

**SACCHAROMYCES CEREVISIAE YAĞ ASİDİ SENTETAZ GENİ,  
 $\alpha$  — ALT ÜNİTESİ, E FRAGMANININ MOLEKÜLER ALT  
KLONLANMASI VE NÜKLEOTİD DİZİSİNİN SAPTANMASI**

**MOLECULAR SUBCLONING AND DNA SEQUENCING OF  
FRAGMENT E OF  $\alpha$  — SUBUNIT OF FATTY ACID SYNTHETASE  
GENE IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Turgut ULUTİN\* - Salih, J. WAKİL\*\*

**SUMMARY**

The project described here involved the subcloning and sequencing of a fragment of yeast fatty acid synthetase 2 known as fragment E. It was necessary to determine the internal code of this fragment and to locate its active site (s).

Fragment E was ligated with plasmid PBR322 and then transformed into E. Coli JM109 host cells. Plasmid DNA was isolated from subclones, and then DNA was purified by cesium chloride ultracentrifugation. Closed circular plasmid DNA was sequenced according to Maxam and Gilbert procedure. The sequence of this fragment was obtained through labelling at the ECOR<sub>I</sub> site and Hind III site. Thus base sequencing gave us a chance to look at same part of the amino acid sequence of  $\alpha$  - subunit of fatty acid synthetase. Since the size of the fragment E is approximately 850 base pairs it could code for 283 amino acids. This might show that there was no active site on fragment E coding for anyone of the known enzymes of the fatty acid synthetase system. When this amino acid sequence was compared to the amino acid sequence of the enzymes of the fatty acid synthetase system, no homology was detected.

\* M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Nişantaşı-İst.

\*\* Baylor College of Medicine, Dep. Biochem., Houston-Texas, U.S.A.

### ÖZET

Bu çalışmada maya yağ asidi sentetaz 2 ( $\alpha$ -alt ünitesi)'nin bir fragmanı olan E fragmanının alt klonlanması ve DNA'sının dizilenmesi üzerinde çalışılmıştır.  $\alpha$ -alt ünitesi E fragmanının internal bir kod içerip içermediği veya herhangi bir aktif yere sahip olup olmadığı araştırıldı.

E fragmanı, PBR322 plasmidi ile bağlandı, ve E. Coli JM109 konak hücresi içerisine transforme edilerek üretildi. Daha sonra plasmid DNA alt klonlardan izole edildi ve sesium klorür ultrasantrifigasyonu ile saflaştırıldı. Elde edilen kapalı yuvarlak DNA'nın nukleotid dizisi Maxam - Gilbert metoduna göre saptandı. ECOR<sub>1</sub> ve Hind III yerlerinde işaretleme ile elde edilen bu fragmanın dizisi,  $\alpha$ -alt ünitesinin protein dizisini daha kolay belirlemeye olanak tanıdı. E fragmanının yaklaşık 850 nükleotid içerdiği ve 283 amino asidi kodlayabileceği bulundu. Tespit edilen amino asit dizisi, amino asit dizisi bilinen yağ asidi sentetaz kompleksi enzimleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir benzerlik saptanamadı. Bu bulgu fragman E'nin yağ asidi sentetaz sistemindeki bilinen aktif bir proteini kodlamadığını düşündürür.

### GİRİŞ

Yağ asidi sentetaz sistemi 6 enzim ve açıl taşıyıcı proteinden meydana gelmiş, hayvan dokularında yaklaşık 500.000 molekül ağırlıklı, *Saccharomyces cerevisiae* ise 415.000 molekül ağırlıklı  $\alpha$  ve  $\beta$  üniteleri içeren kompleks bir sistemdir (1). Bu sistemin genetik yönden incelenmesinin ilk çalışmaları 1972 senesinde Schweizer'in laboratuvarında yapılmış ve bütün yağ asidi sentetaz geninin haritalanması ve bu sistemdeki enzimlerle ilişkisi tamamlanmak üzeredir (2, 3). Mayalarda yağ asidi sentetaz geninin  $\alpha$ -alt ünitesi nükleotid dizisi Wakil ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (4). Bu bulgulara dayanarak  $\alpha$ -alt ünitesinin kodladığı enzimlerin amino asit diziliş sırası belirlenmiştir (4).

