

Bitkisel orijinli olmayan uyarılabilir promotorların bitkilerde kullanımı

Utilization of non-plant based regulatable promoters in plants

Osman GÜLŞEN¹, Mikail AKBULUT²

¹ Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Melikgazi 38030, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Melikgazi 38039, Kayseri, Türkiye

Sorumlu yazar (*Corresponding author*): O. Gülşen, e-posta (*e-mail*): o_gulsen@yahoo.com

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Alınış tarihi 10 Temmuz 2009 Düzeltilme tarihi 9 Aralık 2009 Kabul tarihi 12 Aralık 2009</p> <p>Anahtar Kelimeler: Uyarılabilir promotor Transgenik bitkiler Gen ekspresyonu Kontrol</p>	<p>Bitki biyoteknolojisinin önemli konularından birisi transgenik bitki teknolojisidir. Transgenik bitki teknolojisinde genellikle transgenin devamlı ekspresyonuna neden olan (constitutive) promotorlar kullanılmaktadır. Bazı gen ürünlerinin sürekli sentezi ise bitkiye zararlı olabilir. Bu nedenle uyarılabilir promotorlar kullanılarak gen ekspresyonunun yeri (doku tipi) ve zamanı belirlenerek transgenin uyardığı negatif etkilerden kaçınılabılır veya etkileri azaltılabilir. Transgen aktivitesinin zamansal ve kantitatif kontrolü için birçok düzenlenebilir ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. Genel olarak promotor aktive edici ve promotor durdurucu sistemler bulunmaktadır. Bu düzenlenebilir moleküler anahtarlar virüslerden böceklerle kadar değişen organizmalardan elde edilmiş olup, bitkilerde ise kullanılabilirliği birçok araştırmalarla ortaya konulmuştur. Geliştirilen düzenlenebilir sistemler arasında kimyasal olarak uyarılabilenlerin diğerlerine oranla uygulanabilirlik açısından birçok üstünlükleri söz konusudur. Her model avantajlara ve dezavantajlara sahiptir ki, bu çalışmada çeşitli düzenlenebilir modeller özetlenmektedir.</p>
ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received 10 July 2009 Received in revised form 9 December 2009 Accepted 12 December 2009</p> <p>Keywords: Inducible promotor Transgenic plant Gene expression Controlled expression</p>	<p>Majority of biotechnology research in plants depends heavily on the genetic manipulation of crops. In transgenic plant technology, the gene of interest is mostly expressed in a constitutive manner although this may be harmful for several applications. Constitutive expression of foreign genes in plants may interfere with physiological processes, compromise development and occasionally be deleterious or even lethal. Currently, there are several inducible expression systems for the temporal, spatial and quantitative control of transgene activity. In general, there are two promoter systems: promoter activation and promoter repression. These molecular switches are derived from viruses, prokaryotes and higher eukaryotes. They have also been shown to be usable in plants in many studies. Among these systems chemically inducible ones are more superior than the others in respect to applicability. Each system has its own advantages and disadvantages which were summarized in this review.</p>

1.Giriş

Bitki fenotipi çok gen (pleiotropik) ve bir tek gen ürünü dahil farklı şekillerde oluşabilir. Bu nedenle transgen ürünü, bitkide diğer önemli karakterler üzerinde bir değişikliğe neden olmamalıdır. Bu amaca uygun olarak son yıllarda geliştirilen uyarılabilen promotorlar çeşitli avantajlara sahiptir: 1) aşırı miktarda sentezlendiğinde ölümcül olan gen ekspresyonlarının dozu ve zamanı ayarlanabilir, 2) transgen, sadece uyarıcı ilave edildiğinde çalışır ve ekspresyon gerçekleşir. Bu amacın gerçekleştirilmesi için, uyarıcı (inducer) olarak adlandırılan kimyasalın kullanılmasıyla çok sıkı olarak düzenlenebilen gen ekspresyonuna ihtiyaç vardır. Bununla beraber uyarılabilir promotor sistemlerinde dikkate alınacak bazı önemli kriterler vardır: a) uyarıcının ilave edilmemesi halinde ya hiç ya da çok düşük seviyede ekspresyon görülmelidir, b) ekspresyon

pleiotropik etkiye (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi) sebep olmamalıdır, c) uyarıcı madde bitkiye toksik olmamalıdır, d) uyarıcılar bol ve alternatifli olarak piyasadan temin edilebilmelidir, e) uyarıcı maddenin uygulaması kolay ve etkili olmalıdır, f) uyarıcı uygulandığında transgen hızlı bir şekilde eksprese olmalıdır.

