

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIZILÇAM (*Pinus brutia* TEN.) SİTOKROM P450720B (CYP720B) GENİNİN
KLONLANMASI VE KARAKTERİZE EDİLMESİ**

DOKTORA TEZİ
Aslı SEMİZ

Anabilim Dalı: Biyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

TEMMUZ 2012

DOKTORA TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 071741002 nolu öğrencisi Aslı SEMİZ tarafından hazırlanan “**Kızılçam (*Pinus brutia Ten.*) Sitokrom P450720B (CYP720B) Geninin Klonlanması ve Karakterize Edilmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Alaattin ŞEN (PAÜ)



Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Orhan ADALI (ODTÜ)



Jüri Üyesi:

Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN (PAÜ)



Jüri Üyesi:

Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN (PAÜ)




Jüri Üyesi:

Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN (PAÜ)



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
19.07.2012 tarih ve .../33..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

: 

Öğrenci Adı Soyadı : Aslı SEMİZ

ÖNSÖZ

Kızılcıam (*Pinus brutia* Ten.) “Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı Kapsamında” ıslah programına alınmış ağaç türlerinin başında gelmektedir. Orman ağaçlarında verimliliğin artırılması, hızlı gelişen biyotik ve abiyotik etkenlere karşı dirençli genotiplerin bulunması ve ıslahı ile sağlanabilir. Genetik ıslah yoluyla değişik odun zararlısı böceklerle, çeşitli hastalıklara, kuraklığa ya da soğuğa dayanıklılığın artırılması sağlanabilir ve üstün özellikli bireyler elde edilerek bunlar geniş alanlara ekilip dikilebilir.

Bitkilerin böceklerle karşı direnç göstermelerini sağlayan etkenlerden birisi bunların içerdikleri çok çeşitli sekonder metabolitlerdir. Son yıllarda, sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu olan biyosentetik yollarda sitokrom P450’lerin anahtar enzimler oldukları bulunmuştur. Kızılcıamda en önde gelen böcek zararlısı çam kese böceğidir ve bu böcek ile terpenler arasındaki ilişkileri ele alan çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır, ancak bu etkileşimde sitokrom P450 enzimlerinin etkisini ele alan çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda böcek direncinin oluşmasında rol aldığını düşündüğümüz sitokrom P450 enzimlerinden CYP720B geni klonlanarak, rolü moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Arazi çalışmaları, Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü (ORTOHUM) tarafından 1992’de kurulmuş olan bir klonal tohum bahçesinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel aşamaların tamamı Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Gerekli maddi destek Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden (Proje No: 2010FBE023), 109R012 ve 110T976 no’lu TÜBİTAK projelerinden sağlanmıştır.

Doktora tez konumun şekillenmesinde bana destek olan, tüm olumsuzluklara rağmen beni bu konuda cesaretlendiren, bana inanan ve asistanlığa başladığım ilk günden beri akademik duruşu ve etiği bana her fırsatta benimseten ve araştırma laboratuvarının tüm imkanlarını bana sonuna kadar sunan danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN’e, yapıcı eleştiri ve önerileriyle değerli katkılarda bulunan tez jüri üyelerime, arazi çalışmaları ve numune teminindeki özverili çalışmaları ve desteği için eşim Dr. Gürkan SEMİZ’e, zorlu laboratuvar çalışmalarım esnasında benden manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve zor anlarımda yanımda olup bana moral veren sevgili öğrencilerimiz Gurbet ÇELİK, Özden ÖZGÜN ve Tuğba KOÇ’a

teşekkür eder, şükranlarımı sunarım. Bu özverili yolda sabrı için biricik kızım Alya Derin SEMİZ'e, en büyük destekçim ve en zor anlarımın dermanı olan sevgili ailem Bediha ve Mehmet KIRIKBAKAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Temmuz 2012

Aslı SEMİZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1.GİRİŞ	1
1.1. Kızılcım (<i>Pinus brutia</i> Ten.)’ın Biyolojisi ve Taksonomisi.....	1
1.2. Kızılcım (<i>Pinus brutia</i> Ten.)’ın Doğal Yayılışı ve Ekonomik Önemi	1
1.3. Koniferlerin Böceklerle Karşı Savunma Fizyolojisi	2
1.4. Koniferlerdeki Terpenoid Bileşikler ve Biyosentezleri	4
1.5. Sitokrom P450.....	5
1.6. Bitki Sitokrom P450’leri	11
1.6.1. Bitki Sitokrom P450’lerinin Stres Altındaki Rollerini.....	17
1.7. “Gateway” Klonlama Teknolojisi	19
1.8. Çalışma Materyali	20
1.9. Çalışmanın Amacı	21
2. MATERYAL VE METOD.....	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	23
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	24
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kit, Vektör ve Hücreler	25
2.1.4. Primerler.....	25
2.2. Metod	26
2.2.1. RNA İzolasyonu.....	26
2.2.1.1. TRIzol Metodu	26
2.2.1.2. Suzuki ve diğ. (2008) Metodu.....	26
2.2.1.3. Azevedo ve diğ. (2003) Metodu	27
2.2.1.4. Invitrogen PureLink RNA Minikit.....	28
2.2.1.5. Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit.....	28
2.2.2. RNA’ların Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi	29
2.2.3. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	29
2.2.4. PZR Ürününün Jel’den İzolasyonu	30
2.2.5. TOPO® Klonlama Reaksiyonu.....	31
2.2.5.1. One Shot® Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu.....	32
2.2.5.2. PZR ile Pozitif Klonların Analizi.....	32
2.2.5.3. Plazmid İzolasyonu	32
2.2.6. Sekans Analizi.....	33
2.2.7. Biyoinformatik Analizler	33
2.2.7.1. Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması	33
2.2.7.2. Sinyal Peptid Analizi.....	33
2.2.7.3. Demir Bağlama Domaininin Tespiti	34
2.2.7.3. Transmembran Segment Analizi.....	34
2.2.7.4. Glikolizasyon Bölgelerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.5. Fosforilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.6. Metilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.7. İkincil Yapı Analizi.....	34
2.2.8. <i>E. coli</i> Ekspresyon Sistemi.....	34

2.2.8.1. LR Rekombinasyon Reaksiyonu.....	35
2.2.8.2. DH5 α Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu.....	35
2.2.8.3. PZR ile Pozitif Klonların Analizi.....	36
2.2.8.4. Plazmid İzolasyonu.....	36
2.2.8.5. BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan <i>E. coli</i> Hücelere Transformasyon.....	36
2.2.9. Protein Ekspresyonu.....	37
2.2.10. Örneklerin Parçalanması.....	37
2.2.11. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAJE).....	38
2.2.11.1. Stok Çözeltiler.....	38
2.2.11.2. Jelin Hazırlanması.....	39
2.2.11.3. Örneklerin Hazırlanması.....	40
2.2.11.4. Örneklerin Yüklenmesi.....	40
2.2.11.5. Elektroforetik Ayırıştırma.....	41
2.2.12. Maya Ekspresyon Sistemi.....	41
2.2.12.1. LR Rekombinasyon Reaksiyonu.....	41
2.2.12.2. DH5 α Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu.....	42
2.2.12.3. PZR ile Pozitif Klonların Analizi.....	42
2.2.12.4. Plazmid İzolasyonu.....	43
2.2.12.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'ye Transformasyon.....	43
2.2.13. Protein Ekspresyonu.....	44
2.2.14. Örneklerin Parçalanması.....	44
2.2.15. Western Blot.....	45
2.2.15.1. Stok Çözeltiler.....	45
2.2.15.2. Elektrotransfer.....	46
2.2.15.3. Proteinlerin İmmünolojik Tespiti.....	46
2.2.16. Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması.....	47
2.2.16.1. Stok Çözeltiler.....	47
2.2.16.2. Prosedür.....	48
2.2.17. Örneklerin Bişinkonik Asit (BCA) ile Protein Tayini.....	49
2.2.17.1. Reaktifler.....	49
2.2.17.2. Prosedür.....	49
2.2.18. Sitokrom P450 Tespiti.....	50
2.2.18.1. Stok Çözeltiler.....	50
2.2.18.2. Prosedür.....	50
3.BULGULAR.....	51
3.1. <i>Pinus brutia</i> 'dan RNA İzolasyonları.....	51
3.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	53
3.3. One Shot® Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	54
3.4. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	56
3.5. Sekans Analizi.....	57
3.6. Biyoinformatik Analizler.....	58
3.6.1. Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması.....	58
3.6.2. Sinyal Peptid Analizi.....	59
3.6.3. Demir Bağlama Domainin Tespiti.....	59
3.6.4. Transmembran Segment Analizi.....	60
3.6.5. Glikolizasyon Bölgelerinin Belirlenmesi.....	61
3.6.6. Fosforilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi.....	62
3.6.7. Metilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi.....	63

3.6.8. İkincil Yapı Analizi.....	63
3.7. LR Rekombinasyonu Sonrası DH5 α Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu ve PZR ile Kontrolü.....	64
3.8. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	64
3.9. BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan <i>E. coli</i> Hücrelere Transformasyon ve PZR ile Pozitif Klonların Kontrolü.....	65
3.10. Protein Ekspresyonu	66
3.11. LR Rekombinasyonu Sonrası DH5 α Kimyasal <i>E. coli</i> Transformasyonu ve PZR ile Kontrolü.....	67
3.12. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	68
3.13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'ye Transformasyon ve Protein Ekspresyonu	69
3.14. Proteinlerin İmmünojenik Tespiti.....	70
3.15. Mikrozomal Fraksiyonların BCA ile Protein Tayini	71
3.16. Sitokrom P450 Tespiti.....	72
4.TARTIŞMA	74
5. SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR	79
EKLER.....	94
EK-1: pCR8/GW/TOPO® vektör dizisi.	94
EK-2: pDEST™14 vektörün haritası.	94
EK-3: pYES-DEST52 vektörün haritası.	95
ÖZGEÇMİŞ.....	96

KISALTMALAR

A (Ala)	: Alanin
ALP	: Alkali fosfataz
AJE	: Agaroz jel elektroforezi
APS	: Amonyum persülfat
attB	: Bakteri ile birleşen
attL	: Solda birleşen
attP	: Fajla birleşen
attR	: Sağda birleşen
bç	: Baz çifti
BCA	: Bişinkoninik asit
BCIP	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
BSA	: Sığır serum albumin
C (Cys)	: Sistein
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
cDNA	: Komplementer DNA
cm	: Santimetre
CO	: Karbon monoksit
CPR	: Sitokrom P450 redüktaz
CTAB	: Setil trimetil amonyum bromür
CYP450	: Sitokrom P450
CYP720B	: Sitokrom P450720B
D (Asp)	: Aspartik asit
Da	: Dalton
dk	: Dakika
DTT	: Dithiothreitol
DEA	: Dietanolamin
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DMAPP	: Dimetilallil pirofosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DRA	: Diterpen reçine asit
°	: Derece
E (Glu)	: Glutamik asit
ε-ACA	: Epsilon-amino kaproik asit
EC	: Enzim komisyonu numarası
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
EtBr	: Etidyum bromür
F (Phe)	: Fenilalanin
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
FPP	: Farnesil difosfat

G (Gly)	: Glisin
GKT	: Gateway klonlama teknolojisi
gr	: Gram
GW	: Gateway
GPP	: Geranil difosfat
GGPP	: Geranil geranil difosfat
H (His)	: Histidin
ha	: Hektar alan
HCl	: Hidroklorik asit
I (Ile)	: İzolösin
IgG	: İmmünglobulin
IPP	: İzopentil pirofosfat
K (Lys)	: Lizin
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
KH ₂ PO ₄	: Potasyum monofosfat
L (Leu)	: Lösin
LB	: Luria-Bertani
lt	: Litre
LiAlH ₄	: Lityum alüminyum hidrür
LiCl	: Lityum klorür
M (Met)	: Metiyonin
MeJA	: Metil jasmonat
MEP	: 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfat
m	: Metre
M	: Molar
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mA	: Miliamper
MES	: 2-(N-morfolino)etansülfonik asit
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
N (Asn)	: Asparajin
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
OD	: Optik yoğunluk
°C	: Santigrat derece
P (Pro)	: Prolin
PAJE	: Poliakrilamit jel elektroforezi

PbAO	: <i>Pinus brutia</i> abietadienal oksidaz
pH	: Asitlik derecesi
PMS	: Fenazin metasülfat
PMSF	: Fenil metan sülfonil florid
PtAO	: <i>Pinus taeda</i> abietadienal oksidaz
PVP	: Polivinilpirolidon
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Q (Gln)	: Glutamin
R (Arg)	: Arjinin
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki dönüş
S (Ser)	: Serin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
sn	: Saniye
S.O.C.	: Süper optimal besiyeri (glikozlu)
T (Thr)	: Treonin
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: N-N'-N'-N'-Tetrametiletildiamin
TPS	: Terpen sentaz
Tween 20	: Polietilen sorbitan monolaurat
UV	: Ultraviole
U	: Ünite
V (Val)	: Valin
Y (Tyr)	: Tirozin
YPD	: Maya ekstrakt pepton dekstroz
ZnCl ₂	: Çinko klorür
xg	: Santrifüj hızı (yerçekimi)
%	: Yüzde
W (trp)	: Triptofan
Wa	: Watt

TABLO LİSTESİ

Tablolar

1.1 : Bilinen koruyucu bitki sekonder metabolitleri.....	3
2.1 : CYP720B primerleri.....	26
2.2 : CYP720B PZR karışımı.....	30
2.3 : CYP720B PZR koşulları.....	30
2.4 : TOPO klonlama reaksiyonu.....	31
2.5 : GW primerleri.....	33
2.6 : LR rekombinasyon reaksiyon karışımı.....	35
2.7 : Parçalama tamponunun içeriği	38
2.8 : 4X numune sulandırma tamponunun içeriği.....	39
2.9 : SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.....	39
2.10 : LR rekombinasyon reaksiyon karışımı.....	41
2.11 : SDS-örnek tamponunun içeriği.....	45
2.12 : Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tespiti için substrat çözeltisi hazırlama.....	47
2.13 : BCA reaksiyon karışımı.....	49
3.1 : <i>Pinus brutia</i> CYP720B (PbAO) geni nükleotid dizisi.....	58
3.2 : <i>Pinus brutia</i> CYP720B (PbAO) enzimi amino asit dizisi.....	60
3.3: Mikrozomal fraksiyonların protein miktarları.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

1.1 : İzopren birimi ve bazı terpenoid bileşiklerin kimyasal yapıları.....	5
1.2 : Terpen sentezinin ana yolları.....	5
1.3 : Bir P450 proteinin adlandırılması.....	6
1.4 : Hem protein yapısı.....	8
1.5 : Dört farklı P450'nin kurdele yapısındaki ortak benzerlik.....	8
1.6 : Endoplazmik retikulum (mikrozomal) CYP450 sistem elemanları.....	9
1.7 : Sitokrom P450 reaksiyon döngüsü	11
1.8 : Bitki P450 geninin genel yapısı	12
1.9 : Bitkilerde A tipi ve A tipi olmayan klanlar.....	13
1.10 : <i>Pinus taeda</i> abietadienol oksidaz (PtAO)'ın diterpen reçine asit sentez basamakları.....	18
1.11 : Gateway klonlamada BP ve LR reaksiyonu.....	20
1.12 : Çalışmanın yapılacağı kızılçam tohum bahçesinin kurulduğu alan (Çığlık) ve tohumun getirildiği orijin (Eskibağ).....	21
2.1 : PCR®8/GW/TOPO vektör.....	31
2.2 : pDEST™14 hedef vektör.....	35
2.3 : pYES-DEST52™ hedef vektör.....	42
3.1 : <i>Pinus brutia</i> RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
3.2 : <i>Pinus brutia</i> RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
3.3 : <i>Pinus brutia</i> RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
3.4 : <i>Pinus brutia</i> RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	53
3.5 : <i>Pinus brutia</i> RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	53
3.6 : TRIzol metodu, Suzuki ve diğ. (2008) metodu, Azevedo ve diğ. (2003) metodu ve Invitrogen PureLink RNA Minikit ile elde edilen RNA'lerden <i>Pinus brutia</i> CYP720B gen bölgesi RT-PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	54
3.7 : Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile elde edilen RNA'lerden <i>Pinus brutia</i> CYP720B gen bölgesi RT-PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	54
3.8 : TOP10 <i>E. coli</i> kompetan hücrelere plazmid aktarımı sonucu gelişen kolonilerin görüntüsü.....	55
3.9 : TOP10 <i>E. coli</i> kompetan hücrelere plazmid aktarımı sonucu pozitif koloni taraması.....	55
3.10 : PZR kontrol ürün agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	56
3.11 : Plazmid izolasyonu ve PZR kontrol ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	57
3.12 : <i>Pinus brutia</i> CYP720B geninin amino asit kompozisyonu.....	59
3.13 : "Sinyal P" programında sinyal peptid analizi	61
3.14 : CYP720B'nin transmembran analizi	61
3.15 : "NetNGlyc" programında N-glikolizasyon bölgelerinin tespiti.....	62
3.16 : "NetPhos 2.0" programında fosforilasyon bölgelerinin tespiti.....	62
3.17 : "MASA" programında metilasyon bölgelerinin tespiti.....	63
3.18 : "NPS SOPMA" programında ikincil yapı analizi.....	63

3.19	: DH5 α hücelere transforme edilen pDEST TM 14 hedef vektör kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	64
3.20	: LR rekombinasyon sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün farklı kolonilerden elde edilen plazmid DNA ve kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	65
3.21	: BL21-AI hücelerine transforme edilen CYP720B gen bölgesini içeren ekspresyon vektörü kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	66
3.22	: BL21-AI hücelerinde ifade edilmiş protein profillerinin SDS-PAJE görüntüsü.....	67
3.23	: DH5 α kimyasal <i>E. coli</i> hücelerine plazmid aktarımı sonucu gelişen kolonilerin görüntüsü.....	68
3.24	: DH5 α hücelere transforme edilen pYES-DEST52 hedef vektör kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	68
3.25	: LR rekombinasyon sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün farklı kolonilerden elde edilen plazmid DNA ve kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	69
3.26	: Transforme <i>S. cerevisiae</i> hücelerinin gelişim görüntüsü.....	70
3.27	: <i>S. cerevisiae</i> hücelerinde ifade edilmiş protein profillerinin SDS-PAJE görüntüsü.....	70
3.28	: <i>S. cerevisiae</i> hücelerinde ifade edilmiş protein profillerinin Western-Blot görüntüsü.....	71
3.29	: Standart BSA eğrisi	72
3.30	: CYP720B içeren maya mikrozomlarının indirgenmiş CO-fark spektrumu	73

ÖZET

KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) SİTOKROM P450720B (CYP720B) GENİNİN KLONLANMASI VE KARAKTERİZE EDİLMESİ

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), ekonomik ve ekolojik bakımlardan Türkiye'nin önde gelen yerli orman ağaçlarından. Ağaçlandırma alanlarında karşılaşılan en büyük sorun böcek istilasıdır. Bu çalışmada Antalya ili Çıglık beldesinden toplanan ibre örneklerinden Bitki RNA İzolasyon Mini Kit ile elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi RevertAid Revers Transkriptaz kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lardan Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Toksikoloji ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarımızda *Pinus taeda* CYP720B mRNA nükleotid dizisinden yola çıkarak sentezlettirilen primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi ve elde edilen sitokrom P450720B (CYP720B) geni pCR8/GW/TOPO klonlama vektörüne transfer edilerek rekombinant vektörler oluşturuldu ve TOP10 kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Sekans analizi sonucunda *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) geninin 1464 nükleotid ve 487 amino asit içerdiği ve *Pinus taeda* CYP720B (PtAO) geni ile %99 benzerlik gösterdiği bulundu. CYP720B gen bölgesi LR Klonaz enzimi kullanılarak pYES-DEST 52 maya ekspresyon vektörü'ne aktarıldı. *Pinus brutia* CYP720B'nin *Saccharomyces cerevisiae* transformantlarında ekspresyonu galaktoz ile indüklendi. 48 saat galaktoz indüklenmesi sonucunda western blot analizinde rekombinant CYP720B protein ekspresyonu gösterildi. Transformant *Saccharomyces cerevisiae*'da galaktoz indüklenmesi sonucunda elde edilen mikrozomal fraksiyonlarda CO-bağlı CYP720B'nin absorbans spektrumuna bakıldı ve maksimum 450 nm'de karakteristik pik yapan indirgenmiş CO-fark spektrumu elde edildi. Ayrıca çeşitli biyoinformatik analizler ile de gen hakkında detaylı bilgi edinildi.

Anahtar Kelimeler: Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), CYP720B, Ekspresyon, Klonlama, Maya (*Saccharomyces cerevisiae*).

ABSTRACT

CLONING AND CHARACTERIZATION OF CYTOCHROME P450720B (CYP720B) FROM TURKISH RED PINE (*Pinus brutia* Ten.)

Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) is a prominent native forest tree species in Turkey, due to both its economic and ecological assets. One of the problems faced in afforestation sites is the attacks by insect. The material of this study is collected from a clonal seed orchard near Ciglik, Antalya. RNAs were isolated from needles using Plant RNA Isolation Mini Kit and then cDNA was synthesized using RevertAid Reverse Transcriptase. Polymerase chain reaction was performed using gene specific degenerative primers which had been designed based on the *Pinus taeda* CYP720B mRNA nucleotide sequence and all the experimental and practical procedures are being carried out in Pamukkale University, Department of Biology, Molecular Toxicology and Biochemistry Laboratory. PCR product of *Pinus brutia* CYP720B gene was cloned into the pCR8/GW/TOPO cloning vector and transformed into TOP10 competent *E.coli* cells. After sequence analysis, *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) gene was found to be 1,464 nucleotide long, coding 487 amino acids and shared 99% similarity with *Pinus taeda* CYP720B (PtAO) gene. PbAO was also transferred to a yeast expression vector pYES-DEST52 with the use of LR Clonase enzyme. Expression of *Pinus brutia* CYP720B in *Saccharomyces cerevisiae* transformants was induced by galactose. After 48 hour of galactose induction recombinant CYP720B protein expression was identified by western blot analysis. Furthermore, CYP720B exhibited a characteristic reduced CO-difference spectrum at 450 nm. Also, detailed gene information was obtained through bioinformatic analysis.

Key Words: Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.), CYP720B, Protein expression, Cloning, Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

1.GİRİŞ

1.1. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'ın Biyolojisi ve Taksonomisi

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Gymnosperm divizyonu, Coniferae sınıfı, Pinaceae familyası, Pinus cinsi içinde yer alan ve üç adet varyeteye sahip (*P. brutia* var. *pyramidalis* Selik, *P. brutia* var. *agrophiotii* Papaj ve *P. brutia* var. *densifolia* Yaltırık ve Boydak) bir türdür (Yaltırık ve Boydak, 1993; Ansin ve Özkan, 1997).

Kızılçam, kalın ve genellikle koyu kırmızı renkteki genç sürgünlerinden dolayı bu adı alır. İbrelere 12 - 18 cm uzunluğunda ve koyu yeşildir. Çiçekler Mart - Mayıs ayları arasında görülür. Kozalakları helezon şeklinde ve genellikle sesildir. Tohumlar 7 - 9 cm uzunluğunda, koyu benekli. Tohumları 7 - 10 yaşları arasında üretmeye başlar (Davis, 1965; Panetsos, 1981; Kandemir, 2002). Yaklaşık olarak 20 m'ye kadar boylanabilir.

1.2. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'ın Doğal Yayılışı ve Ekonomik Önemi

Kızılçam, Akdeniz ikliminin etkili olduğu alanlar olan Filistin, Ürdün, Suriye, Irak, Lübnan, Kıbrıs, Türkiye, Yunanistan ve İtalya'da yayılış göstermektedir. Dünya'daki en geniş yayılışı Türkiye'dedir. Türkiye'de Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinin özellikle denize bakan yamaçlarında geniş alanlarda yayılış göstermektedir. Ayrıca Karadeniz sahilleri boyunca (örneğin Sinop Çamgözü yöresinde) küçük adacıklar halinde bulunmaktadır. Genellikle sahil kesimlerinde yayılış göstermesine rağmen 1300 m yükseltilere kadar ulaşan Kızılçam, ışığı seven hızlı büyüyen bir çam türüdür. Türkiye'deki bu yayılışı içerisinde, Akdeniz kıyı bölgeleri Kızılçam'ın en iyi gelişim yaptığı alanlardır (Saatcioglu, 1976; Yaltırık, 1993; Ansin ve Özkan, 1997; Neyişçi, 2001).

Yerli orman ağacı türlerimiz arasında Kızılçam hem ekonomik hem de ekolojik açıdan önemli bir orman ağacı türüdür. Ülkemizde yaklaşık 4,2 milyon hektar yayılışa sahip olan Kızılçam, orman alanlarımızın %20'sini kaplamaktadır (Anonim 2001) ve ağaçlandırma çalışmalarında kullanım açısından birinci sırada

gelmektedir. Odunu; inşaat malzemesi, ambalaj, selüloz ve kağıt endüstrisi gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır. Diğer yerli türlere göre daha hızlı büyür. Bu nedenle, Türkiye’de genetik ıslah yönünden hem Ulusal Ağaç-İslahı ve Tohum Üretimi Programı’nda, hem de Türkiye Bitki Genetik Çeşitliliğinin Yerinde Korunması Ulusal Planı’nda ön sırada yer almaktadır (Koski ve Antola, 1994; Kaya ve diğ. 1998).

1.3. Koniferlerin Böceklerle Karşı Savunma Fizyolojisi

Yaklaşık olarak 600 tür barındıran Coniferales ordosu yeryüzünün %80’nini kaplamaktadır (Scagel, 1965). Koniferler yeryüzünün en uzun boylu ve en uzun ömürlü organizmalarıdır. Uzun fiziksel yapıları ve uzun ömürleri potansiyel herbivorlar ve patojenler için onları belirgin hedef haline getirmektedir (Christiansen ve Bakke, 1988; Kurz ve diğ. 2008). Böcekler yaklaşık 400 milyon yıldan beri varlığını sürdürmekte (Engel ve Grimaldi, 2004) ve fosil kayıtlarına göre de yaklaşık 220 milyon yıldır koniferleri konakçı canlı olarak kullanmaktadır (Scott ve diğ. 2004). Doğal düşmanları yaprak zararlıları (Schopf, 1986), kök zararlıları (Nordlander, 1990), nematodlar (Futai ve Furano, 1979), kabuk zararlıları (Alfaro ve diğ. 2002), memeli ve kuş herbivorlardır (Danell ve diğ. 1990).

Bitkiler, hareketsiz organizmalar olduklarından çeşitli fiziksel bariyerlere sahip olarak ya da böcek ve herbivorlar için toksik olan kimyasalları üreterek kendilerini korur ve hayatta kalırlar (Tablo 1.1). Bu bileşikler, gerek bitkinin toprak üstü, gerekse toprak altı organlarından salgılanmakta ve herhangi bir stres (abiyotik veya biyotik) anında çok çabuk indüklenmektedir (Dudareva ve diğ. 2006). Koniferlerin herbivora ve patojenlere karşı başarılı savunma ve dirençleri, savunma kimyasalları olarak bilinen terpenlerin oluşumu ile açıklanabilir (Keeling ve Bohlmann, 2006). Terpenoid bileşikler, ergin ve larva halindeki böcek türlerine karşı toksik olma (Watanebe ve diğ. 1993; Lee ve diğ. 2003), beslenme ve/veya ovipozisyonu engelleme (Alfaro ve diğ. 1980, 1981; Charles ve diğ. 1982; Brattesten, 1983; Leather, 1987; Karr ve Coats, 1992; Sczcepanik ve diğ. 2005), öldürme (Keeling ve Bohlmann, 2006) ya da bitki patojenlerinin büyüme faaliyetlerini engelleme ya da azaltma gibi değişik görevler üstlenebilmektedir (Chou ve Zabkiewicz, 1976).

Tablo 1.1 : Bilinen koruyucu bitki sekonder metabolitleri.

ADI	ETKİLERİ	REFERANS
Alkanlar, aldehitler, ketonlar, balmumları	Koruyucu tabaka	Panda ve Khush, 1995
Alkaloidler	Toksikant, sinir sistemi bozucu, sindirim enzim inhibitörü, beslenme engelleyici	Panda ve Khush, 1995
Flavonoidler	Mitokondriyal oksidasyon inhibitörü, beslenme engelleyici, fitoaleksinler	Ananthakrishnan, 1999
Fenolikler	Toksikant	Nishida, 2002
Glukosinolatlar	Böcek uzaklaştırıcı, toksikant, irrite edici	Kliebenstein ve diğ. 2001
Lignin ve taninler	Mekanik bariyer	de Bruxelles ve Roberts, 2001
Terpenler	Toksikant, beslenme caydırıcı, yumurtlama caydırıcı	Nishida, 2002

Bazı bitkiler ise içerdikleri terpen ve türevi bileşikleri kendi tozlaştırıcılarını cezb etme amaçlı (Pichersky ve Gershenzon, 2002; Caissard ve diğ. 2004) ya da ortamda maruz kaldıkları herbivorun doğal düşmanını davet etme amaçlı kullanabilmektedir. Bunlar dolaylı savunma olarak adlandırılmaktadır (Hilker ve diğ. 2002; Arimura ve diğ. 2005).

Koniferler çok büyük miktarlarda terpen ve benzeri madde üretebilmekte ve bu üretilen bileşiklerin miktarı aynı türün bireyleri arasında bile çok büyük varyasyonlar gösterebilmektedir (Tobolski ve Hanover, 1971). Douglas göknarı üzerine yapılan bir çalışmada, göknarın içerdiği monoterpen seviyesinin türün bireyleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği ve bu farklılıkların ağaçların sürgün zararlısına karşı gösterdikleri direncin seviyesinde de farklılıklar yarattığı görülmüştür (Cates ve Redak, 1998). Aynı ağaç üzerinde terpenlerin lokal farklılıkları herbivorların ağaç üzerinde spesifik lokasyonlarını da etkilemektedir. Lokal terpen içeriği aynı zamanda beslenme alışkanlığını da etkilemektedir. Terpenlerin caydırıcı aktiviteleri hakkında çarpıcı bir örnek, kaplan güvesi larvalarında görülmüştür. Bu güvenin larvaları beslenmeye *Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws. ibrelerinin ucundan başlar ve ibrenin yarısını yedikten sonra başka ibreye geçer. Yapılan bu çalışmada monoterpen türü bileşiklerin miktarının ibrelerin

tabanında en yüksek miktarlara ulaştığı ve bunun da beslenmeyi engelleyici bir etki yaptığı bulunmuştur (Litvak ve Monson, 1998).

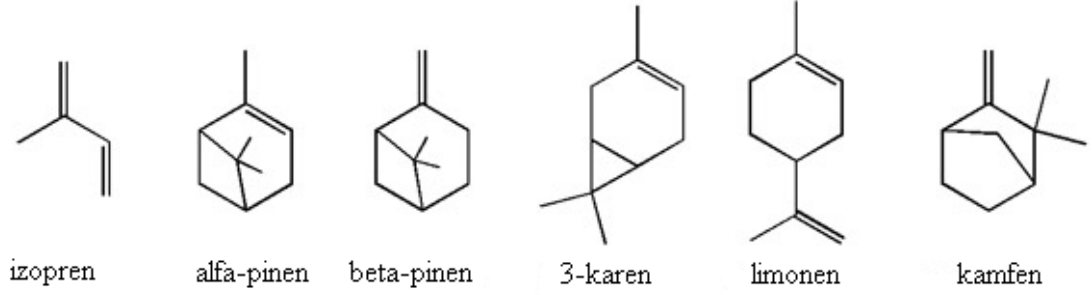
Bir herbivor saldırısı sırasında sekonder metabolitlerin oluşumunun sağlanması için bitki tarafından ilgili genlerin ekspresyonunun hemen başlatıldığı da bulunmuştur. Yapılan çalışmada beyaz çam kurdu bireyleri *Picea sitchensis* ve *Abies concolor* dalları üzerine bırakıldıktan bir süre sonra ibrelerde iki kat daha fazla monotermen sentaz gen ekspresyonuna rastlanılmıştır (McKay ve diğ. 2003). Yapılan bu tarz çalışmalarla mekanizmaları aynı olmasa bile böcek saldırısı karşısında terpen miktarlarının ve çeşitlerinin kolaylıkla tetiklenebildiği gösterilmiştir.

1.4. Koniferlerdeki Terpenoid Bileşikler ve Biyosentezleri

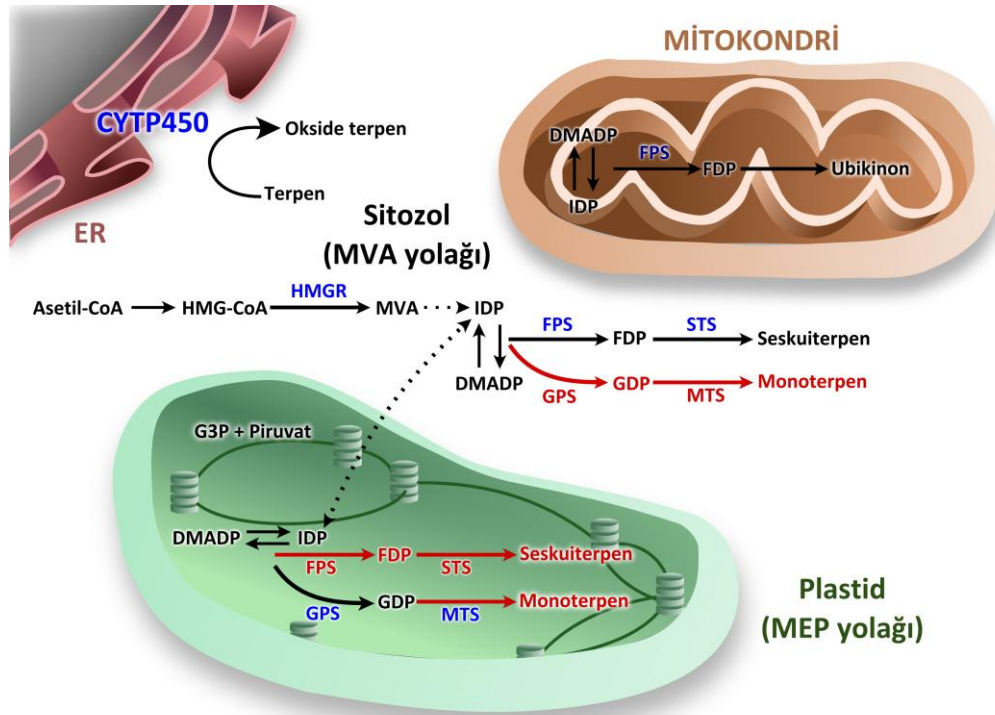
Terpen kelimesi, Almanca *terpentin* kelimesinden gelmektedir. Çamların reçinesi olarak da anılan terpentin, çok akışkan ve keskin kokulu bir maddedir (Breitmaier, 2006). Tüm organizmalar, terpen ve benzeri türevdeki maddeleri bünyelerinde barındırmaktadırlar. Ancak bitkiler, özellikle ağaçlar bu bileşikleri en fazla bulduran canlılardır. Terpenler salgı epitelyum hücreleri tarafından salgılanıp, parankima hücreleri, reçine kanalları ile ksilem ve floemdeki reçine hücreleri içinde depolanmaktadır (Hudgins ve Francesci, 2004). Koniferler indüklenabilir bir terpen salgılama sistemine sahiptir. Bu sistem, yaralı dokunun iyileştirilmesi yanında (Philips ve Croteau, 1999), yaranın oluştuğu yerde yeni reçine kanallarının oluşmasına yardımcı olmaktadır (Trap ve Croteau, 2001).