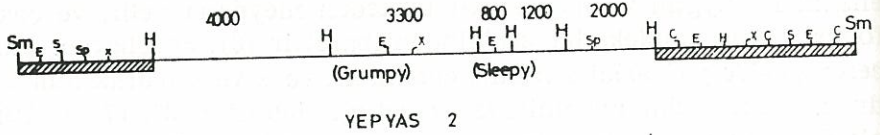
Bu çalışmanın amacı yağ asidi sentetaz  $\alpha$ -alt ünitesinin 5 fragmanından biri olan E fragmanının nükleotid diziliş sırasını belirleyerek kodladığı amino asit dizisine geçmektir. Bu dizinin belirlenmesindeki asıl amaç  $\alpha$ -alt ünitesinin yağ asidi sentetaz sistemi içinde aktif görev alan bir enzimin kodunu içerip içermediğini yani bu genin, diğer adıyla yağ asidi sentetaz 2 geninin yapısal veya kontrol geni olup olmadığını göstermektir.

Yağ asitlerinin sentezi genelde sitozol içerisinde yağ asidi sentetaz enzimi adı verilen bir multi enzim kompleksi tarafından katalizlenir.

Yüksek organizmalarda yağ asidi denovo sentezinin bu 6 enzim aktivitesi ve açıl taşıyıcı yağ asidi sentetaz adı verilen 500.000 dalton ağırlığında bir komplekste mevcuttur (5, 6). Bu sentetaz enzimi iki uygun ve identik alt üniteden meydana gelir, ve çok fonksiyonlu kompleks bir proteinden ibarettir (6). *Saccharomyces cerevisiae*'de yağ asidi sentetaz enziminin ve  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak adlandırılmış iki farklı alt üniteden oluştuğu bildirilmiştir (7, 8). Bu alt üniteler aktif şekillerinin hegzamerler olduğu bilinen ve her biri  $\alpha$  ile  $\beta$ 'yı içeren mültifonksiyonel proteinlerdir. Bu kompleks yaklaşık  $2,4 \times 10^6$  dalton ağırlığına sahiptir (7, 9, 10). Mayalarda yağ asidi sentetaz iki identik olmayan alt üniteden ibarettir. Bunların M.A'ları 212.000 ve 203.000 olup sırasıyla yağ asidi sentetaz 2 ve yağ asidi sentetaz 1 denen iki ilişkisi olmayan gen tarafından kodlanır (6, 11).

$\alpha$ -alt ünitesi üç ayrı aktivite içerir. Bunlar  $\beta$ -ketoaçilsentetaz enzimi, 4-fosfopantotein prostetik grubu için bağlanma yeri ve  $\beta$ -ketoaçilredüktaz aktivitesidir.  $\beta$ -alt ünitesi beş enzim aktivitesine sahiptir. Bunlar enoilredüktaz, asetiltransaçilaz, dehidrataz, malonil ve palmitoiltransaçilazdır (12, 13, 14, 15, 16).

Maya genleri *E. Coli* içerisindeki plazmid vektörlerinde hem transkripsiyon ve hem de translasyonda aktif olarak bulunmuştur. Klonlanmış genlerin ifadesi, eukaryotik başlatıcıların tanınması ve sonuçlanan m-RNA'ların bakteriyel ribozomlar üzerinde doğru translasyonu bakteriyel RNA polimeraza bağlıdır. Böylece maya yağ asidi sentetazın *E. Coli*de ifade edilebileceği ve klonlanan maya YAS genlerinin izole edilebileceği farzedilir. Kuziora ve arkadaşları *Saccharomyces cerevisiae*'den yağ asidi sentetazın DNA klonlarını izale etmek için maya transformasyon tekniğini kullanmışlardır (3). Maya *E. Coli* mekik vektörü olan YEP 13'de maya DNA dizisinin bir bankası YAS genlerini transforme etmek için kullanılmıştır (17). YEP 13 plazmidi mayanın leu 2 geninin tamamını PBR 322 geninin de tamamını içerir (18). YAS 1 ve YAS 2 mutasyonlarının tamamlandığı maya DNA dizilerini içeren plazmid ile transforme edilen hücreler seçildi. Her koloniden komplementer olan plazmid izole edildi ve YEPYAS 1 ve YEPYAS 2 olarak adlandırıldı (Şekil 1). YAS 1 geninin nükleotid dizisinden ortaya çıkan  $\alpha$ -alt ünitesinin amino asit dizisinin tamamı saptanmıştır (4).