İki tip promotor sistemi vardır: promotor aktive edici sistemler (promotor activating) ve promotor durdurucu (promoter repressing) sistemler. Her iki metod da çok sayıda olmasa da araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. İkinci metotta, uyarıcının yokluğunda repressör proteini devamlı olarak sentezlenir ve bu protein operatör üzerine bağlanarak transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanmasını, dolayısıyla transkripsiyonu engeller. Transkripsiyon, yalnızca

uyarıcı ortama ilave edildiğinde gerçekleşir. Buna karşın promotor aktive edici sistemlerde, uyarıcı yokluğunda transaktivatör proteini sürekli olarak sentezlenir ve böylece transkripsiyon devam ederken uyarıcının ortama ilavesi transkripsiyonu engeller. Çeşitli bileşikler her iki sistemde de kullanılabilir. Hepsinde sahip olduğu ortak özellik, uyarıcıların etkili olacağı promotorların, bitkiler dışındaki organizmalardan alınmaları nedeniyle promotorların, aktarılan bitki içinde tabii olarak bulunan kimyasal bileşikler tarafından tanınmaması ve aktarılan transgen ürününün pleiotropik etkilere sahip olmamasıdır. Bitkisel orijinli promotorlarla düzenlenebilir bir promotor sistemi yapıldığında, evrimsel bakış açısına göre bitki içerisinde tabii halde oluşan organik bileşiklerle promotorun uyarılması ihtimali bulunduğundan, bitkisel orijinli olmayan promotorlar ve onlarla birlikte kullanılan elementler bitkilere, genetik olarak oldukça farklı olduğu düşünülen organizmalardan transfer edilirler. Böylelikle sıkıca kontrol edilebilen gen ekspresyonunu sağlayabilecek sistemler yapılabilir. Bu konuda son zamanlarda kapsamlı derlemeler yayınlanmıştır (Padidam 2003; Wang ve ark. 2003; Tang ve ark. 2004; Moore ve ark. 2006; Corrado ve ark. 2009). Bu çalışmada da bitkisel kökenli olmayan çeşitli uyarılabilir modeller ele alınarak avantajlar ve dezavantajları özetlenmiştir.

2. Promotor aktive edici sistemler

2.1. Tetrasikline-bağımlı uyarılabilir promotorlar

Bakteriyel *Tet* repressor proteini ve tetrasiklin (tc) arasındaki pozitif termodinamik özellikleri kullanarak tetrasiklin kontrollü transaktivatör (tTA), Virüs Proteini 16 (VP16) aktivasyon DNA zinciri ile *TetR* DNA dizininin karboksil sonuna füzyonuyla yapılabilir. Bu prensip HeLa hücrelerine (Gossen ve Bujard 1992) ve tütün bitkilerine (*Nicotina tobaccum*) başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Weinmann ve ark. 1994). Bu promotor tc'nin varlığında inaktif hale getirilir (Çizelge 1). Tütün bitkilerinin süspansiyon kültüründe transkripsiyon, tc uygulandıktan 15 dakika sonra etkili bir şekilde durdurulabilmektedir. Buna rağmen, ekspresyon seviyeleri tc uyarılabilir sistemde görülen % 30'una çıkabilmiştir. Bu sistem henüz keşfedildiğinden sınırları tam olarak bilinmemektedir.

2.2. Steroid-bağımlı uyarılabilir promotorlar

Bir memeli transkripsiyon aktivatörü, uyarılabilir promotor yapabilmek için kullanılmıştır. Memeli glukortikoid reseptörü (GR) ki, bu deksametason gibi steroidlerin varlığında transkripsiyonu başlatır (McNellis ve ark. 1998). Bu sistem *Schiosaccharomyces pombe*'de uyarılabilir sistemi oluşturmak için kullanılmıştır (Picard ve ark. 1990). Transforme edilen tütün hücrelerinde transkripsiyon çok etkili olarak kontrol edilebilmiş, uyarılan ile uyarılmayan seviyeler arasında 150 kat

