

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ZEYTİN TAHMİNİ P450 MONOOKSİGENAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müslime YAVUZ

Balıkesir, Temmuz-2011

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ZEYTİN TAHMİNİ P450 MONOOKSİGENAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müslime YAVUZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 15.07.2011

Jüri Üyeleri: Prof.Dr.Serkan URANBEY (ÇKÜ)

Yard.Doç.Dr.Fatih COŞKUN (BAÜ)

Yard.Doç.Dr.Ekrem DÜNDAR (Danışman, BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun
nolu kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Temmuz-2011

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 106O616 ve 110O108 numaralı projeler ve Balıkesir Üniversitesi tarafından 2011-29 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

ZEYTİN TAHMİNİ P450 MONOOKSİGENAZ GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Müslime YAVUZ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr.Ekrem DÜNDAR)

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada zeytin (*Olea europaea* L.) cDNA kütüphanesinden seçilen tahmini sitokrom P450 monooksijenaz geninin moleküler boyutta aydınlatılması amacıyla klonlama, anlık gösterimli PCR (real - time PCR), TAIL - PCR gibi teknikler kullanılmıştır. Ayrıca çeşitli biyoinformatik analizler, intron analizi ve polimorfizm analizi çalışmalarıyla da tahmini gen hakkında detaylı bilgi edinilmiştir.

Planlanan enzim aktivite ölçümü için gen, ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Anlık gösterimli PCR ile genin zamansal ve dokusal ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Genin kontrolünü sağlayan promotör bölgesinin tespiti için TAIL - PCR kullanılmış ve tahmini promotör bölgesi adayı PCR ürünleri elde edilmiştir. İtron ve polimorfizm analizleri sonucunda genin 4 farklı introna ve zeytin çeşitleri arasında polimorfizme sahip olduğu belirlenmiştir. Kullanılan çeşitli biyoinformatik araçlarla genin biyolojik işleyişi, hücre içerisinde bulunduğu konumu ve moleküler fonksiyonu tahmin edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin, promotör, mRNA ekspresyon seviyesi, enzim aktivitesi, polimorfizm, intron, biyoinformatik analiz.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PUTATIVE CYP450 MONOOXYGENASE GENE FROM OLIVE

Müslime YAVUZ

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(M.S. Thesis / Advisor: Assistant Prof.Dr.Ekrem DÜNDAR)

Balikesir- Turkey – 2011

In this study a putative cytochrome P450 monooxygenase isolated from olive (*Olea europaea* L.) leaf cDNA library was studied. Various techniques such as cloning, real - time PCR and TAIL - PCR have been applied for the analysis of the gene in molecular level. Also, detailed information was obtained through bioinformatics tools, intron analysis and polymorphism analysis.

The gene was cloned into expression vector for determination of the enzyme activity. Spatial and temporal expression levels were determined using real - time PCR. TAIL – PCR was employed to capture PCR products harboring the putative promoter region. The putative gene was determined to contain four introns. Polymorphism was also detected among different olive cultivars. Biological activity, cell localization and molecular function of the gene were determined using bioinformatics tools.

KEYWORDS: Olive, promoter, mRNA expression level, enzyme activity, polymorphism, intron, bioinformatic analysis.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ANAHTAR KELİMELER	ii
ABSTRACT	iii
KEYWORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.2 Sitokrom P450 Gen Ailesi	2
1.3 Sitokrom P450 Enzim Yapısı ve Aktif Bölge	3
1.4 Monooksijenazlar ve Enzim Reaksiyon Mekanizması	4
1.5 Sitokrom P450 Proteininin Hücredeki Lokalizasyonu	9
1.6 ER'a Lokalize Olmuş NADPH-CYP450 Redüktazlar	11
1.7 Sitokrom b5	12
1.8 Sitokrom P450 Enzimlerinin Substrat Özgüllüğü	12
1.9 Sitokrom P450 Genlerinin İndüklenmesi	13
1.10 Sitokrom P450 Genlerinin İnhibisyonu	13
1.11 Sitokrom P450 Enzim Sisteminin Bitkiler İçin Önemi	14
2. MATERYAL-METOD	15
2.1 Biyoinformatik Analizler	15
2.1.1 Açık Okuma Çerçevesinin Tespiti	15
2.1.2 Amino asit kompozisyonunun bulunması	15
2.1.3 Membran Protein Analizi	15
2.1.4 Sinyal Peptit Analizi	15
2.1.5 Demir Bağlama Domaininin Tespiti	16
2.1.6 Glikozilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi	16

2.1.7 Blast2Go Analizi	16
2.1.8 Alternatif Splays Analizi	16
2.2 İtron Analizi	16
2.2.1 Primerlerin Dizaynı	16
2.2.2 Primer Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	17
2.2.3 gDNA İzolasyonu	17
2.2.4 PCR Bileşenleri ve Koşulları	19
2.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi	20
2.3 Polimorfizm Analizi	20
2.4 Promotör Analizi	21
2.4.1 TAIL PCR için Primerler	21
2.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	24
2.5.1 Real - time PCR	24
2.5.2 RNA İzolasyonu	25
2.5.3 Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
2.5.4 Real Time PCR Plate'inin Hazırlanması	28
2.6 Genin <i>Pichia</i> Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	28
2.6.1 cDNA'nın Çoğaltılması	28
2.6.2 Ekspresyon Primerlerinin Dizaynı	31
2.6.3 cDNA ve Vektörün Kesilmesi	32
2.6.4 Ligasyon Koşulları	33
2.6.5 Transformasyon	33
2.6.6 Zeozin Hazırlanması	34
2.6.7 Kompetan Hücre Hazırlanması	34
2.6.8 Koloni Tarama	36
2.6.9 Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu	36
2.6.10 Klonlamanın Teyid Edilmesi	38
3. ÇALIŞMANIN KAPSAMI	39
4. BULGULAR	41
4.1 Biyoinformatik Analiz Bulguları	41
4.1.1 Açık Okuma Çerçevesi	41
4.1.2 Dizinin Amino asit Kompozisyonu	42
4.1.3 Membran Protein Analizi	42
4.1.4 Sinyal Peptit	42

4.1.5 Demir Bağlama Domaini	43
4.1.6 Glikozilasyon Bölgeleri	44
4.1.7 Blast2GO Sonuçları	44
4.1.8 Alternatif Splays Sonucu	47
4.2 İtron Analiz Sonuçları	47
4.3 Polimorfizm Sonuçları	49
4.4 Tail – PCR Sonuçları	50
4.5 Real Time PCR Sonuçları	50
4.6 Sitokrom P450 Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanma Sonuçları	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR N	57

KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
DEPC	Dietilpirokarbonat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
EtBr	Etidyum bromür
gDNA	Genomik DNA
Kb	Kilo baz
NAD	Nikotinamit adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamit adenin dinükleotid fosfat
OD	Optik densite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borat etilendiamintetraasetikasit
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviöle
FMN	Flavin mononükleotit

FAD	Flavin adenin dinükleotit
D	Dalton
CYP450	Sitokrom P450 monooksijenaz enzimi

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
Şekil 1.1	CYP1A2'nin Sistematik Adlandırılması	3
Şekil 1.2	CO Bağlı Sitokrom P450'nin Abzorbans Spektrumu	4
Şekil 1.3	Sitokrom P450'de Demir Bağlama Domaini Motifi	4
Şekil 1.4	Sitokrom P450'deki Hem Prostetik Grup	7
Şekil 1.5	Sitokrom P450 Reaksiyon Mekanizması	7
Şekil 1.6	Proteinlerin ER'a SRP Aracılığı ile Yerleşmesi	10
Şekil 1.7	Membran Protein Tipleri	10
Şekil 1.8	Endoplazmik Retikulum (Mikrozomal) CYP Sistem Elemanları	12
Şekil 2.1	RNA İzolasyonu İçin Toplanan Örnekler	29
Şekil 2.3	Real time PCR Plate	30
Şekil 2.3	Standart Hazırlama	30
Şekil 2.4	Sinyal Peptidin Uzaklaştırılmasını Hedef Alan Primer Dizaynı	33
Şekil 4.1	BioEdit Programında Açık Okuma Çerçevesinin Tespiti	41
Şekil 4.2	BioEdit Programında Amino asit Kompozisyonunun Tespiti	42
Şekil 4.3	TopPred Programında Membran Heliks Tespiti	43
Şekil 4.4	Signal P Programında Sinyal Peptit Analizi	44
Şekil 4.5	InterPro Scan Programında Demir Bağlama Domaininin Tespiti	45
Şekil 4.6	NetNGlyc Programında N-Glikozilasyon Bölgelerinin Tespiti	45
Şekil 4.7	NetOGlyc Programında O-Glikozilasyon Bölgelerinin Tespiti	46
Şekil 4.8	İntron ve Alternatif Splays Bölgeleri	47
Şekil 4.9	İntron Analizi jel Görüntüsü	48
Şekil 4.10	İntronların yer ve Uzunluklarının Tespiti	48

Şekil 4.11 Dizileme Sonrası Polimorfizm Analizi	49
Şekil 4.12 TAIL PCR Jel Görüntüsü	50
Şekil 4.13 Real time PCR Dokusal Ekspresyon Analiz Grafiği	51
Şekil 4.14 Real time PCR Zamansal Ekspresyon Analiz Grafiği	51
Şekil 4.15 Transformasyon Sonrası Petri Görüntüsü	52
Şekil 4.16 Koloni PCR Jel Görüntüsü	52
Şekil 4.17 Klonlanan Genin Kesim Sonrası Vektörden Ayrılması	53

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
Tablo 2.1	Primer Çalışma Solüsyonu Hazırlama	17
Tablo 2.2	PCR Koşulları	19
Tablo 2.3	PCR Reaksiyon Karışımı ve Bileşenlerin Yoğunlukları	19
Tablo 2.4	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri	20
Tablo 2.5	TAIL PCR Primerleri ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	21
Tablo 2.6	TAIL PCR Döngü Koşulları	22
Tablo 2.7	TAIL PCR Reaksiyon Karışımları	23
Tablo 2.8	Real time PCR Döngü Koşulları	25
Tablo 2.9	Real time PCR’da Kullanılan Primerler	25
Tablo 2.10	Örneklerin Toplanma Tarihi ve Hava Durumu	27
Tablo 2.11	Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	32
Tablo 2.12	Uygun Enzimler ve Tanıma Bölgeleri	32
Tablo 2.13	LB Besiyerlerinin Hazırlanması	35
Tablo 2.14	Koloni PCR Koşulları	37
Tablo 2.15	Koloni PCR Karışımı	37
Tablo 2.16	AOX Primerleri	38
Tablo 4.1	BALST2GO Analizi	46

ÖNSÖZ

Üretmekten ziyade ezbere dayalı bir eğitim sisteminden çıkmış olmam, her ne kadar hayal gücümün sınırlarını aşmayı seviyor olsam da, benden sürekli bir üretkenlik bekleyen yüksek lisans eğitimim ile tanışma aşamasında beni zorladı.

Geçen günler, aylar içersinde ekip çalışması ruhu ve "iş içinde eğitim" ilkesiyle beni de eritmeye, eğitmeye çalışan; her türlü sorunumuzla ilgilenebilmek için kendi vaktini bizlere bağışlayan, değerli tecrübeleriyle bizleri yönlendiren; araştırma metotlarını bizlere öğreten ve kendimize yetebilmemiz, topluma faydalı olabilmemiz için bizleri yüreklendiren; yapmış olduğum taşkınlıkları büyük bir sabırla karşılayan danışman hocam Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkür gönül borcumdur.

Ders aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a; hiçbir desteğini benden esirgemeyen, hayata dair birçok tavsiyesiyle beni destekleyen sevgili hocam Doç. Dr. Yusuf TURAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızda yardımlarını bizlerden esirgemeyen, laboratuvarımızın tecrübeli ekibi Öznur SUAKAR, Görkem Deniz SÖNMEZ ve Şakir AKGÜN'e teşekkür ederim.

Sıkıntılarımızı, sevinçlerimizi paylaştığımız, birbirimize destek olduğumuz dönem arkadaşlarım Gamze YENER, Gülçin ÇETİN, Şenay SÜNGÜ ve Zeynep KARABAŞ'a teşekkür ederim.

Toplanan zeytin örneklerinin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde örnekleri nukleazlardan korumak için kullanılan sıvı azotu temin etmemizi sağlayan ve bizleri her zaman güler yüzle karşılayan 'Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği' kurumunun müdürü/müdür yardımcısı Hasan DERTLİ/Mustafa YILDIRIM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak beni büyük fedakarlıklarla yetiştiren, attığım her adımda yanımda olan, sevgilerini ve en büyük destekçim olan dualarını benden esirgemeyen, çok sevdiğim aileme binlerce teşekkürler...

Balıkesir,2011

Müslime YAVUZ

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Moleküler biyoloji, biyolojinin alt bilim dalları olan biyokimya, hücre biyolojisi, genetik, biyofizik gibi alanların son yıllarda çok daha fazla önem kazanması ve teknolojinin üstün gelişimi ile ortaya çıkmış, hızla gelişmekte olan bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı organizmada cereyan eden olayları moleküler seviyede tetkik eder [1, 2]. Organizmadaki canlılığın yapı taşları olan nükleik asitlerin, protein ve enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını aydınlatmak moleküler biyolojinin ilgi alanıdır. Moleküler biyoloji çalışmaları, bilgisayar ortamında DNA dizilerinin çeşitli yönlerden analizini mümkün kılan biyoinformatik araçların gelişmesiyle daha da hız kazanmıştır. Moleküler biyolojide kullanılan mikroçipler ile gen ifade profilleri çıkarılabilmekte, aynı zamanda anlık gösterimli PCR ile farklı koşullarda genin ekspresyon seviyeleri incelenebilmektedir. Floresan antikor tekniğiyle proteinler hücre içerisinde takip edilip hangi hücrenin, ne koşulda ilgili proteini nasıl-nerede kullandığı bulunmaktadır [3]. Kısacası moleküler biyoloji, organizmaların gerçekleştirdikleri hayatsal faaliyetlerin alfabetini ortaya koymaktadır.

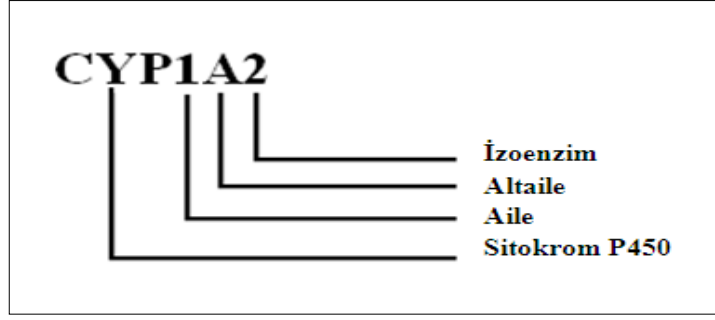
Birçok organizmanın genom yapısı aydınlatılmaya başladıktan sonra moleküler biyoloji ilgisini proteinlerin canlı organizmada üstlendikleri görevlere ve birbirleriyle olan etkileşimlerine yöneltmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda, tahmini sitokrom P450 monooksijenaz geni hakkında detaylı bilgi için biyoinformatik araçlardan yardım alıp; protein eldesi, aktivite ölçümü, genin regülasyonunu sağlayan promotör bölgesinin tespiti, intron analizi ve polimorfizm analizi için moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak bu gen ile ilgili gelecekte oluşacak olan çalışma zincirinin ilk halkasını başlatmış olduk.

1.2 Sitokrom P450 Gen Ailesi

Sitokrom P450 enzim ailesi, özelleşmiş enzimlerin oluşturduğu koruyucu sistemlerden biridir [4]. Bu enzimlerle ilgili ilk çalışmaların 1960'lı yıllarda yapılmaya başlandığı görülmektedir. Çalışmalar ile sağlanan bilgiler sonucunda bazı sınıflandırma problemleri ortaya çıkmıştır. Nebert'in çalışmasında [5] bu probleme yönelik farklı bir sınıflandırma metodu sunulmuştur. Bu sistemde Cyt P450 enzimleri amino asit dizi benzerliklerine göre sınıflandırılmıştır (Şekil 1.1) Bu öneriye göre yapılan sınıflandırmada, yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerine yakın olan sitokrom P450 enzimleri bir araya gelmektedir. Sitokrom P450 enzimleri birçok aile ve alt aile olarak ikiye ayrılmaktadır. Buna göre amino asit dizilimi yönünden en az %40 benzerlik gösteren enzimler aynı aile içinde yer almaktadır. Aynı alt aile grubunda ise aminoasit dizilim benzerliği en az %55 olmaktadır. Bu özelliklere göre yapılan sınıflandırma sonucunda; 16 aile ve çok miktarda alt aile ortaya çıkmıştır [6]. Sitokrom P450 enzimleri CYP1A2, 2C8, 2C9/10, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4 gibi alt aileleri içeren büyük bir enzim ailesidir. Son yıllarda geliştirilen adlandırma sistemine göre CYP1A2 kısaltmasında CYP; sitokrom P450'yi, 1 rakamı; aile numarasını, A harfi; alt aileyi ve en sondaki 2 rakamı ise izoenzimi göstermektedir. CYP1A2*M×N'de M gen duplikasyonlarını, N harfi ise kopya sayısını gösterir [7, 8]. Genel bilimsel ifade kuralında olduğu gibi genotip ve genler italik olarak yazılırken enzim normal şekilde yazılır [9].

Sitokrom P450 sistemi prokaryot ve ökaryot bütün canlılarda mevcuttur. Hemen hemen her dokuya ait farklı P450 enzimleri bulunmuştur.

Bu aile üyeleri doku ve substrat özgüllüğü gösterir, yüzlerce farklı reaksiyonu katalizlerler [10]. Her bir sitokrom P450 enzimi, ayrı bir genle kodlanır ve farklı canlı türlerinde 500'e yakın farklı sitokrom P450 geni vardır [11]. Sitokrom P450 genleri yağ asitlerinin hidro karbonları, steroid halkaları, çeşitli zenobiyotikler gibi birçok bileşiğin hidroksilasyonunda görevlidir. Hidroksilasyon sonucunda yabancı maddelerin çözünürlüğü genellikle artar ve enzim bu adımla onları detoksifiye eder ya da metabolize edip canlıdan uzaklaştırır [12].



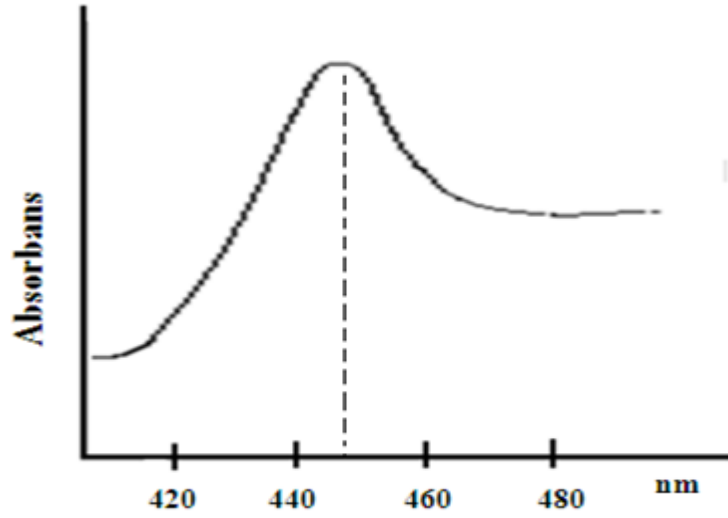
Şekil 1.1 CYP1A2'nin Sistematik Adlandırılması (Referans 7' den.)

Sitokrom P450 sistemi katalitik fonksiyonları bilinmeden evvel spektral özellikleri ile bilinen proteinlerden oluşuyordu [13, 14]. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir abzorban spektrumu vardır.

Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbon monoksit formları geçirildikten sonra soydum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir abzorban spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteine CO formları bağlanır ve 450 nm'de *soret band* abzorban spektrumu elde edilir [15–17] (Şekil 1.2). *Soret band* görünür spektrumdaki mavi dalga boyu ışığın en yoğun absorblandığı piktir [18]. Bu terim absorbsiyon spektrokopisinde uygun dalga boyundaki en yüksek absorbsiyonu belirtmek için yaygın bir şekilde kullanılır. P450 özel isimlendirmesinde yer alan P, pigmente aittir ve 450 ise abzorban değerini yansıtmaktadır.

1.3 Sitokrom P450 Enzim Yapısı ve Aktif Bölge

Genellikle 500 civarında amino asit (aa) içeren, 45–60 kD moleküler ağırlığında, merkezinde demir atomu barındıran bir porfirin halkası bulunduran hem proteinleridir [19]. Porfirin halkası yüksek oranda korunmuşluk gösteren amino asitleri barındıran demir bağlama domaini ile ilişkilidir (Şekil 1.3). Bu kısım enzimin indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını gerçekleştirdiği aktif kısmıdır ve 'FXXGXXXCXG' motifinden oluşur. Burada X'ler değişken amino asitlerken F-G-C ve G amino asitleri motifin oluşması için gereklidir.



Şekil 1.2 CO bağı Sitokrom P450'nin Abzorbans Spektrumu (Referans 20'den.)



