlanan α donör proteinidir (α -alfa-peptidi). Her iki parçada ayrı durumlarda iken inaktif, α komplementasyon ile birleştikleri anda aktif yani laktoz veya türevi XGal'i parçalayarak renk oluşumu meydana getirebilir durumdadır (2).

Rutin klonlama çalışmalarında tercih ettiğimiz pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, katalog no A1360) klonlama vektörü, α peptidini kodlayan *LacZ* genini taşımaktadır. Çoklu klonlama bölgesinin bu bölgede bulunması sonucu genin insersiyonel inaktivasyonu nedeni ile α -komplementasyonun gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlı olarak mavi-beyaz seçilimi sağlanmaktadır. Plazmitin 3' uçlarında bulunan tekli "T" nükleotidleri ile "AT" klonlaması yapılabilmekte ve hücre içinde baskılanması ise taşıdığı amfisilin direnç geni sayesinde sağlanmaktadır (3).

1.Stratagene. *XLI-Blue Competent Cells.* 2010,
www.stratagene.com/manuals/200249.pdf.

2. Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
3. Promega. *Technical Manual - pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. 2010, www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html.

EK- 5 Protein İfade Sistemi: Konakçı *Escherichia coli* BL-21 DE3 pLySs İrki ve pET16b Vektörü

E. coli ifade konakçısına aktarıldığında, hücrelerin ölümüne neden olan ya da kültüre edilmesini, büyümesini engelleyen (1); membran proteinleri ve ETS'de rol oynayan enzimler yada substrat olarak DNA (2) yada RNA'yı (3) kullanan enzimleri kodlayan genler **toksik genler**dir. Bu nedenle toksik gen sınıfına girdiği düşünülen ATP bağımlı DNA Ligaz enziminin ifadesinde sızıntıya izin vermeyen, sıkı kontrolü sağlayan bir ifade sisteminin seçilmesi gerekmektedir.

Sıkı kontrolü sağlamak amacıyla, ifade konakçısı olarak *Escherichia coli* BL-21 DE3 pLySs irki kullanılmıştır (Sigma, katalog no B3310). Bu suş doğal olarak *lon* proteaz'ı taşımazken dış membran proteaz hasarı (*ompT*) sonradan oluşturulmuş ve bazı heterolog proteinlerin parçalanması bu yolla engellenmiştir. Genotipindeki DE3, lizojenik fazdaki profajı temsil etmektedir. Bu profaj IPTG ile indüklenebilir bir promotor olan *lacUV5* kontrolündeki T7 polimeraz genini taşır. Yapısındaki pLySs plazmiti ise T7 polimerazı inhibe eden T7 lizojen geni taşır, böylece sızıntılı ifade engellenmiş olur. pLySs plazmitinin hücre içinde baskılanması yapısındaki kloramfenikol dirençlilik geni ile sağlanır (4).

İfade vektörü ise yapısında T7 promotörü, N terminal histidin kuyruk yapısı, Ampicillin direnç geni, T7 terminatör dizisi ve sıkı kontrolü sağlayacak olan *lacI* geni mevcuttur (5).

LacI geni ile üretilen *lac* represör proteini *lacUV5* promotörünün baskılanmasını sağlayarak T7 polimerazın ifadesini durdurur, bu enzimin az miktardaki olası salınımı ise T7 lizojeni ile kontrol altına alınarak sızıntı engellenir. Proteinin üretilmesi, kloramfenikolsüz ortamda ve IPTG varlığında gerçekleşir. Böyle bir ortamda pLySs plazmiti hücre dışına salınır, *lacUV5* promotöründeki baskı kalkar ve etkin bir protein ifadesi gerçekleşir.

1. F. Saïda, M. Uzan, B. Odaert and F. Bontems, *Expression of Highly Toxic Genes in E. coli: Special Strategies and Genetic*, Current Protein and Peptide Science, 2006, 7, 47-56

2. *The QIAexpressionist*, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QiaGene, Fifth Edition, 2003
3. Eric A. Arn and John N. Abelson, *The 2^{*}-5^{*} RNA Ligase of Escherichia coli: Purification, Cloning, And Genomic Disruption*, The Journal Of Biological Chemistry Vol. 271, No. 49, Issue of December 6, pp. 31145–31153, 1996
4. BL21 (DE3) pLysS-T1R Competent Cells, Uni-Pack, Technical Bulletin, 2010, <http://www.sigmaaldrich.com/>
5. pET16b Vector, Novagen, 2010, <https://wasatch.biochem.utah.edu/chris/links/pET16b.pdf>

EK- 6 Uygulanan Deneysel Yöntemler

Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” kitabından yola çıkılarak hazırlanmış Dr. Harry van Keulen'nin laboratuvar protokolleri uygulanarak doktora çalışmalarını yürütmüş olan Mehmet Taha YILDIZ tarafından gerçekleştirilmiştir. Protokol organik bir çözücü olan Fenol: Kloroform: İzamilalkol (25:24:1) ile hücrelerin polisakkaritlerinin parçalanması, proteinlerinin denatüre edilmesi ve ardından DNA'nın tuz çözeltisi ve etanol ile çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Protokolün detayları M. Taha YILDIZ'ın doktora tezinde bulunmaktadır.

Toplam RNA İzolasyonu

Çalışılan genin translasyona giren formunun elde edilmesi amacıyla, bir gece PPY besiyerinde büyütülmüş *Tetrahymena* hücrelerinden RNeasy Midi Kit (Qiagen,75144) kullanılarak toplam RNA elde edilmiştir. Protokoldeki seçeneklerden “hayvan hücreleri” için uygun olan metod uygulanmış, hücre sayısı 5×10^6 'yı (yaklaşık 50 μ l hücre peleti) geçmeyecek şekilde belirlenmiştir. *Çalışma tamponları içerisinde, RNase'ı inhibe ederek RNA'nın korunmasını sağlayan guanidinium tuzlarından (1) guanidin tiosiyanat (2) bulunuyor olsa da deney süresince hızlı hareket edilmiştir.*

1. Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
2. RNeasy® Mini Handbook, Qiagene, Fourth Edition, 2010, www1.qiagen.com/HB/RNeasyMini

Toplam RNA'ya DNase Uygulanması

İzole edilen RNA, RT yoluyla ile cDNA'nın üretilmesi çalışmasında kalıp olarak kullanılacaktır. RNA'nın içerdiği DNA kontaminasyonun, RT yoluyla RT-

PZR'ye taşınması ve bu aşamada cDNA yerine gDNA kopyasının üretilmesi muhtemeldir. Bunun aşılması DNase uygulaması ile mümkündür. DNase uygulamasında Promega RQ1 RNase-Free DNase enzimi, protokolüne uygun şekilde kullanılmıştır. Elde edilen RNA'nın yoğunluğu ve kitin hacim sınırlaması göz önünde bulundurularak olabilecek en fazla oranda RNA reaksiyona alınmış ve *reaksiyon genellikle 2X hacimde gerçekleştirilerek sonraki aşamaya aktarılan RNA yoğunluğunun artırılması sağlanmıştır*. Bu yolla uygulanan DNase ürünü, RNeasy Midi Kit protokolündeki RNA CleanUp başlıklı protokole uygun şekilde temizlenmiş ve RT'de kullanılmıştır.

RQ1 RNase-Free DNase enziminin diğer bir uygulama şekli ise aşağıdaki gibidir:

- 1) İzole edilen RNA'nın tamamı nükleazsız su ile 250 µl'ye tamamlanır.
- 2) 80 µl 50 mM Tris-HCl (pH=8,8) ve 5,5 µl RQ1 Rnase-Free Dnase eklenir.
- 3) Su banyosu ya da PZR cihazında 38 °C'de 45 dakika ve DNaz enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dakika bekletilir.
- 4) Üzerine 33 µl, 0,3 M NaAc ve 660 µl % 95'lik EtOH eklenir. -20°C'de gece boyu bekletilerek RNA çökmesi sağlanır.
- 5) Ertesi gün 7.500 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek peletin tüpün dibine oturması sağlanır. Eğer pelet hareketli ise santrifüj işlemi 12.000 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile tekrarlanır.
- 6) RNA peleti 50-100 µl dH₂O ile çözülür. Elde edilen RNA, agaroz jel elektroforezinde ve spektrofotometrede analiz edilerek kalitesi ölçülür (1).

Bu uygulamada, daha az enzim harcandığı gibi RNA'nın tamamı reaksiyona alındığından, uygulama sonunda elde edilen RNA'nın yoğunluğu diğer DNase protokolüne göre daha yüksektir.

İzole Edilen DNA ve RNA'ların Spektrofotometrik Analizleri

DNA ve RNA örneklerinden 1-2 µl kullanarak nanodrop'ta uygun programlar (DNA için "Double Stranded DNA", RNA için "RNA") seçilerek ölçümler yapılmıştır.

Klasik spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak RNA ve DNA miktarı ile saflığı saptanmıştır.

$$\text{RNA miktarı} = \text{OD}_{260} \text{ değeri} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD}_{260} \text{ değeri} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Nükleik asitler 260 nm dalga boyunda, proteinler 280, polisakkaritler ise 230 nm dalga boyunda absorpsiyona sahip olduğundan kontamine olmamış bir RNA'nın 230:260:280 oranı 1:2:1, DNA'nın ise 1:1.8:1'dir. Çalışmalarda kullanılacak DNA yada RNA'nın spektrofotometrik sonuçları bu oranlara yakın olmalıdır (1,2).

1. <http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm>
2. Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.

Toplam RNA'dan Geri Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA'nın Üretilmesi

Bu reaksiyonun amacı toplam RNA içindeki mRNA'nın PZR'de kalıp olarak kullanılabilir cDNA formuna dönüştürülmesidir. "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" in kullanıldığı reaksiyona toplam RNA girse de; kullanılan yöntem mRNA'lara spesifik olarak gerçekleşeceğinden, oluşacak cDNA havuzunda sadece mRNA'lar temsil edilecektir. Reaksiyon kitin birinci prosedürünün önerdiği şartlarda gerçekleştirilmiştir. Uygulamaya 0.1-5 µg RNA'nın alınabildiği reaksiyonda (1) *genellikle iyi sonuç verdiği*nden 2 µg RNA kullanılmıştır. Reaksiyon 3 aşamalıdır. 1. aşamada reaksiyona sadece RNA ve poli-A kuyruğuna oturacak olan dT₁₈ primeri eklenir ve ikincil katlanmaların giderilmesi için 70°C'de 5 dk bekletilir. 2. aşamada reaksiyona sırasıyla 5X reaksiyon tamponu, Ribolock Ribonükleaz inhibitörü ve dNTP eklenir, 37°C'de 5 dk süreyle primerlerin RNA'ya oturması sağlanır. M-MuLV ters transkriptaz enziminin eklendiği son aşamada ise 42°C'de polimerizasyon gerçekleşir. Reaksiyon 70°C'de 10 dk süre ile bekletilerek sonlandırılır.

1. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Protokolü, <http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-labeling-detection/enzymes/ep044-revertaid-transcriptase>

Gene Özgül Primerler Kullanılarak TtBtlig Geninin cDNA'sının Üretilmesi

Tetrahymena termophila BtLig geni cDNA bilgisi NCBI veritabanından elde edilmiş ve dış primer bölgeleri seçilmiştir. Üretilerek klonlama vektörüne aktarılan genin daha sonra pET16b vektörüne klonlanması planlandığı için primerlerin 5' uçlarına, BtLig ve klonlama vektörü içinde tanıma bölgesi olmayan, pET16b çoklu klonlama bölgesi enzimlerinden NdeI (ileri primerde) ve XhoI(geri primerde) enzimleri için tanıma dizileri eklenmiştir.

Primer dizileri aşağıdaki gibidir:

FBtBütETNdeI 5' gcgcatatgatgatcaaaattgatttaacaaaacct 3'
RBtpETXhoI 5' gcgctcgactcattcgtctctctttattctcaa 3'

Kalıp olarak RT ürününün kullanıldığı PZR çalışmasında yukarıdaki primerler kullanılmış ve reaksiyon PrimeStar Enzimi ile 58°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde, kalıp olarak gDNA'nın kullanıldığı şartlarda genin genomik kopyası üretilmiştir.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektforezinde Görüntülenmesi ve Jelden İzole Edilmesi

PZR ile elde edilen genomik ve cDNA kopyaları agaroz jelde yürütülerek UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde elde edilen parçalar kesilerek saflaştırılmaya alınmıştır. Saflaştırma için QIAquick Gel Extraction Kit kullanılmıştır.

Ligasyon

Klonlama veya ifade vektörlerine ligasyon çalışması farklı ön işlemleri gerektirir. Klonlama vektörüne ligasyon daha çok “AT klonlaması” şeklinde gerçekleşir. Klonlanacak parça Taq polimeraz gibi, üretilen parçanın 3’ ucuna -A ekleme özelliğine sahip ise parçanın saf olması yeterlidir. Pfu yada pfu kalitesindeki PrimeStar gibi enzimlerin 3’ ucuna -A ekleme yeteneği olmadığı için bu enzimler ile üretilen parçanın saflaştırıldıktan sonra -A ekleme reaksiyonuna alınması gereklidir.

-A ekleme reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleşir:

İnsert	x µl
dATP (2.5 µM)	0.8 µl (Finalde 0.2 µM/µl)
MgCl ₂ (25 mM)	0.8 µl (Finalde 2 mM/µl)
10X Taq Tamponu	1 µl (Finalde 1X)
Taq DNA Polimeraz (5u/µl)	1 µl (5u)
dH ₂ O	10 µl’ye tamamlayacak hacimde

Reaksiyon 70°C’de 30 dakika sürer, süre sonunda ürün doğrudan ligasyona alınır (1).

Klonlama Vektörüne Ligasyon Protokolü:

İnsert	x µl
2X Ligasyon Tamponu	5 µl
pGEMT- Easy vektör (50 ng/ml)	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
dH ₂ O	10 µl’ye tamamlayacak hacimde

Reaksiyon oda sıcaklığında 1 saat yada 4°C’de gece boyu sürebilir (1).

İfade vektörlerine ligasyon işleminde insertün vektör içindeki yönelimi önem taşır. Klonlanan genin ifade edilebilmesi için, 5’ ucunun vektördeki indüklenebilir promotora, 3’ ucunun ise terminasyon dizisine yönelmiş durumda yerleşmesi gerekir. İnsert ve vektörün, insertün vektöre doğru şekilde

yerleşmesini sağlayacak iki restriksiyon enzimi ile kesilerek saflaştırılmış olması gerekir.

Ligasyon reaksiyonunda vektör DNA'nın 50-100 ng arasında olması tavsiye edilmektedir (2). Kullanılacak DNA hacminin alt ve üst sınırının geniş tutulabilmesi amacıyla 10X tamponu olan ligaz enzimi tercih edilmelidir. Takara T4 DNA Ligaz enzimi bu iş için uygun olup; üretici firma 10 µl'lik reaksiyon hacmi için 0.5 µl enzim kullanılmasını, yapışkan uçların ligasyonunda reaksiyonun 16°C'de 1-5 saat (*iki saat yeterli olmaktadır*); küt uçların ligasyonunda ise 16°C'de 1-24 saat yada 4°C'de 16 saat sürmesini tavsiye etmektedir (3).

1. *pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual*, Promega, www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf
2. Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
3. Takara T4 DNA Ligase Technical Info, http://catalog.takara-bio.co.jp/en/product/tech_info_detail.asp?unitid=U100005325&masterid=M100004988

***E. coli* Kimyasal Kompetent Hücre Hazırlığı**

Sıcaklığa bağlı transformasyonda kullanılacak olan bu hücrelerin, dış ortamdaki DNA'yı almaya hazır hale getirilmesi amacıyla, hücre çeperinin zayıflatılması ve DNA'nın hücre zarına tutunması için CaCl₂ ile işlemden geçirilmesi gerekmektedir. İşlemin adımları aşağıdaki gibidir:

- 1) Kompetent yapılmak istenen hücre tipi LB agar besiyerine ekilir ve yayılır. Oluşan tek kolonilerden LB Broth besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de 120 rpm'de inkübe edilir.
- 2) Ertesi gün canlılığı yüksek olan hücre kültüründen 0,3-0,5 ml alınarak 100 ml'lik taze LB Broth besiyerine ekilir. 120 rpm, 37°C'de inkübasyona devam edilir.
- 3) Erken logaritmik faza erişen kültürün spektrofotometrik olarak OD değeri ölçülür. Kör olarak dH₂O'nun kullanıldığı ölçümlerde 550 nm'deki OD 0,4 ila 0,6 arasında, 600 nm'deki OD 0,2- 0,4 arasında olmalıdır.

Hücrelerin bu yoğunluğa eriştiği zamanı yakalamak için, inkübasyon başladıktan 70-80 dakika sonra spektrofotometrik ölçümlere başlanır.

4) İstenilen OD aralığına ulaştığında, kültürün alınarak 6000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Miktar fazla ise peletleme birkaç santrifüj adımı ile yapılır.

5) Santrifüj sonunda süpernatant dökülür ve pelet 50 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülür ve 15 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.

6) Süre sonunda karışım tekrar 6000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir.

7) Santrifüj sonunda üst faz dökülür ve hücre peleti 4 ml 50 mM soğuk CaCl₂ ile “yavaş” pipetleme ile çözülür, 0,6 ml % 80'lik gliserol eklenerek karıştırılır ve 200 µl hacimlere bölünerek -86°C'ye kaldırılır.

8) Hazırlanan kompetent hücrelerin kompetentliği eşit hacimde insert bulunduran ve bulundurmayan klonlama plazmitinin transformasyonu ile test edilir.

***E. coli* Elektro Kompetent Hücre Hazırlığı**

Klonlama zorluğu yaşanan bazı deneylerde, verimliliği arttırmak amacıyla elektroporasyon tercih edilmiştir. Elektroporasyonda hücre çeperinin zayıflatılmasına gerek olmadığı için, işlemler hücrelerin uzun süre saklanabilmesine yöneliktir.

1. 10 ml sıvı LB'ye inoküle edilmiş *E. coli* hücresi 37°C'de bir gece büyütülerek başlangıç kültürü elde edilir.
2. Sabah başlangıç kültüründen 1 ml alınarak 125 ml sıvı LB'ye aktarılır ve 37°C'de çalkalamalı olarak 600 nm OD'si 0.5'e ulaşınca kadar büyümeye bırakılır.
3. İstenen yoğunluğa ulaşan hücreler buz dolu bir kutuya alınır ve soğutulur, soğuyan hücreler, yine soğutulmuş, steril 50 ml falkon tüpte, 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 4000 x g'de 15 dk santrifüjlenir.
4. Süpernatant uzaklaştırılır, pelet 125 ml soğuk, steril %10 gliserol ile çözülür ve yine santrifüjlenir.

5. Süpernetant uzaklaştırılır ve pelet 60 ml soğuk, steril %10 gliserol ile çözülür ve santrifüjlenir.
6. Süpernetant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 5 ml soğuk, steril %10 gliserol ile çözülür santrifüj işlemi tekrarlanır ve bu kez pelet 400 µl soğuk, steril %10 gliserol ile çözülür ve 40'ar µl olacak şekilde tüplere bölünerek 86°C'de muhafaza edilir (BioRad).

Vektör DNA'nın Kompetent Hücrelere Transformasyonu

Sıcaklık şoku ile transformasyon, her 50 µl kimyasal kompetent hücre için 25 ng (Sambrook), 1-2 µl (promega) DNA ile gerçekleştirilmektedir.

1. Buzda 5 dk bekletilmiş kompetent hücreler ile DNA karıştırılarak 30 dk buzda inkübe edilir.
2. Süre sonunda hücreler 42°C'de 2, buzda 3 dk bekletilir.
3. Hücreler üzerine 500 µl LB besiyeri eklenir ve 30 dk 37°C'de 130 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrasında hücreler 8000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir ve yaklaşık olarak 100 µl süpernetant içinde çözülen hücreler LB-Agar-Ampicillin tabaklarına yayılarak gece boyu 37°C'de inkübe edilir (sambrook, promega). Mavi- beyaz seçilimi yapılacaksa transformasyon tabağına önceden 40 µl 25 mg/ml XGal yayılmış olmalıdır.

Elektrotransformasyonda, 1 pg - 25 ng arasında değişen miktarda ve 1 – 2 µl hacminde DNA'nın kullanılabilirdiği bu yöntem, elektrokompotent hale getirilmiş hücrelerde uygulanmalıdır. Elektrotransformasyon, BioRad Gene Pulser Xcell Elektroporasyon sistemi kullanılarak, C: 25 µF; PC:200 ohm; V:2.5 kV olduğu ve 0.2 cm küvetin kullanıldığı şartlarda gerçekleştirilir (BioRad, Sambrook).

1. Buzda bekletilen DNA ve hücreler karıştırılarak 1dk buzda inkübe edildikten sonra, yine buzda bekletilmekte olan küvete aktarılır ve ön ayarları yapılmış cihazın ShockPod adı verilen aparatına yerleştirilir.
2. Ön ayarları yapılmış olan cihazın pulse düğmesine basılır.

3. İşlem biter bitmez hücreler üzerine, 1 ml, oda sıcaklığındaki SOC besiyeri eklenir ve 15 ml'lik falkon tüpe alınan hücreler 1 saat süreyle, 37°C'de, 140 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilir.
4. Süre sonunda santrifüjlenerek az miktarda süpernetant içinde çözülmüş hücreler (mavi beyaz seleksiyonu gerçekleştirecekse önceden 40 µl 25 mg/ml XGal yayılmış olan) LB –Agar-Ampicillin tabağına yayılır ve gece boyu 37°C'de inkübe edilir (BioRad, Sambrook).

Transformasyondan önce, ligasyon ürünlerinin 65°C'de 10 dk enzim inaktivasyonuna alınması verim artışını sağladığından (kaynak) tüm transformasyon uygulamalarından önce enzim inaktivasyonu adımı gerçekleştirilmiştir.

1. S. Ymer, Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency, Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 24, 1991.

