

DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM (AX - 3)'DA DNA İZOLASYONU

Ömer GÜZEL

Edirne Tıp Fakültesi, Biokimya Kürsüsü
Fatih - İstanbul

Ö Z E T

Sıklık nükleotidlerin çeşitli metabolik olaylardaki yer alış tarzı organizma, organ ve doku spesifik değişimler göstermektedir. Fakat etki mekanizmasının moleküler düzeyde açıklanması için yapılmış olan pek çok çalışmalarda eukaryotlar için tek seçeneğin protein kinazın yer aldığı model yapı olduğu belirtilmektedir. Prokaryotlardaki gibi bir katabolik gen represörü bağlayıcı proteinin de var olabileceği savı henüz çok yenidir. Bu savın prokaryotlarla eukaryotlar arasında bir geçiş canlısı olan *Dictyostelium discoideum* içinde geçerli olabileceğini araştırmak amacıyla yapılan çalışmanın ilk aşamasında organizmanın saf DNA sınıfı izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

G İ R İ Ş

Su küflerinden *Dictyostelium discoideum* hücreleri açlık periyoduna girdiklerinde kemotaksis yoluyla kümelenerek çok hücreli bir aşamaya geçerler. Kümelenme olayını başlatan kemotaktik faktörün cAMP olduğu iyi bilinmektedir^{2,12}. Kümelenme periyodik olarak belirli zaman aralıklarında cAMP yayınlayan merkez hücrelerin oluşmasıyla başlamaktadır^{13,19}. Çeşitli çalışmacıların bulgularına göre, hücrelerin cAMP ile periyodik uyarılmalarının gen aktivasyonuna sebep olduğuda bilinmektedir^{3,5}. Kümelenme aşamasındaki hücreler, dışarıdan aldıkları kimyasal mesajı (cAMP) diğer hücrelere de iletmek için cAMP üretiminde bulunurken aynı zamanda cAMP hidrolizlenmesini sağlayan Fosfodiesteraz enziminin üretimini gerçekleştirmektedirler. Kemotaktik mesajın hücre tarafından tanınmasını sağlayan hücre membranındaki cAMP - Bağlayıcı proteinlerin oluşmasında kümelenme olayı ile bağıntılı olarak başlamaktadır^{6,9,16,20}.

cAMP'nin çok çeşitli fizyolojik olaylardaki rolü oldukça iyi bilinen bir konudur^{7,7,10,11,14,15,21}. «Pleotipik» terimi ise siklik nükleotidin eukaryotik hücrelerdeki birleştirici etkilerini tanımlamak üzere kullanılmaktadır. cAMP'nin hücre içi etki mekanizmasında söz konusu olan temel proses, Protein kinaz molekülü ile etkileşimidir. cAMP, enzimin regülatör alt - ünitesine bağlanarak aktif protein kinaz haline dönüşmesini sağlamakta ve aktif hale geçen katalitik alt ünite histon fosforilasyonuna sebep olarak transkripsiyonu etkilemektedir¹².

Prokaryotlarda ise, özellikle *E. coli* üzerinde yapılan birçok çalışmalarda siklik nükleotidin katabolik gen aktivatörü bir proteine veya cAMP - Reseptör proteine bağlanarak transkripsiyonu etkilediği bilinmektedir^{18,24}. Eukaryotik hücrelerde ise protein kinaz enzimi dışında böyle bir bağlayıcı proteinin (reseptör) varlığı önem kazanan güncel bir konudur²².

Prokaryotlarla eukaryotlar arasında bir geçiş canlısı olarak kabul edilen ve farklılaşma sürecinde bir çok biokimyasal ve morfojenetik süreçlerinin cAMP tarafından kontrol edildiği bilinen bir canlı olması nedeniyle *Dictyostelium discoideum* da da protein kinaz aktivitesi dışında bir cAMP - Bağlayıcı protein bulunabileceği olasılığı çalışmalarımızın yol gösterici düşüncesi olmuştur. Bu yönde yapılacak çalışmaların ilk aşamasında organizmanın DNA izolasyonu gerçekleştirilecek ve izole DNA ile sitozolik veya nükleer bağlayıcı protein ile ³H - cAMP etkileşimleri daha ileri aşamalarda incelenecektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1 — Gereçler:

Deney materyali olarak AX - 3 tipi *Dictyostelium discoideum*¹ hücreleri kullanılmıştır. Pronase B Calbiochem Comp. den temin edilmiştir. DNase aktivitesinin elimine edilmesi için kullanılmadan önce 37°C de iki saat inkübe edilmiştir. Diğer kullanılan kimyasal maddeler laboratuvar safliğinde olup Sigma Chem. Comp. den temin edilmiştir.