Şekil 1.3 Sitokrom P450'de Demir Bağlama Domaini Motifi (Kutucuk içerisinde görülen X aminoasitleri değişken amino asitlerdir.)

1.4 Monooksijenazlar ve Enzim Reaksiyon Mekanizması

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemleri, olgun eritrositler ve iskelet kası hücreleri dışında ökaryot ve prokaryotlarda bulunan çok geniş bir hem protein ailesidir. Bu enzimler yapısal olarak farklı, birçok bileşimin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen sentezlenen birçok bileşik CYP enzimlerinin substratı olarak görev yapar [20]. CYP monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler, sekonder metabolitler ve diğer birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinojenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif metabolizmasına katılan enzimlerden oluşur [21]. Genellikle çok komponentli elektron transport zincirinde terminal oksidaz olarak görev yaparlar ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılırlar [21, 22].

Bu enzimler iki grupta toplanır. Bakteriyel ve mitokondriyel enzimler tip I, endoplazmik retikulum zarında (mikrozomal) olanlar ise tip II olarak sınıflandırılır. Sitokrom P450 enzim sistemi, P450 içeren monoksijenaz sistemlerdeki temel proteinler kullanılarak da sınıflandırma yapılmaktadır [23]. Sitokrom *b5*'in elektron vericisi veya efektör olarak P450 enzimlerine yardım edebileceği bilinmesine rağmen, P450 enzimlerini sınıflandırmak için ileri sürülen şemalarda sitokrom *b5*'in katıldığı redoks yolları kapsama alınmamaktadır [24].

Katalitik sistem, sitokrom P450 ve NADPH'den sitokrom P450'ye indirgeyici 2 elektron gönderen, membran bağımlı flavoprotein olan NADPH-cyt P450-redüktaz enzimlerinden oluşur. Bu enzim sistemi hayvan dokularında tanımlandıktan 15 sene sonra bitkilerde de tanımlanmıştır [25–28]. Sitokrom P450 enzimlerinin genel reaksiyon mekanizması;

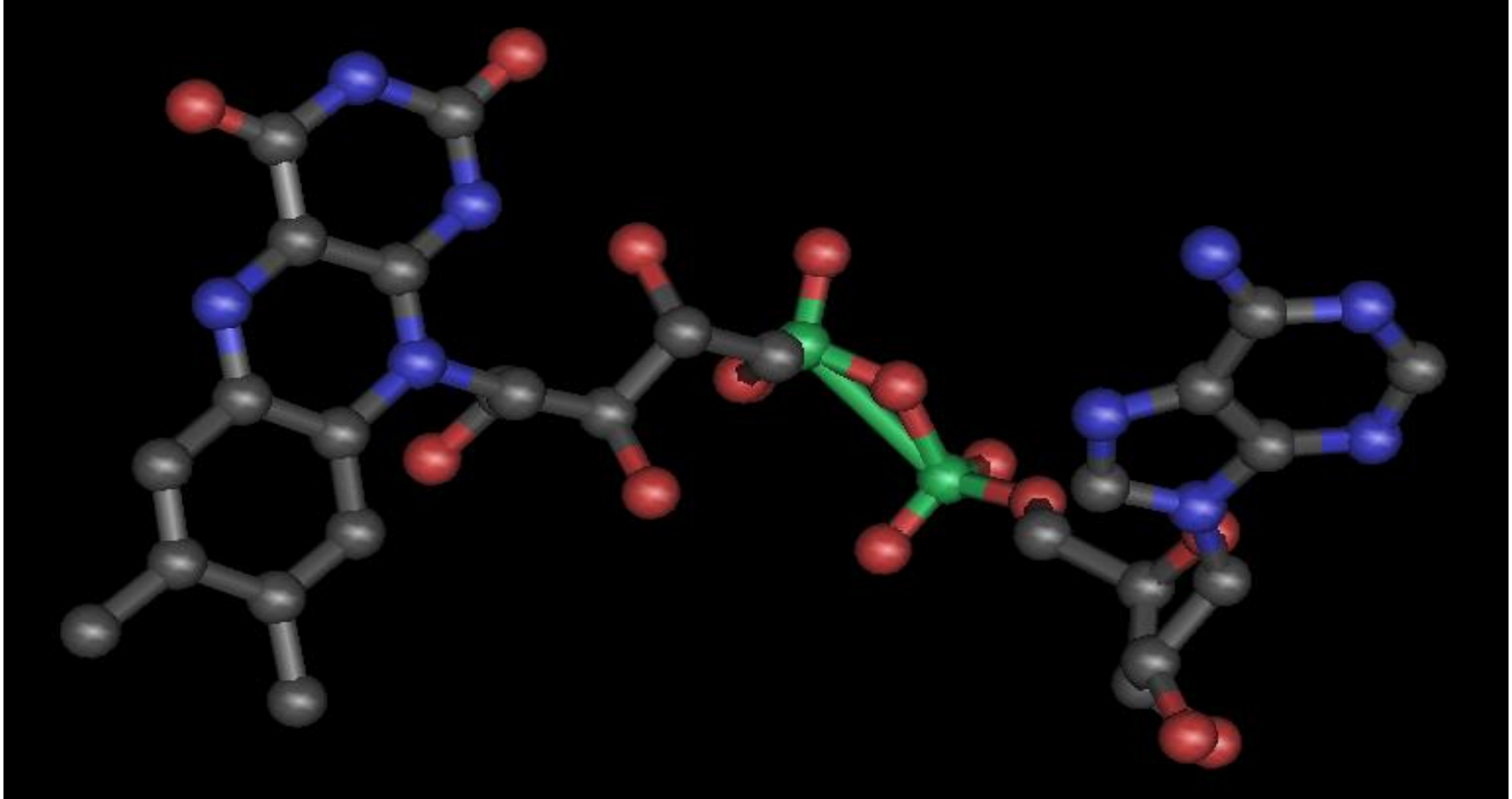


Buradaki substrat (S), bir steroid, yağ asidi, ilaç ya da oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka, veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Bu reaksiyonda moleküler oksijenin biri substrata katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir [29].

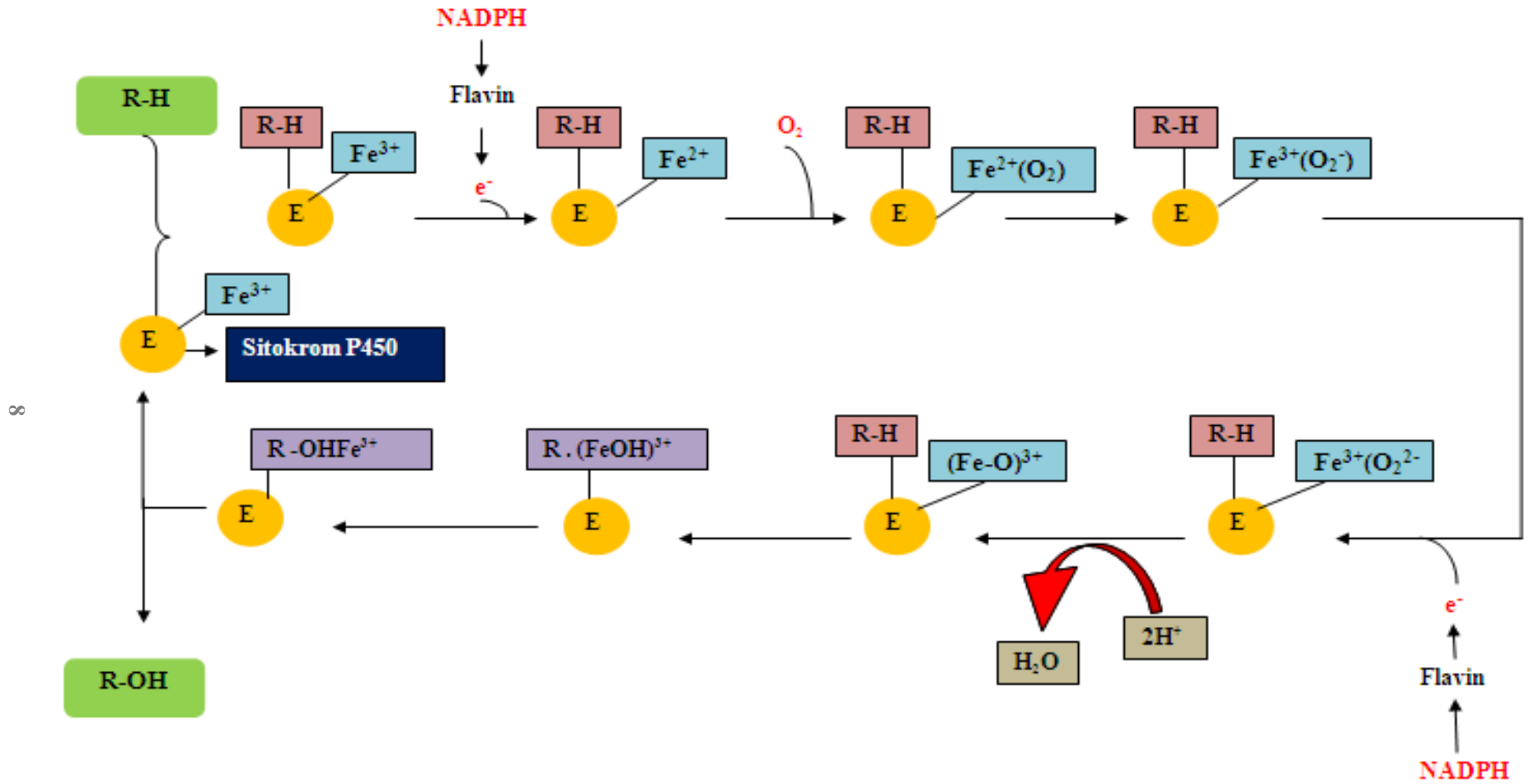
CYP proteinlerinde bulunan demir protoporfirin IX prostetik grubu, hem bir oksijen molekülünün hem de substratın bağanabileceği bölgeler bulundurur. Bilinen bütün CYP proteinlerindeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 pirol nitrojen atomuna ve 2 aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın bir sülfhidril grubu bulunur [22] (Şekil 1.4). Hem demiri hekza yerleşimde düşük spinli demir ve penta yerleşimde yüksek spinli demir olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik kalkanlar olarak tanımlanır ve hemdeki demir atomunu hekza yerleşimli durumdan penta yerleşimli duruma değiştirir.

CYP molekülü bir substrata bağlanınca, bu elektronik kalkanda uyarılma meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşimine geçer. Penta konumda demir atomu, substrata bağlanamayan hekza koordine duruma göre daha fazla indirgenme potansiyeline sahip olduğu için sitokrom P450 NADPH'dan gelen elektronlarla indirgenebilir hale gelir (Şekil 1.5).

Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyon basamağında oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik (Fe^{3+}) durumdan ferros (Fe^{2+}) duruma indirgenmelidir. Hidroksilasyon reaksiyonlarında toplam 2 elektron (e^-) gereklidir ve elektronlar CYP molekülüne aşama aşama transfer edilir. İlk önce oksijen bağlanır daha sonra substratın reaksiyona katılabilmesi için aktif oksijen türleri oluşturarak ayrılır [21, 23, 24, 30, 31]. Reaksiyonlar sırasında NADPH-sitokrom P450 redüktaz enziminin aracılığı ile NADPH'dan bir elektron, enzim-substrat kompleksine transfer edilir. Böylece kompleks indirgenir (Fe^{3+} - Fe^{2+} haline geçer). İndirgenmiş enzim-substrat kompleksi moleküler oksijenle birleşir ve bunun ardından ikinci bir elektron transferi ile kompleks bir daha indirgenir. İkinci elektron büyük olasılıkla sitokrom-b5 üzerinden NADH tarafından verilir ve bu olayı NADH-sitokrom-b5 redüktaz enzimi katalizler. Elektronların NADPH'dan sitokrom P450'ye transferi genellikle ya mitokondri ya da endoplazmik retikulumda bulunan iki farklı elektron transport sistemi ile sağlanır [32]. Reaksiyon sonucunda 'enzim-substrat-oksijen' kompleksi su, oksitlenmiş substrat ve oksitlenmiş durumdaki serbest sitokrom P450 enzimine ayrışır [33].



Şekil 1.4 Sitokrom P450'deki Hem Prostetik Grup.CN3D programı (NCBI) yardımıyla 1GAW_A erişim numaralı kayıttan elde edilmiştir.

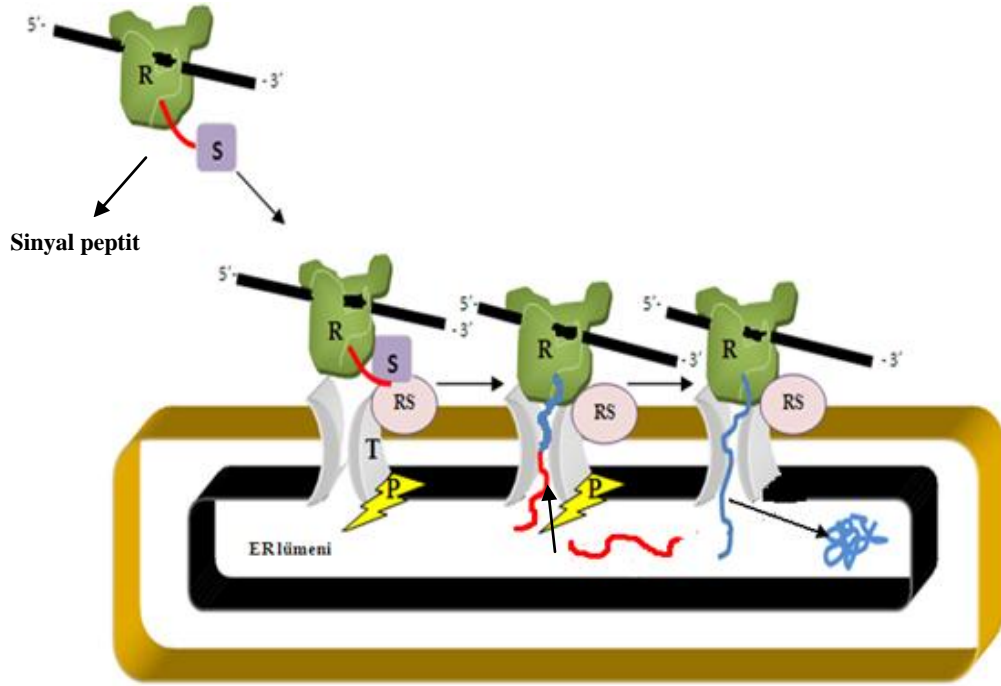


Şekil 1.5 Sitokrom P450 Reaksiyon Mekanizması (Referans 12'den)

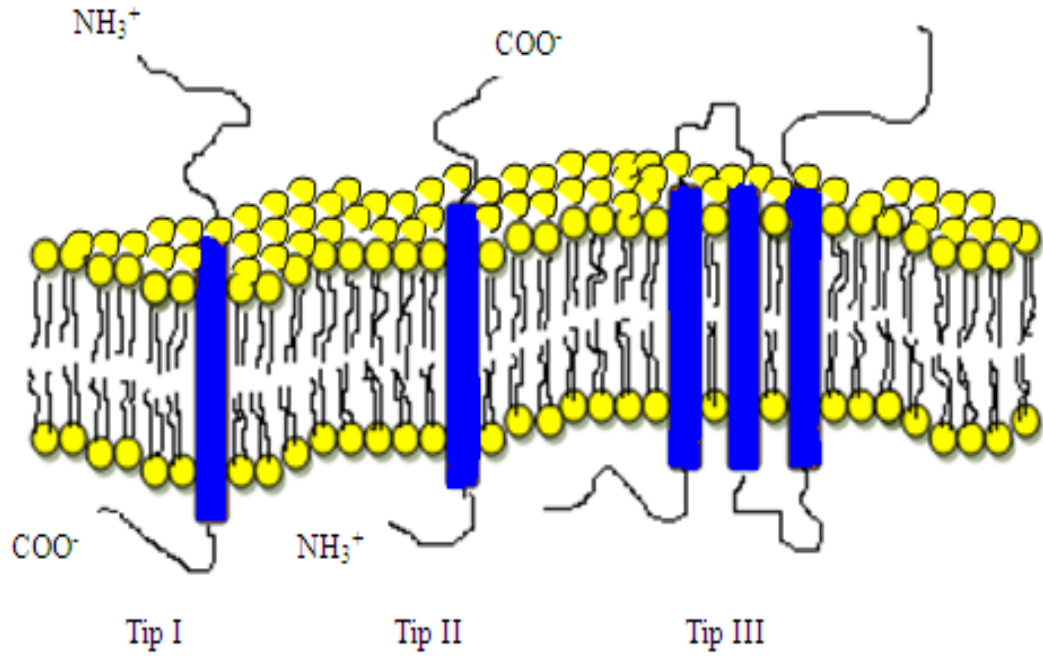
1.5 Sitokrom P450 Proteininin Hücredeki Lokalizasyonu

Prokaryot hücrelerde sitosolde veya hücre zarında ökaryot hücrelerde sitosolde, endoplazmik retikulum zarında genellikle granülsüz mitokondri iç zarında ve mikrozomlarda bulunurlar [34, 35]. Genellikle ER zarında bulunan sitokrom P450, ER'a gelebilmek için N-terminal ucunda sinyal peptidi oluşturan 20 civarında amino asitleri barındırır [36]. Sinyal peptit N – terminal uç, hidrofobik çekirdek ve C – terminal uç olmak üzere üç kısımdan oluşur [37].

Ribozomda translasyon başlar başlamaz sinyal tanıyıcı molekül (SRP) sinyali algılar ve ribozoma bağlanır. SRP-Ribozom kompleksinin oluşmasıyla protein sentezi, SRP'nin hedef ER zarındaki SRP reseptörüne bağlanmasına kadar durdurulur. Kompleks reseptöre bağlanınca SRP uzaklaşarak protein sentezi yeniden başlar ve sentezlenen zincir translokasyon kompleksi aracılığıyla ER lümenine aktarılır. Sinyal peptit sinyal peptidaz enzimi tarafından kesilerek uzaklaştırılır ve bu arada protein sentezi devam eder. Sentezi tamamlanan protein membran proteini değilse, ER lümenine aktarılır ve burada katlanır (Şekil 1.6). Membran proteinleri amino asit dizilişlerine göre ER membranı üzerinde kalırlar ve birden fazla trans membran heliks bulundurabilirler. Çoğu ER integral proteini sentez yapan ribozomun ER'a bağlanması ve sentez esnasında membrana yerleşmesi ile oluşur [38–40]. Membran proteinleri Tip I, Tip II VE Tip III olmak üzere 3 grupta toplanır. Tip I membran proteinlerinde proteinin karboksil ucu sitosolde iken tip II' de amino ucu hücre zarının dış kısmına bakar. Tip III membran proteinleri 1'den fazla trans membran heliks bulundururlar ve a ve b olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Tip IIIb'de amino ucu hücre zarının dışına bakar. Bunu organel için düşünecek olursak organel lümenine bakar. Sitokrom P450 membran proteinleri bu grupta yer alır (Şekil 1.7). ER membran proteinlerinin glikozilasyonu hem sentez esnasında hem de sentez sonrasında yoğun bir şekilde yapılır. Lizozom proteinleri işaret olarak mannoz 6-fosfat taşıdıklarından, golgide lipid veziküllerinde ayrı olarak paketlenir. Salgı proteinleri ise vesiküllerde biriktirilir ve dışarıdan gelecek bir sinyale göre sentezlenirler [41].



Şekil 1.6 Proteinlerin ER'a SRP Aracılığı İle Yerleşmesi. R: Ribozom, S: SRP, RS: SRP reseptörü, T: Translokasyon kompleksi, P: Siyal peptid peptidaz.



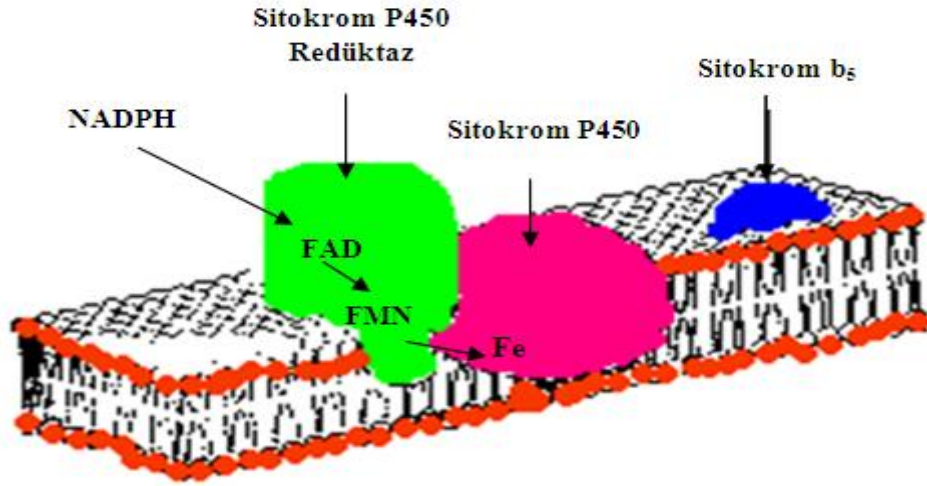
Şekil 1.7 Membran Protein Tipleri

1.6 ER'a Lokalize Olmuş NADPH-CYP450 Redüktazlar

ER'da bulunan NADPH, elektronları NADPH-CYP450 redüktaz adı verilen bir flavoproteine taşır. Bu enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 78000 Dalton'dur.