Koloni PZR Yöntemi ile Kolonilerin Taranması

Bu yöntem ön DNA hazırlığı gerektirmeksizin bakteri plak ve kolonilerinde doğrudan uygulanabilmekte ve transformant hücre plazmitlerinin insert taşıyıp taşımadığı PZR yöntemi ile tespit edilebilmektedir. Bu yöntem ile, plazmit izolasyonu için zaman ve sarf harcanmaksızın olasılıkla pozitif koloniler belirlenebilmektedir. Koloni PZR ile üretilen materyal restriksiyon reaksiyonunda, klonlamada ve dizi analizinde kullanılabilir (Güssow ve Clackson). *Dikkat edilmesi gereken en önemli husus, kullanılacak primerlerin E. coli genom DNA'sına oturmadığının, hedef gen için negatif olduğu bilinen klonun da koloni PZR'ye alınması ile teyit edilmesi gerekliliğidir.*

- Temiz bir tüpe 25 µl distile su eklenir.
- Steril şartlarda, bir öze ile alınan kültür bu suya inoküle edilir.
- 100'de 5 dk bekletilen hücre süspansiyonu 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
- Süpernetantın 20 µl'si yeni bir tüpe aktarılır ve 2 µl'si PZR çalışmasında kalıp olarak kullanılır [1].

1. D. Güssow ve T. Clackson, Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction, Nucleic Acids Res.; 1989.

Vektör DNA'nın Saflaştırılması

Vektör DNA'nın izolasyonunda Qiagene Plasmid Mini Kit Gravity yada Qiagene Plasmid Spin Mini Kit santrifüj kullanılmış ve protokole birebir uyulmuştur. Yer çekimine bağlı olarak yapılan saflaştırmada elüsyonlar otoklav edilmiş steril distile su ile, santrifüj ile yapılan saflaştırmalarda ise kitin içinde bulunan elüsyon tamponu ile gerçekleştirilmiştir.

Restriksiyon Enzim Analizi

Plazmit ve insert dizisini içten kesen ve kesmeyen enzimler WebCutter veri tabanında analiz edilerek belirlendikten sonra klonlamanın başarısının teyit edilmesi ve/veya parçaların özgün enzimler ile kesilerek yönlendirilmiş klonlamayı sağlayacak yapışkan uçların oluşturulması sağlanır. *İkili kesimlerde iki enzimin de çalışacağı ortak tamponun belirlenmesine ve kullanılması gereken enzim hacminin firmadan firmaya farklılık gösterdiğine dikkat edilmelidir.*

Yapılan analizler BtLig dizisinin NdeI, NotI, SacI, PstI, SmaI, XhoI gibi laboratuarda sıklıkla kullanılan enzimlerin içten tanıma bölgesine sahip olmadığını göstermiştir. Yine sıklıkla kullanılan enzimlerden BamHI, 930. bazda, HindIII 1226. bazda, EcoRI 1018 ve 1522. bazlarda olmak üzere iki yerde tanıma bölgesine sahiptir.

Dizi Analizi Reaksiyonu

Koloni PZR ve izole edilen plazmitin restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi ile yüksek olasılıkla pozitif olduğu belirlenen klonların doğruluğunun teyit edilmesi amacıyla dizi analizi çalışması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda PZR ürünü doğrudan kullanılabilir olsa da genellikle plazmit kullanımı tercih

edilmiştir. Çift zincirli bir DNA'nın reaksiyona girebilecek molekül sayısı 50-100 fmol ile sınırlandırılmış olup, 100 fmol'ün 3 kb'lik vektöre denk gelen miktarı 195 ng, 4 kb'lik vektör için 260 ng, 5 kb'lik vektör için 325 ng, 6 kb'lik vektör için ise 390 ng'dır.

Reaksiyon GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit kullanılarak, kitin tavsiye ettiği şartlarda kurulmuştur. Reaksiyon ürününün etanol çöktürmesi ile saflaştırılması kit protokolünde tarif edildiği şekilde uygulanırken; bu işlem daha sonra *verimlilik artışı sağladığından* manyetik boncuklar (Agencourt CleanSEQ) ile yapılmıştır. Saflaştırılan ürünlerin okumaları dizi analizi cihazı CEQ8000'de gerçekleştirilmiştir.

BtLig Geninin gDNA ve cDNA'sının Klonlanması

BtLig'in genomik kopyası, M. Taha Yıldız tarafından *T. thermophila* SB210'dan izole edilmiş gDNA'nın kalıp olarak kullanılması ile kurulmuş PZR ile elde edilmiştir. Reaksiyonda gen spesifik primerler ile Takara SpeedStar enzimi kullanılmıştır. Enzim ürettiği kopyanın 3' ucuna -A ekleme özelliğine sahip olduğundan, klasik metodla jelden saflaştırılan ürün pGEMT-E plazmitine ligasyonda doğrudan kullanılabilmiştir. Ligasyon ürünü sıcaklık şoku yoluyla XL-1 Blue suşuna aktarılmış, transformasyon tabağındaki beyaz kolonilerden plazmit izole edilmiştir. İzole edilen plazmit, vektörün çoklu klonlama bölgesinde tanıma bölgesine sahip olan fakat insertü içten kesmeyen NotI (Takara) enzimi ile kesilerek agaroz jel analizine alınmıştır.

Genin cDNA kopyasının üretilmesi amacıyla, 30°C sıcaklıkta büyütülmüş *Tetrahymena* hücrelerinden Qiagene RNeasy Mini Kit ile protokole birebir uyularak RNA izolasyonu yapılmış ve Promega RQ1 RNase free DNase kullanılarak, elde edilen RNA'nın 12 µg'ı ile 20 µl hacminde DNase uygulaması gerçekleştirilmiştir. DNase muamelesi gören RNA'nın DNase reaktiflerinden temizlenmesi ise yine Qiagene RNeasy Mini Kiti kullanılarak, kite ait RNA Clean Up protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiş ve NanoDrop ile yoğunluk ve saflık tayini gerçekleştirilmiştir. Saflığı (260/280: 2.21) ve yoğunluğu (213.5 ng/µl) sonraki aşamalarda kullanılabilceğini gösteren RNA havuzundan sadece

mRNA topluluğunun elde edilmesi, 1µg RNA'nın Fermentas RevertAid M MuLV-RT kiti ile ters transkripsiyon (RT) reaksiyonuna sokulması ile sağlanmıştır. RT ürününün kalıp olarak kullanıldığı ve gen spesifik primerler ile kurulan RT-PZR sonucu genin cDNA'sı elde edilmiştir. PrimeStar (Takara) enzimi kullanılarak elde edilmiş olan ürün jelden saflaştırılmış, Taq Polymerase (Fermentas) enzimi ile –A ekleme reaksiyonu kurulmuş ve pGEMT-E plazmitine klonlanmıştır. Ligasyon ürünü, *elektrotransformasyon ortamında tuz bulunmaması gerektiğinden PZR saflaştırma kiti (Qiagene) ile saflaştırılarak, konsantre edilmiş, distile suda çözülmüştür.* Bu çözeltinin 1:5 dilüsyonunun 2 µl'si, elektrokompotent hale getirilmiş XL-1 Blue konakçısının elektrotransformasyonunda kullanılmıştır. Transformasyon tabağındaki beyaz kolonilerden hazırlanan master tabakta beyaz kalmaya devam eden 6 koloni ile koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR sonucu ürün veren koloniden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve NotI enzimi ile kesilerek, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

BtLig cDNA'sının 5' ve 3' Translasyona Girmeyen Bölgelerinin Karakterizasyonu

3' RACE PZR uygulamasında, geri primer olarak mRNA'nın polyA kuyruğuna uygun şekilde tasarlanmış dT₁₈ primeri ile reaksiyonda spesifikliği sağlaması açısından ileri primer olarak gen spesifik FBt19 primeri kullanılmıştır. Bu reaksiyon sonraki reaksiyon için kalıp olarak kullanılarak genin 3' ucuna daha yakın ileri primer olan FBt20 ile nested PZR kurulmuştur. Nested PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak aynı primer çifti ile rePZR kurulmuş ve ürünün güçlendirilmesi sağlanmıştır. UTR bölgesinin yaklaşık olarak 150 bp uzunluğunda olduğu kabul edildiğinde nested PZR sonucu beklenen ürün büyüklüğü 270 bp'dir.

3' RACE çalışmasında kullanılan ileri primerler:

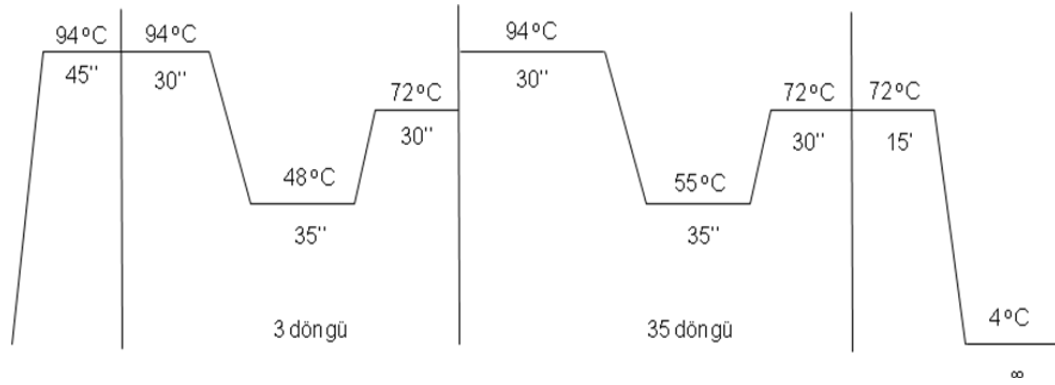
FBt19 5' agagaacaacttgaatcagagc 3'

FBt20 5' gatgaccaaagaagaaggccacc 3'

Reaksiyon (50 µl):

1/10 oranında seyreltilmiş RT ürünü	2 µl
FBt19 (2.5 µM)	5 µl
dT ₁₈ (2.5 µM)	5 µl
dNTP karışımı (2 mM)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
10 Taq Buffer	10 µl
Taq Polymerase (5u/ml)	0.4 µl
dH ₂ O	18.6 µl

Çalışma Şartları:



Reaksiyonlar sonucu elde edilen ürünler jelden kesilerek Qiagene QiaQuick Gel Extraction Kit ile jelden saflaştırılmış ve pGEMT Easy vektörüne Promega T4 ligaz enzimi ile eklenmiştir. Gece boyu süren ligasyon reaksiyonu sonunda ligasyon ürünleri dH₂O ile 100 µl'ye tamamlanmış ve Qiagene PCR saflaştırma kiti ile reaktiflerinden temizlenen plazmitler 50 µl EB'de elüe edilmiştir. Konsantratörde 35 dk süresince 42°C sıcaklık uygulanan elüent 40 dakika döndürülerek tüm sıvısı uzaklaştırılmış ve pelet 6 µl dH₂O içinde çözülmüştür. Yaklaşık 20 ng'a denk gelen 1.4 µl hacmindeki plazmit elektrokompotent *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır.

Transformasyon tabaklarındaki kolonilerden beyaz olanlar ile master tabak hazırlanmıştır. Master tabaktaki alt ve üst bandı temsil eden 5'er koloni 1X oranında Amfisilin içeren LB besiyerine aktarılmış, 37°C de gece boyu büyütülen kolonilerden Qiagene Plasmid Mini Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. WebCutter programı ile BtLig'in 3' ucundaki 150 bç'lik kısım ile 3' UTR bölgesinin yaklaşık 150 bç'lik kısmını içten kesmediği tespit edilen EcoRI enzimi

ile alt ve üst bant klonlarının oluşturduğu 10 plazmitten kesim reaksiyonu kurulmuş ve hepsinden alt ve üst bandı temsil eden insert bantları elde edilmiştir. Bu ürünleri en iyi temsil eden iki klon seçilerek dizi analizinde kullanılmıştır.

Dizi analizinde, Beckman Coulter GenomeLab DTCS Quick Start Kit kitinin önerdiği şartlarda, pGEM-T Easy plazmitine uygun olarak dizi analizi çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanmış ileri primer ile reaksiyon kurulmuş ve Becman CEQ8000 dizi analizi cihazı ile okumalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizideki vektör bilgisi NCBI veri tabanındaki VecScreen programı ile uzaklaştırılmış, temizlenen dizi, BlastX programı ve GeneTool hizalama programında kullanılmıştır.

BtLig Geninin Nokta Mutasyonlarının Yerleştirilmesi

Nokta mutasyonu yapılmasını gerektiren bölgeler GeneTool programı ile belirlenmiştir. GeneTool programındaki translasyon analizi, DNA dizilerinin aminoasit karşılığının bulunabilmesini sağlar. Analiz sonucunda, analiz edilen diziye ait kodonların üzerinde, bu kodonlara karşılık gelen aminoasitler harflendirme ile gösterilir. Dizideki “DUR” kodonları ise, aminoasit kodlamadığından, “*” işareti ile belirtilir. *Tetrahymena*'ya ait bir gen dizisi bu şekilde analiz edildiğinde, dizi içinde “*” işaretinin görüldüğü kodonların, mutasyon gerektiren “DUR” kodonları olduğu anlaşılır.

Tetrahymena BtLig geninin (NCBI ulaşım numarası XM_001011861) cDNA dizisinin GeneTool analizi sonucunda, mutasyon gerektiren 22 kodon taşıdığı görülmüştür.

		G	N	K	S	*	I	R	Y	G	
FBt1	5'	gga	aat	aaa	tct	taa	atc	aga	tat	gga	3'
RBt1	3'	cct	tta	ttt	aga	att	tag	tct	ata	cct	5'

Şekil : Nokta mutasyonu için ileri ve geri primer tasarımı.

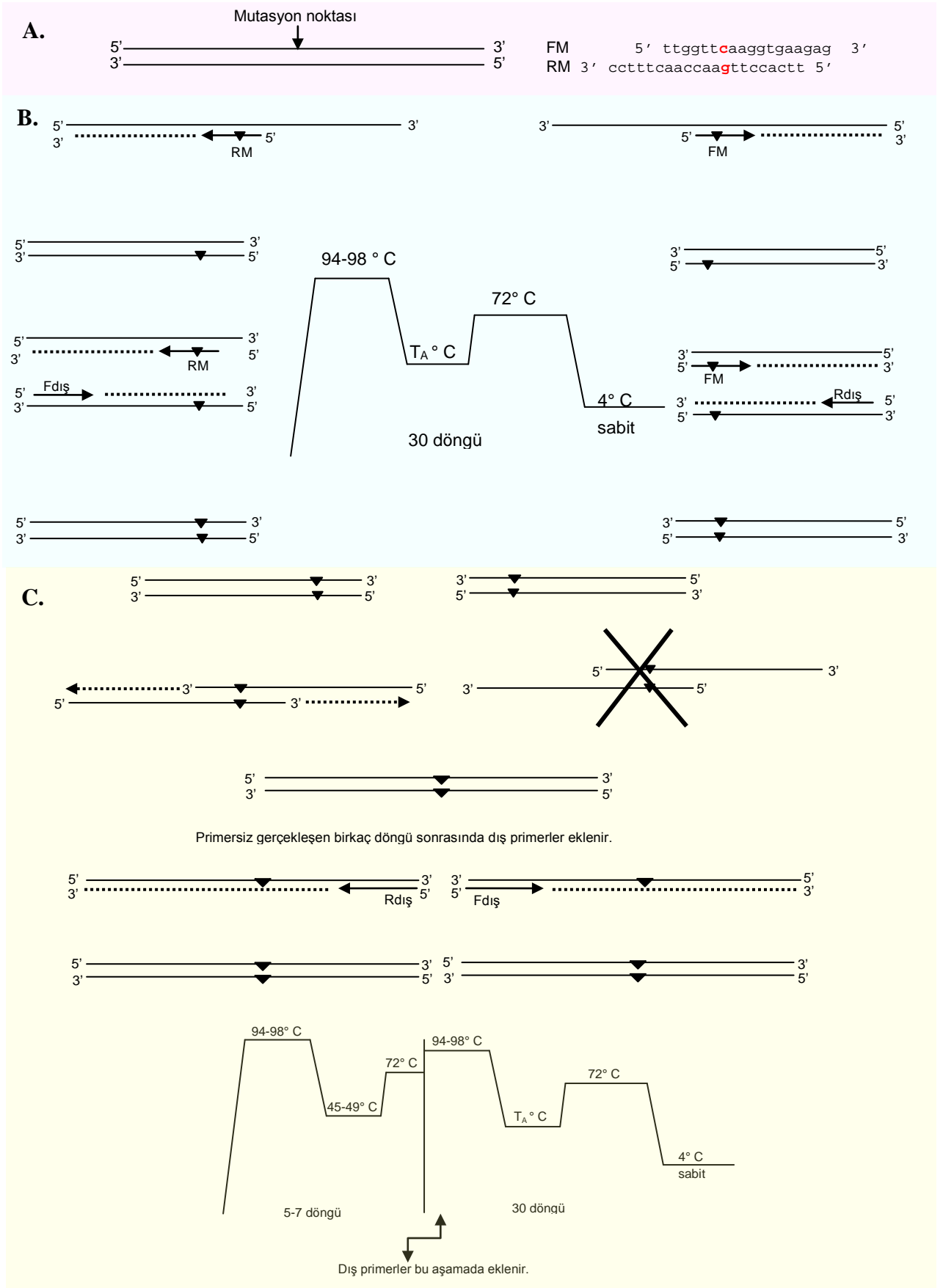
Şekilde BtLig genine ait cDNA dizisi ile bu dizinin komplementer zinciri birlikte verilmiştir. Kodonlar üzerindeki büyük harfler, kodon tarafından kodlanan aminoasidi göstermektedir. Anlamli zincir üzerindeki açık gri gölgesi

dizi, metin içinde bahsedildiği şekilde tasarlanmış ileri primeri (FBt1); komplementer zincir üzerinde görünen koyu gri gölgeli dizi ise geri primeri (RBt1) göstermektedir. Nokta mutasyonu gerektiren kodon, üzerindeki “*” işareti ile ayırt edilmektedir. İleri primer olması tasarlanan dizi içindeki “taa”, “caa” şeklinde, buna komplementer olan geri primer içindeki “att” ise “gtt” şeklinde değiştirilerek sipariş edilir.

“Örtüşen bölgelerin uzatılması ile spesifik/yönlendirilmiş mutasyon oluşturma” yöntemi (Site-specific Mutagenesis by Overlap Extension / Site-directed Mutagenesis by Overlap Extension) ile bir nokta mutasyonunun yerleştirilmesi, özel tasarlanmış mutasyon taşıyan primerler kullanılarak, iki basamakta gerçekleştirilen, PZR temelli bir yöntemdir.

İki aşamada gerçekleşen PZR temelli yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarında, tek bir mutasyonun yerleştirilmesi için 4 primer kullanılır. Primerlerden ikisi mutasyon bölgesi için tasarlanmış mutasyon primerleridir: FM ve RM (Şekil 2A). Diğer iki primer ise mutasyon taşımayan dış primerlerdir: F ve R. Reaksiyonun ilk aşamasında bu primerler kullanılarak mutasyonu taşıyan parçalar elde edilir (Şekil 2.B). İkinci aşamada ise, saflaştırılan bu parçalar polimerizasyon reaksiyonuna alınır, primersiz gerçekleşen birkaç döngü sonrasında dış primerler eklenerek, mutasyon taşıyan ürününün logaritmik olarak çoğalması sağlanır (Şekil 2.C).

Sentetik oligonükleotid temelli bu yaklaşım, mutasyon yerleştirme, dizi ekleme çıkarma ve hibrit gen elde etme çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir.



Şekil : Bir nokta mutasyonunun yerleştirilmesi.

Yukarıdaki şekle göre, PZR temelli bu sistemde mutasyon taşıyan ileri ve geri iç primerler ile (FM, RM) mutasyon taşımayan dış primerler (Fdış ve Rdış) kullanılır. Diziye mutasyonun yerleştirilmesi iki aşamada gerçekleştirilir: Nokta mutasyonu taşıyan parçaların üretilmesi ve mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesi. **A. Mutasyon bölgeleri ve primerlerin belirlenmesi.** Mutasyon yerleştirilmesi gereken dizi ve örnek mutasyon primerleri görülmekte. **B. Mutasyon taşıyan parçaların üretilmesi.** Çalışmanın ilk aşamasında “dur” kodunu (taa, tag) taşıyan diziye, aynı yerleşimde “glutamin” kodunu (caa, cag) taşıyan nokta mutasyonu primerlerinin kullanıldığı PZR çalışması ile mutasyon yerleştirilir. Bu aşamada nokta mutasyonu primerleri ile dış primerler çiftler halinde (Fdış-RM ve FM-Rdış) kullanılır. Hata tamir özelliğine sahip DNA polimeraz enzimlerinin kullanıldığı reaksiyon, klasik PZR şartlarında gerçekleşir. Reaksiyon sonucunda, mutasyon taşıyan ve birbirine komplementer oligonükleotid bölgesine sahip iki dizi elde edilir. **C. Üretilen parçaların birleştirilmesi.** Mutasyon taşıyan iki dizi polimerizasyon reaksiyonuna alınır, bir dizinin örtüşen bölgesinin 3’ ucu, diğeri için primer vazifesi gördüğü için polimerizasyon gerçekleşir, tek bir mutasyon taşıyan tüm dizi bu aşamada elde edilir. Bu şekilde primer eklenmeden gerçekleşen birkaç döngü sonrası, dış primerler de eklenerek, dizinin logaritmik olarak çoğaltılması sağlanır.

Mutasyon Taşıyan Primerlerin Tasarlanması

PZR temelli nokta mutasyonu deneylerinde, mutasyon bölgesi için ileri ve geri olmak üzere iki primer tasarlanır. Primerler, en az 20 bç uzunluğunda olmalıdır. Mutasyonu gerçekleştirecek nükleotidin primerin 5’ ucuna olan uzaklığı 8-10 mer, 3’ ucuna olan uzaklığı en az 10-15 mer uzunluğunda olmalıdır (Şekil 1). Dizi içindeki “taa” ve/ veya “tag” dur kodonları ileri primer içinde sırasıyla “caa” ve “cag” ile değiştirilerek *E. coli* için “glutamin” kodlar hale getirilir. Bu kurallar dikkate alınarak BtLig geni için 20 adet nokta mutasyonu primeri tasarlanmıştır.