fark bulunmuştur (Scheda ve ark. 1991). Buna karşın aynı sistem, transforme edilmiş arabidopsis bitkilerinde (*Arabidopsis thaliana*) etkili bulunmamıştır (Lloyd ve ark. 1994). Oldukça yeni bir çalışmada arabidopsis ve tütün bitkilerinde, fare GR'ünün HBD'si kullanılmıştır (Aoyama ve Chua 1997). Bu sistem bazı avantajlara sahiptir: a) glukortikoid bitkilere toksik değildir, b) hücre membranından geçebilir, c) büyüme ortamına direk ilave edilerek uygulanabilir, d) yoğun olarak çalışılan ve primitif bir bitki olduğu kabul edilen arabidopsis bitkisine başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Çizelge 1). Ortama deksametason ilavesi ile uygulamadan sonraki bir saat içinde, haberci gen aktivitesi uygulamadan önceki seviyesinin 100 katına kadar çıktığı ve en yüksek seviyeye ise 4 saat sonra yükseldiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada glukortikoidlerin 4 farklı türü test edilmiş ve aralarında farklılıklar bulunmasına rağmen hepsinin de etkili olduğu tespit edilmiştir. GR dizininin öteki bitkisel düzenleyici maddeler tarafından tanındığına dair bulguya rastlanmamıştır. Tang ve Newton (2004) yaptığı bir çalışmada deksametazon tarafından uyarılabilen transgenik loblolly çamı hücreleri geliştirmişlerdir. Uyarılabilen promotorun altında raportör gen olarak GFP (yeşil floresan protein) kullanılmıştır. Tüm transgenik hücre hatlarında 5 mg L⁻¹ deksametazon uygulamasından 48 saat sonra GFP ifadesi maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu deney transgenik hücre hatlarında GFP ifadesinin bir uyarıcı tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilebileceğini ve moleküler fizyoloji ve yeni genlerin tanımlanmasında kullanılabileceğini de göstermiştir.

Ecdyson reseptör geni (*EcR*), transgenlerin bitkide düzenlenmesinde kullanılan sistemlerden birisidir. Padidam ve ark. (2003), tarla uygulamalarında önemli olabilecek, ladin tomurcuk güvesi ecdyson reseptörünü (*EcR*) ve non-steroidal agonisti olan metoxyfenozid'i kullanan uyarılabilir gen ifade sistemi geliştirmiştir. Bu çalışmada *EcR* ligand bağlayan bölge, GAL4, LexA bağlayan bölge ve VP16 içeren bölge kimerik transkripsiyonel aktivatör bölge oluşturmak için kullanılmıştır. Metoxyfenozidin varlığında transkripsiyonel aktivatörler, GAL4 ve LexA cevap elementi bulunduran minimal 35S promotor altına klonlanan lusiferaz raportör geninin ekspresyonunu uyarmıştır. Birçok transgenik arabidopsis ve tütün bitkileri metoxyfenozid'in yokluğunda ya çok az bazal ifade göstermiş veya hiç ifade göstermemiştir. Gen ifadesinin metoxyfenozid konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol edilebildiği de gösterilmiştir. Ayrıca sistemin metoxyfenozid ligandı ile transgenlerin regülasyonunda çok etkili olduğu belirtilmiştir. Metoxyfenozidin ticari olarak kolaylıkla elde edilebilir olması, kullanım izninin bulunması, sistemin tarlada da kolayca uygulanabileceğine işaret etmektedir. Ecdyson reseptörleri ile ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada da, ligand bağlanan bölgesinde birkaç aminoasidi değiştirilmiş mutant ecdyson reseptörlerinin liganda olan duyarlılığının 125 kat veya daha fazla artırıldığı Tavva ve ark. (2006 ve 2008) tarafından

Çizelge 1. Bitkisel orijinli olmayan uyarılabilir promotorlar arasında çeşitli açılardan yapılan karşılaştırmalar.

