

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MAYA İKİLİ HİBRİD SİSTEMİ İLE KLONLANAN MUHTEMELEN YENİ
BİR HÜCRE-İÇİ SİNYALİZASYON MOLEKÜLÜNÜN
KARAKTERİZASYONU**

Lokman VARIŞLI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

170345

**ŞANLIURFA
2005**

Yrd. Doç. Dr. Osman ÇEN'in danışmanlığında, Lokman VARIŞLI'nın hazırladığı "Maya İkili Hibrid Sistemi İle Klonlanan Muhtemelen Yeni Bir Hücre-İçi Sinyalizasyon Molekülünün Karakterizasyonu" konulu bu çalışma 02/02/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Osman ÇEN

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Nihat DİLSİZ

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ

İmza: 

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 432

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge-şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. KURAMSAL TEMELLER	1
1.1. Astım	1
1.2. Eozinofiller	2
1.3. İnterlökin 5	3
1.4. İnterlökin 5 Reseptörü	3
1.5. İnterlökin 5 Reseptörü İle Sinyal İletimi	5
1.5.1. JAK/STAT yolu	7
1.5.2. Map kinaz yolu	10
1.5.3. PI3 kinaz yolu	12
1.6. Maya İkili Hibrid Sistemi	14
1.7. DNA Klonlaması	15
1.7.1. Plazmidler	16
1.7.2. DNA moleküllerinin plazmidlere klonlaması	17
1.8. Biyoinformatik	18
1.8.1. DNA sekans databazları	23
1.8.2. RNA sekans databazları	23
1.8.3. Protein sekans databazları	23
1.8.4. Yapı databazları	24
1.8.5. Genomik databazlar	25
1.8.6. Diğer databazlar	25
2. MATERYAL ve YÖNTEM	26
2.1. Biyoinformatik Analiz Yöntemleri	26
2.1.1. BLAST araştırması	26
2.1.2. Genin yapısının ve kromozomal yerleşiminin belirlenmesi	27
2.1.3. Gen transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi	27
2.1.4. Genin kodlayacağı proteinlerin belirlenmesi	27
2.1.5. Proteinlerin karşılaştırılması	27
2.1.6. Proteinlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi	28
2.1.7. Proteinlerin fonksiyonel domeyn ve motiflerinin belirlenmesi	28
2.1.8. Proteinlerin hücredeki yerlerinin belirlenmesi	28
2.1.9. Proteinlerin sekonder yapılarının belirlenmesi	29
2.1.10. Proteinlerin transmembran bölgelerinin belirlenmesi	29
2.1.11. Proteinlerdeki translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi	29
2.2. Deneysel Yöntemler	30
2.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması	30
2.2.2. Transformasyon için alıcı (competent) hücrelerin hazırlanması	31
2.2.3. Bakteri hücrelerine plazmid DNA'sının transformasyonu	32
2.2.4. Plazmid DNA'nın transforme edilmiş bakterilerden izolasyonu	33
2.2.5. Plazmid DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi	34
2.2.6. Agaroz jel elektroforez	34
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	36
3.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları	36
3.1.1. BLAST araştırması	36
3.1.2. FLJ90024 geninin kromozmal yerleşimi ve gen yapısı	36
3.1.3. FLJ90024 geninin transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi	37
3.1.4. FLJ90024 geninin transkriptlerinin kodlayacağı proteinler	39

	Sayfa No
3.1.5. Proteinlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi	42
3.1.6. Proteinlerdeki fonksiyonel motif ve domeynler	43
3.1.7. Proteinlerin hücredeki yerleşimlerinin tahmini	43
3.1.8. Proteinlerin sekonder yapılarının belirlenmesi	44
3.1.9. Proteinlerin transmembran bölgelerinin belirlenmesi	44
3.1.10. Proteinlerin translasyon sonrası muhtemel modifikasyonları	45
3.2. Deneysel Sonuçlar	47
3.2.1. Transformasyon için bakteri suşlarının hazırlanması	47
3.2.2. Transformasyon sonuçları	48
3.2.3. Transformasyon sonrası plazmidlerin saflaştırılması	49
3.3. Tartışma	51
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	66
ÖZET	67
SUMMARY	68



ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYA İKİLİ HİBRİD SİSTEMİ İLE KLONLANAN MUHTEMELEN YENİ BİR HÜCRE İÇİ SİNYALİZASYON MOLEKÜLÜNÜN KARAKTERİZASYONU

Lokman VARİŞLİ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Osman ÇEN
Yıl: 2005, Sayfa: 68

Bu çalışma, maya ikili hibrid sistemi kullanılarak elde edilen ve IL-5 reseptörü (IL-5R)'nın α alt ünitesi ile bağlantı kuran 1,6 kilobaz çifti uzunluğunda bir cDNA (klon-38)'nin biyoinformatik (biyobilişim) yöntemle karakterizasyonunu ile ilgilidir. Bu klonun Genbankasındaki karşılığı, geninin kromozomal yerleşimi ve yapısı mRNA'ları, oluşturabilecekleri proteinler, bu proteinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendi. Bu proteinlerin hücredeki yerleşimleri, sekonder yapıları ile fonksiyonel domeyn ve motifleri transmembran bölgeleri ve translasyon sonrası geçirebilecekleri modifikasyonlar araştırıldı. Analizler bu klonun 2. kromozom üzerinde yer alan bir gene karşılık geldiği ve bu genin alternatif splising ile dört mRNA kodlayabileceğini göstermektedir. Bu mRNA'ların oluşturabileceği proteinlerin G-proteinlere bağlı reseptör süper ailesine ait olduğu ve ağırlıklı olarak random coil ve alfa heliks sekonder yapısına sahip olabileceği görülmüştür. Topolojik olarak proteinlerin hücre zarını 5-6 sefer geçen transmembran bölgelere sahip olduğu ve fosforilasyon, glikozilasyon ve miristilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar geçirebileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu genin G-proteinlere bağlı reseptörleri kodlaması büyük bir olasılık teşkil etmektedir. Böyle bir durumda bu gen ve ürünleri çeşitli terapötik özellik arz edebilecek bir hedef oluşturabilir. Deneysel olarak pBAD plazmidi içerisinde bulunan klon-38 cDNAsı E. coli'ye transforme edilerek antibiyotikli besi ortamında seçildi, plazmid izole edildi ve EcoRI ve XhoI DNA kesim enzimleri ile kesilerek analizi yapıldı.

ANAHTAR KELİMELER: Astım, eozinofil, IL5R, biyoinformatik, transformasyon

ABSTRACT

Master Thesis

CHARACTERIZATION OF NEW INTRACELLULAR SIGNALING MOLECULE CLONED IN THE YEAST TWO-HYBRID SYSTEM

Lokman VARIŞLI

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Osman ÇEN
Year: 2005, Page: 68

This study is on *in silico* (bioinformatical) characterization of a 1,6 kbp cDNA (clone-38) initially cloned as an IL-5 receptor alpha (IL-5R α) interaction molecule in the yeast two-hybrid system. Its gene in the Genebank, chromosomal location and gene structure has been defined. The mRNAs expressed from this gene and their open reading frames (ORF) and their protein products, their cellular distribution, secondary structure, and the functional domains were investigated. In addition, the transmembrane regions and the post-translational modifications were also searched. The results show that the gene is located on the human chromosome 2 and predicted to transcribe four alternatively spliced mRNAs. The proteins are predicted to belong to the G-protein coupled receptors. They are mainly in random coil and alpha helix structures transpass the membrane 5-6 times and show some of the post-translational modifications such as phosphorylation, glycosylation, and myristoylation. As a result, it is suspected to be involved in both in IL-5R and G-protein coupled receptor signaling. If so, it may prove to be an important therapeutic target. Experimentally, the cDNA of clone-38 in pBAD plasmid was transformed into *E. coli*, selected on media containing ampicillin. Then plasmid was purified and analyzed with the EcoRI and XhoI restriction digesiton.

KEY WORDS: Asthma, eosinophil, IL-5R, bioinformatics, transformation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk andan itibaren beni yetiştirmeye çalışan ve tez çalışmam boyunca da bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışmanım Yrd. Doç. Dr. Osman ÇEN'e, yorum ve önerileri ile Biyoloji Bölüm Başkanı Doç. Dr. Nihat Dilsiz'e, tez çalışmasında kullanılmak üzere gerekli olan çeşitli bakteri ırklarının temininde yardımcı olan Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Kemal GÜVEN'e, Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Murat KIZIL'a ve Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Sezai TÜRKEK'e, Özellikle agaroz gel elektroforezi için yardımlarını esirgemeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Fuat DİLMEÇ'e, yüksek lisans tez projeme destek sağladığı için HÜBAK'a, zaman ve önerilerini esirgemeyerek tezimin komitesinde görev alan Doç. Dr. Nihat DİLSİZ ve Yrd. Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a, Biyoteknoloji laboratuvarını kullanırken sunduğu yardım için Arş. Gör. Ayşe ŞAHABOĞLU'na, tezimi hazırlarken verdikleri manevi destekten dolayı da eşim, annem, babam ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. IL-5 reseptörünün yapısı	4
Şekil 1.2. Lyn. kinaz molekülünün yapısı	5
Şekil 1.3. JAK ve STAT moleküllerinin yapısı.....	8
Şekil 1.4. IL-5 reseptöründe JAK moleküllerinin bağlanma yerleri	9
Şekil 1.5. JAK/STAT yolu	10
Şekil 1.6. MAP kinaz yolunun organizasyonu	11
Şekil 1.7. PI 3K yolu ile sinyal iletimi	13
Şekil 1.8. Maya ikili hibrid sistemi	15
Şekil 1.9. DNA klonlamasında kullanılan bir plazmidin genel yapısı	16
Şekil 1.10. DNA klonlamanın şematik gösterimi	18
Şekil 1.11. 1995-2003 yılları arasında genomu sekanslanan organizmalar	22
Şekil 2.1. pBAD plazmidinin yapısı	26
Şekil 3.1. FLJ90024 geninin yapısı	37
Şekil 3.2. FLJ90024 geninin transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi	38
Şekil 3.3. TM6P1 ve HEMBA proteinlerinin primer yapısı	39
Şekil 3.4. DKFZ ve TRACH transkriptlerinin ORF analizi	41
Şekil 3.5. FLJ90024 geninin dört transkribinin protein karşılaştırması	42
Şekil 3.6. FLJ 90024 geninin kodladığı proteinlerin muhtemel sekonder yapıları	44
Şekil 3.7. Proteinlerdeki muhtemel transmembran bölgeler	45
Şekil 3.8. Proteinlerdeki translasyon sonrası muhtemel modifikasyon bölgeleri	47
Şekil 3.9. Transformasyon sonucu kolonilerin büyümesi	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Plazmid DNA'sının kesim reaksiyonu	34
Çizelge 3.1. BLAST taraması sonucu klon-38'e benzer olarak bulunan insan klonları	36
Çizelge 3.2. FLJ90024'ün kodladığı dört proteinin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları	42
Çizelge 3.3. Proteinlerin PRINT databazı ile belirlenen fonksiyonel motifleri	43
Çizelge 3.4. FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerdeki muhtemel fosforilasyon bölgeleri	46
Çizelge 3.5. FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerdeki muhtemel N ve O glikozilasyon bölgeleri	46
Çizelge 3.6. Transformasyon sonuçları	49



SİMGELER DİZİNİ

AP-1	Aktivatör Protein -1
cDNA	Komplementer DNA
CRM	Sitokin Reseptör Modülü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECP	Eozinofil Katyonik Protein
EPO	Eozinofil Peroksidaz
ERK	Hücre Dışı Sinyali Düzenleyici Kinaz
EST	Eksprese Edilen Sekans Parçaları
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör
GPCR	G Proteine Bağlı Reseptör
IL-13	İnterlökin-13
IL-3	İnterlökin-3
IL-4	İnterlökin-4
IL-5	İnterlökin-5
IL-5R	İnterlökin-5 Reseptörü
IL-9	İnterlökin-9
JAK	Janus Kinaz
MAPK	Mitojenleri Aktifleştiren Protein Kinaz
MAPKAP	MAP Kinazı Aktifleştiren Kinaz
MAPKK	Mitojenleri Aktifleştiren Protein Kinaz Kinaz
MAPKKK	Mitojenleri Aktifleştiren Protein Kinaz Kinaz Kinaz
MBP	Temel Bazık Protein
MCS	Plazmid Klonlama Bölgesi
MNK	MAP Kinaz ile Etkileşen Kinaz
MRNA	Mesajcı RNA
PAF	Platelet aktifleştiren Faktör
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDK	Fosfoinositide Bağlı Kinaz
PI3K	Fosfoinositid 3 kinaz
PKB	Protein Kinaz B
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RNA	Ribonükleik Asit
RSK	Ribozomal S6 Kinaz
SH	Sark Homoloji Domeyni
STAT	Sinyal Üretici Transkripsiyon Aktivatörleri
TAD	Transkripsiyonu Aktifleştiren Domeyn

1. KURAMSAL TEMELLER**1.1. Astım**

Astım, gerek çocuklarda, gerekse de yetişkinlerde birçok klinik belirti ile seyreden solunumla ilgili kompleks bir hastalıktır. Son 10 yıl içerisinde astımın yaygınlığının bütün dünyada arttığı ve oransal olarak gelişmiş ülkelerin toplam nüfuslarının %10'undan fazlasını etkiler bir duruma geldiği bildirilmektedir (Beasley ve ark., 2000). Bu hastalıktan dolayı görülen ölüm vakaları yaygın olmamakla beraber son yıllarda ağır seyreden hastalık durumları yüzünden ölüm vakalarının sayısında artış olduğu rapor edilmektedir (Papiris ve ark. 2002).

Astım tedavisi için günümüzde β agonistleri, ofilin ve lökotrien antagonistleri gibi ilaçlar kullanılmasına rağmen ağır astım hastaları için en iyi tedavi steroid ilaçlar ile sağlanmaktadır (Kayaalp, 2000). Steroid ilaçlar; astımda rol alan çeşitli sitokin genlerinin transkripsiyonunu etkileyen nükleer faktör κ B (NF κ B), STAT ve Aktivatör Protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek immün inflamatuvar cevabı ayarlamak suretiyle görev yapmaktadırlar. (Barnes ve Adcock, 1998). Steroid ilaçlar ağır astım hastalarının tedavisinde etkili ve yaygın olarak kullanılmalarına rağmen özellikle çocuklarda bağışıklığın zayıflatılması ve yetersiz kemik gelişimi gibi önemli yan etkilere de sahiptirler. Bu gibi ağır yan etkilerinden dolayı steroid ilaçların tedavide kullanılmasına pek çok kişi şüphe ile bakmaktadır.

Astım hastalığında temel anormallik solunum yolunun mukoza tabakasının kronik olarak iltihaplanmasıdır. Bu olay solunum yolunun tıkanmasına neden olmaktadır (Denburg, 1996). Çoğu durumda astıma bağlı olan solunum yolunun iltihaplanması olayı anormal immün cevap sonucunda meydana gelir. Bu anormal immün cevap CD4⁺ TH2 hücrelerinin baskın olması ile belgindir (Wills-Karp, 1999). TH2 hücrelerinin salgıladığı sitokinler astımdaki solunum yolunun kronik

olarak iltihaplanmasının gerek başlaması ve gerekse de sürdürülmesinde temel bir rol oynamaktadır (Chung ve Barnes, 1999).

Astım patogeneğinde sayısı artan en önemli hücre tipi eozinofildir. Astım hastalarının akciğerlerinde eozinofil oranı çok artmıştır ve buradaki eozinofiller aktifleşmiş durumdadır.

1.2. Eozinofiller

Eozinofiller, toplumda yaygın olarak bulunan astım, alerji ve parazitik hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadırlar (Middleton ve ark., 1998). Bu hücreler kemik iliğinde miyeloid öncü hücrelerden köken alırlar ve uygun sitokin aktivasyonu ile olgunlaşp dolaşıma katılırlar (Barnes, 2001). Sağlıklı kişilerde bu hücrelerin kandaki oranları tüm lökositlerin %2–3'ü kadardır. Ancak alerjik durumlarda hem dokularda hem de kanda eozinofillerin düzeyi artmaktadır (Rothenberg, 1998). Aynı şekilde astım nöbetleri esnasında eozinofillerin akciğerlerde toplandığı belirlenmiştir (Rothenberg, 1998). Astımda eozinofillerin bronşiyal mukozada toplanması mukusun aşırı salgılanmasına ve salgılanan mukusun birikmesine neden olmaktadır (Filipović ve Cekić, 2001). Ayrıca astımın şiddeti ile akciğerde toplanan eozinofillerin miktarı arasında ciddi bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Papisir ve ark., 2002).

Eozinofiller içerdikleri granüllerde ECP (eozinofil kationik protein), MBP (temel bazik protein), EPO (eosinofil peroksidaz) ve PAF (platelet aktifleştirici faktör) gibi bir sürü reaktif molekülleri bulundururlar. Bu granüller aktifleştiklerinde içlerindeki reaktif moleküller eksositoza benzer bir şekilde dokuya salınır ve dolayısıyla doku hasarına ve inflamatuara neden olurlar (Sanderson, 1992). Eozinofillerin farklılaşması, yaşaması ve aktifleşmesi için en önemli faktör TH2 hücreleri tarafından salınan İnterlökin-5 (IL-5)'dir.

1.3. İnterlökin 5 (IL-5)

İnterlökin-5 IL-4, IL-9 ve IL-13 gibi Th2 tip bir sitokindir (Barnes, 2001). IL-5 T hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri tarafından salgılanır (Rothenberg, 1998). IL-5 IL-3 ve granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) eozinofillerin büyümesi, farklılaşması ve yaşamlarını sürdürmelerinde rol almaktadırlar. IL-3 ve GM-CSF diğer lökositler için olduğu gibi eozinofillerin de ilk dönem farklılaşmalarını uyarırken, IL-5 eozinofillerin son dönem farklılaşmalarını uyarmaktadır (Denburg, 1996). IL-5 astım patogeneğinde rol alan en önemli sitokin olarak bilinmektedir (Barnes, 2001). Bu hastalarda IL-5 miktarındaki artış olduğu gerek bronkoalveolar sıvı (BAL)'da gerekse de biyopsi örneklerinde hem mRNA hem de proteinin miktarındaki artış ile belirlenmiştir. IL-5'in düzeyindeki artış hipereozinofiliya'nın gelişmesine neden olmaktadır (Greenfeder ve ark., 2001).

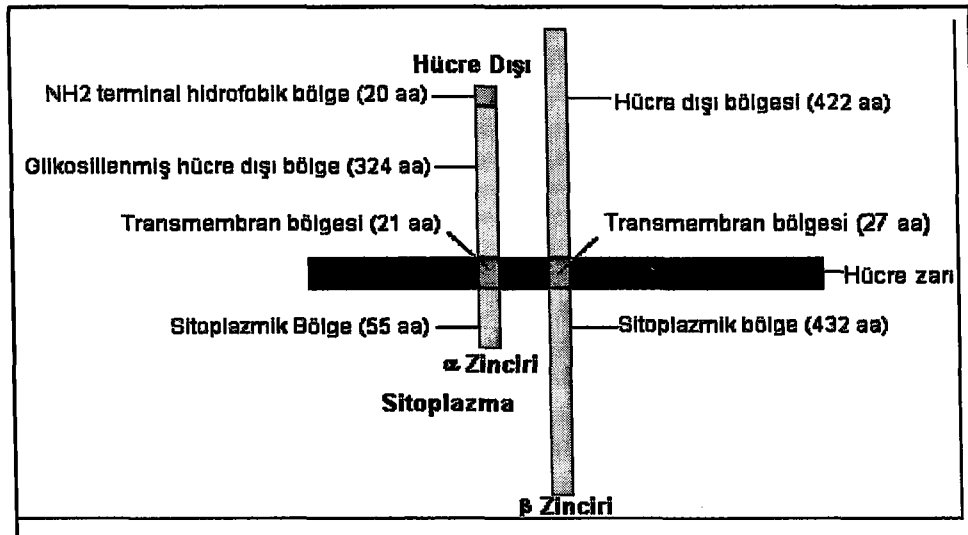
İnsan IL-5 geni 5. kromozom üzerine yerleşmiştir ve 5 eksondan oluşmuştur (Kotsimbos ve Hamid, 1997). İnsanda olgun IL-5 molekülü her bir monomeri 115 aminoasit'ten meydana gelen ve ağırlığı 12 kd olan birbirine disülfid bağı ile bağlı homodimerik bir glikoproteindir (Sanderson, 1992; Kotsimbos ve ark., 1997). IL-5 biyolojik etkisini hedef hücrelerin üzerinde bulunan kendi reseptörüne (IL-5R) bağlanarak gösterir.

1.4. İnterlökin 5 Reseptörü (IL-5R)

IL-5 reseptörü (IL-5R) baskın olarak eozinofiller üzerinde bulunmakla beraber bazofiller, mast hücreleri ve B lenfositleri üzerinde de bulunmaktadır (Migita ve ark., 1991). İnsan IL-5R'ü 60 kd'luk bir alfa (α) alt ünitesi ile 130 kd'luk bir beta (β) alt ünitesinden meydana gelen bir heterodimer komplekstir (Lopez ve ark., 1991). Reseptörün α alt ünitesi IL-5 reseptörüne özeldir ve spesifik ligand bağlanması özelliğine sahiptir. β alt ünitesi ise IL-5, IL-3 ve GM-CSF tarafından ortak olarak kullanılmaktadır ve α alt ünitelerinin kendi ligandları ile olan bağlarını kuvvetlendirmektedir (Takaki ve ark., 1993).

IL-5R'ü IL-3 ve GM-CSF reseptörleri gibi I. sınıf sitokin reseptör familyasına aittir ve sitokin reseptör modülleri (CRMs) denilen korunmuş hücre dışı domeynler içermektedir (Bazan, 1990). Her bir CRM iki tane Fibronektin tip III'e benzer domeyn (Fibronectin Type III Like Domain) içermektedir. Bu kısımların her biri reseptörün bu familyasına özgü iki motif taşır. İlk motif dört sistein aminoasidini içeren bir yapıdır. İkincisi ise WSXWS (Triptofan – Serin – X – Triptofan – Serin) motifidir (Guthridge ve ark., 1998). Bu motiflerin işlevsel reseptörlerin ligandlara bağlanması ve hücre içerisinde gerekli sinyallerin oluşması için önemli olduğu tahmin edilmektedir.