Primer listesi incelendiğinde 20 çift nokta mutasyonu primeri, 1 çift dış primer ile FBt14 primerinin dış primer versiyonu görülmektedir. Ligaz proteinin

aktivite gösterebilecek en küçük parçasının belirlenebilmesi amacıyla Rossi ve ark.larının T4 DNA Ligaz ile yaptıkları çalışmadan yola çıkılarak BtLigaz'ın katalitik domaini ve tüm motiflerini taşıyan parçasının üretilmesine karar verilmiş ve bu dizinin 5' ucu olarak FBt14 primerinin denk geldiği bölge belirlenmiştir. Diğer dış primer gibi bu primer de pET16b vektörüne klonlama için gerekli NdeI enzimi tanıma dizisi taşımaktadır. Bu diziye çalışma süresince BtLig Katalitik Bölge (BtLig KB) ismi verilmiştir.

EK- 7 Nokta Mutasyonlarının Yerleştirilmesi Amacıyla Kullanılan Primerlerin Listesi

Çizelge: BtLig geni nokta mutasyonu çalışmasında kullanılan primer setleri ile dış primerlerin listesi.

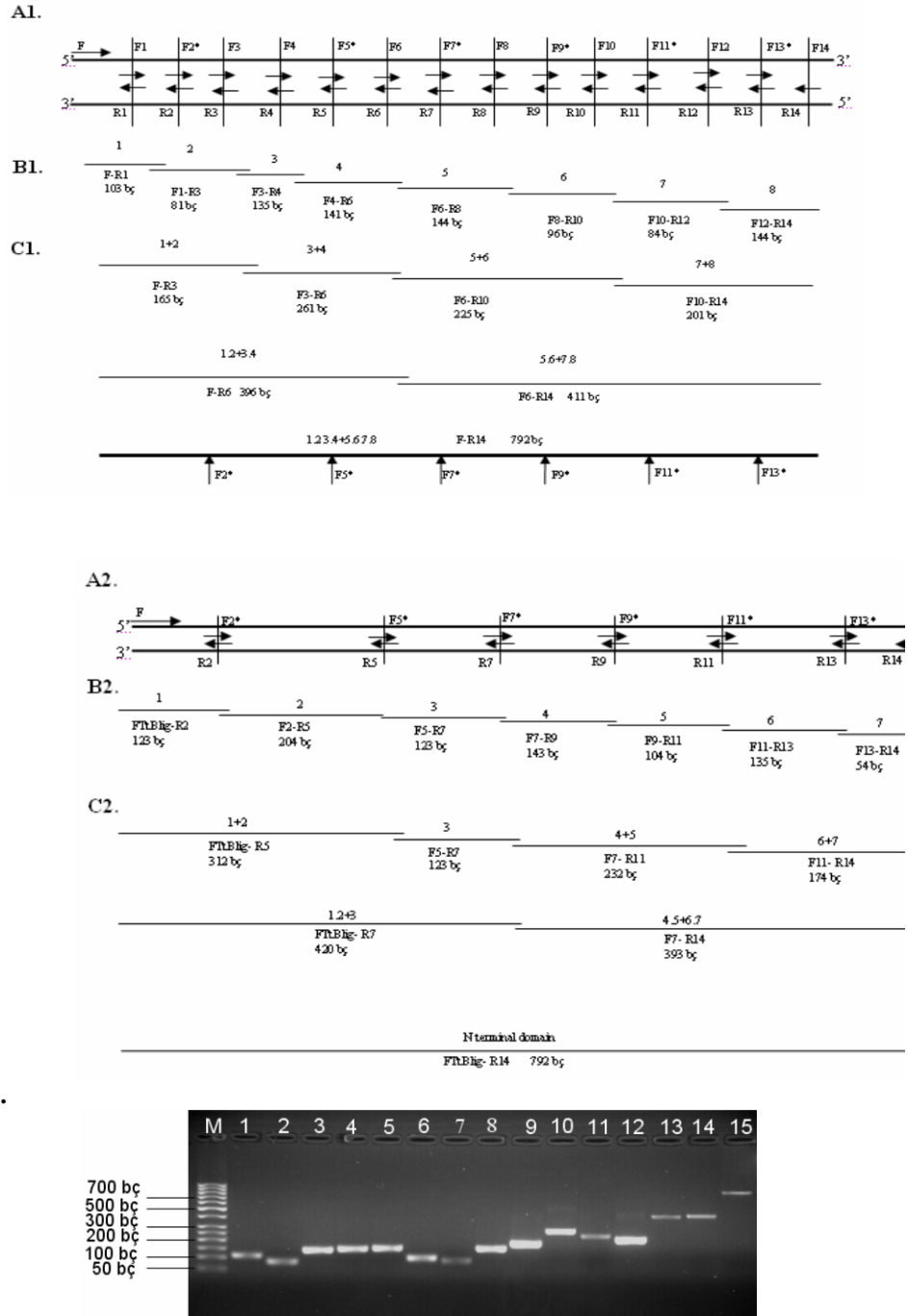
Primer Adı	Primer Dizisi	Mutasyon Numarası
FBt1 RBt1	5' aaatct caa atcagatatg 3' 3' cctttat tt tagag gt tttagtct 5'	1
FBt2 RBt2	5' ttggtt ca aggtgaagag 3' 3' cctttca acca agttccactt 5'	2
RBt3 FBt3	5' aaaact caa attgtc caaa agcagcaca aa agacactg 3' 3' cttctct tt tga gt tttaacag gt tttctgctgtg tt 5'	3 ve 4
FBt4 RBt4	5' gagcct gaa atcatcattcct 3' 3' ttcttactc gga cttttagtag 5'	5
FBt5 RBt5	5' tcaatt caa atttcagcacct 3' 3' cctaaaag tt aagtttaagt 5'	6
RBt6 FBt6	5' tattt ca ggaaaacaaaac 3' 3' gttcgcata aat gtccttttg 5'	7
RBt7 FBt7	5' tcatc aca atttgaattttaac 3' 3' gaaccagtagt gt ttaaacat 5'	8
FBt8 RBt8	5' gcaaac ca gtgtaaattg 3' 5' gttataattc ac g tt gtcacattt 3'	9
FBt9 RBt9	5' aaaaat caa attgaggaatac 3' 3' cataaag tt tttag gt tttaactc 5'	10
FBt10 RBt10	5' aatttt ca gctaaatgaag 3' 3' gttatatt aaa agtcgattta 5'	11
FBt11 RBt11	5' tcagc aca aaatggatctag 3' 3' gaaaagtc gt ttttacc 5'	12
FBt12 RBt12	5' aataat ca gcttgatctcaacc aga aaaggc 3' 5' tcattattattag tc gaaactagagtt gt tcttt 3'	13 ve 14
FBt13 RBt13	5' tcagat ca g tc cagatttaactgc 3' 5' ccatagagt ct ag tc cagtcta 3'	15
FBtpETNdeI FBt14 RBt14	5' gcgcatatgggctctcaattagatttatca 3' 5' ggctct ca atttagatttatca 3' 5' cagaccaccgagag gt taactca 3'	16
FBt15 RBt15	5' cttttagct ca agcaatgccagatg 3' 5' ccacatgaaaat cg agttcgttac 3'	17
FBt16 RBt16	5' ccaaattgcttcatt caaa atttc 3' 3' ggtaaaaag ta agttttaaagggt 5'	18
FBt17 RBt17	5' gatttc ca gcgttgtgtgggt 3' 5' tctctactaa ag tcgcaaca 3'	19
FBt18 RBt18	5' caagaa ca aattc caaa acttgggt 3' 5' cgaaatg tt ctt gt tttaagg ta aacttgggt 3'	20
FBt19 RBt19	5' agaga ca aacttgaatcagagc 3' 5' ctctcgtctct gt ttgaactt 3'	21
FBt20 RBt20	5' gatgac ca agaagaaggccacc 3' 5' gtactact g gtttcttct 3'	22
FBtBütpETNdeI RBtpETXhoI	5' gcgcatatgatgat caaa attgattta caaa acct 3' 5' gcgctcagatcattcgtcttcttttattctca 3'	Dış Primer

Yukarıdaki çizelgede, tasarlanan primer dizileri komplementer bölgeleri örtüşecek şekilde gösterilmiş ve mutasyon noktası kalın karakter ile belirtilmiştir. Bu primerlerden FBt4, RBt4 ve FBt16'nın hatalı tasarlandığı mutasyon çalışmalarından sonra fark edilmiştir. FBt4'de nokta mutasyonu kodonu "caa" şeklinde olması gereken kodon "gaa" şeklinde yazılarak glutamin yerine glutamat kodlar duruma getirilmiştir, hata bu dizinin komplementeri olan geri primere de "ctt" yazılarak aktarılmıştır. FBt16'da ise, primerin 3' ucundaki 9 bazlık bölge 5' ucunda yazılarak, primer içinde yanlışlıkla translokasyon gerçekleştirilmiş fakat hata bu primerin komplementeri olan geri primere aktarılmamıştır. Hatalı bölgeler kırmızı renkli harflendirme ile belirtilmiştir.

Çizelge: Aktif merkezin inaktif duruma getirilmesi için tasarlanan F ve R BtK*L primerleri, daha önce aktif dizilerin nokta mutasyonlarının yerleştirilmesi için tasarlanmış olan ve bu deneyde de kullanılan nokta mutasyonu primerleri ile diziyeye ait dış primerlerin listesi aşağıda verilmiştir. F ve R BtK*L primerleri ile "aaa" kodonu ile kodlanan Lizin amino asidinin "cta" (GRİ gölgeli) (5) ile kodlanan Lösin amino asidine dönüştürülmesi hedeflenmiştir.

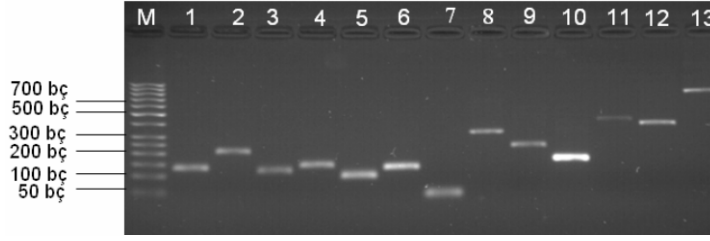
Primer Adı	Primer Dizisi	Mutasyon Numarası
FBtK*L RBtK*L	5' gcaagtgaactaatggatggagtcagagc 3' 3' accatacgttcacttgattacctacct 5'	K*L
FBt14 RBt14	5' ggctctcaattagatttatca 3' 3' cagaccaccgagagtttaattcta 5'	16
FBt17 RBt17	5' gatttccagcgttggtggtgggt 3' 3' tctctactaaaggctcgcaaca 5'	19
FTtBlig RTtBlig	5' gcgcataatgatgatcaaaattgatttaacaaaacct 3' 5' gcgctcgagtcattcgtcttcttttattctcaa 3'	Dış

EK -8 N Terminal Domaininin Nokta Mutasyonlarının Yerleştirilmesi



Şekil . BtLig1 N terminali 15 nokta mutasyonunun iki aşamada yerleştirilmesi.

E.



Şekil . (Devam) BtLig1 N terminali 15 nokta mutasyonunun iki aşamada yerleştirilmesi.

15 mutasyonun yerleştirilmesi nokta mutasyonların bazı noktalarda çok yakın olmasından dolayı 2 aşamada (Aşama 1: A1, B1 ve C1 ile Aşama 2: A2, B2 ve C2) gerçekleştirilmiştir. **A1 ve A2. Mutasyon yerleştirilmesi gereken bölgeler ve mutasyonlu primerlerin BtLig1 cDNA üzerindeki olası pozisyonları.** Dizide mutasyon gerektiren bölgeler (dik çizgiler), kullanılacak ileri (sağ yönelmiş ok) ve geri (sola yönelmiş ok) primerler gösterilmiştir. Hedef mutasyonun BtLig dizisine aktarılabilmesi için ileri ve geri primerlerin çiftler halinde (F-R1, F1-R2..) kullanıldığı PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çizimde, üzerinde “*” işareti bulunan primerler, kullanılmaları durumunda elde edilecek ürünün çok küçük olması sebebiyle, ilk aşamada kullanılamamıştır. Birinci aşamada işaretli primerler kullanılarak parçalar üretilmiş, birleştirilmiş ve bu mutasyon taşıyan bu parça kullanılarak, ikinci aşamada “*” işaretli primerler ile eksik mutasyonlar yerleştirilmiştir. **B1 ve B2. Mutasyon taşıyan DNA parçalarının PZR ile üretilen beklenen ürün büyüklükleri.** Şekilde çizgiler üretilen parçaları, çizgi üstüne parça numarası ve altında parçanın üretilmesi için kullanılan primer çifti ile ürün büyüklüğü gösterilmiştir. B1’de parçaların üretilmesi için işaretli primerler kullanılmış ve 9 mutasyon yerleştirilmiştir. B2’de ilk aşamada kullanılmayan “*” işaretli primerler kullanılarak kalan 6 mutasyonu taşıyan 7 parça üretilmiştir. **C1 ve C2. Tüm mutasyonları taşıyan hedef ürünlerin PZR deneyi sonunda elde edilen deneysel ürünleri.** Üretilerek saflaştırılan parçalar, komplementer 3’ uçlarından birbirilerine megaprimer gibi davranması prensibi ile birleştirilmiş ve mutasyon taşıyan N terminal bölgesi elde edilmiştir. **D.** İlk aşama PZR çalışması ile elde edilen ürünler (1-8. kuyular) ve bu ürünlerin birleştirilmesi ile ilk 9 mutasyonu taşıyan bütün parça üretilmiştir (9-15. kuyular). **E.** İlk aşamadaki PZR çalışmaları ile 9 mutasyonun yerleştirildiği parça kullanılarak diğer primerler ile kalan 6

mutasyonu taşıyan parçalar üretilmiş (1-7), birleştirilmiş (8-13. kuyular) ve 15 mutasyonu taşıyan N terminal bölgesi elde edilmiştir (13. kuyu). M. Marker (Fermentas 50 bp DNA Ladder)

Ek -9 Aktif TtLIG13-pGEMT Easy ve Aktif TtLIG13-KD-pGEMT Easy Plazmitlerinin Dizi analizi Sonuçları

>RBT8ButunDiziRC

```
catgatccaaactgattcacaaaacctgtatttcttaattttaatcaatcaaagtttgggaaatcagcc
tgcttgatggaaataaatctcaaactagatatggaaagtgggttcaaggtgaagagattgaagagaaaac
tcaaattgtccaaaagcagcacaagacactgactcttggttagattacataataagagtgattgaaaac
aaaaaattgaaaggatagcggagatattcccatgaaaaagaatgagcctgaaatcatcattcctgcaa
ataacgcaagtggatttttcaattcaaatttcagcacctaaatctggtgaaaaataatgctaacgatgata
aagattctaaagttgattcaaatactcaagcgtatttacaggaaaaacaaaacttgggtcatcacaatttgt
aattttaactctgtctggcaatgaagtagaagaatttataggcaaaacttaggaataaaaa
```

>FBt7ButunDizi

```
tataggcaactaggaataaaaaagactgggaaaaagttactacaatattaagtgcaaaccagtgtaaatt
gtatttcaaaaatcaaattgaggaatacgaagaaagggatgtagagagatgatagtcataataatctt
cagctaaatgaagtttaataaacacttttcagcacaataatggatctagtaataataatcagcttgatctca
accagaaaggcaaaaagaaaaattttaataaagattcaggggtatacgcagattcacattcaaataatctc
aggtatctcagatcagtcagatttaactgctaggtctgggtgctctcaattagatttatcattcgacaag
ggatgatgatgatggtaatactcagttggtgtaactggagaaaataaaaaaggttcttaggtgctaac
ggaagtaggattcaggtgactttacctcaggtatgcccgatgaatggat
```

>ButunDiziFpGemRC

```
tagtgctacgaagttgattcaggtgacttagctcagcatgcagatgaatgatccactgctgtatgcaagt
gaaaaatgatgagtcagagctgttgactgaaagacattttatcttaggatgtaacgattctccctcctcca
tctttcattcaaaaatttccaaattgcactttagatggggaattggtttacaaaagagatgattccagc
gttggtgggtattggttaagacaaaaaatggaaatgaagaaaaagatgaaaggtggaaagatattggtta
cttagtttacgactgctntaaattattaaaaccctttaaagatagaataaaaagctttacaagaacaaatt
ccaaaacttggaacaagtacattaaagttcttccacataagatagtgagagcagagaacaacttgaat
cagagcttgatagagcttataaaaaataatggcgaaggtttgatgtaagagatcctaattcaatgatga
atgcagaagatcaaaaacccttcttaaggtaaaaacatttacagatgaagaagctacagtaattgggag
gaaagagtgaaaggaagatgtgcagatagatgggtgctttggatgcccgtatgaaaaatggaaaagaat
tcaaaataggatcaggattcaatgatgaccaaaagaagaaggccacctaaaaaaggaagtgataacatt
caaatacaaaaatcttaccaaagatggtaaccaagattccctattttcttgagaataaaaagaagacgaa
tgagggcccctgcagatc
```

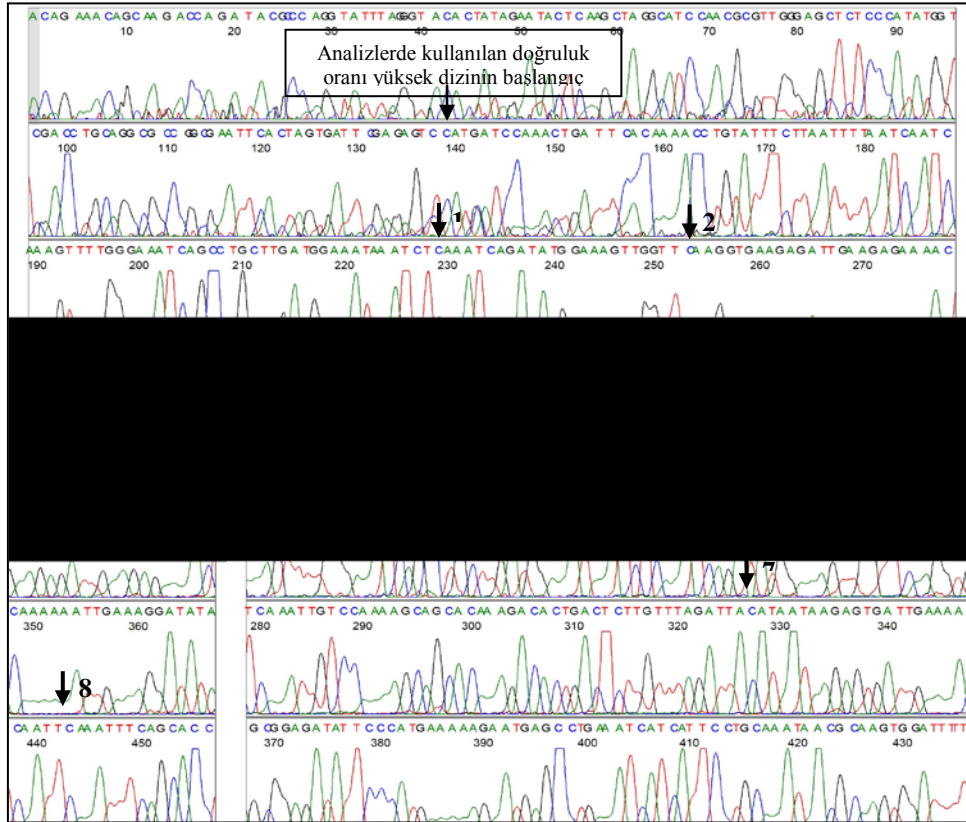
>KisaDiziFpGem

```
ttgcccagctcggctctcaattagatttatcattcgacaaggggtgatgatgatggtaataagctcagt
tgttgtaactggagaaattaaaaaaggttctttaggtgctaaccggaagtaggattcaggtgactttta
gctcaagcaatgccagatgaaatggatccaactggctggtatgcaagtgaaaaaatggatggagtcagag
ctggttggactggaaagacattttattctaggaatggtaacgaattctaccctcctccattttcattca
aaatttccaaattgcactttagatggggaattggtttacaaaagagatgattccagcgttgggtgggt
attggttaagacaaaaaatggaaatgaagaaaaagatgaaangtggaaagatattggttacttagtttacg
actgtcctaaattattaaaaccctttaaagataggataaaaagctttacaagaacaaattccaaaacttg
taacaagtacattaaagttcttccacataagatagtgagagcagagaacaacttgaatcagagcttgat
agagcttataaaaaataatggcgaaggttgatgtaagagatcctaactcaatgatgaatgccgaagat
ccaaaacccttcttaaggtaaaaacatttacngatga
```

A

Rbt8ButunDiziRC	CATGATCCAAACTGATTCA-CAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAATCAATCAAAGTTTGG	59
BtLigcDNA	-ATGATCAAATTTGATTTAACAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAATCAATCAAAGTTTGG	59
	***** **	
	1	
	2	
Rbt8ButunDiziRC	GGAAATCAGCCTGCTTGATGGAAATAAATCTCAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTCAAGG	119
BtLigcDNA	GGAAATCAGCCTGCTTGATGGAAATAAATCTCAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTCAAGG	119
	***** **	
	3	4
Rbt8ButunDiziRC	TGAAGAGATTGAAGAGAAAACCTCAAATTTGTCCAAAAGCAGCACAAAGACACTGACTCTTG	179
BtLigcDNA	TGAAGAGATTGAAGAGAAAACCTCAAATTTGTCCAAAAGCAGCACAAAGACACTGACTCTTG	179
	***** **	
	5	
Rbt8ButunDiziRC	TTTAGATTACATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATAT	239
BtLigcDNA	TTTAGATTACATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATAT	239
	***** **	
	6	
Rbt8ButunDiziRC	TCCCATGAAAAGAATGAGCCTCAAATCATCATTCTGCAAAATAACGCAAGTGGATTTTT	299
BtLigcDNA	TCCCATGAAAAGAATGAGCCTCAAATCATCATTCTGCAAAATAACGCAAGTGGATTTTT-	298
	***** **	
	7	8
Rbt8ButunDiziRC	CAATTCAAATTCAGCACCTAAATCTGTTGAAAATAATGCTAACGATGATAAAGATTCTA	359
BtLigcDNA	CAATTCAAATTCAGCACCTAAATCTGTTGAAAATAATGCTAACGATGATAAAGATTCTA	358
	***** **	
	7	8
Rbt8ButunDiziRC	AAGTTGATTCAAATACTCAAGCGTATTTAAGGAAAACAAAACCTGGTCATCAAATTGG	419
BtLigcDNA	AAGTTGATTCAAATACTCAAGCGTATTTAAGGAAAACAAAACCTGGTCATCAAATTGG	418
	***** **	
	7	8
Rbt8ButunDiziRC	TAATTTAACTCTGTCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATATAGGCAAACTAGGAATAAAAA	479
BtLigcDNA	TAATTTAACTCTGTCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATATAGGCAAACTAGGAATAAAAA	478
	***** **	