Promotor sistemi	Uyarıcı madde	Uygulanılan organ	Toksosite	Aktivasyon için gerekli zaman	Önemli özelliği	Literatür
Promotor-aktivatör sistem	Tc glukortikoid bakır OOHL	kök kök, yaprak kök, yaprak yaprak	bilgi yok Yok muhtemel Bilgi yok	10 dak. 1 saat 24 saat hızlı*	hızlı bozulur farklı formları yalnız protoplastlarda bilgi yok	Weinmann ve ark. (1994) McNellis ve ark. (1998) Vadim ve ark. (1993) You ve ark. (2006)
Promotor-durdurucu sistem	tc etanol IPTG	kök kök, yaprak kültür	Evet Yok Bilgi yok	10 dak. 4 saat hızlı*	hızlı bozulur biyolojik parçalanma yalnız protoplastlarda	Gatz (1997) Salter ve ark. (1998) Kulmberg ve ark. (1991)

*Zaman belirtilmemiş.

yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Mutant genin kullanılabilirliği arabidopsis ve tütün bitkisinde çinko parmak geninin ifadesinin düzenlenmesinde de gösterilmiştir.

2.3. Bakırla uyarılabilir sistemler

Bakır, ekme mayasına ait *ace1* geni ile birlikte tütün bitkilerinde kullanılmıştır (activating copper-MT expression) (Mett ve ark. 1993). Bu sistemde söz konusu transgen, bakırın yokluğunda çalışmaz (Çizelge 1). Sistemde bakır, ACE1 proteinin şeklini değiştirir ve bu proteinin promotora bağlanmasına, dolayısıyla da transgenin ekspresyonuna sebep olur. Transgenik tütün bitkisinde, ekspresyon seviyesinin bakır uygulamasından 10 gün sonra 50 katına kadar çıktığı tespit edilmiştir.

Bakırla uyarılabilir promotörün kontrolü altında, sitokinin sentaz (ipt) geni aktarılan tütün bitkilerinde kontrollü bir şekilde sitokinin üretildiği gösterilmiştir. Herhangi bir anomali göstermeyen ve istenildiği zaman sitokinin üretmek üzere uyarılabilir transgenik tütün bitkileri elde edilmiştir (McKenzie ve ark. 1998). Bu bitkiler endojen sitokinin, bitki gelişimine etkisinin araştırılması için kullanılabilir. Bir başka çalışmada ise, bakır tarafından uyarılan promotörün, transgenik arabidopsis bitkisinde de gen ekspresyonunun yerini ve zamanını düzenlemede kullanılabilceği tespit edilmiştir (Granger ve Cyr 2001). Bu çalışmada, bakırla uyarılabilir promotör altındaki *gfp* konstraktını arabidopsis bitkilerine aktararak elde ettikleri transgenik bitkilerde dışarıdan uygulanan bakır seviyesine göre gen ifadesini yukarı ve aşağıya çekerek düzenlenebileceği ortaya konulmuştur. Genin hem kök hem de toprak üstü organlarda eksprese edildiği belirlenmiştir.

2.4. Diğer aktive edici promotör sistemleri

Böceklerle karşı direnç geliştirilmek üzere bazı bitkisel orijinli olmayan genlerin bitkide ifade ettirilerek bitkilerin zararlı böceklerle direnç kazandırılması insan ve çevre sağlığı açısından son derece önemli ve bitki biyoteknolojisinin en fazla üzerinde durduğu önemli konulardan biridir. Bu amaçla bitkilerde ifade ettirilen yabancı genlerden en çok çalışılan ve kullanılan *Bacillus thuringiensis* kristal proteinlerini kodlayan genlerin çeşitli bitkilerde ifade ettirilmesidir. Ancak bu gen ürünlerinin insan gıdalarında bulunmasının bir tehlike arz etmediği bilinmesine rağmen, yine de bunların insan gıdalarında bulunması arzu edilmemektedir. Bu tür genlerin uyarılabilir veya dokuya özgü ifade edilen bir promotör altında bitkiye aktararak kontrollü ifade ettirilmesi bu tür transgenik bitkilerin tüketici tarafından kabulünü kolaylaştıracaktır. Böyle bir yaklaşımla Bates ve ark. (2005), kimyasal olarak Bt toksini üreten transgenik broccoli üretmişlerdir. Bu amaçla patojene cevap veren promotör olan ve salisilik asit tarafından uyarılan PR-1a promotörü altına *cry1Ab* geninin klonlandığı transgenik brokoli bitkileri üretmişlerdir. PR-1a promotörü, patojen enfeksiyonu sonrası biriken salisilik asitle veya dışarıdan uygulanan SA analoglarıyla (acibenzolar-smethyl[benzo (1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester](ASM) uyarılabilir. Transgenik bitkilerin yapraklarının acibenzolar-smethyl[benzo (1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester veya ASM ile spray edilmesi yüksek derece Bt toksininin birikmesini neden olmuştur. Transgenin sentezlendiği yapraklar üzerinde beslenen *P. xylostella*'nin tüm dönemlerinde % 100 ölüm görülmüştür. Yeni gelişen yapraklar 4. yeni yaprağa kadar % 80 toksisite göstermiştir. Uyarılmış bitkiler 3 hafta boyunca böcek beslenmesinden korunmuştur.

