

***ORIGANUM ONITES* L.'DE MİTOJENLER TARAFINDAN
AKTİVE EDİLEN PROTEİN KİNAZ KİNAZ (MAPKK)
ENZİM AİLESİ ÜYELERİNDEN BİRİNİN KLONLANMASI
VE ENZİMATİK OLARAK TANIMLANMASI**

İsmail POYRAZ

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2007

**Bu çalışma TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından
desteklenmiştir. Proje No: TBAG-2415 104T025**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İsmail Poyraz'ın "*Origanum onites*'de Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz (MAPKK) Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Klonlanması ve Enzimatik Olarak Tanımlanması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 20/07/2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN
Üye (II. Danışman) : Yard.Doç.Dr.Muhittin ARSLANYOLU
Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
Üye : Prof. Dr. Mahinur AKKAYA
Üye : Doç. Dr. A. Safa ÖZCAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ORIGANUM ONITES L.'DE MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE EDİLEN PROTEİN KİNAZ KİNAZ (MAPKK) ENZİM AİLESİ ÜYELERİNDEN BİRİNİN KLONLANMASI VE ENZİMATİK OLARAK TANIMLANMASI

İsmail POYRAZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN

2. Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2007, 170 sayfa

Origanum onites ülkemizde kültüre alınmış, ticareti en fazla yapılan bitki türüdür. *O.onites*'ten elde edilen uçucu yağlar ilaç ve kozmetik başta olmak üzere birçok endüstri alanında kullanılmakta, ayrıca yaprakları baharat olarak tüketilmektedir. Bu bitkiden elde edilen uçucu yağ miktarının farklı bölge, iklim ve yıllara göre farklı oranlarda olduğu bilinmektedir. MAPK (Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz) enzim ailesi, MAPKKK-MAPKK-MAPK şeklinde üçlü kinaz modülünden oluşan bir sinyal iletim yoludur ve bitkilerde çevresel faktörlere karşı hücrel cevabın oluşmasında rol oynar. Bu çalışmada *O. onites* bitkisinde MAPK sinyal yolunda görev alan MAPKK enzim ailesi üyelerinden birinin klonlanması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. *O.onites* bitkisinden beş farklı olası MAPKK cDNA'sının orta bölgeleri klonlanarak nükleotid dizileri belirlenmiş ve bunlardan *OoI7-MAPKK*'nin 5' ve 3' uçları RACE tekniği ile elde edilmiştir. 5' ve 3' uçlarının dizi bilgisi kullanarak tasarlanan spesifik primerlerle yaklaşık 1400bp büyüklüğünde ürün elde edilmiştir. Bu ürün klonlanarak nükleotid dizisi saptanmış, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanında MAPKK olduğu gösterilmiştir. Klonlanan cDNA *OoMAPKK-1* olarak isimlendirilmiştir. Genin amino asit dizisi belirlenerek MAPKK enzim ailesine özgü motifler ortaya çıkartılmıştır. Yapılan RT-PZR analizleriyle *OoMAPKK1* gen ekspresyonunun yaprak ve gövde dokularında var olduğu, kök de dört ayrı deneme yapılmasına rağmen var olmadığı, ayrıca soğuk ve yaralanma stres şartlarında arttığı görülmüştür. Rekombinant *OoMAPKK1*-MBP füzyon proteini üretmek amacıyla start ve stop kodonları içeren spesifik primerler tasarlanarak yapılan PZR sonucu elde edilen 1059 bp (353 A.A.)'lik ürün, pMAL-p2x ekspresyon plazmitine aktarılarak *E.coli*'de üretilme deneyi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Origanum onites*, MAPKK, RT-PZR, RACE Teknikleri, Gen Klonlama, Rekombinant Protein Üretimi

ABSTRACT

PhD Dissertation

CLONING AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF A MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE(MAPKK) ENZYME FAMILY MEMBER IN *ORIGANUM ONITES*