Prostetik grup olarak hem flavin adenin dinükleotiti (FAD) hem de flavin mononükleotiti (FMN) kapsar. Bu protein FAD ve FMN'den ikisine de sahip olan iki uçlu flavoproteinlerden biridir. Flavoprotein NADPH-sitokrom P450 NADPH'den elektron alarak bunları CYP450'ye transfer eder [42–45]. FMN, FAD ve NADPH'de bulunan farklı bağlanma domainlerinin dizi homolojisi mutagenез ile belirlenmiştir [46–53]. Bakterilerdeki sülfid redüktaz, memelilerdeki nitrikoksit sentaz ve metiyonin sentaz redüktaz enzimleri buna örnek verilebilir [54–57]. FMN'den farklı olarak FAD redüktaza daha sıkı bir şekilde bağlanır [58,59]. NADPH molekülünün amino ucu hidrofobik özelliktedir ve molekülün ER'a yerleşmesini sağlar (Şekil 1.8). FAD NADPH'den alınan elektronların giriş noktası olarak, FMN ise her bir elektronu CYP450'ye transfer edebildiği için çıkış noktası olarak görev yapar. İlk elektronun alınmasıyla hem demirine oksijen bağlanır, ikinci elektronun alınması da oksijenin hem demirinden ayrılmasını sağlar [60]. Mikrozomal P450 ile katalizlenen reaksiyonların bazılarında ikinci elektronun transferi endoplazmik retikulumda bulunan, moleküler ağırlığı 16000 D olan, sitokrom b5 denen, küçük bir hem proteini ile de olabilir (Şekil 1.8).

Sitokrom b5 ya NADPH-CYP450 redüktazlarla ya da mikrozomlara bağlı diğer flavoproteinlerle indirgenir. NADPH-sitokrom b5 redüktaz, NADH için özeldir. Substrata özgü bazı CYP450 enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarda, en yüksek enzimatik aktiviteyi gösterebilmek için CYP450'ye ikinci elektronu transfer eden sitokrom b5'e ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca yağ asitlerinde çift bağ oluşumunu katalize eden desaturaz enzimine elektron transferi için de sitokrom b5 ve NADH-sitokrom b5 redüktaz gerekmektedir



Şekil 1.8 Endoplazmik Retikulum (mikrozomal) CYP450 Sistem Elemanları. NADPH-CYP450 redüktaz, membrana hidrofob ucu ile bağlanırken sitokrom P450 membranda daha derine girmiştir. CYP450'nin aracılık ettiği reaksiyonlara sitokrom b5'in de katılabildiği görülmektedir (Referans 20'den esinlenerek çizilmiştir).

1.7 Sitokrom b5

Sitokrom b5 sadece ökaryotlarda bulunan özelleşmiş bir elektron taşıma proteinidir. Mikrozomal ve mitokondriyal [61] membrana bağlı sitokrom b5 proteininden farklı olarak, eritrositlerdeki sitokrom b5 suda çözünen sitosolik proteindir [62]. Son yıllarda sitokrom b5'in çözülmüş formuna uyan mRNA'nın hayvan dokularında dağılmış olarak bulunduğu tespit edilmiştir [63]. Sitokrom b5 ve globin proteinlerin baz dizilimleri karşılaştırılmış ve globinlerin sitokrom b5 proteinlerinden tüvelendiği bulunmuştur [64].

1.8 Sitokrom P450 Enzimlerinin Substrat Özgüllüğü

Sitokrom P450 sistemi uzun yıllar boyunca gerçekleşen dublikasyonlar sonucunda çok geniş bir aile haline gelmiştir [65].

Yaklaşık 500 sitokrom P450 geni tepe edilmiş ve bunların birçok substratta oksijenasyon reaksiyonunu katalizlediği ortaya konulmuştur [66]. Çok fazla üye barındıran bu süper ailede enzimlerin tanımlanması kolay değildir.

Enzimleri moleküler ağırlık, diğer moleküler özellikler ve substrat özelliklerine göre tanımlamak mümkündür [67]. Substrat özelliğini bulabilmek için ilgili proteini kodlayan cDNA ekspresyon vektörüne klonlanır ve protein ekspresyonu sağlanır.

Enzim farklı substratlarla denenir ve substrat özellikleri tespit edilir. Bu sistemin dezavantajı bir tek sitokrom P450 enziminin farklı yapıdaki substratları da metabolize edebilmesidir [68].

1.9 Sitokrom P450 Genlerinin İndüklenmesi

İndüklenme, çevresel atıklar, sigara dumanı, herbisit-pestisit gibi ilaçlar, ışık ve çeşitli toksik maddeler tarafından enzim sentezinin artması ile gerçekleşir [69]. CYP450 enzimlerinin en çarpıcı özelliklerinden biri kimyasallar tarafından indüklenebilmesidir [70–72]. Yaralanmış dokularda indüklendiği de tespit edilmiştir [73, 74]. Sitokrom P450 genlerinin çeşitli bileşikler tarafından indüklenebildiği 1960 yıllarından beri bilinmektedir. Sitokrom P450 genleri hem transkripsiyon esnasında hem de transkripsiyon sonrasında indüksiyon mekanizmasına sahiptir. İndüksiyon mekanizmasında indükleyici ajanlar ile protein reseptörler birlikte çalışırlar. Polisiklik hidrokarbonlar reseptöre bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks gen için spesifiktir ve sitokrom P450 genindeki regülatör bölgelere bağlanabilir [75].

1.10 Sitokrom P450 Genlerinin İnhibisyonu

Bu enzimlerin buldukları dokulardaki fonksiyonunun bilinebilmesi, katıldıkları metabolik yolların gösterilebilmesi için inhibitör ajanlardan yararlanılır. İndirgenme reaksiyonlarında daha önce de bahsedildiği gibi CO kullanılır. CO sitokrom P450 proteininde bulunan demire oksijenden daha fazla afinite gösterir ve buraya bağlanarak enzimin fonksiyonunu inhibe eder. Sitokrom P450 enzimleri harflerle (a, b ve c) sınıflandırılırlar. a'dan c'ye görünür ışıktaki absorpsiyon derecesi düşer. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim grubu b harfiyle simgelenir ve 420 nm civarında en yüksek absorpsiyonu verir. P450 olarak isimlendirilmesinin sebebi CO ile indirgenmiş kompleksin 450 nm'de absorpsiyon vermesidir [76].

Mikrozomlarda b tipi monooksijenazların farklı tiplerine de rastlanmıştır. Bunlar 450 nm civarında absorpsiyon verir ve pikler zayıf ya da belirsizdir [77, 78].

Anlatılanlardan yola çıkarak P450 enziminin aktivitesinin anlaşılması, 450 nm'de absorpsiyon veren indirgenmiş durumdan geri dönmesiyle, inhibisyonun kalkmasıyla olur [79].

1.11 Sitokrom P450 Enzim Sisteminin Bitkiler İçin Önemi

Yüksek yapılı bitkilerde çok çeşitli sitokrom P450 enzimleri tespit edilmiştir. Bu mikrozomal enzimler farklı biyosentez yollarında çok önemli basamakları katalizlerler. Bitkilerde yağ asitleri, fenilpropanoidler, alkaloidler, terpenoitler, kütin ve giberellin gibi hormonların oksidasyon reaksiyon basamaklarında yer alırlar [80–84]. Bitkilerin olumsuz çevre şartlarında metabolizmalarını yönlendirmesi, fiziksel bariyerler oluşturması, ısırgan otunda olduğu gibi herbivorlara karşı savunma için bitki toksik maddelerinin üretilmesi, polinatörlerle iletişim için çeşitli sekonder metabolitlerin sentezi gibi metabolik olayları yöneten reaksiyonlarda da sitokrom P450 monooksijenazlar anahtar rol oynarlar.

2. MATERYAL-METOD

2.1 Biyoinformatik Analizler

2.1.1 Açık Okuma Çerçevesinin Tespiti

Genin proteini kodlayan anlamlı kısmı açık okuma çerçevesinin tespiti için ‘BioEdit’ programı kullanıldı [85]. Bu program kullanılarak ATG kodonunun yeri tespit edildi. Genin kaç amino asitlik bir proteini kodladığı bulundu.

2.1.2 Amino asit kompozisyonunun bulunması

Bu çalışma için de ‘BioEdit’ programı kullanıldı. Amino asit kompozisyonu değerlendirilerek proteinin hücre içerisindeki konumu hakkında bilgi edinildi.

2.1.3 Membran Protein Analizi

CYP450 proteinlerinin çoğu membranda bulunduğu için mevcut dizi membran protein analiz programlarında değerlendirildi. Bu analiz için isimleri TopPred [86] ve TMMOD [87] olan iki ayrı membran protein topolojisi belirleme programı kullanıldı.

2.1.4 Sinyal Peptit Analizi

Sitokrom P450 proteinleri ökaryotlarda çoğunlukla ER’a yerleştikleri için sinyal peptit analizi yapıldı. Bu analiz için ‘Signal P’ adındaki programdan [88] yararlanıldı.

2.1.5 Demir Bağlama Domaininin Tespiti

P450 gen ailesinde korunmuş bölge olan demir bağlama domaininin varlığının tespiti için InterPro Scan [89]) adındaki programdan yararlanıldı.

2.1.6 Glikozilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan glikozilasyon bölgelerinin tespiti için NetOGlyc[90] ve NetNGlyc [91] adlı programlar kullanıldı.

2.1.7 Blast2Go Analizi

Genin biyolojik prosesi, hücre içerisindeki konumu ve moleküler fonksiyonu bir gen ontoloji programı olan Blast2GO [92] analizi ile araştırıldı.

2.1.8 Alternatif Splays Analizi

Gen içerisinde bulunan intronlar arasında alternatif splays olup olmadığını tespit edebilmek için Splays Finder [93] adlı program kullanıldı.

2.2 İtron Analizi

2.2.1 Primerlerin Dizayını

Primerler, Primer 3 adlı programda yapıldı [94]. Sol primerin dizisi ‘TAATTAAAATGGAGATACTGAAAACAGC’, sağ primerin dizisi ise ‘AGAGAGAATGCATAACAACATACGATAA’dır. 1804 nükleotit içeren dizide hedef ürün büyüklüğü 1600 seçildi. Sol primer ATG kodonuna göre 38. nükleotitten başlarken sağ primer 1637. nükleotitten başlatıldı.

Her iki primerin de uzunluğu 28 nükleotit olarak belirlendi. Primer sıcaklıkları sol ve sağ primerde sırasıyla 59.48 °C, 60.61 °C'dir.

2.2.2 Primer Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Primerler laboratuara gelir gelmez veya – 20 °C dolabından çıkartıldıktan sonra yaklaşık 15 saniye 12000 rpm'de santrifüj yapılarak tüp dibinde çökelti oluşturuldu. 1 mL TE eklenerek 2 dakika alt-üst edildikten sonra 15 saniye vorteks yapılarak sulandırıldı ve çalışma solüsyonu yapmak için hazır hale getirildi.

1 mL TE içinde sulandırılmış primerlerinden 200 µL'lik 5µM çalışma solüsyonları Tablo 2.1'de gösterilen konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı. Son hacmi 25 µL olan PCR reaksiyonu için 2.5 µL primer eklendi.

Tablo 2.1 Primer Çalışma Solüsyonu Hazırlama.

Primerler	Molaritesi	Çalışma Solüsyonları
Sol Primer	29 µM	34.5 µL primer + 165. 5 µL TE
Sağ Primer	38.3 µM	26 µL primer + 174 µL TE

2.2.3 gDNA İzolasyonu

Bu çalışmanın materyalini oluşturan zeytin (*Olea europaea* L.) meyve ve yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edilmiştir. O bölgeden sıvı azot içerisinde getirilmiş ve RNA veya DNA izolasyonu yapılncaya kadar -80 °C dolabında muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu için 'GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit' (Sigma, Almanya) ürünü kullanıldı. Bu kite göre izolasyon özetle şu şekilde yapıldı:

Zeytin yaprak örnekleri havan içerisinde sıvı azotta ezildi ve ependorf tüpüne 100 mg olacak şekilde alındı. Sıvı azotun uçması beklendi.

Hücreleri lizise uğratmak için ependorf tüpüne 350 µL lizis solüsyonu (Part A) eklendi ve örneğin tamamıyla temas etmesi sağlandı (Pipet uçları kesilip otoklavlanarak, ezilmiş örneklerin pipetaj işlemi yapıldı). Hemen ardından 50 µL 'Part B' lizis solüsyonu eklendi. Ependorflar daha önceden 65 °C'ye ayarlanmış su banyosuna kondu ve 10 dakika inkübe edildi. Su banyosuna koymadan önce bazı durumlarda RNA kirliliğine karşı lizis karışımı içerisinde RNase eklendi. 10 dakika sonunda artıkları çöktürmek için karışıma 130 µL çöktürme solüsyonu eklendi ve 15000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi (Hücresel artıklar, proteinler ve polisakkaritler bu sayede çöktürüldü).

Santrifüjden sonra süpernatant, kit içerisinde bulunan mavi insörtlü kolona aktarıldı. 1 dakikada 15000 X g'de santrifüj edildi. Böylece hücresel atıklar tamamıyla uzaklaştırıldı. Filtre atılır içerisinde sıvının olduğu toplama tüpü ile devam edildi. Bu sıvı içerisinde 700 µL bağlama solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Bağlama kolonlarının hazırlanması için kırmızı renkli insörtler toplama kolonlarına yerleştirildi, 500 µL kolon hazırlama solüsyonu eklendi ve 1 dakika 12000 X g'de santrifüj yapıldı. Daha önce elde edilen sıvı bu kolona yüklendi. Bu kolon en fazla 700 µL alır. Eldeki sıvı bu miktardan fazla olduğu için bundan sonraki işlem iki kerede yapıldı. 1 dakika 15000 X g'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Bundan sonra yıkama işlemine geçildi. Kit içerisindeki yıkama solüsyonu kullanılmadan önce içerisinde etanol ilavesi yapıldı. 500 µL kolona ilave edildi ve 1 dakika 15000 X g'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.

İkinci yıkama işlemimde kolona 500 µL yıkama solüsyonu ilave edildikten sonra 3 dakika 15000 X g'de santrifüj yapıldı. Filtre 2 mL'lik yeni bir ependorf tüpüne alındı. Bu aşamadan son hacim 50 µL olacak şekilde elüsyon işlemlerine başlandı. Elüsyon solüsyonu daha önce su banyosunda 65 °C'de ön ısıtmaya tabi tutuldu. Önce 30 µL elüsyon çözeltisi eklendi ve 7 dakika beklendikten sonra 1 dakika, 15000 X g'de santrifüj yapıldı. Daha sonra 20 µL elüsyon çözeltisi eklenerek yine 7 dakika beklendi ve 1 dakika, 15000 X g'de santrifüj yapıldı.. DNA örnekleri - 20 °C'de saklandı.

2.2.4 PCR Bileşenleri ve Koşulları

cDNA ve gDNA örneklerinin PCR’da oluşturacakları bant büyüklüklerinin karşılaştırılıp dizileme sonuçlarının değerlendirilmesiyle gen içerisinde intron olup olmadığı bilgisine ulaşmak hedeflendiği için, cDNA kütüphanesinden seçilen tahmini sitokrom P450 cDNA’sı ile zeytin yapraklarından elde edilen gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak Tablo 2.2’de belirtilen PCR koşulları ve Tablo 2.3’deki PCR karışımı ile belirtilen primerler kullanılarak çoğaltma yapıldı.

Tablo 2.2 PCR Koşulları

Döngü isimleri	Sıcaklık	Zaman	Devir
Kapak ısıtma	105 °C	1 dakika	-
1- Ön Isıtma	94 °C	5 dakika	1
2- Ayrılma	94 °C	30 saniye	35
3- Bağlanma	50 °C	45 saniye	
4- Uzama	72 °C	2 dakika	
5- Son Uzama	72 °C	7 dakika	1

Tablo 2.3 PCR Reaksiyon Karışımı ve Bileşenlerin Yoğunlukları

Bileşen İsmi	Reaksiyon İçin Kullanılan Miktar (25 µL Toplam Hacim için)	Yoğunluk
Tampon	2.5 µL	10X
MgCl ₂	1.5 µL	25 Mm
Sağ Primer	2.5 µL	29 µM
Sol Primer	2.5 µL	38.3 µM
DMSO	2 µL	-
dNTP karışım	2.5 µL	10 mM
Kalıp	1 µL	-
Taq Pol	0.5 µL	5 u / µL
Nükleazlardan arındırılmış su	10 µL	-

2.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonuçları %0.8'lik olacak şekilde hazırlanan jelde koşturuldu. Jel için 0.4 gr agaroz (Sigma, Almanya) tartıldı ve üzerine 50 mL 0.5 X'lik TBE ilave edilerek mikrodalga fırında çözelti hazırlandı. Çözelti soğutuldu, içerisine 0.5 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edildi ve içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez kasetine döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı, kuyucuklar yüklemeye hazır hale getirildi. Kaset elektroforez tankına yerleştirildi ve jelin üzerini kapatıncaya kadar elektrik akımını iletici olarak kullanılan 0.5 X'lik TBE ilave edildi. TBE için gerekli olan Triz bazı (Almanya) firmasından, Borik Asit AppliChem (Darmstadt-Almanya) firmasından, temin edildi. Bu çözeltiler ve kompozisyonları Tablo 2. 4'te verilmiştir. Örnekler 1 (6 X) boya:5 örnek karışımı şeklinde kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık belirteci olan markır yüklendi. 100 V elektrik verilerek 45 dakika yürütüldü. Jel 45 dakika sonunda Transilluminatör UV cihazında gözlemlendi ve cihazda fotoğraf çekildi.

Tablo 2.4 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri

Çözelti	Kompozisyonu (0.5 L için)
5X TBE	27 g Tris-baz 13.75 g Borik asit 10 mL, 0.5 M, pH 8 EDTA
Yükleme Boyası	GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0313)

2.3 Polimorfizm Analizi

Yüksek oranda polimorfizm barındıran sitokrom P450 geninin, zeytin çeşitleri arasında da polimorfizm gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla Memecik, Memeli, Uslu, Ayvalık ve Gemlik zeytin türlerinden bölüm 2. 2. 3'te anlatılan DNA izolasyon yöntemiyle yapraktan DNA izolasyonu yapıldı. Tablo 2.1'deki primerlerden yararlanıldı ve Tablo 2.2'deki PCR koşulları ile Tablo 2.3'teki PCR reaksiyon karışımı kullanıldı.

2.4 Promotör Analizi

2.4.1 TAIL PCR için Primerler

Genin düzenlenmesini sağlayan 5' bölgesinin (promotör) tespiti için 'TAIL-PCR' tekniğinden yararlanıldı. Bu teknikte genin 5' bölgesine rast gele bağlanan 5 ayrı AD primeri ve AD karışımı (5 primerin eşit oranlarda karıştırılmasıyla oluşturuldu.) kullanıldı. Dizinin 5' ucuna yakın olacak şekilde birbiri ardına (Aralık mesafesi yaklaşık 40 nükleotit civarında seçildi.) 3 ayrı sol primer, Primer 3 [94] programında tasarlandı (Tablo 2. 5). Primerler sulandırılmış olarak alındı. Bunlardan istenilen yoğunluklarda çalışma solüsyonları hazırlandı

Tablo 2. 5 TAIL PCR Primerleri ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

Primer Adı- Dizisi	Yoğunluk	Çalışma Solüsyonu
AD ₁ : 5'-NTCGASTWTSWGTT-3'	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD ₂ : 5'- NGTCGASWGANAWGAA-3'	10 Mm	80 µL TE + 20 µL Primer
AD _{2a} : 5'- STTGNTASTNCTNTGC-3'	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD ₃ : 5'- WGTGNAGWANCANAGA-3'	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD ₅ : 5'- WCAGNTGWTNGTNCTG-3'	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
Tail ₁ : 5'AAACAAAAGCCTTCTGAAAGTGTAAG-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer
Tail ₂ : 5' CCTCAAAATCCTCTCTTTCTTCTTT-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer
Tail ₃ : 5'- CACTGAAATTGCTGTTTTTCAGTATCT-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer

2.4.2 PCR Döngü Koşulları

Tail-1, Tail-2 ve Tail-3 adını verdiğimiz 3 ayrı PCR koşulu uygulandı (Tablo 2.6) Tail-1 için kalıp olarak bölüm 2.2.3'te bahsedildiği gibi izole edilen DNA örnekleri kullanıldı. Tail-1'den çıkan örnekler 1/40 sulandırılıp bundan Tail-2 için 1 µL kullanıldı. Tail-2 sonuçları 1/10 sulandırıldı ve bundan Tail-3 için 1 µL kullanıldı. Kalıp ve AD primerleri sırayla PCR tüplerine dağıtıldı. PCR reaksiyon karışımı hazırlandı, tüplere paylaştırıldı (Tablo 2.7). PCR sonrasında örnekler 2.2.5'te anlatıldığı gibi jelde koşturuldu, görüntü fotoğraflandı.