Bu amaçla bazı sıra dışı sistemler de geliştirilmiştir. Virus

ekspresyon sistemi, uyarılabilir bitki ekspresyon sisteminde transkripsiyonel aktivatörleri kullanmak amacıyla örnek alınabilir. Bu sistem Hull ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu virus tarafından uyarılan transkripsiyonel aktivatör sisteminde iyi karakterize edilmiş maya GAL4 UAS-temelli promotör GAL4-VP16 transkripsiyonel aktivatör ile birlikte kullanılmıştır. Bu sistem kimyasal olarak uyarılabilir sisteme çok benzemesine rağmen transkripsiyon faktörünün viral vektör tarafından sunulması kimyasal uyarıcıya olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır.

Son zamanlarda yapılan önemli çalışmalardan birisi de *Agrobacterium* gibi gram negatif bakterilerden elde edilen 'quorum sensing' bileşeni, bitkilerde gen ekspresyonunun regülasyonunda etkili ve uyarılabilir sistem olarak kullanılmıştır (Çizelge 1). Bu bakteriler kendi popülasyon yoğunluklarını, N-acyl homoserine lactone ailesini uyarıcı, onun reseptörünü de transkripsiyonel aktivatör olarak kullanarak izlerler. Yapılan çalışmada *A. tumefaciens*'den elde edilen, *Tral* ve onun reseptörü *TraR* tarafından sentezlenen bileşen (i.e. 3-oxooctanyl-L-homoserine lactone [OOHL]) kullanılmıştır. OOHL, *TraR*'ye bağlandığında onun özel Cis elementi olan *TraR* kutusunu tanıtır. *TraR*'nin amino ucuna ökaryotik *VP16*'nin aktivasyon bölgesi translayonel olarak birleştirilmiştir. OOHL'nin varlığında, kimerik *VP16:TraR* transkripsiyonel regülatörü, karayosunu (*Physcomitrella patens*), arpa (*Hordeum vulgare*), havuç (*Daucus carota*) ve transgenik arabidopsiste raportör gen ekspresyonunu uyarmıştır. Uyarıcının yokluğunda düşük seviyede raportör gen ifadesi gözlemlenmiştir. Yapraklara uyarıcı uygulanması sonucu 30-200 kat uyarılma tesbit edilmiştir (You ve ark. 2006).

3. Promotör durdurucu sistemler

3.1. Tetrasiklin-uyarılabilir promotörler

Durdurma prensibi, (repressing system) bir represör proteininin transkripsiyonda önemli proteinleri engellemesi temeline dayanır. Bu sistem bakterilerde yaygın bir mekanizma olmakla birlikte gelişmiş organizmalarda (Eukaryote) bulunmaz. *Esterichia coli*'ye ait *Tn10* geni tarafından kodlanan TetR durdurucu proteini, transkripsiyon faktörlerinin toplanmasını engelleyerek transkripsiyonu düzenler. Düşük miktarda olsa bile, ortama tc ilavesiyle durdurucu protein promotörden ayrılır ve transkripsiyon başlar (Hillen ve Berens 1994).