R



Şekil 1: Rbt8 primerinin kullanıldığı dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen dizinin hizalanması. A. Edilen dizinin ters komplementlerinin *TtLIG13* cDNA'sı ile

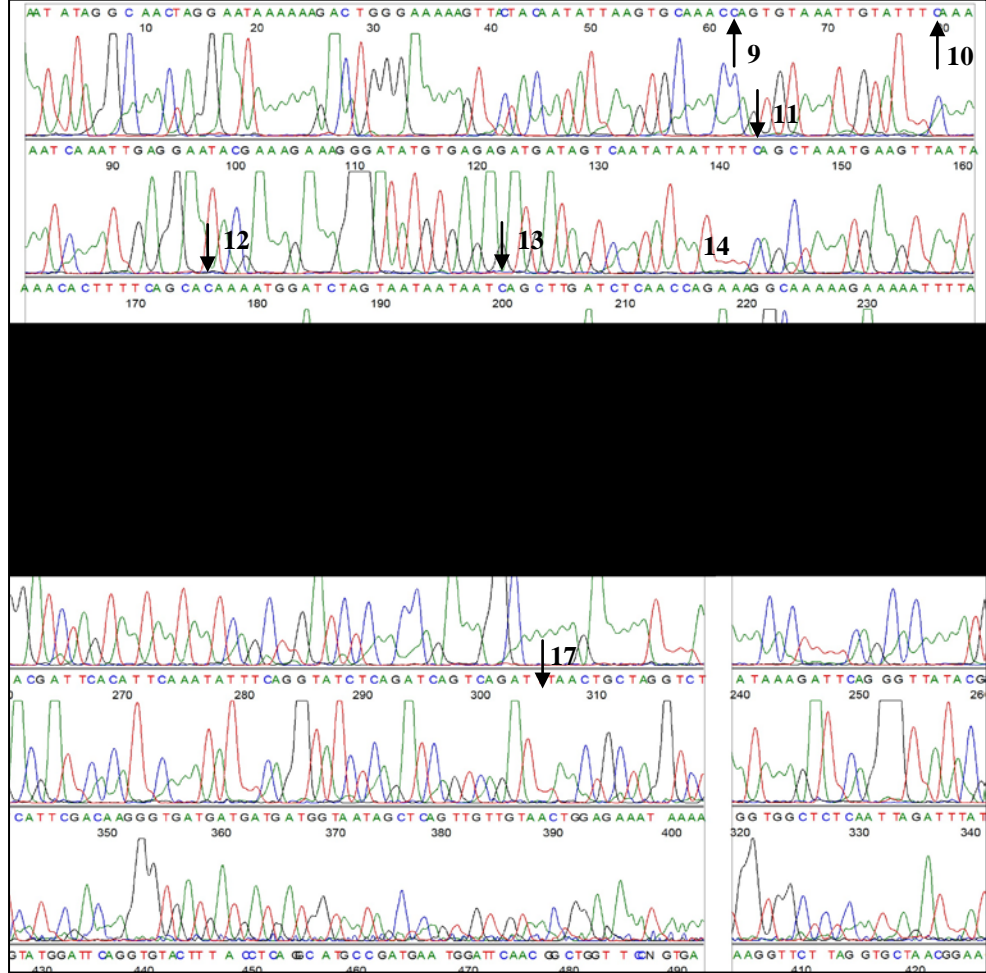
hizalanması sonucu 7 mutasyonun doğru bir şekilde diziyeye yerleştirildiği görülmekte. F/RBt4 primerlerinin hatalı tasarlanmış olması nedeniyle, 5. mutasyon dizinin glutamin yerine glutamat kodlayacak şekilde değişmesine neden olmuştur. **B.** Dizi analizi verileri FinchTV (13) programında açılarak piklerin güvenilirliği kontrol edilmiştir, oklar mutasyon bölgesini ve rakamlar mutasyon numarasını temsil etmektedir.

A

FBt7ButunDizi	AC-TGGGAAAAAGTTACTACAATATTAAGTGCAAAC	9	AGTGTAATTGTATTTCAAAAAT	83
TtLIG1cDNA	ACATGGGAAAAAGTTCTACAATATTAAGTGCAAAC		AGTGTAATTGTATTTCAAAAAT	540
	** ***** * *****		*****	
FBt7ButunDizi	CAAATTGAGGAATACGAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTT	10	11	143
TtLIG1cDNA	CAAATTGAGGAATACGAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTT		AG	600
	*****		**	
FBt7ButunDizi	CTAAATGAAGTTAATAAACACTTTTCAGCA	12	13	203
TtLIG1cDNA	CTAAATGAAGTTAATAAACACTTTTCAGCA		AAAATGGATCTAGTAATAATAAT	660
	*****		*****	
FBt7ButunDizi	GATCTCAAC	14	AGAAAGGCAAAAAGAAAATTTTAATAAAGATTCAGGGTTATACGACGAT	263
TtLIG1cDNA	GATCTCAAC		AGAAAGGCAAAAAGAAAATTTTAATAAAGATTCAGGGTTATACGACGAT	720
	*****		*****	
FBt7ButunDizi	TCACATTCAAATATTTTCAGGTATCTCAGAT	15	AGTCAGATTTAACTGCTAGGCTGGTGGC	323
TtLIG1cDNA	TCACATTCAAATATTTTCAGGTATCTCAGAT		AGTCAGATTTAACTGCTAGGCTGGTGGC	780
	*****		*****	
FBt7ButunDizi	TCT	16	AATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT	383
TtLIG1cDNA	TCT		AATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT	840
	***		*****	
FBt7ButunDizi	GTAACGGAGAAAT-AAAAAAGGTTCTT-AGGTGCTAACGGAAGTATGGATTCAGGTGTA	17		441
TtLIG1cDNA	GTAACGGAGAAATAAAAAAGGTTCTT-AGGTGCTAACGGAAGTATGGATTCAGGTGTA			900
	*****		*****	
FBt7ButunDizi	CTTT-ACCT	17	AGGCA-TGCC-GATGAA-TGGAT-----	470
TtLIG1cDNA	CTTTTAGCT		AAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACGGCTGGTATGCAAGTAAAAA	960
	**** * * * * *		*****	

Şekil 2. FBt7 primerinin kullanıldığı dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen dizinin hizalanması.

B.



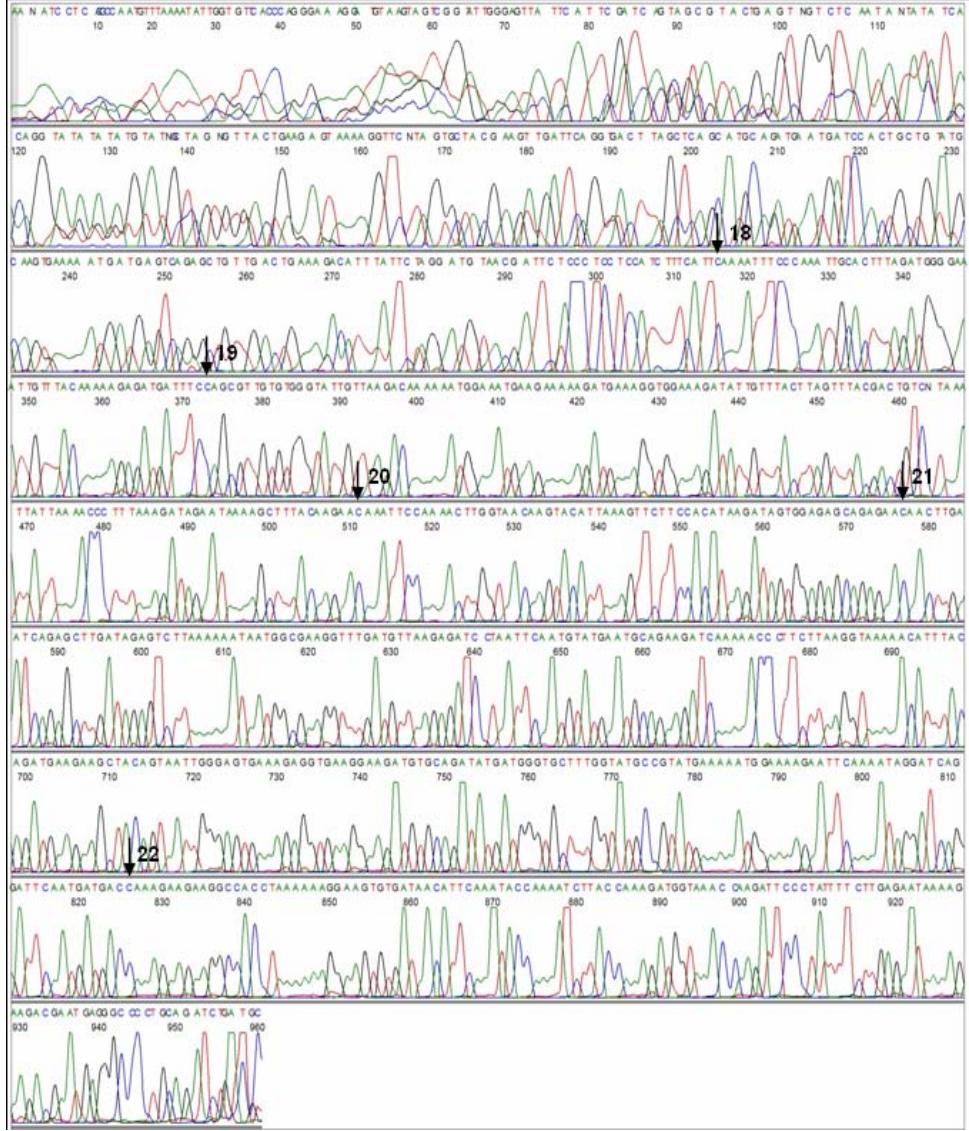
Şekil 2. (Devam) FBt7 primerinin kullanıldığı dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen dizinin hizalanması. A. Edilen dizinin *TtLIG13* cDNA'sı ile hizalanması sonucu, 9. ve 17. mutasyonlar arasındaki 9 mutasyonun doğru bir şekilde diziye yerleştirildiği görülmekte. **B.** Dizi analizi verileri FinchTV (13) programında açılarak piklerin güvenilirliği kontrol edilmiştir, oklar mutasyon bölgesini ve rakamlar mutasyon numarasını temsil etmektedir.

A

	18		
ButunDiziFpGemRC	TTCT-CCCTCCTCCATCTTTCATT	AAAAATTCCCAAATTCACACTTTAGATGGGGAATTG	185
TtLIG1cDNA	TTCTACCTCCTCCATTTTCATT	AAAAATTCCCAAATTCACACTTTAGATGGGGAATTG	1080
	*****	*****	*****
	19		
ButunDiziFpGemRC	TTTACAAAAAGAGATGATTTTC	AGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAT	245
TtLIG1cDNA	TTTACAAAAAGAGATGATTTTC	AGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAT	1140
	*****	*****	*****
		20	
ButunDiziFpGemRC	GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAAGATATTGTTTACTTAGTTACGACTGTCNTAAATTA		305
TtLIG1cDNA	GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAAGATATTGTTTACTTAGTTACGACTGTCNTAAATTA		1200
	*****	*****	*****
		21	
ButunDiziFpGemRC	TTAAAACCTTTAAAGATAGAAATAAAAGCTTTACAAGAA	AAATTCCAAACCTTGGTAAC	365
TtLIG1cDNA	TTAAAACCTTTAAAGATAGAAATAAAAGCTTTACAAGAA	AAATTCCAAACCTTGGTAAC	1260
	*****	*****	*****
		22	
ButunDiziFpGemRC	AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAA	AACTTGAATCAGAG	425
TtLIG1cDNA	AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAA	AACTTGAATCAGAG	1320
	*****	*****	*****
		23	
ButunDiziFpGemRC	CTTGATAGAGTCTTAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG		485
TtLIG1cDNA	CTTGATAGAGTCTTAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG		1380
	*****	*****	*****
		24	
ButunDiziFpGemRC	TATGAATGCAGAAGATCAAAAACCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT		545
TtLIG1cDNA	TATGAATGCAGAAGATCAAAAACCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT		1440
	*****	*****	*****
		25	
ButunDiziFpGemRC	ACAGTAATTGGGAGTGAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA		605
TtLIG1cDNA	ACAGTAATTGGGAGTGAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA		1500
	*****	*****	*****
		26	
ButunDiziFpGemRC	TGCCGTATGAAAAATGAAAAAGAATTCAAATAGGATCAGGATTCAATGATGAC	AAAGA	665
TtLIG1cDNA	TGCCGTATGAAAAATGAAAAAGAATTCAAATAGGATCAGGATTCAATGATGAC	AAAGA	1560
	*****	*****	*****
		27	
ButunDiziFpGemRC	AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT		725
TtLIG1cDNA	AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT		1620
	*****	*****	*****
		28	
ButunDiziFpGemRC	GGTAAACCAAGATTCCTATTTCCTTGAGAATAAAAGAAGACGAATGAGGGCCCCCTGCAG		785
TtLIG1cDNA	GGTAAACCAAGATTCCTATTTCCTTGAGAATAAAAGAAGACGAATG-----		1668
	*****	*****	*****

Şekil 3. TtLIG13 Uzun Dizinin FDiziAnalizpGem primerinin kullanıldığı dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen verinin hizalanması.

B.



Şekil 3. (Devam) *TtLIG13* Uzun Dizinin *FDiziAnalizpGem* primerinin kullanıldığı dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen verinin hizalanması. A. Elde edilen dizinin ters komplementlerinin hizalanması sonucu, 18-22. mutasyonların doğru bir şekilde diziyeye yerleşmiş olduğu görülmekte. B. Dizi analizi verileri FinchTV programında açılarak piklerin güvenilirliği kontrol edilmiştir. Bu bölgede yapılan nokta mutasyonu çalışmalarında, hatalı olan FBt16 primeri kullanılmıştır. Primerdeki hataya göre, 18. mutasyonun 6 bç yukarısında 9 bçlik bir insersiyon ile, 6 bç aşağısında yine 9 bçlik bir delesyon olmalıydı, fakat hizalama sonucunda böyle bir değişim görülmediği gibi ilgili bölgenin dizi analizi piklerinde de çelişki fark edilmemiştir.

A

KisaDiziFpGem	-----TTGCGGAGCTCGG---C	14
TtLIG1cDNA	TCACATTCAAATATTTTCAGGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGCTGGTGGC	780
	*** * ** *	
	16	
KisaDiziFpGem	TCTCAATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT	74
TtLIG1cDNA	TCTCAATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT	840

KisaDiziFpGem	GTAAGTGGAGAAATTAATAAGGTTCTTTAGTGTCTAACCGAAGTATGGATTGAGTGTGTA	134
TtLIG1cDNA	GTAAGTGGAGAAATTAATAAGGTTCTTTAGTGTCTAACCGAAGTATGGATTGAGTGTGTA	900

	17	
KisaDiziFpGem	CTTTTAGCTCAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACCTGGCTGGTATGCAAGTAAAAA	194
TtLIG1cDNA	CTTTTAGCTCAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACCTGGCTGGTATGCAAGTAAAAA	960

KisaDiziFpGem	ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTTGGACTGGAAAGACATTTATTCTAGGAATGGTAACGAA	254
TtLIG1cDNA	ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTTGGACTGGAAAGACATTTATTCTAGGAATGGTAACGAA	1020

	18	
KisaDiziFpGem	TTCTACCCTCCTCCATTTTTCATTCAAAATTTCCCAAATGTCACCTTAGATGGGGAATTG	314
TtLIG1cDNA	TTCTACCCTCCTCCATTTTTCATTCAAAATTTCCCAAATGTCACCTTAGATGGGGAATTG	1080

	19	
KisaDiziFpGem	TTTACAAAAGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAAT	374
TtLIG1cDNA	TTTACAAAAGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAAT	1140

KisaDiziFpGem	GAAGAAAAGATGAAANGTGGAAAGATATGTTTACTTAGTTACGACTGTCTCAAATTA	434
TtLIG1cDNA	GAAGAAAAGATGAAANGTGGAAAGATATGTTTACTTAGTTACGACTGTCTCAAATTA	1200

	20	
KisaDiziFpGem	TTAAACCCCTTTAAAGATAGGATAAAAGCTTTACAAGAACTAAATTCAAAACCTTGGAAC	494
TtLIG1cDNA	TTAAACCCCTTTAAAGATAGGATAAAAGCTTTACAAGAACTAAATTCAAAACCTTGGAAC	1260

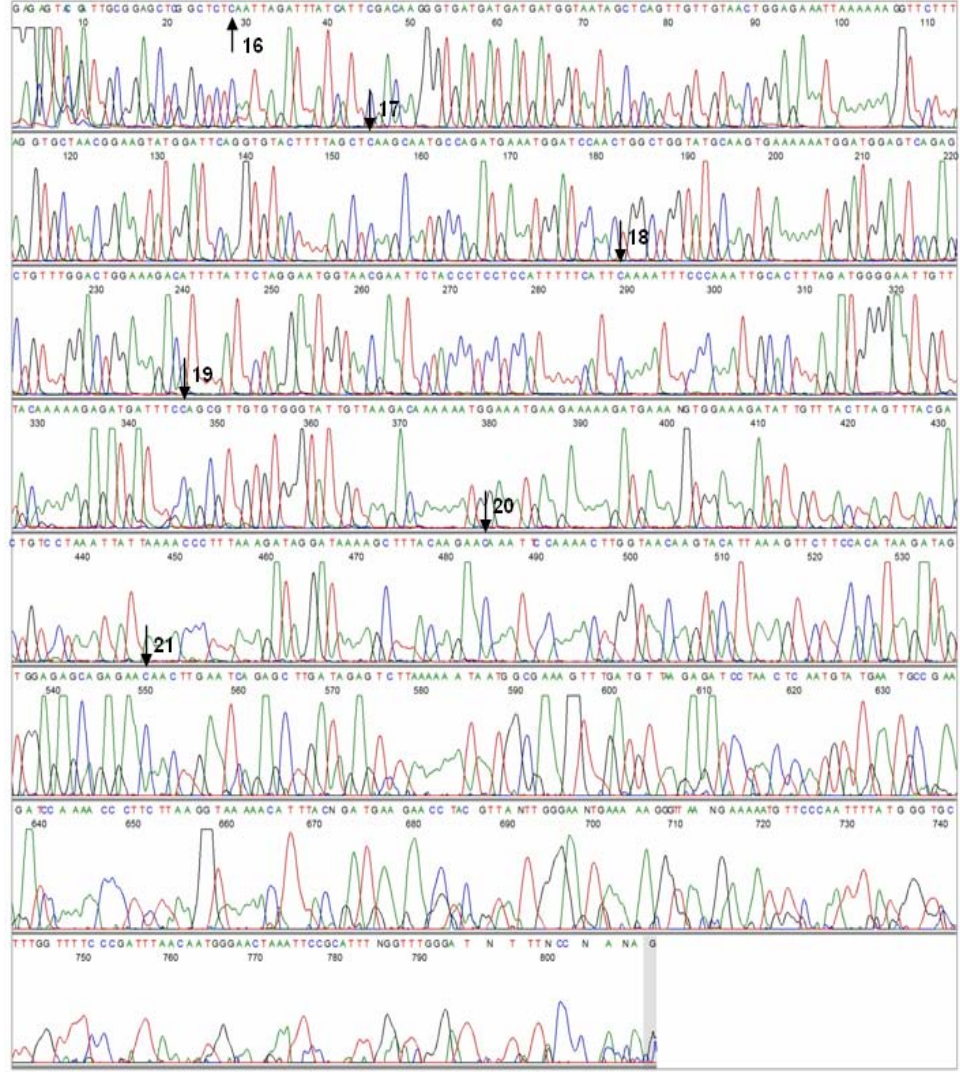
	21	
KisaDiziFpGem	AAGTACATTAAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTTGAATCAGAG	554
TtLIG1cDNA	AAGTACATTAAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTTGAATCAGAG	1320

KisaDiziFpGem	CTTGATAGAGTCTTAAAAAATAATGGCGAAGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATCAATG	614
TtLIG1cDNA	CTTGATAGAGTCTTAAAAAATAATGGCGAAGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATCAATG	1380

KisaDiziFpGem	TATGAATGCCGAAGATCCAAAACCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACNGATGA-----	667
TtLIG1cDNA	TATGAATGCAGAAGATCCAAAACCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT	1440

Şekil 4. FDiziAnalizpGem primerinin kullanıldığı TtLIG1 Kısa Dizinin dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen verinin hizalanması.

B.