Tablo 2.6 TAIL PCR Döngü Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
TAIL-1		
94 °C	1 dakika	5
60 °C	2 dakika	
72 °C	3 dakika	
94 °C	1 dakika	1
25 °C	2 dakika	
72 °C	3 dakika	
94 °C	1 dakika	17
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
45 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
72 °C	7 dakika	1
TAIL-2		
94 °C	1 dakika	12
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
45 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dak	
72 °C	1 dakika	1

Tablo 2.6'nın devamı

TAIL-3		
94 °C	1 dakika	20
45 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Tablo 2.7 Tail PCR Reaksiyon Karışımları

Bileşen İsmi	Miktar
TAIL-1 (Toplam Hacim 20 µL)	
Tampon	2 µL
MgCl ₂	1.5 µL
AD primer	5 µL
T1 Primer	1 µL
DMSO	1 µL
dNTP karışım	0.5 µL (10 mM)
Kalıp	1 Ml
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 Ml
Nükleazlardan arındırılmış su	7.5 µL
TAIL-2 (Toplam Hacim 25 µL)	
Tampon	2.5 Ml
MgCl ₂	1.5 µL
AD primer	5 µL
T2 Primer	1 µL
DMSO	1 µL
dNTP karışım	0.5 µL (10 mM)
Kalıp	1 µL
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 µL

Tablo 2.7'nin devamı

Nükleazlardan arındırılmış su	12 µL
TAIL-3 (Toplam Hacim 50 µL)	
Tampon	5 µL
MgCl ₂	3 µL
AD primer	10 µL
T3 Primer	2 µL
DMSO	3 µL
dNTP karışım	1 µL (10mM)
Kalıp	1 µL
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 µL
Nükleazlardan arındırılmış su	24.5 µL

2.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

2.5.1 Real - time PCR

Genin hangi aylarda, hangi dokuda ne kadar sentezlendiğini bulabilmek için Real Time PCR tekniğinden yararlanıldı. Bunun için Light Cycler 480 PCR (Roche, Almanya) cihazı ve LC 480 Sybr Green kiti (Roche, Almanya) kullanıldı. PCR döngü koşulları Tablo 2.8'de, Real Time PCR primerleri Tablo 2.9'da gösterilmiştir.

Real Time primerleri 152 nükleotitlik bir bölge çoğaltacak şekilde, primer 3 [94] programında oluşturuldu. Sol primer ATG kodonuna göre 1486. nükleotitten sağ primer ise 1637. nükleotitten başlatıldı. Primerler sulandırılmış olarak alındı. 100 µM'lık stoktan 5 µM'lık çalışma solüsyonu hazırlandı.

Tablo 2. 8 Real Time PCR Döngü Koşulları

DÖNGÜ ADI	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
İlk Ayrılma	95 °C	5 dakika	1
Ayrılma	95 °C	20 saniye	40
Bağlanma	50 °C	20 saniye	
Uzama	72 °C	20 saniye	
Erime Eğrisi	95 °C	20 saniye	1
Soğutma	40 °C	30 saniye	1

Tablo 2.9 Real Time PCR’da Kullanılan Primerler

PRİMER ADI	PRİMER
Sol Primer	5’- TTCTCGTTTGAGATTTACCTACTTAT-3’
Sağ Primer	5’- AGAGAGAATGCATAACAACATACGATA-3’
GAPDH-Sol	5’- TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3’
GAPDH-Sağ	5’- CGCCCCACTTGATTTTGGGA-3’

2.5.2 RNA İzolasyonu

Real Time PCR’da kalıp olarak kullanılacak cDNA örneklerini elde etmek için 12 ay boyunca, var yılı ve yok yılı olarak belirlenen (1.Ağaç var yılı, 2.Ağaç yok yılı) iki ağaçtan toplanan yaprak, meyve, sürgün, çiçek ve tomurcuk gibi dokulardan RNA izolasyonu yapıldı (Şekil 2.1).

Tablo 2.10’da örneklerin toplanma tarihi ve hava durumu görülmektedir. RNA izolasyonu için RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Kit tarifesinin takip edildiği izolasyonda özetle aşağıdaki gibi yapıldı:

Ezilen örnekler (Yaklaşık 100 mg) ependorf tüpüne aktarıldı. Sıvı azotun uçması beklendi. Örnekler erimeden 450 µL merkaptoetanol ilave edilmiş RLT tamponu eklendi. Vorteks yapıldı ve örnekler 56 °C'de 3 dakika su banyosunda inkübe edildi. Elde edilen karışım lila kolon bulunduran toplama tüpüne aktarıldı ve 2 dakika 15000 X g'de santrifüj edildi.

Oluşan süpernatant çökeltiye (pellet) dokunulmadan yeni bir ependorfa alındı. İçerisine kendi hacminin yarısı kadar %96'lık etanol eklendi ve hemen pipetaj yapıldı. Beklenmeden numune (yaklaşık 650 µL) pembe renkli kolon barındıran toplama tüpüne aktarıldı. 15 saniyesaniye 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atıldı. Bu aşamadan sonra DNA kirliliğinden kurtulmak için On-column DNase Digestion kiti (Sigma, Almanya) uygulandı. Bu yöntem özetle şu şekilde yapıldı

Elimizdeki pembe renkli kolona 350 µL RW1 tamponu eklendi ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirildi. 10 µL DNase I, 70 µL RDD tamponundan oluşan 80 µL'lik DNase stok solüsyonu kolona eklendi ve 20–30 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Ardından 350 µL RW1 tamponu eklendi 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirildi. Bu aşamadan sonra protokole geri dönüldü. Kolona 500 µL RPE tamponu eklendi ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne geçirilerek 15000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi. Etanolden uzaklaştırma işleminden sonra kolon 1.5 mL'lik yeni bir toplama tüpüne dikkatlice yerleştirildi. 30 µL RNaz'lardan arındırılmış su, tam kolonun zarına gelecek şekilde eklendi ve 5 dakika inkübe edildikten sonra 12000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi. Örnekler -20 °C'de saklandı.

Tablo 2.10 Örneklerin Toplanma Tarihi ve Hava Durumu

AY	GÜN-YIL	HAVA DURUMU
Nisan (N)	15-2010	19 °C, Güneşli
Mayıs (MY)	14-2010	15 °C, Güneşli
Haziran (H)	17-2010	33 °C, Güneşli
Temmuz (T)	15-2010	37 °C, Güneşli
Ağustos (A)	18-2010	32°C, Güneşli
Eylül (E)	22-2010	28 °C, Güneşli
Ekim (EK)	19-2010	16 °C, Parçalı Bulutlu
Kasım (K)	22-2010	14 °C, Kapalı
Aralık (A)	22-2010	13 °C, Kapalı
Ocak (O)	19-2011	12 °C, Kapalı
Şubat (Ş)	21-2011	10 °C, Az Yağışlı
Mart (M)	16-2011	19 °C, Güneşli

2.5.3 Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi için RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas katalog no: K1622) kullanıldı. Bunun için 5 µL total RNA örneğine (her bir örnek için) 1 µL oligo dT, 6 µL nükleazlardan arındırılmış su eklendi ve pipetaj yapılarak 70 °C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra 4 µL 5X reaksiyon tamponu, 1 µL ribonükleaz inhibitörü, 2 µL 10 mM'lık dNTP eklenerek 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Bütün bu işlemlerin sonunda 1 µL revers transkriptaz enzimi eklendi ve 42 °C'de 1 saat inkübe edildi. cDNA örnekleri bu şekilde hazırlanmış oldu.

2.5.4 Real Time PCR Plate'inin Hazırlanması

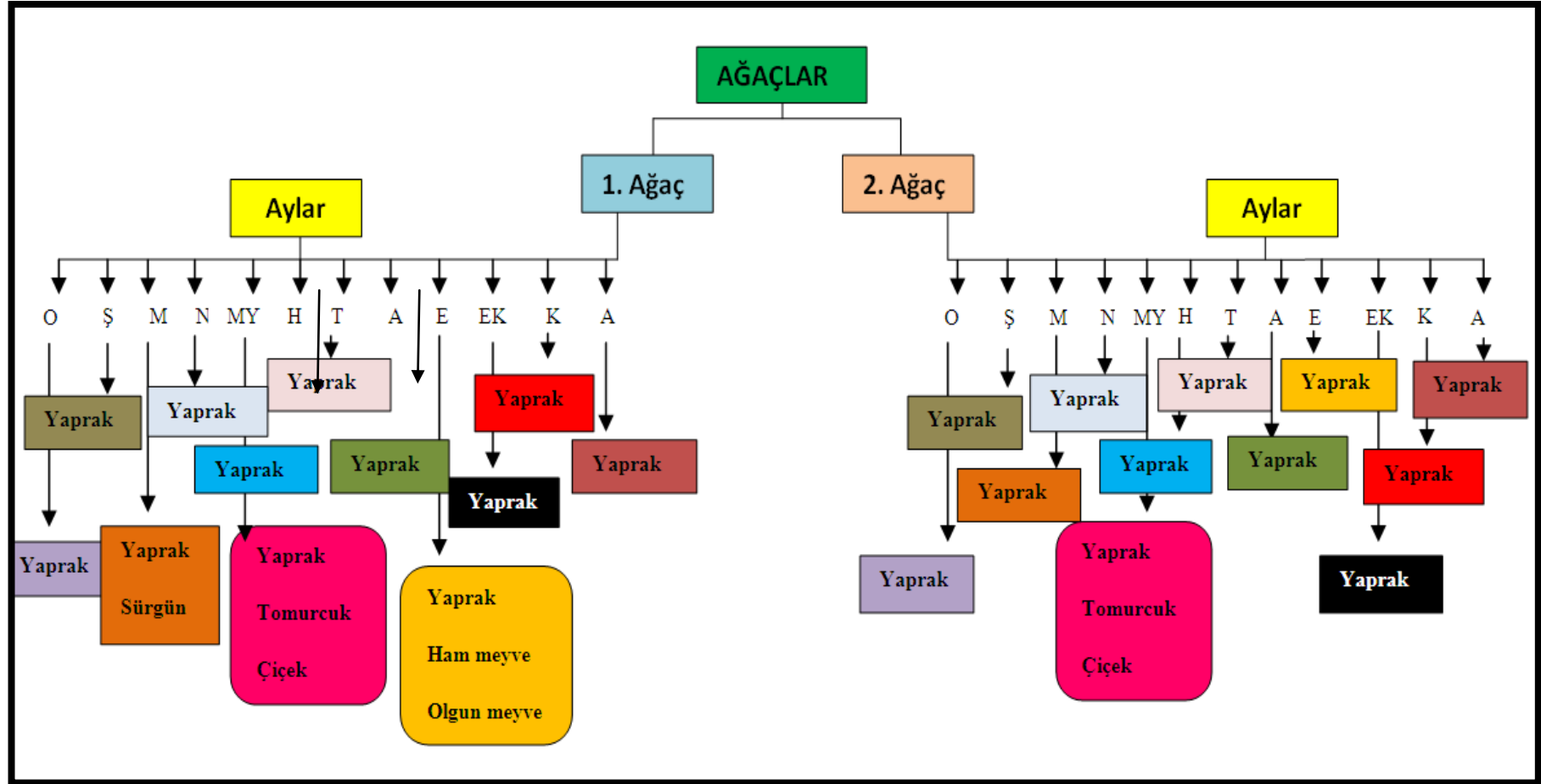
Roche firmasının 384'lük plate'i kullanıldı (Şekil 2.2). Her bir örnek güvenilirlik açısından 3 tekrarlı yapıldı (Plate'in A satırında ilk 3 kuyucuk 1 örneğe 4, 5, 6 başka bir örneğe aittir). Deneyde konsantrasyonların karşılaştırılabilmesi açısından konsantrasyonunu bildiğimiz bir numune (plazmit) standart olarak kullanıldı. Standartlar için de her sulandırma basamağı 3 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara yüklendi (Şekil 2.3). Sentez miktarı (ekspresyon) ölçülen genin GAPDH'e (GenBank Erişim No: AM933453) göre kaç kat sentezlendiğini bulabilmek için her örnekden Tablo 2.8'de gösterilen iki farklı primer çiftiyle PCR yapıldı. GAPDH primerleri ile yapılan örnekler de 3 tekrarlı yapıldı.

2.6 Genin *Pichia* Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

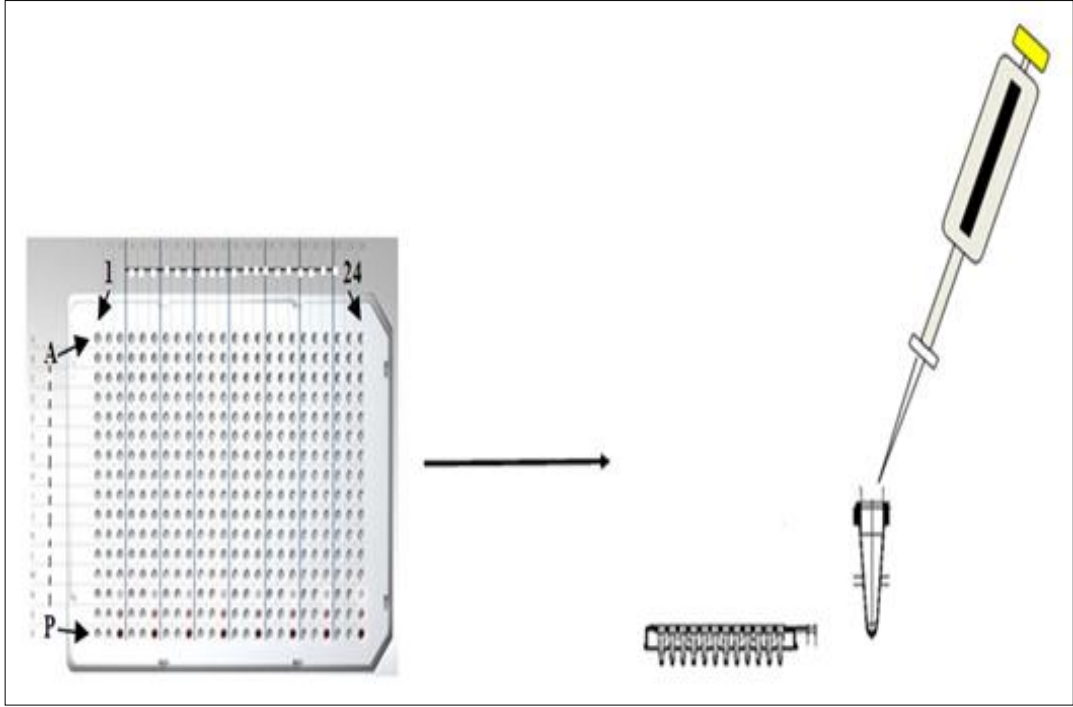
2.6.1 cDNA'nın Çoğaltılması

Ligasyon aşamasında kullanmak üzere tahmini P450 cDNA'sının Tablo 2.2'de gösterilen reaksiyon koşullarında ve Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımıyla PCR'ı yapıldı. Bu aşamada kesim bölgelerine uygun bir şekilde dizayn edilen ekspresyon primeri adını verdiğimiz primerler kullanıldı. Sol primerin dizisi; 5'-AGCGGCATCGATGATTTTGAAGTGGTTA-3', sağ primerin dizisi 5'-AGAATGCATAACAACCTAGGATAA-3' olarak dizayn edildi. Bunlardan 5 µM'lık çalışma solüsyonu hazırlandı (Tablo 2.11). Tablo 2.2'deki PCR koşulları ile Tablo 2.3'teki PCR reaksiyon karışımı kullanıldı.

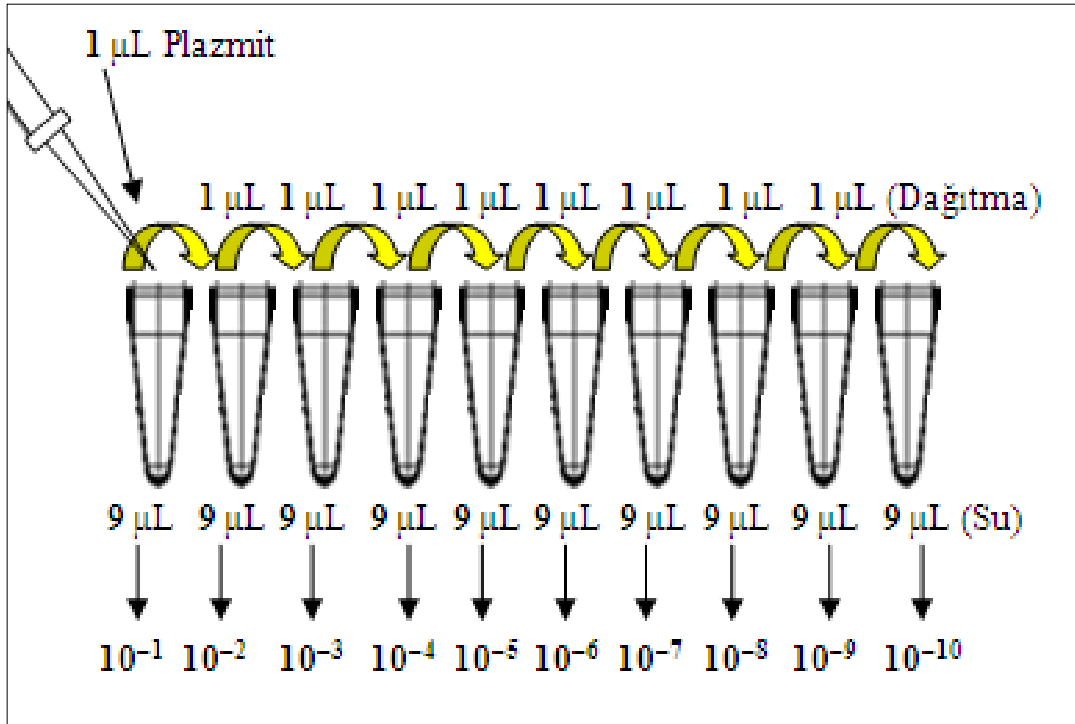
İnsert miktar ve konsantrasyonunu arttırmak için PCR 50 µL'lik hacimde 4 ayrı tüpte yapıldı. PCR sonrasında örnekler 2.2.5'inci bölümde anlatıldığı gibi jelde koşturuldu. İstenilen bantların elde edildiği gözlemlendi ve örnekler jelden geri kazanıldı. Jelden geri kazanma için GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, Almanya) kullanıldı. Kit tarifesinin takip edildiği bu aşama için özetle şu yol takip edildi:



Şekil 2.1 RNA İzolasyonu İçin Toplanan Örnekler



Şekil 2.2 Real time PCR plate



Şekil 2.3 Standart Hazırlama

Boşken tartılan ependorf tüplerine jel görüntülemeye kısa sürede, dikkatlice kesilen bantlar koyuldu. Jel ağırlığı tespit edildikten sonra jel ağırlığının 3 katı kadar (100 mg jel varsa 300 µL) jel çözücü solüsyon eklendi ve 55 °C’de 10 dakika jel tamamıyla çözünene kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresince her 3 dakika’da vortex yapıldı. Kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi ve 500 µL kolon hazırlama solüsyonu eklenerek 13000 X g’de santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. Çözelti içerisine başlangıçtaki jel miktarı kadar %100 isopropanol eklendi ve homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapıldı. Çözünmüş jel karışımı hazırlanan kolonlara aktarıldı. 13000 X g’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. 700 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 1 dakika 13000 X g’de santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. Kolon toplama tüpüne yerleştirildi ve bir kez de etanolden arındırmak için boş santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 30 µL elüsyon tamponu eklenerek 5 dakika beklendi. Sonrasında 13000g’de 1dakika santrifüj yapıldı. Tekrar 20 µL elüsyon tamponu eklendi ve 5 dakika beklendi. 13000 X g’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu şekilde jelden kazanma 50 µL’lik son hacimle tamamlanmış oldu.

2.6.2 Ekspresyon Primerlerinin Dizaynı

Klonlama çalışmalarında EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen Cat.no.K1740–01) kullanıldı. Klonlamada, bulundurduğu restriksiyon bölgeleri hedef cDNA dizisi içindiğerlerine göre daha uygun olduğundan kit içerisinde bulunan zeozin direnç geni barındıran pPICZ α C vektörü (Invitrogen, A.B.D.) kullanıldı. Bu vektör mayada üretilen proteinin hücre dışarısına verilmesini sağlayan α sinyalinin barındırmaktadır. Ve içerisine girdiği hücreye zeozin antibiyotiğine karşı direnç sağlar. Bu şekilde vektörü alan tansformatlar tespit edilir. Primerler dizayn edilirken dizinin amino ucunda tespit edilen sinyal peptit de göz önünde bulunduruldu. Sol primer sinyal peptitin ayrılma bölgesinden sonraki nükleotitlere dizayn edildi. Restriksiyondan sonra sinyal peptit diziden uzaklaştırılmış oldu (Şekil 2. 4). Bunun sonucu olarak proteinin hedef ER’a gitmesi engellendi. Bu şekilde proteinin sitoplazmada kalması ve α sinyal sayesinde hücre dışarısına verilmesi

hedeflendi. Primerler içerisinde vektörle uyumlu restriksiyon tanıma bölgeleri düzenlendi.