2 — Hücrelerin yetiştirilmesi:

Sporlardan başlayarak 10⁷ hücre/ml konsantrasyonuna ulaşıncaya dek HL - 5²³ ortamında yetiştirilen hücreler 1000 rpm de çöktürülerek iki kez soğuk distile su ile yıkandıktan sonra MES (2 - [N - morpholino]

ethane sulfonic acid, monohydrate) tamponunda çözülmüştür. (10⁷ hücre/ml) MES tamponunda çözülen hücreler dönerli çalkalayıcılarda 22°C da 6 saat inkübe edilerek açığa terkedilmişlerdir. Bu süre sonunda tekrar çöktürülen hücreler dondurularak saklanılmıştır.

3 — DNA İzolasyonu:

a) 100 g yaş donmuş hücre tartılarak 150 ml NTE tamponunda çözülür. Çözeltiye sonuç konsantrasyonu %2 olacak şekilde SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) eklenir. 0.5 mg/ml Pronase ilâvesinden sonra 37°C da bir gece inkübe edilen hücreler üç gün süre ile 1×SSC tamponuna karşı +4°C de dialize edilmiştir. Dializ işleminden sonra yapılan fenol ekstraksiyonunda ekstrakta geçebilecek safsızlıkların bertaraf edilmesi için kloroform : isoamil alkol (24 : 1) karışımı eklendikten sonra etil alkol ile DNA fraksiyonu çöktürülür. Çökelti 300 ml NTE'de çözülerek dalga boyu taramalı spektrofotometrede okunur.

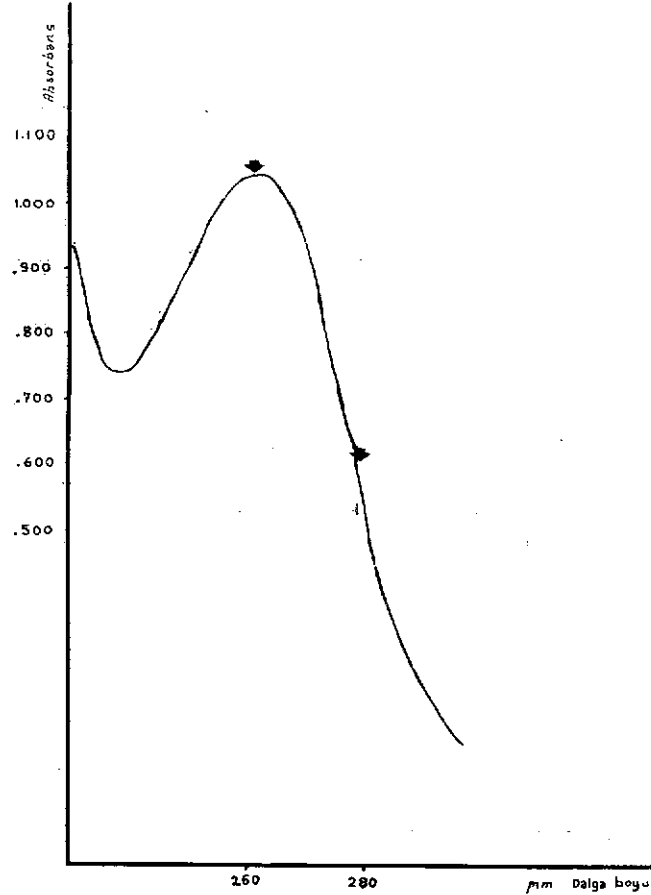
b) Hücre DNA'sının analitik olarak CsCl çöktürmesi ile ayrılması: Yukarıda belirtmiş olduğumuz şekilde hazırlanan hücreler uygun metodlarla⁴ parçalandıktan sonra karışımın konsantrasyonu 1 M olacak şekilde CsCl eklenir. Karışım 60°C de 5 dakika ısıtıldıktan sonra konsantrasyon 1.55 g/ml olacak şekilde CsCl eklenir. Ayrıca DNA bandının daha açıkça görülebilmesi için ortama etidiyum bromür (500 µg/ml) eklenmiştir. Çöktürme işlemi Beckman L - 50 ultrasantrifüjünde SW - 41 başlığı ile 40.000 rpm de 48 saat çevrilerek gerçekleştirilmiştir.