Terpenler, izopren (2-metil-1,3-butadien) halkalarının birleşmesi ile meydana gelmektedir (Şekil 1.1). Bir izopren birimi 5, monotermenler 10, seskiterpenler 15, diterpenler ise 20 karbon atomu içermektedir. Terpenler, iki farklı metabolik yolla sentezlenirler. İlki, sitozol ya da endoplazmik retikulum içinde seskiterpenlerin sentezlendiği mevalonat yolu (Chappell, 1995; Bochar ve diğ. 1999), diğeri ise plastidlerin içerisinde monotermenler ve diterpenlerin sentezlendiği metil eritrol (2-C-metil-D-eritrol-4-fosfat, MEP) yoludur (Bochar ve diğ. 1999) (Şekil 1.2). Bütün terpenler terpen sentazlar (TPS) tarafından sentezlenir (Chappell, 1995; Fäldt ve diğ. 2003; Martin ve diğ. 2004; Keeling ve Bohlmann 2006; Ro ve diğ. 2006; Bohlmann ve Keeling, 2008) ve ortak substratları olan izopentil pirofosfat (IPP) ve onun izomeri dimetilallil pirofosfat (DMAPP)'tan türevlenirler. Bu substratlar daha sonra monotermenlerin (geranil difosfat, GPP), seskiterpenlerin (farnesil difosfat, FPP) ve

diterpenlerin (geranil geranil difosfat, GGPP) öncüllerini oluşturmak için yoğunlaşırlar. Konifer terpenoidleri (özellikle diterpenler) sitokrom P450 enzimlerinin aracılığıyla oksidasyon - hidroksilasyon mekanizmaları ile çeşitlenmektedir (Funk ve Croteau, 1994; Bohlmann ve diğ. 1998a; Jennewein ve diğ. 2004; Ro ve diğ. 2005).



Şekil 1.1 : İzopren birimi ve bazı terpenoid bileşiklerin kimyasal yapıları.



Şekil 1.2 : Terpen sentezinin ana yolları.

1.5. Sitokrom P450

Sitokrom P450'ler [E.C.1.14.14.1] bakterilerden insana kadar tüm organizmalarda bulunan, çeşitli biyosentetik ve ksenobiyotik yollarında rol alan hemtiyolat enzimlerdir (Nelson, 2009). Katalizledikleri reaksiyonlar son derece çeşitlidir,

ancak genellikle moleküler oksijenin birinin substrata katıldığı, diğerinin suya indirgendiği heterolitik yıkıma dayanır (Mansuy, 1998; Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000; Bernhardt, 2006). Bunlar monooksijenazlar olarak tanımlanırlar.

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki gibidir:



İndirgenmiş P450 oksijen yerine karbon monoksit (CO) bağlanabilir. CO bağlanması hem'in 450 nm'de maksimum absorbanı vermesi ile sonuçlanır (Omura ve Sato, 1964) ve böylece 450 nm'de absorblama yapan **Pigment** adına öncülük eder (Bak ve diğ. 2011). Bu özellik P450 enzimleri için karakteristiktir ve CO ne zaman yüksek affinite ile bağlanırsa, bu durum O₂'nin bağlanmasını ve aktivasyonunu engeller.

Bakteriyel P450'ler çözümlü proteinlerdir, fakat yüksek organizmalarda membran bağlıdır, özellikle bitkilerde endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyine sıkıca bağlanmıştır (Williams ve diğ. 2000).

Sitokrom P450'lerin çok fazla izoziminin bulunması ve birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir (Nebert ve diğ. 1987). Bu genel sistem filogeni ve protein dizi benzerliğine dayanır (Şekil 1.3, Nelson, 2006a). Aynı ailedeki P450'ler en az %40 benzerlik gösterirken, bir altailede bu benzerlik en az %55'dir. Bu benzerlik kuralı birkaç istisnaya sahiptir. Özellikle bitkilerde gen duplikasyonu gibi olaylar bu kolay isimlendirmeyi karmaşık bir hale getirmektedir. Bu nedenle aile tanımlaması filogeni ve gen organizasyonuna dayanır (Nelson ve Werck-Reichhart, 2011). P450'ler bir isimlendirme komitesi (David Nelson: dnelson@uthsc.edu) tarafından kronolojik sıraya göre isimlendirilirler. Böylece kişisel isimlendirmelerin doğuracağı karışıklıklar ve çift isimlendirmelerden kurtulmuş olur. Bitki P450'lerinin isimlendirilmesinde CYP51, 55, 71-99 ve 701-804 kullanılır (Werck-Reichhart ve diğ. 2002).

CYP71A1

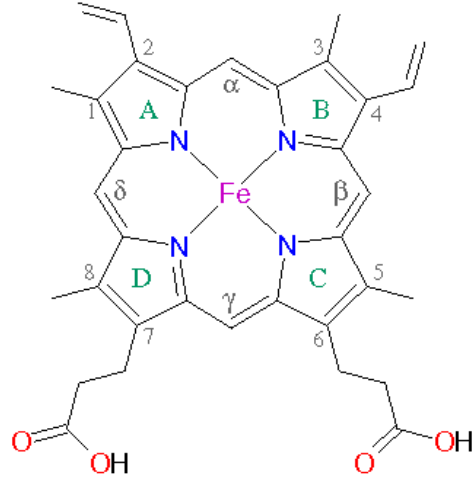


Aile Altaile İzofom

Şekil 1.3 : Bir P450 proteininin adlandırılması (Werck-Reichhart ve diğ. 2002).

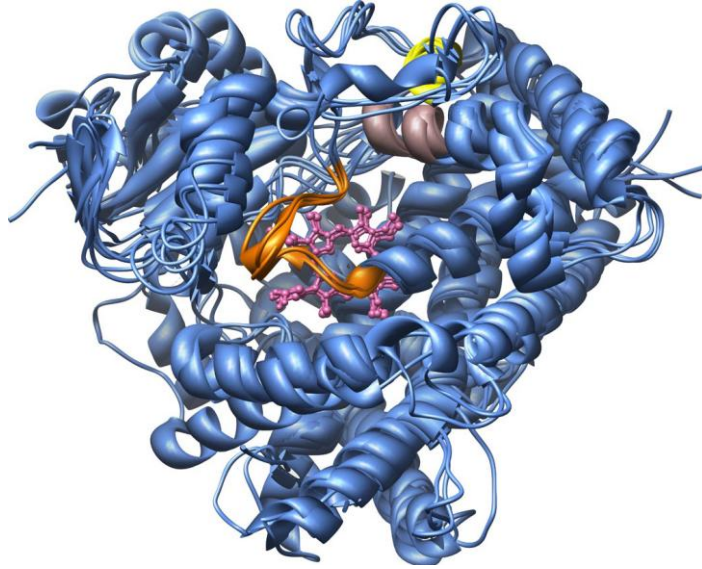
Sitokrom P450'ler genellikle 500 civarında amino asit içeren, 45-60 kDa moleküler ağırlığında, aktif merkezinde demir atomu barındıran bir porfirin halkası bulunduran hem proteinleridir. Porfirin halkası yüksek oranda korunmuşluk gösteren amino asitleri barındıran demir bağlama domaini ile ilişkilidir. 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 (Gorinova ve diğ. 2005).

P450'ler ortak bir katalitik merkez paylaşırlar. Aktif bölgesi tek bir demir iyonu olan protoporfirin IX (hem) prostetik grubunu içerir (Şekil 1.4). Bu grup hem bir oksijen molekülünün hem de substratın bağlanabileceği bölgeleri içerir. Sitokrom P450'nin hem demiri 4 pirok azot atomuyla çevrilidir (Ortiz de Monteliano, 1995). Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, korunmuş sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'nin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand su molekülü tarafından bağlanmış olan substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda O₂'ne bağlanmaktadır. 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. Sitokrom P450 molekülü bir substrata bağlandığı zaman hem demirini çevreleyen protein yapısında konformasyonel bir değişim meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşimine geçer (Ortiz de Monteliano, 1995). 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 (Ortiz de Monteliano, 1995).



Şekil 1.4 : Hem protein yapısı.

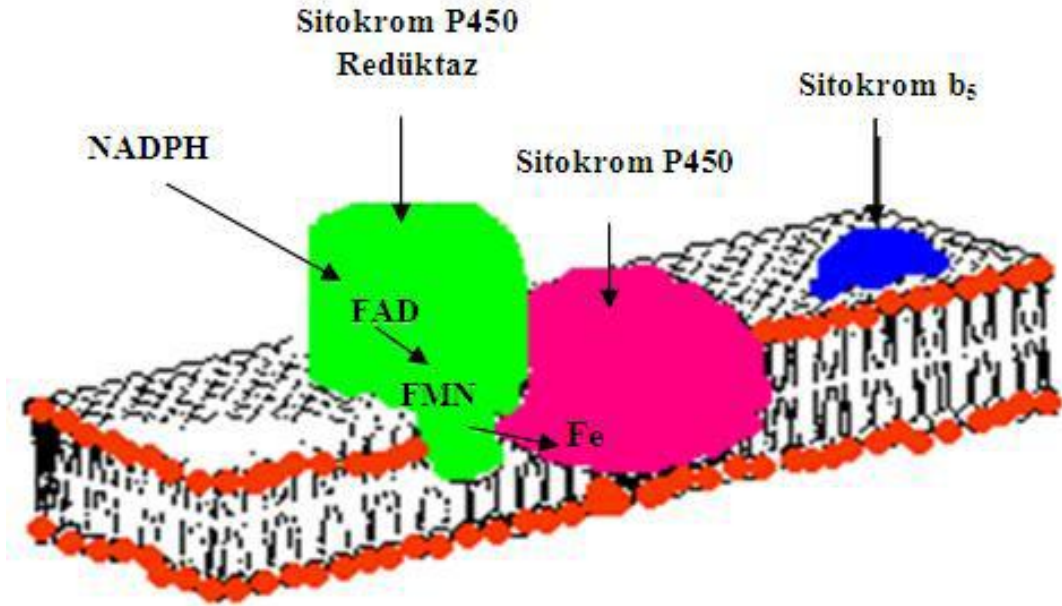
Amino asit seviyesinde düşük dizi benzerliğine rağmen, P450'ler topolojide ve üç boyutlu yapıda oldukça benzerlik gösterirler (Şekil 1.5) (Graham ve Peterson, 1999; Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000).



Şekil 1.5 : Dört farklı P450'nin kurdele yapısındaki ortak benzerlik. P450'ler: CYP3A4 (*Homo sapiens*), CYP2B4 (*Oryctolagus cuniculus*), CYP2C5 (*Oryctolagus cuniculus*) ve CYP2C9 (*Homo sapiens*). Mavi renkli yapı; K-heliks ortaklığı, gri renkli yapı; PxRx ortaklığı, sarı renkli yapı; hem bağlanma bölgesi, turuncu renkli yapı; hem, pembe; bağlanan ligand (Bak ve diğ. 2011).

Sitokrom P450 monooksijenaz sistemi çok komponentli elektron taşıma sistemi gibi görev alır. Lu ve Coon (1968), ilk kez, karaciğer mikrozomal sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz sisteminin 3 komponenti olduğunu göstermiştir. Bunlar; sitokrom P450, NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktaz ve lipittir.

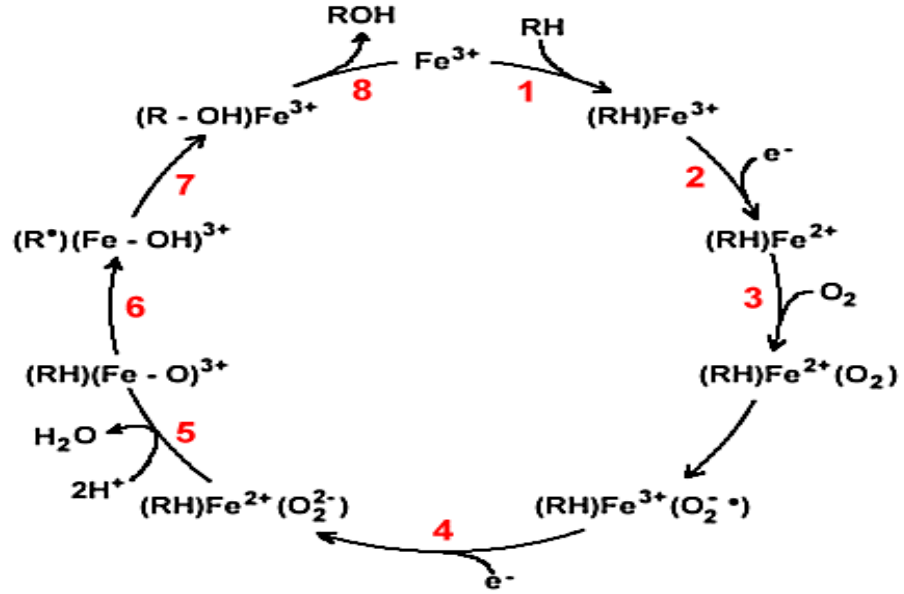
Endoplazmik retikulum'da bulunan NADPH, elektronları NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktaz (CPR) adı verilen bir flavoproteine taşır. CPR, endoplazmik retikulum (ER) membranında lokalize olan bir membran bağlı proteindir. Bu enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 78.000 Da'dur. Prostetik grup olarak hem flavin adenin dinükleotiti (FAD) hem de flavin mononükleotiti (FMN) kapsar (Porter ve Kasper, 1986). CPR üç kofaktör (FMN, FAD ve NADPH) bağlanma bölgesi ile çok bölgeli bir proteindir. Mikrozomal sistemde, FAD ve FMN içeren NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktaz (Şekil 1.6), NADPH'tan sitokrom P450'ye 2 elektronun transferini katalizler. FMN'den farklı olarak FAD redüktaza daha sıkı bir şekilde bağlanır (Vermilion ve Coon, 1978; Kurzban ve Strobel, 1986). NADPH molekülünün amino ucu hidrofobik özelliktedir ve molekülün ER'a yerleşmesini sağlar. FAD, NADPH'dan alınan elektronların giriş noktası olarak, FMN ise her bir elektronu P450'ye transfer edebildiği için çıkış noktası olarak görev yapar. İlk elektronun alınmasıyla hem demirine oksijen bağlanır, ikinci elektronun alınmasıyla da oksijenin hem demirinden ayrılması sağlanır (Narayanasami ve diğ. 1995). Bazen de ikinci elektron NADH, NADH-bağımlı sitokrom b5 redüktaz ve sitokrom b5 içeren alternatif elektron taşıma zinciri tarafından etkili bir şekilde sağlanabilir (de Vetten ve diğ. 1999) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 : Endoplazmik retikulum (mikrozomal) CYP450 sistem elemanları (Yavuz, 2011).

P450 katalizinin sonucu genellikle bir substratın hidroksillenmesidir, ancak reaksiyon daha kompleks olup, ara metabolitlerin ve son ürünün yeniden düzenlenmesine öncülük edebilir (Mansuy, 1998; Isin ve Guengerich, 2007; Rontein ve diğ. 2008). Katalizledikleri reaksiyonlar oldukça çeşitlidir ve sayısı her yıl artmaktadır. Bunlara örnek olarak dealkilasyon, dehidrasyon, desatürasyon, hidroksilasyon, halka oluşumu, izomerizasyon, dekarboksilasyon ve redüksiyon verilebilir.

Genel olarak, P450'ler Şekil 1.7'de gösterilen reaksiyon döngüsüne girerler. Çeşitli bileşiklerin hidroksilasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Bu diyagram substrata bağlanma, birinci ve ikinci elektronların NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktazdan transferi, oksijenin bağlanması, oksijenin kopması ve ürün oluşumunu göstermektedir. Substrat RH öncelikle Fe^{+3} formu ile kombine olur. Bu durum redoks potansiyelinin düşmesine neden olur. Substratın bağlanması ile aynı zamanda enzimin konformasyonel yapısında da bir değişim meydana gelir. Enzim NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktazdan bir elektron alarak indirgenir. Ferrik (Fe^{+3}) formdan ferros (Fe^{+2}) forma dönüşür ve oksijen hem demirine bağlanır. Oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik (Fe^{+3}) durumdan ferros (Fe^{+2}) duruma indirgenmelidir. Daha sonra oksijen molekülü hızlıca indirgenmiş sitokrom P450-substrat kompleksine bağlanır ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürür. Bir iç oksido-redüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın ve suyun oluşumu gerçekleşir. Serbest sitokrom P450 Fe^{3+} formunda rejenere olur. Reaksiyon sonucunda, "enzim-substrat-oksijen" kompleksi su, oksitlenmiş substrat ve oksitlenmiş durumdaki serbest sitokrom P450 enzimine ayrışır (Peterson ve Prough, 1986). Sitokrom P450'ye bağlı monoksijenaz sisteminin tüm üç bileşeni de hidroksilasyon (monooksijenasyon) aktivitesinin oluşturulmasını sağlar (Lu ve Coon, 1968; Lu ve Levin ve diğ. 1974; Arinc ve Philpot, 1976; Adali ve Arinc, 1990).



Şekil 1.7 : Sitokrom P450 reaksiyon döngüsü.

1.6. Bitki Sitokrom P450'leri

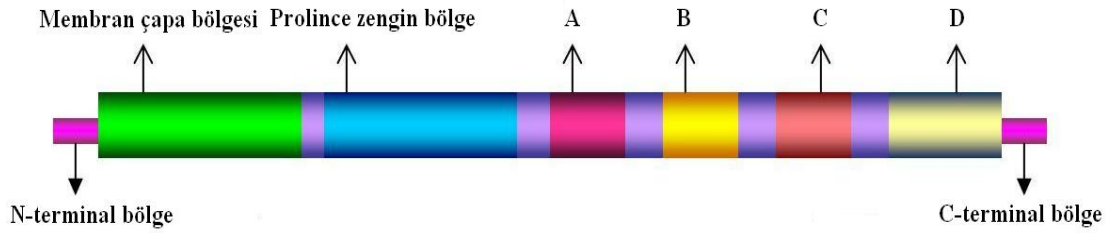
Bitkiler âlemi, değerli doğal ürünlerin binlercesinin sentezini katalizleyen P450'lerin geniş bir çeşidini içerir (Schuler, 1996; Chapple, 1998). Koniferlerde P450 genlerinin toplam sayısı bilinmemektedir, ancak model genetik bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da 272 sitokrom P450 geni bulunmuştur (Werck-Reichhart ve diğ. 2002). Bitki P450 enzimlerinin doğal substratları membran sterollerin öncüllerini ve lignin, kütin ve süberin gibi yapısal polimerleri içerir. P450'ler fitohormonların ve sinyal moleküllerinin (giberellinler, oksinler, brassinosteroidler, sitokininler, jasmonik asit) sentezini ve katabolizmasını kontrol ederek homeostazise de katkıda bulunurlar (Bak ve diğ. 2011).

Bitki sitokrom P450'leri ikincil metabolitlerin üretiminde ve birçok biyosentetik yolda önemli fonksiyonlar üstlenirler. Özellikle pigmentlerin, uçucu bileşiklerin, antioksidanların, allelokimyasalların ve flavanoidlerin, fenolik bileşikler, kumarinler, glukosinolatlar, izoprenoidler ve alkaloidleri içeren savunma bileşiklerinin biyosentezine katıldığı bulunmuştur (Morant ve diğ. 2003; Schuler ve Werck-Reichhart, 2003; Mizutani ve Otah, 2010). Fizyolojik substratlarına ek olarak sitokrom P450'lerin, meyva ve çiçek renginin (Holton, 1992, 1995; Waters ve diğ. 2005), hücre membran yapısının (Grand, 1984; Kim ve diğ. 1998; Rupasinghe ve diğ. 2003) oluşumuna katıldığı, pestisitler ve kirleticiler gibi ekzojen bileşikleri metabolize ve detoksifiye ettiği bilinmektedir (Bolwell ve diğ. 1994; Werck-

Reichhart ve diğ. 2000; Kim ve Tsukaya, 2002; Morant ve diğ. 2003; Powles ve Yu, 2010).

Bozak ve diğ. (1990) ilk izole edilen bitki P450'sinin CYP71A1 olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda biyoteknolojideki gelişimlerle bitkilerden P450 genlerinin moleküler klonlaması hızla artmıştır. Günümüzde çeşitli bitki türlerinden 63 familyaya ait yaklaşık 2000 adet P450 geni keşfedilmiştir (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

Hayvanlardan ve insanlardan izole edilen pek çok P450 gibi, bitkilerdeki P450'ler de A, B, C ve D olarak adlandırılan 4 yüksek derecede korunmuş bölgede dizi benzerliğine sahiptirler (Choe ve diğ. 1998; Halkier, 1996) (Şekil 1.8). Bu bölgeler arasında, D bölgesi oldukça fazla korunmuş ve pek çok P450'nin hem bağlanma bölgesi ile ilgilidir (Kalb ve Loper, 1988). Bu dört bölge, uzunluk ve amino asit dizisi çeşitlenen üç kısa segment ile birbirine bağlanır (Kalb ve Loper, 1988).



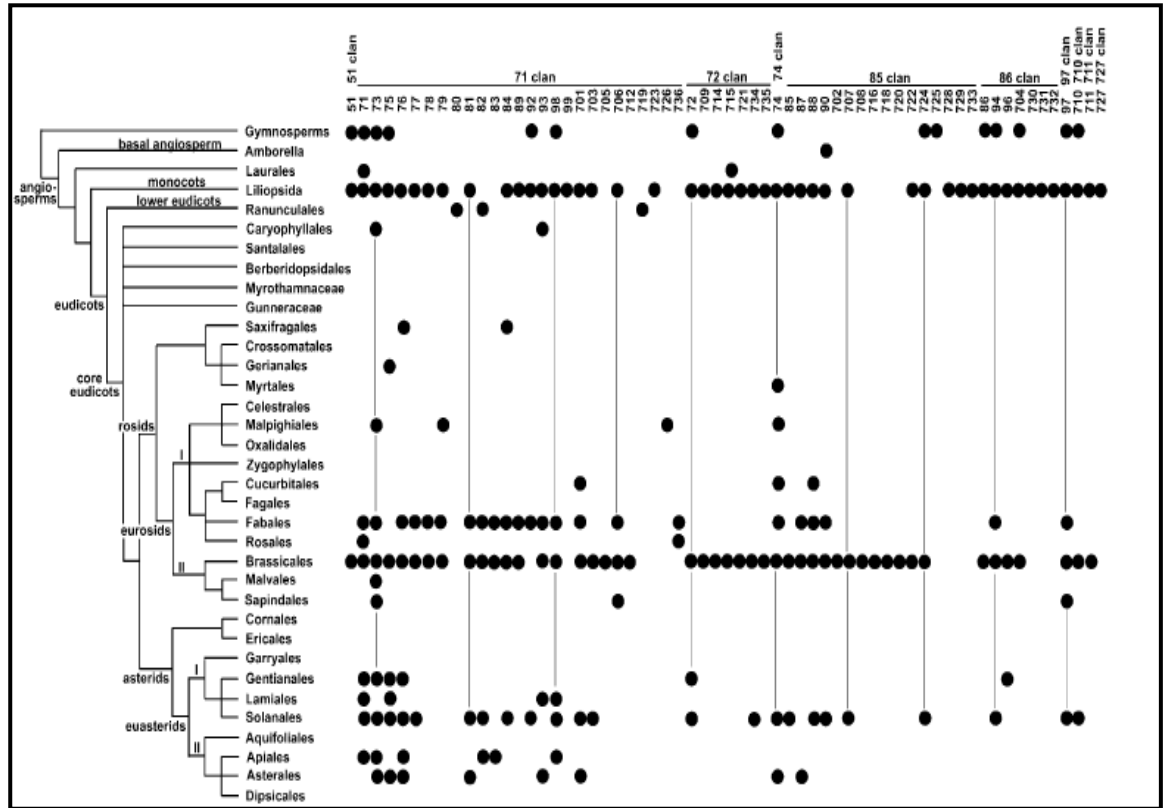
Şekil 1.8 : Bitki P450 geninin genel yapısı.

Membran çapa bölgesi pek çok P450'de bulunur ve genin N-terminal bölgesinin yakınında yerleşmiştir ve korunmuş bir treonin içerir. Prolince zengin bölge (PPGP) membran çapa bölgesi ile A bölgesi arasında bir menteşe görevi görür (Halkier, 1996). A bölgesine aynı zamanda I heliks de denir, (A,G)Gx(D,E)T(T,S) motifine sahiptir ve oksijen molekülüne bağlanma bölgesidir (Choe ve diğ. 1998). C bölgesi, pek çok P450'nin yapısında bulunan PxRx ortak dizisini içerir (Choe ve diğ. 1998). D bölgesi, C-terminal bölgenin yakınındadır ve pek çok P450'nin hem bağlanma bölgesi ile ilişkili oldukça fazla korunmuş olan FxxGxxxCxG motifini içerir. Bu motifin içinde oldukça korunmuş olan sistein kalıntısı demir grubu ile tiyolat bağı (SH) oluşturur ve pek çok P450'de bulunur (Halkier, 1996). K heliks,

P450 içinde en iyi korunmuş yapıdır ve ExxR dizisini içerir (Seifert ve Pleiss, 2008). C heliks, pek çok ökaryotik P450'de korunmuş WxxxR motifini içerir.

CYP51 ailesi hariç bitki P450'lerin hayvan ve mikrobiyal enzimlerle dizi benzerliği %30'un altındadır. Sterol demetilaz aktivitesine sahip olan CYP51 ailesinin filumlarla arasındaki dizi benzerliği %30-40 arasında değişir.

Bitki P450'leri Şekil 1.9'da verildiği gibi 2 ana grupta sınıflandırılırlar: A-tipi ve A-tipi olmayan P450'ler (Durst ve Nelson, 1995; Paquette ve diğ. 2000; Werck-Reichhart ve diğ. 2002; Nelson ve diğ. 2004). Bitkilerde A-tipi ve A-tipi olmayan 10 klan tespit edilmiştir: CYP51, CYP71, CYP72, CYP74, CYP85, CYP86, CYP97, CYP710, CYP711 ve CYP727. Bunlardan altısı (CYP51, CYP74, CYP97, CYP710, CYP711 ve CYP727) sadece tek bir aile içerir ve genellikle lipit, sterol, karotenoid metabolizması ve sinyal iletimi gibi atasal fonksiyonlar için gereklidir (Nelson ve Reichhart, 2011). Diğer dört klan (CYP71, CYP72, CYP85 ve CYP86) yoğun gen duplikasyonu ve çeşitlenme ile birçok P450 ailesini içerir. CYP711 ve CYP727 klanları hariç diğer tüm klanlar Gymnospermlerde bulunmuştur (Nelson ve diğ. 2004).



Şekil 1.9 : Bitkilerde A tipi ve A tipi olmayan klanlar (Nelson ve diğ. 2004).

A-tipi olmayan P450'ler: İntronların sayısı A-tipi olmayan P450'lerde daha azdır. A-tipi olmayan P450'ler, gelişim ve sinyal iletiminde esansiyel olan fonksiyonlara katılırlar (Werck-Reichhart ve diğ. 2002). Bununla birlikte ikincil metabolitlerin sentezine katıldığını gösteren örnekler de mevcuttur. *Catharanthus roseus* bitkisinde A-tipi olmayan CYP72A1'in indol alkaloid biyosentezine katıldığı gösterilmiştir (İrmler ve diğ. 2000). Arabidopsis'te 93 A-tipi olmayan P450 ve 7 yalancı gen bulunmuştur (Bak ve diğ. 2011).

CYP51: Bakterilerden mantarlara, hayvanlara ve bitkilere kadar evrimsel olarak korunmuş tek P450 ailesidir. Tek bir aile içerir. Tüm organizmalarda membran sterollerinin *de nova* sentezini kontrol ettiğinden (Yoshida ve diğ. 1997; Lamb ve diğ. 1998) bütün ökaryotik organizmalarda esansiyel gendir. Sterollerin biyosentezinde 14 α -demetilasyon basamağını katalizler. Fonksiyonu oldukça korunmuş olmakla birlikte mantar, hayvan ve bitkilerdeki substratları ve yolları farklıdır (Werck-Reichhart ve diğ. 2002). Tek bir intronu vardır.

CYP72: CYP72, CYP709, CYP714, CYP715, CYP721, CYP734 ve CYP735 ailelerinden oluşur. Bu klan oldukça fazla korunmuş 4 intronla karakterize edilir. İntron pozisyonları bu klanda oldukça fazla korunmuştur. Bu klan üyeleri yağ asit metabolizmasında, sitokinin biyosentezinde ve hormonların (gibberellinler ve brassinosteroidler) katabolizmasında fonksiyoneldir (Bak ve diğ. 2011). CYP72A alt ailesi monoterpenlerin veya indol alkaloidlerin biyosentezine katılır. CYP72B1 brassinosteroid hormonlarının katabolizmasına katılır (Neff ve diğ. 1999). Gymnospermlerde tek bir ailesi bulunur (CYP72).

CYP74: Tek bir ailesi bulunur. Bitkilerden daha eskidir ve ilk olarak *Rhizobacteria*, *Cnidaria* ve *Chordata*'da tespit edilmiştir (Lee ve diğ. 2008). CYP74A allen oksit sentazdır (AOS), jasmonat ve oktadekanoit yollarını katalizlerler (Laudert ve diğ. 1996; Creelman ve Mullet, 1997; Agrawal ve diğ. 2004). Oktadekanoit yolağında ilk basamağı katalizler. Yaralanmış bitki yapraklarında CYP74A transkripsiyonu, protein, katalitik aktivitesi ve jasmonik asit miktarının hızla arttığı gösterilmiştir. Transkripsiyon ve proteindeki artışla birlikte AOS aktivitesi de indüklenmiştir (Laudert ve Weiler, 1998; Laudert ve diğ. 2000).

CYP85: CYP85 klanı 13 aile içerir; CYP85, CYP87, CYP88, CYP90, CYP702, CYP707, CYP708, CYP716, CYP718, CYP720, CYP722, CYP724 ve

CYP728. Çok sayıda korunmuş intronları vardır. CYP85 ailesi, CYP90 ve CYP724 ile birlikte triterpen kamfesterol'ün brassionolid'e dönüşümünde erken basamakları katalize ederler (Fujita vd., 2006). Absisik asit'in (ABA) 8'-hidroksilasyonu CYP707A tarafından katalizlenir (Millar ve diğ. 2006). Çamlarda abietadienol/abietadienal oksidaz (PtAO, CYP720B1), abietadienol ve abietadienal'i abietik asite okside eder. Ayrıca diterpenlerin (dehidroabietadien, isopimaradien, levopimaradien) alkol ve aldehit formlarını da okside eder. Bu çok fonksiyonlu CYP450 enzimi çeşitli oksidasyon basamaklarını katalizler ve diterpen reçine asitlerin (DRA) birçoğunu oluşturmak için çeşitli substratları kullanır. DRA koniferlerde herbivorlara ve patojenlere karşı önemli savunma bileşikleridir (Ro ve diğ. 2005). CYP85A1'ler, bitki hormonlarından brassinosteroidlerin sentezinde C-6 oksidasyon basamağını katalize ederler (Shimada ve diğ. 2001). Sterollerin, siklik terpenlerin, abisik asit ve giberellik asit yolaklarının modifikasyonuna katılırlar (Helliwell ve diğ. 2001; Bishop ve Koncz, 2002; Kushiro ve diğ. 2004). CYP88 (ent-kaurenoik asit oksidaz) ailesi ent-kaurenoik asitin giberellik asite (GA12) dönüşümünü katalizler (Helliwell ve diğ. 2001).

CYP86: CYP86, CYP94, CYP96 ve CYP704 aileleri vardır. CYP94 ve CYP96 ailesi üyeleri genellikle intronsuzken, CYP86 genleri tek bir intron içerir. CYP704'ler ise dört ya da beş introna sahiptir. Yağ asitlerinin ω -hidroksilasyonuna katılırlar (Benveniste ve diğ. 1998; Kahn ve diğ. 2001). Gymnospermlerde 3 ailesi bulunur (CYP86, CYP94 ve CYP704). CYP94'ler kitin monomerlerinin biyosentezine veya savunma reaksiyonlarına katılırlar.

CYP97: CYP97'ler en eski bitki P450'lerindendir ve hali hazırda *Chlamydomonas*'ta bulunur (Nelson ve Werck-Reichhart, 2011). Tek aileli klanlardandır. 3 alt ailesi vardır ve üçü de bütün bitkilerde bulunur. Karotenoid sentezinde rol alırlar (Tian ve diğ. 2004).

CYP710, CYP711 ve CYP727: Sadece CYP710 klanı Gymnospermlerde bulunur ve intronları yoktur. Fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemektedir.