Transgenik tütün bitkilerinde ekspresyon seviyesinin 500 katına kadar çıktığı ve tc'ye tepki olarak, tc'nin 0,1 mg/l gibi düşük dozlarında bile yalnızca 10 dakikada ekspresyon başladığı tespit edilmiştir (Çizelge 1) (Gatz ve ark. 1991). Tc, toksik etkisi nedeniyle yapraklara uygulanamaz. Bütün bitkide maksimum uyarım için 10-14 gün gereklidir ve tc'nin kısa sürede bozulması nedeniyle, ortama hergün ilave edilmelidir. Bu son özellik ve uygulanabildiği organların sınırlı olması sebebi ile bu sistem tercih edilebilir olmaktan uzak görünmektedir. Tc'nin yokluğunda, TetR ekspresyonunun yüksek seviyelerinin domates ve tütün bitkilerinde azalan sürgün kuru ağırlığına, yaprak klorofil içeriğine, yaprak büyüklüğüne ve olumsuz etkilenebilir fotosentez fizyolojisine sebep olduğu belirtilmiştir (Chorlett ve ark. 1996). Buna ilave olarak arabidopsiste transkripsiyonel kontrol için yeterli Tet durdurucu protein konsantrasyonlarına tolere edilemez. Bu dezavantajlar bu sistemin pratik açıdan uygulanabilirliğini azaltmaktadır.

3.2. IPTG-uyarılabilir promotorlar

Bakteriyel lac operatör durdurucu sistemi, uyarılabilir bir sistem yapmak üzere kullanılmıştır (Wilde ve ark. 1992). Bir repressör proteini olan *LacI*, IPTG gibi bir uyarıcının yokluğunda sentezlenir. Bu olay repressör proteininin operatöre olan eğilimini arttırmayla gerçekleşir. Tütün bitkileri başarılı ve kolayca transforme edilebildiğinden bu sistem öncelikle tütün bitkisine uygulanabilmiştir. Transforme edilen bitkilerdeki ekspresyon kapasitesi öteki düzenlenebilir promotorlara göre düşüktür. IPTG ile uyarılabilir promotorların diğer bitkilere uygulanması henüz gerçekleşmemiştir.

3.3. Etanol-uyarılabilir promotorlar

Etanolun yokluğunda *Aspergillus nidulans*'a ait ALCR proteini (tc uyarılabilir sistemdeki TetR benzeri bir protein), *PalcA* kontrol bölgesine bağlanır ve transkripsiyonu engeller (Caddick ve ark. 1998). Etanol ortama ilave edildiğinde ALCR'nin şekli değiştirilir ve promotor aktif hale gelir. Plazmid 35S:*alcR* konstraktı bir *alcR* cDNA'sı kullanarak yapılmıştır ve *alcR*: *CAT* konstraktıyla birlikte *Agrobacterium tumefaciens* içine transfer edilmiştir. Daha sonra tütün bitkisi, transgenleri içeren bakteri ile transforme edilmiştir. Bu sistemde iki konstrakt vardır: 35S CaMV'den devamlı olarak sentezlenen durdurucu proteinin (ALCR) bulunduğu konstrakt ve *CAT* haberci geninin yanısıra ALCR proteinin bağlandığı DNA dizini ile 35S downstream dizinini içeren haberci konstrakt.

Kullanılan *alcR*:35S konstraktı, *alcR* promotorunun upstream aktivatör bölgesi (*palcA*) ile transkripsiyonu başlatma yeteneğine sahip olmayan -46 ve +5 bölgesini içeren minimal 35S promotorunu içerir. Bu konstrakt rekombinant PCR tekniği yardımıyla yapılmıştır (Higuchi 1990). Bu transgen açısından homozigot tütün bitkileri, heterozigotların kendilenmesinden elde edilmiş ve bu homozigot hatlar etanolla uyarıldığında maksimum ekspresyonu elde etmek için kullanılmıştır (Caddick ve ark. 1997; Salter ve ark. 1998). Etanol uyarımı, tetrasiklin sistemine göre uygulamadan 4 saat sonra ekspresyon gösterdiğinden oldukça yavaş bulunmuş ve her iki çalışmada da 4 gün sonra maksimum seviyeye çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 1). Etanolun yokluğunda tespit edilebilir senteze rastlanmamıştır. Kontrol bitkileri 0,38 ng CAT sentezlemesine rağmen her bir uyarılmış bitkide, her bir mg toplam protein için 32 ng CAT sentezlemiştir. Bununla birlikte, düzenleyici elementlere sahip olmayan transforme edilmiş bitkiler, hem etanol uygulanmış bitkide hem de uygulanmamış bitkide yüksek ekspresyon göstermişlerdir. Tabii büyüme koşullarında, bitkideki tabii olarak bulunan uyarıcıların seviyelerinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden *alcR*, içsel etanol düzeyini aşırı derecede arttıran aşırı sulamaya rağmen içsel etanol tarafından uyarılmamıştır (Caddick ve ark. 1998). *A. nidulensis* ve bitkiler arasındaki evrimsel oluşum dönemleri arasındaki zaman farkı oldukça büyüktür. Bu durum, ALCR proteinin bitkiler tarafından tanınması ihtimalini azaltmaktadır. ALCR proteini, çinko-binükler demet benzeri *Gal4* (zinc binuclear cluster-like Gal4) bulundurmaktadır. Bu duruma genellikle bitkilerde rastlanılmamaktadır ve aynı şey *alcR* promotorunu engelleyen transkripsiyon faktörleri içinde geçerlidir.