İnsanda IL-5R'ün α alt ünitesinin geni üçüncü kromozom üzerinde (Tuypens ve ark., 1992), β alt ünitesinin geni ise yirmi ikinci kromozom üzerinde bulunur (Miyajima ve ark., 1992). IL-5 reseptörünün α alt ünitesi 20 aminoasitlik NH₂ terminal hidrofobik bölge, 324 aminoasitlik glikozillenmiş hücre dışı bölge, 21 aminoasitlik transmembran kısım ve 55 aminoasitlik sitoplazmik kısımdan oluşan toplam 420 aminoasit'ten meydana gelen bir polipeptit'dir (Murata ve ark., 1992). IL-5 reseptörünün β alt ünitesi ise 422 aminoasitlik hücre dışı kısmı, 27 aminoasitlik transmembran kısmı ve 432 aminoasitlik sitoplazmik kısım ile toplam 871 aminoasitten meydana gelen bir polipeptit'dir (Kitamura ve ark., 1991) (Şekil 1.1).

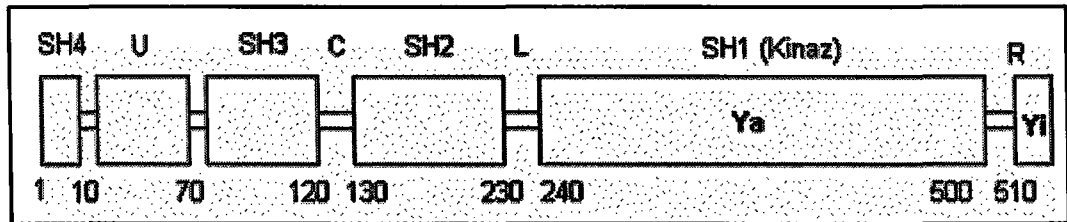


Şekil 1.1. IL-5 reseptörünün şematik yapısı

1.5. IL – 5 Reseptörü İle Sinyal İletimi

Sinyal iletiminde ilk adım IL-5'in reseptörüne bağlanmasıdır. Bu bağlanma reseptörün daha önce ayrı olan α ve β alt ünitelerinin dimerizasyonunu sağlar. Bu dimerizasyon IL-5 ve IL-5R'ünün yüksek affiniteli bağlanması ve bunun sonucunda reseptörün aktivasyonu için zorunludur (Heldin, 1995). IL-5R'ü üç önemli sinyal yolunu aktifleştirir. Bunlar JAK/STAT, MAP Kinaz ve PI3 Kinaz yollarıdır. (Guthridge ve ark., 1998). IL-5 reseptörüne bağlı sinyal iletimi için reseptörün hem α hem de β zincirlerinin sitoplazmik kısımları önemli görev görmektedir (Sakamaki ve ark., 1992; Cen ve ark., 2003; Gorska ve ark., 2004) Bununla birlikte özellikle α zincirinin mekanizmasıyla ilgili çok az şey bilinmektedir (Cen, 2001).

IL-5'in IL-5R'üne bağlanması ile hemen aktifleşen ve eozinofillerde sinyalin oluşmasında önemli bir enzim Lyn kinazdır. Lyn Src ailesi tirozin kinazların bir üyesi olup dört domeyn'den oluşmuştur (Şekil 1.2). Bunlar sıra ile kinaz (SH1 = Src homology 1 veya kinaz domeyni), SH2, SH3 ve özgül (unique) domeynlerdir. En başta da asilasyon kısmı vardır ki bu kısım bir domeyn olmamasına rağmen bazen SH4 olarak ta bilinir.



Şekil 1.2. Lyn kinaz molekülünün yapısı (Cen, 2001)

SH4 domeyni bağlandığı yağ asitlerinin membranın içine yerleşmesi ile Lyn'in membranın hemen alt yüzeyinde reseptörler ile beraber olmasını sağlar. Özgül domeyn SH4 ve SH3 domeynleri arasında yer alır. Bu domeyn Src tirozin kinazlar arasında en fazla farklılık gösteren kısımdır. Bu bölge birçok reseptörle kinazın etkileşiminden sorumludur. SH2 ve SH3 domeynleri protein – protein etkileşimlerini sağlar. SH1 katalitik domeyndir ve spesifik tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. C

bölgesi fosforilasyon ve defosforilasyon yoluyla tirozin kinaz aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur (Cen, 2001).

Diğer reseptörlerin sinyal iletim işlemlerinde olduğu gibi IL-5 ile sinyal iletimi de tipik olarak dört adımdan oluşmaktadır (Adachi ve Alam, 1998). Bu adımlar

1. Jukstamembranöz adım (The Juxtamembranous Signaling Step)
2. Sinyal ara adım (Signal-Interfacing Step)
3. Mobil sinyal adımı (Mobile Signaling Step)
4. Transkripsiyon aktivasyon adımı (transcription-activating step)

Jukstamembranöz sinyal adımı, reseptörün α ve β alt ünitelerinin spesifik sitoplazmik bölgelerinde JAK2, Lyn ve Fes gibi tirozin kinazların aktivasyonu aşamasıdır. JAK2 (Brizzi ve ark., 1996), Lyn (Li ve ark., 1995) ve Fes (Brizzi ve ark., 1996) kinazlar fiziksel olarak reseptörün β zinciri ile bağlantılıdır. Ligand reseptöre bağlandığında oluşan Ligand-Reseptör kompleksleri bir araya gelip daha büyük kompleksler oluştururlar. Bu büyük komplekslerdeki kinazlar birbirlerini ve reseptörleri fosforlaştırarak aktifleştirirler. Reseptör ve kinazlara bağlı bazı proteinler bu aktifleşmeyi düzenler. Örneğin UNC119 içerdiği SH2 ve SH3 motifleri aracılığıyla reseptöre ve bazı tirozin kinazlara bağlanabilmektedir. UNC119 bu bağlanmalarla Lyn gibi jukstamembranöz adımda görev gören enzimlerin aktifleşmesini uyarmakta ve bu şekilde büyüme faktörlerinin varlığında hücrenin hayatta kalmasını uyarmaktadır (Cen ve ark., 2003).

Sinyal ara adım, jukstamembranöz adımdan sonra gelen adımdır. Bu adımda SHC, SHP2 ve GRB2 gibi adaptör proteinler görev görmektedir. Tirozin kinazlar tarafından β zincirinin tirozin aminoasidi üzerinden fosforilasyonu adaptör proteinleri de içeren birçok sinyal molekülü için bir bağlanma bölgesi yaratır. Bu proteinler içerdikleri SH2 (Src Homology-2) veya PTB (Fosforlanmış Tirozinleri Bağlayan) domeynleri aracılığıyla β zincirine bağlanabilmektedir. Adaptör proteinler sitosolik sinyal molekülleri için bir yanaşma bölgesi görevi görürler ve Jukstamembranöz

kısımda aktifleşen tirozin kinazların (ör. Lyn) substratı olacak diğer proteinlerin (ör. Ras, Rac) aktifleşmesini sağlayacak bağlantıyı kurarlar.

Mobil sinyal adımında, ara adımda görev gören adaptör proteinler ve GTPaz' lar tarafından gelen uyarılarla G proteinleri aktifleştirilmektedir. Aktifleşen bu moleküller sinyali alarak hedef bölgelere iletmektedirler. Ancak bu adımdaki sinyalin hedef bölgelere taşınması olayının mekanizması henüz çok iyi aydınlatılmamıştır. Bu adımda aktifleşen G proteinlerin en çok bilineni Ras'tır. Ras MAP kinaz yolunda önemli bir molekül olan Raf-1 kinazı fosforlayarak aktifleştirir. Raf-1 bu bölgede MAP kinaz yolunun bir üyesi olan ERK molekülünün aktivasyonunu düzenlemektedir.

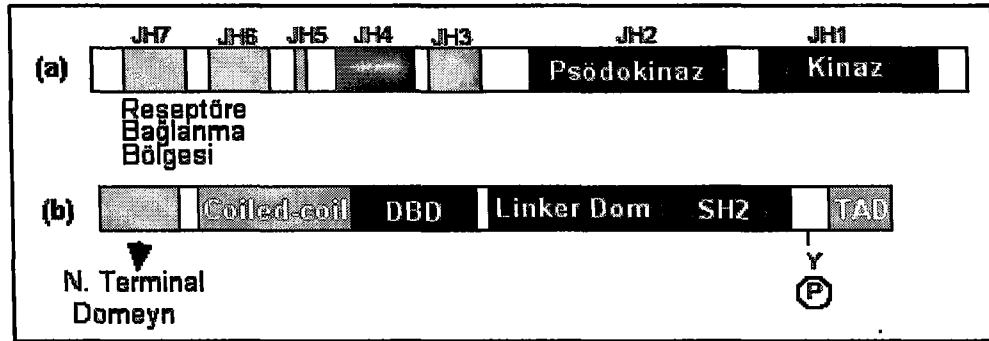
1.5.1. JAK / STAT yolu

Janus Kinaz (JAK)'lar reseptörlerin sitoplazmik kısımlarına bağlı katalitik aktivitesi olan tirozin kinazlardır. Memelilerde JAK ailesinin dört üyesi bulunmaktadır. Bunlar Jak1, Jak2, Jak3 ve Tyk2'dir (Liu ve ark, 1998). IL-5R ile ilişkide olan tip Jak2'dir. JAK kinazlar 120-130 kd ağırlığında yaklaşık olarak 1150 aminoasit uzunluğunda olup yedi domeynden meydana gelen büyük moleküllerdir. Bu moleküllerin COOH ucundaki ilk domeyn kinaz domeyni olup katalitik aktiveye sahiptir (Şekil 1.3a). İkinci domeyn ise katalitik aktivitenin düzenlenmesinde önemli olan psödokinaz'dır. Bu domeyn ayrıca STAT proteinleri için bir bağlanma noktası olarak da görev yapmaktadır. Bu iki domeyn'den sonra gelen bölgeler çok iyi çalışılmamıştır ancak altıncı ve yedinci domeynlerin reseptöre bağlanma ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Ortmann ve ark., 2000) (Şekil 1.3a).

STAT (signal transducers and activators of transcription) familyası yedi üyeden (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b ve Stat6) meydana gelen ve sitokin reseptörü ile sinyal iletiminde görev alan transkripsiyon faktörleridir. Bu moleküllerden STAT3, STAT5a ve STAT5b çok farklı sitokinler tarafından aktifleştirilebilmektedir. IL-5 molekülü de bu familyanın STAT 5a/b üyelerini

aktifleştirmektedir. Bununla birlikte STAT1, STAT2, STAT4 ve STAT6 özel sitokinler tarafından aktifleştirilmektedir.

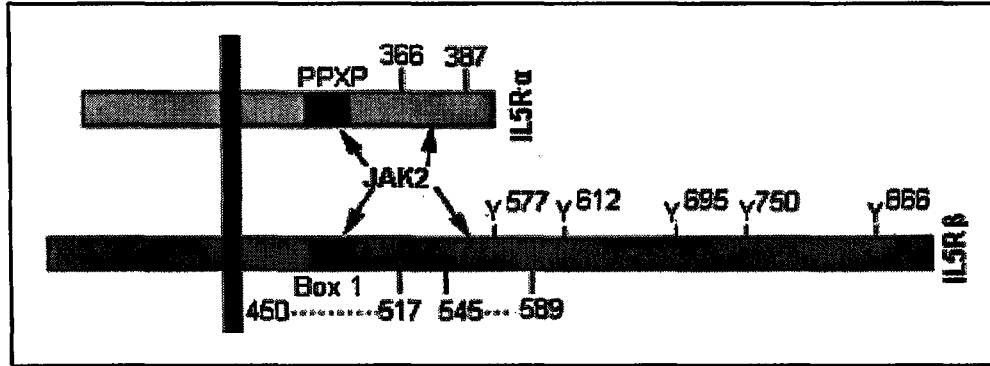
STAT proteinleri 750–850 aminoasit uzunluğunda olup altı domeynden meydana gelmektedirler (Takeda ve Akira, 2000) (Şekil 1.3b). Amino ucundaki N-terminal domeyn dimerizasyon domeyni olarak bilinir. İkinci bölge Coiled-coil domeynidir ve dört α heliksten meydana gelmektedir. STAT molekülü aktifleştiginde bu bölge transkripsiyon faktörleri ile bağlantı kurmaktadır. Bunun dışında bu domeynin STAT'ların reseptöre bağlanmasında ve tirozin fosforilasyonunda da görev aldığı düşünülmektedir. Üçüncü bölge DNA'ya bağlanma domeynidir. Bu bölge DNA'ya TTCNNGAA motifi üzerinden bağlanıp transkripsiyon görevini yerine getirmesini sağlamaktadır. Dördüncü bölge linker domeyni olup transkripsiyonel düzenlemede görev almaktadır. Beşinci bölge SH2 domeynidir ve sinyal iletiminde çok önemlidir. Çünkü SH2 domeyni aracılığıyla STAT molekülleri JAK moleküllerine bağlanabilmekte ve fosforlanarak sinyal iletimini yapabilmektedirler. Yedinci bölge transkripsiyon aktivasyon domeynidir. Bu bölgenin Serin fosforilasyonu ile transkripsiyonu arttırdığı düşünülmektedir (Kisseleva ve ark., 2002) (Şekil 1.3b).



Şekil 1.3. JAK (a) ve STAT (b) moleküllerinin yapısı (Kisseleva ve ark., 2002)

JAK ve STAT moleküllerinin IL-5 reseptörüne bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. JAK molekülleri IL-5 reseptörünün hem α hem de β zincirlerine ikişer bölgeden bağlanırlar. Bu bağlanmalarda β zincirinde bulunan box-1 isimli proline

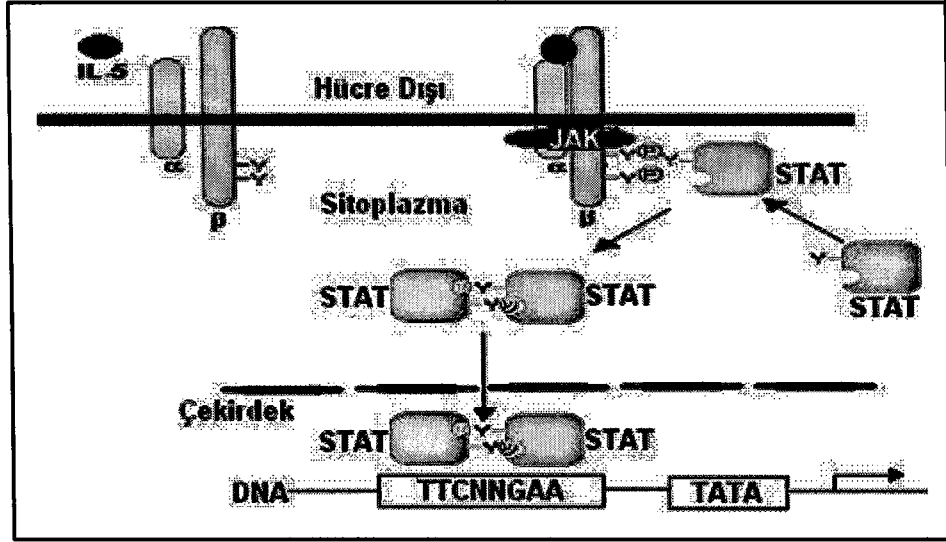
zengin bölge büyük önem taşımaktadır. α zincirinde de box-1'e benzeyen proline zengin bir bölge bulunmaktadır. JAK molekülü reseptörün bu bölgelerine bağlanarak sinyalin oluşmasını sağlar (Adachi ve Alam, 1998) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. IL-5 reseptöründe JAK molekülünün bağlanma yerleri (Adachi ve Alam, 1998)

JAK/STAT yolunda sinyal iletiminde diğer yollarda olduğu gibi ilk aşama reseptörün liganda bağlanmasıdır. Reseptör liganda bağlandıktan sonra dimerleşir ve böylece reseptörün hücre içi kısımlarına bağlanmış olan JAK molekülleri aktifleşir (Quelle ve ark., 1994). Aktifleşen JAK reseptörün β alt ünitesini tirozin üzerinden fosforlayarak aktifleştirir. Bu fosforlanan tirozinler SH2 domeynini içeren proteinler için bir bağlanma bölgesi olarak görev görürler. STAT da SH2 domeyni ile reseptörün β alt ünitesinin fosforlanan kısımlarına bağlanabilir (Pawson ve Scott, 1997).

STAT molekülleri reseptöre bağlandıktan sonra JAK molekülleri tarafından fosforlanıp aktifleştirilirler. Aktifleşen STAT molekülleri homodimer veya heterodimer şeklinde düzenlenerek hücre çekirdeğine geçer ve burada transkripsiyon faktörü görevini yerine getirirler (Itoh ve ark., 1998) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. JAK/STAT yolu (Leonard ve O'shea, 1998)

1.5.2. Map kinaz yolu

MAP kinaz yolunda sinyal iletiminde ilk adım reseptörün β zincirindeki proteinlerin fosforilasyonu ve adaptör proteinler aracılığıyla sinyalin MAP kinaz'lara iletilmesidir. MAP Kinaz yolu üçlü bir kinaz döngüsü ile kontrol edilmektedir. Bu döngünün elemanları şunlardır.

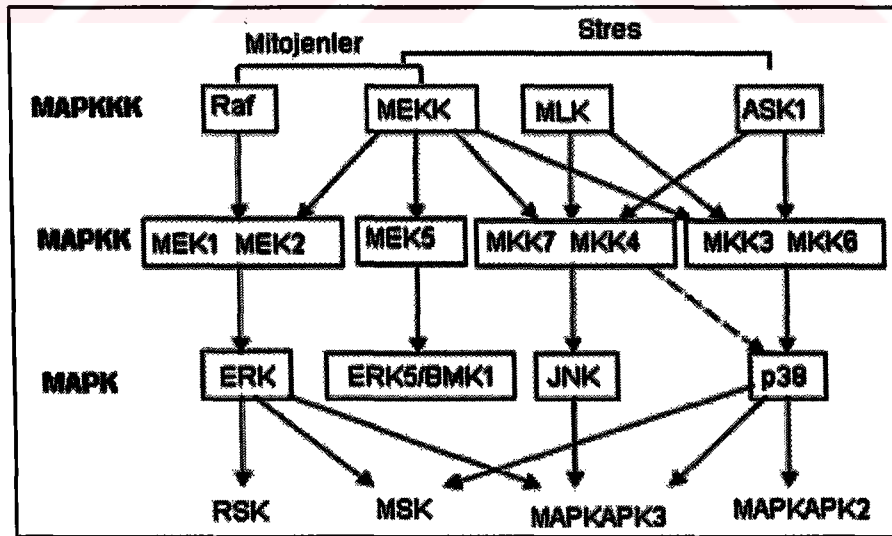
1. MAP Kinaz Kinaz Kinaz (MAPKKK)
2. MAP Kinaz Kinaz (MAPKK)
3. MAP Kinaz (MAPK)

MAPK yolunda sinyali ilk alan moleküller MAPKKK'dır. Stres veya mitojenik uyarılar ile farklı MAPKKK molekülleri uyarılmaktadır (Şekil 1.6). Bu moleküller serin ve treonin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile MAPKK moleküllerini aktifleştirirler. Aktifleştirilen bu MAPKK molekülleri treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile MAPK moleküllerini aktifleştirirler (Yang ve ark., 2003). Her MAPK molekülü ancak özgül bazı MAPKK'lar tarafından aktifleştirilebilirler (Chang ve Karin, 2001) (Şekil 1.6).

Memelilerde MAP kinaz yolunun dört önemli grubu vardır (Kyriakis ve Avruch, 2001). Bunlar

1. Hücre Dışı Sinyali Düzenleyen Kinaz 1 – 2 (ERK 1-2)
2. c-Jun N-terminal kinaz (JNK)
3. P-38
4. Hücre Dışı Sinyali Düzenleyen Kinaz -5 (ERK-5 veya BMK-1)

MAP kinazlar minimal fosfoakseptör adı verilen motifi içeren proteinleri doğrudan fosforlayabilirler. Bu motif Ser/Thr-Pro aminoasitlerinden meydana gelmektedir. Fosforilasyon sitoplazmada veya çekirdekte meydana gelebilir ve hedef moleküller de transkripsiyon faktörleridir. MAP kinazlar bunlara ek olarak başka protein kinazları da fosforlayabilirler. Bunların başlıcaları RSK, MNK, MAPKAP ve MSK familyası proteinleridir. Bu proteinlerin çoğu transkripsiyon düzenleyici proteinlerin ve histonların fosforlanmasıyla gen ekspresyonunu düzenlemektedirler (Kyriakis ve Avruch, 2001) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. MAP Kinaz Yolunun Organizasyonu (Yang ve ark., 2003)

1.5.3. PI3 kinaz yolu

Fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) molekülleri 110 kilodalton (kd)'dan oluşan bir katalitik alt ünite (p110) ile 85 kd'dan meydana gelen bir adaptör alt ünite (p85)'den meydana gelen heterodimerlerdir. Regülatör p85 alt ünitesi bir adet SH3 domeyni, iki tane proline zengin bölge ve iSH2 (inter SH2) sekansı ile birbirine bağlanmış olan iki tane SH2 domeyni içermektedir. iSH2 domeyni katalitik ve regülatör alt üniteleri arasındaki etkileşimi sağlamaktadır. SH2 domeynleri p85/p110 heterodimerinin reseptör ve reseptör olmayan tirozin kinazlar ile bağlanmasından sorumludur. Katalitik p110 alt ünitesi ise protein kinazlara homologdur ve hem serin/treonin protein kinaz ve hem de fosfoinositid kinaz aktivitelere sahiptir (Kapeller ve Cantley, 1994).

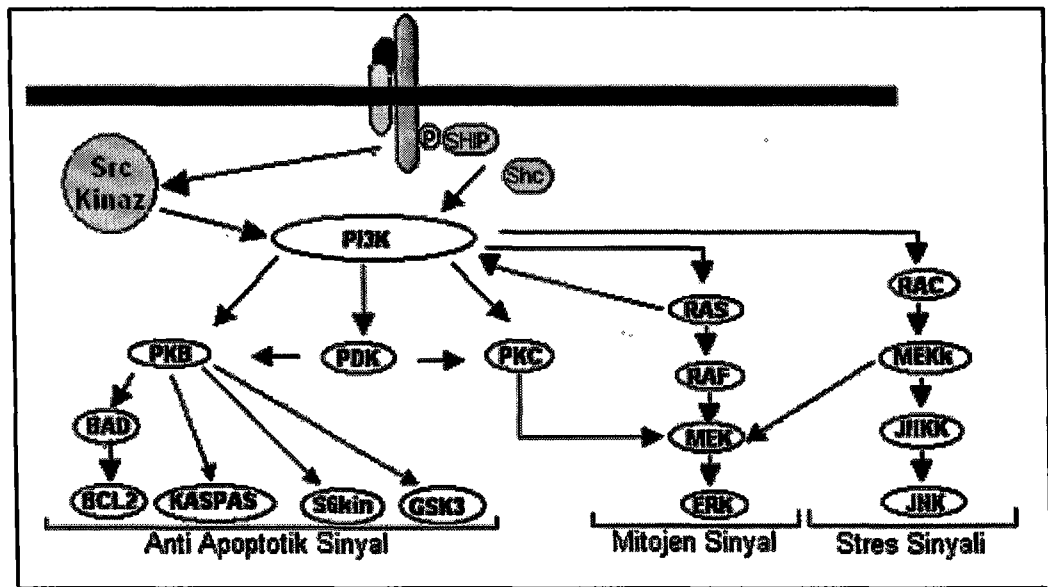
PI3K aktivasyonuna yol açan başlıca iki olay vardır. Birincisi p85/p110 heterodimerinin aktivatör proteinlerle etkileşimidir. Aktivatör proteinler reseptör veya reseptör olmayan tirozin kinazlar olabilir. PI3K regülatör alt ünitelerinin SH2 domeynleri ile aktivatör proteinlerin fosforlanmış tirozin bölgelerine bağlanması enzim aktivasyonuna yol açan heterodimerin konformasyonel değişimine neden olur (Yu ve ark., 1998). İkinci aktivasyon şekli ise PI3K moleküllerinin katalitik alt üniteleri ile sitoplazmadaki bazı proteinlerin doğrudan etkileşimi ile olmaktadır. Böyle bir aktivasyona iyi bir örnek PI3K molekülünün katalitik alt ünitesi olan p110'un p21-Ras molekülü ile etkileşimidir (Backer ve ark., 1992).