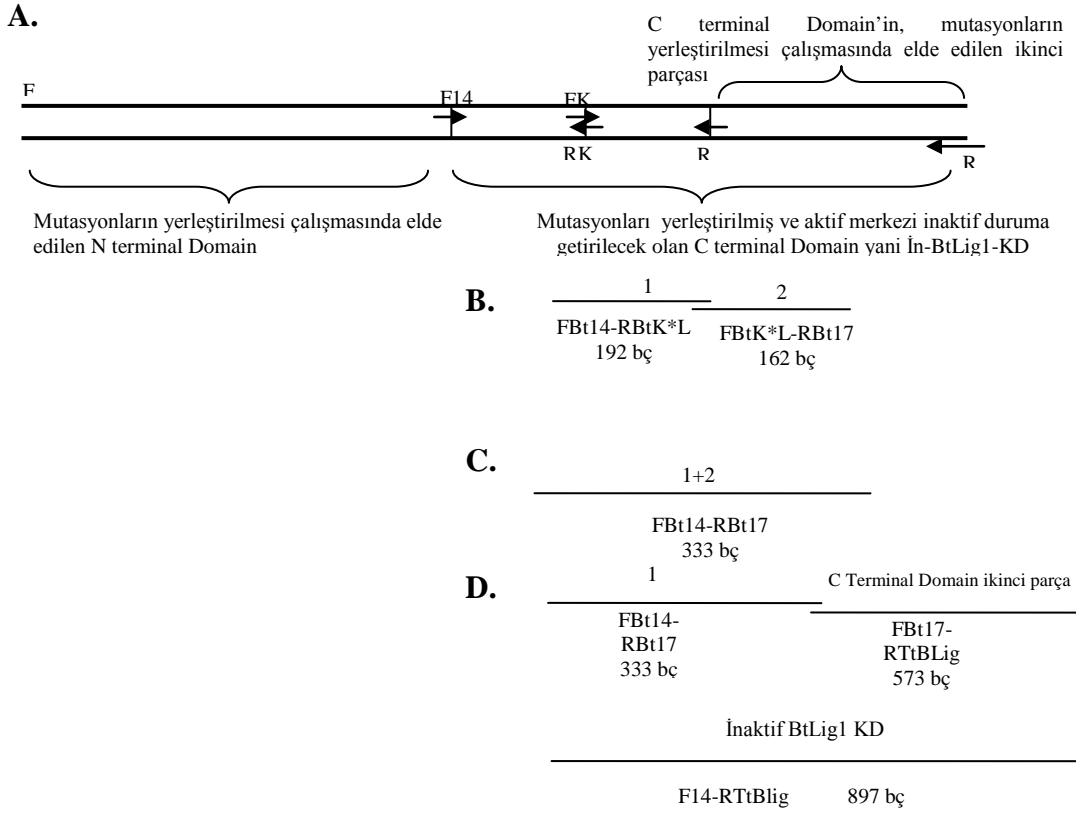


Şekil 4. (Devam) FDiziAnalizpGem primerinin kullanıldığı TtLIGI Kısa Dizinin dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen verinin hizalanması. A. Elde edilen dizinin hizalanması sonucu, 16-21. mutasyonların doğru bir şekilde diziyeye yerleşmiş olduğu görülmekte. B. Dizi analizi verileri FinchTV (13) programında açılarak piklerin güvenilirliği kontrol edilmiştir. Hatalı olan FBt16 primeri neden olması beklenen insersiyon ve delesyonlar bu dizinin analizi sonucunda da görülmemiştir.

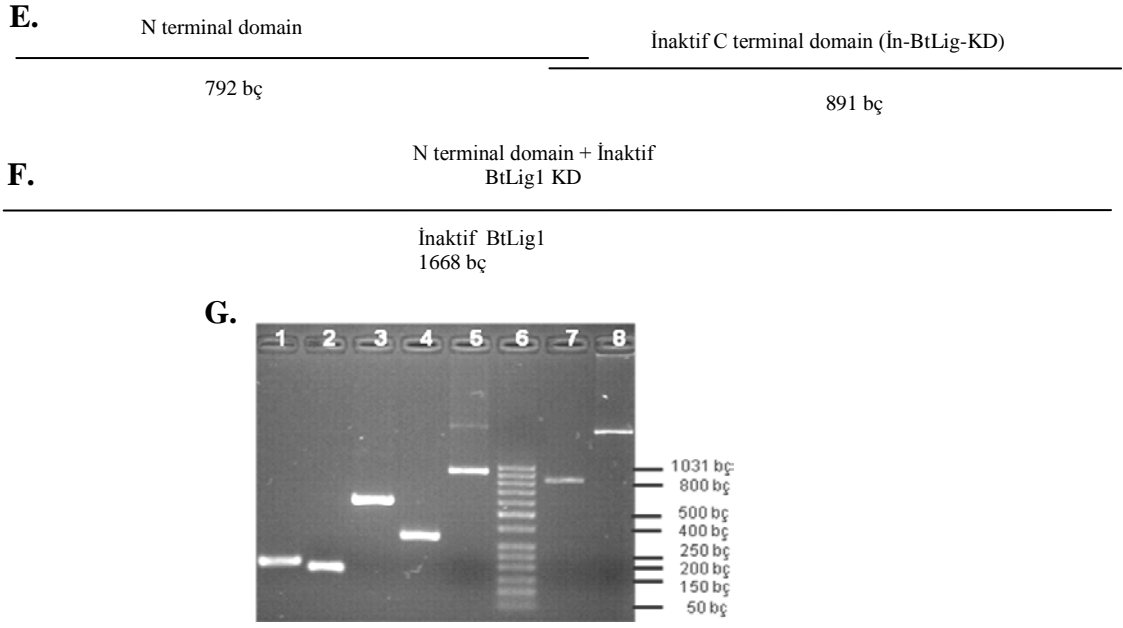
Ek -10 İnaktif TtLIG13 ve İnaktif TtLIG13-KD'nin Oluşturulması

Çalışma kapsamında, nokta mutasyonları yerleştirilmiş olan *TtLIG13* dizisi kalıp olarak kullanılarak Şekil 1.(A-F)'deki stratejiye göre inaktif İn-*TtLIG13* ve İn- *TtLIG13*-KD dizileri üretilmiştir (Şekil 1.G). Üretilen bu diziler pGEMT-Easy vektörü (Şekil 2) ile *E. coli* XL-1 Blue konakçısına transforme edilmiş ve pozitif kolonilerden izole edilen plazmitler ile dizi analizi çalışması yürütülmüştür. Dizi analizi çalışmaları gerekli modifikasyonun doğru şekilde gerçekleştiğini teyit etmiştir (Şekil 5. A ve B).

Ürünün Üretilmesine Ait Bulgular:



Şekil 1. Tüm mutasyonları yerleştirilmiş BtLig1 dizisinin nokta mutasyonu yerleştirme metodu ile aktif merkezinin inaktif duruma getirilmesi.



Şekil 1. (Devam) Tüm mutasyonları yerleştirilmiş BtLig1 dizisinin nokta mutasyonu yerleştirme metodu ile aktif merkezinin inaktif duruma getirilmesi.

Şekilde **A. Çalışmada kullanılacak primerler ve dizi üzerindeki yerleşimleri.** K*L primerleri ile gösterilen kısım mutasyon bölgesini işaret etmekte. Bu çalışmada üretilmesi hedeflenen N terminal domain ile C terminal domainin 2. kısmı daha önce nokta mutasyonlarının yerleştirilmesi çalışmasında üretilmişti. **B, C ve E. Çalışmada üretilmesi ve birleştirilmesi planlanan parçalar ve büyüklükleri.** Şekilde çizgiler ürünleri temsil ederken, çizgi üstünde ürüne verilen isim, altında ise ürünün üretilmesi esnasında kullanılan primer çifti ile ürün büyüklüğü gösterilmektedir. **D. Üretilmesi hedeflenen İnaktif BtLig1 Katalitik Bölge ve F. İnaktif BtLig1 dizileri.** **G. Bu çalışmaya ait deneysel ürünler.** **1.**FBt14-RBtK*L primerleri ile üretilen 192 bç büyüklüğündeki 1. parça; **2.**FBtK*L-RBt17 primerleri ile üretilen 162 bç büyüklüğündeki 2. parça; **3.**Nokta mutasyonu yerleştirme çalışmalarında FBt17-RTtBlig primerleri ile üretilmiş olan 573 bç büyüklüğündeki Katalitik Bölgeye ait 2. Parça(4. Raporda belirtildiği gibi); **4.**Birinci ve ikinci parçanın birleştirilmesi ile üretilen 333 bç büyüklüğündeki 1+2 parçası; **5.** Birinci ve ikinci parçanın birleştirilmesi ile üretilen 1.2 parçasına Katalitik Bölgeye ait ikinci parçanın eklenmesi ile oluşturulan İnaktif BtLig1 Katalitik Bölge. **6.** Marker 50-1000 bp (BioBasic, Ready-to-Use Cat: GM345) **7.** Daha önce nokta mutasyonlarının yerleştirilmesi

çalışmalarında FTtBlig-RBt14 primerleri ile üretilmiş olan 777 bç büyüklüğündeki BtLig1 N-terminal domain parçası (4. Raporda belirtildiği gibi).
8. Beşinci kuyuda gösterilen İnaktif Katalitik Bölge ile yedinci kuyuda gösterilen N terminal domainin birleştirilmesi ile üretilen İnaktif BtLig1 geni.

EK- 11 Dizilerin İnakif Duruma Getirilmesinin Dizi Analizi İle Teyit Edilmesi

1. İnakif BtLig1: Dizi analizi PZR çalışmasında vektöre uygun F primeri kullanıldı. Ürünün dizi analizi sonucunda elde edilen bilginin doğruluk oranı yüksek olan kısmı VecScreen (8) programında değerlendirildiğinde dizi içinde vektöre ait bilgi olmadığı görüldü. GeneTool programı ile dizinin ters komplementeri alınarak ClustalW2 (9) programında BtLig cDNA'sı ile hizalandı. cDNA dizisinin 1132. bazından son bazına kadar okuma elde edildiği ve bu bölgede yerleşim gösteren 3 mutasyonunda yerleşmiş olduğu görüldü. Fakat katalitik merkezin inaktif duruma getirilen kodonu, dizinin 957. bazına; bütün diziyi oluşturan iki parçanın birleşim bölgesi ise 777-798 bç'lik bazlarına denk geldiğinden, bu bölgelerin durumu bu dizi analizi reaksiyonunda aydınlatılmadı.

Dizi analizi ile elde edilen doğruluk oranı yüksek dizi:

```
GCCTCATTTCGTCCTTCTTTTATTCTCAAGAAAATANGGAATCTTGGTTCACCATCTTGGTAAAGATTTTGGTATTTGAATGTT
ATCACACTTCTCTTTTAAAGTGGCCTTCTTCTTTGGTTCATCATTGAATCCTGATCCTATTTTGAATCTTTTCCATTTTCA
TACGGCATAACCAAAGCACCATCATATCTGCACATCTTCTTCCACTCTTTCACTCCCAATFACTGTAGCTTCTTCATCTGT
AAATGTTTTTACCTTAAGAAGGGTTTTTGATCTTCTGCATTCATACATTGAATTAGGATCTCTTAACATCAAACCTTCGCCA
TTATTTTTTAAAGACTCTATCAAGCTCTGATTCAAGTTGTTCTCTGCTCTCCACTATCTTATGTGGAAGAACTTAATGTACT
TGTTACCAAGTTTTGGAATTTGTTCTTGTAAAGCTTTTATCTATCTTTAAAGGGTTTAAATAATTANGACAGTCGTAAC
TAAGTAAACAATATCTTCCACCTTTCATCTTTTCTTTCATTTCCAT
```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```
FnsuzButunFpGEM      -----ATGGAAT 8
cDNA                  TTTACAAAAAGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGTATTGTTAAGACAAAAAATGGAAT 1140
                        *****

FnsuzButunFpGEM      GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAGATATTTGTTACTTAGTTTACGACTGTCCTAAATTA 68
cDNA                  GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAGATATTTGTTACTTAGTTTACGACTGTCCTAAATTA 1200
                        *****

FnsuzButunFpGEM      TTAAAACCCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAACTAAATCCAAAACCTGGTAAC 128
cDNA                  TTAAAACCCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAACTAAATCCAAAACCTGGTAAC 1260
                        *****

FnsuzButunFpGEM      AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTAAGTGAATCAGAG 188
cDNA                  AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTAAGTGAATCAGAG 1320
                        *****

FnsuzButunFpGEM      CTTGATAGAGTCTTAAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG 248
cDNA                  CTTGATAGAGTCTTAAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG 1380
                        *****

FnsuzButunFpGEM      TATGAATGCAGAAGATCAAAAACCCCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT 308
cDNA                  TATGAATGCAGAAGATCAAAAACCCCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT 1440
                        *****

FnsuzButunFpGEM      ACAGTAATTGGGAGTGAAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA 368
cDNA                  ACAGTAATTGGGAGTGAAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA 1500
                        *****

FnsuzButunFpGEM      TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAATTCAAAATAGGATCAGGATTC AATGATGACTTAAAGA 428
cDNA                  TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAATTCAAAATAGGATCAGGATTC AATGATGACTTAAAGA 1560
                        *****

FnsuzButunFpGEM      AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT 488
cDNA                  AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT 1620
                        *****
```



```
FnsuzButunFpGEM      GGTAACCAAGATTCCCTATTTTCTTGAGAATAAAGAAGACGAATGAGGC 539
cdNA                  GGTAACCAAGATTCCCTATTTTCTTGAGAATAAAGAAGACGAATGAGGC--- 1668
*****
*****
```

Şekil 1: İn-BtLig1 dizisinin vektöre uygun tasarlanmış olan F primeri ile dizi analizi sonucu.

Kırmızı ile işaretli diziler daha önce yerleştirilmiş ve dizi analizi ile teyit edilmiş olan 3 nokta mutasyonunu göstermekte.

2. İnaktif BtLig1 KD: Bu parçanın dizi analizi için PZR çalışmasında iki primer kullanıldı: FpGEMDiziAnalizi ve RBt19.

- Vektöre uygun F primeri ile üretilen ürünün doğruluk oranı yüksek olan kısmı VecScreen (8) programında değerlendirildiğinde vektör dizi içinde vektöre ait bilgi olmadığı görüldü. GeneTool programı ile dizinin ters komplementeri alınarak ClustalW2 (9) programında BtLig cDNA'sı ile hizalandı. cDNA dizisinin 1066. bazından son bazına kadar okuma elde edildiği ve bu bölgede yerleşim gösteren 4 mutasyonunda yerleşmiş olduğu görüldü. Fakat inaktif kodonların durumu bu dizi analizinde aydınlatılmadı.

- RBt19 primerinin dizi üzerindeki konumu inaktif duruma getirilen kodona 354 bç uzaklığında bulunuyor. Reaksiyon sonucu elde edilen dizi vektör bilgilerinden temizlenerek BtLig1 cDNA dizisi ile hizalama çalışmasında kullanıldı, FinchTV (10) programı ile sonucun güvenilirliği kontrol edildi ve **katalitik merkezin inaktif duruma getirildiği görüldü.**

Dizi analizi ile elde edilen doğruluk oranı yüksek dizi (Dizi analizi primeri ile üretildi):

FnsuzKatBolFpGEM

```
TTCGTCTTCTTTTATCTCAAGAAATAGGGAATCTTGGTTTACCATCTTTGGTAAGATTTTGGTATTTGAATGTTATCACAC
TTCCTTTTTTAGGTGGCCTTCTTCTTTGGTCATCATTTGAATCCTGATCCTATTTTGAATTCCTTTTCCATTTTTCATACGGCA
TACCAAAGCACCCATCATATCTGCACATCTTCCTTCACCTCTTTCACCTCCAATTACTGTAGCTTCTTCATCTGTAATGTT
TTTACCTTAAGAAGGGTTTTTGATCCTCTGCATTCATACATTGAATTAGGATCTCTTAACATCAAACCTTCGCCATTATTTT
TTAAGACTCTATCAAGCTCTGATTCAAGTTGTTCTCTGCTCTCCACTATCTTATGTGGAAGAACTTTAATGTACTTGTACC
AAGTTTGGAAATTTGTCTTGTAAAGCTTTTATTCTATCTTTAAAGGGTTTTAATAATTTANGACAGTCGTAACCTAAGTAA
ACAATATCTTTCCACCTTTCATCTTTTCTTCATTTCCATTTTGTCTTAAACAATACCCACACAACGCTGGAAATCATCTC
TTTTTGTAACAATCCCCATCTA
```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

FnsuzKatBolFpGEMrc  -----TAGATGGGGA-TTG 13
cDNA                 TTCTACCTCTCCATTTTTCATTTAAAAATTCCEAAATGCACTTTAGATGGGGAATTG 1080
                      ***** **

FnsuzKatBolFpGEMrc  TTTACAAAAAGAGATGATTTCCAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAT 73
cDNA                 TTTACAAAAAGAGATGATTTCCAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAT 1140
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  GAAGAAAAAGATGAAAGGTGAAAGATATTGTTTACTTAGTTTACGACTGTCNTAAATTA 133
cDNA                 GAAGAAAAAGATGAAAGGTGAAAGATATTGTTTACTTAGTTTACGACTGTCNTAAATTA 1200
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  TTTAAACCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAAATAATTCAAAACTTGGTAAC 193
cDNA                 TTTAAACCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAAATAATTCAAAACTTGGTAAC 1260
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTTGAATCAGAG 253
cDNA                 AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAACTTGAATCAGAG 1320
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  CTTGATAGAGTCTTAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG 313
cDNA                 CTTGATAGAGTCTTAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTC AATG 1380
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  TATGAATGCAGAGATCAAAAACCTTCTTAAGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT 373
cDNA                 TATGAATGCAGAGATCAAAAACCTTCTTAAGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT 1440
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  ACAGTAATGGGAGTGAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA 433
cDNA                 ACAGTAATGGGAGTGAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA 1500
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAATTCAAATAGGATCAGGATTC AATGATGACTAAAGA 493
cDNA                 TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAATTCAAATAGGATCAGGATTC AATGATGACTAAAGA 1560
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  AGAAGGCCACCTAAAAAGGAAGTGTGATAACATTC AATACCAAATCTTACCAAAGAT 553
cDNA                 AGAAGGCCACCTAAAAAGGAAGTGTGATAACATTC AATACCAAATCTTACCAAAGAT 1620
                      *****

FnsuzKatBolFpGEMrc  GGTAAACCAAGATTCCTATTCTTGAGAATAAAAAGAAGACGAA--- 597
cDNA                 GGTAAACCAAGATTCCTATTCTTGAGAATAAAAAGAAGACGAA--- 1668
                      *****

```

Şekil 2: İn-BtLig1-KD dizisinin vektöre uygun tasarlanmış olan F primeri ile dizi analizi sonucu. Kırmızı ile işaretli diziler daha önce yerleştirilmiş ve dizi analizi ile teyit edilmiş olan 4 nokta mutasyonunu göstermekte.

Dizi analizi ile elde edilen doğruluk oranı yüksek dizi (RBt19 ile üretildi):

FnsuzKatBol**RBt19** ters komplementeri

```

gcggagctcggctctcaattagatttatcgcacaagggtgatgatgatggtaatagctcagt
tgttgtaactggagaaattaaaaagggttcttttaggtgctaacggaagatggattcaggtgtac
tttttagctcaagcaatgccagatgaaatggatccaactggctggtatgcaagtgaaactaatggat
ggagtcaagagctgtttggactggaaagacatttttattctaggaatggtaacgaattctaccctc
ctccatttttcattcaaaatttccaaattgcacattagatggggaattgtttacaaaaagagat
gatttccagcgttgtgtgggtattgttaagacaaaaatggaaatgaagaaaaagatgaaagggtg
gaaagatattgtttacttagtttacgactgtcctaaattattaaaacccttttaagatagaata
aaagctttacaagaacaaattccaaaacttggtacaagtacattaag

```

A. CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

FnsuzKatBolRBT19rc -----GCGGAGCTCGG---C 12
cDNA TCACATTCAAATATTTTCAGGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGCTCGGTGGC 780
          * * * * *

FnsuzKatBolRBT19rc TCTCAATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATG---GTAATAGCTCAGTTGTT 69
cDNA TCTTAATTAGATTTATCATTTCGACAAGGGTGATGATGATGATGATGTAATAGCTCAGTTGTT 840
          *** **

FnsuzKatBolRBT19rc GTAACTGGAGAAATTA AAAAAGGTTCTTTAGGTGCTAACGGAAGTATGGATTCAGGTGTA 129
cDNA GTAACTGGAGAAATTA AAAAAGGTTCTTTAGGTGCTAACGGAAGTATGGATTCAGGTGTA 900
          *****

Lizin'i kodlayan AAA yerine, Lösin'i kodlayan CTA kodonuna değiştirildi.
          Katalitik merkez

FnsuzKatBolRBT19rc CTTTtagctTAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAAGTGGTATGCAAGTGAAC TA 189
cDNA CTTTtagctTAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAAGTGGTATGCAAGTGA AAA 960
          *****

FnsuzKatBolRBT19rc ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTTGACTGGAAAGACATTTTATTCTAGGAATGGTAACGA 249
cDNA ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTTGACTGGAAAGACATTTTATTCTAGGAATGGTAACGA 1019
          *****

FnsuzKatBolRBT19rc ATTCTACCCCTCCATTTTTCATTAAAATTTCCCAAATTCACATTAGATGGGGAAAT 309
cDNA ATTCTACCCCTCCATTTTTCATTAAAATTTCCCAAATTCACATTAGATGGGGAAAT 1079
          *****

FnsuzKatBolRBT19rc GTTTACAAAAGAGATGATTTCAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAA 369
cDNA GTTTACAAAAGAGATGATTTCAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAATGGAAA 1139
          *****

FnsuzKatBolRBT19rc TGAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAGATATTGTTACTTAGTTTACGACTGTCCTAAAT 429
cDNA TGAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAGATATTGTTACTTAGTTTACGACTGTCCTAAAT 1199
          *****