Sinyal peptit çıkarma işleminde P450 dizisine uyumlu primerlerin dizilerinde bulunan nükleotitlerin birkaçında değişiklik yapıldı. Çerçeve kaymaması için kesim sonrasında vektör ve P450 dizilerinden gelecek nükleotitler kontrol edildi. Dizinin sol ucunun kesimi için *Cla* I (Fermentas, Litvanya), sağ ucunun kesimi içinse *Acc* 651 (Fermentas, Litvanya) enzimleri seçildi (Tablo 2.12).

Tablo 2.11 Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

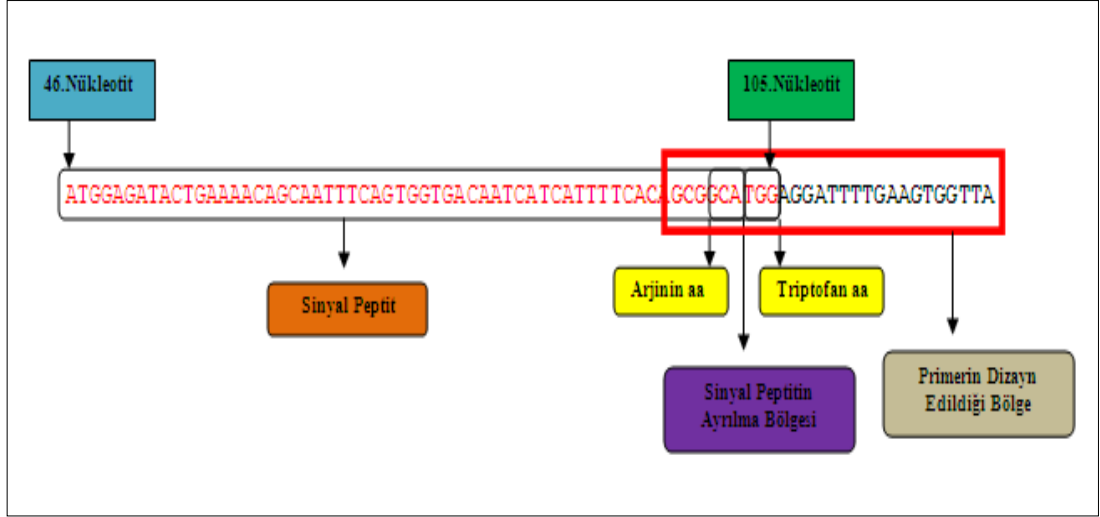
Primerler	Molaritesi	Çalışma Solüsyonları
Exp. Sağ Primer	33.3 µM	30 µL primer + 170 µL TE
Exp. Sol Primer	30.1 Mm	33 µL primer + 167 µL TE

Tablo 2.12 Uygun Enzimler ve Tanıma Bölgeleri

Enzim	Tanıma Bölgesi	Primer Gösterim
<i>Cla</i> I	5'-AT'CGAT-3'	AGCGGCATG(c)GAG(t)GATTTTGAAGTGGTTA
<i>Acc</i> 651	3'-C'CATGG-5'	AGAATGCATAACAACG(c)ATA(g)GATAA

2.6.3 cDNA ve Vektörün Kesilmesi

Kesim vektör için 20 µL, cDNA için 30 µL toplam hacimde yapıldı. Vektör kesiminde hazırlanan karışım içerisinde 350 ng'lık vektörden toplamda 1µg olabilmesi için 4 µL vektör, 1 µL (1 ünite) *Cla* I enzimi, 1 µL (1 ünite) *Acc* 651 enzimi, 2 µL 10X tampon ve 12 µL su; cDNA kesiminde hazırlanan karışım içerisinde 200 ng'lık cDNA'dan toplamda 1 µg olabilmesi için 5 µL, 1.5 µL (1.5 ünite) *Cla* I enzimi, 1.5 µL (1.5 ünite) *Acc* 651 enzimi, 3 µL 10X tampon ve 19 µL su koyuldu. 37 °C'de 1 saat etüvde inkübe edildi. Kesimden sonra 2. 6. 1'inci bölümde anlatıldığı gibi saflaştırma yapıldı. Kesilmiş vektör jele yüklenerek geri kazanıldı, cDNA ise jele yüklenmeden saflaştırıldı. cDNA enzim ve diğer bileşenlerden ayırmak için saflaştırıldı.



Şekil 2.4 Sinyal Peptitin Uzaklaştırılmasını Hedef Alan Primer Dizaynı. Seçilen enzim triptofan amino asidini kodlayan TGG kodonunda T ve G (G nükleotidi C nükleotidi ile değiştirilmiştir.) nükleotitleri arasından kesme yapmaktadır.

2.6.4 Ligasyon Koşulları

Ligasyon, T4 DNA Ligaz (5 U / μL , Fermentas, Litvanya) enzimi ile 22 °C’de, 45 dakika yapıldı. Enzimin kullanım talimatına göre karışım, 100 ng (1 μL) vektör, 3 katı olacak şekilde 300 ng (10 μL) insert, 2 μL 10X tampon, 1 μL (1/5 sulandırılmış, 1 ünite) T4 DNA ligaz enzimi, 6 μL su katılarak toplam 20 μL hacimde hazırlandı.

2.6.5 Transformasyon

Hazırlanan ligasyon ürününün 5 μL ’si toplam hacmin 1/10 miktarı olacak şekilde 50 μL ’lik *E.coli* DH10B suşuna transforme edildi. Transformasyonda şu yol takip edildi: -80 °C dolabından buza transfer edilen kompetan hücreler (50 μL) içerisine 5 μL ’lik ligasyon ürünü eklendi ve karışım 20 dakika buzda bekletildi. Sonrasında 42 °C’de 1.5 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Bu aşamalar sırasında çok hızlı olundu. 55 μL ’lik bu karışım 950 μL ’lik sıvı LB besiyerine aktarıldı ve 1.5 saat, 37 °C’de, 240 rpm’de etüvde çalkalandı. 1.5 saat sonunda 1 mL inokülasyon ürünü 500 μL , 250 μL ve 250 μL olarak zeozin antibiyotiği bulunduran 3 adet petriye yayıldı.

Transformasyon işleminin başarılı olup olmadığını anlayabilmek için ligasyon ürünü ile birlikte 0.5 µL boş halkasal vektör (50 ng) de kompetana transforme edildi. Kompetan canlılığı sadece kompetanın zeozinsiz petriye ekilmesiyle test edildi. Boş hücreler aynı zamanda zeozin yeterlilik testi için zeozinli petriye ekildi. Başarılı transformasyonlarda zeozinli petriye ekilen boş hücreler ölürken antibiyotiksiz ortamda çok fazla üreme gözlemlendi. Boş (insertsüz) vektör zeozinli ortamda çok fazla koloni oluşturdu. Ligasyon başarılı olduğunda zeozinli petrilere üreme gözlemlendi.

2.6.6 Zeozin Hazırlanması

Kit içerisindeki 100 mg'lık zeozinden deneylerde 25 µg / µL'lik zeozin kullanabilmek için 250 µL zeozin alındı ve 750 µL su ile çözelti oluşturuldu. Bu çalışma solüsyonundan LB içine bire bir konuldu (500 µL LB'ye 500 µL zeozin). LB besiyerlerinin hazırlanması Tablo 2.13'te gösterilmiştir.

2.6.7 Kompetan Hücre Hazırlanması

Kompetan hale getirilecek *E.coli* (DH10B) hücreleri LB agar petrilere yayıldı. 37 °C'de bir gece inkübe edildi ve tek koloni düşürüldü. Tek koloni sıyrılarak 10 mL sıvı LB'de 1 gece inoküle edildi. 250 mL'lik erlen içerisinde 100 mL'lik LB koyuldu. Daha önce hazırladığımız ön kültürden buraya 5 mL eklendi. 37 °C'de yaklaşık 4–6 saat kadar inkübe edildi (OD₆₀₀ 0.6 – 1 olana kadar). İnoküle edilen 100 mL'lik bakteri kültürü 50 mL'lik 2 falkona bölündü. 3000 rpm'de, 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Başlangıç hacminin yarısı kadar (25 mL) soğuk (kullanılmadan önce buzda bekletildi) 0.1 M CaCl₂ eklendi. Pipetajla dipteki çökelti çözüldü. 25 dakika buzda bekletildi. Bu işlemlerden sonra 3000 rpm'de, 5 dakika 4 °C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra başlangıç hacminin 1/10'u kadar (5 mL) soğuk, 0.1 M CaCl₂ eklendi. Pipetajla çökelti çözüldü. Hazırlanan kompetan hücre çözeltisi ependorflara, tek kullanımlık olması için 50 µL'lik miktarlarda paylaştırıldı.

Tablo 2.13 LB Besiyerlerinin Hazırlanması

Sıvı LB Besiyeri (500 mL)	
Tripton	5 g
Maya Ekstraktı	2.5 g
NaCl	5 g
LB Petri (500 mL)	
Tripton	5 g
Maya Ekstraktı	2.5 g
NaCl	5 g
Agar	7.5 g
Zeozinli Sıvı LB (500 mL)	
Tripton	5 g
Maya Ekstraktı	2.5 g
NaCl	5 g
Zeozin (İnvitrogen)	500 µL
Zeozinli Petri LB (500 mL)	
Tripton	5 g
Maya Ekstraktı	2.5 g
NaCl	5 g
Agar	7.5
Zeozin	500 µL

2.6.8 Koloni Tarama

Transformasyon sonrası oluşan kolonilere pipet ucu değdirildi ve herbiri 10 µL su ile karıştırıldı. Her örnekten 1 µL kalıp ligasyonun başarılı olup olmadığını anlayabilmek için koloni PCR’da kullanıldı (Tablo 2. 14).

Koloni PCR için vektöre ait AOX-3’ ve AOX-5’ primerleri sulandırılmış olarak (100 µM) sipariş edildi ve bunlardan 5 µM’lık çalışma solüsyonları hazırlandı (Tablo 2.15). Koloni PCR karışımı Tablo 2.16’da gösterilmektedir. PCR sonrasında örnekler 2.2.5’inci bölümde anlatıldığı gibi jelde koşturuldu ve jel görüntüsü fotoğraflandı.

2.6.9 Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu

Koloni PCR ile başarılı ligasyon ürününü aldığımız hücrelerin oluşturduğu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Bunun için koloni sayısına falkona 5’er mL zeozinli LB besiyeri koyuldu ve kolonilerden koloni sayısına göre işaretlenen falkonlara inokülasyon yapıldı. 37 °C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün plazmit izolasyonu GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bu kite göre izlenen yol özetle şöyledir:

5 mL’lik kültürden 850 µL alınarak 150 µL gliserolle karıştırıldı, gerektiğinde kültür hazırlayabilmek için oluşturulan gliserol stok -80 °C dolabına kaldırıldı. Kültürün artan kısmı 2 mL’lik 2 ependorfa paylaştırıldı ve 15000 X g’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı, bakteri pelletine 200 µL süspansiyon solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı. Sonrasında 200 µL lizis solüsyonu eklendi ve hemen 6 – 8 kez pipetaj yapıldı. Daha sonra 350 µL nötrale edici solüsyon eklendi ve ependorf hafifçe 4 – 6 kez ters düz edildi. 15000 X g’de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Tablo 2.14 Koloni PCR Koşulları

Döngü İsmi	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Ayrılma	95 °C	2 dakika	1
Ayrılma	94 °C	1 dakika	40
Bağlanma	55°C	1 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1

Tablo 2.15 Koloni PCR Karışımı

Bileşen İsmi	Reaksiyon İçin Kullanılan Miktar (25 µL Toplam Hacim için)
Tampon	2.5 µL
MgCl ₂	1.5 µL
AOX-3'	0.5 µL
AOX-5'	0.5 µL
dNTP karışım (10 mM)	0.4 µL
Kalıp	1 µL
Taq Pol (Fermentas, Litvanya)	0.5 µL
Nükleazlardan arındırılmış su	18.1 µL

Tablo 2.16 AOX Primerleri

Primer İsmi	Nükleotit Dizisi
AOX-3'	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
AOX-5'	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3

Süpernatant kolonlara aktarılmadan önce kolonlara 500 µL kolon hazırlama solüsyonu eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Hazır hale gelince süpernatant kolonlara eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. 750 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı ve kolon yerleştirilerek bir kez daha bu sefer 15000 X g'de etanolü tamamıyla uzaklaştırabilmek için santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 30 µL elüsyon tamponu eklendi. 5 dakika beklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Tekrar 20 µL elüsyon tamponu eklendi, 5 dakika beklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Hazırlanan plazmitler - 20 °C'de saklandı.

2.6.10 Klonlamanın Teyid Edilmesi

Ligasyonda vektör içerisine giren dizinin hedeflenen P450 dizisi olup olmadığını teyit edebilmek için vektör aynı enzimlerle (*Cla* I, *Acc* 651) kesime tabi tutuldu. Kesim 30 µL toplam hacimde yapıldı. Karışım 3 µL tampon, 1 µL *Cla* I enzimi, 1 µL *Acc* 651 enzimi, 1 µg rekombinant vektör (7 µL) ve 18 µL su olacak şekilde hazırlandı. 37 °C'de 1 saat etüvde inkübe edildi. Bölüm 2. 2. 5'te anlatıldığı gibi jelde koşturuldu ve fotoğraflandı.

3. ÇALIŞMANIN KAPSAMI

Sitokrom P450 monooksijenaz gen ailesi, bilim dünyasında çok geniş bir çalışma alanı oluşturmaktadır. Canlıların göstermiş olduğu her türlü yaşamsal faaliyette görevli olan ve savunma mekanizması olarak canlılığın devamını sağlayan gen ailesi bu özellikleri yönünden bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Birçok canlıda Sitokrom P450 genleri çeşitli yönlerden analiz edilmiştir; ancak literatürde zeytin bitkisi ile alakalı bu gene ilişkin hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle bu çalışma bir ilk niteliğinde, büyük önem taşımaktadır.

Zeytin ağacı (*Olea europaea*), zeytingiller (*Oleaceae*) familyasından; meyvesi yenen, Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türüdür. Zeytinin kromozom sayısı, $2n = 46$ 'dır. Zeytingiller familyasının 27 kadar cinsi ve 600 kadar türü vardır. Zeytin ağacı, bir yıl bol ürün verirken, arkasından gelen yılda adeta dinlenir ve verimi azalır. Sonuçta, bir yıl çok, bir yıl az ürün verir. Buna 'periyodisite' denir. Bu durum, halk arasında "var yılı" ve "yok yılı" olarak adlandırılır. Zeytin yaprakları, ışık, yüksek veya düşük sıcaklık gibi, çevre şartlarına karşı hassastırlar. Bu tür çevre şartlarında zeytin ağacının gelişmesinde ve fotosentez eğiliminde belirgin bir azalma görülür. Zeytin ağacının çok ilginç özellikleri vardır. 1000 yaşına kadar yaşayabilir. 3000 yaşında zeytin ağaçları da bulunmuştur.

Zeytin ağacının uzun yaşamının, yapraklarındaki, oleuropein maddesine dayandığı söylenmektedir. Bu madde, zeytin ağaçlarını, hastalık ve zararlılardan korur. Ayrıca yapraklarından çıkan kalsiyum elenolaten maddesi, zararlı virüs, bakteri ve mantarları yok eder. Yaprakta, çeşitli flavonoidler bulunur. Fenolik ve flavonoid bileşikler, vücudun bağışıklık sistemini güçlendirip hastalıklara karşı dirençli olmasını sağlar. Zeytinin yaprağında, uçucu yağlar, organik asitler ve rezin bulunur. Zeytinde bulunan fenolik bileşikler; bitkinin özelliklerini, zeytinin rengini, besin değerini, zeytinyağının kararlılığını, mikroorganizmalara karşı dayanıklılığını etkiler. Zeytine birçok artı özellik kazandıran bu maddelerin biyokimyasal reaksiyon basamaklarında sitokrom P450 monooksijenaz enziminin rolünü belirlemek zeytinin verimini arttırma, besin değerini yükseltme gibi çalışmalarda yararlı olacaktır.

Bu çalışmada, zeytinden elde edilen ve biyoinformatik analiz sonucunda P450 monooksijenaz olduğu tahmin edilen bir cDNA'nın moleküler karakterizasyonunun

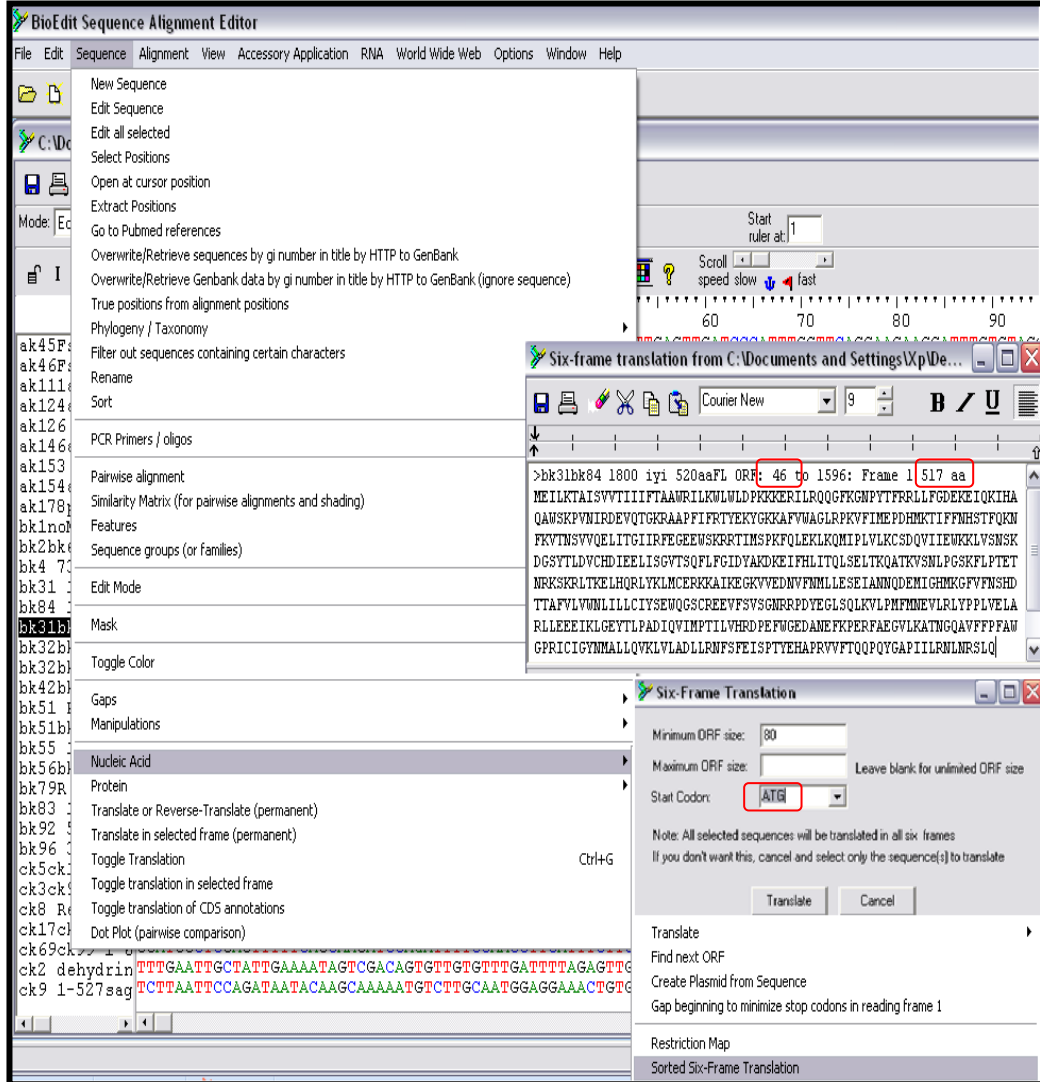
yapılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda bu cDNA'nın intronlar dahil tam uzunluğu, exon / intron bölgeleri, exon / intron polimorfizmi ve zeytinde 12 ay boyunca sentezlenme durumu analiz edilmiştir. Bu tahmini genin promotör bölgesinin tespiti ve protein olarak üretilip enzim aktivitesinin tespit edilmesi ise bundan sonraki çalışmalar için planlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Biyoinformatik Analiz Bulguları

4.1.1 Açık Okuma Çerçevesi

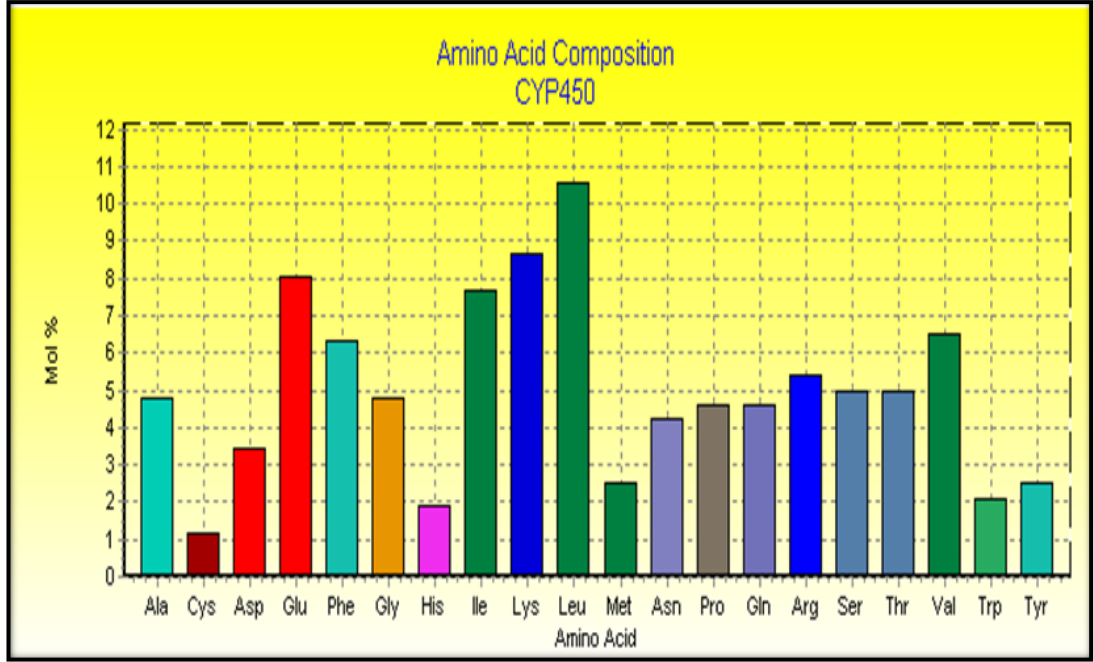
Proteinin 517 amino asitten oluştuğu bulunmuştur. Başlangıç kodonundan önce 46 nükleotitlik bir 5' UTR (Translasyona dahil olmayan bölge) bölgesi tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 BioEdit programında [85] açık okuma çerçevesinin tespiti

4.1.2 Dizinin Amino asit Kompozisyonu

Lizin - Arjinin (hidrofilik) ve Lösin - İzölösin (hidrofobik) gibi farklı iki grup amino asitin yüksek oranlarda bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.2).