DNA bandı çöktürme sonucu elde edildikten sonra etidiyum bromürün ortamdan uzaklaştırılması için iki kere isopentil alkol ile ekstrakte edilir⁴. Etil alkol çöktürmesi yapılır. DNA veriminin yüksek olabilmesi için 1 M NaCl, 0.01 M EDTA pH : 8 çözeltisine karşı örnek dialize edilir.

BULGULAR VE SONUÇ

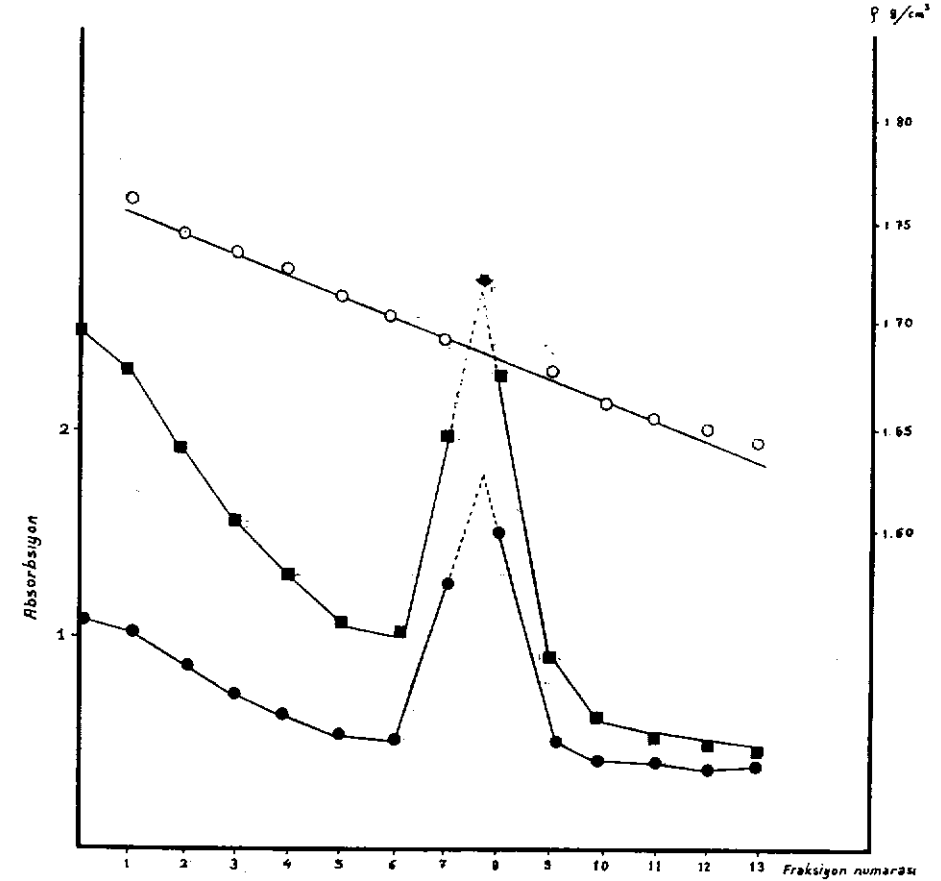
Dictyostelium discoideum hücrelerinde protein kinaz dışında katabolik gen aktivatörü bir bağlayıcı proteinin izolasyonu çalışmasında ilk aşama olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole DNA ile sitozolik veya nükleer bağlayıcı proteinin ve ³H - cAMP nin etkileşimleri daha ileri çalışma aşamalarını oluşturacaktır. Varsayılan olasılığın kanıtlanması, prokaryotlar için kanıtlanmış olan ve eukaryotlardan CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri için

de varlığı gösterilmiş olan katabolik gen aktivatörü CAMP - Bağlayıcı proteinin bütün sistemler için geçerli olabileceği olasılığını kuvvetlendirmektedir.