A-tipi P450'ler: A-tipi P450'ler tek bir ortak atasal genden orijinlenir ve bitkilere spesifik olan reaksiyonları katalizlerler. İkincil metabolitlerin veya doğal ürünlerin biyosentezine katılan P450'ler bu grupta bulunur. Arabidopsis'te 153 A-tipi P450 ve 19 yalancı gen bulunmuştur. Bu A-tip P450'ler oldukça yüksek

korunmuş tek bir intron'a (M) sahip olması ile karakterize edilirler (Bak ve diğ. 2011). Farklı A-tip aileler ve altaileler arasında bazı ilave korunmuş intronlar görülmektedir. A-tipi P450'ler tek bir klanda (CYP71) toplanmıştır.

CYP71: Bütün bitki türlerinde en geniş P450 ailesi olarak ortaya çıkmaktadır. İkincil metabolitlerin üretiminde rol alırlar. CYP71A1 olgunlaşmış avokadodan izole edilen ilk bitki P450'sidir (Bozak ve diğ. 1990). Şikimat yolağının arabileşiklerinin ve ürünlerinin modifikasyonunu sağlarlar. CYP71A'lar isoprenoidlerin metabolizmasına katılırlar (Hallahan ve diğ. 1994). CYP71A10'un herbisit metabolizmasındaki rolü CYP71A10-transforme edilmiş tütün bitkisinde gösterilmiştir. Transformasyon, linuron ve klortoluron bileşiklerine karşı toleransın fazlaca artışı ile sonuçlanmıştır (Siminszky ve diğ. 1999). Fenilpropanoid yolağı bütün bitkilerde korunmuştur, bu yolda rol alan P450'ler; sinamik asit 4-hidroksilaz (C4H, E.C.1.14.13.11, CYP73), izoflavon sentaz (E.C.1.14.14), izoflavon 32-hidroksilaz'dır (E.C.1.14.13.53) (Shet, 2007). CYP75B1, flavonoid 3'-hidroksilazdır ve fenilpropanoid metabolizmasında ikinci basamağı metabolize eder. CYP79'lar glukosinolatların biyosentezine katılırlar. CYP79B2 ve CYP79B3 triptofanın indol-3-asetaldoksime (IAOx) dönüşümünü katalize eder. İndol-3-asetaldoksim, öksin (indol-3-asetik asit) ve indol glukosinolatların biyosentezi sırasında ara bileşiktir (Hull ve diğ. 2000). CYP93 flavonoidlerin sentezine katılır. CYP98 kumarik asidin 3-hidroksilasyonuna ve lignin monomerlerinin biyosentezine katılır. CYP701A3 (ent-kauren oksidaz) giberellin sentezine katılır (Helliwell ve diğ. 1998). Gymnospermlerde 5 ailesi bulunur (CYP71, CYP73, CYP75, CYP92 ve CYP98).

Yapılan çalışmalarda doğal ürünlerin sentezinden sorumlu olan biyosentetik yollarda (glukosinolatlar, isoflavonoidler ve alkaloidlerin biyosentetik yolları) P450'lerin anahtar enzimler oldukları bulunmuştur. Buna ek olarak, bitki P450'lerinin birçoğunun herbisitleri içeren çeşitli zararlı ajanların detoksifikasyonunu katalizledikleri de gösterilmiştir (Morant ve diğ. 2003).

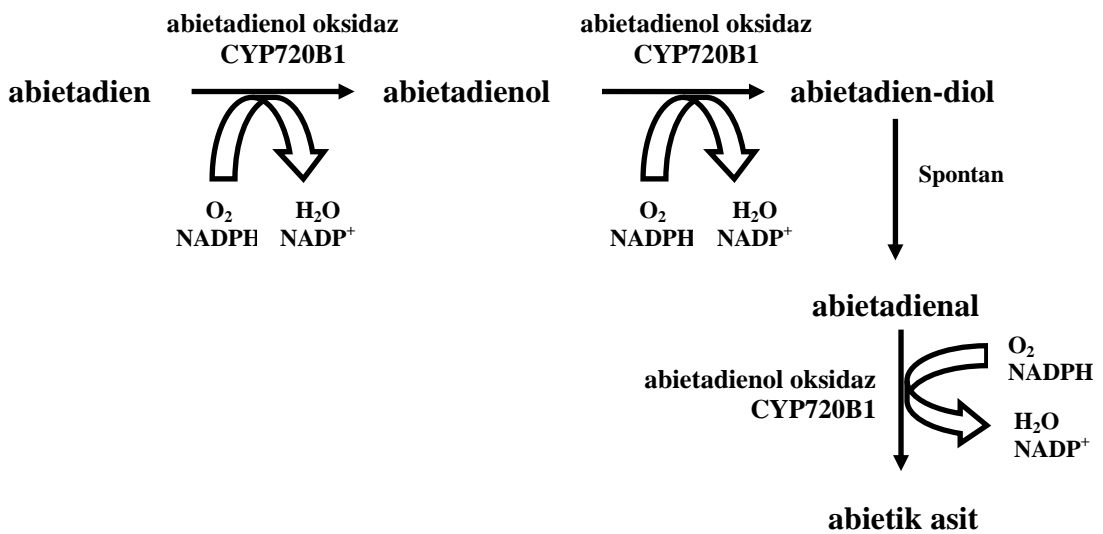
1.6.1. Bitki Sitokrom P450'lerinin Stres Altındaki Rollerini

Monoterpenler, terpen grupları içinde en büyük grubu oluşturur. Hastalıklara ve herbivora karşı kimyasal bir savunma mekanizması görevi görürken, pollinatörlere karşı güzel kokulu bir çekicilik yapmaktadır (Gershenson ve Croteau, 1991). Monoterpenler, böceklerin temel bazı davranışlarını bozabilir, ağır toksik etki yapabilir, böceklerin beslenmesini durdurabilir veya böceğin üreme yeteneğini düşürebilir (Bratesten, 1983; Hough-Golstein, 1990; Karr ve Coats, 1992; Watanabe ve diğ. 1993). Orman ağaçlarına zarar veren birçok böcek türü için bu metabolitler ve miktarları ayrıntılı biçimde belirlenmiştir (Watt, 1989; Barnola ve diğ. 1997; Figueroa ve diğ. 2004; Nerg ve diğ. 2004; Hofstetter ve diğ. 2005; Thoss ve Byers, 2006). *Pinus pinea*'da limonen'in çam kese böceğinin (*Thaumetopoea pityocampa*) hayatsal döngüsünde ovipozisyon için önemli bir konak seçimi engeli veya beslenme inhibitörü olduğu görülmüştür (Tiberi ve diğ. 1999; Petrakis ve diğ. 2005).

Yapılan çeşitli çalışmalarda seskuiterpenlerden farnesol, juvabion ve farnesal'ın böcek endokrin sistemini engelleyerek böceklerin gelişim ve olgunlaşmasını bozduğu gösterilmiştir (Schmialek, 1963; Slama ve Williams, 1965). DRA'ların (abietik asit ve isopimarik asit) bir konifer patojeni olan *Ophisotoma ips* mantarının spor çimlenmesini ve misel büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Kopper ve diğ. 2005). Sitka Ladini'nde, terpenlerin beyaz çam bitine karşı direnç sağladığı ve reçine kanallarının böcek-indüklü oluşumunun beyaz çam bitine karşı direnç ile doğrudan alakalı olduğu gösterilmiştir (Alfaro ve diğ. 2002; King ve diğ. 2004). Douglas Göknağında (*Pseudotsuga menziesii*) sürgün zararlısına karşı β -pinen'in çok şiddetli toksik etki yaptığı görülmüştür (Cates ve diğ. 1983; Cates ve Redak, 1986). Douglas Göknağının başka bir zararlısı olan yün yaprak biti (*Gilletteella cooleyi*) ile olan ilişkisinde 3-carene ve camphen, ağacın böceğe karşı etkili savunma elemanları olarak öne çıkmaktadır (Stephan, 1987). Halep çamı'nın (*Pinus halepensis*) *Matsucoccus josephi* zararlısına karşı olan direncinde limonen etkili bileşik olarak bulunmuştur (Schiller ve Grunwald, 1987). Diğer bir konifer türü olan *Pinus contorta*'nın *Panolis flammea*'ya olan direncinde ise limonen ve camphene bileşiklerindeki çeşitlilikler böceğin konak seçiminde çok önemli etkenler olarak belirlenmiştir (Leather, 1985). Tiberi ve diğ. (1999) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada, çam kese böceği'nin en az istilasının görüldüğü tür olan Fıstık çamı'nın ibrelerindeki en yaygın bileşiğin limonen olduğu gösterilmiştir.

Reçine kanallarının oluşumunun mekanik yaralanma, metil jasmonat (MeJA) veya etilen uygulaması ile indüklendiği bilinmektedir. Metil jasmonat (MeJA) kullanımının koniferlerde kimyasal ve anatomik savunmayı indüklediği görülmüştür (Franceschi ve diğ. 2002; Martin ve diğ. 2002, 2003a; Fäldt ve diğ. 2003; Miller ve diğ. 2005, Zeneli ve diğ. 2006). *Pinus taeda*'da (Loblolly pine) metil jasmonatın PtAO P450'nin transkripsiyon seviyesini arttırdığı bulunmuştur (Ro ve diğ. 2005; Ro ve Bohlmann, 2006).

Konifer terpen profillerinin coğrafik olarak, yakın ilgili taksonlar arasında ve aynı türün genotipleri arasında çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur (Fäldt ve diğ. 2001; Manninen ve diğ. 2002; Martin ve diğ. 2003b). Moleküler seviyede ağaçlarda böcek direncindeki genotipik farklılıklar terpen sentaz (TPS) ve P450 gen ekspresyonundaki indüklenme ile alakalıdır (Byun-McKay ve diğ. 2006). TPS ve sitokrom P450-bağımlı monooksijenazlar (P450) konifer savunmasında ve terpen kimyasal çeşitliliğinde merkezi bir rol oynarlar (Bohlmann ve diğ. 1998a; Martin ve diğ. 2004; Ro ve diğ. 2005). Günümüzde diterpen reçine asitlerin (DRA) oluşumunda rol alan sadece tek bir P450 klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Ro ve diğ. 2005). *Pinus taeda* P450 enzimi, abietadienol/abietadienal oksidaz (PtAO) olarak da bilinir ve bitki P450 enzimlerinden CYP720 ailesi içinde çok substratlı ve çok fonksiyonlu bir diterpen oksidazdır. PtAO'nun, konifer DRA'lerin oluşumundaki ardışık üç oksidasyon basamağından en az ikisini katalizlediği bilinmektedir (Bohlmann, 2008) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 : *Pinus taeda* abietadienol oksidaz (PtAO)'ın diterpen reçine asit sentez basamakları.

1.7. “Gateway” Klonlama Teknolojisi

Gateway Klonlama Teknolojisi (GKT), James Hartley, Dominic Esposito ve Mike Brasch adlı araştırmacılar tarafından keşfedilmiş ve geliştirilmiştir. Bu teknoloji temel olarak, Lambda fajının spesifik rekombinasyon özelliklerine göre ayarlanabilen, evrensel bir klonlama yöntemidir (Jefferies ve Hacıömeroğlu, 2010). GKT, hızlı ve etkili bir şekilde DNA zincirinin çoklu vektör sistemine uygulanarak istenen proteinin elde edilmesini ve fonksiyonel analizinin yapılmasını olanaklı kılmaktadır (Jefferies ve Hacıömeroğlu, 2010).

L, R ve de B, P terimleri, GKT’de çok sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar enzimle kesilen ve “attX” (att: attachment: birleşme) olarak ifade edilen spesifik noktalardır. attX tanımındaki X harfi, L, R, B ve P’nin yerlerine kullanılmıştır. Buna göre kullanım anlamları aşağıda tanımlanmıştır (Jefferies ve Hacıömeroğlu, 2010):

attL : (attachment Left), solda birleşen.

attR : (attachment Right), sağda birleşen.

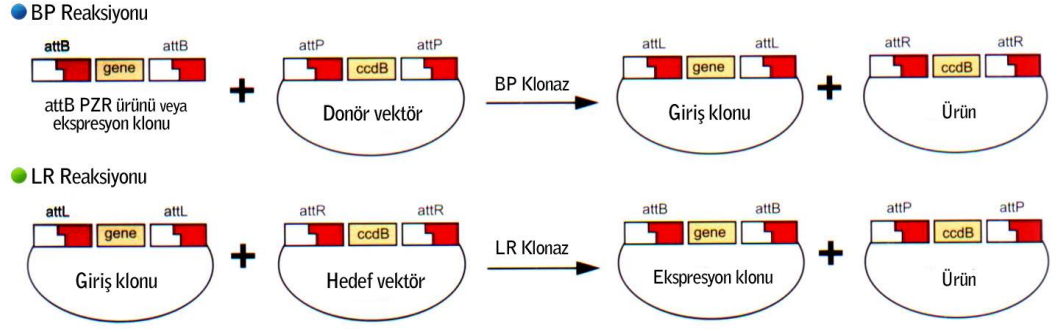
attB : (attachment Bacteria), bakteri ile birleşen.

attP : (attachment Phage), fajla birleşen.

Gateway Klonlama (GW), iki aşamada gerçekleştirilmektedir:

BP Reaksiyonu: attB bir substrattır. attB içeren PZR ürünü, attB içeren eksprese edilmiş klon ile attP içeren donör vektörle birleşerek attL içeren bir giriş klonunu oluşturmaktadır. Bu reaksiyonu BP klonaz enzimi katalize etmektedir. şekil 1.11’de BP reaksiyonunda görüldüğü gibi attB içeren PZR ürünü, attP içeren donör vektörle BP klonaz enzimi yardımıyla attL içeren bir giriş klonu oluşturmaktadır.

LR Reaksiyonu: attL içeren giriş klonu ile hedef vektör birleşerek attB içeren istenen klonu oluşturmaktadır. Bu reaksiyon LR klonaz enzimi tarafından katalize edilmektedir. şekil 1.11’deki LR reaksiyonunda görüldüğü gibi, attL içeren giriş klonu, LR klonaz enzimi yardımıyla attR içeren hedef vektöre transfer edilerek, hedef klonun elde edilmesini sağlamaktadır.

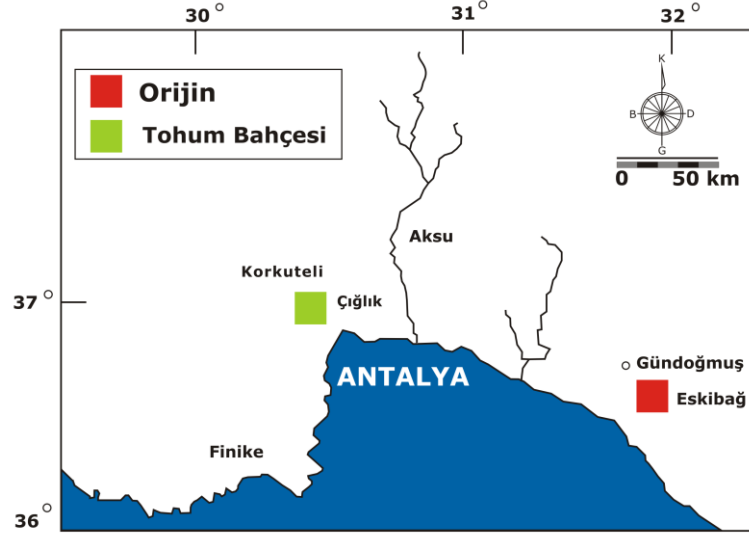


Şekil 1.11 : Gateway klonlamada BP ve LR reaksiyonu.

Bütün giriş klonları, ilgilendikleri genin her iki tarafında da attL'ye sahiptir. Bunlar Gateway sisteminde gereklidir. Çünkü L'ler Gateway rekombinasyon proteinlerle yapışkan uçları oluşturmak için kesilir. Bu yapışkan uçlar, yapışkan ucu olan ve attR'yi içeren hedef vektörle birleşmektedir. Bu reaksiyon LR aşamasında gerçekleşmekte olup, ekspresyon klonunun nasıl oluşturulduğunu göstermekte ve bu ekspresyon klonundan elde edilen proteinin analizi yapılabilmektedir (Jefferies ve Hacıömeroğlu, 2010). Daha önce bazı sitokrom P450 enzimlerinin klonlanması ve ekspres edilmesinde kullanılan ve verimliliği gösterilmiş olan GKT teknolojisi bu çalışmada da kullanılmıştır (Chung ve diğ. 2004; Goldstone ve diğ. 2008; Höfer ve diğ. 2008).

1.8. Çalışma Materyali

Çalışmada kullanılacak olan kızılçam klonları, Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü (ORTOHUM) tarafından 1992'de kurulmuş olan bir klonal tohum bahçesinde yer almaktadır (Şekil 1.12). Alandaki ağaçların orijini Gündoğmuş-Eskibağ olup, Antalya sınırları içerisindeki 12 Kızılçam tohum bahçesinden birisidir. Tohum bahçesi, Antalya ili Çıglık beldesi sınırları içerisinde 37° 02" 60' kuzey enlemi ile 30° 54" 79' doğu boylamı arasında yer almaktadır. Alanın denizden yüksekliği 300 m'dir. ORTOHUM kayıtlarına göre Eskibağ orijininin alınması Şubat 1992 tarihinde 8 m x 8 m'lik aralıklarla dikilmiştir. Bugün (2012 yılında) yaklaşık 20 yaşında olan fidanların dikili olduğu alan 17,8 ha'lık bir alan olup, alanda 30 farklı klona ait 2166 ağaç bulunmaktadır. Bahçedeki her ağacın akrabalık ilişkileri bilinmektedir.



Şekil 1.12 : Çalışmanın yapılacağı kızılçam tohum bahçesinin kurulduğu alan (Çıglık) ve tohumun getirildiği orijin (Eskibağ) (Semiz, 2009).

1.9. Çalışmanın Amacı

Kızılçam (*Pinus brutia*), ekolojik ve ekonomik bakımlardan Türkiye'nin en önde gelen yerli bir orman ağacı türüdür. Ülkemizde her yıl ortalama 40.000 ha Kızılçam fidanları ile ağaçlandırılmaktadır. Ancak, bu ağaçlandırma alanlarında karşılaşılan sorunlardan biri, çam kese böceği (*Thaumetopoea wilkinsoni*) istilasıdır (Acatay, 1972; Avcı, 2000; Kanat ve Alma, 2004). Bu böcek, özellikle genç ağaçların büyüme ve gelişmesini önemli ölçüde engellemektedir. Buna karşı: (a) böceklerle mekanik ve/veya kimyasal mücadele yapılması; (b) böceklere karşı biyolojik mücadele yapılması; (c) böceklere karşı dirençli genotiplerin bulunup ağaçlandırma alanlarında bunların dikilmesi yolları uygulanabilir. Bu çalışmamızın konusu, bireyler arasında konifer savunmasında ve terpen kimyasal çeşitliliğinde merkezi bir rol oynayan *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) geninin moleküler düzeyde araştırılmasını kapsamaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilerin çam kese böceği direnci ve bitki-böcek ilişkisini aydınlatmada ve biyolojik mücadelede kullanabilmek için başlangıç ve temel oluşturması hedeflenmiştir. Ayrıca "Pinus" cinsinde sadece tek bir sitokrom P450 enzimi bilinmektedir. Bu açıdan literatüre karşılaştırmalı canlılar yapacak ilave veriler üretilmesi amaç edinilmiştir. Tüm dünyada nadir olarak çalışılan ve oldukça zor olan bitki P450'lerinin klonlanması ve karakterize edilmesi gibi araştırmaların birimizde bu tez ile birlikte başlangıç projesi olarak ele alınarak

daha ileri düzey tarımsal bitkilerde ve çeşitli doğal zenginliğimiz olan diğer ekonomik bitkilerimizde bitki-patojen araştırmalarına öncülük edilmesi en temel amaçlarımız arasında yer almaktadır. Literatürde (Science Direct ve Web of Science veri tabanlarında yapılan tarama) *Pinus brutia*'dan izole edilmiş ya da klonlanmış sitokrom P450 enzim bilgisi mevcut değildir. Bu da çalışmamızın bu tür için orijinal ve özgün olmasını sağlamaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

1 Kb standart DNA (Fermentas, SM0311; ABM, G248), Adenin (Amresco, 73-24-5), Agar (Merck, 1.01614), Agaroz (Sigma, A9539), Akrilamit (Sigma, A8887), Amfisilin, (BioBasic, DB0028), APS (Fluka, 10043), Arjinin (Amresco, 1119-34-2), Asetik asit (Sigma, 27225), Aspartik asit (Amresco, 56-84-8), Bakır sülfat (Fluka, 61240), BCA (Sigma, D8284), BCIP (Sigma, B1026), Bis-akrilamit (Applichem, A3636), Birincil antikor (Mouse monoclonal IgG anti-His, Invitrogen, R930-25), Bromfenol mavisi (Sigma, B6131), BSA (Fluka, 62971), CTAB (Fluka, 52365), DEA (Sigma D8885), DEPC (BioBasic, 1609-47-8), D-galaktoz (Sigma, G0750), D-glikoz (Sigma, 16301), dNTP karışımı (Fermentas, R0192), EDTA (Sigma, 03620), EtBr (Sigma, E8751), Fenilalanin (Amresco, 63-91-2), Gliserol (Sigma, G2289), Glisin (Sigma, G8898), Hidroklorik asit (Riedel de-Haen, 07102), Histidin (Amresco, 71-00-1), İkincil antikor (Goat antimouse IgG-ALP), İzolösin (Amresco, 73-32-5), İzopropil alkol (Sigma, 24137), Kalsiyum klorür (Sigma, C1016), KH_2PO_4 (Applichem, A2946), Kloroform (Sigma, 24216), Kolat (Fluka, 27029), L-arabinoz (Merck, 1.01492), Litikaz, *Arthrobacter luteus*'dan (Sigma, L4025, 25 KU), Lizin (Amresco, 657-27-2), LiCl (Applichem, A6286), Lösün (Amresco, 61-90-5), LB-Miller besiyeri (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %1 NaCl, pH 7,0), Maya ekstraktı (Merck, 1.03753), Maxima Hot Start Taq DNA Polimeraz (Fermentas, EP0602), MES (Ambresco, 4432-31-9), MgCl_2 (Sigma M8266), MgSO_4 (Sigma, M7506), β -merkaptoetanol (Sigma, M3148), Metanol (Riedel de-Haen, 24229), Metionin (Amresco, 63-68-3), NaCl (Sigma, S7653), Na_2HPO_4 (Sigma, S7907), NBT (Sigma, N5514), Oligo d(T) (Fermentas, S0132), Pepton (Merck, 1.07228), PMS (Sigma, P9265), PMSF (Sigma, P7626), Potasyum klorür (Applichem, A2939), PVP (Applichem, A2260), Prolin (Amresco, 147-85-3), RevertAid Ters Transkriptaz (Fermentas, EP0441), 5X RT reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8,30, 250 mM KCl, 20 mM MgCl_2 ve 50 mM DTT), RNA ekstraksiyon tamponu (100 mM

Tris-HCl, pH 8,0, %2 CTAB, 25 mM EDTA, %2 PVP, 1,4 M NaCl, %5 β -merkaptoetanol), Serin (Amresco, 56-45-1), SDS (Applichem, A2263), Sodyum ditionit (Merck, 106505), Sıvı azot, Sistein (Amresco, 56-89-3), S.O.C. besiyeri (%2 tripton, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoz), Sodyum bikarbonat (Riedel-de-Haen, 13433), Sodyum fosfat (Sigma, S9390), Sodyum karbonat monohidrat (Sigma, S4132), Sodyum tartarat (Rochelle Tuzu, Sigma, S6170), Sorbitol (Applichem, A4992), Spektinomisin (BioBasic, SB0971), Spermidin (Applichem, A0674), SC-U besiyeri (%0,67 maya nitrojen, %2 D-glikoz, %0,01 adenin, arjinin, sistein, lösın, lizin, treonin, triptofan, %0,05 aspartik asit, histidin, izolösın, metionin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin, valin, %2 agar), Treonin (Amresco, 72-19-5), Tirozin (Amresco, 60-18-4), Triptofan (Amresco, 73-22-3), Tripton (Merck, 1.10859), Tris (Sigma, A2264), TRIzol reaktifi (Invitrogen, 15596-026), Tuz solüsyonu (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂), Tween-20 (Sigma, P9416), Valin (Amresco, 72-18-4), Yağsız süt tozu (BioRad, 170-6404), Maya nitrojen (amonyum sülfatlı, Amresco, YNB406), YPD besiyeri (%1 maya ekstraktı, %2 pepton, %2 D-glikoz), Yürütme boyası (10 mM Tris-HCl pH 7,60, %0,03 bromfenol mavisi, %0,03 xylene-cyanol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA), TE tamponu (10 mM Tris-HCl pH 7,40, 1 mM EDTA, pH 8,0), TEMED (Sigma, T9281), Xylene-cyanol FF (Fluka, 95600).

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Agaroz jel elektroforez aparatı (Thermo EC320 ve EC330), buzdolabı (Regal ve Whitewestinghouse), buz makinası (Hoshizaki FM 70-GE), Potter-Elvehjem PTFE cam-teflon homojenizatör (Sigma), çalkalamalı inkübatör (Zticheng ZHWY-200B), -20 °C dikey derin dondurucu (Arçelik 2041 DY), -80 °C derin dondurucu (Sanyo Nuaire CVK-NBST2), elektrotransfer sistemi (Hoefler miniVE SE300-10A-1.0), güç kaynağı (Thermo EC 1000-90), ısı bloğu (Biosan Dry Block Heating Thermostat TDB-100), inkübatör (Binder BD 115), manyetik karıştırıcı (Velp Arex), mikrodalga fırın (Shov M7017-P), otoklav (Nüve OT 4060 ve Hirayama Hiclave HVE-50), pastör fırını (Binder ED 115), pH metre (Mettler Toledo MP 220), poliakrilamit jel elektroforez aparatı (Owl P9DS), pır cihazı (Techne TC-512 ve Bioneer MyGenie 96 Thermal Block), saf su sistemi (Human Power I Scholar UV), santrifüj (Sigma 3K30, Sigma 1-15K ve Sigma 1-14), sıvı azot tankı (International Cryogenics Inc. IC-10R), soğutmalı inkübatör (Binder KB 115), sonikatör (Bandelin

Sonoplus), spektrofotometre (Shimadzu UV-1700, UV-1800), su banyosu (Mettler WB-14), terazi (Precisa XB 220A, Mettler Toledo AB 265S ve Mettler Toledo PB 602-L), Ultra Turraks (IKA-Werke T25), UV jel görüntüleme kabini (DNR LB 0605), UV transillüminatör (Vilber Lourmat), vorteks karıştırıcı (DragonLab MX-F).

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kit, Vektör ve Hücreler

Bitki RNA İzolasyon Mini Kit (Agilent, 5188-2780), BL21-AI™ Kimyasal Kompetan *E. coli* hücresi (Invitrogen, C607003), EZ-10 Spin Kolon DNA Jel Ekstraksiyon Kiti (BioBasic, BS353), Gateway® *E. coli* ekspresyon sistemi (Invitrogen, 11824-026), Gateway® pYES-DEST52 vektör (Invitrogen, 12286-019), “Library Efficiency” DH5α *E. coli* hücresi (Invitrogen, 18263-012), LR Klonaz™ II enzimi (Invitrogen, 11791-100), pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama Kiti (Invitrogen, K2500-20), PureLink™ Plazmit Miniprep Kit (Invitrogen, K2100-10), PureLink™ RNA Minikit (Invitrogen, 12183-018A), Sc. EasyComp Transformasyon Kiti (Invitrogen, K5050-01), *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc-1, Invitrogen, C81000).

2.1.4. Primerler

Pinus brutia CYP720B geninin klonlanması için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> adresinden *Pinus taeda* sitokrom P450 CYPB'nin (CYP720 alt ailesine benzer olan) 1464 bp'lik mRNA sekansına ulaşıldı. Buradan klonlama stratejisine uygun şekilde 5'-ucu fosfatsız olacak şekilde dejeneratif primerler BM Yazılım Danışmanlık ve Laboratuvar Sistemleri Ltd. (Ankara) firmasına sentezletirildi (Tablo 2.1).

Liyofilize olarak gelen HPSalt free ve 0,2 µmol skalada olan bu primerlerden 100 µM'lık stok hazırlamak için üzerlerine verilen oranlarda (CYP720BDP_F1: 88 µl; CYP720BDP_F2: 81 µl; CYP720BDP_R: 81 µl) steril su ilave edildi. Elde edilen stoklar 1:10 sulandırılarak 10 µM'lık primerler elde edildi ve ana stoklar -80 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 2.1 : Dejeneratif primerler.

Primer	İleri ve Geri Primer	Uzunluk
CYP720BDP_F1	5'- TTAACCCTCACAAG(C/T)T(N)CC(N)CC(N)GG -3'	25 Baz
CYP720BDP_F2	5'- TTAGGAGGCCCTCTT(N)T(N)GG(N)GA(N)AC -3'	26 Baz
CYP720BDP_R	5'- CACAGACGGTC(N)CC(N)CC(N)CC(A/G)AA(N)GG-3'	26 Baz

2.2. Metod

2.2.1. RNA İzolasyonu

Tohum bahçesinden toplanan ve -80 °C'de bekletilen ibrelerden RNA izolasyonu çeşitli metotlarla denendi.

2.2.1.1. TRIZol Metodu

-80 °C'de muhafaza edilen ibrelerden Invitrogen TRIZol reaktifi ile üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İbrelerden 0,5'er gr tartılarak DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütüldü. 15 ml'lik falcon tüplere alındı ve tüplere hemen 2 ml TRIZol reaktifi eklenip karıştırıldı. 10 dk süre ile 12.000 xg'de +4 °C'de santrifüj edildi. Üst fazdan 1'er ml alınarak 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Tüplere 0,4 ml kloroform eklendi ve 15 sn karıştırıldı. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında 12 dk bekletildi. Süre sonunda 15 dk süre ile 12.000 xg'de +4 °C'de santrifüj edildi. Üst fazdan 0,5 ml alınarak yeni eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüplere 0,5 ml kloroform ve 0,5 ml 1,2 M Na-sitrat/0,8 M NaCl karışımından eklenerek tuz çöktürmesi yapıldı. Tüpler oda sıcaklığında 8 dk bekletildi. Süre sonunda 12.000 xg'de 8 dk santrifüj edilerek RNA'nın dibe çökmesi sağlandı. Oluşan peletin üzerine %75'lik etil alkolden 1 ml eklenerek yıkanması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Pelete 100 µl DEPC'li su eklendi ve 59 °C'de 10 dk inkübe edilerek çözdürüldü. Elde edilen RNA'lar -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.1.2. Suzuki ve diğ. (2008) Metodu

-80 °C'de muhafaza edilen ibrelerden Suzuki ve diğ. (2008) metodu ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice

öğütülen 0,5 gr ibre örnekleri 15 ml'lik falcon tüplere alındı ve tüplere 5 ml sıcak RNA ekstraksiyon tamponundan eklendi. Daha sonra tüpler 65 °C'de 10 dk bekletildi. Süre sonunda 10 dk 60 °C'de çalkalamalı inkübatörde çalkalandı. Üzerine 1 ml TRIzol eklendi ve 4-5 dk karıştırıldı. 5 dk süre ile 16.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 1'er ml alınarak 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine 180 µl kloroform eklendi ve karıştırılıp oda sıcaklığında 3 dk beklendi. 15 dk süre ile 16.000 xg'de +4°C'de santrifüj edildi. Üst fazdan 450 µl alınarak 1,5 ml'lik eppendorfa konmuştur. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 15 sn karıştırılıp oda sıcaklığında 3 dk beklendi. 5 dk süre ile 16.000 xg'de santrifüj edilip üst fazdan 400 µl alınarak 1,5 ml'lik eppendorfa kondu. Üzerine 1 ml izopropil alkol eklenip oda sıcaklığında 10 dk beklendi. Süre sonunda 10 dk süre ile 16.000 xg'de santrifüj edilip RNA dipte kalacak şekilde tüp içindeki tüm sıvı döküldü. Peletin üzerine %75'lik etil alkolden 1 ml eklenerek 5 dk süre ile 16.000 xg'de santrifüj yapılarak dibe çöktürülüp ve yıkama solüsyonu boşaltılarak, kurumaya bırakıldı Tüpün dibindeki RNA'lar 50 µl DEPC'li su eklenerek 15 dk süre ile 65 °C'de çözülmesi sağlandı. Elde edilen RNA'lar -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.1.3. Azevedo ve diğ. (2003) Metodu

-80 °C'de muhafaza edilen ibrelerden Azevedo ve diğ. (2003) metodu ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütülen 0,6 gr ibre örnekleri 50 ml'lik falcon tüplere alındı ve tüplere 6 ml ekstraksiyon tamponundan (100 mM Tris-Cl, pH 8,0; %2 CTAB; 30 mM EDTA; %0,05 spermidin; %2 PVP; 2 M NaCl; %2 β-merkaptolanol) eklendi. Daha sonra tüpler 42 °C'de 90 dk inkübe edildi. Süre sonunda üzerine 6 ml kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklenip karıştırıldı. 15 dk süre ile 15.000 xg'de santrifüj edildi. Üst faz alınarak yeni falcon tüplerine aktarıldı. Tüplere 1x kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklendi ve 15 dk süre ile 15.000 xg'de santrifüj edildi. Üst fazdan 1'er ml alınarak 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine 250 µl 10 M LiCl'den eklendi ve RNA çökmesi için tüpler bütün gece +4°C'de bekletildi. +4°C'den çıkarılan tüpler 25 dk süre ile 15.000 xg'de santrifüj edilerek RNA'nın dibe çökmesi sağlandı. RNA dipte kalacak şekilde tüp içindeki tüm sıvı döküldü. Peletin üzerine 2 M LiCl ile yıkandı. Yıkanan RNA'lar 25 dk süre ile 15.000 xg'de santrifüj yapılarak dibe çöktürüldü ve yıkama solüsyonu boşaltılarak, tüpün

dibindeki RNA'lar 100 µl DEPC'li suda çözüldü. Elde edilen RNA'lar -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.1.4. Invitrogen PureLink RNA Minikit

Tohum bahçesinden toplanan ve -80 °C'de muhafaza edilen ibrelerden Invitrogen PureLink RNA Minikit ile üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

İbrelerden 0,3'er gr tartılarak DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütüldü. 2 ml'lik eppendorf tüplere 1 ml lizis tamponundan ve 10 µl β-merkaptotanol'den eklendi. Eppendorf tüplerin darası alındı ve içlerine 0,2 gr olacak şekilde ibre öğütlerinden eklendi. Ultra turraks'ta 45 sn homojenize edildikten sonra 4.000 xg'de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst fazdan 800 µl yeni eppendorf tüpe alındı ve üzerine ½ hacimde saf etanolden eklendi. 10 sn süre ile karıştırıldı. Yaklaşık 600 µl'si kitin içinden çıkan spin kolona eklendi ve 12.000 xg'de 35 sn santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kalan örnek tekrar aynı spin kolona yüklenip 12.000 xg'de 35 sn daha santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve spin kolona yıkama tamponu I'den 700 µl eklendi. 12.000 xg'de 35 sn santrifüj edildi. Spin kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Üzerine yıkama tamponu II'den 500 µl eklenerek 12.000 xg'de 35 sn santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Spin kolon 12.000 xg'de 1 dk 35 sn santrifüj edilerek membran kurutuldu. Spin kolon tam ortasına 30 µl RNaz içermeyen sudan eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi ve 12.000 xg'de 2 dk 20 sn santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA'lar -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.1.5. Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit

Tohum bahçesinden toplanan ve -80 °C'de muhafaza edilen ibrelerden Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

-80 °C'deki ibrelerden 1'er gr tartılarak DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütüldü. 2 ml'lik eppendorf tüplere 600 µl ekstraksiyon solüsyonundan ve 6 µl β-merkaptotanol'den eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 0,06 gr olacak şekilde ibre öğütlerinden eklendi ve iyice karıştırıldı.