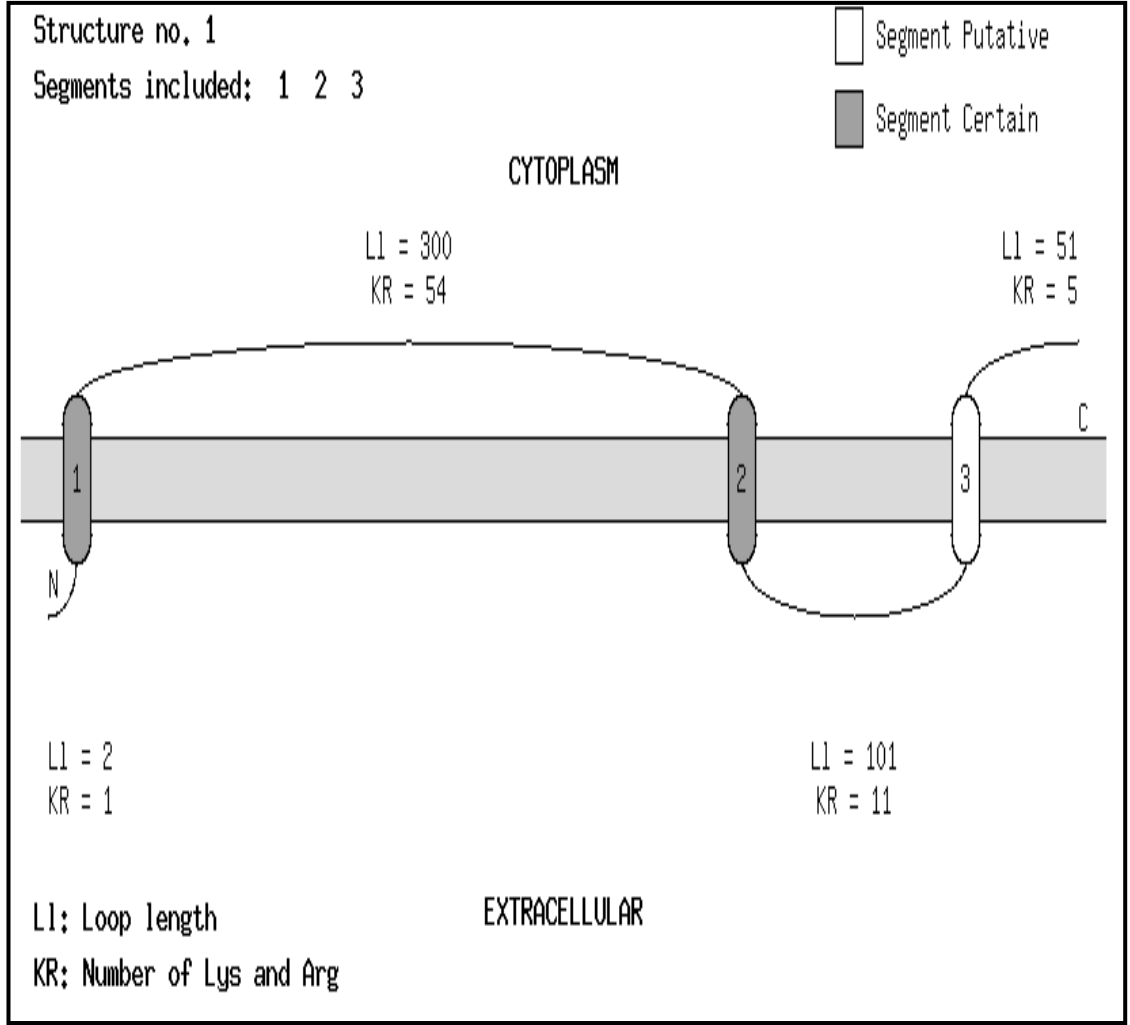
Şekil 4.2 BioEdit programında [85] amino asit kompozisyonunun tespiti

4.1.3 Membran Protein Analizi

Proteinin 3 adet transmembran heliks barındırdığı tespit edildi (Şekil 4. 3)

4.1.4 Sinyal Peptit

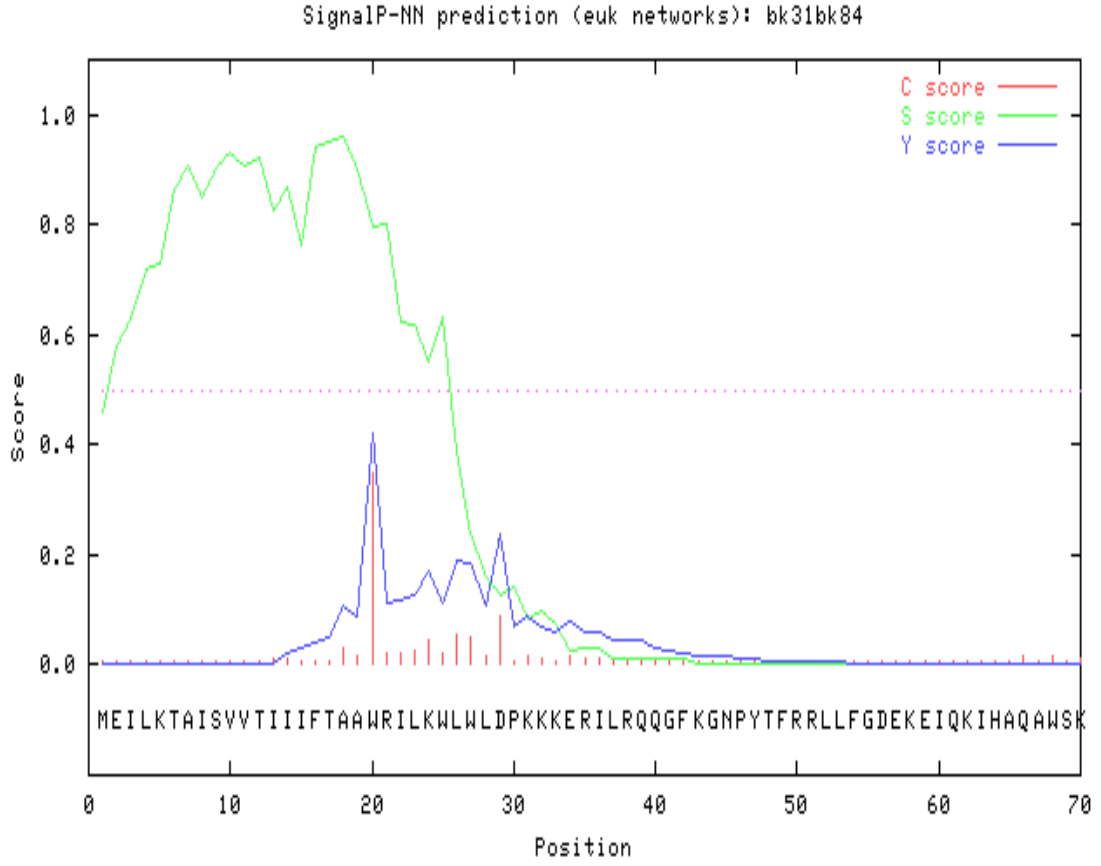
Dizinin 5' amino ucunda 20 amino asitlik bir sinyal peptit tespit edildi. Sinyal peptit ayrılma bölgesinin 19.ve 20.amino asitler arasında olduğu bulundu. Sinyalin bu proteini endoplazmik retikulumu taşıdığı ve proteinin endoplazmik retikulum membranına yerleştiği tahmin edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3 TopPred Programında [86] Membran Heliks Tespiti

4.1.5 Demir Bağlama Domaini

Sitokrom P450 gen ailesinde yüksek derecede korunmuşluk gösteren ve aktif bölge amino asitlerini taşıyan demir bağlama domaininin 453.ve 462.aminoasitler arasında olduğu tespit edildi. Bu dizi 'FSWGPRICIG' şeklindedir (Şekil 4.5).



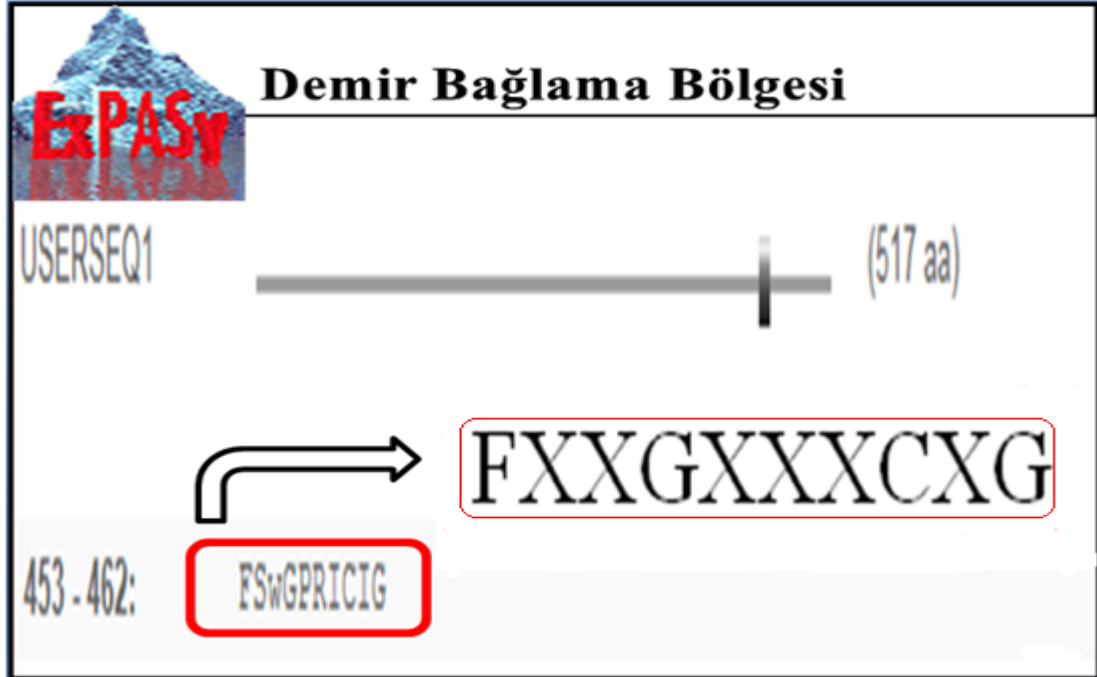
Şekil 4.4 Signal P Programında [88] Sinyal Peptit Analizi

4.1.6 Glikozilasyon Bölgeleri

Dizide 2 adet N-glikozilasyon, 5 adet O-glikozilasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.6- Şekil 4.7).

4.1.7 Blast2GO Sonuçları

Sonuçlar Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu tabloda genin biyolojik prosesi, hücre içerisinde bulunduğu yer ve moleküler fonksiyonu görülmektedir.



Şekil 4.5 InterPro Scan Programında [89] Demir Bağlama Domaininin Tespiti

Name CytP450s Length: 517

MEILKTAISVVTIIIFTAAWRI LRWLWLDPKKKERI LRQQGFZCNPYTFRLLFGDEKEIQKIHAQAWSKPVNIRDEVQT
 GKRAAPFIFRTYEKYGKKAFFVWAGLRPKVFIMEPDHMKTIIFNHSTFQKNFKVTNSVVQELITGIIRFEGEEWSKRRTIM
 SPKPFLEKLRQMIPLVLKCSQVIEWKLVNSKDGSYTLVCHDIEELISGVT SQPLFGIDYAKDKEIFHLITQLSEL
 TKQATKVSNLPGSKFLPTETNRKSKRLTKE LHQRLYKLMCERKKAKEGKVVEDNVFNMLLESEIANNQDEMIGHMKGFV
 FNSHDTTAFVLVWNLILLCIYSEWQGSCEEVFSVSGNRRPDYEGLSQLKVLPMFMNEVLRLYPPLVE LARLLEEEIKLG
 EYTLPADIQVIMPTILVHRDPEFWGEDANEFKPERFAEGLKATNGQAVFFPFAWGPRICIGYNMALLQVKLVLADLLRN
 FSFEISPTYEHAPRVVFTQQPQYGAPIILRNLRSLQ

.....N.....
N.....

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement:	N-Glyc result:
CytP450s	123 NHST	0.5354	(5/9)	+
	480 NFSF	0.4177	(6/9)	-
	513 NRSL	0.5814	(8/9)	+

Şekil 4.6 NetNGlyc Programında [91] N-glikozilasyon Bölgelerinin Tespiti

Name: CytP450s Length: 517

MEILKTAISVVTIIIFTAAWRILKWLWLDPKKKERILRQQGPKGNPYTFRRLLFGDEKEIQKIHAQAWSKFPVNIRDEVQT
 GKRAAPFI FRTYEKYGKKA FVWAGLRPKV FIMBPDHMTIFFNHSTFQKNFKVTNSVVQELITGIIRFEGEWSKRRTIM
 SPKFQLEKLRQMIPLVLKCSQVIEWKRKLVNSKDGSYTLDVCHDIEELISGVT SQPLFGIDYAKDKEIFHLITQLSEL
 TRQATKVS NLP GSKFLPTETNRKSKRLTKELHQRLYKLM CERKKAIKEGKVVEDNVFNMLLESEIANNQDEMIGHMKGFV
 FNSHDTTAFVLVWNLILLCIYSEWQGSCEEVFSVSGNRRPDYEGLSQLKVLPMFMNEVLRLYPPLVELARLLEEEIKLG
 EYTL PADIQVIMPTILVHRDPEFWGEDANEFKPERFAEGVLKATNGQAVFFPFAWGPRICIGYNMALLQVKLVLADLLRN
 FSFEISPTYEHAPRVVFTQQPQYGAPIILRNLRSLQ

.....G.....G
G.....
 ..G.....G.....
 ..G.....

SeqName	Residue	O-GlcNac result	Potential	Thresh. (1)	Thresh. (2)
CytP450s	69	S	+	0.4777	0.4374
	80	T	+	0.4720	0.3966
	134	T	+	0.4800	0.4663
	248	S	++	0.5520	0.4178
	260	T	+	0.4588	0.3787

Şekil 4.7 NetOGlyc Programında [90] O-Glikozilasyon Bölgelerinin Tespiti

Tablo 4.1 Balst2GO [92] Analizi

Biyolojik Proses	Hücredeki konum	Moleküler Fonksiyon
1- Oksidason -Redüksiyon	1-Endoplazmik R.	1-Elektron taşıma
		2-Fe-O2 bağlama
		3-Monooksijenaz aktivite

4.1.8 Alternatif Splays Sonucu

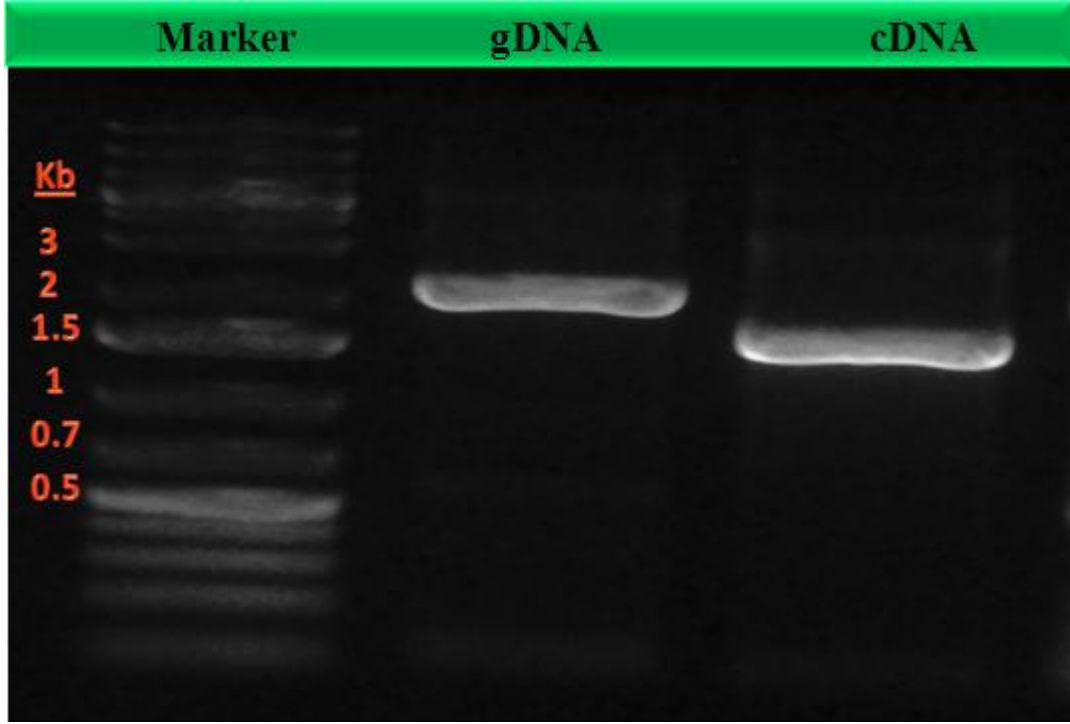
Tahmini alternatif splays bölgeleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

acc_Sensitivity (%) :90.51		acc_threshold :3.329682			
don_Sensitivity (%) :94.10		don_threshold :2.239693			
★	258	259	5.174331	Medium	donor
	362	363	10.788384	Medium	acceptor
★	588	589	7.865473	Medium	donor
	662	663	14.096444	High	acceptor
★	915	916	5.287416	Medium	donor
	1007	1008	4.636112	Medium	acceptor
	1150	1149	4.275536	Medium	donor
	1275	1276	3.962341	Medium	acceptor
	1363	1364	5.178394	Medium	donor
	1448	1447	7.359702	Medium	acceptor
	1577	1578	10.189150	Medium	acceptor

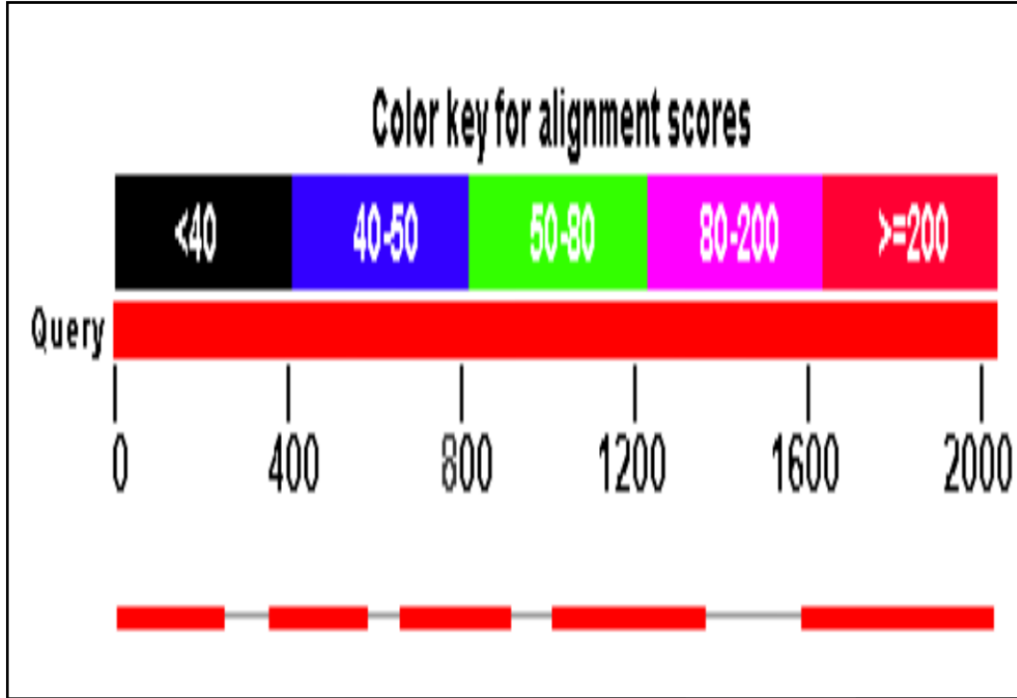
Şekil 4.8 İntron ve Alternatif Splays Bölgeleri. Kare içerisine alınmış, yıldızlar ve ok işareti ile gösterilen donor - acceptor eşleri dizi içerisindeki intronları, parantez içerisindeki bölgeler tahmini alternatif splays bölgelerini göstermektedir.