PI3K sinyal yolu hücrede meydana gelen birçok metabolik olayda rol alan bir yoldur ve bu yol ile çeşitli koşullar altında farklı mekanizmaların tetiklendiği bilinmektedir. PI3K yolu ile sinyal iletiminde en az iki muhtemel mekanizma vardır. Bunlardan birincisi PI3K'ın lipid kinaz aktivitesi, ikincisi ise bazı hücre içi sinyal proteinleri ile PI3K'ın doğrudan etkileşimi temellerine dayanmaktadır (Katso ve ark., 2001).

Birinci sinyal iletim mekanizması PI3K moleküllerinin lipid kinaz aktiviteleri üzerine temellenmiştir. Fosfoinositidlerin hücre faaliyetlerindeki rolleri hücre

bölünmesi esnasında reseptör tirozin kinazlar tarafından aktifleştirilen fosfolipaz C (PLC)'nin substratları olma temeline dayanmaktadır. PLC'nin hareketiyle fosfoinositidlerin hidroliz ürünü olan diaçil gliserol ve inositol fosfat moleküllerinin hücrede konsantrasyonu arttığı zaman PKC aktifleşir. PKC'nin aktifleşmesi diaçil gliserol ile doğrudan bağlanma şeklinde olabileceği gibi PI3K'ın lipid ürünleriyle etkileşim yoluyla da olabilmektedir. PI3K'ın lipid ürünleriyle aktifleşen bir başka molekül grubu da fosfoinositide bağlı kinazlar (PDK)'dır. PDK molekülleri protein kinaz B (PKB) ve protein kinaz C (PKC) moleküllerini de içeren bir grup sinyal iletiminde görevli protein kinazların aktifleşmesi için bunların fosforilasyonundan sorumludur (Krasilnikov, 2000) (Şekil 1.7).

İkinci sinyal iletim mekanizması PI3K moleküllerinin bazı hücre içi sinyal proteinleri ile doğrudan etkileşimi ve PI3K moleküllerin lipid kinaz aktiviteleri dışındaki protein kinaz aktivitelerinin olması temeline dayanmaktadır. Yapılan *in vivo* deneylerde p85/p110 heterodimerinin p21-Ras ve Rac gibi bazı tirozin kinazları da içeren hücre içi moleküllerle kompleks oluşturduğu belirlenmiştir. Bunun dışında PI3K'ın Ras/Raf/ERK sinyal yolunun uyarılmasında zorunlu olduğuna yönelik sonuçlara da varılmıştır (Krasilnikov, 2000) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. PI3K yolu ile sinyal iletimi (Krasilnikov, 2000)

1.6. Maya İkili Hibrid Sistemi

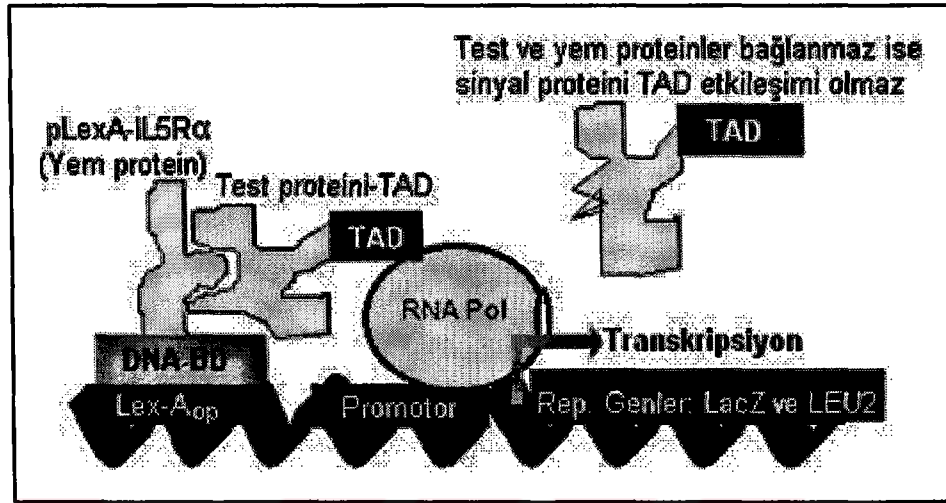
Hücre içi sinyal iletiminde görev alan moleküllerin belirlenmesinde oldukça hassas ve kesin sonuçlar verecek sistemlere gereksinim vardır. Çünkü bu moleküllerin hücredeki yoğunluğu pek fazla olmayabilir. Hücre içerisinde birbiri ile bağlantı kuran proteinlerin tespiti için kullanılan en etkili yöntemlerden biri maya ikili hibrid sistemi (yeast two hybrid system)'dir.

Maya ikili hibrid sistemi protein-protein bağlantılarını tespit etmede kullanılan oldukça karmaşık bir moleküler biyoloji metodudur. Bu sistem ilk olarak 1989 yılında Fields ve Song isimli araştırmacılar tarafından bulunup laboratuvarlarda uygulanmaya başlanmıştır (Fields ve Song, 1989). Maya ikili hibrid sistemi temelde gerek iki proteinin birbirine bağlanıp bağlanmadığını test etmek ve gerekse de ilgilenilen bir proteine bağlanan diğer bilinmeyen proteinleri keşfetmek amacıyla kullanılabilen bir sistemdir. Bu sistemde ilgilenilen proteinlerin cDNA'ları ilgili plazmidlere klonlanır ve maya hücrelerine aktararak test edilir (Gyuris ve ark., 1993; Golemis ve ark., 1996).

Maya ikili hibrid sisteminde konak olarak maya hücreleri kullanılmakta ve Maya hücreleri içerisine yerleştirilmek üzere iki tane farklı domeynlere sahip ekspresyon plazmidleri ile bir tane de reporter plazmid kullanılmaktadır. Kullanılan birinci ekspresyon plazmid DNA'ya bağlanacak olan bir domeyn (DNA-BD), ikinci plazmid ise RNA Polimeraza bağlanacak bir transkripsiyon aktivasyon domeyni (TAD) içermektedir.

DNA'ya bağlanacak domeyni taşıyan plazmidin içine yem (bait) olarak tarif edilen araştırılan bir proteinin geni eklenir. RNA Polimeraza bağlanacak domeyni içeren plazmidde ise test edilecek proteini kodlayan gen eklenir. Bu şekilde DNA-BD rekombinant proteini reporter genin DNA üzerinde uygun operatör bölgesine bağlanırken buna bağlı ve yem olarak bilinen protein serbest kalmaktadır. Şayet bu yem proteini TAD plazmidindeki test edilen proteine bağlanıyorsa TAD domeyni RNA Polimeraza bağlanıp onu promotere yakın tutacaktır. Bu durumda reporter

genlerin transkripsiyonu başlatılabilecektir (Coates ve Hall, 2003). Maya ikili hibrid sisteminin çalışma mekanizması şekil 1.8’de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.8. Maya ikili hibrid sistemi (Cen, 2001)

Maya ikili hibrid sistemi biyokimyasal tekniklerle belirlenemeyen zayıf veya geçici protein-protein bağlanmalarını tespit edebilmesinden dolayı avantajlı bir sistemdir. Ayrıca bu sistem ile tek bir aminoasitten kaynaklanan mutasyonları da tespit etmek mümkündür. Sistemin çok hassas olmasının getirdiği bazı dezavantajlar da vardır. Çünkü bu kadar hassas çalışma yanlış pozitif veya negatif sonuçları da verebilmektedir. Bu yanlış sonuçları en aza indirmek için iki tane reporter gen kullanılmakta ve ancak bu iki genin aktifleşmesi ile sonucun doğru olduğuna kanaat getirilmektedir.

1.7. DNA Klonlaması

DNA klonlanmasında temel strateji ilgili bir DNA sekansının vektör olarak isimlendirilen bir DNA segmenti içerisine yerleştirilmesidir (Griffiths ve ark., 1999). Bu yöntem kullanılarak tıbbi veya ekonomik değeri olan bir ürünün hücrede sentezlenmesi sağlanabilir. DNA klonlamasında kullanılacak DNA segmenti genomik bir DNA parçası olabileceği gibi revers transkriptaz enzimi aracılığıyla

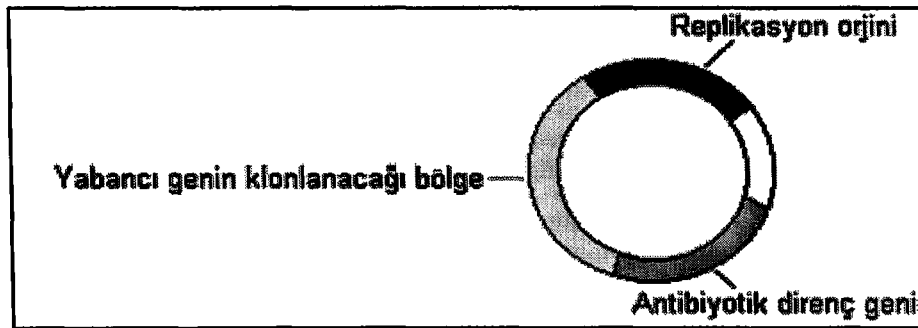
RNA'dan DNA'ya çevrilmiş bir komplementer DNA (cDNA) sekansı veya PCR ile çoğaltılmış herhangi bir DNA parçası da olabilir.

Klonlamada en yaygın olarak kullanılan vektörler plazmidlerdir. Plazmidlerden başka amaca göre bakteriyofaj, virüs, kozmid veya yapay kromozomlar da kullanılmaktadır.

1.7.1. Plazmidler

Plazmidler, hücre içerisinde kendi kendine çoğalabilme yeteneğindeki küçük, halkasal ekstra kromozomal DNA molekülleridir. Plazmidler yaygın olarak klonlama vektörü olarak kullanılmaktadır (Lodish ve ark, 2000). DNA klonlamasında kullanılan plazmidler doğal veya rekombinant moleküller olabilir. Moleküler biyolojide kullanılan plazmidlerde üç önemli özelliğin olması gerekir (Lodish ve ark, 2000) (Şekil 1.9). Bunlar

1. Replikasyon orijini (ori)
2. Antibiyotik direnç geni gibi bir marker bölge
3. Çalışılan DNA'nın yerleştirilebileceği bir klonlama bölgesi (multiple cloning site = MCS)



Şekil 1.9. DNA klonlamasında kullanılan bir plazmidin genel yapısı (Lodish ve ark, 2000)

1.7.2. DNA moleküllerinin plazmidlere klonlaması

Plazmid vektörler ile DNA'nın klonlanması işlemi temel olarak birkaç başlık altına alınabilir (Şekil 1.10). Bunlar

1. Klonlanacak DNA'nın izolasyonu
2. Vektörün DNA kesim (restriksiyon endonükleaz-RE) enzimleri ile kesimi
3. DNA'nın vektör ile birleştirilmesi
4. Oluşan rekombinant molekülün konak hücre içerisine yerleştirilmesi
5. Kültür ortamında hücrelerin çoğaltılması

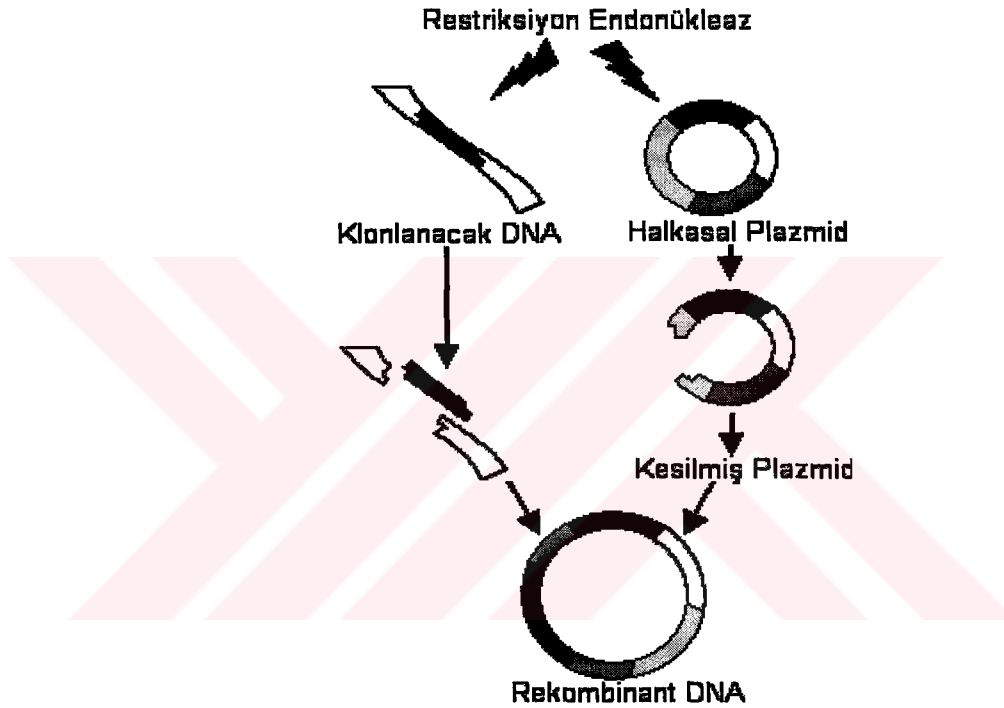
DNA klonlaması için ilk adım DNA'nın saf halde elde edilmesidir. Klonlanacak DNA insana ait bir genomik sekans olabileceği gibi daha önce bir bakterinin plazmidi içerisine yerleştirilmiş cDNA sekansı da olabilir. DNA'nın bulunuş yerlerine göre uygun işlemlerden geçirerek DNA saf olarak hazırlanır.

Klonlanacak DNA ve onun yerleştirileceği vektörün klonlama bölgesi uygun DNA kesim enzimleri (restriksiyon endonükleaz-RE) ile kesilerek yapıştırıcı uçlar elde edilir. Her biri farklı DNA dizilerini tanıyan çok sayıda farklı RE'leri bulunmaktadır. RE enzimleri ile kesilen ve yapıştırıcı uçlu bu DNA parçaları karıştırılarak birbirleriyle uç uca bağlanmaları sağlanır (Griffiths ve ark. 1999).

DNA'nın vektör ile birleştirilmesi için ligaz enzimi kullanılır. Ligaz enzimi vektör DNA ile klonlanacak DNA arasında bağ oluşumunu sağlayarak bunların birleşmesini sağlar.

Rekombinant DNA oluşturulduktan sonraki aşama bu molekülün hücre içerisine yerleştirilmesidir. Bunun için çeşitli yollarla hücrelerin zarlarında geçici bir geçirgenlik değişikliği yaratılarak rekombinant DNA'nın hücre içerisine girmesi sağlanır. DNA'nın hücre içerisine aktarılması olayı bakterilerde transformasyon, yüksek yapılı hücrelerde transfeksiyon olarak adlandırılır.

Rekombinant DNA hücre içine alındıktan sonra hücreler kültür ortamında seçici koşullar altında çoğaltılırlar. Hücreler çoğaldıkları zaman kromozomları ile beraber plazmidler de replikasyona uğrar. Seçici koşullar plazmid alan bakterilerin çoğalmasını sağlarken almayanların ölmesine neden olur. Bu koşullar çoğunlukla bir antibiyotik ilavesi ile sağlanır. Antibiyotik plazmid üzerinde bulunan bir genin ürünü tarafından etkisiz hale getirilerek bu plazmidi içeren hücrelerin yaşamasını sağlar (Griffiths ve ark. 1999).



Şekil 1.10. DNA klonlamanın şematik gösterimi (Griffiths ve ark., 1999' dan yararlanarak çizilmiştir)

1.8. Biyoinformatik

In silico biyoloji veya bilgisayarlı biyoloji olarak da isimlendirilen biyoinformatik; kelime anlamı olarak biyoloji ve informatik kelimelerinin birleşmesinden meydana gelmektedir. Tanımsal olarak biyoinformatik, biyolojik verilerin ortaya çıkarılması ve yorumlanması için bilgisayar araçlarının analizi ve uygulaması olarak tanımlanabilir (Bayat, 2002). Ancak biyoinformatik bununla sınırlı değildir ve daha geniş bir multidisipliner alandır. Bu bağlamda biyoinformatik

biyolojik bilginin elde edilmesi, işlenmesi, depolanması, ayrıştırılması, analizi ve yorumlanmasına klavuzluk eden bir bilimsel disiplindir. (Benton, 1996). Biyoinformatik alan olarak interdisipliner olup bilgisayar, matematik, fizik, kimya ve biyoloji'den yararlanmaktadır (Bayat, 2002).

Biyoinformatik gerek akademik ve gerekse de ticari alanlar için yeni bir bilim dalıdır ve biyolojinin geleceği için ufuklar oluşturmaktadır. Bu bilim dalı fazla ekipman gerektirmediğinden, araştırma ve geliştirmelerin göreceli kolay olması, herkese açık kaynakların bolluğu, hızlı sonuçların alınabilmesi, alınan sonuçların laboratuvarlarda test edilebilecek niteliklerde olması gibi nedenlerle gelecek için düşünüldüğünde heyecan verici bir teknoloji platformudur (Anonymous, 2000).

Biyolojide bilgisayar temelli ilk yaklaşım 1966 yılında protein kristallografisinden elde edilen bilgilerin depolanması ve kullanılması için oluşturulan Protein Databank'tır (Levinthal, 1966). 1970'lerin sonlarına doğru DNA sekanslama metotlarının geliştirilmesi ve özellikle de 1995 yılında insan genom projesinin resmen başlamasıyla elde edilen sekans verileri miktarında olağanüstü bir artış olmuş ve bu verilerin gerek depolanması ve gerekse de analizi ve yorumlanması için bilgisayar temelli yaklaşımlar kaçınılmaz olmuştur. Biyolojik verilerin depolanması, analizi ve yorumlanması noktasında algoritma temelli yaklaşımlar ile biyoinformatik'in interdisipliner bağımsız bir bilim dalı olarak ortaya çıkması yine bu dönemde olmuştur (Ouzounis ve Valencia, 2003).

1990'lı yıllara gelindiğinde kişisel bilgisayarlar ve özellikle de internet yavaş yavaş günlük yaşamımızın bir parçası haline gelmeye başladı. Bilgisayar ve iletişim teknolojilerinde bu gelişmeler olurken biyolojide de hızlı gelişmeler yaşanmaktaydı. 1991 yılında EST'lerin üretilmesi bu ilerlemenin en ayırt edici özelliği oldu (Adams ve ark., 1991). Çünkü EST'ler transkribe edilen genlerin kısmi parçalarıdır ve genomların transkribe edilen kısımları için genel bir fikir vermektedir (Englbrecht ve ark., 2004). EST'lerin geliştirilmesinden yaklaşık olarak dört yıl sonra yani 1995'te bir bakteri olan *Haemophilus influenza*'nın genomunun sekanslanmasıyla ilk kez bir organizmanın bütün genomu sekanslanmış oldu (Fleishmann ve ark., 1995). Bunu

izleyen yıllar içinde *Saccaromyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, insan ve daha onlarca organizmanın genomları sekanslandı. Şu ana kadar yüzden fazla organizmanın genomu sekanslanmış durumdadır (Şekil 1.11).

Biyoloji alanındaki bu gelişmeler bilgisayar ve iletişim teknolojilerindeki gelişmeler ile birleştirilince ikinci nesil biyoinformatik araçlar ortaya çıkmaya başladı. Bu araçlar dünya'nın her tarafındaki araştırmacıların internet üzerinden kolayca kullanılmalarına olanak verirken aynı zamanda verilerin analizi ve depolanması noktasında da eskisine oranla daha güçlü ve daha hassas yapılmasına olanak veriyordu. Bu paralel ilerlemeler sayesinde 90'lı yılların ortalarından itibaren biyoinformatik, biyomedikal bilimlerde gelişme ve araştırmaların ayrılmaz bir parçası haline gelmeye başladı. Böylece bilgisayara dayalı araştırma ve analiz araçları, internet ve büyük kapasiteli databazlar biyologlar için temel araçlar haline geldi (Kaminski, 2000).

2000'li yılların başından itibaren biyoinformatik çalışmaları daha derli toplu yapılmaya ve aynı zamanda belirli başlıklar altında da toplanmaya başlandı. Bu alandaki çalışmalar özellikle 5 konu etrafında toplandı (Zhang, 2002).

1. Prokaryot ve ökaryot organizmaların DNA sekanslarında genlerin belirlenmesi ve ortaya çıkarılması.
2. Proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi
3. Proteinlerin familya ve korunmuş bölgelerinin belirlenmesi.
4. Evrimsel ilişkileri belirlemek için filogenetik ağaçların oluşturulması.
5. Protein sekanslarında sekonder ve tersiyer yapıların belirlenmesi.

Günümüzde deneysel teknolojiler tarafından oluşturulan genomik, transkriptomik ve proteomik verilerin analizi ve yorumlanması ile diğer biyolojik bilimlerden oluşturulan verilerin depolanmasında biyoinformatik temel bir role sahiptir (Kanehisa ve Boork, 2003). Bunun dışında özel genlerin veya proteinlerin analizinde sekans temelli yöntemlerin gün geçtikçe ilerlemesi yanında

birbirine bağı gen kümelerinin tanımlanması veya protein etkileşim networkları gibi büyük miktarda gen veya proteinlerin analizi için de yeni yöntemler geliştirilmektedir (Kanehisa ve Boork, 2003). Genom sekanslaması yapılan organizmaların sayısındaki artış ile beraber biyoinformatik hem organizma ve hücrelerin sistemik fonksiyonel davranışlarını belirlemek için hem de bunlara kavramsal temeller sağlamak için bir başlangıç olabilir (Kanehisa ve Boork, 2003).