Homojenat mini - ön filtrasyon kolonuna eklendi ve 16.000 xg'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Kolon atıldı ve alta geçen kısmın üzerine 600 µl izopropil alkol eklendi ve otomatik pipetle karıştırılarak tamamı mini - izolasyon kolonuna transfer edildi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra 16.000 xg'de 30 sn süre ile santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine yıkama solüsyonundan 500 µl eklendi ve 16.000 xg'de 30 sn süre ile santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Alta geçen kısım döküldü ve kolon aynı toplama tüpüne geri konuldu. 16.000 xg'de 2 dk santrifüj edilerek membran tamamen kurutuldu. Kolon temiz toplama tüpüne alındı ve kolonun tam ortasına 45 µl RNaz içermeyen sudan eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi ve 16.000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA'lar -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.2. RNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Uygulanan tüm metodlarla izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak 8 cm x 9 cm tablaya sahip yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. 0,4 gr agaroz tartılıp üzerine 40 ml 1X'lik TAE tamponundan ilave edildi. Bu karışım mikrodalga fırınında kontrollü bir şekilde agaroz çözünene dek ısıtıldı.

Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu hafifçe soğutulmuş üzerine 1 µl EtBr'den eklendi ve daha önceden kurulmuş elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, taraklar çıkarıldıktan sonra elektroforez tankına elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı 250 ml 1X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. 2 µl RNA örneği, 7 µl distile su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transillüminatörde incelenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

2.2.3. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid oligo d(T) primer ve RevertAid Ters Transkriptaz kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 5 µg toplam RNA ve 0,5 µg oligo d(T) primeri karıştırıldı ve son hacmi 11 µl RNaz içermeyen su ile tamamlandı. Karışım 70 °C'de

5 dk inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl 5X reaksiyon tamponu ve 2 µl dNTP karışımı eklendi. 5 dk 37 °C’de inkübasyondan sonra 200 ünite RevertAid Ters Transkriptaz eklenerek son hacim 20 µl tamamladı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42 °C’de 1 saat inkübe edildi ve sonra enzim inhibe edilmek üzere 70 °C’de 10 dk bekletildi. Sentezlenen cDNA’lar, PZR yapmak üzere -80 °C’ye kaldırıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi Techne TC 512 termal döngü cihazı ile gerçekleştirildi. PZR koşulları Tablo 2.2’de, sıcaklık, döngü ve zamanlar ise Tablo 2.3’te verilmiştir.

Tablo 2.2 : CYP720B PZR karışımı.

Bileşenler	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X reaksiyon tamponu	2,5	1X
MgCl₂ (25 mM)	2	2 mM
CYP720BDP_F1 (10 µM)	1	2,5 µM
CYP720BDP_F2 (10 µM)	1	2,5 µM
CYP720BDP_R (10 µM)	1	2,5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	0,75	0,3 mM
cDNA	6	
Ultra saf su	10,25	
Maxima Hot Start Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,5	2,5 U
Toplam Hacim	25	

Tablo 2.3 : CYP720B PZR koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön Denatürasyon	95	5 dk
Denatürasyon	94	30 sn
Yapışma	45	90 sn
Uzama	72	2 dk
Denatürasyon	94	1 dk
Yapışma	63	90 sn
Uzama	72	2 dk
Son Uzama	72	6 dk

2.2.4. PZR Ürününün Jel’den İzolasyonu

Elde edilen PZR ürünü BioBasic EZ-10 Spin Kolon DNA Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak jelden izole edildi. Kuyudaki PZR ürünü steril bistüri yardımıyla UV transillüminatörde kesilerek darası alınmış 1,5 ml’lik eppendorf tüpe aktarıldı (~ 80 mg). Üzerine 320 µl bağlanma tamponu II’den eklendi ve 60 °C’de 10 dk inkübe edilerek jelin erimesi sağlandı. Tamamen eridikten sonra karışım EZ-10 spin

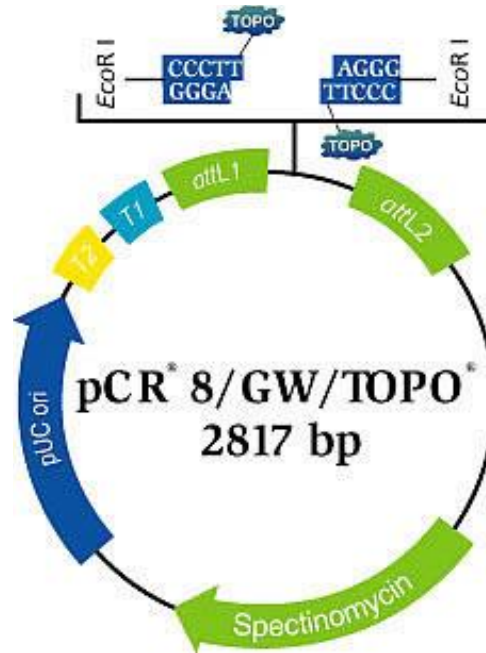
kolonuna aktarılıp, 2 dk bekletildi. Sonra 10.000 rpm’de 2 dk 20 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı dökülüp spin kolona yıkama solüsyonundan 500 µl eklendi ve 10.000 rpm’de 2 dk 20 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı dökülüp spin kolon tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra spin kolon temiz 1,5 ml’lik eppendorfa yerleştirildi ve kolonun tam ortasına 50 µl elüsyon tamponundan eklendi ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 10.000 rpm’de 2 dk 20 sn santrifüj edilerek DNA elüe edildi.

2.2.5. TOPO® Klonlama Reaksiyonu

TOPO® klonlama reaksiyonu için Invitrogen pCR®8/GW/TOPO® TA Klonlama Kit kullanıldı (Bkz. EK-1). Tablo 2.4’de verilen miktarlarda agaroz jel’den izole edilen PZR ürünü, tuz solüsyonu, steril ultra saf su ve Şekil 2.1’de gösterilen pCR®8/GW/TOPO® vektör pcr tüpü içinde sırasıyla konularak hafifçe karıştırıldı, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi ve reaksiyon karışımı buz üzerine alındı.

Tablo 2.4 : TOPO klonlama reaksiyonu.

Bileşenler	Hacim (µl)
PZR ürünü	2
Tuz solüsyonu	1
Ultra saf su	2
TOPO® vektör	1
Toplam Hacim	6



Şekil 2.1 : pCR®8/GW/TOPO® vektör.

2.2.5.1. One Shot® Kimyasal *E. coli* Transformasyonu

-80 °C'de muhafaza edilen TOP10 kimyasal *E. coli* hücrelerinden 1 tüp çıkartılıp (50 µl) buz üzerinde erimesi sağlandı. Eridikten sonra üzerine hazırlanmış olan TOPO® klonlama reaksiyonundan 2 µl eklendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra buzda 30 dk inkübe edildi. İnkübe edilen hücrelere 42 °C'de 30 sn ısı şoku uygulandı ve buz üzerine transfer edildi. Üzerlerine daha sonra oda sıcaklığındaki S.O.C. besiyerinden 250 µl eklendi ve 37 °C'de 1 saat 200 rpm çalkalama hızında yatay şekilde inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda 100 µg/ml spektinomisin antibiyotiği içeren LB agar'lı petrilere 50 µl S.O.C. besiyerinden ve 100 µl hücrelerden eklendi ve drigalski özesi ile inoküle edildi. İnoküle edilen petrilere 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi.

2.2.5.2. PZR ile Pozitif Klonların Analizi

Giriş klonunun hücrelere girip girmediğini analiz etmek ve pozitif klonları belirlemek amacıyla Tablo 2.2'de verilen miktarlarda PZR komponentleri karıştırılarak her koloni için 23 µl öncü karışım hazırlandı, daha sonra petriden seçilen koloniler steril kürdan yardımıyla karışıma eklendi, kürdanda kalan koloni ile 10 adet bölgeye bölünmüş ve 100 µg/ml spektinomisin antibiyotiği içeren LB agar'lı petride uygun yerlere çizgi ekimi yapılarak tek koloni elde edilmeye çalışıldı.

2.2.5.3. Plazmid İzolasyonu

Klonlamanın kontrol edilmesi için plazmid izolasyonu Invitrogen PureLink Plazmid Miniprep Kit kullanılarak gerçekleştirildi.

Transforme olan kolonilerden 2 - 6 adet seçildi ve 100 µg/ml spektinomisin antibiyotiği içeren 5 ml LB besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de, 180 rpm çalkalamalı inkübatörde gece boyunca inkübe edildi. Gece boyu inkübe edilen kültür 8.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, oluşan süpernatant pelletten uzaklaştırılıp üzerine 250 µl RNaz-A'lı seyreltme tamponu (R3) eklendi, vortekslenerek homojen hale getirildi. Hücrelere 250 µl parçalama tamponu (L7) eklendi ve 5 kez aşağı-yukarı yapılarak karıştırıldıktan sonra 4 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tüplere 350 µl çökeltme tamponu (N4) eklendi ve aşağı-yukarı yapılarak homojenlik sağlandı, daha sonra 12.000 rpm'de 10 dk 20 sn santrifüj edildi, oluşan santrifüj alınarak spin kolona konuldu. 12.000 rpm'de 1 dk 20 sn santrifüj edilerek

alta geçen sıvı kısım döküldü, spin kolona bu kez 700 µl yıkama tamponu (W9) eklendi ve 12.000 rpm’de 1 dk 20 sn santrifüj edilip alta geçen sıvı döküldü. Yıkama tamponundan arındırmak için 12.000 rpm’de 1 dk 20 sn daha santrifüj edilip spin kolon temiz 1,5 ml’lik eppendorf tüpe alındı. 40 µl ön ısıtılmış TE tamponu kolonun merkezine konuldu ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi. İnkübe edilen spin kolon 12.000 rpm’de 2 dk 20 sn santrifüj edilerek saf plasmid DNA (giriş klonu) elde edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

Ve gerçekten genin aktarımının gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için bu plazmitlerden PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6. Sekans Analizi

PZR gen ürünümüzün doğru bir şekilde TOPO® vektöre girip girmediğini belirlemek için elde edilen plasmid DNA doğrulanmak üzere sekans analizi için Tablo 2.5’te verilen Gateway (GW) primerleri ile birlikte BM Yazılım Danış. Lab. Sis. Ltd. Şti. aracılığı ile GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderildi.

Tablo 2.5: GW primerleri.

Primer	İleri ve Geri Primer	Uzunluk
GW 1	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'	25 Baz
GW 2	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3'	25 Baz

2.2.7. Biyoinformatik Analizler

2.2.7.1. Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması

Elde edilen *Pinus brutia* CYP720B gen dizisinin karşılığı amino asit dizisi ExPASy Proteomics Server (www.expasy.ch) kullanılarak belirlendi.

2.2.7.2. Sinyal Peptid Analizi

Sitokrom P450 proteinleri ökaryotlarda çoğunlukla ER’a yerleştikleri için sinyal peptid analizi yapıldı. Bu analiz için “Signal P” adındaki programdan (Bendtsen ve diğ. 2004) yararlanıldı.

2.2.7.3. Demir Bağlama Domaininin Tespiti

P450 gen ailesinde korunmuş bölge olan demir bağlama domaininin varlığının tespiti için InterPro Scan (Quevillion ve diğ. 2005) adındaki programdan yararlanıldı.

2.2.7.3. Transmembran Segment Analizi

Proteinin transmembran segmentini tespit etmek için 2 farklı program kullanıldı. Bunlar: TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Sonnhammer ve diğ. 1988; Krogh ve diğ. 2001) ve DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) (Cserzo ve diğ. 1997).

2.2.7.4. Glikolizasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan glikozilasyon bölgelerinin tespiti için “NetNGlyc” (Gupta ve diğ. 2004) adlı program kullanıldı.

2.2.7.5. Fosforilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan fosforilasyon bölgelerinin tespiti için “NetPhos 2.0” (Blom ve diğ. 1999) adlı program kullanıldı.

2.2.7.6. Metilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan metilasyon bölgelerinin tespiti için “MASA” (Shien ve diğ. 2009) adlı program kullanıldı.

2.2.7.7. İkincil Yapı Analizi

Pinus brutia CYP720B'nin ikincil yapısı “NPS SOPMA” (Geourjon ve Deléage, 1995) adlı program kullanılarak analiz edildi.

2.2.8. *E. coli* Ekspresyon Sistemi

Gateway teknolojisi kullanılarak klonlanan gen bölgesinden proteinin ekspresyonunu gerçekleştirmek için uygun hedef vektör ve transformasyon organizmasını içeren Invitrogen “*E. coli* Expression System with Gateway® Technology” kiti kullanıldı.

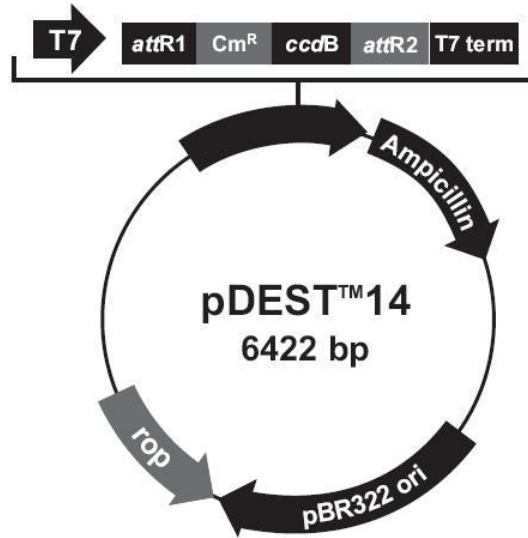
2.2.8.1. LR Rekombinasyon Reaksiyonu

Giriş klonu ve hedef vektör kullanılarak yeni bir ekspresyon klonu oluşturmayı sağlar, reaksiyon LR Klonaz™ II enzim karışımı ile gerçekleştirilir.

Tablo 2.6'da verilen miktarlarda giriş plazmiti, pDEST™14 hedef vektör (Şekil 2.2) (Bkz. EK-2), TE tamponu (pH 8,0) 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içine sırasıyla konularak hafifçe karıştırıldı. LR Klonaz™ II enzim karışımı -20 °C'den çıkarılarak 2 dk buz üzerinde çözüldü ve 2 sn olmak üzere iki defa karıştırıldı. Her bir tüpe 2 µl LR Klonaz™ II enzim karışımı eklendi ve pipet yardımıyla aşağı-yukarı yapılarak karıştırıldı. 25 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi, daha sonra her bir tüpe 1 µl Proteinaz K eklenip 37 °C'de 10 dk inkübe edilerek ekspresyon klonu elde edildi.

Tablo 2.6 : LR rekombinasyon reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Alınan Hacim (µl)
Giriş Klonu (50-150 ng/reaksiyon)	2
pDEST™14 hedef vektör (150 ng/µl)	1
TE Tamponu (pH 8,0)	5
Toplam Hacim	8



Şekil 2.2 : pDEST™14 hedef vektör.

2.2.8.2. DH5α Kimyasal *E. coli* Transformasyonu

LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan ekspresyon klonunun çoğaltılması için kompetan hücrelere plazmitin aktarımı gerçekleştirildi.

-80 °C’de bulunan “Library Efficiency” DH5α *E.coli* hücresi buz üzerine alındı ve steril bir eppendorf tüpe 50 µl ayrıldı. Üzerine LR rekombinasyon reaksiyonundan 1 µl eklendi, hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. İnkübe edilen hücelere 42 °C’de 30 sn ısı şoku uygulandı ve tekrar buz üzerine transfer edildi. Üzerine 450 µl oda sıcaklığındaki S.O.C. besiyerinden eklendi. Tüpler sıkıca kapatılıp çalkalamalı inkübatörde 200 rpm, 37 °C’de 1 saat yatay şekilde inkübe edildi.

Hazırlanan ve ön ısıtılması yapılmış 100 µg/ml amfisilin antibiyotiği içeren LB agar’lı petrilere 50 µl S.O.C. besiyerinden ve 100 µl hücrelerden eklendi ve drigalski özesi ile inoküle edildi. İnoküle edilen petrilere 37 °C’de gece boyunca inkübe edildi.

2.2.8.3. PZR ile Pozitif Klonların Analizi

Ekspresyon klonunun hücelere girip girmediğini analiz etmek ve pozitif klonları belirlemek amacıyla kısım 2.2.5.2’de belirtildiği şekilde kontrol PZR’nu gerçekleştirildi.

2.2.8.4. Plazmid İzolasyonu

Elde edilen tek kolonilerden Invitrogen PureLink Plazmid Miniprep Kit ile kısım 2.2.5.3’te belirtildiği şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek saf plazmid DNA (ekspresyon klonu) elde edildi. Gerçekten genin aktarımının gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için bu plazmitlerden PZR gerçekleştirildi.

2.2.8.5. BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan *E. coli* Hücelere Transformasyon

-80 °C’de bulunan BL21-AI™ One Shot® kimyasal kompetan *E. coli* hücreleri buz üzerine alındı. Plazmid DNA’dan 5 µl (5-10 ng) alınıp kompetan *E. coli* hücreleri üzerine eklendi, hafifçe karıştırıldı ve daha sonra buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. İnkübe edilen hücelere 42 °C’de 30 saniye ısı şoku uygulandı ve buz üzerine transfer edildi, üzerine 250 µl oda sıcaklığındaki S.O.C besiyerinden eklendi. Tüpler sıkıca kapatılıp çalkalamalı inkübatörde 200 rpm, 37 °C’de 1 saat yatay şekilde inkübe edildi.

Hazırlanan ve ön ısıtılması yapılmış 100 µg/ml amfisilin antibiyotiği içeren LB agarlı petrilere 50 µl S.O.C. besiyerinden ve 100 µl hücrelerden eklendi ve drigalski özesi ile inoküle edildi. İnoküle edilen petrilere 37 °C’de gece boyunca inkübe edildi ve pozitif klonlar PZR yöntemi ile kısım 2.2.5.2’de verilen reaksiyon şartları kullanılarak belirlendi.

2.2.9. Protein Ekspresyonu

Transformasyonu gerçekleştirilen ve belirlenen pozitif klonlardan CYP720B ekspresyonu gerçekleştirildi. Ekspresyonu artırmak için kullanılan kit ile uyumlu L-arabinoz kullanıldı.

Transformant kolonilerden seçim yapılarak 100 µg/ml amfisilin antibiyotiği içeren 5 mL LB besiyerine inoküle edildi. 37 °C’de, 120 rpm çalkalamalı inkübatörde OD₆₀₀ değeri 0,6’dan 1,0’e ulaşıncaya kadar inkübe edildi ve hücrelerin logaritmik büyüme fazına ulaşması sağlandı. 5 ml kültür 100 µg/ml amfisilin antibiyotiği içeren 100 ml LB besiyerine inoküle edildi ve OD₆₀₀’de 0,05-0,1 arası bir değer elde edildi. Böylelikle başlangıç kültürü 1:20 dilüe edilmiş oldu, bu dilüsyon hücrelerin logaritmik büyümesine dönmesine ve uygun hücre yoğunluğuna ulaşmasına izin verir.

Kültür OD₆₀₀’de 0,4-2,0 arası bir değere ulaşıncaya kadar büyütüldü, daha sonra her bir kültür ikiye bölünerek bir tanesine son konsantrasyon %0,2 olacak şekilde L-arabinoz eklendi, böylelikle bir indüklenmiş bir de indüklenmemiş iki kültür elde edildi. Her bir kültürden 500 µl eppendorf tüplere alındı ve mikrosantrifüjde 14.000 rpm’de santrifüj edilerek çökelek oluşması sağlanıp santrifügat kısmı atıldı, hücre peletleri -20 °C’de donduruldu ve 0. saat örnekleri elde edilmiş oldu. Kültür daha sonra inkübe edilmeye devam edildi ve 6 saat boyunca, her iki saatte bir 500 µl örnek alınarak aynı işlem uygulandı.

2.2.10. Örneklerin Parçalanması

%0,2 L-arabinoz varlığında büyütülen hücreler peletlerinin üzerine 500 µl parçalama tamponu (Tablo 2.7) eklenip sonikasyon cihazıyla (Bandelin Sonoplus) hücreler 4 kez 20’şer saniye boyunca sonike edilerek parçalandı.

Tablo 2.7 : Parçalama tamponunun içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
0,4 M KPi tamponu pH 7,80	100 mM
%10 Triton X-100	%0,2
100 mM PMSF	0,5 mM
100 mM ϵ-ACA	0,3 mM
100 mM EDTA	2 mM
DTT	0,05 mM
Distile su	-

2.2.11. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (SDS-PAJE)

Poliakrilamit jel elektrofrezisi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. SDS-PAJE'in detayları aşağıda verilmiştir.

2.2.11.1. Stok Çözeltiler

10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30): 30 g Tris ve 144 g glisin distile suda çözüldü ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Tamponun pH'sı asit veya bazla ayarlanmadı. Tampon kullanımdan önce 10 kez sulandırılarak ve 1 lt tampona 1 gr SDS eklenerek kullanıldı.

Stok ayırıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80): 18,15 gr Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 8,80'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80): 6 gr Tris yaklaşık 40 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 6,80'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Stok jel çözeltisi (Akrilamit-BIS, %30 T, %2,67 C): 29,2 g akrilamit bir miktar distile suda çözüldü; 0,8 g BIS eklendi ve çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti kaba filtre kâğıdından süzüldü. %T toplam akrilamit monomer konsantrasyonunun yüzdesini gösterir ve %C aşağıda gösterildiği gibi çapraz bağlanan monomer konsantrasyonunu tanımlar.

$$\%T = (g \text{ Akrilamit} + g \text{ BIS} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (g \text{ BIS} / g \text{ Akrilamit} + g \text{ BIS}) \times 100$$

%10 SDS: 10 gr SDS ısıtılarak distile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 gr amonyum persülfat 1 ml distile suda çözülüp taze olarak hazırlandı.

4X Numune seyreltme tamponu: %8 SDS, %40 gliserol, %20 β -merkaptotanol ve %0,01 bromfenol mavisi içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 6,80) Tablo 2.8'de verilen çözeltilerin belirtilen hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. Tamponun pH'sı son hacme tamamlanmadan önce 1 M HCl ile 6,80'e titre edildi.

Tablo 2.8 : 4X numune sulandırma tamponunun içeriği.

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,80)	2,5
Gliserol	4,0
B-merkaptotanol	2,0
SDS	0,8 g
Bromfenol mavisi	1,0 mg
Toplam Hacim	10

Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması

Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.9'da belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 2. 9 : SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

İçerik	Ayrıştırıcı Jel (%8,5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel çözeltisi (ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı jel tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı jel tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012
Toplam Hacim	30	10

2.2.11.2. Jelin Hazırlanması

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm'lik teflon ayırıcıların ve son olarak da kısa camın (12,5 x 16 cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki

kuyucuğa %2'lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.19'da belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8 - 9 cm) ulaşmaya kadar 10 ml'lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazikçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1 cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15 - 20 dk süreyle polimerizasyona bırakıldı.

Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten sonra 10 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk da tamamlandı.

2.2.11.3. Örneklerin Hazırlanması

Analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune sulandırma tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve 3 dk süre ile kaynar suda kaynatıldı.

2.2.11.4. Örneklerin Yüklenmesi

Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi.

Uygun iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak 20 µl protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

2.2.11.5. Elektroforetik Ayrıştırma

Sistem Thermo EC 1000-90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741-4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Elektroforetik ayrıştırmanın yapılacağı jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 10 mA'lık sabit akım ile yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayrıştırıcı jele ulaştığında akım 12 mA'e, sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 15 mA'e çıkarıldı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6 - 7 cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayrıştırma sağlamak için toplam 5 - 5,5 saat yürütme yapıldı.

2.2.12. Maya Ekspresyon Sistemi

Gateway teknolojisi kullanılarak klonlanan gen bölgesinden proteinin ekspresyonunu gerçekleştirmek için uygun hedef vektör ve transformasyon organizması kullanıldı.

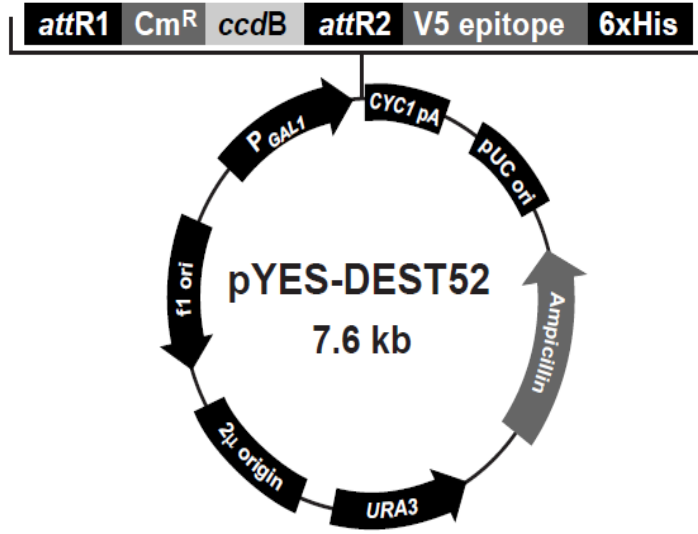
2.2.12.1. LR Rekombinasyon Reaksiyonu

Giriş klonu ve hedef vektör kullanılarak yeni bir ekspresyon klonu oluşturmayı sağlar ve reaksiyon LR Klonaz™ II enzim karışımı ile gerçekleştirilir.

Tablo 2.10'da verilen miktarlarda giriş plazmiti, pYES-DEST52™ hedef vektör (Şekil 2.3) (Bkz. EK-3), TE tamponu (pH 8,0) 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içine sırasıyla konularak hafifçe karıştırıldı. LR Klonaz™ II enzim karışımı -20 °C'den çıkarılarak 2 dk buz üzerinde çözüldü ve 2 sn olmak üzere iki defa karıştırıldı. Her bir tüpe 2 µl LR Klonaz™ II enzim karışımı eklendi ve pipet yardımıyla aşağı-yukarı yapılarak karıştırıldı. 25 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi, daha sonra her bir tüpe 1 µl Proteinaz K eklenip 37 °C'de 10 dk inkübe edilerek ekspresyon klonu elde edildi.

Tablo 2.10 : LR rekombinasyon reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Alınan Hacim (µl)
Giriş Klonu (50-150 ng/reaksiyon)	1
pYES-DEST52™ hedef vektör (150 ng/µl)	0,75
TE Tamponu (pH 8,0)	6,25
Toplam Hacim	8



Şekil 2.3 : pYES-DEST52™ hedef vektör.

2.2.12.2. DH5α Kimyasal *E. coli* Transformasyonu

LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan ekspresyon klonunun çoğaltılması için kompetan hücrelere plazmitin aktarımı gerçekleştirildi.

-80 °C’de bulunan “Library Efficiency” DH5α *E.coli* hücresi buz üzerine alındı ve steril bir eppendorf tüpe 50 µl ayrıldı. Üzerine LR rekombinasyon reaksiyonundan 1 µl eklendi, hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. İnkübe edilen hücrelere 42 °C’de 30 sn ısı şoku uygulandı ve tekrar buz üzerine transfer edildi. Üzerine 450 µl oda sıcaklığındaki S.O.C. besiyerinden eklendi. Tüpler sıkıca kapatılıp çalkalamalı inkübatörde 200 rpm, 37 °C’de 1 saat yatay şekilde inkübe edildi.

Hazırlanan ve ön ısıtılması yapılmış 100 µg/ml amfisilin antibiyotiği içeren LB agar’lı petrilere 50 µl S.O.C. besiyerinden ve 100 µl hücrelerden eklendi ve drigalski özesi ile inoküle edildi. İnoküle edilen petrilere 37 °C’de gece boyunca inkübe edildi.

2.2.12.3. PZR ile Pozitif Klonların Analizi

Ekspresyon klonunun hücrelere girip girmediğini analiz etmek ve pozitif klonları belirlemek amacıyla kısım 2.2.5.2’de belirtildiği şekilde kontrol PZR’nu gerçekleştirildi.

2.2.12.4. Plazmid İzolasyonu

Elde edilen tek kolonilerden Invitrogen PureLink Plasmid Miniprep Kit ile kısım 2.2.5.3'te belirtildiği şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek saf plazmid DNA (ekspresyon klonu) elde edildi. Ve gerçekten genin aktarımının gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için bu plazmitlerden PZR gerçekleştirildi.

2.2.12.5. *Saccharomyces cerevisiae*'ye Transformasyon

İzole edilen saf plazmid DNA (ekspresyon klonu) Invitrogen Sc. EasyComp Transformasyon Kiti kullanılarak maya hücrelerine aktarıldı.

2.2.12.5.1. Kompetan Hücre Yapımı

Maya hücrelerinin ekspresyon plazmitini alabilmesi için kompetan hale getirilmesi gerekmektedir.

Ticari olarak satın alınan *S. cerevisiae*'den YPD plakaya tek koloni ekimi yapıldı. 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. 2. günün sonunda tek koloni oluşumu gözlemlendi. Elde edilen bu tek kolonilerden 10 ml YPD'ye ekim yapıldı, 30 °C'de 250 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 22 saat sonunda OD₆₀₀'üne bakıldı ve 2,26 olarak kaydedildi. Kültür OD'si 0,4 olacak şekilde YPD ile dilüe edildi ve tekrar 30 °C, 250 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonra OD₆₀₀'üne bakıldı ve OD₆₀₀ değeri 1,4 olarak kaydedildi. 1.500 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılarak hücreler pelet şeklinde çöktü. Pelet 10 ml solüsyon I ile süspansiyon edildi ve tekrar 1.500 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Daha sonra hücre peletleri 1 ml solüsyon II ile süspansiyon edildi ve elde edilen kompetan hücrelerden 50 µl olacak şekilde steril eppendorflara bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.12.5.2. Kompetan Hücrelere Transformasyon

Transformasyon için bir eppendorf tüp (50 µl) kompetan hücre -80 °C'den çıkarıldı. Üzerine elde edilmiş olan ekspresyon klonundan 2 µl eklendi. Üzerine 500 µl solüsyon III'ten eklenerek elle tiplendi ve transformasyon reaksiyonu 1 saat 30 °C'de su banyosunda inkübe edildi. Transformasyon etkinliğini arttırmak için her 15 dk da bir reaksiyon karışımı elle tiplendi. Seçici plakaya (SC-U) transformasyon reaksiyonundan 100 µl eklenerek drigalski özesi ile inoküle edildi ve petriyer 30

°C'de 2-4 gün arası inkübasyona bırakıldı. İkinci günün sonunda seçici plakada transformant kolonilerden ~ 100 adet tespit edildi.

2.2.13. Protein Ekspresyonu

Transformasyonu gerçekleştirilen ve belirlenen pozitif klonlardan CYP720B ekspresyonu gerçekleştirildi. Ekspresyonu artırmak için kullanılan kit ile uyumlu D-galaktoz kullanıldı. Transformant kolonilerden seçim yapılarak karbon kaynağı olarak %2 glikoz içeren 10 ml SC-U besiyerine inokülasyon yapıldı. 30°C'de, 250 rpm çalkalamalı inkübatörde geceboyu büyütüldü, OD₆₀₀ değerine bakıldı ve bu değer 3,0 olarak kaydedildi. OD₆₀₀ değeri 0,9 olacak şekilde SC-U besiyerinde büyüyen hücrelerden gerekli miktarlarda (yaklaşık 7'şer ml) alınarak 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Böylelikle hem kontrol (indüklenmemiş) hem de indüklenmiş iki kültür elde edildi. Oluşan hücre peletlerinden indüklenmiş grup bir kaç kez steril distile su ile yıkanarak glikozdan tamamen kurtulmaya çalışıldı. Daha sonra hücre peletinin üzerine karbon kaynağı olarak %2 galaktoz içeren SC-U besiyerinden 1-2 ml eklenerek süspanse edildi ve tamamı 50 ml'lik indüklenmiş besiyerinin (%2 galaktozlu) içine aktarıldı. Benzer şekilde kontrol grubunun hücre peletinin üzerine karbon kaynağı olarak %2 glikoz içeren SC-U besiyerinden 1-2 ml eklenerek süspanse edildi ve tamamı 50 ml'lik indüklenmemiş besiyerine (%2 glikozlu) aktarıldı. Her iki grupta da aktarım yapılır yapılmaz 5'er ml örnek alınarak OD₆₀₀ değerlerine bakılarak kaydedildi. Daha sonra örnekler 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edilerek sup kısmı atıldı. Peletlerin üzerlerine 500 µl steril distile su eklenerek süspanse edildi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj edilerek elde edilen hücre peletleri O. saat olarak kaydedilerek -80 °C'ye kaldırıldı. Bu işlem 24. ve 48. saatlerde de tekrarlanarak indüklenme için en uygun zaman aralığı tespit edilmeye çalışıldı.