4.2 İntron Analiz Sonuçları

İntron analizini yansıtan jel görüntüsü, dizileme sonucu ve alternatif splays bölgeleri sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.



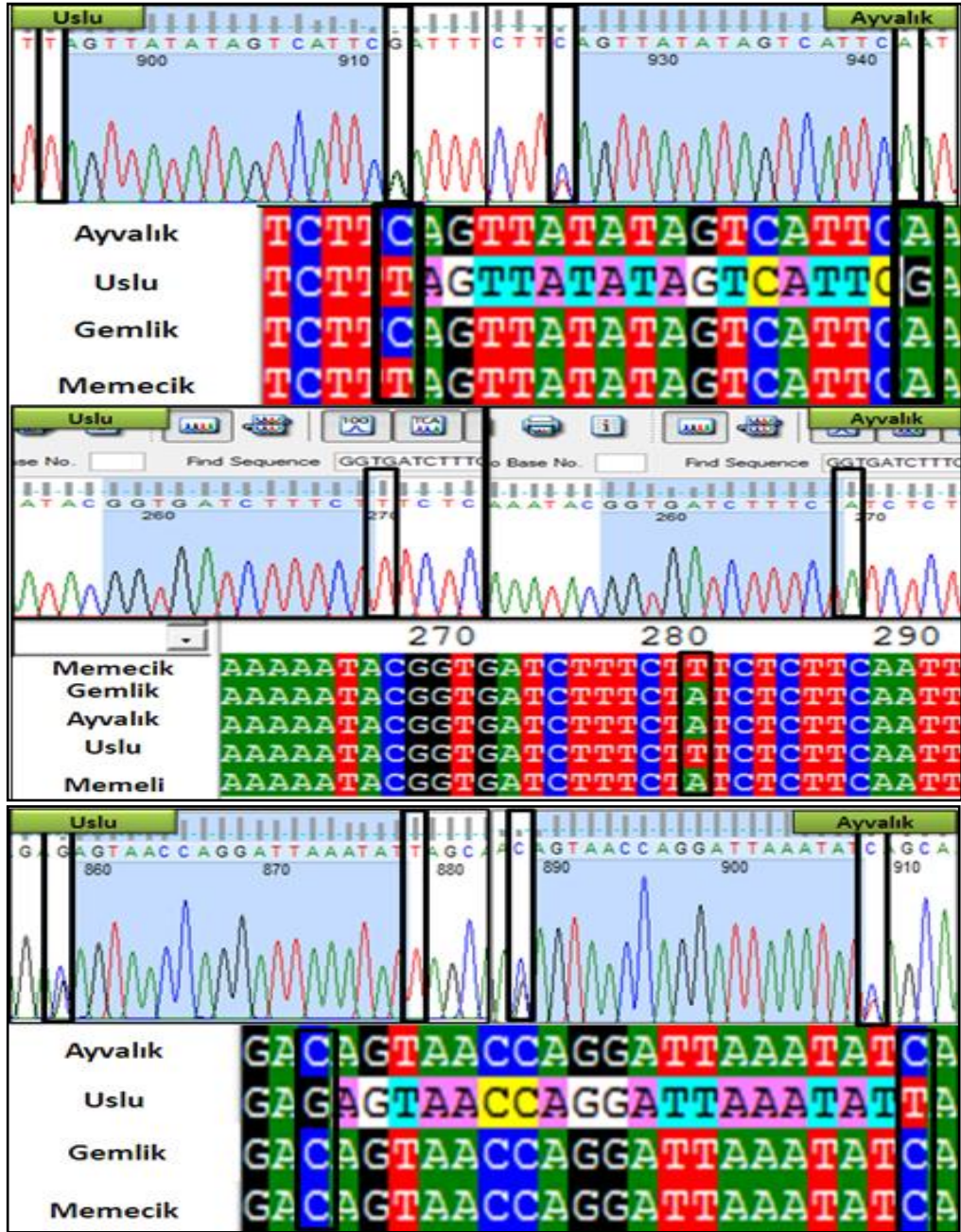
Şekil 4.9 İtron Analizi Jel Görüntüsü. PCR reaksiyonunda gDNA kalıp olarak kullanıldığında 2 kb'lık, cDNA kalıp olarak kullanıldığında ise 1.5 kb'lık PCR ürünü oluşmakta ve dolayısıyla toplam 500 nükleotitik intron olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.10 İtronların Yer ve Uzunluklarının Tespiti

4.3 Polimorfizm Sonuçları

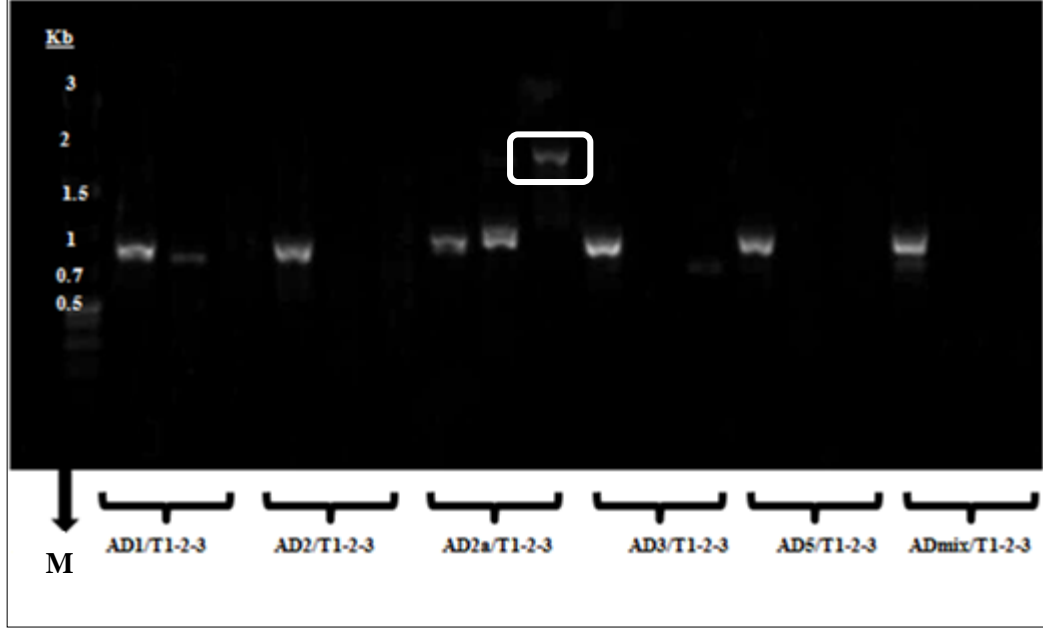
Ayvalık, uslu, gemlik, memeli ve memecik çeşitlerine ait gDNA örneklerinin PCR'ı sonrasında dizi analizi yapıldı ve 5 noktada polimorfizm olduğu bulundu. Sonuçlar kromatogram pikleri ile teyid edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Dizileme Sonrası Polimorfizm Analizi

4.4 Tail – PCR Sonuçları

AD primer seti (AD₁,AD₂,AD_{2a},AD₃,AD₅,AD_{karışım}) ve Tail1-2-3 primerleri ile 3 aşamada yapılan PCR sonucunun jel görüntüsü Şekil 4.12’de görülmektedir.



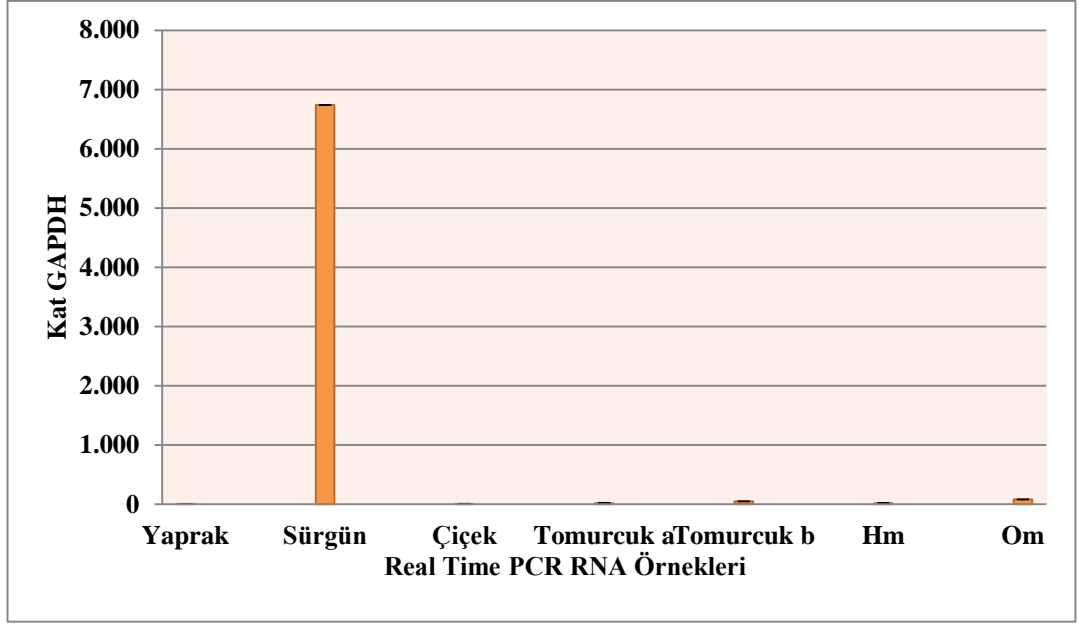
Şekil 4.12 TAIL PCR Jel Görüntüsü, M: Belirteç

4.5 Real Time PCR Sonuçları

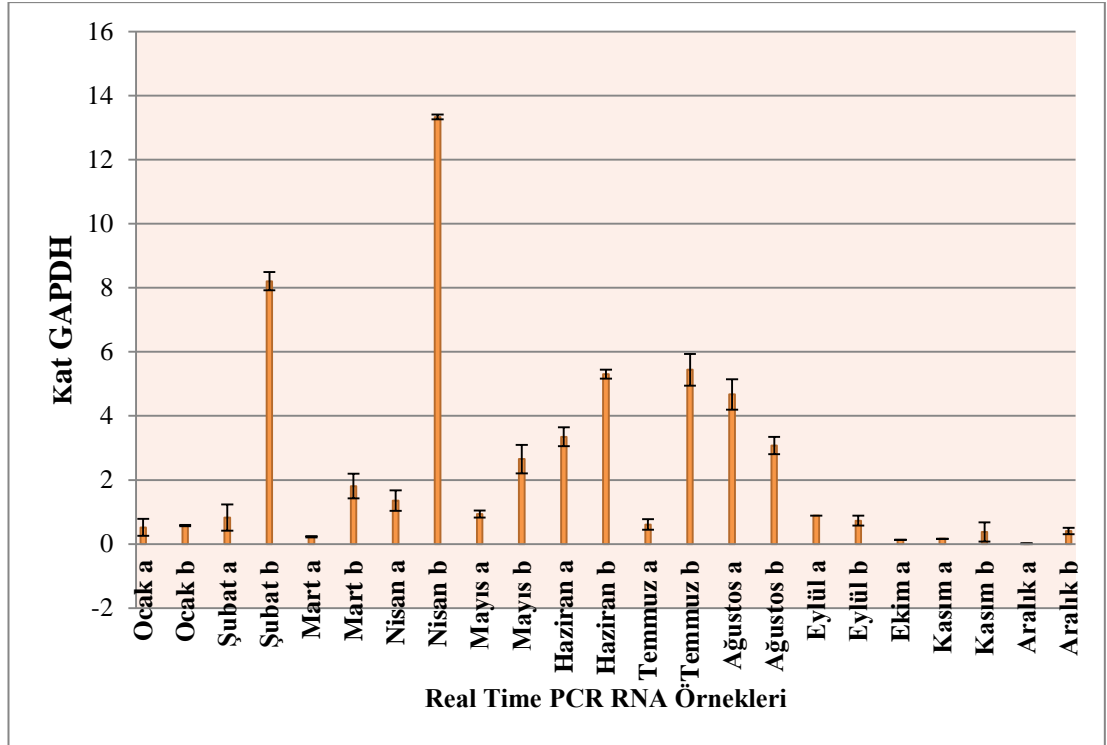
Tablo 2.10’da görülen örneklerin cDNA örnekleri ile yapılan real - time PCR sonuçları dokusal (Şekil 4.13) ve zamansal ekspresyon analizi (Şekil 4.14) olarak grafiklerde gösterilmektedir.

4.6 Sitokrom P450 Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanma Sonuçları

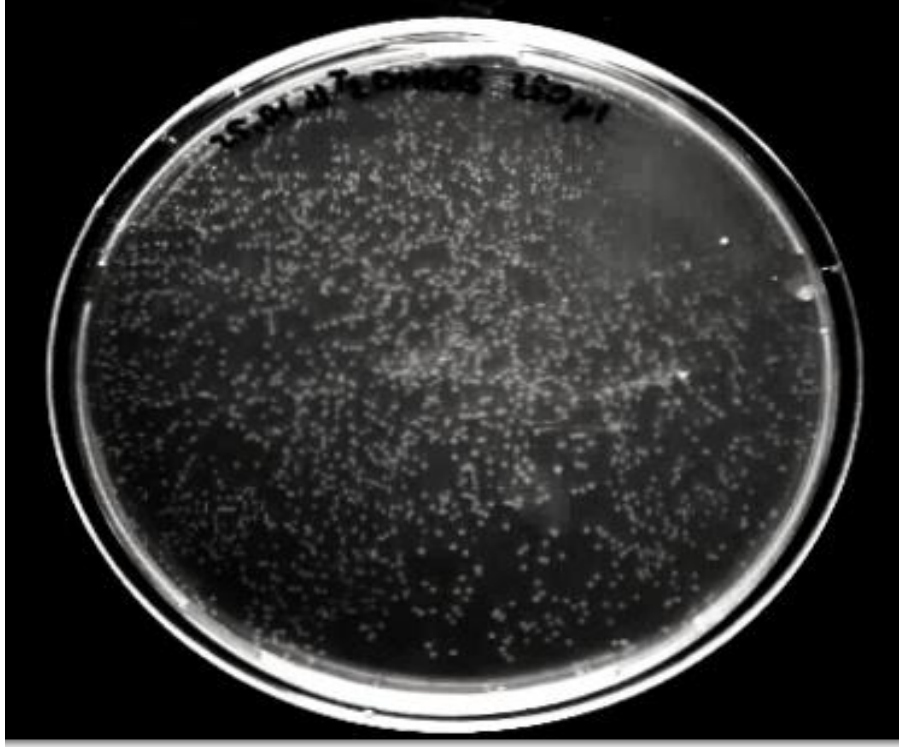
Transformasyon petri sonuçları, koloni PCR sonuçları ve genin vektörden kesilip çıkarılması sırasıyla Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmektedir.



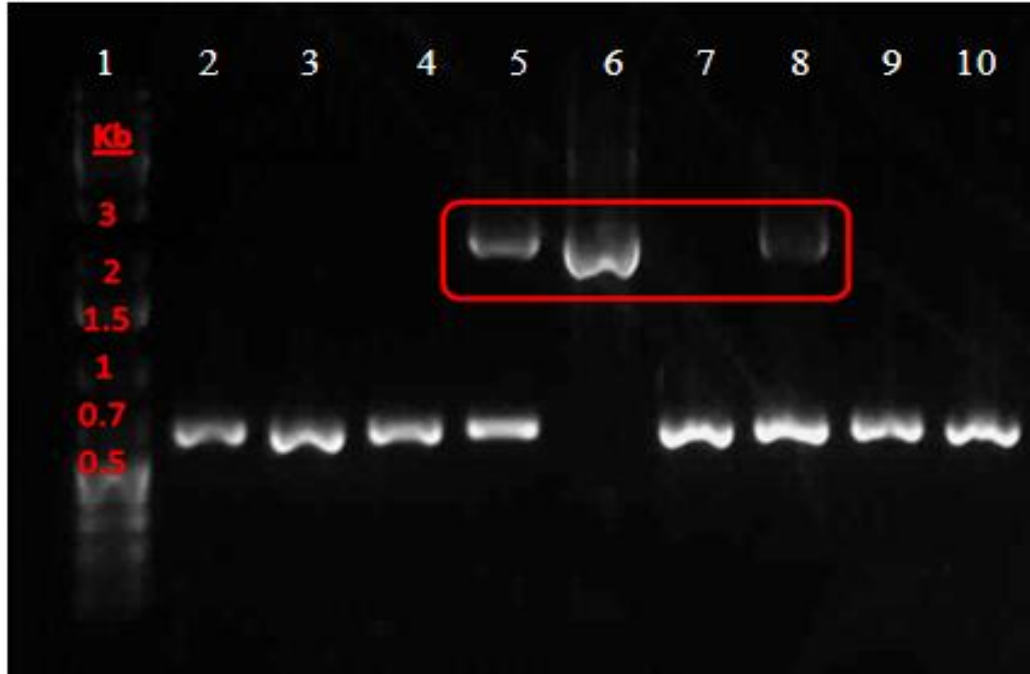
Şekil 4.13 Real time PCR Dokusal Ekspresyon Analiz Grafiği



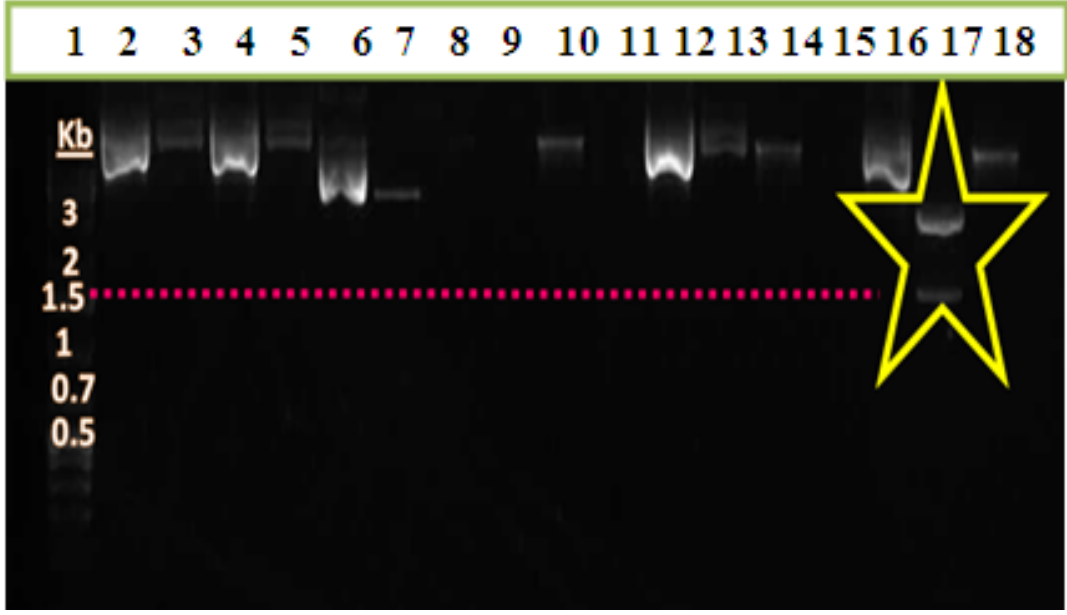
Şekil 4.14 Real time PCR Zamansal Ekspresyon Analiz Grafiği



Şekil 4.15 Transformasyon Sonrası Petri Görüntüsü



Şekil 4.16 Koloni PCR Jel Görüntüsü, 1. Kuyucuk Belirteç; 2, 3, 4, 7, 9 ve 10. Kuyucuklar Boş Vektör; 5, 6 ve 8. Kuyucuklar Rekombinant Vektör.



Şekil 4.17 Klonlanan Genin Kesim Sonrası Vektörden Ayrılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sitokrom P450 gen ailesinin monooksijenaz grubu ökaryotlarda çoğunlukla ER'da, zara bağlı olarak bulunan hem proteinlerdir [12]. Daha önce hazırlanmış zeytin cDNA kütüphanesinden seçilen 517 amino asitlik bir protein kodladığı tespit edilen sitokrom P450 monooksijenaz benzeri dizi ile yapılan sinyal peptit ve membran protein analizlerinde dizinin amino ucunda, proteini ER'a taşıyan, 20 aa'lık bir sinyal olduğu ve proteinin 3 membran heliks bulundurduğu literatürleri doğrular bir şekilde tespit edildi (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Aynı şekilde lösin-izolösin gibi hidrofobik ve lizin-arjinin gibi hidrofilik farklı 2 grup aa'i yüksek miktarlarda içermesi membran bağlı bir protein olduğu bilgisini kuvvetlendirdi. CYP gen ailesinin ayırt edici özelliği, korunmuş bölgesi olan demir bağlama domaininin analiz edilen dizideki varlığı da tespit edildi (Şekil 4.5).