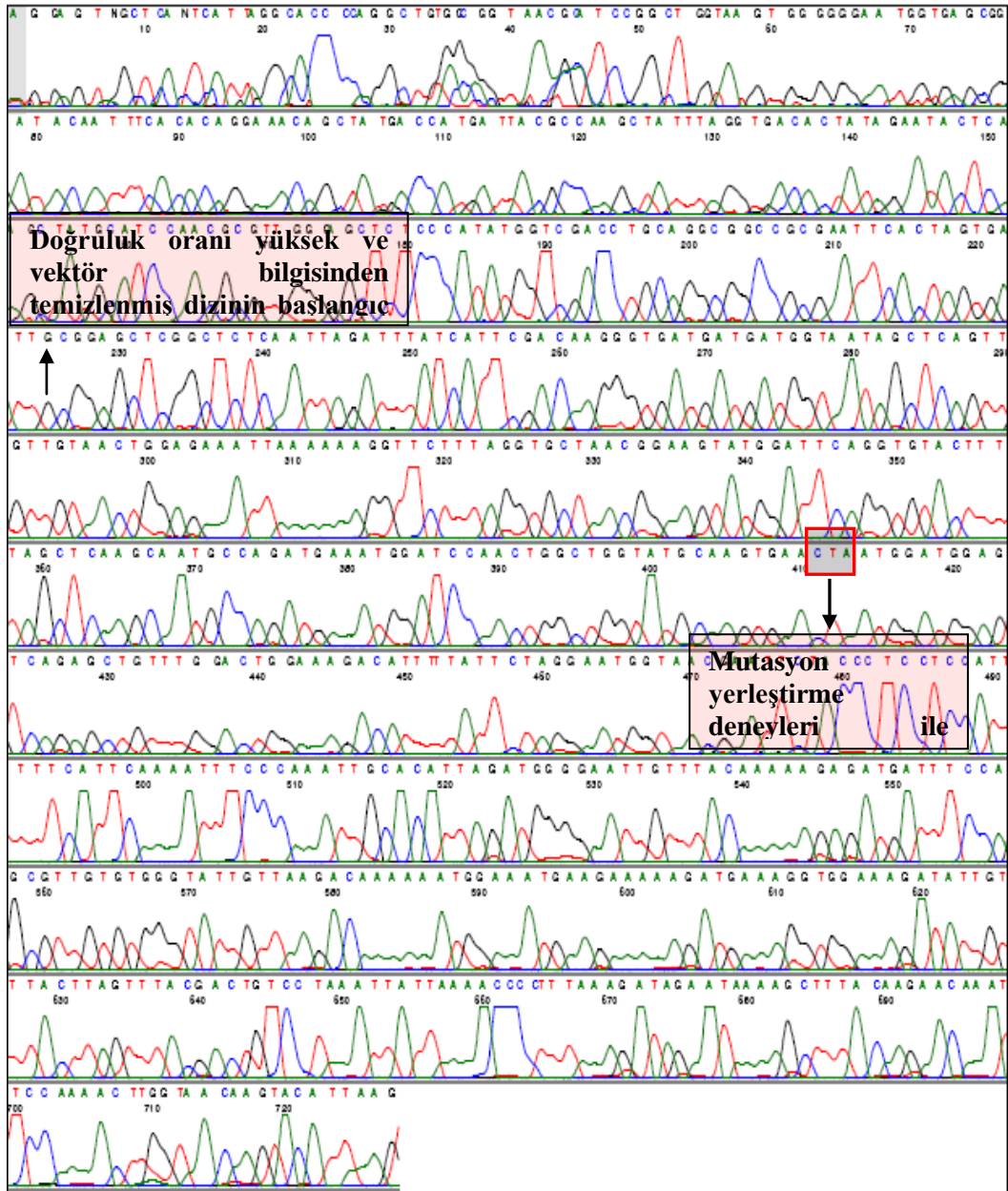
FnsuzKatBolRBT19rc ATTAAAACCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAAATAATCCAAAACCTGGTA 489
cDNA ATTAAAACCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAAATAATCCAAAACCTGGTA 1258
          *****

FnsuzKatBolRBT19rc ACAAGTACATTAAG----- 503
cDNA ACAAGTACATTAAGTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAATAACTTGAATCAG 1318
          *****

```

Şekil 3: İn-BtLig1-KD dizisinin nokta mutasyonu için tasarlanmış olan RBt19 primeri ile dizi analizi sonucu. A. Dizi analizi sonucu elde edilen dizi ile BtLig1 cDNA dizisinin ClustalW2 programı ile hizalanması sonucu görülmekte.

B



Şekil 3. (Devam) İn-BtLig1-KD dizisinin nokta mutasyonu için tasarlanmış olan RBt19 primeri ile dizi analizi sonucu. A. Dizi analizi sonucu elde edilen dizi ile BtLig1 cDNA dizisinin ClustalW2 programı ile hizalanması sonucu görülmekte. Kırmızı ile işaretli diziler daha önce yerleştirilmiş ve dizi analizi ile teyit edilmiş olan 4 nokta mutasyonunu ve yeşil ile işaretli dizi ise lösin kodlayan “CTA” dizisine dönüştürülmüş kodonu göstermekte. B. Dizi analizi sonucu FinchTV ile açılarak piklerin güvenilirliği test edilmiştir. Doğruluk oranı yüksek dizinin başlangıç noktası ok işaretli ile, Lösin amino asidini kodlar duruma getirilmiş kodon ise kırmızı çerçeveye alınarak belirtilmiştir.

Ek -12 *Tetrahymena thermophila* DNA Ligaz Dizileri

Dizilerde aktif merkezi taşıyan I. Motif “K(x)DG(x)R” kalın ve altı çizilmiş olarak gösterilmiştir.

TtLIG11 (TtLig1) TTHERM_00865240

NCBI ulaşım numarası: XM_001026764.1 (mRNA)

Genomic sequence length: 2341 nucleotides

CDS length: 1908 nucleotides

Protein length: 635 amino acids

Genomic sequence>154.t00046

```
ATGATAAAGAAATTATTGTATTTACCCAAGTAAAGCTTGTATCATCTTTGATTTTTTCT
AAGTTTTGTACTCAATTTAACTCCAAATCTATTTAGAGCTTTTATTTTTTTGGCTAAATAG
TTTGACGATATCTCCAAAATATCTTCTAGAAAATCTGGAATAGAAGCTATAGAACTTTG
ATGAATGATTACATTTAAGGAGGAGATAATGAAGTAAATAAAACCAATTTAAAATTGTAAC
TAAACATTCAAAATATTAAGTAGCTATTTATCTAAATGGTACGCTTACTAACCTGCAAAG
TAGATAGTGAAGAAAATATAAATAGCTAATTCCTTCTTAGTTGAGATATTGAAAGTTGTAT
ATCCCTAAGAGGATATAACTAAAATTCCTTTTTGAAAAAGGAGATATAGGATTTGTATGCAA
AAGAAATGCTTGAAAAAAGCTTGAAAAAGAAGGAAAATAATCGAACTGAAAAAATCATT
TAAGTATTTTAGAAGTTACGAGCTTTTTTGAAAACTGAAGAATTTATAAGGTGATCGCT
CGAGACTTGAAAAACAAGAACTTATCATAGATTTTTTGAAAGAAAATCCTAAGATCCACTTG
AAATATAATATTTTATCAGAATCCTTCTGTAAATTTTTGTGAAATTTAAATGTAATAAAG
TAAATAATTTATATCTTAGAAAAGCCTAAGGATAGGTGTAAGTGAGAAATCTATTATAAA
AGCATAAACAATAATCAATAAAAAGAAGAAAAAATCTTTGGATTCACTGCTTAAAAAATGT
TCAAGATAAAAATATTTGGATATAATACTGCCCTTACATACCGATATTTAAATAGGAACCTC
TGTGCCTCCAATGCTAGCCAAACAGTTTCCGATTTTGACGAACTTTTAAAAATTTTTAAA
GAAGTACGAAAAGTAAAAAAGTCTCTCTTGAACATAAATATGATGGAGAGAGATGTTAGGT
AAATATTAAGATAAAAATAAGAGTTAATGTTTTTACTTTTTAAATAAAAAGGTTTCATTATGGT
AAAAAGAAAAGGAATTTAAATTTATTTAGTAGAAAATTTAGAAAATCTAAAATGAGAAATATCCA
TAACTAGTTTAGCAATTAGAAAAATTTTTTAGAAAAATAACAGTGTAGAAGATTGCATA
TTAGATGGAGAGATTGTTGTAAACAGATTCTAAAGGAAATATTTAAATCATTTTAAGAACAA
CAACAAAATAGAAAAAGGAAAATAAGATTCTAACAAGGTAGTTGCTTTTCGATGAAGATGTA
ATTTTAATCCTTAAATATAAAAAATTTGTCTAAATTTTTAATTTAAATAAATGTTAGAATA
TTGAAAAGATTTACTTATTTGATATCCTGTTTTTAAATGCATGTGAGCAAAAATACCAAGG
AATAACTTTACAGAAAAGAGCTTGATTTAAAGAAAATTTTCCTATTGAAGGACCAGTTAATC
ACGCTGAATCAAAAATATTTGATCTTAGCATATAAAAAGATTTTGATGAGCTAAAAAAT
TAGTAAAAATAATATATTTGATTTAAAAAGAAGAAGGTGCTATGGTTAAATCGCTTGATTCTA
ATACATTTTATGATAATAATGGAAGAACTTAGTGGGCAAAAATTAAGAAGCAAGTTTTGT
CAGGAGGTTTAGCTGATACATTTGATGTTATTCCTATTGCTGCATACATATGAAAAAGGCA
AGAGGTAATAATTAGTTAGCTAATTTTATAAATCTAGAAAAAATTAACTTAATAAAAAATA
AATAAGATCTGGTGTCTATGGATCATATCTACTTGCCTTGTATGATGACAAAAAGAAAGA
GTATGTGGCTTTGTGTAAGATAGGTACAGGTTTTTCTGATCAATTTTTTATAAGATTCAAC
GGATAGACTGAAAATAAAAAGTATGCAAGTTAAAAACCTAAAGAATACTCTGTGCATAGAAC
TTTTAAGCCTGATGTTTGGTTTTTAAAAAGATGCTGAAGTGTGGGAAGTAGAGAGTGATAG
TCTTTTCATCATCTCCTATTTATACAATAGGAAAAATGAATTTATAGTGATAATGGAATATC
CCTTCGTTTCCCAAGATTTTACGTGTAAGAGATGATAAACTACTGAACAATCAACAAA
AACATATTAAGTATATTTAAATTTAATAAATTTAAAAATAAAAAAATTTAAATCTATTAATTT
AATTTAAAAAGATTTATTTGAGTTCTACAATAAATAAAGCAAAACCAATGTAATTAAT
TCATTTTTGAGTTAAAAATAATACCTAACAAAATTTATTCACATTTATTTTTTAGAATAATTC
AAAAGATTTAAAAAGGAGACCATGGAGATAAAGGAGAAGAAGAAGAAGGAGATAAGTG
A
```

CDS

>154.m00112

ATGATAAAAGAAATTATTGTATTTACCCAAGTAAAGCTTGTATTATCATCTTTGATTTTTTCT
AAGTTTTGTACTCAATTTAACTCCAAATCTATTTAGAGCTTTTTATTTTTGGCTAAATAG
TTTGACGATATCTCCAAAATATCTTCTAGAAATCTGGAATAGAAGCTATAGAACTTTG
ATGAATGATTACATTTAAGGAGGAGATAATGAACATTTTATCTAAATGGTACGCTTACTA
ACCTGCAAAGTAGATAGTGAAGAAATATAAATAGCTAATTCCTTCCCTTAGTTGAGATATTG
AAAGTTGTATATCCCTAAGAGGATATAACTAAATTCCTTTTTGAAAAAGGAGATATAGGA
TTGTATGCAAAGAAATGCTTGAAAAAAACTTGAAAAAGAAGGAAATAATCGAACTGAA
AAAAATCATTTAAGTATTTTAGAAGTTACGAGCTTTTTTGAAAACTGAAGAATTTATAA
GGTGATCGCTCGAGACTTGAAAAGCAAGAACTTATCATAGATTTTTTGAAAGAAAATCTAA
GATCCACTTGAAAATATAATATTTTATCAGAATCCTTTCTAAAAGCCTAAGGATAGGTGTA
AGTGAGAAAATCTATTATAAAAAGCATTAACAAAATATCAATAAAAAGAAGAAAAACTCTTTG
GATTTCACTGCTTAAAAATGTTCAAGATAAAAATATTTGGATATAATACTGCCTTACATACC
GATATTTAAATAGGAACTCCTGTGCCCTCCAATGCTAGCCAAACCAGTTTCCGATTTTGAC
GAACTTTTAAAAATTTTAAAGAAGTACGAAAAGTAAAAAAGTCTCTCTTGAACATAAATAT
GATGGAGAGAGATGTTAGGTTTCAATATGGTAAAAAGAAAGGAATTAATTTATTTAGTAGA
AATTTAGAAAATCTAAAATGAGAAAATATCCATAACTAGTTTAGCAATTAGAAAAATATTTT
TAGAAAAATAACAGTGTAGAAGATTGCATATTAGATGGAGAGATTGTTGTAACAGATTCT
AAAGGAAATATTTAAATCATTTTAAAGAACAACAACAAAATAGAAAAAGGAAATAAGATTCT
AACCAAGGTAGTTGCTTTTCGATGAAGATAAATATTGAAAAGATTTACTTTATTTGATATCCTG
TTTTTAAATGCATGTGAGCAAAAATACCAAGGAATAACTTTACAGAAAGAGCTTGATTTAA
GAAAATTTTCTTATTGAAGGACCAGTTAATCACGCTGAATCAAAAATATTTGATCTTAGC
ATATAAAAAGATTTTGATGAGCTAAAAAAATAGTAAAATAATATATTGATTTAAAAGAA
GAAGGTGCTATGGTTAAATCGCTTGAATCTAATACATTTTATGATAATAATGGAAGA
TAGTGGGCAAAATTAAGAAGCAAGTTTGTGTCAGGAGTTTAGCTGATACATTTGATGTT
ATTCCTATTGCTGCATACTATGAAAAGGCAAGAGATCTGGTGTCTATGGATCATATCTA
CTTGCTTGTATTATGATGACAAAAAGAAAGATATGTGGCTTTGTGTAAGATAGGTACAGGT
TTTTCTGATCAATTTTTATAAGATTCAACGGATAGACTGAAATAAAAAGTATGCAGTTAA
AAACCTAAAAGAATACTCTGTGCATAGAACTTTTAAGCCTGATGTTTGGTTTTAAAAGAT
GCTGAAGTGTGGGAAAGTAGAGAGTGATAGTCTTTCATCATCTCCTATTTATACAATAGGA
AAAATGAATTTATAGTGATAATGGAATATCCCTTCGTTTCCCAAGATTCTTACGTGTAAGA
GATGATAAACTACTGAACAATCAACAAAAACATATTAATAAATTCAAAAGATTTAAAA
GGAGACCATGGAGATAAAGGAGAAGAAGAAGAAGGAGATAAGTGA

Protein

>154.m00112

MIKKLLYLPKQSLSSLI~~FSK~~FCTQFN~~SK~~SIQSFYFLAKQFDDISKISSRNSGIEAIE~~TL~~
MNDYIQGGDNELFIQMVRLLTCKVDSEEQIANSSLVEILKVVYPQEDITKFLFEKGDIG
LYAKEMLEKKLEKEGNNRTEKNHLSILEVTSFFEKLNQDRSRLEKQELIDFLKKIQ
DPL~~ET~~QYFIRILSKSLRIGVSEKSIKALTNINKKKKNSLDSLLKNVQDKIFGYNTALHT
DIQIGTPVPPMLAKPVSDFDELLKFLKKYESKKVSELELKYDGERCQVHYGKKKGIKLF~~SR~~
NLEIQNEKYPQLVQQLKQYFQKNNSVEDCILDGEIVVTDSKGNIKSFQEQQNRKRKQDS
NKVVA~~FDE~~DNIEKIYLF~~DIL~~FLNACEQNTKEQLYRKS~~L~~IKENFPIEGPVNHAESKIFDLS
IQKDFDELK~~KL~~VKQYIDQKEEGAMVKSLS~~NT~~FYDNNGR~~TQ~~WAKLKKQVLSGGLADTFDV
IPIAAYYGKGRSGVYGSYLLACYDDKKKEYVALCKIGTGFSDQFLQDSTDRLKQK~~VCSQ~~
KPKEYSVHRTFKPDVWFQKDAEVVEVESDLS~~SS~~PIY~~T~~IGKM~~NY~~SDNGISLRFPRFLRVR
DDKTTEQSTKTYQNSKDKQGDHGDKEEEEEEGDK*

TtLIG12 (TtLig2) TTHERM_00348170

NCBI Ulaşım Numarası: XM_001022972.2 (mRNA)

Genomic seq

uence length: 2670 nucleotides

CDS length: 2451 nucleotides

Protein length: 816 amino acids

Genomic sequence

>36.t00026