2.2.14. Örneklerin Parçalanması

Hücreler -80 °C'den çıkarıldı ve üzerlerine 500 µl steril distile sudan eklenerek vortekslendi. OD₆₀₀ değerleri 0,5 olacak şekilde hesaplanan miktar yeni 1,5 ml'lik eppendorflara alındı. 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edilerek sup kısmı atıldı. Peletlere 1 ml steril distile sudan eklenerek vortekslendi. 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edilerek sup kısmı atıldı. Peletlere tekrar distile sudan 300 µl eklenerek vortekslendi. Üzerlerine eş hacimde (300 µl) 0,6 M NaOH'dan eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edilerek sup kısmı dikkatle

atılarak peletlere 70 µl SDS-örnek tamponundan (Tablo 2.11) eklenerek pipetle karıştırıldı. Örnekler 3 dk kaynatıldıktan sonra 1500 xg'de 5 dk santrifüj edilerek 20 µl'si SDS-PAJE'e yüklendi. SDS-PAJE işlemi kısım 2.2.11'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kalan ekstrakt -20 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 2.11 : SDS-örnek tamponunun içeriği.

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,80)	0,3
Gliserol	0,25
B-merkaptotanol	0,2
SDS	0,2 g
Bromfenol mavisi	0,5 mg
Toplam Hacim	5

2.2.15. Western Blot

Western blot işlemi Hoefer miniVE elektrotransfer sistemi (Hoefer Inc. 84 October Hill Road Holliston, MA 01746-1388) kullanılarak gerçekleştirildi. Transferin detayları aşağıda verilmiştir.

2.2.15.1. Stok Çözeltiler

Transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 Metanol): SDS-PAJE'de kullanılan 10X elektrot tamponuna son konsantrasyonu %20 olacak şekilde metanol eklenmesi ile hazırlandı.

1 M Tris-HCl, pH 7,40: 12,1 gr Tris yaklaşık 30 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 7,40'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

PBST: 4 gr NaCl, 0,1 gr KCl, 1,34 gr Na₂HPO₄, 0,122 gr KH₂PO₄ distile suda çözüldü, içine 0,25 ml Tween 20 solüsyonundan eklendi ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

Bloklama solüsyonu: Hazırlanan PBST'nin içine %5 olacak şekilde yağsız süt tozundan eklendi.

Birincil antikor: Mouse monoklonal IgG Anti-His (C-term) antikorunu 1:5000 olacak şekilde bloklama solüsyonu ile dilüe edildi.

İkincil antikor: Goat anti-mouse IgG-ALP antikorunu 1:5000 olacak şekilde bloklama solüsyonu ile dilüe edildi.

2.2.15.2. Elektrotransfer

Elektroforezi takiben jel soğuk transfer tamponu içerisinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübe edildi. Nitroselüloz membran jelin boyutlarında kesilerek soğuk transfer tamponu ile ıslatıldı. Filtre kâğıtları (Whatman # 1) da jelin boyutlarına uygun olarak kesildikten sonra soğuk transfer tamponu ile ıslatıldı. Hoefer miniVE sistemin blotter aparatı katot kısmı (siyah yüzey) alta gelecek şekilde düz bir zemine yerleştirildi. En alt kısma sistemin içinden çıkan süngerden bir adet transfer tamponu ile ıslatılarak yerleştirildi.

Üzerine ıslatılmış olan filtre kâğıtlarından bir adet yerleştirildikten sonra onun da üzerine jel kondu. Jelin üzerine nitroselüloz membran dikkatlice hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi ve üzerinden sistemden çıkan roller ile geçilerek hava kabarcıkları giderildi. Üzerine 2 adet ıslatılmış sünger konuldu ve blotter aparatı sıkıca kapatıldı. Blotter tankın içine katot kısmı arka tarafa gelecek şekilde yerleştirildi ve üzerine 300-350 ml soğuk transfer tamponundan eklendi. Tankın içi ise 1-1,2 lt distile su ile doldurularak üst kapak kapatıldı. Sistem güç kaynağına bağlanarak 90 volt, 90 mA'de 90 dk transfer işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı, hücrenin bağlantısı kesildi. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, "Blot", elde edildi.

2.2.15.3. Proteinlerin İmmünojenik Tespiti

Transfer tamamlandıktan sonra membran, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve bloklama solüsyonuna alınarak 1 saat çalkalamalı inkübatörde çalkalandı. Süre sonunda membran PBST solüsyonunda her biri 5 dk olmak üzere 2 defa yıkandı. Yıkama çözeltisi, membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için yapılan her yıkama basamağı arasında plastik tepside tamamen uzaklaştırıldı. Birincil antikor (Mouse IgG Anti-his, 1:5000 oranında) membranın üzerine boşaltıldı ve tüm gece çalkalamalı inkübatörde +4 °C'de inkübe edildi. Daha sonra membran tekrar PBST solüsyonunda her biri 5 dk olmak üzere 2 defa yıkandı. Membran daha sonradan 1 saat süreyle işaretleyici enzim-alkali fosfataz (goat anti-mouse IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikinci antikorlarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi yıkandı. Sonuç olarak, membran antikor bağlanan

proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından Tablo 2.12’de verilen substrat çözeltisi ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutuldu, stretch film ile kaplandı ve karanlıkta saklandı. Substrat çözeltisi her seferinde taze olarak hazırlandı ve kullanımdan sonra atıldı.

Tablo 2.12 : Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama.

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)
Çözelti A*	
1,5 M Tris-HCl, pH 8,80	2,97
1 M NaCl	4,0
100 mM MgCl₂	0,82
100 mM ZnCl₂	0,04
DEA	0,096
NBT	12,2 mg
Toplam Hacim	40
Çözelti B	
PMS	2 mg/ml
Çözelti C	
BCIP	5,44 mg
Substrat çözeltisi; A çözeltisi ile C çözeltisi ve 0,268 ml B çözeltisinin karışımından hazırlandı.	

*Çözeltinin pH’sı son hacmi tamamlamadan önce satüre Tris ile 9,55’e ayarlandı.

2.2.16. Mikrozomal Fraksiyonların Hazırlanması

Transforme maya hücrelerinden mikrozomal fraksiyonların hazırlanmasında Pompon ve diğ. (1996) metodu laboratuvarımızda optimize edilerek aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.2.16.1. Stok Çözeltiler

TE tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA): 1 M Tris-HCl pH 7,4’ten 50 ml, 100 mM EDTA’dan 10 ml alınarak karıştırıldı ve son hacim distile su ile 1 lt’ye tamamlandı.

TEK tamponu (0,1 M KCl): 0,37 gr KCl 50 ml TE tamponunda çözüldü.

TEM tamponu (71 mM β-merkaptotanol): 0,25 ml β-merkaptotanol 50 ml TE tamponu ile karıştırıldı.

TMS tamponu (1,5 M sorbitol, 20 mM Tris-MES pH 6,3, 2mM EDTA): 0,048 gr Tris az miktar distile su ile çözüldü ve pH’sı 1 M MES ile 6,3’e ayarlandı.

İçine 2,7 gr sorbitol ve 0,04 ml 0,5 M EDTA'dan eklenerek son hacim distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

TES A tamponu (1,5 M sorbitol): 27,4 gr sorbitol 100 ml TE tamponunda çözüldü.

TES B tamponu (0,6 M sorbitol): 2,18 gr sorbitol 20 ml TE tamponunda çözüldü.

TEG (%20 gliserol): 4 ml gliserol 20 ml TE tamponu ile karıştırıldı.

2.2.16.2. Prosedür

48 saatlik indüklenmiş maya hücreleri kısım 2.2.8'de belirtildiği şekilde ancak daha büyük hacimde (1 lt) hazırlandı. 48 saatlik indüklenmeden sonra besiyerinin tamamı 1.500 xg'de 5 dk çöktürülerek uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet 50 ml TEK tamponu ile yıkandı ve 1.500 xg'de 5 dk çöktürüldü. Pelete 30 ml TEM tamponundan eklenerek 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 1.500 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Pelete bu kez 10 ml TMS tamponu ve 5 mg Litikaz eklenerek 28 °C'de 130 rpm çalkalama hızında OD₆₀₀ 10 olana kadar (yaklaşık 2 saat) çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sferoblastları toplamak için 7.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

Daha sonra sferoblastlar nazikçe 60 ml TES A tamponu ile yıkanarak 7.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Peletin üzerine 20 ml TES B tamponundan eklenerek önce 2 dk boyunca yüksek hızda vortekslendi, daha sonra 2 dk boyunca 100 Wa'da sonike edildi. 5 dk buzda inkübe edildikten sonra 3.500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Nükleer fraksiyonları ve parçalanmamış hücreleri içeren pelet atıldı. Süpernatantın tamamı 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek mitokondri uzaklaştırıldı. Süpernatantın hacmi ölçülerek içine son konsantrasyonu 18 mM olacak şekilde CaCl₂'den eklendi ve 30 dk buzda inkübe edildi. 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek oluşan pelete TEG solüsyonundan 2 ml eklenerek cam homojenizatörde mikrozomal fraksiyon iyice homojenize olana kadar çözüldü ve 1,5 ml'lik eppendorf tüplere bölündü. Önce azot gazı ile gazlanıp daha sonra sıvı azota daldırılıp hızla dondurulan tüpler -80 °C'ye kaldırıldı.

2.2.17. Örneklerin Bişinkoninik Asit (BCA) ile Protein Tayini

Örneklerin protein miktar tayini Smith ve diğ. (1985) tarafından verilen BCA yöntemi aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

2.2.17.1. Reaktifler

Mikro-BCA reaktifi A: 8 gr sodyum karbonat monohidrat, 1,6 gr sodyum tartarat bir miktar suda çözülür, pH sodyum bikarbonat ile 11,25'e titre edildi. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Mikro-BCA reaktifi B: 4 gr BCA 100 ml distile suda çözüldü.

Mikro-BCA reaktifi C: 0,4 gr bakır sülfat tartılır, 10 ml distile suda çözüldü.

Mikro-BCA solüsyonu: 25(A):25(B):1(C) (v/v/v) olacak şekilde kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Reaktifleri karıştırırken önce A ve C reaktifi karıştırılıp sonra B reaktifi eklenir.

Standartların hazırlanışı: Standart olarak kullanılan BSA 0,02 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,1 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı.

Örneklerin hazırlanışı: Örnekler 1/200 oranında olacak şekilde seyreltildi.

2.2.17.2. Prosedür

Tablo 2.13'de verilen değerler 96 kuyulu plakaya kondu. Üzerlerine 100 µl BCA solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. 15 dk 60 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda OD₅₆₂'de köre karşı okundu. Standart BSA grafiğinden elde edilen eğim kullanılarak hücrelerin protein miktarları hesaplandı.

Tablo 2.13: BCA reaksiyon karışımı.

	Std. Protein (µl)	Bilinmeyen Protein (µl)	Distile Su (µl)	BCA (µl)
Kör	-	-	100	100
Std 1 (0,02 mg/ml)	100	-	-	100
Std 2 (0,05 mg/ml)	100	-	-	100
Std 3 (0,075 mg/ml)	100	-	-	100
Std 4 (0,1 mg/ml)	100	-	-	100
5	-	25	75	100
6	-	50	50	100
7	-	100	-	100

2.2.18. Sitokrom P450 Tespiti

Sitokrom P450 konsantrasyonu Omura ve Sato (1964) metodu ile Shimadzu UV-1800 marka çift ışık kaynaklı spektrofotometrede aşağıda belirtildiği şekilde ölçüldü.

2.2.18.1. Stok Çözeltiler

Numune Seyreltme Tamponu (0,1 M potasyum fosfat pH 7,70, %30 gliserol, 1 mM EDTA): 2,72 gr KH_2PO_4 20 ml distile suda çözüldü. 1,74 gr K_2HPO_4 10 ml distile suda çözüldü. K_2HPO_4 'ün pH'sı KH_2PO_4 ile 7,70'ye ayarlandı. Elde edilen 1 M'lık fosfat tamponundan 5 ml alınarak 0,5 ml 0,1 M'lık EDTA ile karıştırıldı ve içine 15 ml gliserol eklenerek son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

%10 Kolat: 0,5 gr kolat 5 ml distile suda çözüldü.

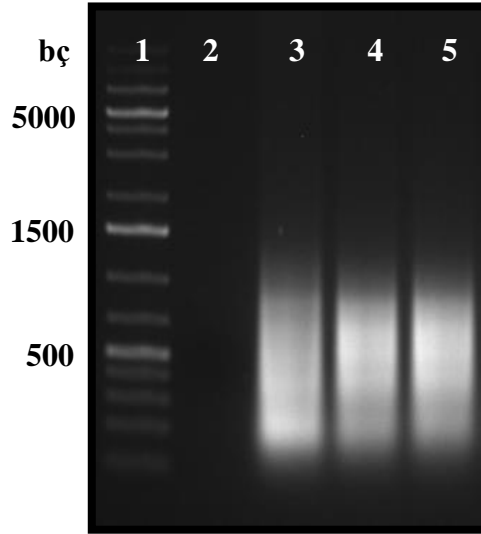
2.2.18.2. Prosedür

Mikrozomal fraksiyonlar 5 ml numune seyreltme tamponu ile sulandırıldıktan sonra içine 0,5 ml %10'luk kolat'tan eklenerek çözümlendirildi. Daha sonra seyreltilmiş numuneler 2 adet kapaklı küvete 2,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve her iki küvet (örnek ve referans) spektrofotometreye yerleştirilerek baseline alındı. Örnek küveti 20 sn CO ile gazlandıktan sonra her iki küvete bir pinçik sodyum dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) eklendi. İndirgenmiş örnek (Fe^{2+}) 40 sn daha CO ile gazlanıp kapakları sıkıca kapatıldıktan 7-8 dk sonra CO-fark spektrumu [$(\text{Fe}^{2+}\text{-CO}) - (\text{Fe}^{2+})$] kaydedildi. Sitokrom P450 miktarı $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. Hesaplama kullanılan absorbans değerleri 450 nm ve 490 nm'deki absorbanslar arasındaki farktır.

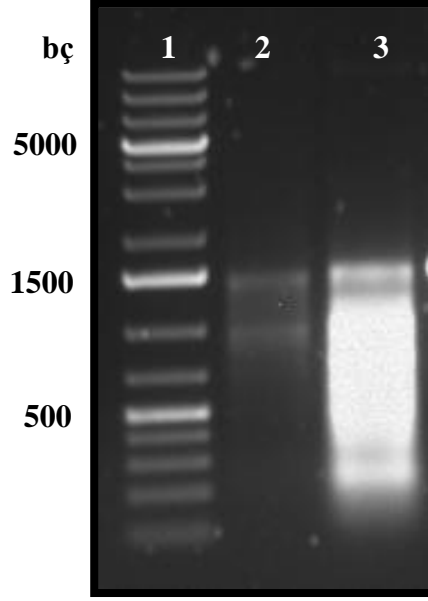
3.BULGULAR

3.1. *Pinus brutia*'dan RNA İzolasyonları

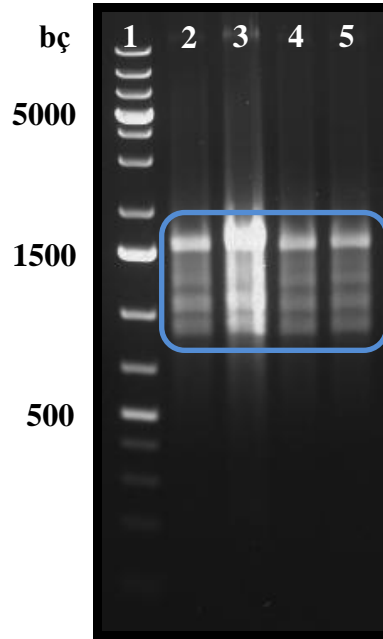
Materyal ve Metod bölümünde belirtilen yöntemlerle yapılan RNA izolasyonlarından sonra yapılan %1'lik agaroz jel elektroforezinde ilk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 2 µl RNA örneği, 7 µl distile su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipetle yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Şekil 3.1-3.5'te RNA örnekleri görüntülenmiştir. TRIZol metodu ile RNA izolasyonunda başarılı olunamadı. Suzuki ve diğ. (2008) metodu ile de pek başarılı olunamadı. Azevedo ve diğ. (2003) metodu ile RNA izolasyonunda başarı sağlandı. Invitrogen PureLink RNA Minikit ve Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile RNA izolasyonlarında başarılı olundu.



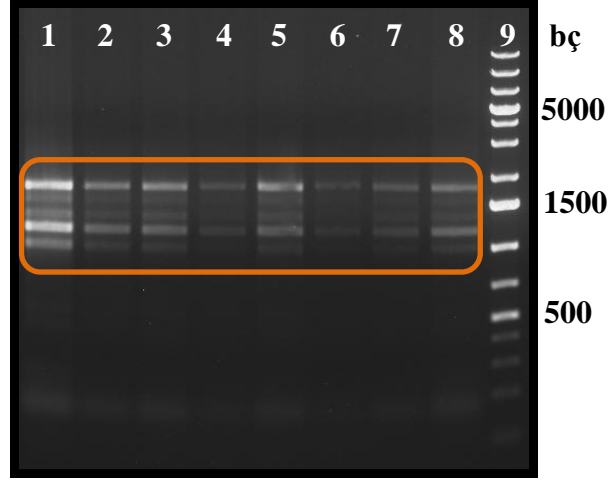
Şekil 3.1 : *Pinus brutia* RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-5; TRIZol metodu ile izolasyonu gerçekleştirilen RNA örnekleri.



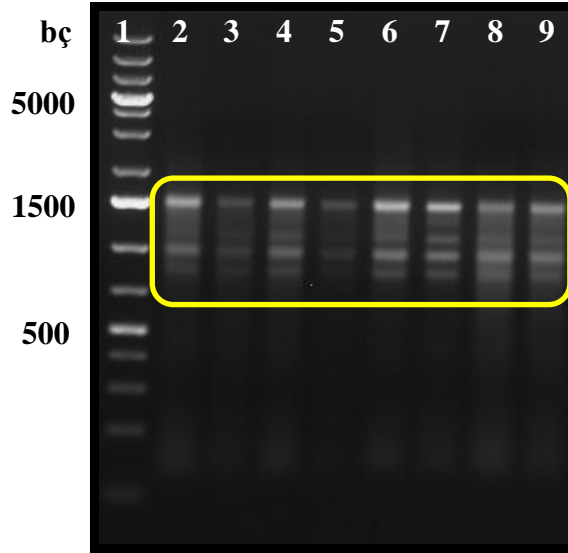
Şekil 3.2 : *Pinus brutia* RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-3; Suzuki ve diğ. (2008) metodu ile izolasyonu gerçekleştirilen RNA örnekleri.



Şekil 3.3 : *Pinus brutia* RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-4; Azevedo ve diğ. (2003) metodu ile izolasyonu gerçekleştirilen RNA örnekleri.



Şekil 3.4 : *Pinus brutia* RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1-8; Invitrogen PureLink RNA Minikit ile izolasyonu gerçekleştirilen RNA örnekleri, kuyucuk 9; 1 Kb standart DNA.

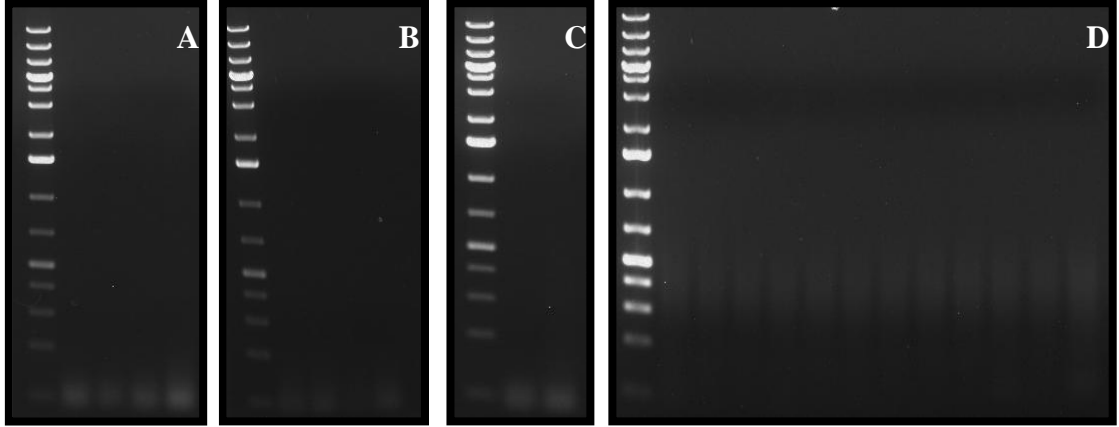


Şekil 3.5 : *Pinus brutia* RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-9; Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile izolasyonu gerçekleştirilen RNA örnekleri.

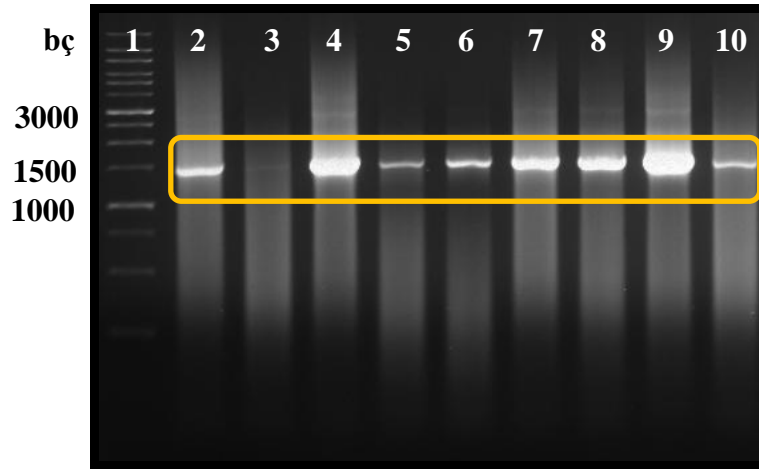
3.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Çeşitli metodlarla izolasyonu gerçekleştirilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid oligo d(T) primer ve RevertAid Ters Transkriptaz kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütme sonunda TRizol metodu, Suzuki ve diğ.

(2008) metodu, Azevedo ve diğ. (2003) metodu ve Invitrogen PureLink RNA Minikit ile elde edilen RNA'lardan herhangi bir PZR ürünü elde edilemedi (Şekil 3.6). Ancak Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile elde edilen RNA'lardan yaklaşık 1464 bp'lik bir ürün elde edildiği gözlemlendi. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.6 : TRIZol metodu (A), Suzuki ve diğ. (2008) metodu (B), Azevedo ve diğ. (2003) metodu (C) ve Invitrogen PureLink RNA Minikit (D) ile elde edilen RNA'lardan *Pinus brutia* CYP720B gen bölgesi RT-PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

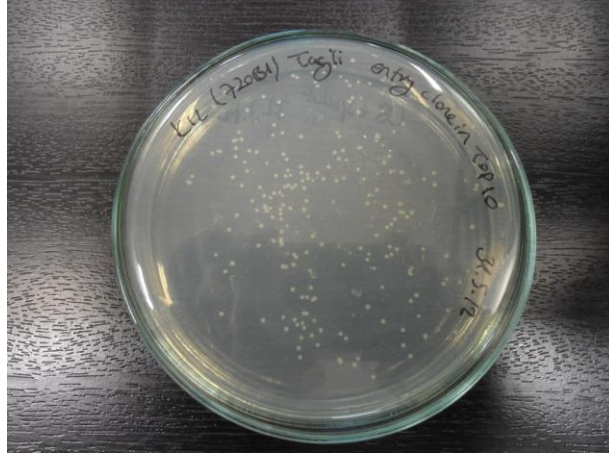


Şekil 3.7 : Agilent Bitki RNA İzolasyon Minikit ile elde edilen RNA'lardan *Pinus brutia* CYP720B gen bölgesi RT-PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2 -10; CYP720B gen bölgesine ait 1464 bp'lik PZR ürünleri.

3.3. One Shot® Kimyasal *E. coli* Transformasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmidin çoğaltılması için TOP10 *E.coli* kompetan hücrelere plazmidin aktarımı gerçekleştirildi ve ~100 adet

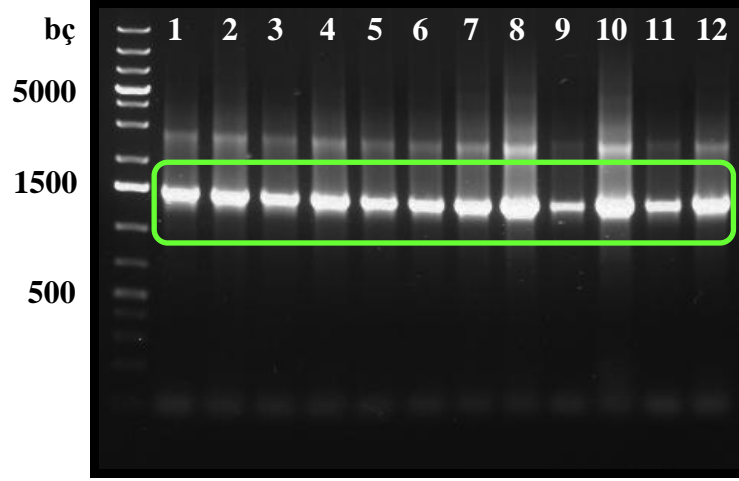
koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.8). Sonrasında pozitif koloni taraması yapıldı (Şekil 3.9). Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütmenin sonunda tüm kolonilerin pozitif olduğu gözlemlendi. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.8 : TOP10 *E. coli* kompetan hücrelere plazmid aktarımı sonucu gelişen kolonilerin görüntüsü.



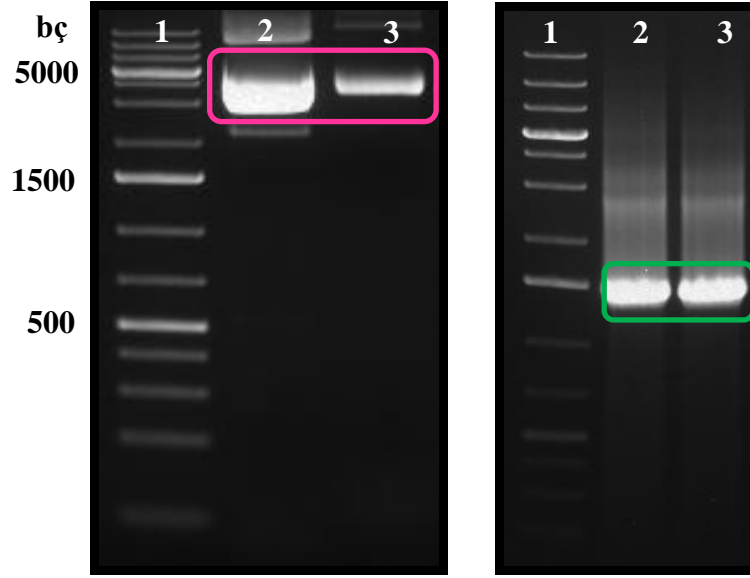
Şekil 3.9 : TOP10 *E. coli* kompetan hücrelere plazmid aktarımı sonucu pozitif koloni taraması.



Şekil 3.10 : PZR kontrol ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-13; farklı kolonilerden elde edilen giriş klonu PZR kontrol ürünleri (1464 bç).

3.4. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pozitif olan kolonilerden plazmid izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ve plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapıldı. Elde edilen plazmitler %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 5 µl plazmid DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Elde edilen plazmid DNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.11'de (soldaki jel) verilmiştir. Elde edilen giriş klonlarının pozitif olup olmadığının anlaşılması için PZR yapıldı. Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütmenin sonunda giriş klonlarının pozitif olduğu gözlemlendi. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.11'de (sağdaki jel) verilmiştir.



Şekil 3.11 : Plazmid izolasyonu ve PZR kontrol ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Soldaki jel: kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-3; farklı kolonilerden plazmid izolasyonu sonrası elde edilen giriş klonu örnekleri (1464+2817 bç). Sağdaki jel: kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-3; elde edilen giriş klonu örneklerinin kontrol PZR'nu (1464 bç).

3.5. Sekans Analizi

Elde edilen plazmid DNA doğrulanmak üzere sekans analizi için Tablo 2.5'te verilen GW primerleri ile BM Yazılım Danış. Lab. Sis. Ltd. Şti. aracılığı ile GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderildi ve sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans analizinden gelen sonuçlar ChromasPro Version 1.5 programı kullanılarak gen dizisi elde edildi ve literatürdeki diğer örneklerle BLAST edilerek karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucu %99 oranında *Pinus taeda* CYP720B mRNA sekansı ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Belirlenen gen dizisi aşağıda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) geni nükleotit dizisi.

```
ATGGGATCGGGCATCATGACGGAGACTCTTACAGATTCATGGCTAGTGGGTTTGCTC
TGTTTCGTGCTGGGCTTCTTACTGCTTCAGCTCTACAAATTAGTGTGGGGGGCGAGC
AGTCGAGCCTACAAGTTGCCGCCGGGTTCTACAGGGTGGCCACTGATTGGAGAAACC
ATTAGCTTCTTTCGAGGTATTAATTCCACTGCTCAACCACGCCAGTTCATTCAAGAG
CGAGAGCGAAGGTATGGGGAGATATTCAGATCAAATTTGTTTGGAGATCTCGAATT
GTTGTGTCCGTGGATCCAGAATTCAACAAACATGTCCTGCAACACGAAGGCAGGCAA
TTTCAGGCCAACTATCCCAAACCTCTTCGAAATCTCATTGGCAAATATGGTTTGCTT
TCGGTACACGGAGATCTCCAGAAGAAGTTACATGGGGCGGCTGTAAATTTGCTGAGG
TTCGAGAGGTTGAGCGTGGACTTCATGGAGGACATACAGAACCCTTCTGCACATCACT
TTGGCCAAATGGCAAGCCAAGAGGGATATACATCTTCAAGAAGAGTGCCATCAGCTT
GTTCTGAATTTGATGGCCAAACAATTGCTGGACTTATCGCCATCCAAGGACACTGAA
GAGATTTGTGAAGCGTTTGGCCATTTCTCTGAAGCTCTCCTCGCTGTTCCCATCAA
ATCCCGGGTACCAAGTATGCAAGAGGATTTAAGGCCAGGGAATTTTGTATAAAAAAG
ATTTACGAGAGTATCGAGGATAGAAGGCAGCATCCAGAAGCTGTACATAATGATTTG
TTAACAAAACCTCTTGAAAGAAGACTCGTTTTTCAGAAGAAATTATAGCAGATTTTATA
CTGTTCCCTGCTCTTTGCTGGTCATGAGACATCGTCCAGATCCATGTCATTCGCCATC
AAATTTCTCACCGACTGTCCCCGAGCACTCGAGGAACTTAAGGCTGAGCACGACGCT
CTGTTAAAGAGGAAGGGGAATCTAAAAAATCAAAGCTCAATTGGGATGATTACCAG
TCGTTGAAATTCACCCAATGTGTCATACATGAAACACTTCGCGTCGGCAACTTTGGT
CCAGGAGTTTTTCAGAGAAACAAAAGAAGACATTA AAAACCAAAGGAGGCTTTGTCATT
CCAAGAGGATGGACAGTGTATGTGTTTCTAACAGGCACCCATCTGGACGAGAAGTAC
CATTCTTCTGCACTCAAGTTTGACCCATGGCGCTGGCAACCGCATCTGCAAGATCAA
GAGCTCTTAAAGAACCCTCGTTTTATGCCTTTTGGAGGAGGTGCCAGGCTCTGTCCA
GGAATGCATCTGGCAAAGATGGAGCTGGCCCTCTTTCTTCATAACTTCGTCACCCAAA
TTCAGATGGGAGGCACTGCAGGATGATAATATCTCCTACTTCCCTTTTCTCGCTTG
ATCAAGGGCCTCCCAATCCGACTACGTCTTCGAGAGTGA
```

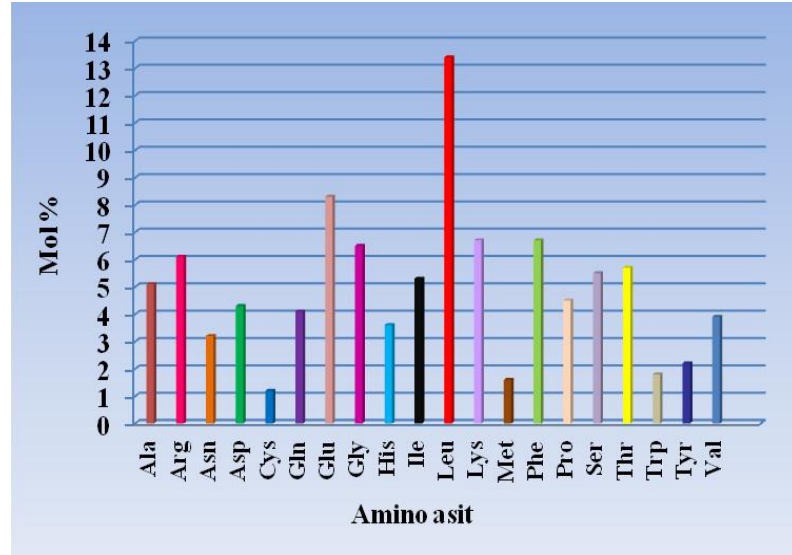
3.6. Biyoinformatik Analizler

3.6.1. Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması

Elde edilen *Pinus brutia* CYP720B gen dizisinin karşılığı amino asit dizisi ExPASy Proteomics Server (www.expasy.ch) kullanılarak belirlendi. Proteinin 487 amino asitten oluştuğu ve moleküler ağırlığının da yaklaşık 53.570 Da olduğu bulunmuştur.

Belirlenen CYP72B proteinin amino asit dizisi aşağıda verilmiştir. Elde edilen amino asit dizisi ile *Pinus taeda* sitokrom P450 CYPB amino asit dizisi arasında 5 amino asitlik bir farklılık gözlemlendi. Sonuçlar Tablo 3.2’de verilmiştir. Dizinin amino asit kompozisyonu Şekil 3.12’de verilmiştir. Buna göre amino asitlerin büyük bir kısmının non-polar (A, C, F, G, I, L, M, P, V) amino asitler olduğu ve bunların total amino asitlerin % 48,2’si gibi yüksek oranlarda bulunduğu,

yük grubu amino asitlerin (D, E, H, K, R) ise %29'unu kapsadığı görüldü. Alifatik amino asitler (I, L, V) total amino asitlerin %22,6'sını kapsarken, aromatik grubun %14,3'ünü kapsadığı bulundu. CYP720B'de bulunan total amino asitlerin %13,4'ü gibi yüksek bir oranını alifatik non-polar bir amino asit olan lösin kapsamaktadır.