Sm = Sma I , x = xba I , E = ECOR, Sp = Sp H I  
 S = Sal I , H = Hind III , C = cla I , B = Bam H I

### ŞEKİL I : YEPYAS 2'nin KLONLARI

Kalın çizgiler vektör DNA'yı (YEP 13), ince çizgiler ise maya DNA insertini belirtir. Yukarıda verilen YAS 2 haritası PBR 322 yada PUC 18 vektörleri içerisinde klonlanmıştır. Burada Hind III restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen fragmanlar A'dan E'ye gösterilmektedir.

### MATERYAL VE METOD

Sığır serum albumin, Etdiyum Bromür, Üre, Caftimus DNA Sigma firmasından CsCl<sub>2</sub>, Agaroz bethesda araştırma laboratuvarından, Hidrazin Aldrich kimya laboratuvarından, Sodyum Dodesil Sülfat, Akrilamid, Bisakrilamid, TEMED, Amonyum persülfat Biorad laboratuvarından, Formik asit, Piperidin Fischer scientific firmasından temin edildi.

Bütün radyoaktif kimyasal maddeler Amersham Cooperation'dan sağlandı. Bakto yeast extract, Bakto Tripton, Agar gibi bütün ortam kimyasalları Difco laboratuvarlarından sağlandı.

Bütün restriksiyon enzimleri New England Biolab'dan sağlandı. T4 DNA ligaz, T4 Polinükleotidkinaz, Bakteriyel Alkalifosfataz, Klenow Fragmanı gibi DNA'yı modifiye edici diğer enzimler de Bethesda research laboratuvarlarından sağlandı.

Kullanılan tamponlar sırasıyla; Ligasyon Tamponu, Tris HCl tamponu, 0.5 M EDTA Tamponu ve % 10'luk Sodyum Dodesil Sülfat Tamponu, Restriksiyon Enzimi Tamponları (Orta, yüksek ve az miktarda tuz içeren olmak üzere), Kinaz Tamponu ve Tris Borat Elektroferez Tamponudur.

Plazmid olarak PBR 322 ve PUC 18, suş olarak da JM 109 kullanıldı. Elektroforez deneylerinde Agaroz ve Akrilamid Jeller kullanıldı.

Bakterinin büyütülmesi ve transformasyonu için LBroth ortamı kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçler; 37°C Isı Bloku (VWR Scientific Lab), 12°C Buzdolabı (Sub Zero), 65° İnkibatör, model 235 Mikrosantrifüj (Fischer), 37°C İnkibatör, Sorwall RC-2B Santrifüj (Narco), 42°C Su Banyosu, L2-65B Ultrasantrifüj, Spektrofotometre (Beckmann), 37°C Çalkalayıcı (New Brunswick Scientific Lab), J21 Corb Santrifüj, Sorwall SS Santrifüj Rotoru (Beckmann), Sterill gard hood (Baker Company), Speed Vac Concantratör (avand), Model 3000/300 Elektroforez Güç Aygıtı, Model C94 Elektroforez Güç Aygıtı (Isco), XAR-5-X-RAY films (KODAK).

## YÖNTEMLER

Kalsiyum Klorür metodunu kullanarak JM 109'un E fragmanlı plazmid ile transformasyonu (19) yapıldı. Koloniler plaklardan toplanarak alt klonlardan plazmid DNA elde edildi. Bu işlem esnasında CsCl<sub>2</sub> Ultrasantrifüj Gradyan yöntemi kullanıldı. Elde edilen DNA UV ışığında iki bant olarak görüldü. Üstteki bant lineer bakteriyel DNA, alttaki bant ise kapalı plazmid DNA'dan ibaretti. Ve elde edilen plazmid DNA'nın 260 nm ve 280 nm dalga boyunda Beckmann Spektrofotometresi ile kalite ve miktarı saptandı. Daha sonra dizilenmesi amaçlanan DNA fragmanı uçları işaretlendi. Elde edilen fragman % 6'lık poliakrilamid jeli üzerinde analiz edildi. 0.8 kilobazlık fragmanı içeren klon restriksiyonendonükleaz enzimi ile muamele edildi. Numune fenol ve kloroform ekstraksiyonlarından sonra CH<sub>3</sub>COONa ve etanol ile çöktürüldü ve etanolle yıkanıp kurutuldu. Kurumuş haldeki pellet 50 milimolar tris tamponu ile çözüldü. Bakteriyel alkalifosfat eklendi. 37 ve 65°C'larda inkübe edildi. Fosfatlama işlemi tamamlandıktan sonra kinazlama işlemi için kinaz tamponu  $\alpha$ -32 ATP ve T4 kinaz ilave edildi. Fenol-Kloroform ekstraksiyonu ve etanol çöktürmesinden sonra kurutuldu ve ikinci restriksiyon endonükleaz ayrılması gerçekleştirildi. İşaretli fragmanlar % 5'lik akrilamid jel üzerinde ayırıldı. X-RAY filimleri ile alınan filimlerden fragmanların yerleşimleri saptandı. Jelden kesilerek çı-