Biyoinformatik, databazlar üzerine şekillenmiş bir bilim dalıdır. İlk ortaya çıkış dönemlerinde sınırlı bir sayıda databaza ve çalışma alanına sahip olan biyoinformatik günümüzde artık işin en uzmanlarının bile takip etmekte zorlandığı bir hızla gelişmektedir. Tasarlanan databazlar bir genin yerinin belirlenmesinden herhangi bir proteinin biyokimyasal özelliklerinin tahminine kadar çok çeşitli amaçlara hizmet edebilmektedir. Dr. Michael Galperin tarafından Nucleic Acids Research dergisinde Molecular Biology Database collection: 2004 Update ismiyle yayınlanan yazıya göre (Galperin, 2003) 2003 yılında databaz sayısı bir önceki yıla göre 162 adet artarak 548'e ulaşmıştır. Bu sayı doğal olarak her geçen gün artmaktadır. Databazların sayısındaki artışın yanında analizlerdeki hassasiyet de gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenden dolayıdır ki biyoinformatik ile yapılan analizlerin sonuçlarına yakın zamana kadar tahmini sonuçlar denilirken günümüzde analiz sonuçlarında yavaş yavaş tahmin sözcüğü atılmaya başlanmıştır (Zhang, 2002).

Biyoinformatik databazlarını kullanım amaçlarına göre genel olarak birkaç kategoriye ayırmak mümkündür. Bu kategoride sayılan çok sayıdaki çeşitli databazların belli bazılarının sadece adlarını vererek aşağıdaki şekilde listeleyebiliriz (Galperin, 2003).

1. DNA Sekans Databazları
2. RNA Sekans Databazları
3. Protein Sekans Databazları
4. Yapı Databazları
5. Genomik Databazlar
6. Diğer databazlar

1.8.1. DNA sekans databazları

Uluslar arası nükleotid sekans databaz işbirliği databazları: NCBI Genbank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Databank of Japan)

Kodlayan ve kodlamayan DNA bölgeleri databazları: Xpro (Gopalan ve ark., 2004), UniGene (Schuler, 1997), Transterm (Jacobs ve ark., 2000).

Gen yapısı, intron, ekson ve splicing bölgeleri databazları: ASAP (Schwerk ve ark., 2003), ASD (Thanaraj ve ark., 2004), PALS (Huang ve ark., 2002), ExInt (Sakharkar ve ark., 2002), SpliceDB (Bursset ve ark., 2001).

Transkripsiyonu düzenleyen bölgeler ve transkripsiyon faktörleri databazları: DBTSS (Suzuki ve ark., 2002), TransCompel (Kel-Margoulis ve ark., 2002), TRANSFAC (Matys ve ark., 2003), TRRD (Kel ve ark., 1997)

1.8.2. RNA sekans databazları

Aptamer Database, ARED, GtRDP, PseudoBase (Batenburg ve ark., 2000), RDP (Maidak ve ark., 1997), Rfam (Griffiths-Jones ve ark., 2003).

1.8.3. Protein sekans databazları

Genel sekans databazları: PIR (Barker ve ark., 2000), PRF, Swiss-Prot (Fleischmann ve ark., 1999), TrEMBL (Bairoch ve Apweiler., 1996), UniProt (Apweiler ve ark., 2004)

Protein özelliklerini belirlemeye yönelik databazlar: aaindex (Nakai ve ark., 1988), ProTherm (Sarai ve ark., 2001)

Protein yerleşim yerini belirlemeye yönelik databazlar: DBSubLoc (Guo ve ark., 2004), NESbase (Cour ve ark., 2003), NLSdb (Nair ve ark., 2003)

Proteinlerin motif ve aktif bölgelerini belirlemeye yardımcı databazlar: ASC (Facchiano ve ark., 2003), Blocks (Petrokovski, 1996), eMOTIF (Huang ve Brutlag, 2001), O-GlycBase (Gupta ve ark., 1999), PhosphoBase (Kreegipuu ve ark., 1999), PROMISE (Degtyarenko ve ark., 1997), ScanPROSITE (Gattiger ve ark., 2002).

Proteinlerde domeyn belirlenmesi ve sınıflandırmalarını sağlamaya yardımcı databazlar: CluSTR (Kriventseva ve ark., 2001), Hits (Pagni ve ark., 2001), iProClass (Wu ve ark., 2001), MetaFam (Silverstein ve ark., 2001), PRINTS (Attwood ve Beck, 1994), Pfam (Sonnhammer ve ark., 1997), ProClass (Wu ve ark., 1999), ProDom (Corpet ve ark., 2000), SMART (Schultz ve ark., 1998).

Özel protein familyalarının databazları: AARSDB (Szymanski ve Barciszewski, 1999), Histone Database (Sullivan ve ark., 2002), NPD (Dellaire ve ark., 2003), NuclearRDB (Horn ve ark., 2001), NUREBASE (Duarte ve ark., 2002).

1.8.4. Yapı databazları

Küçük Moleküller: LIGAND (Goto ve ark., 1998), HIC-Up (Kleywegt ve Jones, 1998).

Karbonhidratlar: Glycan (Hashimoto ve ark., 2003), GlycoSuiteDB (Cooper ve ark., 2001).

Protein yapı databazları: ArchDB (Oliva ve ark., 1997), Gene3D (Buchan ve ark., 2002), SCOP (Murzin ve ark., 1995), SWISS-MODEL Repository (Guex ve Peitsch, 1997), SUPERFAMILY (Gough ve ark., 2001), 3D-GENOMICS (Fleming ve ark., 2004).

1.8.5. Genomik databazlar

Genel genomik databazlar: COG (Tatusov ve ark., 2000), Entrez Genomes (Tatusova ve ark., 1999), PEDANT (Frishman ve ark., 2003), The Pedant genome database (Albermann ve ark., 2003), PACRAT (Ray ve Daniels, 2003).

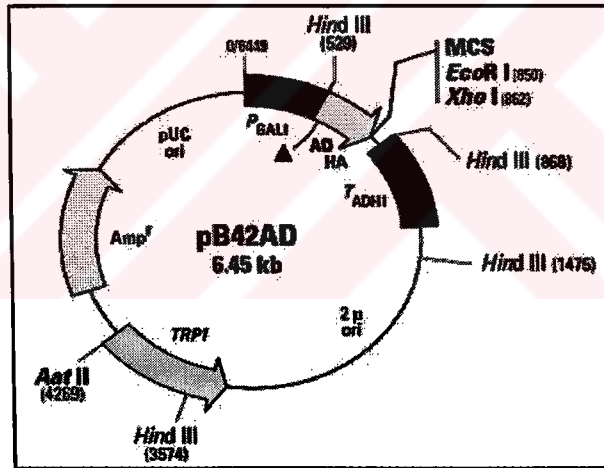
Özel organizmaların genomik databazları: EcoGene (Rudd, 2000), CyanoBase (Nakamura ve ark., 1998), SGD (Cherry ve ark., 1998), PhytoProt (Mohseni-Zadeh, 2004), ARAMEMNON (Schwacke ve ark., 2003), FlyBase (Gelbart ve ark., 1997), PlasmoDB (Anonymous, 2001).

1.8.6. Diğer databazlar

Pharmacogenomics and Pharmacogenetics Knowledge Base, PubMed, BioImage.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada başlangıç materyali olarak daha önceki bir çalışmada maya ikili hibrid sistemi ile elde edilmiş (Cen, 2001) ve IL-5 reseptörünün α alt ünitesi ile bağlantı kuran klonlardan biri (klon-38) incelenmeye çalışıldı. Bu cDNA 1.6 kb büyüklüğünde olup 6.4 kb büyüklüğündeki pBAD plazmidini içerisinde klonlanmış olarak bulunmaktadır. pBAD plazmidinin yapısı Şekil 2.1’de verilmiştir. Klon-38’in 400’den fazla nükleotid sekansı daha önce elde edilmiş olup elimizde bulunmaktadır. Bu sekans biyoinformatik analizler için başlangıç dizisi olarak kullanıldı.



Şekil 2.1. pBAD plazmidinin yapısı

2.1. Biyoinformatik Analiz Yöntemleri

2.1.1. BLAST araştırması

Elimizdeki klonun karşılık geldiği tam mRNA dizilerini belirlemek için NCBI (National Center of Bioinformatics Institute - www.ncbi.nlm.nih.gov)'nın gen bankası veritabanı BLAST (Altschul ve ark., 1990) programı ile tarandı. Bu program

elimizde bulunan klonun gen bankasında eşleştiği klonları eşleşme oranına ve olasılığına göre sıralamaktadır.

2.1.2. Genin yapısının ve kromozomal yerleşiminin belirlenmesi

BLAST araştırması sonucu ile elde edilen benzer dizilerin genomdaki yerleşimlerini belirlemek için NCBI'nin MegaBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) programı (Zhang ve ark., 2000) kullanıldı. Bu databaz klonların sekansını ilgili genomunki ile karşılaştırarak onların kromozom üzerindeki yerlerini belirlemektedir. Bu yolla klonun ait olduğu genin ekson ve intron bölgeleri kromozom üzerinde belirlenerek gen haritası ortaya çıkarılabilmektedir.

2.1.3. Gen transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi

Klonumuzun denk geldiği genin transkriptlerinin DNA kesim (restriksiyon endonükleaz enzim) enzim analizini yapmak için New England Biolabs inc. firmasının NEBcutter (www.neb.com) programı kullanıldı. Bu program kullanılırken belirli restriksiyon enzimleri için parametreler kullanıldı.

2.1.4. Genin kodlayabileceği proteinlerin belirlenmesi

Belirlenen genin kodlayabileceği protein veya proteinleri belirlemek için mRNA dizisi ORF finder (www.ncbi.nlm.nih.gov) programıyla tarandı. Tarama sonucunda olası peptidlerin sekansı cDNA sekansı ile karşılıklı olarak veya ayrı ayrı olarak belirlenebilir.

2.1.5. Proteinlerin karşılaştırılması

Belirlenen proteinlerin karşılaştırılması ve belirli bir düzende hizalanması için ClustalW (www.ebi.ac.uk) programı (Higgins ve ark., 1994) kullanıldı. Bu program hem proteinleri hem de nükleotidleri hizalayıp düzenlemek ve karşılaştırmak için

kullanılabilmektedir. Proteinlerin veya nükleotidlerin karşılaştırılması özellikle sekanslardaki korunmuş bölgeleri belirlemek için önemlidir.

2.1.6. Proteinlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Proteinlerin teorik izoelektrik noktalarını tespit etmek ve bunların moleküler ağırlıklarını belirlemek için EXPASY serverinde (www.expasy.org) bulunan ProtParam ve compute pI/Mw programları kullanıldı. Bu programlar her bir aminoasitin yükünü ve moleküler ağırlığını hesaplayarak sonuçları vermektedir. İsoelektrik noktayı ve moleküler ağırlığı belirlemek için iki farklı programın kullanılmasının nedeni programların aynı sonucu verip vermediklerini ve dolayısıyla yapılan analizin güvenilirliğini test etmektir.

2.1.7. Proteinlerin fonksiyonel domeyn ve motiflerinin belirlenmesi

Proteinlerde bulunan fonksiyonel domeynleri belirlemek için CDD programı (www.ncbi.nlm.nih.gov - Marchler-Bauer ve ark., 2003), motifleri belirlemek için de PRINTS (www.umber.sbs.man.ac.uk - Attwood ve Beck, 1994) databazları kullanıldı. Bu databazlar kullanılarak proteinlerin muhtemel yapısal ve işlevsel özellikleri belirlenmeye çalışıldı.

2.1.8. Proteinlerin hücredeki yerlerinin belirlenmesi

Proteinlerin hücredeki yerleşimlerini belirlemek için PLOC programı (www.genome.ad.jp - Park and Kanehisa, 2003) kullanıldı. PLOC programı proteinlerin muhtemel yerini belirlerken sitoplazma, hücre iskeleti, endoplazmik retikulum, golgi, lizozom, mitokondri, çekirdek, peroksizom ve plazma membranı'nı dikkate almakta ve bunları beş farklı değişkenle analiz etmektedir. Bu işlemler sonucunda proteinin en yüksek olasılıkla bulunabileceği hücre kısmı belirlenmektedir.

2.1.9. Proteinlerin sekonder yapılarının belirlenmesi

Proteinlerin sekonder yapısını belirlemek için dört farklı program kullanıldı. Bu programlardan üçü sekonder yapıyı belirlemeye yönelik tahminler verirken dördüncü program ilk üç programın sonuçlarını ortak bir yapı halinde daha güçlü bir tahmin olarak vermektedir. Sekonder yapı tahmini için HNNC (www.npsa-pbil.ibcp.fr - Guernieur, 1997), SOPM (www.npsa-pbil.ibcp.fr - Geourjon ve Deleage, 1994) ve SOPMA (www.npsa-pbil.ibcp.fr - Geourjon ve Deleage, 1995) programları kullanıldı. Bu üç programın sonuçlarının ortak bir ikincil yapı tahmini için Consensus Secondary Structure Prediction (www.npsa-pbil.ibcp.fr - Deleage ve ark., 1997) programı kullanıldı.

2.1.10. Proteinlerin transmembran bölgelerinin belirlenmesi

Proteinlerdeki muhtemel transmembran bölgelerini belirlemek için SOSUI programı (www.sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp) (Hirokawa ve ark., 1998) kullanıldı. SOSUI programı Kyte – Doolittle hidrofobisite skalasını kullanarak muhtemel transmembran bölgelerini belirlemektedir. Kyte–Doolittle hidrofobisite skalası 19–25 aminoasitlik muhtemel transmembran bölgelerini aramaktadır (Kyte and Doolittle, 1982).

2.1.11. Proteinlerdeki translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi

Proteinlerdeki translasyon sonrası olası modifikasyonları belirlemek için ilgili modifikasyonlara göre programlar kullanıldı. Proteinlerdeki serin, treonin ve tirozin fosforilasyon bölgelerini tespit etmek için NetPhos (www.cbs.dtu.dk) (Blom ve ark., 1999), miristilasyon bölgelerini belirlemek için myristoylator, O glikozilasyon bölgelerini belirlemek için NetOGlyc (www.cbs.dtu.dk) (Hansen ve ark., 1998) ve N glikozilasyon bölgelerini belirlemek için NetNGlyc (www.cbs.dtu.dk) programları kullanıldı.

2.2. Deneysel Yöntemler**2.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması**

LB Besiyerinin hazırlanması: Bakterileri büyütmek için kullanılan Luria broth (LB) besiyerinin bir litresi şöyle hazırlandı:

1. Bir erlenmayer içinde bulunan 500 ml saf suya aşağıdaki maddeler sırasıyla ilave edilerek magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı:
 - a. 10 gr tripton
 - b. 5gr maya ekstraktı
 - c. 5 gr NaCl
2. Karışıma 1000 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi (~495 ml) ve NaOH kullanılarak pH 7,4 olarak ayarlandı.
3. Katı agar besi yerleri olarak kullanıldığı durumlarda 10 gr/500 ml (%2 yoğunlukta) olacak şekilde agar ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan besiyerler sterilizasyon için otoklava konularak 121 °C, 20 dakika sterilize edildi.
4. Sterilizasyondan sonra sıcaklığı 50-60 °C'ye düştüğünde her birisine 15-20 ml düşecek şekilde "LB" diye işaretlenen petri kaplarına döküldü. Ampisilinli agarlı petri hazırlanacağı zaman petrilere dökülmeden önce 200 ml besiyerine 100 mg/ml'lik stok ampisilin solusyonundan 200 µl ilave edilerek yavaşça ve iyice karıştırıldı (son yoğunluğu 100 µg/ml) ve "LB+Amp" diye işaretlenen petri kaplarına dökülüp katılaşması sağlandı.

LBM Besiyerlerinin hazırlanması: Transformasyon deneylerinde kullanılan uygun (competent) hücreler magnezyum içeren LB (LBM) besiyerlerinde büyütülerek hazırlandılar. LBM besiyeri LB besiyeri gibi hazırlandı. Ancak bundan farklı olarak son yoğunluğu 1 mM olacak şekilde magnezyum klorür ilave edildi. Kısaca 1 litre LBM şöyle hazırlandı:

1. LB pH 7.4: 999 ml
2. 1 M MgCl₂: 1 ml.
3. Katı besiortamı hazırlandığı durumlarda %2 oranında agar ilave edilerek otoklav edildi. Otoklavdan sonra, ampisilinli ortam için son yoğunluğu 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin ilave edilip hafifçe fakat iyice karıştırıldı ve petri kaplarına döküldü.

2.2.2. Transformasyon için alıcı (competent) hücrelerin hazırlanması

Hem K12 hem de XL1 Blue *E. coli* bakteri suşları ampisilinsiz LBM besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece (~14-16 saat) inkübasyona bırakıldı (Sambrook, 1989). Bir koloniden alınan bakteri hücreleri taze bir LBM ortamına ekildi ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu petri üzerindeki koloniler toplanarak aşağıdaki şekilde transformasyon işlemi için hazırlandı:

1. Hücreler 1.5 ml sıvı LBM ile yıkandı, santrifüj edilerek (5000 rpm, 5 dak) supernatant döküldü. Bu yıkama işlemi toplam üç sefer olacak şekilde iki sefer daha tekrar edildi.
2. Pelet halindeki hücreler 1.5 ml soğuk (buz üzerinde ~4°C) 100 mM MgCl₂ eklendi ve hücreler pipet yardımı ile süspansiyon haline getirildi; Buz ortamında 5 dakika bekletildikten sonra yukarıdaki gibi santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı.
3. Hücelere 1 ml soğuk 100 mM CaCl₂ eklendi. İyice süspansiyon haline getirildikten sonra 20 dk. buzun üzerinde bekletildi, ve sonra santrifüj edilerek supernatant döküldü. Bu işlem de iki kez daha tekrarlandı.
4. Hücreler 1 ml soğuk 100 mM CaCl₂ + 15% gliserol eklendi içerisinde yavaşça ve iyice süspaniyon haline getirildi.
5. Bu hücreler farklı plazmid DNAsı içeren veya içermeyen ependorf tüplerine ilave edilerek transformasyon yapıldı.

2.2.3. Bakteri hücrelerine plazmid DNA'sının transformasyonu

Transformasyona uygun 50 µl (competent) hücreler ile aynı tüpe konulan 10 µl pBR veya pBAD-38 plazmid DNA'sı nazikçe karıştırıldı ve buzdolabında buz üzerinde 30 dk bekletildi. Negatif kontrol olarak da plazmid içermeyen TE çözeltisi hücrelerle karıştırılarak aynı işlemlerden geçirildi. Bu süre sonunda bu karışım bir dakikalık ısı şokuna tabi tutuldu (42⁰C'de 1 dak) (Mandel ve Higa, 1970; Cohen ve ark., 1972). Şok geçiren bu hücre-DNA karışımına daha sonra 37⁰C'deki 1 ml LBM ilave edildi ve 37⁰C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Karışım daha sonra santrifüj edilerek süpernatantı dököldü ve 100 µl taze LBM ilave edilerek süspansiyon haline getirildi; Bu karışımdan 50 µl ampisilinli (LBM+amp) ve 50 µl de ampisilinsiz (LBM) LBM agar petrilere yayıldı. Petriler 37⁰C'de bir gece 14-16 saat inkübasyona bırakıldı (Cohen ve ark., 1972). Transformasyon işlemi hem K12 hem de XL1 Blue bakteri suşlarına gerçekleştirildi.

Transformasyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

LBM katı besiyerinde üremiş olan K12 ve XL1 Blue bakterileri ayrı eppendorf tüplerinde 1.5 ml LBM sıvı besiyerinde iyice karıştırılarak hücre süspansiyonu sağlandı ve aşağıdaki basamaklar takip edilerek plazmidin çalıştığımız bakterilere transformasyonu gerçekleştirildi.

1. Buzdolabında buz üzerinde bulunan (4⁰C) ve transformasyon için yeni hazırlanmış olan 50 µl K12 veya XL1 Blue hücre süspansiyonunu içeren iki tüpe klon-38'i bulunduran pBAD plazmid solüsyonundan (pAD-38) 10 µl eklendi. K12 ve XL1 Blue içeren pBR diye işaretlenen diğer iki tüpe pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere daha önce saflaştırılan pBR plazmid solüsyonundan 10 µl eklendi. Negatif kontrol olarak işaretlenen tüplerdeki K12 veya XL1 Blue hücrelerine ise herhangi bir plazmid içermeyen 10 µl TE ilave edildi.
2. Hücre-plazmid karışımını içeren tüpler 4⁰C'de 30 dk. buz içerisinde buzdolabında bekletildi. Daha sonra çıkarılarak sıcaklığı 42⁰C'de olan su banyosunda 1 dk. ısı şokuna tabi tutuldu.

3. Daha sonra 37⁰C'deki LBM besiyerinden 700 µl ilave edilerek 37⁰C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
4. Karışım 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek supernatant döküldü.
5. Hücre pelleti 100 µl LBM içinde süspanse edildi ve 50 µl halinde ayrı ayrı ampisilinli (LBM+Amp) ve ampisilinsiz (LMB) petri kaplarına yayıldı. 15-20 dk. içerisinde sıvının agara iyice sızması için beklendikten sonra 37⁰C'de etüve konularak 14-16 saat büyümeye bırakıldı.

2.2.4. Transforme edilmiş bakterilerden plazmid DNA'sının izolasyonu

Plazmid DNA'nın bakterilerden saflaştırılmasını gerçekleştirmek için miniprep metoduna dayalı plazmid DNA saflaştırma kiti Cyclo-Prep™ K179 kullanıldı. Bu miniprep metodunun ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

1. Katı LB besiyerinde büyüyen bakterilerden birkaç koloni alınarak bir eppendorf tüpünde 1 ml. LB içerisinde süspanسیون haline getirildikten sonra santrifüj edildi (12000-14000 rpm/ 2 dk) ve süpernatant döküldü.
2. Hücre pelleti 200 µl Solüsyon I içinde pipetle hafifçe karıştırılarak süspanسیون haline getirildi. (Sol I hücrelerin süspanسیونu için kullanılır).
3. Hücre süspanسیونuna 200 µl Solüsyon II ilave edildi. Yavaşça alt üste gelecek şekilde tüpler 5-6 defa nazikçe karıştırıldı (Sol II hücre zar yapısında delikler oluşturuyor).
4. Daha sonra 200 µl Solüsyon III ilave edildi. Yavaşça alt üste gelecek şekilde tüpler 5-6 defa nazikçe karıştırıldı (Sol III nötralize edilmeyi sağlıyor).
5. Süspanسیون 12-14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda proteinlerden oluşan beyaz renkli pelet kısım dipte bulunur ve plazmid DNA'sı da supernatant içinde bulunur.
6. Filtre kolonları (spin column) toplama tüpünün içine yerleştirildi ve 5'nci basamakta elde edilen süpernatant (plazmid DNA'nın bulunduğu kısım) yavaşça doğrudan filtre üzerine ilave edildi.
7. 12-14000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi ve geçen sıvı döküldü. Bu aşamada plazmid DNA'sı filtreye bağlı durumda kalıyor.