Şekil : 1 Yöntemlerde belirtildiği üzere izolasyonu yapılan ve etil alkol ile çöktürülüp 300 ml NTE'de çözülmüş olan total hücre DNA'sı 1/10 oranında seyreltilerek dalga boyu karamah bir spektrofotometrede okunmuştur. DNA çözeltisinde 260 µm de maksimal değer okunmaktadır.

Yukarıdaki Şekil: 1 de görüldüğü gibi eldeki çözeltide DNA oldukça yüksek saflıkta mevcut bulunmaktadır. 260 µm de elde edilen belirgin pik bunu kanıtlamaktadır.



Şekil : 2 CsCl gradiyentinde çöktürme ile ayrılan fraksiyonların 260 ve 280 µm okunan absorbans değerleri görülmektedir. Sağdaki eksen ise fraksiyon numaralarına karşı gelen hesaplanmış yoğunluklar görülmektedir. Maksimum absorbansa karşı gelen yoğunluk 1.685 g/cm³ olarak görülmektedir ki bu da bilinen yoğunluğa oldukça yakın bir değerdir (4) Yoğunluk ölçümleri dansitometre ile yapılmıştır.

DNA maksimal aktivitesinin yoğunluğu : 1.685 g/cm³ olmasına karşılık $A_{280}/A_{260} = 1.5$ oranının söz konusu olması elde edilen bandın saf DNA veya nükleik asit olduğunu göstermektedir. Çeşitli yöntemlerle bandın karakterini anlamak mümkündür. Kolaylık açısından Etidyum bromür ile çöktürme tercih edilmiştir.

Tablo II de görüldüğü gibi DNA bandının CsCl gradiyentinde düşük yoğunluktaki fraksiyonlara kayması etidyum bromür-DNA etkileşimi sonucudur. Bant Tablo I de 8 ve 9 nolu fraksiyonlarda yer alırken etidyum

Tablo I CsCl çöktürmesi sonucu elde edilen fraksiyonların yoğunlukları.

Frak. Num.	Dansitometre Okuma endeksi	g/cm ³
1	1.4054	1.765
2	1.4050	1.760
3	1.4037	1.747
4	1.4026	1.734
5	1.4020	1.728
6	1.4006	1.714
7	1.3997	1.705
8	1.4041	1.751
9	1.4043	1.752
10	1.3971	1.678
11	1.3962	1.666
12	1.3956	1.659
13	1.3948	1.650
14	1.3941	1.643

Tablo II CsCl - Etidium Bromür - DNA fraksiyonlarının yoğunlukları.

Frak. Num.	Dansitometre Okuma endeksi	g/cm ³
.	.	.
.	.	.
.	.	.
7	1.3885	1.5825
8	1.3873	1.5700
9	1.3863	1.564
10	1.3855	1.550
11	1.3850	1.540
12	1.3840	1.535
12	1.3840	1.535
13	1.3831	1.520
14	1.3822	1.513

bromür ile çöktürmede 10 ve 11 no.lu fraksiyonlara kayma görülmüştür. Etidyum Br. -DNA etkileşiminin karakteristik olması nedeniyle elde edilmiş bulunan bandın saf DNA olduğu ortaya çıkmaktadır.

Etidyum bromür ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra yapılan O.D. değerleri: $A_{260}/A_{280} = 1.965$ ve $A_{280}/A_{230} = 1.743$ olarak elde edilmesinde DNA

çözeltisinin bir miktar CsCl içerdiğini göstermektedir. Tuzun eliminasyonu için eldeki çözelti $0.01 \times \text{SSC}$ çözeltisine karşı (2 kez $\times 500$ ml) 48 saat dializlendi.

Dializlenen çözeltide,

$$A_{280}/A_{260} = \frac{1.627}{0.731} = 2.22 \text{ ve } A_{260}/A_{230} = \frac{1.627}{0.662} = 2.45$$

oranları elde edilmiştir. Yeterli saflığa ulaşan DNA çözeltisi etil alkol ile çöktürülerek (-20°C) de saklanmıştır.