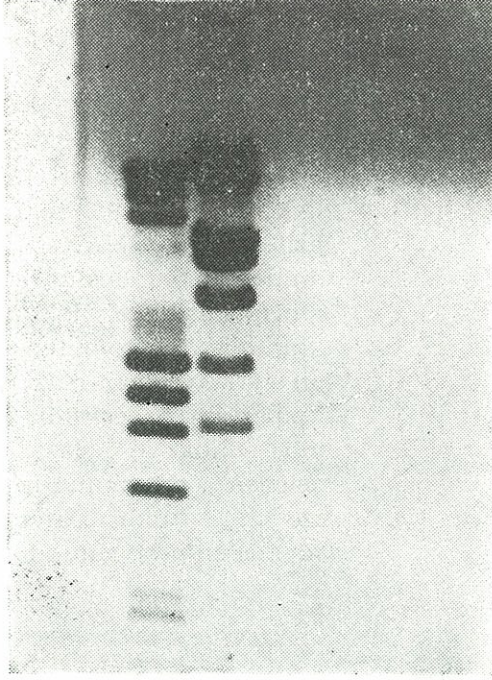
kartılan bantlar elüe edildi. Bantlar tris EDTA tamponu içerisinde bırakıldı. Santrifüj edildikten sonra süpernatant jel parçacıklarını çıkartmak için cam pamuğu içeren bir kolondan iki defa geçirildi. Daha sonra işaretli fragmanları içeren solüsyon DEAE kolonundan geçirildi. Tris EDTA ile yıkandı. Elüe edilen sıvı materyel ufak bir tüpte toplandı. Taşıyıcı dediğimiz Calf Timus DNA ilave edildi. Etanol ile yıkanarak Speed Vakum Konsantratörde kurutuldu. Bundan sonra MAXAM-GİLBERT tekniği kullanılarak ucu işaretli fragmanlar dizilendi (20). MAXAM ve GİLBERT dizilenmesi için bazı özel tamponlar şunlardır: Dimetilsülfaat tamponu, Dimetil sülfat durdurucu tampon, Hidrazin reaksiyon durdurucu tampon, yükleme tamponu. Bu yöntemle göre Timin, Sitozin, Adenin ve Guanin için ayrı ayrı baz reaksiyonları yapıldı. G-C-T peletleri 1.5 molar piperidin ile eritildi. Bütün reaksiyonlar 30 dakika 90°C'da inkübe edildi. Ve 5 dakika buza konuldu. Butanol ve SDS ile muameleden sonra numuneler % 8'lik poliakrilamid jelinde elektroforeze tabi tutuldu. Daha sonra otoradyografi ile okuyarak nükleotid dizilenmesi bulundu.

## BULGULAR

$\alpha$ -alt ünitesinin fragmanlara ayrılması; YEPYAS 2 klonu vektörler hariç beş fragman oluşturdu (Resim I). Fragmanların ölçüsü 0.8 kilobazdan 4.0 kilobaza kadar değişir. Fragman A 4 kilobaz, fragman B 3.3 kilobaz, fragman C 2 kilobaz, fragman D 1.2 kilobaz ve fragman E. 0.8 kilobaz olarak elde edildi. 0.8 kilobazlık E fragmanı PBR322 içerisine klonlandı.

Plasmid DNA'nın JM 109 içerisine transformasyonu: Plasmid DNA'nın 1 mikrogramı E. Coli suşu JM 109 içerisine metod bölünümünde tarif edildiği gibi transforme edildi. Transforme edilmiş hücreler ampisilin içeren L-BROTH plakları üzerine yayıldı. Tek olan koloniler toplandı. Yeni ampisilin plakları üzerine yayıldı ve depolandı.

Plasmid DNA'nın eldesi: Plasmid DNA ile transforme edilmiş JM 109 hücreleri 1 litre L BROTH besiyeri içerisinde üretildi. (BKZ. Plasmid saflaştırılması metodu). Plasmid CsCl<sub>2</sub> dansite gradyan santrifigasyon yoluyla saflaştırıldı. Böylece saf hale gelen DNA, plasmidin uygun insertler içerip içermediğinden emin olmak amacıyla restriksiyon enzimleri ile rutin olarak kontrol edildi. Bu DNA'nın ECOR<sub>1</sub>, Hindi III restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle yapıldı (Resim II).