8. Etanol içeren yıkama solusyonundan 700 µl filtre üzerine eklendi. 12-14 000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi. Toplama tüpündeki yıkama sıvısı döktüldü ve etanolden tümüyle arındırmak için filtre tekrar 12-14000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
9. Filtre yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 60-70 °C'deki 100 µl TE eklendi.
10. Solüsyon 12-14000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi. Elde edilen plazmid DNA daha sonraki çalışmalar için -20 °C de saklandı.

2.2.5. Plazmid DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi

Plazmid DNA'sı, Sigma firmasından temin edilen EcoRI ve XhoI DNA kesim (restriksiyon) enzimleri ile kesildi ve jel elektroforezi ile incelendi. Bu kesim reaksiyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. DNA ve kesim enzimleri çizelge 2.1'deki gibi hazırlandı.
2. Tüplerdeki karışım su banyosunda 37 °C de gece boyu kesime bırakıldı.
3. Enzimlerin aktivitelerinin durdurulması için kesim reaksiyonu 65°C de 30 dak tutuldu.
4. Reaksiyon karışımı %0.8 agaroz jelde elektroforez ile ayrıştırılıp jel görüntüleme sistemi ile incelendi

Çizelge 2.1. Plazmid DNA'sının kesim reaksiyonu

	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3
Steril distile su	20 µl	19.5 µl	19 µl
Plazmid DNA	25 µl	25 µl	25 µl
SH tampon çözeltisi	5 µl	5 µl	5 µl
EcoRI enzimi	-	0.5 µl	0.5 µl
XhoI enzimi	-	-	0.5 µl

2.2.6. Agaroz jel elektroforez

Agaroz jel elektroforezi değişik büyüklükteki DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında kullanılan uygun bir yöntemdir. Gerek restriksiyon enzimleri ile

kesilen DNA'nın oluşturduğu parçacıkları, gerekse de DNA izolasyon veya PCR ile çoğaltılan DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında kullanılabilir. Jel hazırlanması için, agaroz uygun bir çözeltisi içinde kaynatılarak çözündürülür ve etidyum bromür ilave edilir. Sıcak agaroz daha katılaşmadan kuyucukların oluşumu için uygun jel tarağı yerleştirilmiş bir jel kalıbına dökülür. Etidyum bromür DNA'nın iki iplikçiği arasına girerek ultraviyole ışınları altında DNA'nın görüntülenmesini sağlar. DNA örnekleri hazırlanan jeldeki tarak dişlerinin oluşturduğu yuvaların içerisine bırakılır. Bu arada molekül büyüklükleri bilinen marker DNA'lar da jelin bir yuvasına yerleştirilir. Böylece agaroz jel içerisindeki DNA bantları etidym bromür ile görünür hale getirilmiş olur. Elektrik akımı verilerek bantların ayrışması sağlanır. Elektroforeden sonra jel ultraviyole (UV) ışığı üzerinde incelenebilir (Studier, 1973).

Agaroz jel aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1. 40 ml %0.8 agaroz jel hazırlandı.

Agaroz : 0.32 gr.

20X TAE : 2 ml.

H₂O : 38 ml.

Toplam Miktar: 40 ml.

2. Karışım ısıtıcı üzerinde arada bir karıştırılarak eritildi ve 60 °C'ye gelinceye kadar soğutulmaya bırakıldı. Daha sonra 2 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml EtBr) ilave edildi. Yavaşça ve iyice karıştırıldıktan sonra jel tarağının olduğu bir jel döküm kabına döküldü ve katılaşması için beklendi.
3. Katılaşan jel elektroferez tankına yerleştirildi ve jelin üstünü örtecek kadar 1xTAE çözeltisi ilave edildi. Daha sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
4. Her bir DNA örneğinden 10 µl alınarak 2 µl 6x Jel Yükleme Boyası tamponu (gel loading buffer) ile karıştırıldı. Jel 100 mA'da yaklaşık 1 saat koşturularak DNA bantlarının ayrıştırılması sağlandı. Jelde DNA fragmentleri jel görüntüleme ve dokümantasyon sistemi ile UV ışık üzerinde incelendi.

3. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTISMA

3.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

3.1.1. BLAST araştırması

IL-5 reseptörünün α alt-ünitesine bağlanan hücre içi sinyalizasyon moleküllerinin bulunması için yapılan maya ikili hibrid taraması sonucu elde edilen klonlardan biri 1,6 kilobaz büyüklüğünde olan klon-38'dir (Cen, 2001). Bu klonun elimizde bulunan yaklaşık 0,5 kilobazlık sekansının BLAST ile araştırılması sonucu bu klon ile yüksek benzerlik gösteren dört insan klonu belirlenmiştir (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. BLAST taraması sonucu klon-38'e benzer olarak bulunan insan klonları

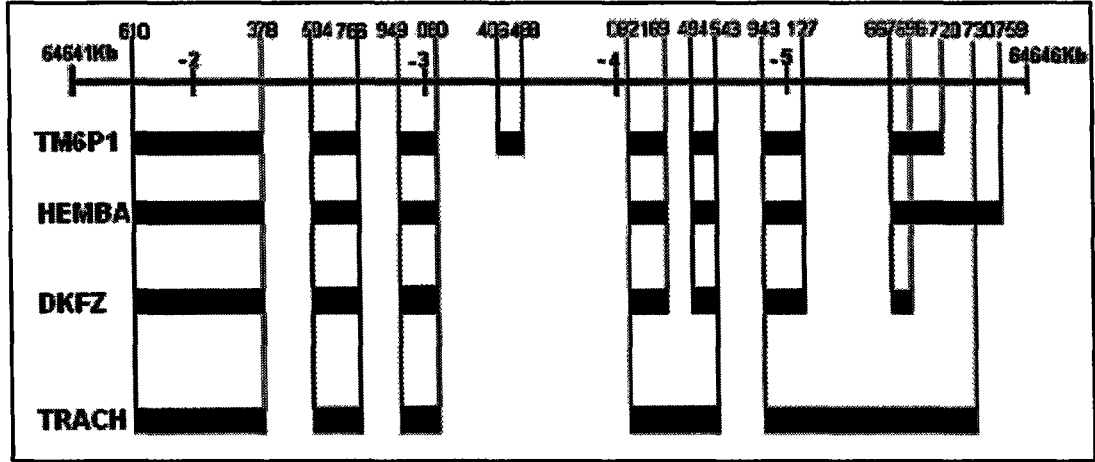
Adı	Uzunluğu (nt)	Benzerlik Oranı
TM6P1	1527	383/388 (98%)
HEMBA	1486	347/349 (99%)
DKFZ	1440	336/338 (99%)
TRACH	2323	233/233 (100%)

Bu klonların her birinin ayrı ayrı non redundant (nr) databazında BLAST ile araştırılması sonucu hepsinin insan ait FLJ90024 geni ile eşleştiği görüldü ve bu şekilde elde edilen sonuçların tamamının bu genin alternatif splicing sonucu oluşmuş izoform transkriptleri olduğu anlaşılmıştır.

3.1.2. FLJ90024 geninin kromozomal yerleşimi ve gen yapısı

FLJ90024 geninin mRNAları'nın insan genomuna karşı taraması sonucu bu genin 2. kromozomun p11.2 bölgesinde 5000 nükleotidlik bir alan (64641 Kb – 64646 Kb) kapladığı ve bu bölge ile Plus/Minus (+/-) şeklinde eşleştiği görülmüştür.

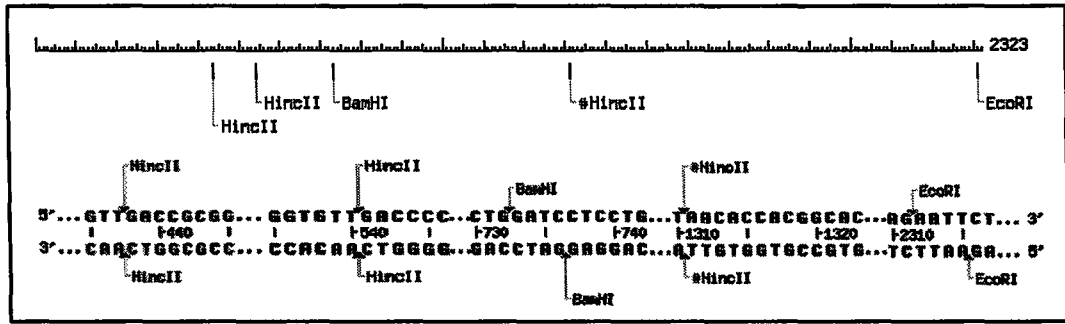
Bu geninin farklı formları olan her bir mRNA'nın kodlayan (ekson) ve kodlamayan (intron) bölgeleri dikkate alındığında genin yapısının şekil 3.1'deki gibi olduğu belirlenmiştir.



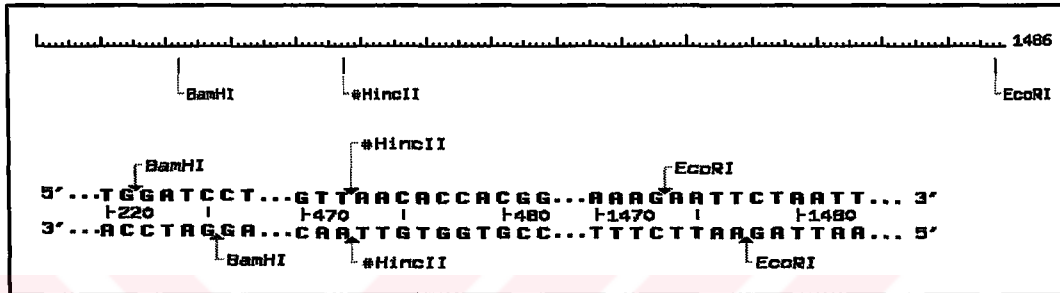
Şekil 3.1. FLJ90024 geninin yapısı

3.1.3 FLJ90024 geninin transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi

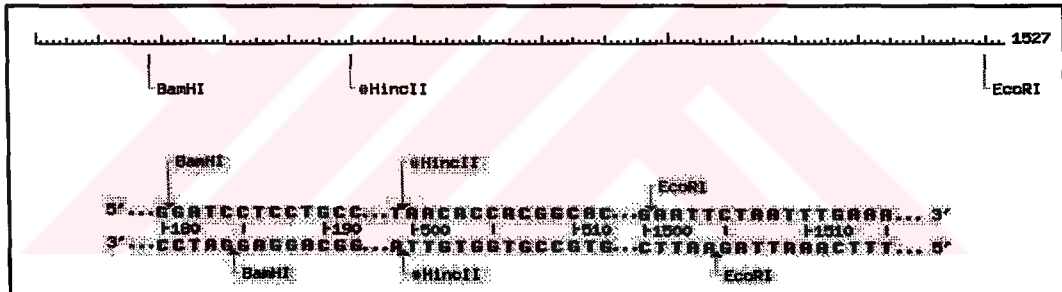
FLJ90024 geninin New England Biolabs inc. şirketinin NEBcutter programı ile yapılan EcoRI, BamHI ve HincII enzim analizleri şekil 3.2'de görülmektedir. Bu sonuç genin her dört transkriptinin de kullanılan her üç restriksiyon endonükleaz için kesim noktalarını göstermektedir.



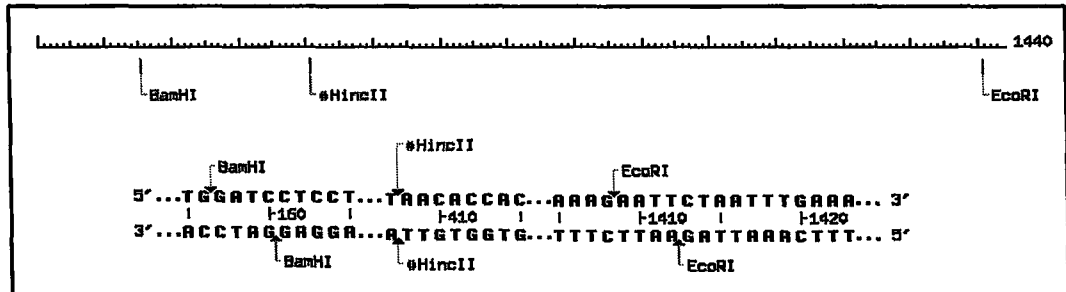
a. TRACH



b. HEMBA



c. TM6P1

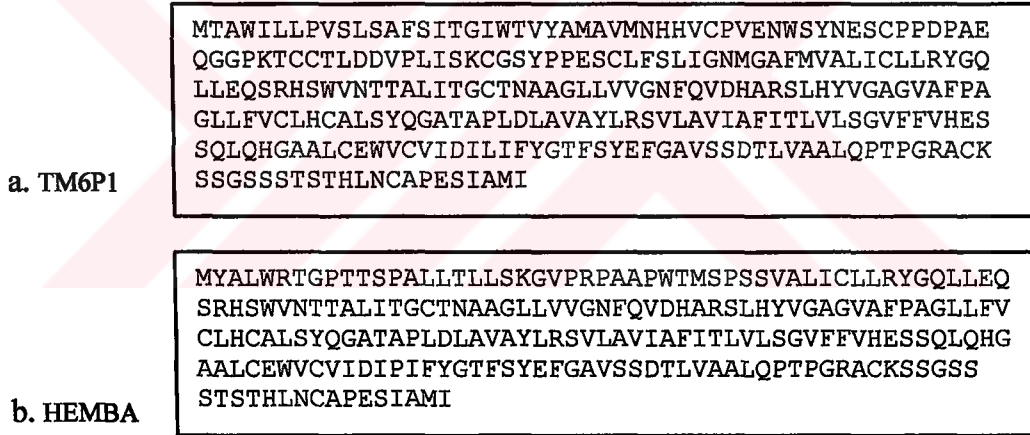


d. DKFZ

Şekil 3.2. FLJ90024 geninin transkriptlerinin restriksiyon enzim analizi.

3.1.4. FLJ90024 geninin transkriptlerinin kodlayacağı proteinler

NCBI protein veri bankasında yapılan araştırmada FLJ90024 geninin dört transkriptinden sadece iki tanesinin gen bankasında protein karşılığı bulunmaktadır. Bunlar TM6P1 ve HEMBA transkriptleridir. Diğer iki transkriptin (DKFZ ve TRACH) kodlayacağı protein sekansı NCBI'nin ORF finder programı yardımıyla belirlendi. Gen bankasında karşılığı bulunan proteinlerden biri olan TM6P1 proteini 271 aminoasitten meydana gelmekte (Şekil 3.3a) ve vücuttaki birçok organda sentezlenmektedir. Gen bankasında karşılığı olan diğer protein olan HEMBA proteini ise 218 aminoasitten meydana gelmekte (Şekil 3.3b) ve sadece periferik ve sempatik sinirlerde sentezlenmektedir. Veri tabanında her iki protein için bunlar dışında hiçbir veriye rastlanmamıştır ve yine her iki protein için yapısı ve fonksiyonu bilinmemektedir notu düşülmüştür.



Şekil 3.3 TM6P1(a) ve HEMBA (b) proteinlerinin primer yapısı

Veri tabanında FLJ90024 geninin kodladığı ve proteini belirlenmemiş olan mRNA'ların proteinlerini belirlemek için NCBI'nin ORF (Open Reading Frame) Finder (Okuma Sırasını Bulan) programı kullanıldı. Bu program Metiyonin aminoasidini başlangıç aminoasidi olarak tanımakta ve nükleotidleri proteine çevirirken sonlanma kodonu ile karşılaştığında translasyonu durdurmaktadır. ORF

programı bu şekilde başlangıç aminoasidi ile sonlanma sinyali arasında kalan aminoasitleri proteininin muhtemel dizisi olarak vermektedir.

Proteini belirlenmemiş transkriptlerden biri DKFZ'dir. DKFZ'nin protein dizi tespitinde ORF finder programının bu mRNA'nın 237'nci nükleotidinden başlayarak bir metiyonin aminoasidini belirleyerek translasyonu başlattığı ve 891'nci nükleotiden başlayarak bir sonlanma sinyali ile translasyonu bitirdiği görülmüştür. DKFZ'nin ORF analizi sonucunda bu transkriptin de tıpkı HEMBA proteini gibi 218 aminoasitten meydana gelen bir proteini kodladığı belirlenmiştir (Şekil 3.4a).

FLJ90024 geninin proteini belirlenmemiş diğer transkripti TRACH'tır. Yapılan protein dizi tespitinde ORF finder programı bu mRNA'nın 1233-1796 nükleotidleri arasında 187 aminoasitlik bir peptide karşılık gelen bir ORF tespit etmektedir (Şekil 3.4b). Bu mRNA molekülünde ayrıca bir alternatif translasyon başlangıcı da tahmin edilmekte ve bu durumda 232 aminoasitlik bir peptid sentezlenebileceği tahmin edilmektedir. Ancak metiyonin dışında bir aminoasitle translasyonun başlaması nadir olduğundan bu tezde metiyonin başlangıç aminoasidi olarak alınmıştır.

Hem veri bankalarında bulunan hem de yeni belirlediğimiz peptid sekanslarının karşılaştırılması için EBI (European Bioinformatics Institute)'nin ClustalW programı kullanıldı. Bu programın verdiği sonuçlara göre FLJ90024 geninin transkriptlerinin proteinleri birbirleri ile yüksek düzeyde homoloji göstermektedir. Bu proteinlerden özellikle HEMBA ile DKFZ arasındaki homoloji dikkat çekicidir. Çünkü bu iki proteinin iki aminoasidi dışında tüm protein yapısı birbirinin aynıdır. Bunun dışında diğer proteinlerin birbirleri ile olan benzerlikleri de yüksek derecededir (Şekil 3.5).

```

237 atgtatgccctgtggagaactggctcctacaacgagctcctgcctc
M Y A L W R T G P T T S P A L
282 ctgaccctgctgagcaaggggggtcccaagacctgctgcaccctgg
L T L L S K G V P R P A A P W
327 acgatgtcccctcatcagtgccctgatctgcctcctgcgctac
T M S P S S V A L I C L L R Y
372 gggcagctcctggagcagagtcggcactcttgggtaacaccacg
G Q L L E Q S R H S W V N T T
417 gcactcatcacaggctgcaccaacgctgcgggcctcttgggtgtt
A L I T G C T N A A G L L V V
462 ggcaactttcaggtggatcatgccaggtctctgcactacgttga
G N F Q V D H A R S L H Y V G
507 gctggcgtggccttccctgcggggctgctcttggttgcctgcac
A G V A F P A G L L F V C L H
552 tgtgctctctcctaccaaggggacctgccccgctggacctggct
C A L S Y Q G A T A P L D L A
597 gtggcctatctgcaagtgtgctggctgtcatcgcctttatcacc
V A Y L R S V L A V I A F I T
642 ctggctcctcagtgaggctcttcttggccatgagagttctcggtg
L V L S G V F F V H E S S R L
687 caacatggggcagccctgtgtgagtggtgtgtgtcatcgatc
Q H G A A L C E W V C V I D I
732 ctcattttctatggcaccttcagctacgagtttggggcagctctcc
L I F Y G T F S Y E F G A V S
777 tcagacacactgggtgctgcactgcagcctaccctggccggcc
S D T L V A A L Q P T P G R A
822 tgcaagtcctccgggagcagcagcacctccaccacctcaactgt
C K S S G S S S T S T H L N C
867 gccccgagagcatcgctatgatctaa 893
A P E S I A M I *

```

a. DKFZ

```

1233 atgtccccctcatcagtgccctgatctgcctcctgcgctacggg
M S P S S V A L I C L L R Y G
1278 cagctcctggagcagagtcggcactcttgggtaacaccacggca
Q L L E Q S R H S W V N T T A
1323 ctcatcacaggctgcaccaacgctgcgggcctcttgggtggc
L I T G C T N A A G L L V V G
1368 aactttcaggtggatcatgccaggtctctgcactacgttggagct
N F Q V D H A R S L H Y V G A
1413 ggcgtggccttccctgcggggctgctcttggttgcctgcactgt
G V A F P A G L L F V C L H C
1458 gctctctcctaccaaggggacctgccccgctggacctggctgtg
A L S Y Q G A T A P L D L A V
1503 gcctatctgcaagtgtgctggctgtcatgcctttatcacctg
A Y L R S V L A V I A F I T L
1548 gtcctcagtgagctcttcttggccatgagagttctcagctgcaa
V L S G V F F V H E S S Q L Q
1593 catggggcagccctgtgtgagtggtgtgtgtcatcgatcctc
H G A A L C E W V C V I D I L
1638 attttctatggcaccttcagctacgagtttggggcagctcctca
I F Y G T F S Y E F G A V S S
1683 gacacactgggtgctgcactgcagcctaccctggccgggctgc
D T L V A A L Q P T P G R A C
1728 aagtcctccgggagcagcagcacctccaccacctcaactgtgcc
K S S G S S S T S T H L N C A
1773 cccgagagcatcgctatgatctaa 1796
P E S I A M I *

```

b. TRACH

Şekil 3.4. DKFZ (a) ve TRACH (b) transkriptlerinin ORF analizi

HEMBA	-----MYALWRTGPTTSPALLTLLSKGVPRPAAP-----
DKFZ	-----MYALWRTGPTTSPALLTLLSKGVPRPAAP-----
TRACH	-----
TM6P1	MTAWILLPVSLSAFSITGIWTVYAMAVMHHVCPVENWSYNESCPPDPAEQGGPKTCCTL
HEMBA	-----WTMSPSSVALICLLRYGQLLEQSRHSWVNTTALITGCT
DKFZ	-----WTMSPSSVALICLLRYGQLLEQSRHSWVNTTALITGCT
TRACH	-----MS PSSVALICLLRYGQLLEQSRHSWVNTTALITGCT
TM6P1	DDVPLISKGSYPPESCLFSLIGNMGAFMVALICLLRYGQLLEQSRHSWVNTTALITGCT * . . *****
HEMBA	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYVGAGVAFPAGLLFVCLHCALSYQGATAPLDLAVAYLRSV
DKFZ	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYVGAGVAFPAGLLFVCLHCALSYQGATAPLDLAVAYLRSV
TRACH	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYVGAGVAFPAGLLFVCLHCALSYQGATAPLDLAVAYLRSV
TM6P1	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYVGAGVAFPAGLLFVCLHCALSYQGATAPLDLAVAYLRSV *****
HEMBA	LAVIAFITLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWVCVIDIPIFYGTFSYEFGAVSSDTLVAA
DKFZ	LAVIAFITLVLSGVFFVHESSRLQHGAALCEWVCVIDILIFYGTFSYEFGAVSSDTLVAA
TRACH	LAVIAFITLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWVCVIDIPIFYGTFSYEFGAVSSDTLVAA
TM6P1	LAVIAFITLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWVCVIDILIFYGTFSYEFGAVSSDTLVAA *****:*****
HEMBA	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE SIAMI
DKFZ	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE SIAMI
TRACH	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE SIAMI
TM6P1	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE SIAMI *****

Şekil 3.5. FLJ90024 geninin dört transkriptinin olası protein dizilerinin karşılaştırılması

3.1.5. Proteinlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

EXPASY serverinde bulunan ProtParam ve compute pI/Mw programları kullanılarak HEMBA, TM6P1, DKFZ ve TRACH proteinlerinin bazı fiziko-kimyasal özellikleri belirlenmeye çalışıldı. Bu analiz sonucunda proteinlerin izoelektrik noktaları ve moleküler ağırlıkları tespit edildi (Çizelge 3.2). Analiz sonucunda her iki programın da aynı sonucu verdiği görüldü.