Şekil 3.12 : *Pinus brutia* CYP720B geninin amino asit kompozisyonu.

3.6.2. Sinyal Peptid Analizi

Sitokrom P450 proteinleri ökaryotlarda çoğunlukla ER'a yerleştikleri için sinyal peptid analizi "Signal P" programı ile yapıldı. Dizinin 5' amino ucunda 37 amino asitlik bir sinyal peptid tespit edildi. Sinyal peptid ayrılma bölgesinin 36. ve 37. amino asitler arasında olduğu bulundu. Sinyalin bu proteini endoplazmik retikuluma taşıdığı ve proteinin endoplazmik retikulum membranına yerleştiği tahmin edilmektedir (Şekil 3.13).

3.6.3. Demir Bağlama Domainin Tespiti

Sitokrom P450 gen ailesinde yüksek derecede korunmuşluk gösteren ve aktif bölge amino asitlerini taşıyan demir (hem) bağlama domaininin (D-bölgesi) 440. ve 450. amino asitler arasında olduğu tespit edildi. Bu dizi "FGGGARLCPG" şeklindedir. K-heliksin, "ETLR" dizisini (363. ve 366. amino asitler arasında) içerdiği görüldü. Pek çok P450'de oksijen bağlanması için gerekli olan I-heliksin 301. ve 306. amino asitler arasında "AGHETS" motifini içerdiği tespit edildi. Pek çok ökaryotta korunmuş olan C-heliksin "WQAKR" dizisini içerdiği ve 181. ve 185. amino asitler arasında olduğu tespit edildi. Bununla birlikte proline zengin motif

(PPGP) genellikle C-heliks ile membran çapa bölgesi arasında iken *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) dizisinde tespit edilememiştir.

Tablo 3.2: *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) enzimi amino asit dizisi.

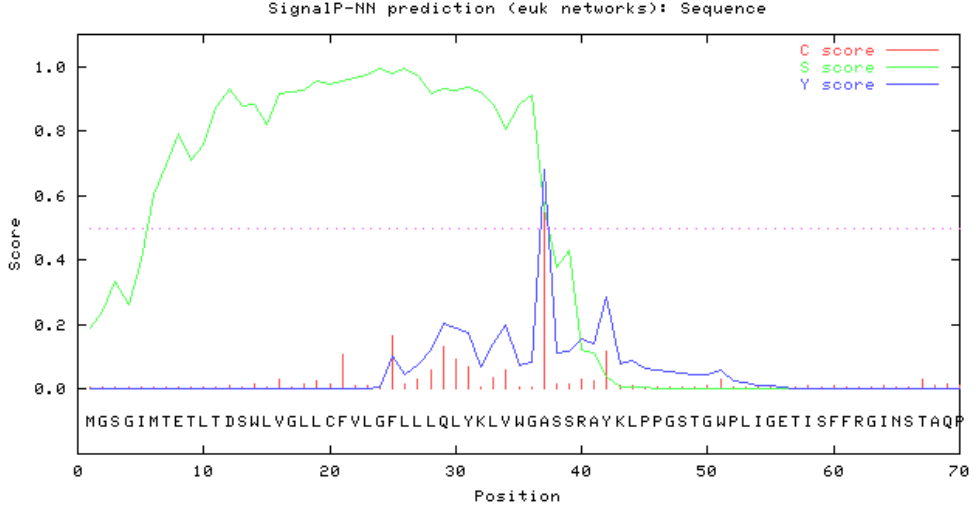
1	Met G S G I Met T E T L T D S W L V G L L C F V L G F L L L Q
	L
30	L Y K L V W G A S S R A Y K L P P G S T G W P L I G E T I S F
61	F R G I N S T A Q P R Q F I Q E R E R R Y G E I F R S N L F G
	Q
92	R S R I V V S V D P E F N K H V L Q H E G R Q F Q A N Y P K P
123	L R N L I G K Y G L L S V H G D L Q K K L H G A A V N L L R F
	R
	C-heliks
154	E R L S V D F Met E D I Q N L L H I T L A K W Q A K R D I H L
	E
184	Q E E C H Q L V L N L Met A K Q L L D L S P S K D T E E I C E
213	A F G H F S E A L L A V P I K I P G T K Y A R G F K A R E F L
244	I K K I Y E S I E D R R Q H P E A V H N D L L T K L L K E D S
275	F S E E I I A D F I L F L L F A G H E T S S R S Met S F A I K
	I-heliks
305	F L T D C P R A L E E L K A E H D A L L K R K G N L K N Q K L
336	N W D D Y Q S L K F T Q C V I H E T L R V G N F G P G V F R E
	K-heliks
367	T K E D I K T K G G F V I P R G W T V Y V F L T G T H L D E K
398	Y H S S A L K F D P W R W Q P H L Q D Q E L L K N P S F Met P
	C-bölgesi
428	F G G G A R L C P G Met H L A K Met E L A L F L H N F V T K F
	Hem-bağlanma bölgesi
457	R W E A L Q D D N I S Y F P F P R L I K G L P I R L R L R E
487	Stop K

3.6.4. Transmembran Segment Analizi

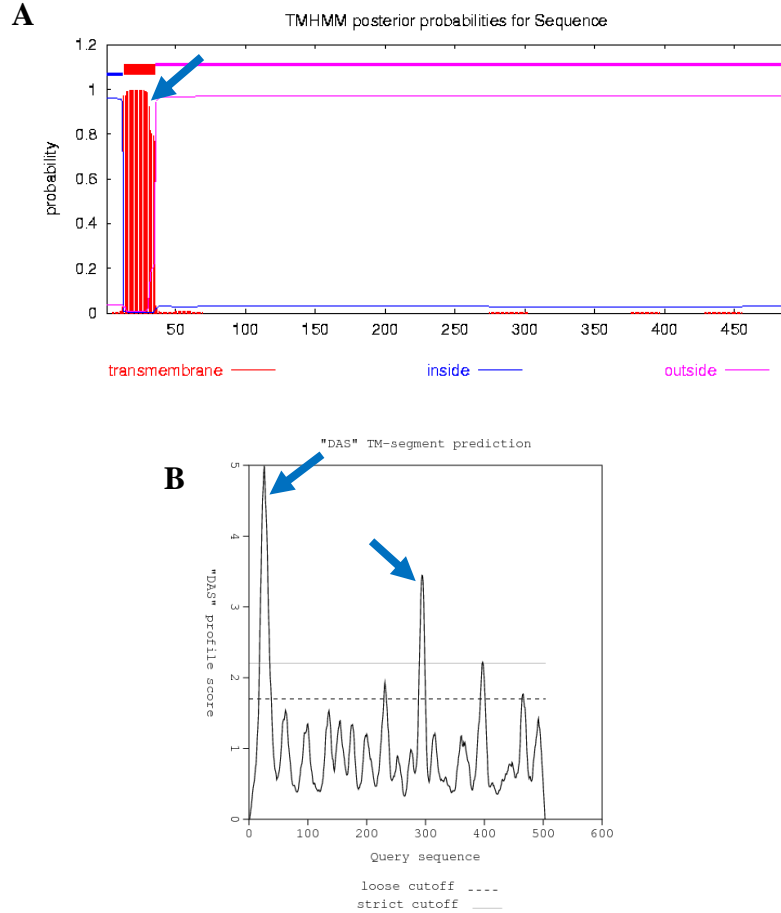
Proteinin transmembran segment analizinde Şekil 3.14'te görüldüğü gibi TMHMM analizi (A) ile sinyal peptit olarak bir adet pik tespit edilirken, DAS analizi (B) ile 2 adet potansiyel transmembran segment tespit edildi.

3.6.5. Glikolizasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan glikozilasyon bölgelerinin tespitinde dizide 2 adet N-glikozilasyon olma olasılığı olan bölge tespit edildi (Şekil 3.15).



Şekil 3.13 : “Signal P” programında sinyal peptit analizi.



Şekil 3.14 : CYP720B'nin transmembran analizi. A: TMHMM programı, B: DAS programı.

```

METGSGIMETTETLTD SWLVGLL CFVLGFLLL QLYKLVWGASSRAYKLPPGSTGWPLIGETISFFRG NSTA QPRQFIQE 80
RERRYGEIFRSNLFGRSRIVVSVDPEFNKHVLQHEGRQFQANYPKPLRNLIGKYGLLSVHGD LQKKLHGA AVNLLRFERL 160
SVDFMETEDIQNLLHITLAKWQAKRD IHLQEECHQLVNLNLMETAKQLLDLSPSKDTEEICEAFGHFSEALLAVPIKIPGT 240
KYARGEKAREFLIKKIYESIEDRRQHPEAVHNDLLTKLLKEDSFSEEIIADFI LFLLFAGHETSSRSMSFAIKFLTDC 320
PRALEELKAEHDALLKRKGNLKNQKLNWDDYQSLKFTQCVIHE TLRVGNFGPGVFRETKEDIKTKGGFVIPRGWTVYVFL 400
TETHLDEKYHSSALKFDPWRWQPHLQDQELLKNPSFMETPFGGGARLCPGMETHLAKMETELALFLHNFVTKFRWEALQD 480
DNIS FFPRLIKGLPIRLRLRE
.....N..... 80
..... 160
..... 240
..... 320
..... 400
..... 480
.....N..... 560
(Threshold=0.5)

```

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	69 NSTA	0.6702	(9/9)	++
Sequence	433 NPSF	0.4782	(6/9)	-
Sequence	482 NISY	0.6029	(7/9)	+

Şekil 3.15 : “NetNGlyc” programında N-glikozilasyon bölgelerinin tespiti.

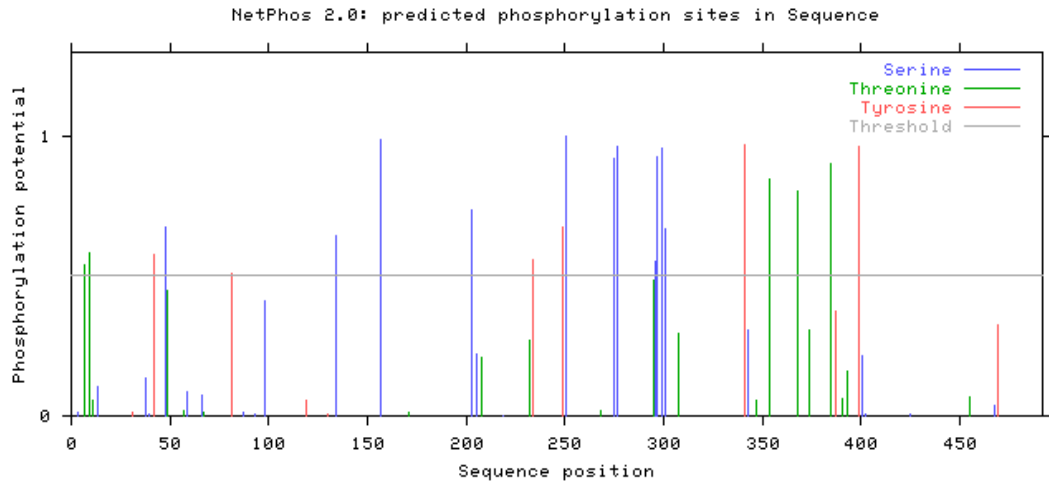
3.6.6. Fosforilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan fosforilasyon bölgelerinin tespiti analizinde dizide 11 adet Serin 6 adet Tirozin ve 5 adet Treonin fosforilasyonu olma olasılığı olan bölgeler tespit edildi (Şekil 3.16).

```

MGSGIMETTETLTD SWLVGLL CFVLGFLLL QLYKLVWGASSRAYKLPPGSTGWPLIGETISFFRGINSTAQPRQFIQERERR 80
YGEIFRSNLFGRSRIVVSVDPEFNKHVLQHEGRQFQANYPKPLRNLIGKYGLLSVHGD LQKKLHGA AVNLLRFERLSVDF 160
MEDIQNLLHITLAKWQAKRD IHLQEECHQLVNLNLMETAKQLLDLSPSKDTEEICEAFGHFSEALLAVPIKIPGTKYARGFKA 240
REFLIKKIYESIEDRRQHPEAVHNDLLTKLLKEDSFSEEIIADFI LFLLFAGHETSSRSMSFAIKFLTDCPRALEELKAE 320
HDALLKRKGNLKNQKLNWDDYQSLKFTQCVIHE TLRVGNFGPGVFRETKEDIKTKGGFVIPRGWTVYVFLTGTHLDEKYH 400
SSALKFDPWRWQPHLQDQELLKNPSFMETPFGGGARLCPGMETHLAKMETELALFLHNFVTKFRWEALQDDNISYFFPRLIKGLP 480
IRLRLRE 560
.....T.T.....Y.....S..... 80
Y.....S.....S.....S..... 160
.....S.....Y..... 240
.....Y.S.....S.S.....SS.S.S..... 320
.....Y.....T.....T.....T.....Y..... 400
..... 480
..... 560
Phosphorylation sites predicted: Ser: 11 Thr: 5 Tyr: 6

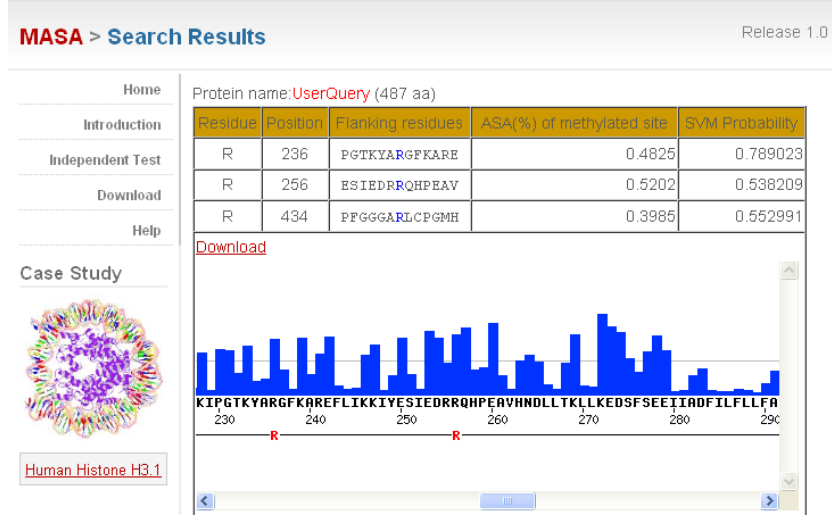
```



Şekil 3.16 : “NetPhos 2.0” programında fosforilasyon bölgelerinin tespiti.

3.6.7. Metilasyon Bölgelerinin Belirlenmesi

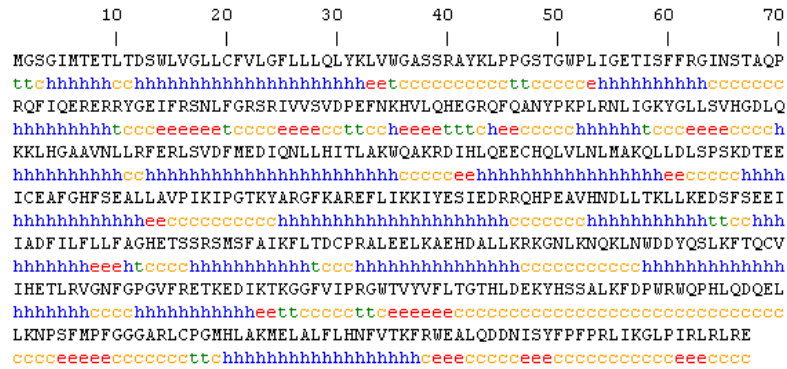
Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan metilasyon bölgelerinin tespiti analizinde dizide 3 adet Arjinin (R) amino asit kalıntısında metilasyon olma olasılığı tespit edilirken, Lizin (K) amino asit kalıntısında metilasyon tespit edilemedi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 : “MASA” programında metilasyon bölgelerinin tespiti.

3.6.8. İkincil Yapı Analizi

Pinus brutia CYP720B'nin ikincil yapısı analizinde amino asitlerin %49,08'inin alfa heliks yapısına, %4,72'sinin ise beta dönüş katıldığı tespit edildi (Şekil 3.18).



Sequence length : 487

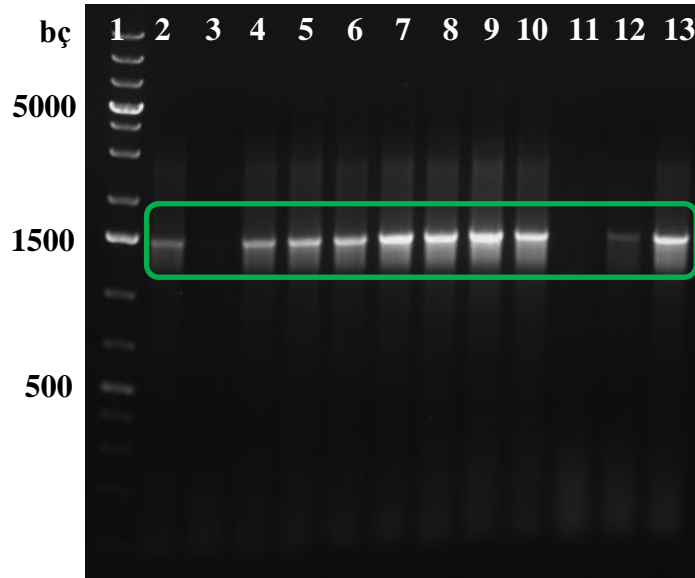
SOPMA :

Alpha helix	(Hh)	: 239 is	49.08%
3 ₁₀ helix	(Gg)	: 0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	: 0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	: 0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	: 54 is	11.09%
Beta turn	(Tt)	: 23 is	4.72%
Bend region	(Ss)	: 0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	: 171 is	35.11%
Ambiguous states (?)		: 0 is	0.00%

Şekil 3.18 : “NPS SOPMA” programında ikincil yapı analizi.

3.7. LR Rekombinasyonu Sonrası DH5α Kimyasal *E. coli* Transformasyonu ve PZR ile Kontrolü

Giriş klonu ve hedef vektör kullanılarak yeni bir ekspresyon klonu oluşturuldu, reaksiyon LR Klonaz™ II enzim karışımı ile gerçekleştirildi. LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan ekspresyon klonunun çoğaltılması için DH5α *E. coli* kompetan hücrelere transforme edildi ve PZR ile pozitif klonların kontrolü yapıldı. Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütmenin sonunda 3 ve 11 no'lu kuyulardakiler hariç tüm kolonilerin pozitif olduğu gözlenmiştir. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.19'da verilmiştir.

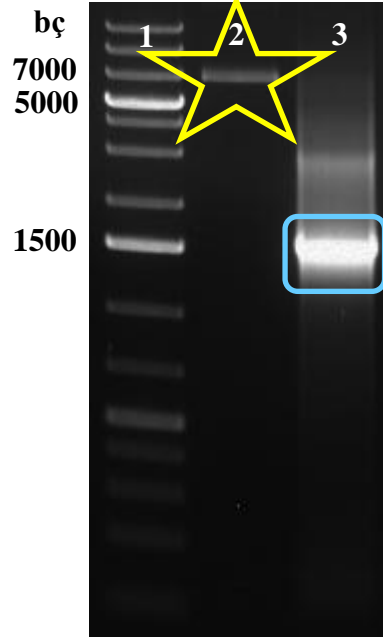


Şekil 3.19 : DH5α hücrelere transforme edilen pDEST™14 hedef vektör kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-13; LR rekombinasyonu sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün farklı kolonilerden elde edilen kontrol PZR ürünleri (1464 bç).

3.8. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pozitif olan kolonilerden plazmid izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ve plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapıldı. Elde edilen

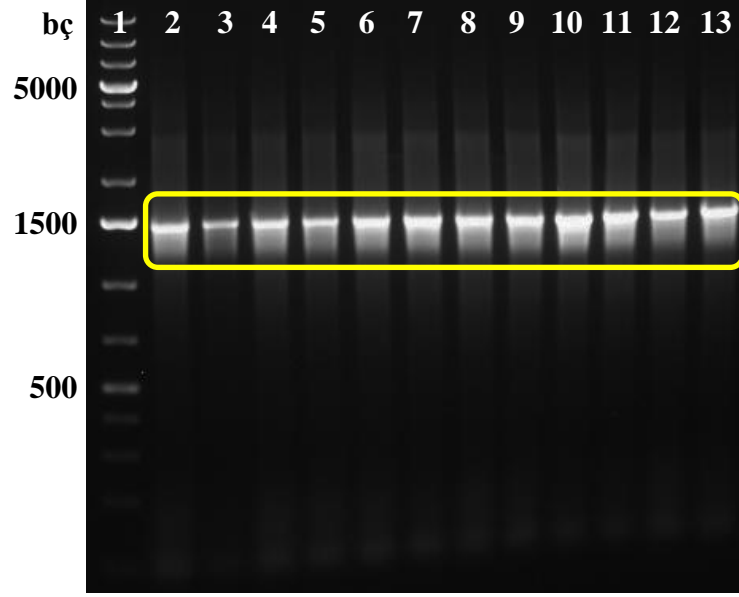
ekspresyon klonlarının pozitif olup olmadığının anlaşılması için PZR yapıldı. Elde edilen plazmid DNA ve PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yürütmenin sonunda giriş klonunun pozitif olduğu gözlenmiştir. Elde edilen plazmid DNA ve PZR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20 : LR rekombinasyonu sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün koloniden elde edilen plazmid DNA ve kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2; plazmid izolasyonu sonrası elde edilen ekspresyon klonu örneği (1464+6422 bç), kuyucuk 3; kontrol PZR ürünü (1464 bç).

3.9. BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan *E. coli* Hücrelere Transformasyon ve PZR ile Pozitif Klonların Kontrolü

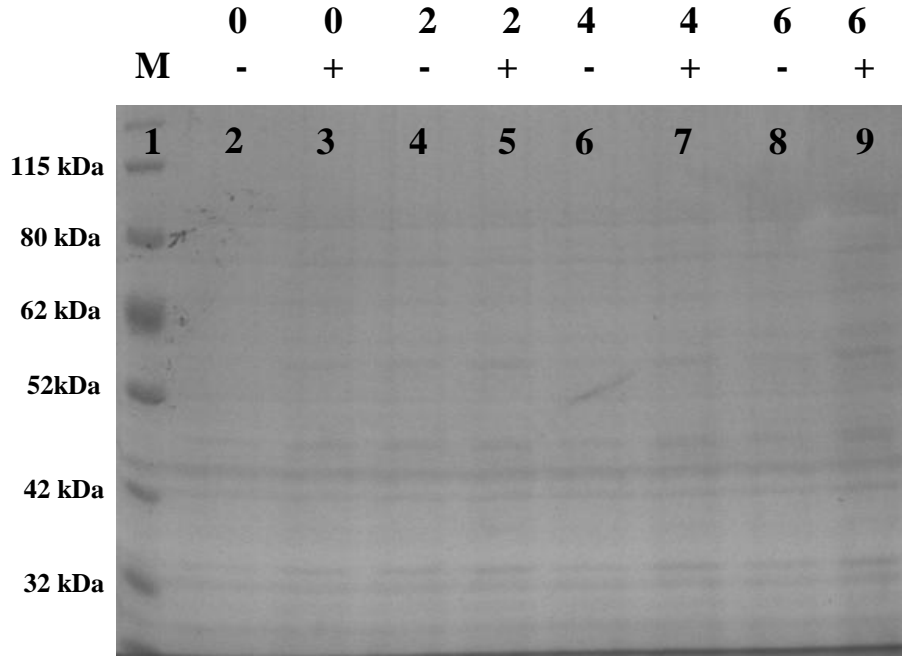
İzole edilen ekspresyon plazmidi, ekspresyonun gerçekleşeceği uygun canlı olan BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan *E. coli* hücrelere transforme edildi ve bu reaksiyonun PZR yöntemi ile kontrolü gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütmenin sonunda tüm kolonilerin pozitif olduğu gözlenmiştir. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.21 BL21-AI hücrelere transforme edilen CYP720B gen bölgesini içeren ekspresyon vektörü kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-13; farklı kolonilerden elde edilen kontrol PZR ürünleri (1464 bç).

3.10. Protein Ekspresyonu

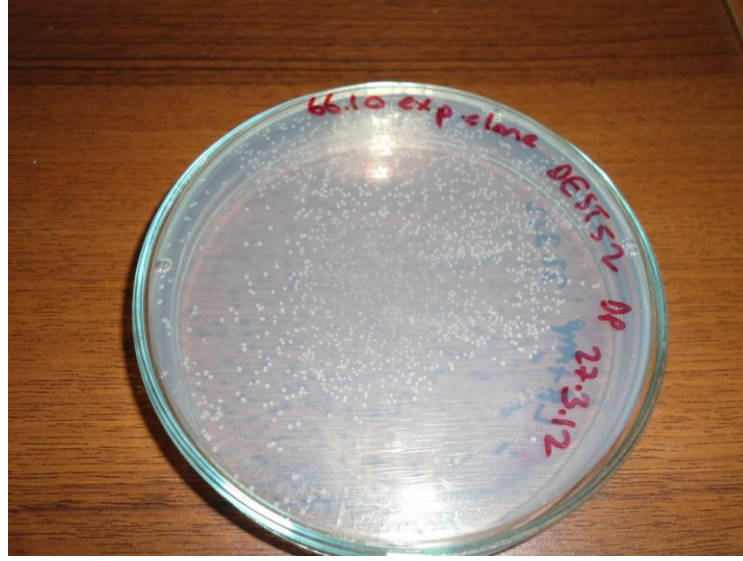
BL21-AI™ One Shot® Kimyasal Kompetan *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilen ve PZR ile kontrolü yapılan pozitif klonlar, 100 µl/ml amfisilin içeren LB besiyerinde %0,2 L-arabinoz katılarak 6 saat boyunca büyütüldü ve iki saatte bir örnek alınarak uygun ifade zamanı belirlendi, alınan örnekler SDS PAGE'e yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.22). Ancak kompetan *E. coli* hücresinde *Pinus brutia* CYP720B protein ekspresyonunun gerçekleşmediği görüldü.



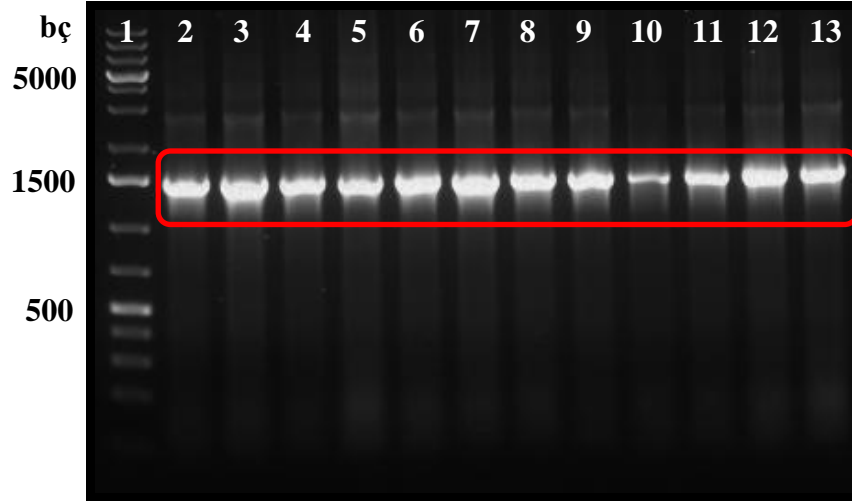
Şekil 3.22 : BL21-AI hücrelerinde ifade edilmiş protein profillerinin SDS-PAJE görüntüsü: Kuyucuk 1; standart proteinler, kuyucuk 2; indüklenmemiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 3; indüklenmiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 4, 6, 8; indüklenmemiş 2., 4., 6. saat proteinleri, kuyucuk 5, 7, 9; indüklenmiş 2., 4., 6. saat proteinleri.

3.11. LR Rekombinasyonu Sonrası DH5α Kimyasal *E. coli* Transformasyonu ve PZR ile Kontrolü

Giriş klonu ve hedef vektör kullanılarak yeni bir ekspresyon klonu oluşturuldu, reaksiyon LR Klonaz™ II enzim karışımı ile gerçekleştirildi. LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan ekspresyon klonunun çoğaltılması için DH5α *E. coli* kompetan hücrelere transforme edildi ve 100'den fazla koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.23). PZR ile pozitif klonların kontrolü yapıldı. Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İlk kuyucuğa 3 µl 1 Kb standart DNA'dan, diğer kuyucuklara ise 10 µl DNA örneği 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek yüklendi ve 90 Volt, 500 mA'de 40 dk süresince yürütüldü. Yürütmenin sonunda tüm kolonilerin pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.24'de verilmiştir.



Şekil 3.23 : DH5 α kimyasal *E. coli* hücrelerine plazmid aktarımı sonucu gelişen kolonilerin görüntüsü.

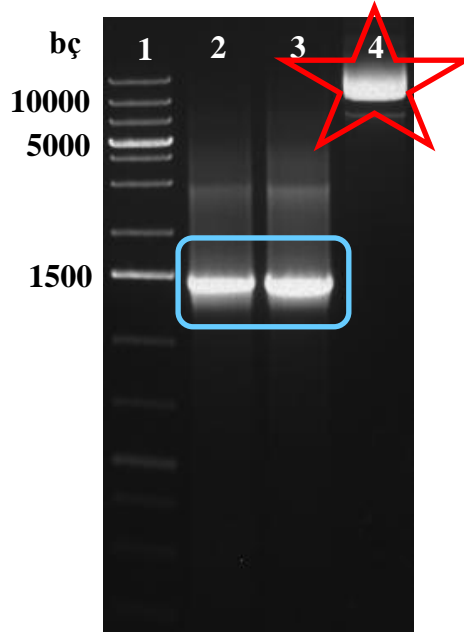


Şekil 3.24 : DH5 α hücrelere transforme edilen pYES-DEST52 hedef vektör kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2-13; LR rekombinasyonu sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün farklı kolonilerden elde edilen kontrol PZR ürünleri (1464 bç).

3.12. Plazmid İzolasyonu ve Kontrol Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pozitif olan kolonilerden plazmid izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ve plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapıldı. Elde edilen ekspresyon klonlarının pozitif olup olmadığının anlaşılması için PZR yapıldı. Elde edilen plazmid DNA ve PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yürütmenin sonunda giriş klonlarının pozitif olduğu gözlenmiştir. Elde edilen

plazmid DNA ve PZR ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.25'te verilmiştir.



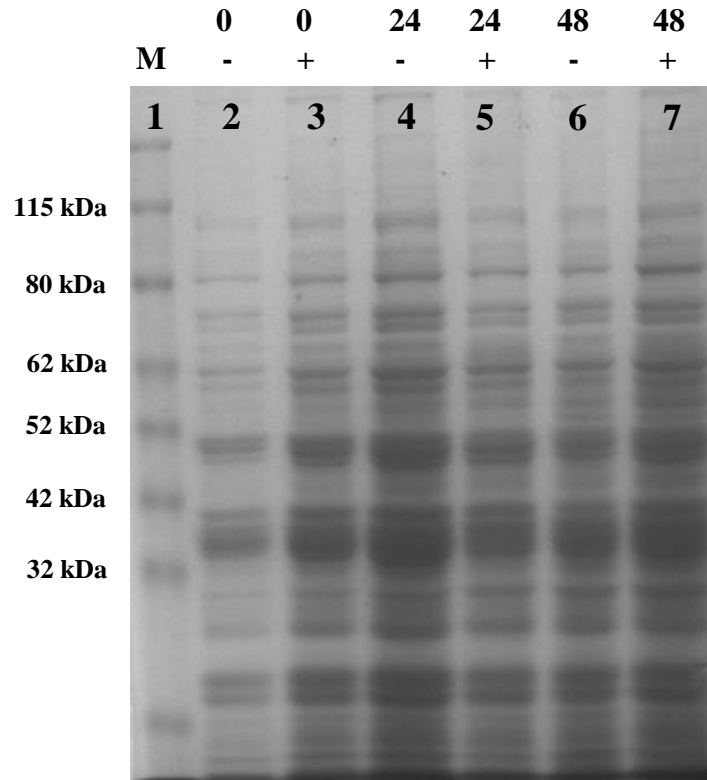
Şekil 3.25 : LR rekombinasyonu sonrası transformasyonu gerçekleştirilen ekspresyon vektörünün farklı kolonilerden elde edilen plazmid DNA ve kontrol PZR ürünü agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Kuyucuk 1; 1 Kb standart DNA, kuyucuk 2 ve 3; kontrol PZR ürünleri (1464 bç), kuyucuk 4; plazmid izolasyonu sonrası elde edilen ekspresyon klonu örneği (1464+7800 bç).

3.13. *Saccharomyces cerevisiae*'ye Transformasyon ve Protein Ekspresyonu

İzole edilen ekspresyon plazmiti, ekspresyonun gerçekleşeceği uygun canlı olan kompetan *Saccharomyces cerevisiae*'ye transforme edildi ve 2. günün sonunda 100'den fazla transforme maya hücrelerinin gelişimi gözlemlendi (Şekil 3.26). Transforme *S. cerevisiae* hücreleri SC-U besiyerine %2 galaktoz katılarak 48 saat boyunca büyütüldü ve 24 saatte bir örnek alınarak uygun indüklenme zaman aralığı belirlendi. Alınan örnekler kısım 2.2.13'te belirtildiği şekilde parçalandı ve SDS-PAJE'e yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.27).



Şekil 3.26 : Transforme *S. cerevisiae* hücrelerinin gelişim görüntüsü.