Resim I

YEPYAS 2 klonu Hind III ile kesildiğinde, vektör dışında beş fragman meydana gelir. Fragman ölçü kalibrasyonu için DNA/Hind III ve 174/Hae III kullanıldı. Birinci sıra  $\lambda$  DNA/Hind III ve  $\phi$  174/Hae III.

No. 1 (23130 baz parçası) No. 2 (9414 bp) No. 3 (2557 bp) No. 4 (4371 bp) No. 5 (2322 bp) No. 6 (2028 bp.) Bu altı bant  $\lambda$  DNA/Hind III işaretleyicisinden gelir. No. 7 (1353 bp) No. 8 (1078 bp) No. 9 (872 bp) No. 10 (603 bp)

İkinci sıra : Hind III ile kesilmiş YEPYAS 2 fragman A (4 kb), B (3.3 kb), C (2 kb), D (1.2 kb), E (0.8 kb).

E fragmanının Hind III ile işaretli uçlarının dizilenmesi : Plasmid DNA Hind III ile kesildi ve metod bölümünde tarif edildiği gibi fosfatlama ve kinazlama basamaklarını takiben uçları işaretlendi. Bu DNA daha sonra ECOR<sub>1</sub> ile kesildi. Ve fragmanlar % 5'lik akrilamid jeli üzerinde elektroforez ile ayrıldı. Otoradyografi ile işaretli bantlar saptandı. Otoradyogram jelden bantları kesip dışarıya almak için kalıp olarak kullanıldı ve DNA elde edildi. DNA'nın dizilenmesi iki ayrı fragman için ayrı olarak gerçekleştirildi. Dizilenme basamakları resim III'te görülmektedir.



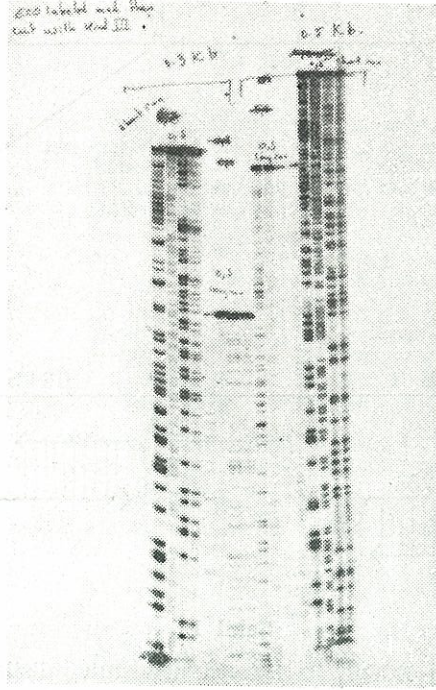
Resim II

DNA'nın  $ECOR_1$  ve Hind III ile kesilmesi; 1. sıra İşaretleyici DNA/Hind III ve 174/Hae III; 2. sıra Hind III/0.8 kb;  $ECOR_1$ /0.8 kb; 4. sıra Hind III/ $ECOR_1$  0.8 kb (0.5 kb - 0.3 kb); 5. sıra RSA I/0.8 kb; 6. sıra RSA I/Hind III 0.8 kb.

Bu ayrılmalar 0.3 kb  $ECOR_1$  fragmanı, 0.8 kb Hind III fragmanı ve her iki enzim ile yapılan çiftli kesimde 0.3 ve 0.5 kb fragmanlarını verdi (4. sıra).

Okunan dizi sequanal (Nar 1982) diye adlandırılan bir program kullanılarak bilgisayara verildi. Fragman yalnızca bir yönde transkripsiyon ve translasyon olacağı için Hind III ile kesili uçların birinin dizisi gene göre aynı yönde olacaktır. Ve öteki Hind III yerindeki işaretleyici ile elde edilen fragmanın dizisi komplementer yönünde olacaktır.