Çizelge 3.2. FLJ90024'ün kodladığı dört proteinin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları

	HEMBA	DKFZ	TM6P1	TRACH
Izoelek. Nok.	7.02	7.62	5.45	6.11
Mol.Ağ.(Da)	23018.7	23062.8	27251.1	19698.7

3.1.6. Proteinlerdeki fonksiyonel motif ve domeynler

Motifler proteinlerde bulunan kısa (4-15 aminoasit) aminoasit sekansları olup belli görevlerde rol alırlar. Fingerprint elementleri bir çeşit motif olup özellikle proteinlerin gruplandırılmasında kullanılırlar. Domeynler motiflerden daha uzun olup (30-120 aminoasit) proteinlerde belli bir görev yapan kısımlardır.

FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerin olası fonksiyonel domeynlerini belirlemek için CDD programı (Marchler-Bauer ve ark., 2003) kullanıldı. Bu programın verdiği sonuçlara göre her dört proteinin de üzerinde karakterize edilmemiş ve işlevi bilinmeyen korunmuş bir domeyn (KOG4320 uncharacterized conserved protein - function unknown) bulunmaktadır.

FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerin olası fonksiyonel motiflerini belirlemek için PRINTS databazı (Attwood ve Beck, 1994) kullanıldı. Proteinlerin PRINTS databazında taranması sonucu her dört proteinin de G proteine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesine ait bazı fingerprint elementlerini taşıdığı belirlendi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Proteinlerin PRINT databazı ile belirlenen fonksiyonel motifleri

Protein İsmi	Fingerprint
HEMBA	GPCRRHODOPSN1, GPCRRHODOPSN4, GPCRRHODOPSN6
TM6P1	GPCRRHODOPSN1, GPCRRHODOPSN3, GPCRRHODOPSN4
DKFZ	GPCRRHODOPSN1, GPCRRHODOPSN4, GPCRRHODOPSN6
TRACH	GPCRRHODOPSN1, GPCRRHODOPSN6, GPCRRHODOPSN7

3.1.7. Proteinlerin hücredeki yerleşimlerinin tahmini

FLJ90024 geninin kodlayabileceği proteinlerin hücre içindeki yerleşimlerini belirlemek için PLOC programı (Park and Kanehisa, 2003) kullanıldı. PLOC proteinlerin hücre içinde yerleşimlerini tahmin eden bir programdır. PLOC programı FLJ90024 geninin her dört transkribinden oluşacak proteinleri plazma membranında bulunan proteinler olarak belirlemektedir.

3.1.8. Proteinlerin sekonder yapısının belirlenmesi

FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerin sekonder yapısını belirlemek için HNNC, SOPM, SOPMA ve Consensus Secondary Structure Prediction programları kullanıldı. Bu programların sonuçları şekil 3.6'da görülmektedir.

Proteinlerin sekonder yapı tahmini ile ilgili olarak ortaya çıkan bu veriler her dört proteinin de ağırlıklı olarak random coil ve heliks yapısında olduğu ve bunun dışında da belirli bölgelerde beta yapılar da içerdiği görülmüştür.

HEMBA	-----MYALWRTGPTT SPALL TLL SKGVPRPAAP-----	
DKFZ	-----MYALWRTGPTT SPALL TLL SKGVPRPAAP-----	
TRACH	-----	
TM6P1	MTAWI LLPVSLSAFSLTGIWTVYAMAVMNHVCPVENWSYNE SCPDPAPAEQGGPKTCCTL	
HEMBA	-----WIMSPSSVAL ICLLRYGQ LLEQSRHSWVNT TALITGCT	
DKFZ	-----WIMSPSSVAL ICLLRYGQ LLEQSRHSWVNT TALITGCT	
TRACH	-----MSPSSVAL ICLLRYGQ LLEQSRHSWVNT TALITGCT	
TM6P1	DDVPLISKCGSYPPESCFLS LIGNMGAFMVAL ICLLRYGQ LLEQSRHSWVNT TALITGCT	
HEMBA	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYV GAGVAFPAGLLFVCLHCALS YQGATAPLDLAVAYLRSV	
DKFZ	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYV GAGVAFPAGLLFVCLHCALS YQGATAPLDLAVAYLRSV	
TRACH	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYV GAGVAFPAGLLFVCLHCALS YQGATAPLDLAVAYLRSV	
TM6P1	NAAGLLVVGNFQVDHARSLHYV GAGVAFPAGLLFVCLHCALS YQGATAPLDLAVAYLRSV	
HEMBA	LAVIAFITLVLSGVFVHES SQLQHGAALCEWVCVID ILI FYGTF SYEFGAVSSD TLVAA	
DKFZ	LAVIAFITLVLSGVFVHES SRLQHGAALCEWVCVID ILI FYGTF SYEFGAVSSD TLVAA	
TRACH	LAVIAFITLVLSGVFVHES SQLQHGAALCEWVCVID ILI FYGTF SYEFGAVSSD TLVAA	
TM6P1	LAVIAFITLVLSGVFVHES SQLQHGAALCEWVCVID ILI FYGTF SYEFGAVSSD TLVAA	
HEMBA	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPEIAMI	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> Heliks </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="width: 15px; height: 10px; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></div> Ekstended Strand </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: gray; margin-right: 5px;"></div> Random Coil </div>
DKFZ	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPEIAMI	
TRACH	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPEIAMI	
TM6P1	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPEIAMI	

Şekil 3.6. FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerin muhtemel sekonder yapıları

3.1.9. Proteinlerin transmembran bölgelerinin belirlenmesi

Proteinlerin muhtemel transmembran bölgeleri SOSUI programı ile belirlendi. Bu programın sonuçlarına göre HEMBA, TM6P1 ve DKFZ proteinleri altı transmembran bölgeye sahip iken TRACH proteini beş transmembran bölgeye sahiptir (Şekil 3.7). HEMBA, TM6P1 ve DKFZ proteinlerinde transmembran bölgeleri birbirine çok benzemektedir. Bunlar dışında TRACH proteininde diğer

proteinlerde bulunan ilk transmembran segmentinin olmadığı görülmekte bunun dışındaki transmembran segmentlerinin ise diğer proteinlerdeki transmembran bölgelere denk geldiği görülmektedir.

HEMBA	-----	<u>MYALWRTGPTTSPALLTLLSKGV</u>	PRPAAP	-----
DKFZ	-----	<u>MYALWRTGPTTSPALLTLLSKGV</u>	PRPAAP	-----
TRACH	-----	-----	-----	-----
TM6P1	MTA	<u>WILLPVSLSAFSTIGIWI</u>	<u>VYAMAVMNHVCPVENWSYNE</u>	SCPPDPAEQGGPKTCCTL
HEMBA	-----	<u>WTMSPSSVALICLLRYGOLLEQSRH</u>	<u>SWNTTALITGCT</u>	-----
DKFZ	-----	<u>WTMSPSSVALICLLRYGOLLEQSRH</u>	<u>SWNTTALITGCT</u>	-----
TRACH	-----	<u>MSPSSVALICLLRYGOLLEQSRH</u>	<u>SWNTTALITGCT</u>	-----
TM6P1	DDVPLISKCGSYPPES	<u>CLFSLIGNMGAFMVALICLLRYGOLLEQSRH</u>	<u>SWNTTALITGCT</u>	-----
HEMBA	<u>NAAGLLVVGNFQVDHARSI</u>	<u>HYVGAGVAFFPAGLLFVCLHCALS</u>	<u>YQGATAPLD</u>	<u>LAVAYLRSV</u>
DKFZ	<u>NAAGLLVVGNFQVDHARSI</u>	<u>HYVGAGVAFFPAGLLFVCLHCALS</u>	<u>YQGATAPLD</u>	<u>LAVAYLRSV</u>
TRACH	<u>NAAGLLVVGNFQVDHARSI</u>	<u>HYVGAGVAFFPAGLLFVCLHCALS</u>	<u>YQGATAPLD</u>	<u>LAVAYLRSV</u>
TM6P1	<u>NAAGLLVVGNFQVDHARSI</u>	<u>HYVGAGVAFFPAGLLFVCLHCALS</u>	<u>YQGATAPLD</u>	<u>LAVAYLRSV</u>
HEMBA	<u>LAVIAFITLVLSGVFFVHES</u>	<u>SQLQHGAAALCEWVCVIDILIF</u>	<u>YGTFS</u>	<u>SYEFGAVSSDTLVAA</u>
DKFZ	<u>LAVIAFITLVLSGVFFVHES</u>	<u>SQLQHGAAALCEWVCVIDILIF</u>	<u>YGTFS</u>	<u>SYEFGAVSSDTLVAA</u>
TRACH	<u>LAVIAFITLVLSGVFFVHES</u>	<u>SQLQHGAAALCEWVCVIDILIF</u>	<u>YGTFS</u>	<u>SYEFGAVSSDTLVAA</u>
TM6P1	<u>LAVIAFITLVLSGVFFVHES</u>	<u>SQLQHGAAALCEWVCVIDILIF</u>	<u>YGTFS</u>	<u>SYEFGAVSSDTLVAA</u>
HEMBA	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE	SIAMI		
DKFZ	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE	SIAMI		
TRACH	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE	SIAMI		
TM6P1	LQPTPGRACKSSGSSSTSTHLNCAPE	SIAMI		

Şekil 3.7. Proteinlerdeki muhtemel transmembran bölgeler

3.1.10. Proteinlerin translasyon sonrası muhtemel modifikasyonları

Proteinlerin translasyon sonrası olası modifikasyonlarını belirlemek için yapılan araştırmada her dört protein üzerinde de muhtemel fosforilasyon, N ve O glikozilasyon ile miristilasyon bölgelerinin olabileceği belirlenmiştir.

Proteinlerdeki fosforilasyon bölgelerini belirlemek için NetPhos (Blom ve ark., 1999), O glikozilasyon bölgelerini belirlemek için NetOGlyc (Hansen ve ark., 1998), N glikozilasyon bölgelerini belirlemek için NetNGlyc, miristilasyon bölgelerini

belirlemek için myristoylator programları kullanıldı. Proteinlerdeki muhtemel fosforilasyon bölgeleri çizelge 3.4'te, N ve O glikozilasyon bölgeleri de çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Her dört proteindeki bütün translayon sonrası modifikasyonlar şekil 3.8'de aminoasitler üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerdeki muhtemel fosforilasyon bölgeleri

Protein İsmi	Fosforlaşan Aminoasit	Aminoasitin Yeri
HEMBA	Tirozin	88
	Treonin	10
	Serin	36, 55, 173, 199, 202, 203, 205
TM6P1	Tirozin	40,141
	Treonin	-
	Serin	39, 108, 226, 252, 255, 256, 258
DKFZ	Tirozin	88
	Treonin	10
	Serin	36, 52, 173, 199, 202, 203, 205
TRACH	Tirozin	57
	Treonin	-
	Serin	5, 24, 142, 168, 171, 172, 174

Çizelge 3.5. FLJ90024 Geninin kodladığı proteinlerdeki muhtemel N ve O glikozilasyon bölgeleri

Protein İsmi	Glikozilasyon	Glikozillenen	Aminoasitin Yeri
HEMBA	O	Treonin	11, 17, 191, 204, 206
		Serin	20, 201, 214
	N	Asparajin	58
TM6P1	O	Treonin	2, 59, 244, 257, 259
		Serin	254, 267
	N	Asparajin	41, 111
DKFZ	O	Treonin	11, 17, 191, 204, 206
		Serin	20, 201, 214
	N	Asparajin	58
TRACH	O	Treonin	160, 173, 175
		Serin	170, 183
	N	Asparajin	27

MEMBA	-----MYALNRTGPTTSPALLTLLSKGVPRPAAP-----	
DKFZ	-----MYALNRTGPTTSPALLTLLSKGVPRPAAP-----	
TRACH	-----	
TM6P1	MTAWILLPVSLSAFSTIGIFVYAMQVMHWHVCPEVWVSYNESCPPDPAEQGGPKTCCTL	
MEMBA	-----WTMSPSSVALICLLRYGQILLEQSRHSEWNTTALITGCT	
DKFZ	-----WTMSPSSVALICLLRYGQILLEQSRHSEWNTTALITGCT	
TRACH	-----MSPSSVALICLLRYGQILLEQSRHSEWNTTALITGCT	
TM6P1	DDVPLISKCGSYPPESCLFSLIGNMGAFFWALI CLLRYGQILLEQSRHSEWNTTALITGCT	
MEMBA	HAAGLLVVGNEQVDHARSLHVGAGVAFPAGLL FVCLHCAISYQGA TAPDLAVAYLRV	
DKFZ	HAAGLLVVGNEQVDHARSLHVGAGVAFPAGLL FVCLHCAISYQGA TAPDLAVAYLRV	
TRACH	HAAGLLVVGNEQVDHARSLHVGAGVAFPAGLL FVCLHCAISYQGA TAPDLAVAYLRV	
TM6P1	HAAGLLVVGNEQVDHARSLHVGAGVAFPAGLL FVCLHCAISYQGA TAPDLAVAYLRV	
MEMBA	LAVLAFTTLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWV CVIDILIFYGTF SYEFGWVS SDTLVAA	
DKFZ	LAVLAFTTLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWV CVIDILIFYGTF SYEFGWVS SDTLVAA	
TRACH	LAVLAFTTLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWV CVIDILIFYGTF SYEFGWVS SDTLVAA	
TM6P1	LAVLAFTTLVLSGVFFVHESSQLQHGAALCEWV CVIDILIFYGTF SYEFGWVS SDTLVAA	
MEMBA	LQPTPGRACKSSGSSSTS THLNCAPES IAMI	
DKFZ	LQPTPGRACKSSGSSSTS THLNCAPES IAMI	
TRACH	LQPTPGRACKSSGSSSTS THLNCAPES IAMI	
TM6P1	LQPTPGRACKSSGSSSTS THLNCAPES IAMI	

Fosforilasyon
 N Glikozilasyon
 O Glikozilasyon
 Miristilasyon

Şekil 3.8. Proteinlerdeki translasyon sonrası muhtemel modifikasyon bölgeleri

3.2. Deneysel Sonuçlar

3.2.1. Transformasyon için bakteri suşlarının hazırlanması

Petri kapları içinde hazırlanmış bulunan LBM katı besiyerlerine yapılan K12 ve XL1 Blue bakteri ekimleri bir gecelik 37 °C inkübe edildi. Ertesi gün yapılan kontrolde, K12 ve XL1 Blue bakterilerinin ampisilinsiz besiyerinde iyi çoğaldığı ama ampisilinli besiyerinde çoğalmadığı görülmüştür. Bununla birlikte pozitif kontrol olarak ekimi yapılan ve pBR plazmidini içeren K12 bakterileri hem ampisilinli hem de ampisilinsiz ortamlarda büyüdüğü tespit edildi. Bu sonuç K12 ve XL1 Blue bakteri suşlarının ampisilin direnç geninine sahip olmadığını ve bu nedenle ampisilinli ortamda üreyemediklerini göstermektedir. Ampisilin direnç geninin plazmid üzerinde bulunduğu göz önüne alındığında bu bakterilerde plazmidin olmadığı ortaya çıkmaktadır. Ancak pBR plazmidini içeren bakterilerin hem

ampisilinli hem de ampisilinsiz besiyerinde üremesi bakterinin ampisilin direnç genine ve dolayısıyla plazmide sahip olduğunu göstermektedir.

3.2.2. Transformasyon sonuçları

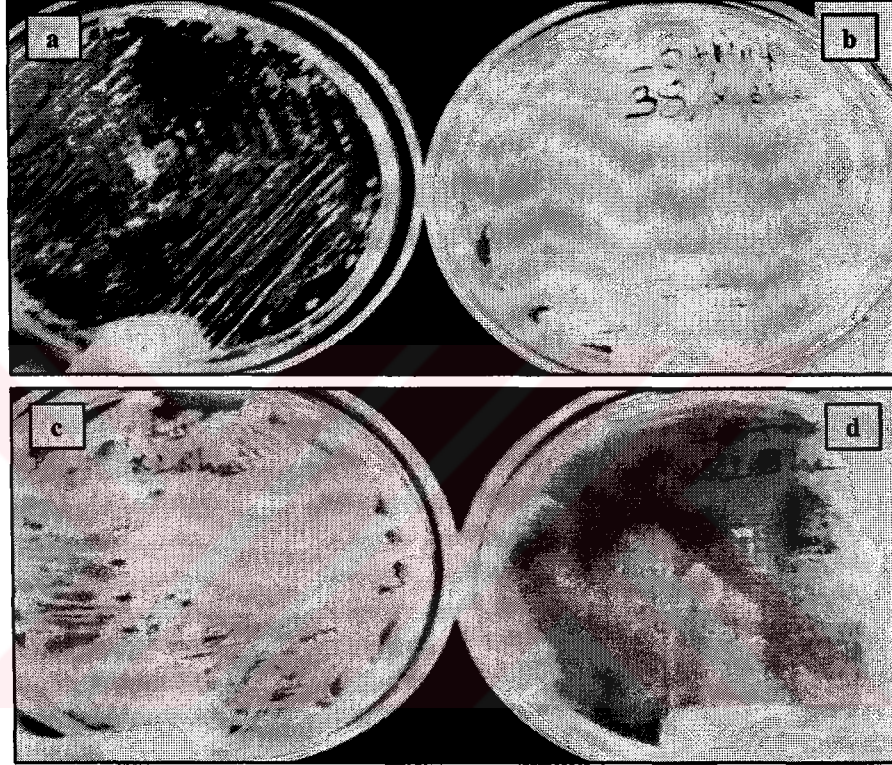
K12 ve XL1 Blue bakteri suşlarına materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı gibi plazmid transformasyonu yapıldı ve transforme edilen hücreler 37°C’de bir gecelik büyümeye bırakıldı. Ertesi sabah yapılan incelemede şu sonuçlar gözlemlendi (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.9):

- Negatif kontrol olarak kullanılan (plazmid transformasyonu yapılmayan) K12 ve XL1 Blue bakterileri ampisilinli besiyerinde üreyememiş ancak bu bakteriler ampisilinsiz besiyerinde üreyebilmişlerdi.
- Buna karşın transformasyonun pozitif kontrolü olarak kullanılan bakteriler (pBR plazmidininin aktarıldığı bakteriler) hem ampisilinli hem de ampisilinsiz besiyerlerinde üreyerek koloni oluşturmuşlardı.
- Aynı şekilde pBAD-klon-38 plazmidinin aktarıldığı bakteriler de hem ampisilinli hem de ampisilinsiz besiyerlerinde büyüyerek koloni oluşturmuşlardı.

Bu sonuçlar negatif kontrol olarak kullanılan bakterilerin canlı olduğunu ancak ampisiline direnç genini kodlayan herhangi bir plazmidi içermediklerinden dolayı ampisilinli besiyerinde üreyemediklerini, pozitif kontrol olarak kullanılan bakterilerin (pBR plazmidini aktarılmış bakteriler) plazmid transformasyonu başarıyla gerçekleştiği için ampisilinli besiyerinde üreyip koloni oluşturabildiklerini, pBAD-klon-38 plazmidinin aktarıldığı bakterilerde de transformasyonun başarıyla gerçekleştiğini ve ampisilinli besiyerinde üreyip koloni oluşturabildiklerini göstermektedir (Şekil 3.9).

Çizelge 3.6. Transformasyon sonuçları

Plazmid Hücre	-		pBR		pBAD-Klon-38	
Bakteri	K12	XL1Blue	K12	XL1Blue	K12	XL1Blue
LBM'de Büyüme	Var	Var	Var	Var	Var	Var
LBM+Amp'de Büyüme	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var



Şekil 3.9. XLBlue bakterisine transformasyon sonucu kolonilerin ampisilinli (a, b ve d) ve ampisilinsiz (c) LB besiyortamlarında büyümesi. pBR/XLBlue (a), pBAD-38/XLBlue (b), plazmid içermeyen XLBlue (c ve d).

3.2.3. Transformasyon sonrası plazmidlerin saflaştırılması

Pozitif kontrol olan pBR ile pBAD-klon-38 plazmidlerinin bakterilere transformasyonu yapıldıktan sonra 37°C'de bir gece inkübatörde bırakılarak bakterilerin çoğalması sağlandı. Uygun koşullarda bakterilerin çoğalması sırasında kromozomal replikasyon ile beraber plazmid replikasyonu da gerçekleşmektedir.

Plazmid saflaştırılması için pBAD-klon-38 ile pBR plazmidlerinin aktarıldığı bakteriler bir gece 37°C'lik sıcaklıkta inkübe edildi. Çoğalan bakterilerden plazmidlerin saflaştırılması Cyclo-Prep metodu ile gerçekleştirildi. Saflaştırılan plazmidler %0.8'lik olarak hazırlanmış agaroz jel üzerinde elektroforezde koşturuldu ve daha sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon cihazı ile görüntüledi.

PBAD-klon38 plazmidi EcoRI ve XhoI DNA kesim enzimleri ile kesildikten sonra jel elektroforezi ile ayrıştırılarak jel görüntüleme ve dökümantasyon cihazı ile incelendi. Bu iki enzimin 1,6 kb kadar büyüklüğündeki klon-38 cDNA'sını pBAD plazmidinden çıkardığı görüldü.