```
ATGAAGCAAGGTACCATTAAAACTTCTTTGGAAATAGCCAAAAGAAAAAGGAAGAATTA
GGTGAAAGCAATTTAGGTTCTGACAAAAAATGTGCTACTCAGTCTCAAAAAGGTGCTGAG
ACAAATGGTTAAAACTCAAAGGAATCCCAATAAAAAGCCTGATGAATCAAAATCATAGCAA
GAAGAATCTTAATTTAAAAGAAAAACCAAAAGCATAAAAAAGAAGATAAATAATAGATAGC
AGTGATGATGAAGAAGTTCCTTCATTGGCTACGATGTCTATAAGTAATAAGTAAATAAAA
AAAGTGAAAAATGAGAACTAAAAAATGAGTCTTCTAAATCAGAAACAAAATCATCCACA
GATTCTAGCAATTTGTGCGAAATAAATACTTGAAAAACCAAAAAATGAAGATGAAAAATTA
AGCCAATCATCTAAAAAAGCAGCAGAATAATAAGGTATGTGAAATTTAATCAATTTTAA
ATATGATTTTTTTTATTTATTTCTGTAGATACAAAAAAGAAACCAACTAATAATTTGAGAA
AACTTTTGGATAAGCACTTTGACCCATTGAAGACGCTCCATTCATAAAGGATTAAGAAG
TCTTGTGGTTATTTATGTGATGGATTTGAAAGAGTAAATGAACAGGAAGGTAAAAAT
CAAAGGCTATACAAATTTGAAATAATGTCAAAAAATTTCAAGTCGATCATATTACTTAATC
CTGACTAGGTATATGAAGCTTATATGTTTTGTATTTTAAAGATAGCACCTGATTTATGAGT
CTAATGAGCTTGGTGTGGGTAGGGAAATACTTTAAAAAGCAATTAGTAATTTGTTGTGGTA
AATCAGTTACTTTAAATCAGAGATAGCCTTAATAAACTTGGTGACTTAGGTAAGGTTGCCGT
CCGAAGCCAAATCTACCTAAAAAACAATCACAATAATTTTTTAAAAAGCAGGCTAAAGAAA
AGCCTCCTATTACTCTTAATAGAACTTTTAATGATTTGAAAAGTATTGCAGCTGCTTCAG
GAAAGGTAAACAAACATAATTTATTTATTTATTTGAACAACCTCATAATTAATGATTTATA
GGACTCAACTGCAGAAAAGAAAAGAAATTAATATAAAAATATATGAATGAAGCAAAACCAGA
TGAAAGCATGCTATTTTATTAGATTTTTTAGAGTAGAATTTGAAAATTTGGTGCCTGCGAAA
AACAAATGTAGGCAGCTCTTTCCAAAGCATCTTTTGAAATTTGCCACAATATCAAAAGCAA
TCACGTTTACACAGAATAATAAACTAACTTTTGAAGAATTTAACTTCAATATCCTAG
ATGCTGTGTGAGTTTCCAAACTATTAAGTCAATGAGACTTTGAAATAAATTTGGCAA
AGATATTTCTAAATTTATTAGATATCTGCAAGATCAGGATAGGCGTTCCCTGCAAGCCTAT
GCTTGCCAAACCAACAAAAATCAATTTAAGTAACAATAAAATAAATATATAAATTTATAAAGT
ATAATAAATTTACAAATACTTAAAGGTTATTTTGGAAAGATTCAAAGACATGACTTTTAC
TTGTGAATACAAGTATGATGGATTGAGAGGTCAAATACACTACGATGGAAAAGATGTTAC
TATTTTTAGCAGAAACCTAGAAAATATGACATAGATGTATCCTGATATTGTAGAATTCAT
AAAAAACATGTCAGCTAATCGAAAACCTGTTAAAAATTTTATTTTAGATAGTGAAATTTGT
AGCTTTTGATAAAAAACCAACAAAAATTAGACCTTTCTAATAATTAGCAACAAGAGGAAG
AGTCAATGTCAAATTAGATGAAATTGATATAAAAAGTTTGTGTTTTTATGTTTCGATTTAAT
ATATATCAATGACTAGAGTTTGTACAAACAACACTTTAAGAAAAGAGATAAAAAATTTA
GGAGTGTTTTGTTCAAGAACCTGGTGAGTTCTGCTTTGCTGAGCACATAAACACTGAAGA
TGTTGAACAAAATTTAAGTAAATTTGATAACCAATTAATTTATTTGAAAAATTAACATCTATTT
TTTTTTTAGGAATTTCTTAGAAAAATCTGTTAAGGTGGGATGTGAAGGCTTGATGGTTAAA
ACTTTAGAACTAACTCAACTTATGAACCAGCAAAAAGATCATTTAAATGGCTTAAACTC
AAAAAAGATTATTTAGATAGTGGGTTAGGAGATACACTTGATTTAGTTCCGATTCAGCC
TTCAAGGGTACAGGTAAAAGAGTTGGATTGTATGGTGCCTTACCTATTAGCTTGCTACAAT
GAAGATATGGAACGTTATGAAACAATATGTAATAAGGTACAGGATTTTCAGATGAAATC
TTAGAAGCATGCTATAAATTTCTTAAGATAAAAATTTATACCATAGCCATAATCTGATTAT
TTAACCAAAAGATTTTAAAGCAGATGTATGGTTTTAAACCTTCTGTAGTTTGGGAAATTAAG
GGAGCAGATTTACAAATATCACCAGTATATACTTGTGCAATTAGTGAACAAAATTAAGAA
```

AAAGGTATTGGTCTTAGATTCCCTCGTCTTATCAGAGTTAGAGATGATAAAGATCCAGTC
GATGCTACTTCTCCTTCTTTTATATACGATATATATAAACAATAAGCTGTTGTAGCAAAT
GATTTTGATGATGGTGATGATTTCTATTGA

CDS

>36.m00193

ATGAAGCAAGGTACCATTAAAACTTCTTTGGAAATAGCCAAAAGAAAAAGGAAGAATTA
GGTGAAGCAATTTAGGTTCTGACAAAAAATGTGCTACTCAGTCTCAAAAAGGTGCTGAG
ACAAATGGTTAAAACTCAAAGGAATCCCAATAAAAAGCCTGATGAATCAAATCATAGCAA
GAAGAATCTTAATTTAAAAGAAAAACCAAAAGCATAAAAAAGAAGATAAATAATAGATAGC
AGTGATGATGAAGAGTTCTTTCATTGGCTACGATGTCTATAAGTAATAAGTAAATAAAA
AAAGTGAAAAATGAGAACTAAAAAATGAGTCTTCTAAATCAGAAACAAAATCATCCACA
GATTCTAGCAAATTTGTGCGAAATAAATACTTGAAAAACCAAAAAATGAAGATGAAAAATTA
AGCCAATCATCTAAAAAAGCAGCAGAATAATAAGATACAAAAAAGAAACCAACTAATAAT
TTGAGAAAACTTTTGATAAGCACTTTGACCCTATTGAAGACGCTCCATTCTATAAGGAT
TAAGAAGTCTTGTGTTGTTATTTATGTGATGGATTTGAAAGAGTAAATGAACAGGAAGGT
AAAAATTCAAAAGGCTATACAAATGAAATAATGTCAAAAATTTTCAAGTCGATCATATTA
CTTAATCCTGACTAGGTATATGAAGCTTATATGTTTTGTATTTTTAAAGATAGCACCTGAT
TATGAGTCTAATGAGCTTGGTGTGGGTAGGGAAATACTTTAAAAGCAATTAGTAATTTGT
TGTGGTAAATCAGTTACTTAAATCAGAGATAGCCTTAATAAACTTGGTGACTTAGGTAAG
GTTGCGTCCGAAGCCAAATCTACCTAAAAAACATCACAATTTATTTTTAAAAGCAGGCT
AAAGAAAAGCCTCCTATTACTCTTAATAGAACTTTTAATGATTTGAAAAGTATTGCAGCT
GCTTCAGGAAAAGACTCAACTGCAGAAAGAGAAAGAATTATTATAAAATATATGAATGAA
GCAAAACCAGATGAAGCATGCTATTTTTATTAGATTTTTTAGAGTAGAATTTGAAAATGGT
GCTGCTGAAAAAACAATGTAGGCAGCTCTTCCAAAGCATTTCTTTGAAATTGCCACAAT
ATCAAAAAGCAATCACGTTTACACAGAATAATAAACTAACTTTTAGAAGAATTTAACTTC
AATATCACTAGATGTCTGTGTGAGTTTCCAAACTATTACTAAGTCATTGAGACTTTGAAA
TAAATTTGGCAAAGATATTTCTAAATTTATTAGATATCTGCAAGATCACGATAGGCGTTCCC
TGCAAGCCTATGCTTGCCAAACCAACAAAATCAATTTAAGTTATTTTGGAAAGATTCAAA
GACATGACTTTTACTTGTGAATACAAGTATGATGGATTGAGAGGTCAAATACACTACGAT
GGAAAAGATGTTACTATTTTTTAGCAGAAACCTAGAAAATATGACATAGATGTATCCTGAT
ATTGTAGAATTCATAAAAAACATGTCAGCTAATCGAAAACCTGTTAAAAATTTTTATTTTA
GATAGTGAATTTGTAGCTTTTTGATAAAAAACCCAACAAAATTAGACCTTTCTAATAATTA
GCAACAAGAGGAAGAGTCAATGTCAAATTAGATGAAATTGATATAAAAGTTTGTGTTTTT
ATGTTTCGATTTAATATATATCAATGACTAGAGTTTGTCTACAAACAACACTTTAAGAAAGA
AGATAAAAAATTTAGGAGTGTTTTGTTCGAAGAACCTGGTGAGTTCTGCTTTGCTGAGCAC
ATAAACACTGAAGATGTTGAACAAAATTTAAGAAATCTTAGAAAAATCTGTTAAGGTGGGA
TGTGAAGGCTTGATGGTTAAAATTTAGAAAATAACTCAACTTATGAACCAGCAAAAAGA
TCATTTAAATGGCTTAACTCAAAAAAGATTTATTTAGATAGTGGGTTAGGAGATACACTT
GATTTAGTTCCGATTGCAGCCTTCAAGGGTACAGGTAAGAGTTGGATTGTATGGTGTCT
TACCTATTAGCTTGTCTACAATGAAGATATGGAACGTTATGAAACAATATGTAATAAGGT
ACAGGATTTTTCAGATGAAATCTTAGAAGCATGCTATAAAATTTCTTCTAAGATAAAATTA
CCATAGCCATAATCTGATTATTTAACCAAAGATTTTAAAGCAGATGTATGGTTTAAACCT
TCTGTAGTTTGGGAAATTAAGGGAGCAGATTTACAAATATCACCAGTATATACTTGTGCA
ATTAGTGAAACAAATTAAGAAAAAGGTATTGGTCTTAGATTTCCCTCGTCTTATCAGAGTT
AGAGATGATAAAGATCCAGTCGATGCTACTTCTCCTTCTTTTATATACGATATATATAAA
CAATAAGCTGTTGTAGCAAATGATTTTGATGATGGTGATGATTTCTATTGA

Protein

>36.m00193

MKQGTIKNFFGNSQKKKEELGESNLGSDKCATQSQKGAETNGQNSKESQQKPDESKSQ
EESQLKEKPKAQKRRQIIDSSDDEEVP SLATMSISNKQIKKVENENQKNESKSETKSST
DSSNLSKQILEKPKNEDEKLSQSSKKAEEQQDTKKKPTNNLRKLLDKHFDP IEDAPFYKD
QEVLFYGLCDGFERVNEQEGKNSKAIQIEIMSKIFKSIILLNPDQVYEAYMFCILKIAPD
YESNELGVGREILQKAI SNCCGKSVTQIRDSLNLKLDLGVASEAKSTQKNITNYFQKQA
KEKPPITLNRFTFNDLKSIAAASGKDS TAERERII IKYMNEAKPDEACYFIRFLEQNLKIG
AAEKTMQAALSKAFFEIAHNIKSNHVYTEQQNQLLEEFNFNITRCLCEFPNYYQV IETLK
QIGKDISKLLDICKITIGVPCPKMLAKPTKSIQVILERFKDMFTTCEY **KYDGLR**GQIHVD

GKDVTIFSRNLENMTQMPDIVEFIKKHVSQSKTVKNFILDSEIVAFDKNTNKIRPFQQL
ATRGRVNVKLDEIDIKVCVFMFDLIYINDQSLLQTTLQERRQKIQECFVQEPGEFCFAEH
INTEDEVEIQEFLEKSVKVGCEGLMVKTLETNSTYEPAKRSFKWLKLLKDYLD SGLGDTL
DLVPIAAFKGTGKRVGLYGAYLLACYNEDMERYETICKIGTGFSEILEACYKFFQDKII
PQPQSDYLTkDFKADVWFKPSVVWEIKGADLQISPVYTCAISETNQEKGIGLRFPRILIRV
RDDKDPVDATSPSFIYDIYKQAVVANDFDDGDDFY*

TtLIG13 (BtLig) TTHERM_00392850

NCBI Ulaşım Numarası: XM_001011861.1 (mRNA)

Genomic sequence length: 1668 nucleotides

CDS length: 1668 nucleotides

Protein length: 555 amino acids

Genomic sequence

>42.t00065

```
ATGATCAAAATTGATTTAACAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAATCAATCAAAGTTTTGG
GAAATCAGCCTGCTTGATGGAAAATAAATCTTAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTAAGGT
GAAGAGATTGAAGAGAAAACCTTAAATTTGTCCAAAAGTAGCACAAAGACACTGACTCTTGT
TTAGATTACATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATATT
CCCATGAAAAAGAATGAGCCTTAAATCATCATTTCCCTGCAAATAACGCAAGTGGATTTTCA
ATTTAAATTTTACGACCTAAATCTGTTGAAAATAAATGCTAACGATGATAAAGATTCTAAA
GTTGATTCAAATACTCAAGCGTATTTATAGGAAAACAAAACTTGGTCATCATAATTTGTA
ATTTTAACTCTGTCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATTTATAGGCAAACCTAGGAATAAAAAAG
ACATGGGAAAAAAGTTCTACAATATTAAGTGCAAACCTAGTGTAATTTGTATTTCAAAAAAT
TAAATTGAGGAATACGAAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTTTAG
CTAAATGAAGTTAATAAAACACTTTTTCAGCATAAAAATGGATCTAGTAATAATAATTAGCTT
GATCTCAACTAGAAAAGGCAAAAAGAAAAATTTTAATAAAGATTTCAGGGTTATACGACGAT
TCACATTCAAAATATTTTCAGGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGTCCTGGTGGC
TCTTAATTAGATTTATCATTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT
GTAAGTGGAGAAATTAATAAAGGTTCTTTAGGTGCTAACGGAAGTATGGATTCAGGTGTA
CTTTTAGCTTAAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACCTGGCTGGTATGCAAGTGAAAAA
ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTTGGACTGGAAAGACATTTTATTTCTAGGAATGGTAACGAA
TTCTACCCCTCCTCCATTTTTCATTTAAATTTCCCAAATTCGACTTTTAGATGGGGAATTG
TTTACAAAAAGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAAATGGAAT
GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAAGATATGTTTACTTAGTTTACGACTGTCTTAAATTA
TTAAAACCCTTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTTACAAGAATAAATTTCCAAAACCTGGTAA
AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAATAACTTGAATCAGAG
CTTGATAGAGCTTAAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTCATG
TATGAATGCAGAAGATCAAAAACCCCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT
ACAGTAATTGGGAGTGAAAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA
TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAAATTCAAAATAGGATCAGGATTCATGATGACTAAAGA
AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT
GGTAAACCAAGATTCCTATTTCTTTGAGAATAAAAAGAAGACGAATGA
```

CDS

>42.m00247

```
ATGATCAAAATTGATTTAACAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAATCAATCAAAGTTTTGG
GAAATCAGCCTGCTTGATGGAAAATAAATCTTAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTAAGGT
GAAGAGATTGAAGAGAAAACCTTAAATTTGTCCAAAAGTAGCACAAAGACACTGACTCTTGT
TTAGATTACATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATATT
CCCATGAAAAAGAATGAGCCTTAAATCATCATTTCCCTGCAAATAACGCAAGTGGATTTTCA
ATTTAAATTTTACGACCTAAATCTGTTGAAAATAAATGCTAACGATGATAAAGATTCTAAA
GTTGATTCAAATACTCAAGCGTATTTATAGGAAAACAAAACTTGGTCATCATAATTTGTA
ATTTTAACTCTGTCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATTTATAGGCAAACCTAGGAATAAAAAAG
ACATGGGAAAAAAGTTCTACAATATTAAGTGCAAACCTAGTGTAATTTGTATTTCAAAAAAT
TAAATTGAGGAATACGAAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTTTAG
CTAAATGAAGTTAATAAAACACTTTTTCAGCATAAAAATGGATCTAGTAATAATAATTAGCTT
GATCTCAACTAGAAAAGGCAAAAAGAAAAATTTTAATAAAGATTTCAGGGTTATACGACGAT
TCACATTCAAAATATTTTCAGGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGTCCTGGTGGC
TCTTAATTAGATTTATCATTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTT
```

GTAACGGAGAAAATTAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACGGCTGGTATGCAAGTAAAAA
ATGGATGGAGTCAGAGCTGTTGGACTGGAAAGACATTTTATTTCTAGGAATGGTAACGAA
TTTACAAAAGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAAATGGAAAT
GAAGAAAAAGATGAAAGGTGGAAAGATATTGTTTACTTAGTTTACGACTGTCCATAAATTA
TTAAAACCCCTTTAAAGATAGAATAAAAAGCTTTACAAGAATAAATTCAAAACCTTGGTAAC
AAGTACATTAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAATAAATTTGAATCAGAG
CTTGATAGAGTCTTAAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCATAATTCAATG
TATGAATGCAGAAAGATCAAAAACCCCTTAAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCT
ACAGTAATTGGGAGTGAAAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTA
TGCCGTATGAAAAATGGAAAAGAAATCAAAAATAGGATCAGGATTCATGATGACTAAAGA
AGAAGGCCACCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAATCTTACCAAAGAT
GGTAAACCAAGATTCCTATTTTCTTGAGAATAAAAAGAAGACGAATGA

Protein

>42.m00247

MIKIDLT~~TKPVFLNFNQSKFWEISLLDGNKSQIRYGKLVQGEIEEKTQIVQKQHKD~~TDSC
LDYIIRVIENKKLKGYSGDIPMKKNPQIIIPANNASGF~~SIQISAPKSVENNANDDKDSK~~
VDSNTQAYLQENKTWSSQFVILTL~~SGNEVEEIIIGKLGIKKTWEKSSTILSANQCKLYFKN~~
QIEEYERKGYVRDDSQYNFQLNEVNKHFSAQNGSSNNQLDLN~~QKGGKKNFNKDSGLYDD~~
SHSNISGISDQSDLTARS~~GGSQLDLSFDKGDDDDGNSVVTGEIKKGS~~L~~GANGS~~MDSGV
LLAQAMPDEMDPTGWYASEKMDGVRAVWTGKTFYSRNGNEFYPPFFIQNFPNCTLDGEL
FTKRDDFQRCVGI~~VKTKNGNEEKDERWKDIVLVYDCPKLLKPFKDR~~IKALQEIQPKLGN
KYIKVLP~~HKIVE~~SREQLESELDRVLKNNGEGLMLRDPNSMYECRRSKTLLKVKTF~~TDEEA~~
TVIGSERGEGRCADMMGALVCRMKGKEFKIGSGFNDDQRRRPPK~~GSVIT~~FKYQNLTKD
GKPRFP~~IFLR~~IKED*

Not: Sarı renkle gölgelendirilmiş bölgeler biyolojik işlevi bilinmeyen N Terminal domaini gösterir. Katalitik Domain ile ilgili çalışmalarda gölgesiz olan dizi FBtpETNdeI ve RBtpETXhoI primerleri ile çoğaltılarak üretilen 897 bç'lik dizi kullanılmıştır.

TtLIG4 (Lig4) TTHERM_00387050

NCBI Ulaşım Numarası: XM_001019308.1 (mRNA)

Genomic sequence length: 3351 nucleotides

CDS length: 3081 nucleotides

Protein length: 1026 amino acids

Genomic sequence

>41.t00043