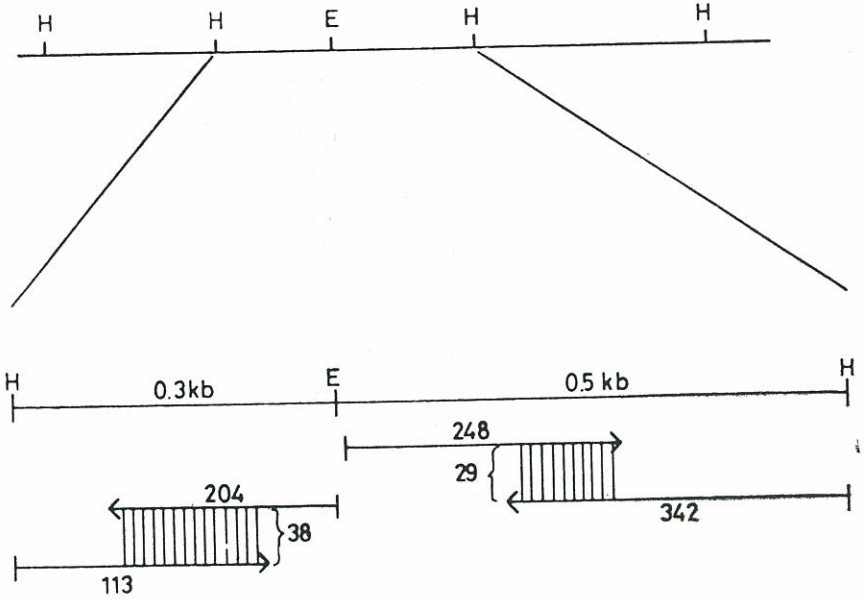
Resim III

Resim III'de  $ECOR_1$  ile işaretlenip sonra Hind III ile kesilen 0.3 kb ve 0.5 kb fragmanların MAXAM - GİLBERT metoduyla yapılmış ve poliakrilamid jeline koşulması ile elde edilmiş nükleotid dizileri görülmektedir.

### TARTIŞMA

E fragmanı maya YAS 2 geninin Hind III restriksiyon fragmanlarının biridir. Bu fragman internal bir fragmandır. Ve yağ asidi sentetazın  $\alpha$ -alt ünitesinin protein dizisinin bir kısmını kodlamak için önemlidir. Fragmanın ölçüsü 850 baz çifti olduğu için 850/3 oranında yani 283 amino asid kodlayabilir.  $\alpha$ -alt ünitesi proteini 2000 kadar amino asid kalıntısı kapsayabilir.

Bu fragmanın  $ECOR_1$  ve Hind III yerlerinde işaretlenmesi yoluyla dizilenmesi bize  $\alpha$ -alt ünitesinin protein dizisinin bir kısmına göz atma şansı verdi.  $ECOR_1$  geninde boşluklar olmasına ve dizi henüz tam olarak doğrulanmamış olmasına rağmen dizi aktif yer olarak bilinen dizileri içerip içermemesi açısından ana



Şekil II

E fragmanının  $ECOR_1$  ile işaretli uçlarının dizilenmesi : (Dizilenme Stratejisi) Hind III uçlarından gelen dizilen yaklaşık olarak işaretli uçtan itibaren 250 nükleotid okunmaktadır. (BKZ. Kompütür dataları) Burada Hind III ile işaretlenip  $ECOR_1$  ile kesilen 0.3 kilobaz fragmanının 38 nükleotidi birbiri ile çakışmışlardır. Aynı şekilde Hind III ile işaretlenip  $ECOR_1$  ile kesilen 0.5 kb fragmanı ve  $ECOR_1$  ile işaretlenip Hind III ile kesilen 0.5 kb fragmanının 29 nükleotidi birbiriyle çakışmışlardır. Fragman E önce Hind III ile işaretlendi ve daha sonra  $ECOR_1$  enzimi ile kesildi. Bu 0.3 kb fragman için 113 nükleotid ve 0.5 kb fragman için 342 nükleotid verdi. Fragman E'nin önce  $ECOR_1$  ile işaretlendiği ve daha sonra Hind III enzimiyle kesildiği durumda ise bu 0.3 kb fragmanı için 204 nükleotid 0.5 kb fragmanı için ise 248 nükleotid verdi. İnsertin internal kısmının dizisini elde etmek için plasmid  $ECOR_1$  ile işaretlendi. Hind III ile de kesilip dizilendi. 0.5 kb  $ECOR_1$  işaretli fragmanın dizisi 0.5 kb Hind III fragmanının komplementer ipliğinin dizisi ile bir noktada kesişti. Benzer şekilde 0.3 kb  $ECOR_1$  işaretli fragmanın dizisi 0.3 kb Hind III fragmanının komplementer ipliğinden elde edilen dizi ile kesişti. Bu dizi, bize elde edilen dizilerin doğru olduğunu da kanıtlar.