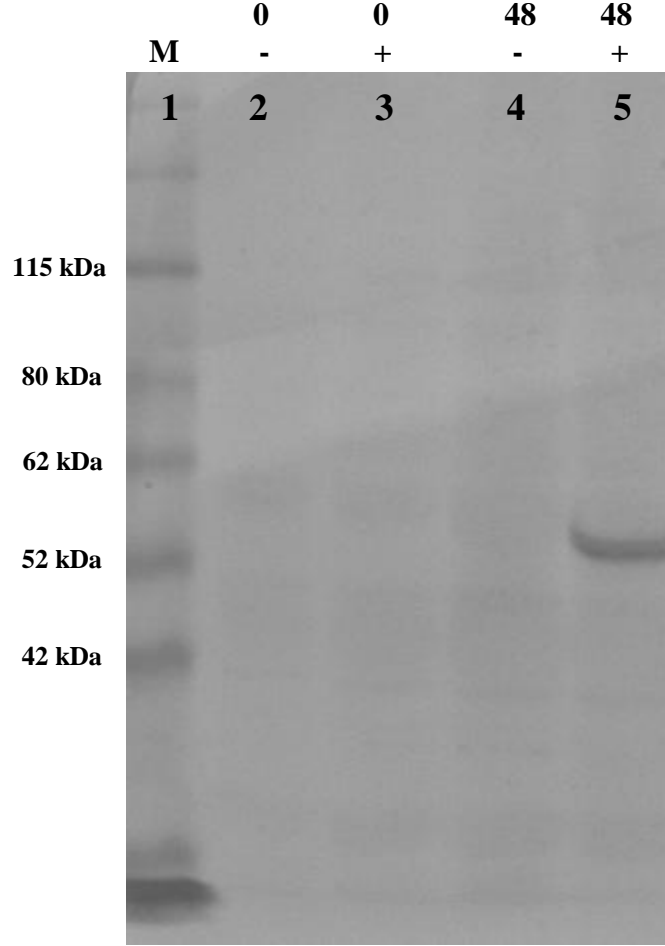


Şekil 3.27 : *S. cerevisiae* hücrelerinde ifade edilmiş protein profillerinin SDS-PAJE görüntüsü: Kuyucuk 1; standart proteinler, kuyucuk 2; indüklenmemiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 3; indüklenmiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 4, 6; indüklenmemiş 24., 48. saat proteinleri, kuyucuk 5, 7; indüklenmiş 24., 48. saat proteinleri.

3.14. Proteinlerin İmmünolojik Tespiti

Saccharomyces cerevisiae'ye transforme olan ve 48 saat boyunca büyütülen örneklerden kısım 2.2.14'de belirtildiği şekilde Western Blot işlemi ve kısım

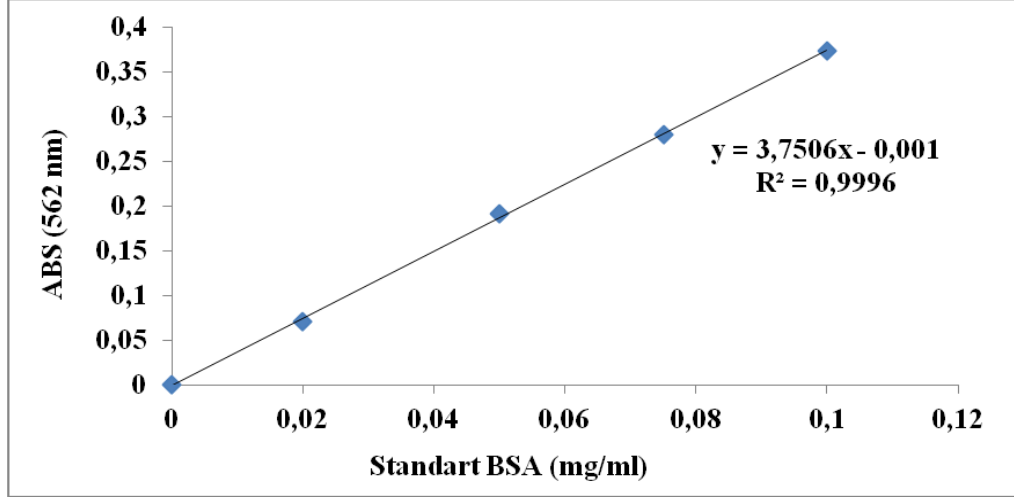
2.2.14.3'te belirtildiği şekilde immünojenik tespiti yapıldı. İndüklenmiş 48. saat örneklerinde ekspres olan ve histidin-etiketli CYP720B proteini anti-his antikoru ile tespit edildi (Şekil 3.28).



Şekil 3.28 : *S. cerevisiae* hücrelerinde ifade edilmiş protein profillerinin Western-Blot görüntüsü: Kuyucuk 1; standart proteinler, kuyucuk 2; indüklenmemiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 3; indüklenmiş başlangıç zaman proteini, kuyucuk 4; indüklenmemiş 48. saat proteini, kuyucuk 5; indüklenmiş 48. saat proteini.

3.15. Mikrozomal Fraksiyonların BCA ile Protein Tayini

Örneklerin protein tayinleri kısım 2.2.16'da belirtildiği gibi BCA yöntemi ile yapıldı. Standart BSA grafiğinden (Şekil 3.29) elde edilen eğim kullanılarak protein miktarları hesaplandı (Tablo 3.3).



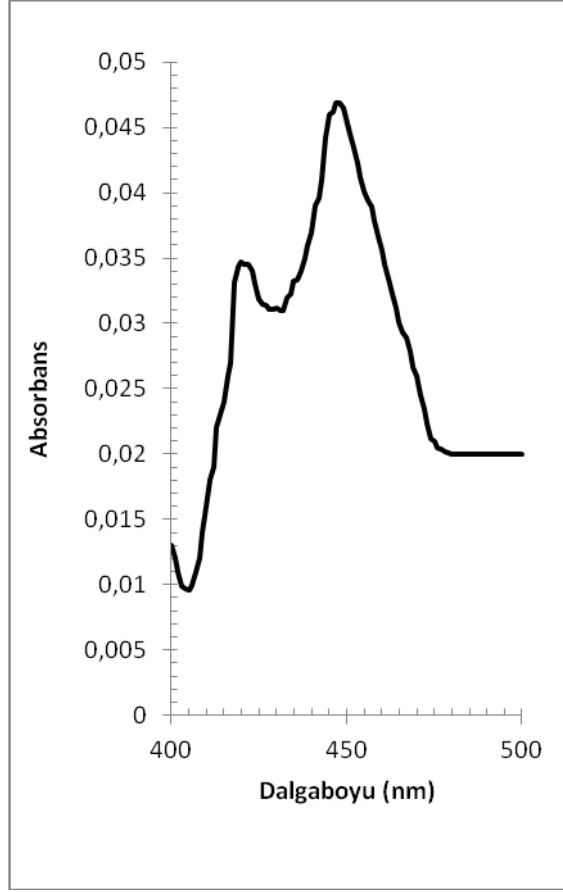
Şekil 3.29 : Standart BSA eğrisi.

Tablo 3.3 : Mikrozomal fraksiyonların protein miktarları.

Örnek	Protein miktarı (mg/ml)
Kontrol	25,508
İndüklenmiş	16,310

3.16. Sitokrom P450 Tespiti

CYP720B içeren maya hücrelerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonlarda sitokrom P450 konsantrasyonu kısım 2.2.17’de belirtildiği şekilde ölçüldü. Sodyum dithionit ile indirgenmiş CYP720B’nin CO-fark spektrumu Şekil 3.30’da gösterilmiştir. Spektrum sonucunda 450 nm’de maksimum absorpsiyon, 420 nm civarında da küçük bir pik görüldü. Bu da bize P450’nin inaktif P420’ye dönüşümünün minimum olduğunu göstermektedir. 450 nm’de görülen pik P450’lerin karakteristik özelliklerinden biridir. $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda total P450 miktarı 0,98 nmol/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.30 : CYP720B içeren maya mikrozoamlarının indirgenmiş CO-fark spektrumu.

4.TARTIŞMA

Diterpen reçine asitlerin koniferlerin böcek ve patojenlere (Phillips ve Croteau, 1999; Trapp ve Croteau, 2001; Martin ve diğ. 2002; Hamberger ve diğ. 2011) direnç sağlamasındaki öneminin bilinmesine rağmen bu konuda pek fazla ilerleme kaydedilmemiştir. Literatürde sadece *Pinus taeda*'dan diterpen oksidaz (PtAO) geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Ro ve diğ. 2005). *Pinus taeda* P450 enzimi, abietadienol/abietadienal oksidaz (PtAO), bitki P450 enzimlerinden CYP720 ailesi içinde çok substratlı ve çok fonksiyonlu bir diterpen oksidazdır. PtAO'nun, konifer diterpen reçine asitlerin oluşumundaki ardışık üç oksidasyon basamağının en az ikisini katalizlediği bilinmektedir. Biz de bu çalışmamızla *Pinus brutia*'dan bir diterpen oksidaz olan CYP720B (PbAO)'yi klonlayıp onun moleküler özelliklerini tanımlamaya çalıştık. Bitki sekonder metabolizmasındaki pek çok P450'nin yüksek substrat spesifikliğine rağmen, çok fonksiyonlu *Pinus brutia* abietadienal oksidaz'ın elde edilen benzerliklere bakıldığında tıpkı *Pinus taeda* abietadienal oksidaz gibi diterpen alkol ve aldehitlerin oksidasyonunu katalizlediği söylenebilir.

Çam ağaçlarından iyi kalitede RNA izolasyonu çam dokularındaki yüksek miktardaki polisakkaritler, fenolik bileşikler ve ribonükleazlar nedeniyle oldukça zordur. Çalışmamızın başında literatürdeki çeşitli yöntemler denenerek *Pinus brutia* ibrelerinden RNA izole edilmeye çalışıldı ancak maalesef iyi kalitede RNA elde edilemedi. Bazı yöntemlerde elde edilen RNA'lardan RT-PZR yöntemi gerçekleştirildi ancak maalesef pozitif ürün oluşumu gözlenemedi. Bütün bunlardan elde edilen RNA'ların tamamen saf olmadığı, içinde kalan polisakkarit ve fenolik bileşiklerin PZR'nu inhibe ettiği ve bu nedenle elde edilecek RNA'nın safsızlıklardan kurtulmuş olmasının çok önemli olduğu sonucunu çıkarabiliriz.

Pinus brutia'dan elde edilen CYP720B geni klonlanıp sekans analizi yapıldıktan sonra elde edilen gen dizisi (Tablo 3.1) BLAST edilerek karşılaştırıldı ve karşılaştırma sonucunda Ro ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışma sonucunda elde edilen *Pinus taeda* sitokrom P450 CYPB (CYP720 alt ailesine benzer olan) mRNA sekansı ile %99 oranında bir eşleşme gösterdiği belirlenmiştir. *Pinus taeda*

CYP720B (PtAO) enzimi nükleotid dizisi 1464 baz çiftinden oluşur ve buradan kodlanan protein 487 amino asit içerir. Benzer şekilde *Pinus brutia*'dan izole ettiğimiz CYP720B enziminin sekans analizi sonucunda enzimin 1464 baz çiftlik bir büyüklüğe sahip olduğu ve buradan kodlanan proteinin de 487 amino asitten oluştuğu bulunmuştur.

Elde edilen sekans gen dizisi, ExPASy Proteomics Server (www.expasy.ch)'dan protein dizisine çevrilerek *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) enziminin amino asit dizisi belirlenmiştir (Tablo 3.2). Elde edilen amino asit dizisi kullanılarak enzimin yaklaşık moleküler ağırlığı (~53.570 Da) ve amino asit içeriği gibi özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen amino asit dizisi NCBI Server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)'dan BLAST yapılarak benzer amino asit dizileriyle karşılaştırılmış ve *Pinus taeda* sitokrom P450 CYPB amino asit dizisi ile %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak *Pinus brutia*'dan izole edilen ve klonlanıp ekspres edilen CYP720B enziminin amino asit dizisinin *Pinus taeda* CYP720B amino asit dizisinden 5 farklı amino asite sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.2). *P. taeda* CYP720B'deki L, Q, R, E ve K (Lösin, Glutamin, Arjinin, Glutamik asit ve Lizin) amino asitleri izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz *Pinus brutia* CYP720B'de sırasıyla F, R, K, Q ve N (Fenilalanin, Arjinin, Lizin, Glutamin ve Asparajin) amino asitlerine dönüşmüştür. Bu sonuç bize çam türlerinde CYP720 genetik yapılarının oldukça benzer olmakla birlikte farklılık olma ihtimaline de işaret etmektedir.

Elde edilen dizinin amino asit kompozisyonu Şekil 3.12'de verilmiştir. Buna göre amino asitlerin büyük bir kısmının non-polar (A, C, F, G, I, L, M, P, V) amino asitler olduğu ve bunların total amino asitlerin % 48,2'si gibi yüksek oranlarda bulunduğu, yük grubu amino asitlerin (D, E, H, K, R) ise %29'unu kapsadığı görüldü. Alifatik amino asitler (I, L, V) total amino asitlerin %22,6'sını kapsarken, aromatik grubun %14,3'ünü kapsadığı bulundu. CYP720B'de bulunan total amino asitlerin %13,4'ü gibi yüksek bir oranını alifatik non-polar bir amino asit olan lösin kapsamaktadır. Dizinin Lösin-Fenilalanin gibi hidrofobik ve Lizin-Glutamik asit gibi hidrofilik farklı 2 grup amino asitleri yüksek miktarda içermesi membran bağlı bir protein olduğunu teyit etmektedir.

Sitokrom P450'ler ökaryotlarda çoğunlukla ER'da, zara bağlı olarak bulunan hem proteinlerdir (Mathews ve Holde, 1990). Yapılan sinyal peptit analizinde dizinin 5' amino ucunda, proteini ER'a taşıyan, 37 amino asitlik bir sinyal olduğu ve bu

sinyalin bu proteini endoplazmik retikuluma taşıdığı ve proteinin endoplazmik retikulum membranına yerleştiği tahmin edilmektedir (Şekil 3.13). Bir polipeptid Asn-x-Thr veya Asn-x-Ser dizilerinden glikozillenir (Black, 1992). Translasyon sonrası modifikasyonlardan olan glikozilasyon bölgelerinin tespiti için “NetNGlyc” (Gupta ve diğ. 2004) adlı program kullanıldı ve dizide 2 adet N-glikozilasyon olma olasılığı olan bölgeler tespit edildi (Şekil 3.15). Bu diziler NST (Asn-Ser-Thr) ve NIS (Asn-Ile-Ser) şeklindedir. Translasyon sonrası önemli modifikasyonlardan olan protein metilasyonu tipik olarak protein dizisindeki Arginin veya Lizin amino asit kalıntılarında yer alır. Metilasyon analizinde dizide 3 adet Arjinin (R) amino asit kalıntısında metilasyon olma olasılığı olan bölge tespit edilirken, Lizin (K) amino asit kalıntısında metilasyon tespit edilemedi (Şekil 3.17).

Proteinin transmembran segmentini tespit etmek için yapılan analiz sonucunda ise proteinin 2 membran heliks bulundurduğu tespit edildi (Şekil 3.14). İlave olarak CYP gen ailesinin ayırt edici özelliği, korunmuş bölgesi olan demir bağlama domaininin analiz edilen dizideki varlığı da tespit edildi (Tablo 3.2). Bu bölge 440. ve 450. amino asitler arasında ve “FGGGARLCPG” şeklindedir. K-heliksin, “ETLR” dizisini (363. ve 366. amino asitler arasında) içerdiği görüldü. Pek çok P450’de oksijen bağlanması için gerekli olan I-heliksin 301. ve 306. amino asitler arasında “AGHETS” motifini içerdiği tespit edildi. Pek çok ökaryotta korunmuş olan C-heliksin “WQAKR” dizisini içerdiği ve 181. ve 185. amino asitler arasında olduğu tespit edildi. Bununla birlikte prolince zengin motif (PPGP) genellikle C-heliksin ile membran çapa bölgesi arasında iken *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) dizisinde tespit edilememiştir. Aynı şekilde *Pinus taeda* CYP720B dizinde de prolince zengin motif tespit edilemedi.

Prostetik hem grubuna sahip P450 enzimleri sodyum dithionit ile indirgenme sonucunda CO’ye bağlanır ve bu bağlanma sonucunda hem 450 nm’de maksimum absorpsiyon verir (Omura ve Sato, 1964). 450 nm’de görülen bu pik P450’lerin karakteristik özelliklerinden biridir. Bu özellik *Pinus brutia*’dan izole edip klonladığımız ve daha sonra maya hücrelerinde ekspres ettiğimiz CYP720B enzimine ait CO-fark spektrumunda da görülmektedir (Şekil 3.30). Spektrum sonucunda 450 nm’de maksimum absorpsiyon, 420 nm civarında da küçük bir pik görüldü. Bu da bize P450’nin inaktif P420’ye dönüşümünün minimum olduğunu göstermektedir. Bu da bize izolasyon prosedürünün oldukça optimum olduğunu

göstermektedir. $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda total P450 miktarı 0,98 nmol/ml olarak hesaplandı.

Pinus brutia'dan izole edilen CYP720B gen bölgesi LR Klonaz enzimi kullanılarak ilk önce pDESTTM14 *E. coli* ekspresyon vektörü'ne aktarıldı ve *Pinus brutia* CYP720B'nin *E. coli* transformantlarında ekspresyonu L-arabinoz ile indüklendi. 6 saat L-arabinoz indüklenmesi sonucunda SDS-PAJE analizinde rekombinant CYP720B protein ekspresyonu gösterilememiştir (Şekil 3.22). *Pinus brutia*'dan izole edilen CYP720B gen bölgesi LR Klonaz enzimi kullanılarak bu sefer pYES-DEST 52 maya ekspresyon vektörü'ne aktarıldı ve *Pinus brutia* CYP720B'nin *Saccharomyces cerevisiae* transformantlarında ekspresyonu galaktoz ile indüklendi. 48 saat galaktoz indüklenmesi sonucunda western blot analizinde histidin-etiketli rekombinant CYP720B protein ekspresyonu gösterilebilmiştir (Şekil 3.28).

Enzim aktivitesinin ölçümü çalışması, CYP720B'ye spesifik substratın (abietadiene-diol/abietadienal) ticari olarak üretilmemesi ve bulunmaması neticesinde gerçekleştirilememiştir. Aktivite ölçümü olmadığı için bundan sonraki dönemde farklı bireylerdeki *Pinus brutia* CYP720B (PbAO) ekspresyon düzeyleri ile populasyon çalışmaları yapılacaktır. Diterpen alkol (substrat) sentezi, ilgili asit (abietik asit)'in Organik Kimya laboratuvarında LiAlH_4 ile Ro ve diğ. (2005)'nin metodu uygulanarak indirgenmesi ile elde edilebilmesi sonucunda mayada ekspres ettirilen ve histidin-etiketli olan rekombinant protein (*Pinus brutia* CYP720B) nikel reçineli affinite kromatografisi ile saflaştırılacak ve protein aktivitesine bakılacaktır.

5. SONUÇ

Son yıllarda, sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu olan biyosentetik yollarda sitokrom P450'lerin anahtar enzimler oldukları bulunmuştur. Kızılda en önde gelen böcek zararlısı çam kese böceğidir ve bu böcek ile terpenler arasındaki ilişkileri ele alan çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır, ancak bu etkileşimde sitokrom P450 enzimlerinin etkisini ele alan çalışma henüz bulunmamaktadır. Literatürde (Science Direct ve Web of Science veri tabanlarında yapılan tarama) *Pinus brutia*'dan izole edilmiş ya da klonlanmış sitokrom P450 enzim bilgisine rastlanmamıştır. Bu da çalışmamızın bu tür için orijinal ve özgün olmasını sağlamaktadır. Literatürde sadece *Pinus taeda*'dan CYP720B klonlanmıştır. Bu da bizim klonlama için seçtiğimiz ve laboratuvarımızda *Pinus brutia*'dan klonladığımız CYP720B enzimini ve çalışmayı daha anlamlı hale getirmektedir çünkü böcek direncinin oluşmasında aktif rol aldığını düşündüğümüz sitokrom P450 enzimlerinden CYP720B geni moleküler düzeyde araştırılmıştır. Ve bu çalışma ilerleyen çalışmalara temel teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

- Aaron, J.**, 2009. Patton Gateway Cloning Technology Overview. <http://www.lifetech.com/gateway> Interview. Life Technologies.
- Acatay, A.**, 1972. *Thaumetopoea* Hbst. (Lep., Thaumetopoeidae) species in Turkey. In: *XIII International Congress of Entomology*, Moscow, 8-9.
- Adali, O., and Arinc, E.**, 1990. Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties of highly purified cytochrome P450 from sheep lung. *Int. J. Biochem.*, **22**, 1437-1444.
- Agrawal, G. K., Tamogami, S., Han, O., Iwahashi, H., and Rakwal, R.**, 2004. Rice octadecanoid pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 1-15.
- Alfaro, R. I., Pierce, H. D., Borden, J. H., and Oeshlschlager, A. C.**, 1980. Role of volatile and non volatile components of *Sitka spruce* bark as feeding stimulants for *Pissodes strobi* Peck (Coleoptera: Curculionidae). *Can. J. Zoology*, **58**, 626-632.
- Alfaro, R. I., Pierce, H. D., Borden, J. H., and Oeshlschlager, A. C.**, 1981. Insect feeding and oviposition deterrents from Western Red Cedar foliage. *J. Chem. Ecol.*, **7**, 39-48.
- Alfaro, R. I., Borden, J. H., King, J. N., Tomlin, E. S., McIntosh, R. L., and Bohlmann, J.**, 2002. Mechanisms of resistance in conifers against shoot infesting insects. In: Wagner, M. R., Clancy, K. M., Lieutier, F., Paine, T. D. (eds) Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 101-126.
- Ananthakrishnan, T. N.**, 1999. Induced responses, signal diversity and plant defense: implications in insect phytophagy. *Curr. Sci.*, **76**, 285-290.
- Anonim**, 2001. Sekizinci beş yıllık kalkınma planı, Ormançılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu. DPT Yay. No: 2531, 539s., Ankara.
- Anşin, R., ve Özkan, Z. C.**, 1997. Tohumlu Bitkiler. K.T.Ü., Orman Fak. No: 19, 512 s., Trabzon.
- Arinc, E., and Philpot, R. M.**, 1976. Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P450 from rabbit. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3213-3220.
- Arimura, G., Kost, C., and Boland, W.**, 2005. Herbivore-induced, indirect defences. *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids*, **1734**, 91-111.
- Avci, M.**, 2000. Investigations on structure of egg-batches, parasitism and egg laying habits of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) (Lepidoptera Thaumetopoeidae) in various regions of Turkey. *J. Ent. Res. Soc.*, **24**, 167-178.

- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., and Werck-Reichhart, D.,** 2011. Cytochromes P450. The Arabidopsis book. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Barnola, L. F., Cedeno, A., and Hasegawa, M.,** 1997. Intraindividual variations of volatile terpene contents in *Pinus caribaea* needles and its possible relationship to *Atta laevigata* herbivory. *Biochem. Syst. Ecol.*, **25**, 707-716.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S.,** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, **340**, 783-795.
- Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaun, J. P., and Durst, F.,** 1998. CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 688-693.
- Bernhardt, R.,** 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.*, **124**, 128-145.
- Bishop, G. J., and Koncz, C.,** 2002. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell*, **14**, S97-110.
- Black, S. D.,** 1992. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB*, **6**, 680-685.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S.,** 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation. *J. Mol. Biol.*, **294(5)**, 1351-1362.
- Bochar, D. A., Friesen, J. A., Stauffacher, C. V., and Rodwell, V. W.,** 1999. Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. In: Cane, D. E. (ed) *Isoprenoids, including caretonoids and steroids, Vol 2. Comprehensive natural products chemistry*, Elsevier, London, pp. 15-44.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R.,** 1998a. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4126-4133.
- Bohlmann, J.,** 2008. Insect-induced terpenoid defenses in spruce, In: Schaller, A. (ed) *Induced plant resistance to herbivory*, Springer Science+Business Media B.V., pp. 173-187.
- Bolweel, G. P., Bozak, K. R., and Zimmerlin, A.,** 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochem.*, **37**, 1491-1506.
- Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R., and Christoffersen, R. E.,** 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3904-3908.
- Bratesten, L. B.,** 1983. Cytochrome P450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores, In: Hedin, P. A. (ed) *Plant resistance to insects*. American Chemical Society, Washington, pp. 173-95.
- Breitmaier, E.,** 2006. *Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*, Wiley-VCH, Weinheim, p. 223.

- Byun-McKay, A., Godard, K. A., Toudefallah, M., Martin, D. M., Alfaro, R., King, J., Bohlmann, J., and Plant, A. L.,** 2006. Wound-induced terpene synthase gene expression in *Sitka spruce* that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. *Plant Physiol.*, **140**, 1009-1021.
- Caissard, J., Meekijironroj, A., Baudino, S., and Anstett, M.,** 2004. Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *Am. J. Botany*, **91**(8), 1190-1199.
- Cates, R. G., Redak, R. A., and Henderson, C. B.,** 1983. Patterns in defensive natural product chemistry: Douglasfir and western spruce budworm interactions. In: Hedin, P. A. (ed) *Plant Resistance to Insects*, Symposium Series, **208**. American Chemical Society, Columbus, pp. 1-19.
- Cates, R. G., and Redak, R. A.,** 1986. Betweenyear population variation in resistance of Douglasfir to the western spruce budworm. In: Gren, M. B., Hedin, P. A. (eds) *Natural resistance of plants to pests*, American Chemical Society Symposium, Washington, pp. 106-15.
- Cates, R. G., and Redak, R. A.,** 1998. Variation in the terpene chemistry of Douglas-fir and its relationship to western spruce budworm success. In: Spencer, K. C. (ed) *Chemical mediation of coevolution*, Academic press, San Diego, pp. 317-344.
- Chappell, J.,** 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.*, **107**,1-6.
- Chapple, C.,** 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome p450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **49**, 311-343.
- Charlers, P. J., Delphanque, A., Marpeau, A., Bernard-Dagan, C., and Arbez, M.,** 1982. Susceptibility of European Black Pine (*Pinus nigra*) to the European pine shoot moth (*Rhyacionia buoliana*): Variations of susceptibility at the provenance and individual level of the pine and effect of terpene composition. In: H. M. Heybroek, B. R. Stephan, K. Weissenberg, V. (eds), *resistance to diseases and pest in forests tress*, Wageningen, pp. 206-212.
- Choe, S. W., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., and Feldmann, K. A.,** 1998. The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22-alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*,**10**, 231-243.
- Chou, C. K. S., and Zabkiewicz, J. A.,** 1976. Toxicity of monoterpenes from *Pinus radiata* cortical oleoresin to *Diplodia pinea* spores. *J. Forest Pathol.*, **6**, 354-359.
- Christiansen, E., and Bakke, A.,** 1988. The spruce bark beetle of Eurasia. In: Berryman, A. A., (ed) *Dynamics of Forest Insect Populations*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 479-503.
- Chung, W. G., Sen, A., Wang-Buhler, J. L., Yang, Y. H., Lopez, N., Merrill, G.**

- F., Miranda, C. L., Hu, C. H., and Buhler, D. R.,** 2004. cDNA-directed expression of a functional zebrafish CYP1A in yeast. *Aquat. Toxicol.*, **70**, 111-121.
- Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., and Rosenthal, O.,** 1965. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science*, **22**, 400-402.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E.,** 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **48**, 355-381.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A.,** 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.*, **10**, 673-676.
- Danell, K., Gref, R., and Yazdani, R.,** 1990. Effects of mono- and diterpenes in Scots pine needles on moose browsing. *Scand. J. For. Res.*, **5**, 535-539.
- Davis, P. H.,** 1965. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Volume **1**, pp.74, University of Edinburgh Press, Edinburgh.
- de Bruxelles, G. L., and Roberts, M. R.,** 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **20**, 487-521.
- de Vetten, N., Ter Horst, J., Van Schaik, H. P., De Boer, A., Mol, J., and Koes, R.,** 1999. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 778-783.
- Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J.,** 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.*, **135**, 1893-1902.
- Durst, F., and Nelson, D. R.,** 1995. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metab. Drug Interact.*, **12**, 189-206.
- Engel, M. S., and Grimaldi, D. A.,** 2004. New light shed on the oldest insect. *Nature*, **427**, 627-630.
- Estabrook, R. W., Cooper, D. Y., and Rosenthal, O.,** 1963. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylation system of the adrenal cortex. *Biochem. Zeit.*, **338**, 741-755.
- Ey, P. L., and Ashman, L. K.,** 1986. The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *Meth. Enzymol.*, **121**, pp. 497-509.
- Fäldt, J., Sjodin, K., Persson, M., Valterova, I., and Borg-Karlson, A. K.,** 2001. Correlations between selected monoterpene hydrocarbons in the xylem of six *Pinus* (Pinaceae) species. *Chemoecology*, **11**, 97-106.
- Fäldt, J., Martin, D., Miller, B., Rawat, S., and Bohlmann, J.,** 2003. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyljasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and

- functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Mol. Biol.*, **51**, 119-133.
- Figuroa, C., Simon, J. C., Le Gallic, J. F., Prunier-Leterme, N., Briones, L. M., Dedryver, C. A., and Niemeyer, H. M.**, 2004. Effect of host defense chemicals on clonal distribution and performance of different genotypes of the cereal aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *J. Chem. Ecol.*, **30**, 2515-2525.
- Franceschi, V. R., Krekling, T., and Christiansen, E.**, 2002. Application of methyljasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *Am. J. Bot.*, **89**, 578-586.
- Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Sakata, K., and Mizutani, M.**, 2006. Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J.*, **45**, 765-774.
- Funk, C., and Croteau, R.**, 1994. Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: characterization of two cytochrome P450-dependent monooxygenases and an aldehyde dehydrogenase involved in abietic acid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 258-266.
- Futai, K., and Furano, T.**, 1979. The variety of resistances among pine species to pine wood nematode *Bursaphelenchus lignicolus*. *Bull. Kyoto Univ. For.*, **51**, 23-26.
- Gatignol, A., Baron, M., and Tiraby, G.**, 1987. Phleomycin resistance encoded by the ble gene from transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 342-348.
- Gershenzon, J., and Croteau, R.**, 1991. Terpenoids. In: Rosenthal, G. A., Berenbaum, M. R. (eds) *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, Vol 1. Academic Press Inc, San Diego, pp. 165-219.
- Geourjon, C., and Deléage, G.**, 1995. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Cabios*, **11**, 681-684.
- Chen, H., Xue, Y., Huang, N., Yao, X., and Sun, Z.**, 2006. MeMo: a web tool for prediction of protein methylation modifications. *Nucleic Acids Res.*, **34**, W249-W253.
- Goldstone, R. M., Moreland, N. J., Bashiri, G., Baker, E. N., and Shaun Lott, J.**, 2008. A new Gateway vector and expression protocol for fast and efficient recombinant protein expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Expr. Purif.*, **57(1)**, 81-87.
- Gorinova, N., Nedkovska, M., and Atanassov, A.**, 2005. Cytochrome P450 monooxygenases as a tool for metabolizing of herbicides in plants. *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.*, **19**, 105-115.
- Graham, S. E., and Peterson, J. A.**, 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us. *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 24-29.
- Grand, C.**, 1984. Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett.* **169(1)**, 7-11.

- Gupta, R., Jung, E., and Brunak, S.,** 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation.
- Hallahan, D. L., Lau, S. M., Harder, P. A., Smiley, D. W., Dawson, G. W., Pickett, J. A., Christoffersen, R. E., and O'Keefe, D. P.,** 1994. Cytochrome P-450-catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related enzymes with different activities. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1201**, 94-100.
- Halkier, B. A.,** 1996. Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, **43**, 1-21.
- Hamberger, B., Ohnishi, T., Hamberger, B., Seguin, A., and Bohlmann, J.,** 2011. Evolution of diterpene metabolism: Sitka spruce CYP720B4 catalyses multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant Physiol.*, **157(4)**, 1677-1695.
- Helliwell, C. A., Sheldon, C. C., Olive, M. R., Walker, A. R., Zeevaart, J. A., Peacock, W. J., and Dennis, E. S.,** 1998. Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9019-9024.
- Helliwell, C. A., Chandler, P. M., Poole, A., Dennis, E. S., and Peacock, W. J.,** 2001. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2065-2070.
- Hilker, M., Rohfritsch, O., and Meiners, T.,** 2002. The plant's response towards insect egg deposition. In: Hilker, M., Meiners, T. (eds) Chemoecology of insect eggs and egg deposition, Blackwell, Berlin, pp. 205-233.
- Hofstetter, R. W., Mahfouz, J. B., Klepzig, K. D., and Ayres, M. P.,** 2005. Effects of tree phytochemistry on the interactions among endophloedic fungi associated with the southern pine beetle. *J. Chem. Ecol.*, **31**, 539-560.
- Holton, T. A.,** 1992. Petal-specific genes expression in *Petunia hybrida*. PhD thesis. The Russell Grimwade School of Biochemistry. The University of Melbourne. 120 pages.
- Holton, T. A.,** 1995. Modification of flower colour via manipulation of P450 gene expression in transgenic plants. *Drug Metabol. Drug Interact.*, **12**, 359-368.
- Hough-Goldstein, J. A.,** 1990. Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, **19**, 234-238.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., and Franke, R.,** 2008. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **59(9)**, 2347-2360.
- Hudgins, J. W., and Francesci, V.,** 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct information. *Plant Physiol.*, **135**, 2134-2149.