Amaçlanan temel çalışmanın tamamlanması için bundan sonraki aşamalarda *D. discoideum*'un çok etkin olan ve bağlanma çalışmalarında zorluklar çıkaran fosfodiesteraz enziminin enterferansını önlemek amacıyla cAMP nin uygun bir türevi olan 8 - N₃ - cAMP'nin sentezlenmesi gerekmektedir. Bağlayıcı protein -8, N₃ - cAMP kompleksi elde edilebildikten sonra yukarıda anlatıldığı şekilde izole edilen DNA ile bağlanma gösterip göstermediği ve diğer kinetik incelemelerin yapılması amaçlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanaklarından yararlanmama izin veren Prof. Dr. H. V. Rickenberg'e ve çalışmanın değerlendirilmesindeki kıymetli yardımlarından ötürü Ass. Prof. Dr. C. Tihon'a teşekkürü bir borç bilirim.

SUMMARY

DNA ISOLATION OF DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM (AX - 3)

Cyclic nucleotides show variable modes of action in organism, organ and tissue specific metabolic processes. However, mechanism of action of cyclic nucleotides at the molecular level have been shown to be mediated by protein kinases in eukaryotes. The presence of catabolic gene repressor binding protein as in prokaryotes is a fairly new concept for eukaryotes. To test the potentiality of this concept in *Dictyostelium discoideum*, DNA of the organism was isolated at the first stage.

KAYNAKLAR

- 1 — Çalışma materyali olarak kullanılan hücreler Dr. David Soll tarafından hediye edilmiştir.
- 2 — BONNER J.T., BARKLEY D.S., HALL E.M., KONIJN T.M., MASON J.N., O'KEEFE, G. ve WOLFE, P.B.: *Dev. Biol.* 20, 72, 1969.

16 GÜZEL - *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* (AX - 3)'DA DNA İZOLASYONU

- 3 — DARMON M., BRACHET P., PEREIRA DA SILVA L.H.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **72**, 3163, 1975.
- 4 — FIRTEL R. ve BONNER J.T.: *J. Mol. Biol.* **66**, 339, 1972.
- 5 — GERISCH G., FROMN M., HUESGEN A. ve WIEK U.: *Nature*, **255**, 547 1975.
- 6 — GREEN A.A. ve NEWELL P.C.: *Cell* **6**, 129, 1975.
- 7 — GUDOTTI A., HANBAUER I. ve COSTA E.: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 5, (Raven Press) pp. 619 - 639, 1975.
- 8 — HAUSCHKA P.V., EVERHART L.P. ve RUBIN. R.W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **69**, 3542, 1972.
- 9 — HENDERSON E.J.: *J. Biol. Chem.* **250** (12), 4730, 1975.
- 10 — JOHNSON G.S., FRIEDMAN R.M. ve PASTAN I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 425, 1971.
- 11 — JUNGMAN R.A., HIESTAND P.C., ve SCHEWEPPE J.S.: *J. Biol. Chem.* **249**, 5444, 1974.
- 12 — KONIJN T.M.: *Advances Cyclic Nucleotide Research*. Vol. 1, (Raven Press) pp. 17 - 31, 1972.
- 13 — KONIJN T.M., van de MEENE J.G.C., BONNER J.T. ve BARKLEY D.S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1152, 1967.
- 14 — KRAM R. ve TOMKINS G.M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 1659, 1973.
- 15 — LANGAN T.A.: *Science* **162**, 579, 1968.
- 16 — MALCHOW D. ve GERISCH, G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **71**, 2423, 1974.
- 17 — PARK C.R. ve LEWIS S.B.: *The role of Adenyl Cyclase and cyclic 3'5' - AMP in Biological Systems*. Fogarty Int. Cent. Proc. No. 4, p.163, 1971.
- 18 — PASTAN I. ve PERLMAN R.L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 1336, 1968.
- 19 — ROSS W. ve GERISCH G.: *FEBS Letters* **68**, 170, 1976.
- 20 — SAMPSON J.: *Cell*, **11**, 173, 1977.
- 21 — TIHON C. ve GREEN, M.: *Nature New Biol.* **244**, 227, 1973.
- 22 — TIHON C.: *Third Int. Conf. Cyclic Nucleotides*, July 17 - 22, 1977, New Orleans.
- 23 — WATTS D.J. ve ASHWORTH J.M.: *Biochem. J.* **119**, 171, 1970.
- 24 — ZUBAY G., SCHWARTZ D. ve BECHMITH J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **66**, 104, 1970.