liz edilebilirdi. Açıl taşıyıcı protein ve ketosentetazın aktif yer dizisi önceden bilinmekteydi. Böylece bu iki dizi için dizileri karşılaştırma olanağı bulundu. Ancak bu iki dizi arasında benzerlik saptanamadı, Böylece bu dizi internal protein dizisinden teş-

Hind III  
 GTT GAA GCT TTG ATT GAA TTT ATC TAC TAC AAT GAA AAG AAT GGT GGT TTA GGT 2275  
 Val Glu Ala Leu Ile Glu Phe Ile Tyr Asp Thr Glu Lys Asn Gly Gly Leu Gly  
 2310 2325 2340  
 TGG GAT GTA GAT GCT ATT ATT GCA TTC GCG GCC ATT CCA GAA GAA GGT ATT GAA  
 Trp Asp Leu Asp Ala Ile Ile Pro Phe Ala Ala Ile Pro Glu Glu Glv Ile Glu  
 2370 2385 2400  
 TTA GAA CAT ATT GAT TCT AAG TCT GAA TTT GCT CAT AGA ATC ATG TTG ACC AAT  
 Leu Glu His Ile Asp Ser Lys Ser Glu Phe Ala His Arg Ile Met Leu Thr Asn  
 2415 2430 2445 2460  
 ATC TTA AGA ATG ATG GGT TGT GTC AAG AAG GAA AAA TCT GCA AGA GGT ATT GAA  
 Ile Leu Arg Met Met Gly Cys Val Lys Lys Glu Lys Ser Ala Arg Gly Ile Glu  
 2475 2490 2505 2520  
 ACA AGA CCA GCT CAA GTC ATT CTA CCA ATT TCT CCA AAC CAT GGT ACT TTC GGT  
 Thr Arg Pro Ala Gln Val Ile Leu Pro Met Ser Pro Asn His Gly Thr Phe Glu  
 2535 2550 2565  
 GGT GAT GGT ATG TAT TCA GAA TCC AAG TGG TCT TTG GAA ACT TTG TTC AAC AGA  
 Gly Asp Gly Met Tyr Ser Glu Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Leu Phe Asn Arg  
 2580 2595 2610 2625  
 TGG CAC TCT GAA TCC TGG GCC AAT CAA TTA ACC GTT TGC GGT GCT ATT ATT GGT  
 Trp His Ser Glu Ser Trp Ala Asn Gln Leu Thr Val Cys Gly Ala Ile Ile Gly  
 2640 2655 2670  
 TGG ACT AGA GGT ACT GGT TTA ATG AGC GCT AAT AAC ATC ATT GCT GAA GGT ATT  
 Trp Thr Arg Gly Thr Gly Leu Met Ser Ala Asn Asn Ile Ile Ala Glu Gly Ile  
 2685 2700 2715 2730  
 GAA AAG ATG GGT GTT CGT ACT TTC TCT CAA AAG GAA ATG GCT TTC AAC TTA TTG  
 Gly Lys Met Gly Val Arg Thr Phe Ser Gln Lys Glu Met Ala Phe Asn Leu Leu  
 2745 2760 2775 2790  
 GGT STA TTG ACT CCA GAA GTC GTA GAA TTT TTT CAA AAA TCA GCT GTT ATG GCT  
 Gly Leu Leu Thr Pro Glu Val Val Glu Leu Cys Gln Lys Ser Pro Val Met Ala  
 2805 2820 2835  
 EcoR I  
 GAC TTG AAT GGT GGT TTG CAA TTT GTT CCT GAA TTG AAG GAA TTC ACT TGT CTA  
 Asp Leu Asn Gly Gly Leu Gln Phe Val Pro Glu Leu Lis Glu Phe Thr Cys Leu  
 2850 2865 2880 2895  
 AAT TGC GTA AAG AGT TGG TTG AAA CTT CTG AAG TTA GAA AGG CAG TTT CCA TCG  
 Asn Cys Val Lys Ser Trp Leu Lys Leu Lys Leu Glu Arg Gln Phe Pro Ser  
 2910 2925 2946  
 AAA CTG CTT TGG AGC ATA AGG TTG TCA ATG ACA ATA GCG CTG ATG CTG CAT ATG  
 Lys Leu Leu Trp Ser Ile Arg Leu Ser Met Ala Ile Ala Leu Met Leu His Met  
 2955 2970 2985 3000  
 CTC AAG TCG AAA TTC AAC CAA GAG CTA ACA TTC AAC TGG ACT TCC CAG AAT CGA  
 Leu Lys Ser Lys Phe Asn Gln Glu Leu Thr Phe Asn Trp Thr Ser Gln Asn Arg  
 3015 3030 3045 3060  
 AAC CAT ACA AAC AGG TTA AAC AAA TTG CTC CCG CTG AGC TTG AGG GTT TGT TGG  
 Asn His Thr Asn Arg Leu Asn Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Arg Val Cys Trp  
 3075 3105  
 ATT TGG AAA GAG TTA TTT GTA GTT ACC GGT TTT GCT GAA GTC GGC CCA TGG GGT  
 Ile Trp Lys Glu Leu Phe Val Val Thr Gly Phe Ala Glu Val Gly Pro Trp Gly  
 3120 3135 3150 3165  
 Hind III  
 TCG GCG AGA ACT AAG ATG GGA AAT GGA AGC TTT GGT CAA TTT TCG TTG GAA GGT  
 Ser Ala Arg Thr Lys Met Gly Asn Gly Ser Phe Gly Glu Phe Ser Leu Glu Gly