3.3. Tartışma

Canlı metabolizmasının en ilginç özelliklerinden biri kuşkusuz hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimidir. Hücrelerin bölünmesi, olgunlaşması, dokuya veya gelişim evresine özgü hücre farklılaşması v.b. gibi temel canlılık fonksiyonları kontrollü sinyallerin iletimi aracılığı ile sağlanmaktadır (Guthridge ve ark., 1998). Bu nedenle ki hücre içi veya hücreler arası sinyal iletimi ile ilgili araştırmalar özellikle son yıllarda oldukça artmıştır. Yapılan çalışmaların çoğu hormon ve sitokin gibi hücreler arası sinyali sağlayan moleküller, bunların reseptörleri ve hücrelerin içinde sinyalleri oluşturup iletme mekanizmaları üzerine odaklanmaktadır. Bu moleküllerden biri olan IL-5 özellikle eozinofillerin son dönem farklılaşmasını ve hücrelerin dolaşıma salınmasını uyarması bakımından önemli bir yere sahip bir sitokindir (Denburg, 1996).

İnsanlar üzerine yapılan çalışmalarda astım ile IL-5 arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Kotsimbos ve Hamid, 1997). Bu ilişki IL-5'in eozinofillerin olgunlaşmasındaki rollerine dayanmaktadır. Dokuda IL-5 miktarı fazlalaştığında fazla sayıda eozinofilin olgunlaşıp dolaşıma katılmaları durumu gözlenir ki bu durum astım hastalığı'nın gelişmesi ve ilerlemesi için oldukça önemlidir. Atopik astımlı hastaların bronşiyal mukozasından alınan örneklerde IL-5 miktarının arttığı (Hamid ve ark., 1991), atopik astımdan farklı olarak yetişkin dönemde başlayan (Kotsimbos ve Hamid, 1997) intrinsik astım'da ise bronkoalveolar sıvısı ve bronşiyal biyopsi örneklerinde T lenfositlerin ve özellikle de eozinofillerin arttığı gözlenmiştir (Marini ve ark., 1992; Bentley ve ark., 1993). Aynı şekilde akciğer alveollerinde toplanan eozinofillerin miktarıyla alveollerdeki doku tahribatı ve dolayısıyla astımın şiddeti arasında ciddi bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Papiris ve ark., 2002).

IL-5 molekülü biyolojik etkisini hedef hücreler üzerinde bulunan kendi reseptörüne (IL-5R) bağlanarak oluşturur (Sanderson, 1992). Bu bağlanma ile beraber gerek reseptörün sitoplazmik kısımlarına bağlı bazı moleküller ve gerekse de sitoplazmadaki bazı adaptör proteinler sinyalin iletilmesinde görev alırlar (Adachi ve Alam, 1998). Bu ilişki göz önüne alındığında IL-5R ile bağlantı kuran moleküllerin

IL-5R ile sinyal iletim yollarından en az birine katılması ve dolayısıyla astım patogenezinde rol alması kuvvetli bir olasılıktır.

IL-5 reseptörüne bağlanarak hücre içi sinyalizasyonda görev alan yeni moleküllerin klonlanması için maya ikili-hibrid sistemi kullanılarak yeni bazı cDNA'lar belirlenmiştir (Cen, 2001). Bu klonlardan bir tanesi (klon-38) bu tez çalışmasında ele alındı. Yapılan karşılaştırmada bu cDNA geninin insan, fare ve sıçanda yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Varışlı ve ark., 2004). Klon-38 ile ilgili bir başka çalışmada da bu klona karşılık gelen EST'lerin vücutta tek bir organda değil aksine birçok organda sentezlendiği belirlenmiştir (Varışlı ve ark., 2003). Bu sonuç klon-38'in canlılarda yüksek derecede korunmuş olduğunu ve bu nedenle de hücre içinde önemli bir fonksiyonu olabileceğini işaret etmektedir.

Klon-38'i içeren plazmidin bakteri hücrelerine transformasyonunun yapılması bu klon ile ilgili ileride yapılması düşünülen çalışmalar açısından önemlidir. pBAD plazmidini içerisinde bulunan klon-38 cDNA'sının EcoRI ve XhoI kesim (restriksiyon) enzimleri ile kesilerek serbest bırakılmış olması daha sonra yapılacak olan ayrıntılı moleküler çalışmalar için uygun cDNA eldesini kolaylaştırmıştır. Bu plazmidin saflaştırılmasıyla ileride yapılması düşünülen daha ayrıntılı çalışmalar için hazır cDNA elde edilmiştir.

Klon-38'in eşleştiği FLJ90024 geninin kodladığı proteinlerin G proteine bağlı reseptör süper-ailesine ait proteinlerin fingerprint elementlerini taşımaları, bu protein moleküllerinin hücre zarına yerleşen ve hücre zarını beş veya altı kez geçen transmembran bölgelere sahip olmaları, fosforilasyon ve glikozilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar geçirmeleri bu moleküllerin ve dolayısıyla klon-38'in kodlayacağı proteinin büyük bir olasılıkla G proteine bağlı reseptör olabileceği ve hücre içi sinyal iletiminde önemli bir görev alabileceğine işaret etmektedir.

Eğer daha ayrıntılı deneylerle klon-38'in G proteine bağlı bir reseptör kodladığı gösterilirse ve FLJ90024 geni ile yapılacak transgenik veya knock-out çalışmaları bu genin astım patogenezinde rol aldığını ortaya çıkarırsa, klon-38'in

kodladığı moleküle özgü ilaç geliştirilmesi ile astım tedavisinde yeni bir yaklaşım geliştirilebilir. Çünkü günümüzde kullanılan bazı ilaçlar hücre zarına yerleşmiş olan G proteine bağlı reseptörler ile etkileşim mekanizması üzerine tasarlanmıştır.

Sinyal moleküllerinin belirlenmesinde ve karakterize edilmesinde deneysel metotlar her ne kadar son aşama için gerekliyse bile bunların çalışılması oldukça pahalı ve zaman alıcıdır. Böyle moleküllerin belirlenip karakterize edilmesinde biyoinformatik araçlar hem ekonomik açıdan hem de zaman bakımından büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bu nedenle klon-38'in karakterize edilmesinde biyoinformatik araçlar kullanıldı.

Klon-38 IL-5R'nün α alt ünitesiyle bağlantı kuran aday bir molekül olarak elde edildiğinden IL-5R ile sinyal iletim mekanizmasında görev alması olasıdır. IL-5R ile bağlantı kuran moleküllerin astım patogeneğinde rol alması görüşüne dayanarak klon-38'in de astım patogeneğinde rol alan bir sinyal molekülü olması düşünülebilir. Bu durumda bu klonun geninin karakterizasyonu astım tedavisine yönelik çalışmalara bir zemin oluşturabilir.

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Klon-38'in yapılan BLAST araştırmasında gen bankasında bu klon ile yüksek orandaki benzerlik ile eşleşen dört adet mRNA molekülü belirlenmiştir. Bu mRNA moleküllerinin ayrı ayrı BLAST yapılması sonucu hepsinin FLJ90024: Fasting-inducible integral membrane protein TM6P1 isimli bir genin alternatif splicing sonucu oluşmuş izoformları olduğu belirlenmiştir.

FLJ90024 geninin 2. kromozomun p11.2 bölgesinde 5000 nükleotidlik bir alan (64641 Kb – 64646 Kb) kapladığı ve bu bölge ile Plus/Minus (+/-) şeklinde eşleştiği görülmüştür. Oluşturulan gen haritasında alternatif splicing bölgeleri net olarak belirlenmiştir.

FLJ90024 geninin farklı transkriptlerinin kodlayacağı proteinlerin yüksek oranda birbirleri ile benzer oldukları görülmüştür. Ayrıca yapılan sekonder yapı analizinde her dört proteinin de ağırlıklı olarak rastgele kıvrım (random coil) ve alfa heliks yapısından meydana geldikleri ve bu yapıda da birbirlerine çok benzedikleri görülmüştür.

Her dört proteinin de muhtemelen hücre zarına yerleştiği ve üçünün altı ve birinin de beş sefer hücre zarını geçen transmembran bölgelere sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlar dışında bütün proteinlerin G proteine bağlı reseptör süper ailesine ait motifler taşıdığı ve ayrıca bir fonksiyonu bilinmeyen domeyne sahip olduğu görülmüştür. Posttranslasyonel modifikasyon olarak her dört proteinin de fosforilasyon, N ve O glikozilasyon ve miristilasyon bölgelerine sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak her dört proteinin de transmembran bölgelere sahip olmaları ve G proteine bağlı reseptör süper ailesine ait motifler taşımaları bu proteinlerin hücre içi

sinyal iletiminde görev alan ve hücre zarını birkaç sefer geçen G proteine bağlı reseptör olma olasılığını ortaya çıkarmaktadır ki bu sonuç klon-38 için başlangıçta düşünülen bir sinyal molekülü olma olasılığını oldukça güçlendirmektedir. Her dört proteinin de hücre içi bölgelerde fosforilasyon ve hücre dışı bölgelerde N ve O glikozilasyon bölgelerine sahip olmaları bu olasılığı daha da arttırmaktadır. Çünkü hücre içi sinyal iletiminde görev alan moleküller hücre dışı bölgelerde glikozilasyona uğrayarak işlevsel açıdan daha çok yetkinleşir ve hücre içi kısımlarda da fosforlaşarak aktifleşirler. Proteinler bu şekilde alınan sinyalin sonraki moleküllere aktarılmasını ve dolayısıyla sinyalin iletilmesini sağlamaktadırlar. Proteinlerde miristilasyon bölgelerinin bulunması hücre zarına yerleşen proteinlere ait bir özelliktir. Hücre zarına yerleşecek proteinler N ucunda glisin aminoasidinden koparak zara bağlanırlar ve burada olgunlaşarak görev yaparlar.

Klon-38'e karşılık gelen genin G proteine bağlı reseptör süper ailesine ait dört izoform proteini kodlaması bu klon için önerilen astımın patogenezinde rol alan bir sinyal molekülü görüşü için heyecan vericidir. Ancak biyoinformatik araçlar ile yapılan analizlerin deneysel olarak desteklenmesi gerekmektedir. Bu veriler deneysel sonuçlarla desteklendiğinde bu proteinler astım tedavisi için birer hedef molekül olarak kullanılabilir. Çünkü günümüzde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı özel bir veya birkaç G proteine bağlı reseptörü bloke etme veya uyarma amacıyla kullanılmaktadır. Eğer deneysel sonuçlar da bu proteinlerin astım patogenezinde rol alan sinyal molekülleri olduğunu gösterirse bunlara özgü hedef ilaçların geliştirilmesiyle astım ve alerjinin tedavisinde yeni ilaç veya ilaçlar geliştirilebilir. Şayet doğrulanırsa bu reseptör molekülünün ligandının belirlenmesi önemli bir aşama olur. Ayrıca molekülün üç boyutlu yapısının belirlenmesi görevi açısından önemlidir.

Klon-38'i içeren pBAD plazmidinin bir bakteri ırkına transformasyonunun yapılması ve bu bakterilerde çoğaltılması ileriki çalışmalarda bu klon ile yapılacak çalışmalar için önemlidir. Çünkü bu plazmidin ve dolayısıyla plazmidin içindeki klon-38'in saflaştırılması bu klonu gerek ekspresyon çalışmaları ve gerekse de diğer çalışmalar için hazır hale getirmiştir.

KAYNAKLAR

- ADACHI, T., and ALAM, R., 1998. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 275; 623-633
- ADAMS, M. D., KELLEY, J. M., GOCAYNE, J. D., DUBNICK, M., POLYMEROPOULOS, M. H., XIAO, H., and et al., 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252; 1651-1656
- ALBERMANN, K., FRISHMAN, D., VOLZ, A., MOKREJS, M., WAGNER, C., KOSYKH, D., FELLEBERG, M., KASTENMULLER, G., HEUMANN, K., KOLESOV, G., MEWES, H-W., ZUBRZYCKI, I., GRUBER, C., GEIER, B., and KAPS, A., 2003. The PEDANT genome database. *Nucleic Acids Research*, 31; 207-211
- ALTSCHUL, S. E., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. and LIPMAN, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215; 403-410
- ANONYMOUS, 2000. Two or three myths about bioinformatics. *Bioinformatics*, 16; 187-189
- ANONYMOUS, 2001. PlasmoDB: An integrative database of the plasmodium falciparum genome. Tools for accessing and analyzing finished and unfinished sequence data. *Nucleic Acids Res.*, 29; 66-69
- APWEILER, R., BAIROCH, A., WU, C. H., BARKER, W. C., BOECKMANN, B., FERRO, S., GASTEIGER, E., HUANG, H., LOPEZ, R., MAGRANE, M., MARTIN, M. J., NATALE, D. A., O'DONOVAN, C., REDASCHI, N., and YEY, L. S., 2004. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 32; 115-119
- ATTWOOD, T. K., and BECK, M. E., 1994. PRINTS - A protein motif fingerprint database. *Protein Engineering*, 7; 841-848
- BACKER, J.M., MYERS, M. G., SHOELSON, S. E., CHIN, D. J., SUN, X. J., MIRALPEIX, M., HU, P., MARGOLIS, B., SKOLNIK, E. Y., and SCHLESSINGER, J., 1992. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO*, 11; 3469-3479
- BAIROCH, A., and APWEILER, R., 1996. The Swiss-Prot protein sequence data bank and its new supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res.*, 24; 21-25
- BARKER, W. C., GARAVELLI, J. S., HUANG, H., MCGARVEY, P.B., ORCUTT, B.C., SRINIVASARAO, G. Y., XIAO, C., YEY, L. L., LEDLEY, R.S. JANDA, J.F., PFEIFFER, F., MEWES, H., TSUGITA, and WU, C., 2000. The Protein Information Resource (PIR) *Nucleic Acids Res.*, 28; 41-44
- BARNES, P. J., 2001. TH2 cytokines and asthma. *Respir. Res.*, 2; 64-65
- BARNES, P. J., and ADCOCK, J. M., 1998. Transcription factors and asthma. *Eur. Respir. J.*, 12; 221-234
- BATENBURG, V. F. H., GULTYAEV, A. P., PLEIJ, C. W., and OLIEHOEK, J., 2000. PseudoBase: a database with RNA pseudoknots. *Nucleic Acids Res.*, 28; 201-204
- BAYAT, A., 2002. Science , medicine and future: Bioinformatics. *BMJ*, 324: 1018-1022
- BAZAN, J. F., 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87; 6934-6938

- BEASLEY, R., CRANE J., LAI, C. K. V. and PEARCE, N., 2000. Prevalence and Etiology of Asthma. *J. Allergy and Clinic Immunology*, 105; 466 – 472
- BENTLEY, A. M., MENG, Q., ROBINSON, D. S., HAMID, Q., KAY, A. B., and DURHAM, S. R., 1993. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for Interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen challenge in atopic asthmatics. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, 8; 35-42
- BENTON, D., 1996. Bioinformatics--principles and potential of a new multidisciplinary tool. *Trends Biotechnol.*, 14; 261-72
- BLOM, N., GAMMELTOFT, S., and BRUNAK, S., 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294; 1351-1362
- BRIZZI, M. F., ARONICA, M. G., ROSSO, A., BAGNARA, G. P., YARDEN, Y., and PEGORARO, L., 1996. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates Jak2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 271; 3562-3567
- BUCHAN, D. W., SHEPHERD, A. J., LEE, D., PEARL, F. M., RISON, S. C., THORNTON, J. M., and ORENKO, C. A., 2002. Gene3D: structural assignment for whole genes and genomes using the CATH domain structure database. *Genome Res.*, 12; 503-14
- BURSET, M., SELEDTSOV, I. A., and SOLOVYEV, V. V., 2001. SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res.*, 29; 255-259
- CEN, O., 2001. Cloning and Characterization of IRIP. University of Texas Medical Branch at Galveston, Dissertation, 114p.
- CEN, O., MAGDALENA, M., GORSKA, M., STAFFORD, S. J., SUR, S., and ALAM, R., 2003. Identification of UNC119 as a Novel Activator of SRC-type Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.*, 278; 8837–8845
- CHANG, L., and KARIN, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410; 37 – 40
- CHERRY, J. M., ADLER, C., BALL, C., CHERVITZ, S. A., DWIGHT, S. S., HESTER, E. T., JIA, Y., JUVIK, G., ROE, T., SCHROEDER, M., WENG, S., and BOTSTEIN, D., 1998. SGD: Saccharomyces Genome Database. *Nucleic Acids Res.*, 26; 73-80
- CHUNG, K. F., and BARNES P. J., 1999. Cytokines in Asthma. *Torax*, 54; 825-857
- COATES, P. J., and HALL, P. A., 2003. The yeast two-hybrid system for identifying protein–protein interactions. *J. Pathol.*, 199; 4–7
- COHEN, S. N., CHANG, A.C.Y., and HSU, L., 1972. "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2114
- COOPER, C. A., HARRISON, M. J., WILKINS, M. R., and PACKER, N.H., 2001, GlycoSuiteDB: a new curated relational database of glycoprotein glycan structures and their biological sources. *Nucleic Acids Res.*, 29; 332-335
- CORPET, F., SERVANT, F., GOUZY, J., and KAHN, D., 2000. ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res.*, 28; 267-269

- COUR, T. L., GUPTA, R., RAPACKI, K., SKRIVER, K., POULSEN, F. M., and BRUNAK, S., 2003. NESbase version 1.0, a database of Nuclear Export Signals. *Nucleic Acids Res.*, 31; 393-396
- DEGTYARENKO, K. N., NORTH, A. C. T. and FINDLAY, J. B. C., 1997. PROMISE: a new database of information on prosthetic centres and metal ions in protein active sites. *Protein Engineering*, 10; 183-186
- DELEAGE, G., BLANCHET, C., and GEOURJON, C., 1997. Secondary consensus prediction Protein structure prediction. Implications for the biologist. *Biochimie*, 79; 681-686
- DELLAIRE, G., FARRALL, R., and BICKMORE, W. A., 2003. The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome. *Nucl. Acids Res.*, 31(1); 328-330.
- DENBURG, J. A., 1996. The inflammatory response. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 153; 11-13
- DUARTE, J., PERRIÈRE, G., LAUDET, V., and ROBINSON-RECHAVI, M., 2002. NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. *Nucleic Acids Research*, 30; 364-368
- ENGLBRECHT, C.C., HAN, M., MADER, M.T., OSANGER, A., and MAYER, K. F. X., 2004. Curated databases and their role in clinic bioinformatics. *Yearbook of Medical Informatics*, 121-136
- FACCHIANO, A., FACCHIANO, A., and FACCHIANO, F., 2003. ASC (Active Sequences Collection) database as a new tool to assign functions to protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 31; 379-382
- FIELDS, S., and SONG, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.*, 20; 340; 245-246.
- FILIPOVIĆ, M., and CEKIĆ, S., 2001. The role of eosinophils in asthma. *FACTA Universitatis Series: Medicine and Biology*, 8; 6 – 10
- FLEISCHMANN, W., MOELLER, S., GATEAU, A., and APWEILER, R., 1999. A novel method for automatic functional annotation of proteins. *Bioinformatics*, 15; 228-233
- FLEISHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O., CLAYTON, R. A., KIRKNESS, E. F., KERLAVAGE, A. R., BULT, C. J., TOMB, J. F., DOUGHERTY, B. A., and et al., 1995. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science*, 269; 496-512
- FLEMING, K., MULLER, A., MACCALLUM, R. M., and STERNBERG, M. J. 2004. 3D-GENOMICS: a database to compare structural and functional annotations of proteins between sequenced genomes. *Nucleic Acids Research*, 32; 245-250
- FRISHMAN, D., MOKREJS, M., KOSYKH, D., KARSTENMULLER, G., KOLESOV, G., ZUBRZYCKI, I., GRUBER, C., GEIER, B., KAPS, A., VOLZ, A., WAGNER, C., FELLEBERG, M., HEUMANN, K., and MEWES, H.-W., 2003. The Pedant genome database , *Nucleic Acids Res.*, 31; 207-211
- GALPERIN, M. Y., 2003. The Molecular Biology Database Collection: 2004 update. *Nucleic Acids Research*, 32; 3-22
- GATTIKER, A., GASTEIGER, E., and BAIROCH, A., 2002. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinformatics*, 1; 107-108

- GELBART, W. M., CROSBY, M., MATTHEWS, B., RINDONE, W. P., CHILLEMI, J., RUSSO-TWOMBLY, S., EMMERT, D., ASHBURNER, M., DRYSDALE, R. A., WHITFIELD, E., MILLBURN, G. H., DE-GREY, A., KAUFMAN, T., MATTHEWS, K., GILBERT, D., STRELETS, V., and TOLSTOSHEV, C., 1997. FlyBase: a *Drosophila* database. The FlyBase consortium. *Nucleic Acids Res.*, 25; 63-66
- GEOURJON, C., and DELEAGE, G., 1994. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Engineering*, 7; 157-164
- GEOURJON, C., and DELEAGE, G., 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, 11; 681-684.
- GOLEMIS, E. A., GYURIS, J. and BRENT, R., 1996. Analysis of protein interactions; and interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), Ch. 20.0 and 20.1
- GOPALAN, V., TAN, T. W., LEE, B. T. K., and RANGANATHAN, S., 2004. Xpro: database of eukaryotic protein-encoding genes. *Nucleic Acids Res.*, 32; 59-63.
- GORSKA, M. M., STAFFORD, S. J., CEN, O., SUR, S., and ALAM, R., 2004. Unc119, a Novel Activator of Lck/Fyn, Is Essential for T Cell Activation. *J.Exp.Med.*, 199: 369-379.
- GOTO, S., NISHIOKA, T., and KANEHISA, M., 1998. LIGAND: Chemical Database for Enzyme Reactions. *Bioinformatics*, 14; 591-599.
- GOUGH, J., KARPLUS, K., HUGHEY, R. and CHOTHIA, C., 2001. Assignment of Homology to Genome Sequences using a Library of Hidden Markov Models that Represent all Proteins of Known Structure. *J. Mol. Biol.*, 313; 903-919.
- GREENFEDER, S., UMLAND, S. P., CUSS F. M., CHAPMAN R. W., and EGAN R. W., 2001. The role of IL-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir. Res.*, 2; 71-79.
- GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C., and GELBART, W. M., 1999. *Introduction to Genetic Analysis*. 7th ed., W. H. Freeman & Company press, New York, USA, 916p.
- GRIFFITHS-JONES, S., BATEMAN, A., MARSHALL, M., KHANNA, A., and EDDY, S. R., 2003. Rfam: An RNA family database. *Nucleic Acids Res.*, 31; 439-441.
- GUERMEUR, Y., 1997. HNN Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines. University of Paris. PhD Thesis, 128p.
- GUEX, N., and PEITSCH, M. C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 18; 2714-2723.
- GUO, T., HUA, S., JI, X., and SUN, Z., 2004. DBSubLoc: database of protein subcellular localization, *Nucleic Acids Res.*, 32; 122-124.
- GUPTA, R., BIRCH, H., RAPACKI, K., BRUNAK, S. and HANSEN, J. E., 1999. O-GLYCBASE version 4.0: A revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Research*, 27; 370-372.