- Hull, A. K., Vij, R., and Celenza, J. L.,** 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2379-2384.
- Irmiler, S., Schroder, G., St-Pierre, B., Crouch, N. P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U., and Schroder, J.,** 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.*, **24**, 797-804.
- Isin, E. M., and Guengerich, F. P.,** 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 314-329.
- Jefferies, M., ve Hacıömeroğlu, M.,** 2010. Gateway Klonlama Teknolojisine Genel Bakış: Daha Hızlı, Daha Kolay, Daha Etkin Bir Klonlama Yöntemi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **67(1)**, 45-51.
- Jennewein, S., Long, R. M., Williams, R. M., and Croteau, R.,** 2004. Cytochrome P450 taxadiene 5-alpha-hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chem. Biol.*, **11**, 379-387.
- Kahn, R. A., and Durst, F.,** 2000. Function and evolution of plant cytochrome P450. *Recent Adv. Phytochem.*, **34**, 151-189.
- Kahn, R. A., Le Bouquin, R., Pinot, F., Benveniste, I., and Durst, F.,** 2001. A conservative amino acid substitution alters the regiospecificity of CYP94A2, a fatty acid hydroxylase from the plant *Vicia sativa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 180-187.
- Kalb, V. F., and Loper, J. C.,** 1988. Proteins from eight eukaryotic cytochrome P-450 families share a segmented region of sequence similarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7221-7225.
- Kanat, M., and Alma, M. H.,** 2004. Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Pes. Man. Sci.*, **60**, 173-177.
- Kandemir, G.,** 2002. Genetics and physiology of cold and drought resistance in Turkish Red Pine (*Pinus brutia*, Ten.) populations from Southern Turkey. Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Science, pp. 145, Ankara, Turkey.
- Karr, L. L., and Coats, J. R.,** 1992. Effects of monoterpenoids on growth and reproduction of the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, **85**, 425-429.
- Kaya, Z., Kün, E., and Güner, A.,** 1998. Türkiye bitki genetik çeşitliliğinin yerinde (*In situ*) korunması ulusal planı. Çevre Bakanlığı, Çevre Koruma Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma ve Erozyonla Mücadele Daire Başkanlığı, Ankara.
- Keeling, C. I., and Bohlmann, J.,** 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, **170**, 657-675.

- Kertbundit, S., Greve, H., Deboeck, F., Montagu, M. V., and Hernalsteens, J. P.,** 1991. In vivo random b-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5212-5216.
- Kim, G.T., Tsukaya, H., and Uchimiya, H.,** 1998. The ROTUNDIFOLIA3 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Gen. and Devel.*, **12**, 2381-2391.
- Kim, G. T., and Tsukaya, H.,** 2002. Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s. *J. Plant Res.*, **115**, 169-177.
- King, J. N., Alfaro, R. I., and Cartwright, C.,** 2004. Genetic resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) populations to the white pine weevil (*Pissodes strobi*): distribution of resistance. *Forestry*, **4**, 269-278.
- Kliebenstein, D. J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., and Mitchell-Olds, T.,** 2001. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.*, **126**, 811-825.
- Klingenberg, M.,** 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386.
- Kopper, B. J., Illman, B. L., Kertsen, P. J., Klepzig, K. D., and Raffa, K. F.,** 2005. Effects of diterpene acids on components of a conifer bark beetle-fungal interaction: tolerance by *Ips pini* and sensitivity by its associate *Ophiostoma ips*. *Environ. Entomol.*, **34**, 486-493.
- Koski, V., and Antola, J.,** 1994. National tree breeding and seed production programme from Turkey 1994-2003. Turkish-Finnish Forestry Project. Vol. **II** Technical Instructions, 24 p. +4 Appendix.
- Kozak, M.,** 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8125-8148.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. L.,** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 567-580.
- Kurz, W. A., Dymond, C. C., Stinson, G., Rampley, G. J., Neilson, E. T., Carroll, A. L., Ebata, T., and Safranyik, L.,** 2008. Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature*, **452**, 987-990.
- Kurzban, G. P., and Strobel, H. W.,** 1986. Preparation and characterization of FAD-dependent NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **261**, 7824-7830.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E.,** 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.*, **23**, 1647-1656.
- Lamb, D. C., Kelly, D. E., and Kelly, S. L.,** 1998. Molecular diversity of sterol 14-alpha-demethylase substrates in plants, fungi and humans. *FEBS Lett.*, **425**, 263-265.

- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollander-Czytko, H., and Weiler, E. W.,** 1996. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 323-335.
- Laudert, D., and Weiler, E. W.,** 1998. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.*, **15**, 675-684.
- Laudert, D., Schaller, F., and Weiler, E. W.,** 2000. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta*, **211**, 163-165.
- Leather, S. R.,** 1985. Oviposition preferences in relation to larval growth rates and survival in the pine beauty moth, *Panolis flammea*. *Ecol. Entomol.*, **10**, 213-217.
- Lee, S., Peterson, C. J., and Coats, J. R.,** 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.*, **39**, 77-85.
- Lee, D. S., Nioche, P., Hamberg, M., and Raman, C. S.,** 2008. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*, **455**, 363-370.
- Litvak, M. E., and Monson, R. K.,** 1998. Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*, **114**, 531-540.
- Lu, A. Y. H., and Lewin, W.,** 1974. The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochem. Biophys. Acta*, **344**, 205-240.
- Lu, A. Y. H., and Coon, M. J.,** 1968. Role of hemoprotein P450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1331-1332.
- Martin, D., Tholl, D., and Gershenzon, J.,** 2002. Methyljasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, **129**, 1003-1018.
- Martin, D., Gershenzon, J., and Bohlmann, J.,** 2003a. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol.*, **132**, 1586-1599.
- Martin, D., Bohlmann, J., Gershenzon, J., Francke, W., and Seybold S. J.,** 2003b. A novel sex-specific and inducible monoterpene synthase activity associated with a pine bark beetle, the pine engraver, *Ips pini*. *Naturwissenschaften*, **90**, 173-179.
- Martin, D., Fäldt, J., and Bohlmann, J.,** 2004. Functional characterization of nine Norway spruce *TPS* genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-d* subfamily. *Plant Physiol.*, **135**, 1908-1927.

- Manninen, A. M., Tarhanen, S., Vuorinen, M., and Kainulainen, P., 2002.** Comparing the variation of needle and wood terpenoids in Scots pine provenances. *J. Chem. Ecol.*, **28**, 211-228.
- Mansuy, D., 1998.** The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C.*, **121**, 5-14.
- Mathews, C. K., and Holde, K. E., 1990.** Biochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Company, p. 533.
- McKay, S. A., Hunter, W. L., Godard, K. A., Wang, S. X., Martin, D. M., Bohlmann, J., and Plant, A. L., 2003.** Insect attack and wounding induced traumatic resin duct development and gene expression of (-)-pinene synthase in *Sitka spruce*. *Plant Physiol.*, **133**, 368-378.
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G, Reid, J. B., and Gubler, F., 2006.** Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.*, **45(6)**, 942-954.
- Miller, B., Madilao, L. L., Ralph, S., and Bohlmann, J., 2005.** Insect-induced conifer defense. White pine weevil and methyljasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce. *Plant Physiol.*, **137**, 369-382.
- Mizutani, M., and Ohta, D., 2010.** Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 291-315.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B. L., and Werck-Reichhart, D., 2003.** Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 151-162.
- Mulsant, P., Tiraby, G., Kallerhoff, J., and Perret, J., 1988.** Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO Cells. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **14**, 243-252.
- Narayanasami, R., Horowitz, P. M., and Masters, B. S., 1995.** Flavin-binding and protein structural integrity studies on NADPH cytochrome P450 reductase are consistent with the presence of distinct domains. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316(1)**, 267-74.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R., and Waterman, M. R., 1987.** The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, **6**, 1-13.
- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J., 1987.** P-450 Genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 945-993.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujikuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., and Waxman, D. J., 1991.** The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, **10**, 1-14.

- Neff, M. M., Nguyen, S. M., Malancharuvil, E. J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., and Chory, J.,** 1999. *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15316-15323.
- 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., and Nebert, D. W.,** 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**,1-43.
- Nelson, D. R.,** 2003. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**(1), 18-24.
- Nelson, D. R., Schuler, M. A., Paquette, S. M., Werck-Reichhart, D., and Bak, S.,** 2004. Comparative genomics of rice and arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.*, **135**, 756-772.
- Nelson, D. R.,** 2006a. Cytochrome P450 nomenclature 2004. *Methods Mol. Biol.*, **320**, 1-10.
- Nelson, D. R., and Werck-Reichhart, D.,** 2011. A P450 centric view of plant evolution. *Plant J.*, **66**, 194-211.
- Nerg, A. M., Heijari, J., Noldt, U., Viitanen, H., Vuorinen, M., Kaunilainen, P., and Holopainen, J. K.,** 2004. Significance of wood terpenoids in the resistance of Scots pine provenances against the old house borer, *Hylotrupes bajalus*, and Brownrot fungus, *Coniphora puteana*. *J. Chem. Ecol.*, **30**, 125-141.
- Neyisçi, T.,** 2001. Kızılcâmın doğal yayılışı. Kızılcâm El Kitabı Dizisi: 2, Ormancılık Arastırma Enstitüsü Muhtelif Yayınlar Serisi, 52: 15-22.
- Nishida, R.,** 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, **47**, 57-92.
- Nordlander, G.,** 1990. Limonene inhibits attraction to α -pinene in the pine weevils *Hyllobius abietis* and *H. pinastri*. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 1307-1320.
- Omura, T., and Sato, R.,** 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, 1. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- Ortiz de Monteliano, P. R.,** 1995. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Monteliano, P. R. (ed) Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry, New York, Plenum, pp. 505-523.
- Quevillion, E., Silventioinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R.,** 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 116-120.
- Panda, N., and Khush, G. S.,** 1995. Host plant resistance to insects. CAB International, Wallingford.

- Panetsos, K. P., Aravanopoulos, F. A., and Scaltsoyiannes, A.,** 1998. Genetic variation of *Pinus brutia* from islands of the Northeastern Aegean Sea. *Silvae Genet.*, **47**, 115-120.
- Paquette, S. M., Bak, S., and Feyereisen, R.,** 2000. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol.*, **19**, 307-317.
- Peterson, J. A., and Prough, R. A.,** 1986. Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b5 in cytochrome P-450 catalysis. In: Ortiz de Montellano, P. R. (ed). *Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry*, New York, Plenum, p. 89.
- Petrakis, P. V., Roussis, V., Papadimitriou, D., Vagias, C., and Tsitsimpikou, C.,** 2005. The effects of terpenoids extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Behav. Proces.*, **69**, 303-322.
- Phillips, M. A., and Croteau, R. B.,** 1999. Resin-based defences in conifers. *Trends Plant Sci.*, **4**, 184-190.
- Pichersky, E., and Gershenon, J.,** 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 237-243.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P.,** 1996. Yeast expression of animals and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.*, **272**, 51-64.
- Porter, T. D., and Kasper, C. B.,** 1986. NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* **25**, 1682-1687.
- Powles, S. B., and Yu, Q.,** 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 317-347.
- Ro, D. K., Arimura, G., Lau, S. Y. W., Piers, E., and Bohlmann, J.,** 2005. Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase *PtAO* is a multi-functional, multi-substrate cytochrome P450 monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8060-8065.
- Ro, D. K., and Bohlmann, J.,** 2006. Diterpene resin acid biosynthesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): Functional characterization of abietadiene/levopimaradiene synthase (PtTPS-LAS) cDNA and subcellular targeting of PtTPS-LAS and abietadienol/abietadienal oxidase (PtAO, CYP720B1). *Phytochemistry*, **67**, 1572-1578.
- Rontein, D., Onillon, S., Herbette, G., Lesot, A., Werck-Reichhart, D., Sallaud, C., and Tissier, A.,** 2008. CYP725A4 from yew catalyzes complex structural rearrangement of taxa-4(5),11(12)-diene into the cyclic ether 5(12)-oxa-3(11)-cyclotaxane. *J. Biol. Chem.*, **283**, 6067-6075.
- Rupasinghe, S., Baudry, J., and Schuler, M. A.,** 2003. Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling. *Protein Eng.*, **16**, 721-731.

- Saatçioğlu, F.**, 1976. Silvikültür I: Silvikültürün biyolojik esasları ve prensipleri. İ.Ü. Orman Fak. Yay., İ.Ü. Yay. No: 2187, 423 s., İstanbul.
- Scagel, R. F.**, 1965. An evolutionary survey of the plant kingdom, Wadsworth Publishers, CA, USA.
- Schiller, G., and Grunwald, C.**, 1987. Resin monoterpenes in rangewide provenance trials of *Pinus halepensis* Mill in Israel. *Silvae Genet.*, **36**, 109-114.
- Schmialek, P.**, 1963. Compounds with juvenile hormone action. *Z. Naturforsch.*, **18**, 516-519.
- Schopf, R.**, 1986. The effect of secondary needle compounds on the development of phytophagous insects. *For. Ecol. Manag.*, **15**, 55-64.
- Schuler, M. A.**, 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **15**, 235-283.
- Schuler, M. A., and Werck-Reichhart, D.**, 2003. Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 629-637.
- Scott, A. C., Anderson, J. M., and Anderson, H. M.**, 2004. Evidence of plant-insect interactions in the upper Triassic Molteno Formation of South Africa. *J. Geol. Soc.*, **161**, 401-410.
- Sczcepanik, M., Dams, I., and Wawrzenczyk, C.**, 2005. Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with the p-menthane system against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, **34**, 1433-1440.
- Seifert, A., and Pleiss, J.**, 2008. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins*, **74**, 1028-1035.
- Semiz, G.**, 2009. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)’da çam kese böceği (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams.)’ne karşı direncin genetik çeşitliliğinin terpenler bakımından araştırılması (Doktora Tezi), Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Shien, D. M., Lee, D. M., Chang, W. C., Hsu, J. B., Horng, J. T., Hsu, P. C., Wang, T. Y., and Huang, H. D.**, 2009. Incorporating structural characteristics for identification of protein methylation sites. *J. Comput. Chem.*, **30(9)**, 1532-1543.
- Shimada, Y., Fujioka, S., Miyauchi, N., Kushiro, M., Takatsuto, S., Nomura, T., Yokota, T., Kamiya, Y., Bishop, G. J., and Yoshida, S.**, 2001. Brassinosteroid-6-oxidases from arabidopsis and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.*, **126**, 770-779.
- Siminszky, B., Corbin, F. T., Ward, E. R., Fleischmann, T. J., and Dewey, R. E.**, 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1750-1755.
- Slama, K., and Williams, C. M.**, 1965. Juvenile hormone activity for the bug *Pyrrhocoris apterus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 411-414.

- Smith, P. K., Krohn R. I, Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C.,** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150(1)**, 76-85.
- Sonnhammer, E. L. L., von Heijne, G., and Krogh. A.,** 1988. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Glasgow, T. L. J., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., and Sensen, C., editor. AAAI Press., Menlo Park, CA. 175-182.
- Stephan, B. R.,** 1987. Differences in the resistance of Douglas fir provenances to the woolly aphid, *Gillettella cooleyi*. *Silvae Genet.*, **36**, 76-79.
- Thoss, V., and Byers, J. A.,** 2006. Monoterpene chemodiversity of ponderosa pine in relation to herbivory and bark beetle colonization. *Chemoecology*, **16**, 51-58.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., and DellaPenna, D.,** 2004. The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**,402-407.
- Tiberi, R., Niccoli, A., Curini, A., Epifano, F., Marcotullio, M. C., and Rosati, O.,** 1999. The role of the monoterpene composition in *Pinus* spp. needles, in host selection by the pine processionary caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*. *Phytopar.*, **27**, 263-272.
- Tobolski, J. J., and Honover, J. W.,** 1971. Genetic variation in monoterpenes of Scotch pine. *Forest Sci.*, **17**, 293-299.
- Trapp, S., and Croteau, R.,** 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 689-724.
- Url 1** <<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>>, alındığı tarih 02.05.2012.
- Url 2** <<http://www.expasy.ch>>, alındığı tarih 12.05.2011.
- Vermilion, J. L., and Coon, M. J.,** 1978. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8812-8819.
- Watanabe, K., Shono, Y., Kakimizu, A., Okada, A., Matsuo, N., Satoh, A., and Nishimura, H.,** 1993. New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, 2164-2166.
- Waters, D. L. E., Holton, T. A., Ablett, E. M., Lee, L. S., and Henry, R.,** 2005. cDNA microarray analysis of developing grape. *Functionals and Inter Genomics*, **5**, 40-58.
- Watt, A. D.,** 1989. The chemical composition of pine foliage in relation to the population dynamics of the pine beauty moth, *Panolis flammea*, in Scotland. *Oecologia*, **78**, 251-258.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E., and Mc Ree, D. E.,** 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural

adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell*, **5**, 121-131.

- Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R.**, 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.*, **1**, reviews3003.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., and Didierjean, L.**, 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.*, **5**, 116-123.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S., and Paquette, S.**, 2002. Cytochrome P450. In: Somerville, C., and Meyerowitz, E. (eds) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Yaltırık, F.**, 1993. Dendroloji ders kitabı: Gymnospermae (açık tohumlular). İ.Ü. Orman Fak. Yay., İ.Ü. Yay. No: 3443, İstanbul.
- Yaltırık, F., ve Boydak, M.**, 1993. Türkiye kızılçamlarında genetik çeşitlilik (varyasyon). Uluslararası Kızılçam Sempozyumu Bildiriler; 1-10, Antalya.
- Yavuz, M.**, 2011. Zeytin tahmini P450 monooksijenaz geninin moleküler karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Yoshida, Y., Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Horiuchi, T., and Gotoh, O.**, 1997. Structural and evolutionary studies on sterol 14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 monooxygenase: II. Evolutionary analysis of protein and gene structures. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 1122-1128.
- Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., and Gershenson, J.**, 2006. Methyljasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiol.*, **26**, 977-988.

EKLER

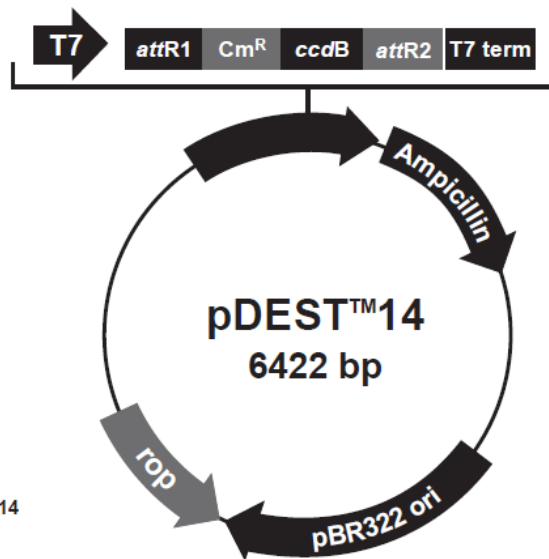
EK-1: pCR8/GW/TOPO[®] vektör dizisi.

```

                    M13 forward (-20) priming site
501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCA AATAATGATT
                    attL1                    GW1 priming site
581 TTATTTTGAC TGATAGTGAC CTGTTCGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
                    EcoR I                    EcoR I
659 AAA GCA GGC TCC GAA TTC GCC CTT PCR product AAG GGC GAA TTC GAC CCA GCT TTC TTG TAC
    TTT CGT CCG AGG CTT AAG CCG GAA TTC CCG CTT AAG CTG GGT CGA AAG AAC ATG
    Lys Ala Gly Ser Glu Phe Gly Leu Lys Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr
                    attL2                    GW2 priming site
713 AAAGTTGG CATTATAAAA AATAATTGCT CATCAATTTG TTGCAACGAA CAGGTCACTA TCAGTCAAAA TAAATCATT
                    T7 promoter/priming site                    M13 reverse priming site
791 ATTTGCCATC CAGCTGATAT CCCCTATAGT GAGTCGTATT ACATGGTCAT AGCTGTTTCC TGGCAGCTCT

```

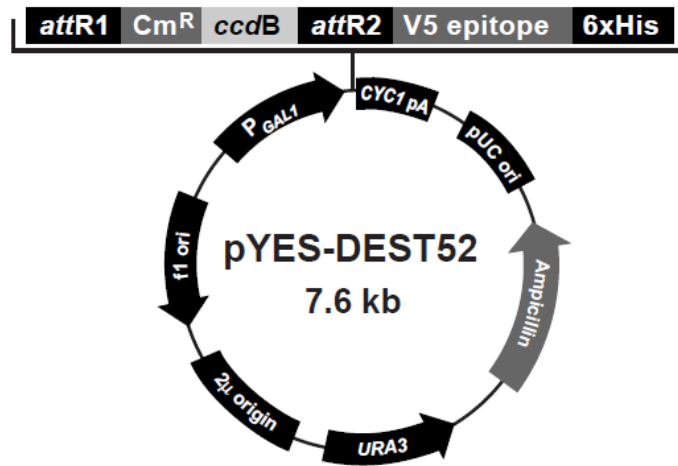
EK-2: pDEST[™]14 vektörün haritası.



Comments for pDEST[™]14
6422 nucleotides

T7 promoter: bases 21-40
 attR1: bases 67-191
 Chloramphenicol resistance gene (Cm^R): bases 441-1100
 ccdB gene: bases 1442-1747
 attR2: bases 1788-1912
 T7 transcription termination region: bases 1923-2051
 bla promoter: bases 2539-2637
 Ampicillin (bla) resistance gene: bases 2638-3498
 pBR322 origin: bases 3643-4316
 ROP ORF: bases 4687-4878 (C)
 C=complementary strand

EK-3: pYES-DEST52 vektörün haritası.



Comments for pYES-DEST52

7621 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451

T7 promoter: bases 475-494

attR1 recombination site: bases 511-635

Chloramphenicol resistance gene: bases 771-1430

ccdB gene: bases 1772-2077

attR2 recombination site: bases 2118-2242

V5 epitope: bases 2265-2306

Polyhistidine (6xHis) region: bases 2316-2333

CYC1 polyadenylation region: bases 2366-2619

pUC origin: bases 2803-3476

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 3321-4481 (complementary strand)

URA3 gene: bases 4499-5606 (complementary strand)

2μ origin: bases 5610-7081

f1 origin: bases 7149-7604 (complementary strand)



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aslı SEMİZ (KIRIKBAKAN)
Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir, 14 Ekim 1977
Yazışma Adresi: Pamukkale Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
20070 Denizli, Türkiye

Öğrenim Durumu

Doktora (2007-2012): Biyoloji Anabilim Dalı
Pamukkale Üniversitesi
Yüksek Lisans (2001-2004): Biyoloji Anabilim Dalı
Pamukkale Üniversitesi
Lisans (1995-1999): Biyoloji Bölümü
Dokuz Eylül Üniversitesi

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı

“Sitokrom P4501A ve Glutasyon S-Transferaz’ların Mavri Kefal Balığından (*Liza saliens*) Karakterizasyonu ve Değişik Dokularda İmmünolojik Tanımlanması” Doç. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, 2004.

Doktora Tez Başlığı ve Tez Danışmanı

“Kızılçam (*Pinus brutia*) Sitokrom P450720B (CYP720B) Geninin Klonlanması ve Karakterize Edilmesi” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, 2012.

Yayınlar

Uluslararası Makaleler (SCI)

- Tutuncu, B., Kucukatay, V., Arslan, S., Sahin B., **Semiz A.**, and Sen, A. (2011) Alteration of drug metabolizing enzymes in sulphite oxidase deficiency. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 51(1), 50-54.
- Arslan, S., Ozgun, O., Celik, G., **Semiz, A.**, Dusen, O., Mammadov, R., and Sen, A. (2011) Effects of *Cyclamen trochopteranthum* on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 63(3), 545-555.
- Agus, H. H., Tekin, P., Bayav, M., **Semiz, A.**, and Sen, A. (2009) Drug Interaction Potential of the Seed Extract of *Urtica urens* L. (dwarf nettle). *Phytotherapy Research* 23(12), 1763-70.

- Sen, A., and **Semiz, A.**, (2007) Effects of Metals and Detergents on Biotransformation and Detoxification Enzymes of Leaping Mullet (*Liza saliens*). *Ecotoxicology & Environmental Safety* 68(3), 405-411.
- **Semiz, A.**, and Sen, A., (2007) Antioxidant and Chemoprotective Properties of *Momordica charantia* L. (Bitter Melon) Fruit Extract. *African Journal of Biotechnology* 6(3), 273-277.
- Sen, A., Sahin, B., Agus, H. H., Bayay, M., Sevim, H., and **Semiz, A.**, (2007) Prevention of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity by *Urtica urens* in Rats. *Journal of Applied Biological Sciences* 1(3), 29-32.
- Şen, A., and **Kirikbakan, A.**, (2004) Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S-Transferases in Leaping Mullet (*Liza saliens*). *Biochem (Moscow)* 69(9), 993-1000.

Uluslararası Bildiriler

- Karakurt, S., Celik, G., **Semiz, A.**, Arslan, S., Akca, H., Gencler-Ozkan, A.M., Sen, A., and Adali, O. (2012) Molecular Studies on Inhibitory Effects of *Epilobium hirsutum* L. on Drug Metabolizing CYP2B1, CYP2C1, CYP2D2 and CYP3A4 Enzymes in Rat Liver Microsomes. *19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting*, June 17-21, *Meeting Proceedings and Abstracts*, pp. 96 (P31).
- Sen, A., Ozkarsli, M., Dogan, N.M., **Semiz, A.**, and Arslan, S. (2011) Cloning, Expression, Purification and Characterization of *Bacillus licheniformis* catalase from Pamukkale Hot Springs. *European Biotechnology Congress*, September 28-October 01, *Current Opinion in Biotechnology* 22: Suppl. 1, pp. S39.
- **Semiz, A.**, Celik, G., Karakurt, S., Arslan, S., Gencler-Ozkan, A. M., Adali, O., and Sen, A. (2011) *In vivo* Effects of *Epilobium hirsutum* Extract on Different Glutathione Transferase Isozymes. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 233.
- Sen, A., Celik, G., **Semiz, A.**, Karakurt, S., and Adali, O. (2011) Effects of Ellagic Acid on CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2, NQO1 and GSTMu Enzymes in Rat. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 241.
- Todurga, Z. G., Adali, O., Celik, G., **Semiz, A.**, Karakurt, S., and Sen, A. (2011) Antioxidant Capacity of *Epilobium hirsutum* in Rats. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1.
- Ozyurt, R., **Semiz, A.**, Celik, G., Karakurt, S., Arslan, S., Gencler-Ozkan, A. M., Adali, O., and Sen., A. (2011) Modulations of Drug Metabolizing Enzymes by *in vivo* Treatment of *Epilobium hirsutum* Extract in Rat. *FEBS Journal* 278: Suppl. 1, pp. 225-226.
- Ozgun, O., Arslan, S., **Semiz, A.**, Kapdag M., Oztas, M., Mammadov, R., and Sen, A. (2009) Cyclamen as an Ethnomedicine. Is it Safe? *FEBS Journal* 276: Suppl. 1, pp. 333.
- **Semiz, A.**, Aynaci, H. K., Kus, A., Elmas, L., and Sen, A. (2008) Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4 in the Turkish Population. *FEBS Journal* 275: Suppl. 1, pp. 110.
- **Semiz, A.**, Ozkarsli, M., and Sen, A. (2007) Protective Effects of Annual Nettle Against Chemical Carcinogens. *FEBS Journal* 274: Suppl. 1, pp. 178.

- **Semiz, A.**, Agus, H. H., Bayav, M., Sevim, H., and Sen, A. (2006) Potential Drug Interactions with *Urtica urens*. 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, November 2-5, Belek-Antalya, pp. 121 (P046).
- **Kirikbakan, A.**, and Sen, A. (2003) Distribution of Glutathione S-Transferases in Mullet (*Liza saliens*). 13th International Conference on Cytochromes P450, Biochemistry Biophysics and Drug Metabolism, June 29-July 3, Chemické Listy, pp. S152-153, Prague.
- Sen, A., **Kirikbakan, A.**, Buhler, D. R., and Arinc, E. (2003) Biochemical, Molecular Genetic and Environmental Aspects of Mullet (*Liza saliens*) CYP1A1. 13th International Conference on Cytochromes P450, Biochemistry Biophysics and Drug Metabolism, June 29-July 3, Chemické Listy, pp. S152-153, Prague.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- Sever, M., Karakurt, S., **Semiz, A.**, Çelik, G., Gençler-Özkan, A. M., Şen, A., ve Adalı, O. (2011) In Vivo Effect of Ellagic Acid on Antioxidant Enzyme Glutathione Peroxidase in Rat Liver. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Kasım-2 Aralık, Adana, *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry], 36(1); syf: 78.
- **Semiz, A.**, Karakurt, S., Çelik, G., Gençler-Özkan, A. M., Adalı, O., ve Şen, A. (2010) Sıçanlarda Glutasyon S-Transferazlar ve Antioksidan Enzimlerin *Epilobium hirsutum* Bitki Ekstraktları ile Değişimi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, Denizli, syf: 203-204 (PA038).
- Çelik, G., **Semiz, A.**, Karakurt, S., Adalı, O., ve Şen, A. (2010) Ellajik Asitin Faz I Enzimleri Üzerine Etkileri. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, Denizli, syf: 209-210 (PA045).
- Özkarslı, M., **Semiz, A.**, Mercan-Doğan, N., Arslan, Ş., ve Şen, A. (2010) Pamukkale Termal Sularından İzole Edilen *Bacillus licheniformis*'ten Katalaz Enziminin Klonlanması ve Ekspres Edilmesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, Denizli, syf: 249-250 (PA085).
- **Semiz, A.**, Mercan, N., ve Şen, A. (2008) Pamukkale Jeotermal Sulardan Termofilik Bacillus Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-28 Haziran, Trabzon, syf: 268-269 (PM079).
- Aynacı, H. K., **Semiz A.**, ve Şen, A. (2008) Sitokrom P4502C9 Aktivitesinin 7-Metoksi-4-Triflorokumarin ile Florometrik Ölçülmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-28 Haziran, Trabzon, syf: 629 (PZ386).
- Şen, A., Şahin, B., Ağuş, H. H., Bayav, M., Sevim, H., ve **Semiz, A.** (2006) Karaciğer Koruyucu *Urtica urens*: Sıçanlarda Karbontetraklorür'ün Neden Olduğu Karaciğer Toksitesinin *U. urens* ile Giderilmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası-Aydın, syf:59 (SS154).
- Şen, A., **Semiz, A.**, Yılmaz, F., Barlas, M., Özdemir, N., ve Yorulmaz, B. (2006) Muğla-Dalaman Sulak Alanındaki Balıklar ve Bu Alandaki Organik Kirliliğin Balık Biyomarkör Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesiyle Tespiti. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası-Aydın, syf: 167 (PS223).
- **Semiz, A.**, ve Şen, A. (2005) Çeşitli Metal ve Deterjanların Mavri Kefal (*Liza saliens*) Karaciğer Mikrozomal EROD ve Sitozolik GST Aktiviteleri Üzerine

İnhibitör Etkileri. 19. *Ulusal Kimya Kongresi*, 30 Eylül-04 Ekim, Kuşadası-Aydın, syf: 475 (BKP48).

- Tütüncü, B., **Kırıkbakan, A.**, ve Şen, A. (2004) Hamster Karaciğer Dokusunda Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesinin Karakterize Edilmesi. 18. *Ulusal Biyokimya Kongresi*, 15-19 Mayıs, Trabzon, ***Türk Biyokimya Dergisi*** [Turkish Journal of Biochemistry], 29(1); 14-142 (P146).
- Hekim, K., **Kırıkbakan, A.**, ve Şen, A., (2004) Sıçan Anti-Oksidant Enzimlerin ve Glutasyon S-Transferazların *Momordica charantia* Meyze Özütleri ile Değişimi. 18. *Ulusal Biyokimya Kongresi*, 15-19 Mayıs, Trabzon, ***Türk Biyokimya Dergisi*** [Turkish Journal of Biochemistry], 29(1); 38 (SB36).
- Şen, A., ve **Kırıkbakan, A.**, (2003) Dalaman Çayı Sazan (*Cyprinus carpio*) Balık Dokularında Bazı Biyomarkör Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi. 1. *Acıpayam Sempozyumu*, 1-3 Aralık, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Bildiri Kitabı, syf: 609.

Projeler

“Kızılçam (*Pinus brutia*) Sitokrom P450720B (CYP720B) Geninin Klonlanması ve Karakterize Edilmesi”. Şen, A., **Semiz, A.**, PAÜBAP, 2010FBE023, 2010-2012.

“Yakıtunun Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Proteomik ve Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması”. Adalı, O., Şen, A., Akça, H., Gençler-Özkan, A. M., TÜBİTAK Projesi, 109R012, 2009-2012.

“Tekstil Sanayisinde Kullanılan Katalaz-Peroksidaz (CP) Enziminin Rekombinant Sentezi, Endüstriyel Process Dayanıklılığının Geliştirilmesi ve Üretimi”. Şen, A., Mercan, N., Çelebi-Toprak, F., ve **Semiz, A.**, DPT Projesi, DPT2006K120950, 2006-2009.

“Faz II Grubundan olan ve Biyomarkör olarak Kullanılan *Liza saliens* Glutasyon S-Transferazların Doku Dağılımı ve Karakterizasyon”. Şen, A., Adalı, O., Tin, Y., ve **Kırıkbakan, A.**, TÜBİTAK Projesi, TBAG2058 (101T064), 2003.

“*Momordica charantia* Meyve Ekstrelerinin Antioksidant Etkilerinin Karakterizasyonu”. Şen, A., ve **Kırıkbakan, A.**, PAÜ Bilimsel Araştırma Fonu Projesi, PAÜBAP-FEF2003-014, 2003.

“Çevresel Olarak İndüklenmiş Sitokrom P4501A1’in Kefal Balık Dokularında Katalitik, İmmunokimyasal ve Genetik Olarak Kalitatif Tayin ve Tespiti”. Şen, A., ve **Kırıkbakan, A.**, PAÜ Bilimsel Araştırma Fonu Projesi, PAÜBAP-FEF2002-001, 2002.

Katıldığı Kongreler

- Haziran 2011, *36th FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine*, Torino, Italy.
- Haziran 2010, *20. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Denizli.
- Eylül 2008, *FEBS Advanced Course: Cytochrome P450 Systems: from structure to application*, Kransjka Gora, Slovenia.
- Temmuz 2008, *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference*, Athens, Greece.
- Şubat 2008, *EMBO Young Scientist Forum*, İstanbul.

- Temmuz 2007, 32nd FEBS Congress, Vienna, Austria.
- Kasım 2006, 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, Antalya.
- Haziran 2006, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Kuşadası, Aydın.
- Ekim 2005, 19. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, Aydın.
- Ekim 2004, 19th European Workshop on Drug Metabolism, Antalya.
- Mayıs 2004, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon.
- Aralık 2003, 1. Acıpayam Sempozyumu, Acıpayam, Denizli.
- Kasım 2000, 6. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Katıldığı Kurslar

- 14-18 Mayıs 2001, Moleküler Biyoloji/Mutagenез/Genom-Proteom Kursu. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gebze-Kocaeli.

Üye Olduğu Kuruluşlar

- Türk Biyokimya Derneği (TBD) 2005-
- International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) 2006-
- Türk Toksikoloji Derneği (TTD) 2006-