Etanolla uyarım belirli avantajlara sahiptir: a) piyasadan kolaylıkla ve bol miktarda temin edilebilir, b) çalışılan konsantrasyonlarda bitkilere toksik olmadığı tespit edilmiştir ve c) hem yapraklara hem de köklere uygulanabilir. Bu avantajları nedeniyle etanolla uyarılabilir promotor sistemlerinin

kullanımının yayılması kuvvetli ihtimaldir.

Transgenik tütün bitkilerinde *alc* promotor sisteminin etanole ek olarak asetaldehit tarafından da uyarılabilirdiği Schaarschmidt ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Transgenik tütün bitkilerinde, etanolün aksine *alc* promotorunun dokuya özgü promotora ihtiyaç duymadan dokuya özgü aktivite gösterdiği de bu çalışmada ispat edilmiştir. Garoosi ve ark. (2004), domateste etanolla uyarılabilir *alc* geninin ekspresyonunun gerçekleştirildiği bitkileri karakterize etmiştir. *A. nidulans*'dan elde edilen transgen ekspresyon sistemi kullanılmıştır. İki farklı konstrakt (*alcR*; *alcA*: *CAT* ve *alcR*; *alcA*: *GUS*) kullanılarak sistemin etkinliği test edilmiştir. Genç yapraklarda ekspresyonun daha yoğun olduğu gözlenmiştir. En yüksek ekspresyon seviyesinin ise karnıbahar mozaik virüsü 35S promotoru tarafından ortaya konulan seviyeye yakın olduğu belirlenmiştir.

4. Sonuç

Yukarıda da açıklandığı gibi düzenlenebilir promotorların hiç birisinin, her açıdan ve her türlü koşulda avantajlı olmadığı ortaya çıkmaktadır. Her promotor sistemi belirli açılardan diğerlerine göre kesin avantajlara sahiptir. Genelde promotor durdurucu ve bakıra bağımlı promotor aktivatör sistemlerinde uyarıcı uygulandığı durumda transgen eksprese edildiğinden, ekspresyonunun bitkisel gelişimin çiçeklenme ve hastalık epidemiyolojisi gibi spesifik dönemlerinde gerekli olduğu durumlarda büyük avantajlar sağlayabilir. Bununla birlikte uyarıcının yokluğunda sentezlenen durdurucu protein, bitki üzerinde herhangi bir pleiotropik etkiye ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiye sahip olmamalıdır. Tetrasiklinin kısa ömürlü ve işığa duyarlı olması nedeniyle, tetrasiklin temelinde dayalı sistemlerin tarım ve bilimde yayılmasının güç olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, uygulandığında çok hızlı tepki göstermesi nedeniyle belirli durumlarda diğer sistemlere göre avantajlı olabilir. Etanol temelinde dayalı promotor sistemleri etanolun pazardaki bolluğu ve görünürde öteki sistemlere göre çok önemli dezavantajı tespit edilmediğinden gelecekte daha yaygın kullanım alanı bulacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca metoxyfenozidine dayalı sistemlerin, bu ürünün ticari olarak piyasada kolayca bulunması, kullanım izninin olması, sistemin pratiğe kolayca aktarılacağı sonucunu doğurmaktadır.