- GUTHRIDGE, M. A., STOMSKI, F. C., THOMAS, D., WOODCOCK, J. M., BAGLEY, C. J., BERNDT, M. C., and LOPEZ, A. F., 1998. Mechanism of Activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Receptors. *Stem Cells*, 16; 301-313.
- GYURIS, J., GOLEMIS E., CHERTKOV, H., and BRENT, R., 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, 19; 791-803.
- HAMID, Q., AZZAWI, M., SUN, Y., MOQBEL, R., WARDLAW, A. J., CORRIGAN, C. J., BRADLEY, B., DURHAM, S. R., COLLINS, J. V., JEFFERY, P. K., QUINT, D. J., and KAY, A. B., 1991. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J. Clin. Invest.*, 87; 1541-1546.
- HANSEN, J. E., LUND, O., TOLSTRUP, N., GOOLEY, A. A., WILLIAMS, K. L., and BRUNAK, S., 1998. NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj. J.*, 15; 115-30.
- HASHIMOTO, K., HAMAJIMA, M., and GOTO, S., 2003. GLYCAN: The Database of Carbohydrate Structures. *Genome Informatics*, 14; 649-650
- HELDIN, C. H., 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80; 213-23.
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22; 4673-4680.
- HIROKAWA, T., BOON-CHIENG, S., and MITAKU, S., 1998. SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. *Bioinformatics*, 14; 378.
- HORN, F., VRIEND, G. and COHEN, F. E., 2001. Collecting and Harvesting Biological Data: The GPCRDB & NuclearDB Databases. *Nucleic Acids Res.*, 29; 346-349.
- HUANG, Y. H., CHEN, Y. T., LAI, J. J., YANG, S. T., and YANG, U. C., 2002. PALS db: Putative Alternative Splicing database. *Nucleic Acids Res.*, 30; 186-190.
- ITOH, T., LIU, R., YOKOTA, T., ARAI, K. I., and WATANABE S., 1998. Definition of the Role of Tyrosine Residues of the Common β Subunit Regulating Multiple Signaling Pathways of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor. *Mol. Cell Biol.*, 18; 742-752.
- J. Y., HUANG, D. L., and BRUTLAG, 2001, The eMOTIF Database, *Nucleic Acids Res.*, 29; 202-204.
- JACOBS, G. H., STOCKWELL, P. A., SCHRIEBER, M. J., TATE, W. P., and BROWN, C. M., 2000. Transterm: a database of messenger RNA components and signals. *Nucleic Acids Res.*, 28; 293-295.
- KAMINSKI, N., 2000. Bioinformatics: A user's perspective. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 23; 705-711.
- KANEHISA, M., and BOORK, P., 2003. Bioinformatics: in the post sequence era. *Nature Genetics Supplement*, 33; 305-310.

- KAPPELLER, R., and CANTLEY, L. C., 1994. Phosphatidylinositol 3- kinase. *Bioessays*, 16; 565–576.
- KATSO, R., OKKENHAUG, K., AHMADI, K., WHITE, S., TIMMS, J., and WATERFIELD, M. D., 2001. Cellular function of phosphoinositide 3- kinases: Implications for development, immunity, homeostasis and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17; 615-675.
- KAYAALP, S. O., 2000, Rasyonel Tedavi Yöntünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt I. 9.Baskı. Ankara, 1736s.
- KEL, A. E., KOLCHANOV, N. A., KEL, O. V., ROMASHCHENKO, A. G., ANANKO, E. A., IGNATEVA, E. V., MERKULOVA, T. I., PODKOLODNAIA, O. A., STEPANENKO, I. L., KOCHETOV, A. V., KOLPAKOV, F. A., PODKOLODNYI, N. L., and NAUMOCHKIN, A. A., 1997. TRRD: a database of transcription regulatory regions in eukaryotic genes. *Mol. Biol (Mosk)*., 31; 626-636.
- KEL-MARGOULIS, O. V., KEL, A. E., REUTER, I., DEINEKO, I. V., and WINGENDER, E., 2002. TRANSCompel: a database on composite regulatory elements in eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res.*, 30; 332-334.
- KISSELEVA, T., BHATTACHARYA, S., BRAUNSTEIN, J., and SCHINDLER, C. W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future Challenges. *Gene*, 285; 1–24.
- KITAMURA, T., SATO, N., ARAI, K., and MIYAJIMA, A., 1991. Expression Cloning of the Human IL-3 Receptor cDNA Reveals a Shared Beta Subunit for the Human IL-3 and GM-CSF Receptors. *Cell.*, 66; 1165-1174.
- KLEYWEGT, G. J., and JONES, T.A., 1998. Databases in protein crystallography. *Acta Cryst.*, 54; 1119-1131.
- KOTSIMBOS, A. T. C., and HAMID, Q., 1997. IL–5 and IL– 5 Receptor in Asthma. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 92; 75-91
- KRASILNIKOV, M. A., 2000. Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: the Role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant Transformation. *Biochemistry (Moscow)*, 65; 59-67.
- KREEGIPUU, A., BLOM, N., and BRUNAK, S., 1999. PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res.*, 27; 237-239.
- KRIVENTSEVA, E. V., FLEISCHMANN, W, ZDOBNOV, E. M., and APWEILER, R., 2001. CluSTr: a database of clusters of SWISS-PROT+TrEMBL proteins. *Nucleic Acids Res.*, 29; 33-36.
- KYRIAKIS, J. M., and AVRUCH, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.*, 81; 807–869.
- KYTE, J., and DOOLITTLE, R. F., A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132
- LEONARD, W. J., and O'SHEA, J. J., 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.*, 16; 293-322.
- LEVINTHAL, C., 1966. Molecular Model-Building by Computer. *Scientific American*, 214; 42-52.
- LI, Y., SHEN, B. F., KARANES, C., SENSENBRENNER, L., and CHEN, B., 1995. Association between Lyn protein tyrosine kinase (p53/56lyn) and the β subunit of the granulocyte-macrophage colonystimulating factor (GM-CSF)

- receptors in a GM-CSF-dependent human megakaryocytic leukemia cell line (M-07e). *J. Immunol.*, 154; 2165-2174.
- LIU, K. D., GAFFEN, S. L., and GOLDSMITH, M. A., 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors *Current Opinion in Immunology*, 10; 271-278.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., and DARNELL, J. E., 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th ed., W. H. Freeman & Company press., New York, USA, 1616p
- LOPEZ, A. F., VADAS, M. A., WOODCOCK, J. M., MILTON, S. E., LEWIS, A., ELLIOTT, M. J., GILLIS, D., IRELAND, R., OLWELL, E., and PARK, L. S., 1991. IL-5, IL-3, and GM-CSF cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol. Chem.*, 266; 24741-24747.
- MAIDAK, B. L., OLSEN, G. J., LARSEN, N., OVERBEEK, R., MCCAUGHEY, M. J., and WOESE, C. R., 1997. The RDP. *Nucleic Acids Res.*, 25; 109-111.
- MANDEL, M., and HIGA, A., 1970. "Calcium dependent bacteriophage DNA infection", *J. Mol. Biol.* 53: 154-159
- MARCHLER-BAUER, A., ANDERSON, J. B., DEWEESE-SCOTT, C., FEDOROVA, N. D., GEER, L. Y., HE, S., HURWITZ, D. I., JACKSON, J. D., JACOBS, A. R., LANCZYCKI, C. J., LIEBERT, C. A., LIU, C., MADEJ, T., MARCHLER, G. H., MAZUMDER, R., NIKOLSKAYA, A. N., PANCHENKO, A. R., RAO, B. S., SHOEMAKER, B. A., SIMONYAN, V., SONG, J. S., THIESSEN, P. A., VASUDEVAN, S., WANG, Y., YAMASHITA, R. A., YIN, J. J., and BRYANT, S. H., 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.*, 31; 383-387.
- MARINI, M., AVONI, E., HOLLEMBORG, J., and MATTOLI, S., 1992. Cytokine mRNA profile and cell activation in bronchoalveolar lavage fluid from nonatopic patients with symptomatic asthma. *Chest.*, 102; 661-669.
- MATYS, V., FRICKE, E., GEFFERS, R., GOSSLING, E., HAUBROCK, M., HEHL, R., HORNISCHER, K., KARAS, D., KEL, A. E., KEL-MARGOULIS, O. V., KLOOS, D. U., LAND, S., LEWICKI-POTAPOV, B., MICHAEL, H., MUNCH, R., REUTER, I., ROTERT, S., SAXEL, H., SCHEER, M., THIELE, S., and WINGENDER, E., 2003. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.*, 31(1); 374-378.
- MIDDLETON, E., ELLIS, E. F., YUNGINGER J. W., REED, C. E., ADKINSON, N. F., and BUSSE, W. W., 1998. *Allergy: Principles and practice*. Mosby, 1440p.
- MIGITA, M., YAMAGUCHI, N., MITA, S., HIGUCHI, S., HITOSHI, Y., YOSHIDA, Y., TOMONAGA, M., MATSUDA, I., TOMINAGA, A., and TAKATSU, K., 1991. Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils. *Cellular Immunology*, 133; 484-497.
- MIYAJIMA, A., KITAMURA, T., HARADA, N., YOKOTA, T., and ARAI, K., 1992. Cytokine receptors and signal transduction. *Ann. Rev. Immunol.*, 10; 295-331.
- MOHSENI-ZADEH, S., LOUIS, A., BREZELLE, P., and RISLER, J. L., 2004. PHYTOPROT: a database of clusters of plant proteins. *Nucleic Acids Res.*, 32; 351-353.

- MURATA, Y., TAKAKI, S., MIGITA, M., KIKUCHI, Y., TOMINAGA, A., and TAKATSU, K., 1992. Molecular Cloning and Expression of the Human Interleukin 5 Receptor. *J. Exp. Med.*, 175; 341-351.
- MURZIN, A. G., BRENNER, S. E., HUBBARD, T., and CHOTHIA, C., (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, 247; 536-540.
- NAIR, R., CARTER, P., and ROST, B., 2003. NLSdb: database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res.*, 31; 397-399.
- NAKAI, K., KIDERA, A., and KANEHISA, M., 1988. Cluster analysis of amino acid indices for prediction of protein structure and function. *Protein Eng.*, 2; 93-100.
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T., HIROSAWA, M., MIYAJIMA, N., and TABATA, S., 1998 CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucleic Acids Res.*, 26; 63-67.
- OLIVA, B., BATES, P. A., QUEROL, E., AVILES, F. X., and STERNBERG, M. J., 1997. An automated classification of the structure of protein loops. *J. Mol. Biol.*, 266; 814-30.
- ORTMANN, R. A., CHENG, T., VISCONTI, R., FRUCHT, D. M., and O'SHEA, J. J., 2000. Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Res.*, 2; 16-32.
- OUZOUNIS, C. A., and VALENCIA, A., 2003. Early bioinformatics: the birth of a discipline a personal view. *Bioinformatics*, 19; 2176-2190.
- PAGNI, M., ISELLI, C., JUNIER, T., FALQUET, L., JONGENEEL, V. and BUCHER, P., 2001. TrEST, trGEN and Hits; Access to databases of predicted protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 29; 148-151.
- PAPIRIS, S., KOTANIDOU, A., MALAGARI, K. and ROUSSOS. C., 2002. Clinical review: Severe asthma. *Crit. Care*, 6; 30-44.
- PARK, K. J., and KANEHISA, M., 2003. Prediction of protein subcellular locations by support vector machines using compositions of amino acids and amino acid pairs. *Bioinformatics*, 19; 1656-1663.
- PAWSON T., and SCOTT J. D., 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278; 2075-2080.
- PIETROKOVSKI, S., HENIKOFF, J. G., and HENIKOFF, S., 1996. The Blocks database, a system for protein classification. *Nucleic Acids Res.*, 24(1); 197-200.
- QUELLE, F. W., SATO, N., WITTHUHN, B. A., INHORN, R. C., EDER, M., MIYAJIMA, A., GRIFFIN, J. D., and IHLE, J. N., 1994. JAK2 associates with the β c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane proximal region. *Mol. Cell. Biol.*, 14; 4335-4341.
- RAY, W. C., and DANIELS, C. J., 2003. PACRAT: a database and analysis system for archaeal and bacterial intergenic sequence features. *Nucleic Acids Res.*, 31; 109-113.
- ROTHENBERG, M.E. 1998. Eosinophilia. *N. Engl. J. Med.*, 338; 1592-1600.
- RUDD, K. E., 2000. EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 28; 60-64.

- SAKAMAKI, K., MIYAJIMA, I., KITAMURA, T., and MIYAJIMA, A., 1992. Critical Cytoplasmic Domains of the Common Beta Subunit of the Human GM-CSF, IL-3 and IL-5 Receptors for Growth Signal Transduction and Tyrosine Phosphorylation. *EMBO J.*, 11; 3541-3549.
- SAKHARKAR, M., PASSETTI, F., DE SOUZA, J. E., LONG, M., and DE SOUZA, S. J., 2002. ExInt: an Exon Intron Database. *Nucleic Acids Res.*, 30; 191-194.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, New York, USA, 999p
- SANDERSON, J., 1992. Interleukin-5, Eosinophils and Disease. *Blood*, 79; 3101-3109.
- SARAI, A., GROMIHA, M. M., AN, J., PRABAKARAN, P., SELVARAJ, S., KONO, H., OOBATAKE, M., and UEDAIRA, H., 2001. Thermodynamic databases for proteins and protein-nucleic acid interactions. *Biopolymers*, 61; 121-126.
- SCHULER, G. D., 1997. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J. Mol. Med.*, 75; 694-698.
- SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., and PONTING, C. P., 1998 SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95; 5857-64.
- SCHWACKE, R., SCHNEIDER, A., VAN DER GRAAFF, E., FISCHER, K., CATONI, E., DESIMONE, M., FROMMER, W. B., FLUGGE, U. I., and KUNZE, R., 2003. ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol.*, 131; 16-26.
- SCHWERK, C., PRASAD, J., DEGENHARDT, K., ERDJUMENT-BROMAGE, H., WHITE, E., TEMPST, P., KIDD, V. J., MANLEY, J. L., LAHTI, J. M., and REINBERG, D., 2003. ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol.*, 23; 2981-2990.
- SILVERSTEIN, K. A., SHOOP, E., JOHNSON, J. E., and RETZEL, E. F., 2001. MetaFam: a unified classification of protein families. Overview and statistics. *Bioinformatics.*, 17; 249-61.
- SONNHAMMER, E., EDDY, S. R., and DURBIN, R., 1997. Pfam: A Comprehensive Database of Protein Families Based on Seed Alignments. *Proteins*, 28; 405-420.
- STUDIER, F.W., 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels, *J. Mol. Biol.* 79: 237-248
- SULLIVAN, S., SINK, D. W., TROUT, K. L., MAKALOWSKA, I., TAYLOR, P. M., BAXEVANIS A. D., and LANDSMAN, D., 2002. The Histone Database. *Nucleic Acids Res.*, 30; 341-342.
- SUZUKI, Y., YAMASHITA, R., NAKAI, K., and SUGANO, S., 2002. DBTSS: DataBase of human Transcriptional Start Sites and full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res.*, 30; 328-331.
- SZYMANSKI, M., and BARCISZEWSKI, J., 1999. The aminoacyl-tRNA Synthetase Data Bank (AARSDB). *Nucleic Acids Res.*, 27; 332-335.
- TAKAKI, S., MURATA, Y., KITAMURA, T., MIYAJIMA, A., TOMINAGA, A., and TAKATSU, K., 1993. Reconstitution of the functional receptors for murine and human interleukin 5. *J. Exp. Med.* 177; 1523-1529.

- TAKEDA, K., and AKIRA, S., 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 11; 199-207.
- TATUSOV, R. L., GALPERIN, M. Y., NATALE, D. A. and KOONIN, E. V., 2000 The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.*, 28; 33–36.
- TATUSOVA, T., KARSCH-MIZRACHI, I., and OSTELL, J., 1999. Complete genomes in WWW Entrez: data representation and analysis. *Bioinformatics*, 15; 536–543.
- THANARAJ, T. A., STAMM, S., CLARK, F., RIETHOVEN, J. J., LE, T. V., and MUILU, J., 2004. ASD: the Alternative Splicing Database. *Nucleic Acids Res.*, 32; 64-69.
- TUYPENS, T., PLAETINCK, G., BAKER, E., SUTHERLAND, G., BRUSSELLE, G., FIERS, W., DEVOS, R., and TAVERNIER, J., 1992. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene. *Euro. Cytokine Network.*, 3; 451-459.
- VARISLI, L., YILDIZ, H., and CEN, O., 2003. Characterization of a putative G-coupled transmembrane protein using bioinformatic tools. 2nd National Congress of Neuroscience, April 16-20, Neuroanatomy Supplement 1, Bursa, p.3.
- VARIŞLI, L., ÇEN, O., ve ALAM, R., 2004. Muhtemel bir reseptör genin insan, fare ve rattaki yapısı ve homolojisinin biyoinformatik araçlarla analizi. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran, Adana, s.18.
- VENTER, J. C., LEVY, S., STOCKWELL, T., REMINGTON, K., and HALPERN, A., 2003. Massive parallelism, randomness and genomic advances. *Nature Genetics*, 33; 219 – 227.
- WILLS-KARP, M., 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness, *Annu. Rev. Immunol.*, 17; 255-81.
- WU, C., SHIVAKUMAR, S., and HUANG, H., 1999. ProClass protein family database. *Nucleic Acids Research*, 27; 272-274.
- WU, C., XIAO, C., HOU, Z., HUANG, H., and BARKER, W.C. 2001. iProclass: an integrated, comprehensive and annotated protein classification database. *Nucleic Acids Res.*, 29; 52-54.
- YANG, S. H., SHARROCKS, A. D., and WHITMARSH, A. J., 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *GENE.*, 320; 3-21.
- YU, J., ZHANG, Y., MCILROY, J., RORDORF-NIKOLIC, T., ORR, G., A., and BACKER., J. M., 1998. Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 α Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. *Mol. Cell Biol.*, 18; 1379-1387.
- ZHANG, H., 2002. Bioinformatics in gene finding and database design: A pharmaceutical approach, Faculty of pharmacy and pharmaceutical sciences, Master thesis, Edmonton- Alberta, 1-7
- ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L. and MILLER, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7; 203–214

ÖZGEÇMİŞ

10.05.1977'de Mardin'in Derik ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Derik'te tamamladı. 1997 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2001 yılında buradan mezun oldu. 2002 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Eylül 2002'de Fen Edebiyat Fakültesine araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu görevine devam etmektedir.



ÖZET

Maya İkili Hibrid Sistemi ile İnterlökin-5 (IL-5) reseptörü (IL-5R)'nün alfa alt ünitesine (IL-5R α) bağlanan bir molekül olarak klonlanan klon-38'i biyoinformatik araçlar ile karakterize ettik. Bu klonun elimizdeki 446 baz çiftlik sekansını kullanarak BLAST araştırması ile geni tespit edildi. Bu gen insanın 2nci kromozomunun uzun kolu üzerinde (2p11) bulunmaktadır. Bu genin intron ve ekson bölgeleri MegaBLAST programı ile tespit edildi ve gen haritası çizildi. Bu genin alternatif splicing sonucu oluşan dört farklı mRNA formu (TM6P1, HEMBA, DKFZ ve TRACH) tespit edildi. Bu mRNA'lerden sentezlenebilecek proteinlerin sekansları bulunarak ClustalW programı ile hizalandı. Yapılan karşılaştırmada proteinlerin N ucunda farklılık gösterdiği ve uzun karboksi ucunun aynı olduğu tespit edildi. EXPASY serverinde bulunan ProtParam ve Compute pI/Mw programları kullanılarak proteinlerin fiziko-kimyasal özellikleri belirlendi. CDD ve PRINTS programları ile proteinlerin içerdikleri domeynler ve motifler belirlenmeye çalışıldı. Her dört protein de fonksiyonu bilinmeyen ve korunmuş bir domeyn içermekte ve G proteine bağlı reseptör süper ailesine ait motifler taşımaktadırlar. PLOC ve SOSUI programları bu proteinlerin hücre zarını 5-6 sefer geçtiklerini belirtmektedir. Bu proteinlerin yoğun olarak random coil ve alfa heliks yapılarından ve daha az oranda beta strand yapılarını da içerdiği öngörülmektedir. NetPhos, myristoylator, NetOGlyc ve NetNGlyc programlarının sonuçlarına göre bu proteinlerin sırasıyla tahmini fosforilasyon, miristilasyon, O- ve N- glikozilasyon bölgelerini içerdikleri görülmektedir. Bu tez çalışmasında son olarak pBAD-klon-38 rekombinant plazmidi seçici besiyeri ortamında *E. coli* hücrelerine aktararak burada çoğaltılması sağlanmıştır. Çoğaltılan bu plazmidler saflaştırılmış ve kesim enzimleri ile kesilerek analiz edilmiştir. Bu çalışma bu genin ürünlerinin IL-5R ile G proteine bağlı reseptörlerin sinyalizasyonunda önemli görevi olabileceğini işaret etmektedir. Böyle bir durum deneysel olarak kanıtlanırsa bu gen çeşitli ilaçların geliştirilmesi için bir hedef molekül oluşturabilir.

SUMMARY

Using bioinformatic tools, we tried to characterize a cDNA (clone-38) previously cloned as an IL-5 receptor alpha (IL-5R α) interacting molecule in the yeast two-hybrid system. The 446 bp sequence of the clone was used in the BLAST search to identify its gene. This gene is located on the short arm of the human second chromosome (2p11). Using MegaBLAST program the exons and introns of the gene were defined and mapped. Four different alternatively spliced mRNA forms (TM6P1, HEMBA, DKFZ and Trach) were identified. The protein products of these mRNAs were aligned with the ClustalW program. They have short unique N termini and long conserved C termini. Using ProtParam and Compute pI/MW programs of the EXPASY server, the physico-chemical features of these proteins were also defined. The domains and the motifs of the proteins were searched for using CDD and PRINTS programs. All four proteins contain a conserved domain with no known function, and six G protein coupled receptor superfamily motifs. The PLOC and SOSUI programs indicate that these proteins locate to the membrane with 5-6 transmembrane passes. The secondary structure analysis predict that all proteins mainly contain random coil, alpha helix and fewer beta strand structures. NetPhos, Myristoylator, NetOGlyc, and NetNGlyc programs predict phosphorylation, myristoylation, O- and N- glycosylation sites, respectively. Finally, the cDNA of clone-38 in pBAD plasmid was transformed into *E. coli*, selected on selection media, the plasmid was purified, and analyzed with the restriction digestion. This study shows that its likely that the products of this gene is highly suspected to be involved in both in IL-5R and G-protein coupled receptor signaling. If this this is proven experimentally, this gene may be an important therapeutic target for drug development.