Dizide intron varlığının tespiti için yapılan cDNA ve gDNA PCR sonuçlarının jelde yürütülmesi sonucunda Şekil 4.9'da elde edilen bilgiye göre toplamda yaklaşık 500 bç'lik bir intron olduğu tespit edildi. cDNA ve gDNA dizilerinin NCBI'da ikili BLAST'ı sonrasında intronların dizide 4 ayrı bölgede olduğu bulundu. İtronlar sırasıyla 105, 82, 94 ve 215 nükleotit uzunluğundadır (Şekil 4.10). Dizide 2 tane tahmini alternatif splays bölgesi tespit edildi. Bu dizide 1150.ve 1276.nükleotitler arasında ekzon olarak görülen bölge Splice Finder adlı programda [93] intron olarak belirlendi ve bu da bize bu bölgenin kimi zaman intron olarak kesilip çıkarıldığını kimi zaman ise burada olduğu gibi ekzon olarak kullanıldığını düşündürdü. Ayrıca programda 1363. nükleotitte bulunan donör (nükleotit verici) bölge için 2 acceptor (nükleotit alıcı) bölge belirlenmiştir. İlk acceptor kullanılırsa dizide intron dizisi olan 1448–1518 arası nükleotitler ekzon durumuna geçecektir. Bunun sonucunda dizinin 4. intronunda bulunan 2 ayrı polimorfik bölge ekzon polimorfizmine dönüşecektir. Ekzon polimorfizminde aa değişimi önemli olduğundan bu değişimin aa farklılığına yol açıp açmadığına bakıldı ve her iki durumda da aynı amino asitlerin kodlandığı tespit edildi.

CYP gen ailesinde polimorfizm oranı çok yüksektir. Bu sebeple zeytin çeşitlerinde de polimorfizm olup olmadığı kontrol edildi. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi yaklaşık 1800 bç uzunluğundaki dizilerde 5 bölgede polimorfizme rastlandı.

Polimorfik bölgelerin hepsinin intron bölgelerinde olduğu (alternatif splay bölgesi hariç) görüldü. İtron bölgesindeki polimorfizmlerin filogenetik analizlerde kullanılmasının yanı sıra genin sentezlenmesinde de önemli olduğu tespit edildiğinden devam eden çalışmalarda daha fazla zeytin çeşidini kapsayan polimorfizm analizinin yapılması önemli görünmektedir.

Genellikle sitokrom P450 geninde ekspresyon seviyesi stres koşullarında, yabancı kimyasallarla temasta ve zararlıların (mantar, böcek) etkilerinde artmaktadır. Bu sebeple bu zamana kadar yapılan real-time PCR çalışmaları bu gen için bitki üzerinde stres koşulları oluşturularak yapılmıştır. Bizim çalışmamızda real-time PCR ile dokusal ve zamansal ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Dokusal ekspresyon sonuçlarına göre ilgili genin ekspresyonunun en yüksek değerini sürgünde aldığı görülmektedir (Şekil 4.13). Daha önceki çalışmalarda CYP genlerinin genç yapraklarda, ksilem dokusunda, odunsu gövdede diğer dokulara göre daha fazla sentezlendiği bulunmuştur. Bu çalışmada sürgün için elde edilen sonuç genç yapraklarda fazla ekspre olduğu bilgisi ile örtüşmektedir. Aylara göre bakıldığında Nisan ayında ekspresyon seviyesinin çok yüksek olduğu görüldü. Nisan ayı zeytin için çiçeklenme zamanıdır. Zeytin yeni bir döneme başlar ve metabolik aktivite çok yüksektir. Bu sebeple fazla enerjiye ihtiyaç duyar. Yağ asitlerinin parçalanması bu enerjinin eldesini sağlar. Ayrıca oksin ve giberellin gibi büyüme hormonlarının da sentezi artar. Aynı şekilde ışık alma süresi, seviyesi de ekspresyon miktarını etkileyen faktörlerdendir. Bu metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesinde CYP genleri anahtar rol oynadığı için ekspresyon miktarının artmış olması beklenen bir durum olarak görülebilir. Nisan ayında var yılında olan ağaçta ise bu durum görülmemektedir. Genin 8 ay yok yılında 4 ay ise var yılında daha fazla sentezlendiği görüldü. Bu sebeple genin yok yılına has olduğu tereddüt uyandırmaktadır. Nisan ayında iki ağaç arasında ortaya çıkan büyük farkın sebebi ağaçların var yılında veya yok yılında olmalarıyla ilgili olmadığı anlaşıldığından (Şekil 4.14) sentez farkının daha başka biyotik abiyotik faktörlere bağlı olduğu söylenebilir.

Promoter tespiti için yapılan TAIL - PCR çalışmasında Şekil 4.12’de görüldüğü gibi, AD_{2a} ve Tail 3 primerleri ile Tablo 2.6’da gösterilen TAIL 3 PCR programının kullanılması sonucunda genin 5’ ucundan yaklaşık 2 Kb civarında bir dizi elde edildi. Bu numune diziyeye gönderildi. Elde edilen dizi doğru okunamadığı için aynı koşullarda TAIL 3 PCR aynı örnek için 5 tüp yapıldı ve jelden kazanılarak tekrar dizilemeye gönderildi; ancak dizileme sonucu aynı şekilde başarılı oldu. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında saflaştırılmış PCR ürününün bir dizileme vektöre klonlanıp okutulması planlanmıştır.

Enzim aktivitesinin ölçümü çalışması, genin ekspresyon vektörüne klonlanması aşamasına kadar geldi. Bundan sonraki aşamada rekombinant vektör kullanılarak büyük miktarlarda plazmit izolasyonu yapılacak, vektör uygun enzim ile kesilerek maya kompetan hücrelerine transforme edilecek ve kesik vektörün maya genomuna entegre olması sağlanacaktır. Bunun sonucunda protein elde edilecek ve proteinin aktivitesine bakılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H., Moleküler Biyolojide Önemli Notlar, Konuk M., Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, (2004).
- [2] Cummings, M.R., Genetik Kavramlar, Öner. C., Palme Yayıncılık, Ankara, (2003).
- [3] Doğruman, F., Kuştimur, S., Özekinci, T., Balaban, N., İlhan, M.N., “Giardia intestinalis Tanısında Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Direkt Fluoresan Antikor (DFA) Yöntemlerinin Kullanılması.” *T Parazitol Derg*, **30/4**, (2006) 275–278.
- [4] Tashinga, E., Tashinga, E. Bapiro, Ann-Charlotte, E., JULIA, A. H., Collen, M.M., “Application of Higher Throughput Screening (HTS) Inhibition Assays To Evaluate The Interaction of Antiparasitic Drugs With Cytochrome P450s.” *DMD*, **29**, (2001) 30–35.
- [5] Nebert, D.W., “P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation.” *Annual Review of Biochemistry*, **56**, (1987) 945–993.
- [6] Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikulev, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitard, E., Beaune, P. “Human cytochromes P450.” *Molecular Aspects of Medicine*, **20/1–2**, (1999) 1–137.
- [7] Okat, Z., Sitokrom P4502D6(CYP2D6) Enziminin Genetik Polimorfizmi İle Primer beyin Tümör İnsidansı arasındaki İlişkinin İncelenmesi., Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, (2009).
- [8] Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeugin, T., Meyer, U. A. “Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of

- individual mutations by expression of chimeric genes” *J Biol Chem.*, **265/28** (1990) 17209–17214.
- [9] Kayaalp, O. İlaçların biyotransformasyonu; Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, **1**, 92–129 (1994).
- [10] Guengerich, F.G., Black , S.D., Wolff ,T., Strobl , Greim , G. H., Ekins ,S., Gonzalez, F.J., Cytochorome P450, (2008).
- [11] Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W., “P450 superfamily:update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclatur” *Pharmacogenetics*, **6/1**, (1996). 1–42.
- [12] Mathews, C.K., Holde, K.E., Biochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Company, (1990), p. 533.
- [13] Omura T., Sato R. “Evidence for Its Hemoprotein Nature” *J. Biol. Chem.*, **239**, (1964) 2370-2378.
- [14] Omura T. In: “Cytochrome P450.” T. Omura., Ishimura , Y., Fuji-Kuriyama, Y., Eds, 2nd. edn., VCH, Weinheim, 1 (1993).
- [15] Pflugmacher , S., Sandermann , H. J., “Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae.” *Plant Physiol.*, , **117**, (1998) 123–128.
- [16] Stryer, L., Biochemistry, Fourth Edition, America, (1996) p.154.
- [17] Bolwell G.P., Bozak K., Zimmerlin A. “Plant cytochrome P450” *Phytochemistry*, **37**, (1994) 1491–1506.

- [18] Soret, J. L., "Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette". *Comptes rendus de Académie des sciences* **97**, (1988) 1269–1270.
- [19] Gorinova, N., Nedkovska, M., Atanassov, A., "Cytochrome P450 Monooxygenases As A Tool For Metabolizing Of Herbicides In Plants." *Biotechnol & Biotechnol Eq.***19**, (2005) 105-115.
- [20] Özerol, E., "Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri." *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **3/3**, (1996) 257–275.
- [21] NC-IUB (Nomenclature of the International Union of Biochemistry) Nomenclature of electron transfer Proteins. Recommendations. *Eur J Biochem.*, **200**, (1989) 599-611.
- [22] Ortiz de Monteliano, P.R., Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In PR. Ortiz de Monteliano (ed.). "Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry". New York, Plenum, (1995) 505-523.
- [23] Hanukoğlu, I., "Electron transfer Proteins of cytochrome P450 systems." *Adv Mol Cell Biol.*, **14**, (1995) 29-55.
- [24] Çaylak, E., "Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar", *Tıp Araştırmaları Dergisi* **9/1**, (2011) 73–83.
- [25] Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., "Enhanced *in vivo* monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome *b5*." *Gene* **125**, (1993) 49–55.
- [26] Klingenberg, M. "Pigments of rat liver microsomes." *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, (1958) 376-386.

- [27] Grafinkel, D. "Studies on pig liver microsomes . Enzymes and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, (1958) 493-509.
- [28] UPAC, Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book") Online corrected version: (2006–) "equivalent entity." (1997).
- [29] International Union of Pure and Applied Chemistry Compendium of Analytical Nomenclature (definitive rules 1997, 3rd. ed.). Oxford: Blackwell Science. ISBN 0–86542–6155, section 6, 3. (1998).
- [30] Torssell, K.B.G., Natural Product Chemistry, Sundén, M., Kristianstads Boktryckeri AB, Sweden, (1997).
- [31] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell V.W., Harper'ın Biyokimyası, Menteş, G., Ersöz, B., Barış Kitap Evi, İstanbul, (1993).
- [32] Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Shimada, T., Guengerich, F.P., "Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5." *J Biol Chem.*, **1/271**, (1996) 27438-44.
- [33] Peterson, J.A., Prough, R.A., Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b5 in cytochrome P-450 catalysis. In: Ortiz de Montellano PR. (ed.). *Cytochrome P-450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Plenum, (1986) p. 89.
- [34] Raunio, H., Pasanen, M., Hakkola, J., Pelkonen, O. Expression of extrahepatic cytochrome P450 in humans. Department of Pharmacology and Toxicology, Finland. (1995).
- [35] Fonne-Pfister R. Ph.D. Thesis, Strasbourg University. (1988).

- [36] Moigin C., Cabanne F., Canivec M., Sealla R., *Plant Sci.*, **66**, (1990) 195.
- [37] Heijne, G., “Signal sequences. The limits of variation.” *J. Mol. Biol.* **184**, (1985) 99–105.
- [38] Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., Mihara, K., Omura, T., “Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, (1992) 16–19.
- [39] Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T. & Adesnik, M. “Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles.” *J. Cell Biol.* **92**, (1982) 1–22.
- [40] Wickner, W. T. & Lodish, H. F. “Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes.” *Science*, **230**, (1985) 400–407.
- [41] Kührevioğlu, İ., Protein Salınımı Ve Optimizasyonu, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- [42] Porter, T. D. & Kasper, C. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, (1985) 973–977.
- [43] Porter, T. D. & Kasper, C. B. “NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins” *Biochemistry* **25**, (1986) 1682–1687.
- [44] Porter, T. D. “An unusual yet strongly conserved flavoprotein reductase in bacteria and mammals” *Trends Biochem. Sci.* **16**, (1991) 154–158.
- [45] Shen, A. L. & Kasper, C. B. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Schenkman, J. B., & Greim, H., eds), Springer-Verlag, Berlin. Vol. 105, pp. 35–59 (1993).

- [46] Shen, A. L., Porter, T. D., Wilson, T. E. & Kasper, C. B. "Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis." *J. Biol. Chem.* **264**, (1989) 7584–7589.
- [47] Sem, D. S. & Kasper, C. B. "Interaction with arginine 597 of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase is a primary source of the uniform binding energy used to discriminate between NADPH and NADH" *Biochemistry*, **32**, (1993) 11548–11558.
- [48] Shen, A. L. & Kasper, C. B. *J. Biol. Chem.* **270**, (1995) 27475–27480.
- [49] Hodgson, A. V. & Strobel, H. W. "Characterization of the FAD binding domain of cytochrome P450 reductase." *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, (1996) 99–106.
- [50] Smith, G. C., Tew, D. G. & Wolf, C. R. "Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, (1994) 8710–8714.
- [51] Black, S. D. & Coon, M. J. "Structural features of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Hydrophobic domain, hydrophilic domain, and connecting region." *J. Biol. Chem.* **257**, (1982) 5929–5938.
- [52] Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. & Kim, J.-J. P. "Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, (1997) 8411–8416.
- [53] Barsukov, I., Modi, S., Lian, L.-Y., Sze, K. H., Paine, M. J. I., Wolf, C. R. & Roberts, G. C. K., "1H, 15N and 13C NMR resonance assignment, secondary structure and global fold of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase." *J. Biomol. NMR* **10**, (1997) 63–75.

- [54] Ostrowski, J., Barber, M. J., Rueger, D. C., Miller, B. E., Siegel, L. M. & Kredich, N. M. "Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase" *J. Biol. Chem.* **264**, (1989) 15796–15808.
- [55] Ruettinger, R. T., Wen, L. P. & Fulco, A. J. "Coding Nucleotide, 5'-Regulatory, and Deduced Amino Acid Sequences of P450BM-3, a Single Peptide Cytochrome P450:NADPH-P450 Reductase from *Bacillus megaterium*" *J. Biol. Chem.* **264**, (1989) 10987–10995.
- [56] Brecht, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R. & Snyder, S. H. "Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase." *Nature*, **351**, (1991) 714–718.
- [57] LeClerq, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H. H. Q., Rommens, J. M., Scherer, S. W., Rosenblatt, D. S. & Gravel, R. A. "Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, (1998) 3059–3064.
- [58] Vermilion, J. L. & Coon, M. J. "Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase". *J. Biol. Chem.* **253**, (1978) 8812–8819.
- [59] Kurzban, G. P. & Strobel, H. W. "Preparation and characterization of FAD -dependent NADPH-cytochrome P-450 reductase." *J. Biol. Chem.* **261**, (1986)7824–7830.
- [60] Narayanasami, R., Horowitz, P.M., Masters, B.S., "Flavin-binding and protein structural integrity studies on NADPHcytochrome P450 reductase

are consistent with the presence of distinct domains.”*Arch Biochem Biophys.*, **316/1**, (1995) 267–74.

- [61] Lederer, F., Ghrir, R., Guiard, B., “Two homologous cytochromes b5 in a single cell.” *Eur J Biochem.*, **132**, (1983) 95–102.
- [62] Abe, K., Kimura, S., Kizawa, R., “Amino acid sequences of cytochrome b5 from human, porcine and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome b5.” *J. Biochem.*, **97**, (1985) 1659–68.
- [63] Giordano, S.J., Steggle, A.W., “Differential expression of the mRNAs for the soluble and membrane-bound forms of rabbit cytochrome b5.” *Biochim Biophys Acta*, **1172**, (1993) 95–100.
- [64] Runnegar, B., “Derivation of the globins from type b cytochromes.” *J Mol Evol.* **21**, (1984) 33–41.
- [65] Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., “Expression of a cytochrome P450 gene family in maize.” *Mol Gen Genet*, **246/1**, (1995) 100–109.
- [66] Cunningham, F.G., MacDonald, P.C., Gant, N.F., *The placental hormones. Williams Obstetrics, Connecticut: Appleton and Lange*, 18th ed, **67**, (1989).
- [67] Yamamoto, Y., Masuda, M., Kazusaka, A., “Purification and characterization of a form of cytochrome P450 from bear liver microsomes.” *Biochem Pharmacol.* **49/7**, (1995) 965–70.
- [68] Stromstedt, M., Waterman, M.R., “A full-length cDNA encoding mouse adrenodoxin.” *Biochim Biophys Acta*, **1261/1**, (1995) 126-8.
- [69] Benet, L.Z., Kroetz, D.L., Sheiner, L.B., *Biotransformation of drugs*, in Hardman, J.G., Limbird, L.L., Molinoff, P.B., Goodman and Gilman's *The*

Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 3–28.
(1996)

- [70] Reichhart, D., Salaün, J.P., Benveniste, I., Durst, F., “Induction by manganese, ethanol, phenobarbital, and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissues” *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, (1979) 301-303.
- [71] Reichhart, D., Salaün, J.P., Benveniste, I., Durst, F., “Time Course of Induction of Cytochrome P-450, NADPH-Cytochrome c Reductase, and Cinnamic Acid Hydroxylase by Phenobarbital, Ethanol, Herbicides, and Manganese in Higher Plant Microsomes.” *Plant Physiol.*, **66**, (1980) 600-604.
- [72] Adélé, P., Reichhart, D., Salaün, J.P., Benveniste, I., Durst, F., *Plant Sci. Lett.*, **22**, (1979) 39-46.
- [73] Benveniste, I., Durst, F., *Acad. Sci., Paris*, , **278D**, (1974) 1487-1490.
- [74] Benveniste I., Salaün J-P., Durst F. *Phytochemistry*, **16**, (1977) 69-73.
- [75] Ayalogu, E.O., Snelling, J., Lewis, D.F., “Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus.” *Biochim Biophys Acta*, **1272/2** (1995) 89- 94.
- [76] Bolwell, G.P., Bozak, K., Zimmerlin, A. *Phytochemistry*, **37**, (1994)1491 – 1506.
- [77] Fonne-Pfister, R., Ph.D. Thesis, Strasbourg University. (1988)
- [78] Moigin, C., Cabanne, F., Canivec, M., Sealla, R., *Plant Sci.*, **66**, (1990) 195.

- [79] Eisen, H.J., Induction of hepatic P-450 isozymes. In: Ortiz de Montellano, P.R., (ed.). *Cytochrome P-450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Plenum, (1986) p.315.
- [80] Benvenist, E.I., Durst, F., "Mise en evidence dans les tissus de tubercule de Topinambour *Helianthus tuberosus* L., var. blanc commun) d'une enzyme a cytochrome P-450 l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase (CAH)." *C R Hebd Seances Acad Sci Ser D Sci Nat.*, **278**, (1974) 1487-1490.
- [81] Porrs, J.R.M., R, Weklych, Conn ,E.E., "The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450." *J Biol Chem*, **249**, (1974) 5019-5026 .
- [82] Hasson, E.P., West, C.A., "Properties of the system for the mixed function oxidation of kaurene and kaurene derivatives in microsomes of the immature seed of *Marah macrocarpus*." *Plant Physiol*, **58**, (1976) 473-484.
- [83] Solida, Y.C.L., Kolattukudy, P.E., "Biosynthesis of cutin. w-hydroxylation of fatty acids by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*." *Plant Physiol*, **59**, (1977) 1116-112.
- [84] Durst, F., "Biochemistry and physiology of plant cy!ochrome P-450." In K Ruckpaul, H Rein, eds, *Frontiers in Biotransformation, Vol4*. Akademie Verlag, Berlin, (1991), 191-232.
- [85] Hall, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **41**, (1999) 95-98
- [86] Heijne, G..Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule. *J.Mol.Biol.*, **225**, (1992) 487-494.

- [87] Kahsay, R.Y., Gao, G., Liao, L., “An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes.” *Oxford Journals*, **21/9**, (2005) 1853-1858.
- [88] Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Heijne, G., Brunak, S., *J.Mol.Biol.*, **340**, (2004) 783-795.
- [89] Quevillion, E., Silventioinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R., “InterProScan: protein domains identifier.” *Nucleic Acids Res*” **33**, (2005) 116–20.
- [90] Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., Brunak, S. “Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation Sites.” *Glycobiology*, **15**, (2005) 153-164.
- [91] Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., “Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.” In preparation, (2004).
- [92] Conesa, A., Götz, S., Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M., “Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics Research.” *Bioinformatics*, **21/18**, (2005).
- [93] Smith, P.J., Zhang, C., Wang, J.Chew, S.L., Zhang, M.Q.and Krainer, A.R., “An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers.” *Hum.Mol.Genet*”, **15/16**, (2006), 2490–2508.
- [94] Rozen, S., Skaletsky, H.J., “Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.” Humana Press, Totowa, NJ, (2000), pp 365–386.