Kaynaklar

- Aoyama T, Chua NH (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Journal* 11: 605-612.
- Bates SL, Zhao JZ, Roush RT, Shelton AM (2005) Insect resistance management in GM crops: past present and future. *Nature Biotechnology* 23: 57-62.
- Caddick MX, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnewald U, Tomsett AB (1997) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* 16: 177-181.
- Caddick MX, Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Tomsett AB (1998) An ethanol-inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* 16: 177-181.
- Chorlett JE, Myatt SC, Thompson AJ (1996) Toxicity symptoms caused by high expression of TetR repressor in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) are alleviated by tetracycline. *Plant Cell Environment* 19: 447-454.
- Corrado G, Karali M (2009) Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnology Advances* 27: 733-743.

- Garoosi GA, Salter MG, Caddick MX, Tomsett AB (2004) Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in tomato. *Journal of Experimental Botany* 56: 635-1642.
- Gatz C (1997) Chemical control of gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 89-108.
- Gatz C, Kaiser A, Wendenburg R (1991) Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* 227: 229-237.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5547-5551.
- Granger CL, Cyr RJ (2001) Characterization of the yeast copper-inducible promoter system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 20: 227-234.
- Higuchi R (1990) Recombinant PCR. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (Eds.), *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 177-183
- Hillen W, Berens C (1994) Mechanism underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annual Review of Microbiology* 48: 345-369.
- Hull AK, Yusibov V, Mett V (2005) Inducible expression in plants by virus-mediated transgene activation. *Transgenic Research* 14: 407-416.
- Kulmberg P, Prange T, Mathieu M, Sequeval D, Scazzochio C, Felenbok B (1991) Correct intron splicing generates a new type of putative zinc-binding domain in a transcriptional activator of *A. nidulensis*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 280: 11-16.
- Lloyd AM, Schena M, Walbot V, Davis RW (1994) Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: Patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* 266: 436-439.
- McKenzie M, Mett V, Reynolds PHS, Elizabeth PJ (1998) Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. *Plant Physiology* 116: 969-977.
- McNellis T, Mudget W, Li B, Aoyama K, Horvath T, Chua D, Staskawicz NH (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 14: 247-257.
- Mett V L, Lochead LP, Reynolds PHS (1993) Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4567-4571.
- Moore I, Samalova M, Kurup S (2006) Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant Journal* 45: 651-83.
- Padidam M (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 169-77.
- Padidam M, Gore M, Lily LD, Smirnova O (2003) Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgenic Research* 12: 101-109.
- Picard D, Schena M, Yamamoto KR (1990) An inducible expression vector for both fission and budding yeast. *Gene* 86: 257-261.
- Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Caddick MX, Tomsett AB (1998) Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant Journal* 16: 127-132.
- Schaarschmidt ST, Qu N, Strack D, Sonnewald U, Hause B (2004) Local induction of the alc gene switch in transgenic tobacco plants by acetaldehyde. *Plant Cell physiology* 45: 1566-77.
- Schena M, Lloyd AM, Davis RW (1991) A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10421-10425.
- Tang W, Newton RJ (2004) Glucocorticoid-inducible transgene expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) cell suspension cultures. *Plant Science* 166: 1351-1358.
- Tang W, Luo XY, Samuels V (2004) Regulated gene expression with promoters responding to inducers. *Plant Science* 166: 827-34.
- Tavva VS, Dinkins RD, Palli SR, Collins GB (2006) Development of a methoxyfenozide responsive gene switch for applications in plants. *Plant Journal* 45: 457469.
- Tavva V S, Palli SR, Dinkins RD, Collins GB (2008) Improvement of a monopartite ecdysone receptor gene switch and demonstration of its utility in regulation of transgene expression in plants. *Federation of European Biochemical Societies journal* 275: 2161-2176.
- Vadim LM, Lochhead LP, Reynolds PHS (1993) Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4567-4571.
- Wang RH, Zhou XF, Wang XZ (2003) Chemically regulated expression systems and their applications in transgenic plants. *Transgenic Research* 12: 529-540.
- Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H, Gatz C (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant Journal* 5: 559-569.
- Wilde RJ, Shuffelbottom D, Cooke S, Jasinsca I, Merryweather A, Beri R, Brammar WJ, Bevan M, Schuch W (1992) Control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator-repressor system. *European Molecular Biology Organization Journal* 11: 1251-1259.
- You YS, Marella H, Zentella R, Zhou Y, Ulmasov T, Ho THD, Quatrano R (2006) Use of bacterial quorum-sensing components to regulate gene expression in plants. *Plant Physiology* 140: 1205-212.