Yağ asidi sentetaz 2'nin E fragmanının nükleotid dizisi ve amino asit kompozisyonu.

kil olmasına rağmen herhangi bir aktif yer dizisi içermeyebilir görüşüne varıldı. Ön taraftan bu dizileme bize mukayese için mevcut olmayan dizinin elde edilmesi, protein katlanması veya bazı fonksiyonel yerlerin içerilmesi açısından bilgi verebilir. Değişik organizmalarda bu tip çalışmalar sonucu proteinlerin amino asid kompozisyonlarındaki benzerlik saptanabilir ve evölüsyon konusuna açıklık getirebilir (21).

#### KAYNAKLAR :

1. Wakil, S. J., Stoops, J. K., Joshi, V. J.: *Annu. Rev. Bio Chem.*, 52, 537 (1983).
2. Kühn, L., Castroh, H., Schweizer, E.: *Eur. J. Biol. Chem.*, 24, 492-497 (1972).
3. Kuziora, A., M. Chalmers, H. J., Douglas, G. M., Hitzeman, A. R., Madtick, S. J., Wakil, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 228, (19), 11648-11653 (1983).
4. Wakil, S. J. ve arkadaşları: Kişisel bilgi alışverişi, Gene dergisinde baskıda.
5. Schweizer, E., Picinini, F., Duba, C., Gunter, S., Ritter, E., Linen, F.: *Eur. J. Biochem.*, 15, 483 (1970).
6. Stoops, J. K., Arslanyan, M. J., Cammers, J. H., Joshi, V. J., Wakil, S. J.: *Bio-organic Chemistry* (Van Tamalen, Ed.) Academic Press New York, 1977, S. 339-370.
7. Stoops, J. K., Avad, E. S., Arslanyan, M. J., Gunsberg, S., Wakil, S. J., Oliver, R. M.: *J. Biol. Chem.*, 253, 4464 (1978).
8. Stoops, J. K. and Wakil, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 256, 8364 (1981).
9. Linen, F.: *Eur. J. Bioll. Chem.*, 112, 431 (1980).
10. Stoops, J. K. and Wakil, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 256, 5128 (1981).
11. Bisswanger, H., Schmincke, E.: John Willey and Sons., 1980, s. 1-29.
12. Henry, S. A., Fogel, S.: *Mol. Gen. Genet.*, 113, 1-19 (1971).
13. Schweizer, E., Dietlein, G., Gimler, G., Knopling, A., Tahedl, H. W., Schweietz, H., Schweizer, M.: *Proc. 10th FEBS. meet* 40, 85-97 (1975).
14. Schweizer, E., Kniep, B., Castorph, H., Holzner, V.: *Eur. J. Biochem.*, 39, 353-362 (1973).
15. Krezze, G. G., Oesterhelt, D., Linen, F., Castorph, H., Schweizer, E.: *Bio-chemical and Biophysical Research Communications*, 69 (4), 893-899 (1976).
16. Stoops, J. K., Wakil, S. J.: *ibid*, 84 (1), 225-231 (1978).
17. Williamson, V., Benetzen, V., Young, E.: *Nature*, 283, 214 (1980).
18. Broach, J., Strathem, J., and Hick, J.: *Gene*, 8, 121 (1979).
19. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
20. MAXAM, A. M., Gilbert, W.: *Methods. Enzymol.*, 65, 489 (1980).
21. Ulutin, T., Wakil, S. J.: *Marmara Medical Journal*, 1, 3, 37 (1988).

(Received January 15, 1988)