```
ATGCAAAACTATTATAAAATGGCATAAGATAAAAATAAGAATAAAATCAAGAATTGTCTGTT
AATATAAAGCCAATTTCTTCATCAAAGATGAAACAAAGTGATATTTCTACTAGGAAGAAA
AAAGCTTAAGAGTATAATATGGATTTTGTATGAATTTTAGCAAGAGGATTCATAAAATTAAC
TAAATTTCTGATAATTTTCACTTTGGTGATTCAGCAGATGAATATGGTATTGATTCACCA
AAAATGAAAAGAGAAAAAGCAGTTAAAGAAGAAGATAAATACCTTTTCGCTTAGAAAATAAA
AAATCTCCTATCCTAGAGAAAACACTCTTTTTCATTTTTTAGTCAAATTTTATAATTAAGTC
TAGCAATCTAAAAAAGGGCAAAGAAAAAATTTGTATAAAGATTCATTGACTCTACATTT
AAAACAAATAGATGTCCATCTTACACATTTACTATCCTTAGGTTAATAATGCCTCATCAT
GATAAATAACGTCCTTAATTATGGCTTAAACTATAAAAAATTTAGCTAAAGTTTTAAGCGAA
GTGTTTGCCTTATCAGAAGATAAACGTCATAGCTTTTGAATTATAAAAAGACCTTTAAAA
GACAACCTAGCAAGTAGTTGGTGATTTTGGTGAAGTTGTATAAAATGTTTTGTAAAGCATTT
ACTTAGAAAAGCCACACTAACAAATCAACGATGTGGATAGATGTCCTTGATGAGCTTGCATAA
CCTCAAAATAGAGATCTAGCATCCAAAGAAAAAGTTTTAAGAACTGCCTGAAGAATGCA
ACATCAGAAGAAAATAAAATGGATTTACGGTAAATTTAATTTATTTTAATTAATATTAAT
AAAAATCTATAAAAGTTTGATCTTAAAGGACCTTAATCTTGGTATTAATCACGAAATAAT
ACTTGCACCTTTTTTCATCCTGATGCAAGTAGTATTATTTAATTTCTACTTCTAGTCTTTGGGA
GGTTTGCAGGAATTTGTAGATCCAAATCATAAAATTTATCTAATGTCCCTTAGGCTATTTCA
TCCTATAAAACCTATGCTTGCAGGACGTAAGACTCTCAAAGTATTTGAAGCTATTTCTTAA
AGGTAAGTAAAAATATTAATTAATTTGAAACATTTAACATCCTTTTTTACTTTTTTTTTATAC
AGGTAAAAACTATTTAGTTGAAACAAAAATTTGATGGGGAGAGAATTTAGTGTCATGTATC
TCCTGAATCTTTAATGTAAAAAATTTTTTTTTATATTTTTTTTTGGTTTAACTTAATAATA
AAAATAGGTTTTTCACTAGAACTCAAACAATTTATACAAAATTTTATGAAAAGAAATGATAG
AGCATGTTAGAAGAAGTTTAAAAGATGCTGTTTCATAGTTGTATTTTAGATGGAGAAATGG
TTGTAGTAAATAAAATAACAGGATAAAGAGTTTAAATTTGGTCTTAATAAAACTGTTGCAA
TGGAAGAGAGGATGATGAATTATGTATATGTTATAAAATTTTTGACATTTTTATATTTGA
AGACTAAAAGATAATAAAGAATATGCACTGACAGAATACACATTTGCAATATAGAAAAAAA
TTTTAGAAAATTTAATTGACAATCAATAAGACAGAGTTGAAGTTATTTTTGGTAGAGAAT
ACTCAGATATAAATGACATACTGACTGAAATTTAATGAGGCAATACATAGAAACGATGAAG
GTATAGTCATAAAGCAGCTCGATACTCTGTATTACCCAGATGATAGATCTGATAAGTGGGA
TTAAAATGAAAGGTGACTACTATGAAGGAATAATAGATACCTTAGATTTGATAGTTATTTG
GAGGATATTTTGGTGAAAAGTCTTATAAAATTAATGGCATAGGAGATTGGACAGATCATA
TCACACATTTATCTTGTGTGCTGTAGCGAAAAAGATTGATCTACAAAACCCCTCTAACTCTA
TACTTGTGCCTTTTGTAAAGTGGGAGCAGTTTTTACAGCTAGAGACTATGCTGATATAA
AAGCTAGAATGAGAGATCAATGGGTAAGAATAATCATTCAAATAAAACGCCTTCTTTCA
TCATATAAAACTGGAAAACCTGGAGAAAAAGTAAGTTATTTAGAAAAATAATGACTTTTTTA
AAAAAATAAAATTTAAGGATAAGCCAGATGCATATATTTTATCTCCTCAAACCTCTCTTA
TTTTAGAGATTAGGGCAACTGAAATTAATAATCTTCTTAATATCCGACCAACTACACCT
TAAGGTATTTATCTATTTTTAAAAATACAAATTTAAATGAAGTTTTGTAAATATCCTAAATTA
AATTTAATGAAATTAAGAAATGACTTAAAAATTTAAAGAAAAAGAATAAAAAGAGAGT
GACAAAAGAGATAATGCAAGCGATGAAGAGTAGGACGAAAATGGAGGAAAATTAAGAAA
AAAAGAAAAGGGTAAAAATGGAGAAGAGATAGAAGTAAATAGACAAGGTAGAAAGCCAAAC
TGGAAGACCAATAAAGTTATGGCTCAATATCTTGATATTGATGTTTCTGATGTCAAAGTA
GAATCAAATATATTTAATAACTTTGTATTTAATATAATTAATTTACCTCATGAAGTATCC
TTGAGTGAGGAAAAGATATTGTTAGAGAAAGCCTAGATTGAAAAAGGTATAGTTGCTAAT
```

GGTGGTAAAAAAGTATAAAATGATAGCAATCTTGTAACCTATTACATAGCTTCACATTAT
GATTTTAAAGTTTAAAGTAATTGGTGATCACTATAAAAGTAAATGTTCTATCCTTATAATGG
GTA AAAAGACTGTATCAAAAAA AACTTTATTAGATTACTCTCCCGCTACATTATATAT
GGTTAAGATTAATTGCTTGAGAGAAAATAAATTGCTTTTATGATTAATATGGAGATTCTTAT
TACAAAGATGTTGATGAAGATGAGTTATTGGATATTTTAAAATCTATGAAAATTGATTAA
ATAGAAGAAGAATCTAGGAGAATGAAGAGTTTGAAGAGGCTGTTAAAGATATTATTTCC
ATGAAAAACCAACTTTTCAAAGAAATGTTTTCCGTAAGGATAAACTTATTGCTTTTATAAT
GCAAAATGATAAAATGAATTCAGATATAGACTTAAAGATATTTAGTTGATCTAATTTAATTT
AGTGGAAATTAAGTTGTATTTGACTTATAGGACGAAAATTGATTACATAGTGGCTTTAGAT
TATAGTGAAGCTGAAAAACGAAAAAATTATTACCTTCAGAGAAAAAACAGAAGTATGGAA
GTTATAACTCCTAAAAA ACTTGTGTAATAATTTTGGAAATAGCTCTAGAATGA

CDS

>41.m00206

ATGCAAACTATTATAAAATGGCATAAGATAAAAATAAGAATAAAATCAAGAAATTGCTGT
AATATAAAAGCCAATTTCTTCATCAAAGATGAAACAAAGTGATATTTCTACTAGGAAGAAA
AAAGCTTAAGAGTATAATATGGATTTTGTATGAATTTTAGCAAGAGGATTTCTAAAATTAAC
TAAAATTTCTGATAATTTTCACTTTGGTGATTACAGCAGATGAATATGGTATTGATTACCA
AAAATGAAAAGAGAAAAAGCAGTTAAAGAAGAAGATAATACCTTTTCGCTTAGAAAATAAA
AAATCTCCTATCCTAGAGAAAACTCTTTTTCATTTTTAGTCAAATTTTATAATTAAGTC
TAGCAATCTAAAAAGGGCAAAGAAAAAATTTGTATAAAAGATTCATTGACTCTACATTT
AAAACAAATAGATGTCCATCTTACACATTTACTATCCTTAGGTTAATAATGCCCTCAT
GATAAATAACGCTCTTAATTAATGGCTTAAACTATAAAAAATTTAGCTAAAAGTTTTAAGCGAA
GTGTTTGCCCTTATCAGAAGATAAACGTC AATAGCTTTTGAATTATAAAAAGACCTTTAAAA
GACAACTAGCAAGTAGTTGGTGATTTTGGTGAAGTTGTATAAAATGTTTTGTAAGCATTT
ACTTAGAAAAGCCACACTAACAAATCAACGATGTGGATAGATGCTTTGATGAGCTTGCATAA
CCTCAAAATAGAGATCTAGCATCCAAAAGAAAAAGTTTTAAGAACTGCTTGAAGAATGCA
ACATCAGAAGAAAATAAAATGGATTTACGTTTTGATCTTAAAGGACCTTAATCTTGGTATT
AATCACGAAAATAACTTGCACCTTTTTCATCCTGATGCAGTAGTATTATTTAATTTCTACT
TCTAGTCTTTGGGAGGTTTGC AAGGAAATTTGTAGATCCAAATCATAAATTTATCTAATGTC
CTTAGGCTATTTTCATCTATAAAACCTATGCTTGCAGGACGTAAGACTCTCAAAGTATT
GAAGCTATTCTTAAAGGTAAAAACTATTTAGTTGAAACAAAATTTGATGGGGAGAGAATT
TAGTGTATGTATCTCCTGAATCTTTAATGTTTTTCACTAGAAACTCAAACAATTATACA
AATATTTATGAAAAGAAATGATAGAGCATGTTAGAAGAAGTTTAAAAGATGCTGTTTCATAGT
TGTATTTTAGATGGAGAAAATGGTTGTAGTAAATAAAAATAACAGGATAAAGAGTTTAAATTT
GGTCTTAATAAAA AACTGTTGCAATGGAAAGAGAGGATGATGAATTAATGTATATGTTATAAA
ATTTTTGACATTTTATATTTGAAGACTAAAGATAATAAAGAATATGCACTGACAGAATAC
ACATTTGCAATATAGAAAAA AATTTTAGAAAAATTTAATTGACAATCAATAAGACAGAGTT
GAAGTTATTTTGGTAGAGAATACTCAGATATAAATGACATACTGACTGAATTTTATGAG
GCAATACATAGAAAACGATGAAGGTATAGTGCATAAAAGCAGCTCGATACCTCTGTATTACCCA
GATGATAGATCTGATAAGTGGATTA AAAATGAAAGGTGACTACTATGAAGGAATAATAGAT
ACCTTAGATTTGATAGTTATTGGAGGATATTTTGGTGA AAAAGTCTTATAAAAATTAATGGC
ATAGGAGATTGGACAGATCATATCACACATTATCTTGTGTGCTGTAGCGAAAAAGATTGAT
CTACAAAACCCCTCTAACTCTATACTTGTGCCTTTTTGC TAAAGTGGGAGCAGGTTTTTACA
GCTAGAGACTATGCTGATATAAAAGCTAGAATGAGAGATCAATGGGTAAGAACTAATCAT
TCAAATAAAAACGCCTTCTTTCATCATATAAAACTGGAAACCTGGAGAAAAAGATAAGCCA
GATGCATATATTTTATCTCCTCAA AACTCTCTTATTTTTAGAGATTAGGGCAACTGAAATTT
ATATAATCTTCTTAATATCCGACCAACTACACCTTAAGATTTCCGAGATTTGAAAAATTT
AGAAGAGATAAAGATTGGTTTGATGCAATGAAATTTAATGAAATTTATAGAAATGACTTAA
AATTTAAAAGAAAAAAGAATAAAAAGAGAGTGACAAAAGAAGATAATGCAAGCGATGAAGAG
TAGGACGAAAAATGGAGGAAAAATTAAGAAAAAAGAAAAGGGTAAAAATGGAGAAGAGATA
GAAGTAAATAGACAAGGTAGAAAAGCCAAACTGGAAGACCAATAAAGTTATGGCTCAATAT
CTTGATATTGATGTTTCTGATGTCAAAGTAGAATCAAATATATTTAATAACTTTGTATTT
AATATAATTAATTTACCTCATGAAGTATCCTTGAGTGAGGAAAAGATATTGTTAGAGAAA
GCCTAGATTGAAAAAGGTATAGTTGCTAATGGTGGTAAAAAAGTATAAAATGATAGCAAT
CTTGTAACCTATTACATAGCTTCACATTATGATTTTTAAAGTTTTAAGTAATTTGGTGATCAC
TATAAAGTAAATGTTCTATCCTTATAATGGGTAAAAAGACTGTATCAAAAAA AACTTTTA
TTAGATTACTCTCCCGCTACATTATATATGGTTAAGATTAATTTGCTTGAGAGAAAATAAA

TTGCTTTATGATTAATATGGAGATTCTTATTACAAAGATGTTGATGAAGATGAGTTATTG
GATATTTTAAAAATCTATGAAAATGATTAAATAGAAGAAGAATTCTAGGAGAATGAAGAG
TTTGAAGAGGCTGTTAAAGATATTTATTTCCATGAAAAACCAACTTTTCAAAGAATGTTTT
CCGTAAGGATAAACTTATTGCTTTTATAATGCAAATGATAAAATTGAATTCAGATATAGAC
TTAAGATATTTAGTTGATCTAATTTAATTTAGTGGAAATTAAGTTGTATTTGACTTATAG
GACGAAATGATTACATAGTGGCTTTAGATTATAGTGAAGCTGAAAACGAAAAAATTATT
ACCTTCAGAGAAAAAACAGAGTATGGAAGTTATAACTCCTAAAAACTTGTGAATAAT
TTTGAATAGCTCTAGAATGA

Protein

>41.m00206

MQNYKWHKIKQEQNQELSVNIKPISSSKMKQSDISTRKKKAQEYNMDFDEFQQEDSKIN
QNSDNFHFHFGDSADEYGIDSPKMKREKAVKEEDNTFRLEIKKSPILEKTLFSLVKFYNQV
QQSKKGQRKKFVQRFIDSTFKTNRCPSYTFITLRLIMPHDKQRLNYGLNYKNLAKVLSE
VFALSEDKRQQLLNYKRPLKDNQVVGDFGEVVQNVLQAFQTQKATLTINDVDRCLDELAQ
PQNRDLASKEKVLRLNCLKNATSEEIKWISRLILKDLNLGINHEIILALFHPDAVVLFNST
SSLWEVCKEFVDPNHKLSNVLRLFHPKPLMLAGRKTLSIEAILKGKNYLVE**TKFDGERI**
QCHVSPESLMFFTRNSNNYTNIEYERMIEHVRRLKDAVHSCILDGEMVVVVKITGQRVQF
GLNKTVAMEREDDELICIKYIFDILYLKTKDNKEYALTEYTLQYRKKILENLIDNQQDRV
EVIFGREYSDINDILTEFNEAIHRNDEGIVIKQLDTLYPDDRSDKWKMKMGDYEGIID
TLDLIVIGGYFGEKSYKINGIGDWDHITHYLVAVAKKIDLQNPNSILVFPKVGAGFT
ARDYADIKARMRDQWVRTNHSNKTPSFI IQNWKPGKDKPDAYILSPQNSLILEIRATEI
IQSSQYPTNYTLRFPRFEKFRDKDWFDCMKFNEI IEMTQNLKKKEQKESDKEDNASDEE
QDENGKGLKKKRKGQNGEEIEVNRQGRKPNWKTNKVMAQYLDIDVSDVKVESNI FNNFVF
NIINLPHEVSLSEEKILLEKAQIEKGI VANGGKKVQNSNLVTHYIASHYDFKVQVIGDH
YKVNVLSQLQWVKDCIKKKTLLDYSPTYIYQDQLLERNKLLYDQYGDSYYKDVEDELL
DILKSMKIDQIEEEFQENEEFEEAVKDI ISMKNQLFKECFPQGQTYCFYNANDKLNSDID
LRYLVDLIQFSGNQVVFDLQDEIDYIVALDYSEAENEKIITFREKNRSMEVITPKNLLNN
FGIALE*

Birinci Motifi “KxDG” Şeklinde Bulunduran Fakat Diğer Beş Motifi Taşımayan Hipotetik Protein:

NCBI Ulaşım Numarası: XM_001024104

TTHERM_00659030 sequence information

Genomic sequence length: 2777 nucleotides

CDS length: 2463 nucleotides

Protein length: 820 amino acids

Genomic sequence

>97.t00082

```
ATGCAATAGGCGCAAGTTCGCTCTAATCTCCCAGAAACCAATTTATGGTTTGCATAAAAAGA
TTAGGAGAAGAAAAATGTTGAATAAAACACAAAAGCAGTCATAGAAAAATATAAAACATAT
ACTTGGGATAAAATCGTTCATTTACAATTATCTTGATACTCGTTTATTGAAATCAATATTT
TTAGATGATAAATTAATACTTTTAAGATTGCATTTTTCTAATTAATGAATATAATGCAGAG
GTAGAGAAAAATCAAGAAAAGCAAGGAGGAAATGAAAAATGGGCCATGGAAAATGCGTTTTT
TTTAGCACTCTATATAATTTACTTTCGTGAGGTCATTTTTTACAAGAGACAGAATACTTTAA
CGAAGTTTCGCCCAAGATGTTAATTAATGGGCGTATAAGCAATTAGAAGGTTTAGAGGCA
GATTAGAAAAGAAATTAACCTTTTGAAAAATGATCCAGCCTTTATGCTTACAACACTAAGA
GGAGTTATGAAAAGATTTTAGCAAGTATCGTAAAACCTCAAGCTCTAGGGAGAGACCTGTA
AATAAATCTCTTGAAAAATAGATAACAGTGACCCTTTACCGCTAACACTTTACCTAATTTT
AACGACGAATCAACTGTAATAGGCAACAGAACTTTCCCTTGATGAAAGCACAAAGAGATTAA
ACCATATTAGATAACAGATAATAATCCCAGAAAAAGAAGAATAATCAGTTTTGAGTTAA
AGCATAACTCATTTAAAGTAACTTCTATTTTTATCTTAAGCTGGGCTGCCCTCCTAAGATG
AAGATGCCTTCAGAATATGTACAAGAAGCTTTTAAAAGATTATAATATATATGTGCTCGTACT
AAACATCCTGAATATGAACCTCCTGCTGTAAGGTATAAAAATAACTTCATAATATATATAT
TTTTACTTTAAAATCCTTATTTAAACAAAACATAAAATATTTATGAAAAGTAAATAAAATAAA
TCCTAAAATAAAATAAAAATGGCTTTAAAAGATACCTATTTATTTAAGAAATATAGTGAAT
TTTAGATTAAGGAAAGATTCATAATTTTTTTTTGATATAAAAAATGAAACAGAAAATATTTAC
TTATTTAATTTTAATTAACAGAAAATAAATAATTTAAATAATTTATCATTAATTTCTTTAAA
GCTATTTGACAAAATAAATTAATTTTAATTTTACTAATTTTAAAAGACTGAAAGAATATA
AGAGAAGAGTTTTAAGCTTTGATGATCCTTCTAAAGTGTTAACCTAAGTTGGCTGATACAT
AAAAGAAAAGATTTCTGAATTTTCAAGAGTAACTTATCCTAAGCCTTTAACACTCTAGGATA
TGAAAAAAAAGAAAAGAAAGAAAGAAATAGTAAGCCTTGAAGAATAGAAGAGAGAAGAGG
CTGCAAAATAGAGCAGAAAAGTGCTGCTGGAGAAAATTAACCAGAAAGATGGATAGGCCCTTG
CTGCAGCAACTCCTAATTAGGAGGGAGAAATAAAAAGCTGATGATGATAAGAGCTAAAAGG
AAGACTTGGATTTAAGTGGAAATCTAGCTGAAAAGGATGATGGATAACCCAAAAAACCTC
CTCTTTAACCTAATATTAATAAATATATACGAATGATGAATATGGAAAGGAGACTTTTTATTA
GAGATTTAAATAAAAAAGTATGATCACAGAAGCAACTATATTTACTATGAGCCTTCTGATG
ATGTACGCGAAAATAAGAATGGAAAATAAGTGGAATGAAAATAGGTAAAAGGAATTTAAAAG
AGAAGAGAGAAAATGAAGAAATGATTAATTTGGTTTAAAGAATGGTCTATTGCAAAAAGGCA
GATTAGAAAAAAGAAATCAGTAGAAAAATAGATTCAAATATTTATGGTTTCGAAATTTAAGG
ATTGCGAATATCGCTTTAATAAAAAAACAATGAAGAGCTTTAAAAGCTGGATTAAGAAA
CTAAAAGAAAGCTGCTCTTAAGCAAAAATGCCCTCTAAGAAATCAGGGAAATAGAAGACAAGA
AAAAGAGAATCGAATAAAAAAAGAAGGAAAGAGAGGAAAGAAGAAAGGAAAGAGAAGAAA
AGAAAAATAAGAAAAAAGACATGATTTCTGACTCAGATAAAGAAAAGTCTGATGAAGAGT
CTTATGATGAAGAATTAGATGGTCCTTTTGATCCCAGCAATCCTAAATTTAAAATAAAA
GACGTCCTCATTCATTCATGTCATGCTAATCAAAGCCTGAATAAAAAAGTGTGATTTCACTT
CTACTCTTCTCGTATAGCAAAAAGTGTAAAATCAAACCTAATTTGCATCCCTTCAAAGGAC
TAGAATATGATACATAACGTTAAAAGATTGAAATGATAAAGAGACTTCATGGTAATTTAA
TAAATATTAACCTAATAATCCAGCTAATAACAATGAATTATCAAAAACCTCAGTAAGCTG
CTGTTTAAATCTGAGTCTTCATAGTCATTTTACTATGAAAAGTTAAAATAGAAAACCTAATCTA
AGGAACCTATATAACCTTCTTTATCAGTGTATTCAAGAGATGTTATGTAAGGCTTAGAC
```

CTTTTTTCAGCAATTTTTTGAAGCAAACGACCTATCAGTAATTTAAAAGGAGCAACTACTGG
AAGTACACGAAAGTAAAAAATAGAATGGCTAAGTATAAACTTTTCAGTACCATATAAAAAAT
TAAAAGATGCAATAATTGTCCAGAAGGCCGTGACAAATAAAGAGGATTTAGAGCTTATTC
CAGATCCTGGACAAGGATTAATAAAAAATCCCTTTATGAAGGATAAGAAGAAAAAAGA
AGAAGAAAAGAAAGTGA

CDS

>97.m00174

ATGCAATAGGCGCAAGTTCGCTCTAATCTCCCAGAAACCAATTTATGGTTTGCATAAAAAGA
TTAGGAGAAGAAAATGTTGAATAAAACACAAAAGCAGTCATAGAAAAATATAAAACATAT
ACTTGGGATAAAATCGTTCATTTACAATTATCTTGATACTCGTTTTATTGAAATCAATATTT
TTAGATGATAAATTAATACTTTTAAGATTGCATTTTTCTAATTAATGAATATAATGCAGAG
GTAGAGAAAATCAAGAAAAGCAAGGAGGAAATGAAAAATGGGCCATGGAAAATGCGTTTTT
TTTAGCACTCTATATAAATTTACTTCGTGAGGTCATTTTTTACAAGAGACAGAATACTTTAA
CGAAGTTTCGCCCAAGATGTTAATTAATGGGCGTATAAGCAATTTAGAAGGTTTAGAGGCA
GATTAGAAAAGAAAATTAACCTTTTGAATAATGATCCAGCCTTTATGCTTACAACACTAAGA
GGAGTTATGAAAAGATTTTAGCAAGTATCGTAAAACCTCAAGCTCTAGGGAGAGACCTGTA
AATAAATCTCTTGAATAATAGATAACAGTGACCTTTACCGCTAACACTTTACCTAATTTT
AACGACGAATCAACTGTAATAGGCAACAGAACTTTCCCTTGATGAAAGCACAAAGAGATTAA
ACCATATTAGATAACAGATAATAATCCCCAGAAAAAGAAGAATAATCAGTTTTGAGTTAA
AGCACAACCTCATTTTAAAGTAACTTCTATTTTATCTTAAGCTGGGCTGCGTCCTAAGATG
AAGATGCCCTCAGAATATGTACAAGAAGCTTTAAAAGATTATAATATATGTGCTCGTACT
AAACATCCTGAATATGAACCTCCTGCTGTAAGACTGAAAGAATATAAGAGAAGAGTTTTTA
AGCTTTGATGATCCTTCTAAAAGTGTAACTAAGTTGGCTGATACATAAAAAGAAAGATTCT
GAATTTTTCAAGAGTAACTTATCCTAAGCCTTTAACACTCTAGGATATGAAAAAAGAAA
GAAGAAGAAAGAAATAGTAAGCACTTGAAGAATAGAAGAGAGAAGAGGCTGCAAATAGAGCA
GAAAGTGCTGCTGGAGAAAATTAACCAGAAGATGGATAGGCCCTGCTGCAGCAACTCCT
AATTAGGAGGGAGAATAAAAAGCTGATGATGATAAGAGCTAAAAGGAAGACTTGGATTTA
AGTGGAATTTCTAGCTGAAAAGGATGATGGATAACCCAAAAACCTCCTCTTTAACCTAAT
ATTAATAAATTTATACGAATGATGAATATGGAAAGGAGACTTTTTATTAGAGATTTAAATAAA
AAGTATGATCACAGAAGCAACTATATTTACTATGAGCCTTCTGATGATGTACGCGAAATA
AGAATGGAAAATAAGTGAATGAAAATAGGTAAAAGGAATTTAAAAGAGAAGAGAGAAAAT
GAAGAAAATGATTAATTTGGTTTAAAGAAATGGTCTATTGCAAAAAGGCAGATTAGAAAAGAA
ATCAGTAGAAAAATAGATTTCAAAATATTTATGGTTTCGAAATTTAAGGATTTGCGAATATCGC
TTTAATAAAAAAACAATGAAGAGCTTTAAAAGCTGGATTAAGAACTAAAGAAGCTGCT
CTTAAGCAAAAATGCCCTCTAAGAAAATCAGGGAAAATAGAAGACAAGAAAAAGAGAATCGAA
TAAAAAAGAAGGAAAGAGAGGAAAAGAAAGAAAGAGAAGAAAAGAAAAATAAGAAA
AAAAGACATGATTTCTGACTCAGATAAAGAAAAGTCTGATGAAGAGTCTTATGATGAAGAA
TTAGATGGTCTCTTTGATCCCAGCAATCCTAAAATTTAAAAATAAAAAGACGCTCCCTCA
TTGCATGTCTAATCAAAGCCTGAATAAAAAAGTGTGATTTCACTTCTACTCTTCTCCTCGT
ATAGCAAAAAGTGTAAAATCAAACATAATTTGCATCCCTTCAAAGGACTAGAATATGATACA
TAACGTTAAAAGATTGAAATGATAAAGAGACTTTCATGGTAATTTAATAAATATTTAAACCT
AATAATCCAGCTAATAACAATGAATTTATCAAAAACCTCAGTAAGCTGCTGTTTAACTGAG
TCTTCATAGTCATTTTACTATGAAAGTTAAAATAGAAACTAATCTAAGGAACCTATATAA
CCTTCTTTATCAGTGTATTTCAAGAGATGTTATGTAAAAGCTTAGACCTTTTTTCAGCAATT
TTTGAAGCAAACGACCTATCAGTAATTTAAAAGGAGCAACTACTGGAAGTACACGAAGTA
AAAAATAGAATGGCTAAGTATAAACTTTTCAGTACCATATAAAAAATTTAAAAGATGCAATA
ATTGTCCAGAAGGCCGTGACAAATAAAGAGGATTTAGAGCTTATTTCCAGATCCTGGACAA
GGATTAATAAAAAAATCCCTTTATGAAGGATAAGAAGAAAAAAGAAGAAGAAAAGAAAG
TGA

Protein

>97.m00174

MQQAQVRSNLPKPIYGLHKRLGEEENVEQNTKAVIEKYKTYTWDKSFIYNYLDTRLLKSI
LDDNQYFQDCIFLINEYNAEVEKIKKSKEEMKNGPWKMRFFSTLYNLLREVIPTDRDILQ
RSFAQDVNQWAYKQLEGLEADQKEIKPFENDPAFMLTTLRGVMKDFSKYRKTSSSRERPV
NKSLEKQITVFTANTLPNFNDESTVIGNRFTLDESTRDQITLDNRQQSPEKEEQSVLSQ
STTHFKVTSILSQAGLRPKMKMPSEYVQEALKDYNICARTKHPEYEPVAVRLKEYKRRVL

SFDDPSKVLTKLADTQKKDSEFSRVTYPKPLTLQDMKKKKEEEEQQALEEQRREEANRA
ESAAGEIKPEDGQAPAAATPNQEGEQKADDDKSQKEDLDLSGILAE**KDDG**QPKKPPLQPN
IKNYTNDEYKETFIRDLNKKYDHRSNYIYYEPSDDVREIRMENKWNENRQKELKEKREN
EEMIKLVQEWSIAGRLEKEISRKIDSNIYGSKFKDCEYRFNKKTNEELQKLDQETKEAA
LKQNALQEIREIEDKKKRIEQKKKEREERRKEREKKKRRHSDSDKEKSDEESYDEE
LDGPFDFSNPKFKNKRRPHSLHVQSKPEQKSVDF'TSTLPRIAKVQNQTNLHPFKGLEYDT
QRQKIEMIKRLHGNLINIKPNNPANNNELSKTQQAAVQSESSQSFYYESQNRNQSKEPIQ
PSLSVYSRDVMQKLRPFSAIFEANDLSVIQKEQLLEVHEVKNRMAKYKLSVPYKCLKDAI
IVPEGLTNKEDLELIPDPGQLIKNPFMKDKKKKKKKKKR*