İsmail POYRAZ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN

2. Supervisor: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2007, 170 pages

Origanum onites is the most commercially cultivated plant species in Turkey. The essential oils extracted from *O.onites* are used in drug and cosmetic industry as well as other industrial areas. The leaves of *O.onites* are also used as spice. It is known that the amount of essential oils extracted from *Origanum* differs between different geographic regions, climates and year. The MAPK (mitogen activated protein kinase) enzyme family is a signal transduction pathway composed of triple kinases modules namely MAPKKK-MAPKK-MAPK and play roles in production of cellular response to environmental factors in plants. The aim of this thesis was to clone and characterize one member of MAPKK enzyme family from *O.onites*. Mid-region nucleotide sequences of the five different putative MAPKK cDNAs were cloned by using MAPKKs specific degeneracy primers. Among them *Oo17-MAPKK* was chosen and its 5', 3' ends were produced by using RACE technique. The sequence data of 5', 3' ends was used to design specific primers to obtain whole cDNA sequence. PCR reactions with these primers gave an expected ~1400 bp product. The nucleotide sequence of the product was determined and confirmed as MAPKK in NCBI (National Center for Biotechnology Information) database and it was named as *OoMAPKK1*. *OoMAPKK1* amino acid sequence was determined by bioinformatic analysis and MAPKK spesific conserved domains were shown. Expression of *OoMAPKK1* was shown to be present in leaf and stem but absent in root based on the four assays, and to be induced under cold and wounding stress. Specific primers containing start and stop codons of *OoMAPKK1* gene were designed and by using these primers a 1059 bp (353 aa.) PCR product was obtained. This PCR product was transferred to a pMAL-p2x expression plasmit and an experiment to express a recombinant *OoMAPKK1*-MBP fusion protein was done in *E. coli*.

Keywords: *Origanum onites*, MAPKK, RT-PCR, RACE Techniques, Gene Cloning, Recombinant Protein Synthesis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, bilgi ve deneyimleriyle her türlü imkan ve ortamı sağlayan, eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini aldığım değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN'e, engin tecrübe ve bilgisinin yanında kendi laboratuvar ve malzeme imkanlarını esirgemeyen yardımcı danışmanım Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na, tez izleme dönemleri dışında da öneri ve destekleriyle bana her zaman yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ÖZATA ve Yard. Doç. Dr. Ayşe MERCANGÖZ'e, Biyoloji Bölümünün imkan ve olanaklarını mümkün kılan Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ersin YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla bana güç veren ve destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili eşim İlham ERÖZ POYRAZ'a, aileme ve tüm dostlarıma sevgi ve teşekkürlerimle...

İsmail POYRAZ

Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Origanum onites</i> Bitkisinin Sistematik Tanımı.....	4
1.2. <i>Origanum onites</i> Bitkisinin Genel Morfolojik Özellikleri	5
1.3. <i>Origanum onites</i> Bitkisinin Yayılış Alanı	5
1.4. <i>Origanum onites</i> Bitkisinin Kimyasal Yapısı	5
1.5. <i>Origanum onites</i> Bitkisinin Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi	7
1.6. Hücre İçi Sinyal İletim Yolları.....	9
1.7. Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPKs)	13
1.8. MAPKK Enzim Ailesi	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1. <i>Origanum onites</i> 'in Çimlendirilmesi	26
2.2. Çalışma Materyalinin Hazırlanması.....	27
2.3. <i>Origanum onites</i> Total RNA'sının izolasyonu.....	27
2.4. <i>Origanum onites</i> DNA'sının İzolasyonu.....	28
2.4.1. Fermantas DNA Purification Kit ile Saflaştırma	28
2.4.2. Klasik CTAB DNA İzolasyonu.....	29
2.5. <i>Origanum onites</i> RNA ve DNA'sının Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini	30

2.6. <i>Origanum onites</i> MAPKK Enziminin Orta Bölgesini Klonlamak İçin Yarıbozuk Primerlerin Tasarımı	31
2.7. Stok ve Çalışma Primer Solüsyonlarının Hazırlanması	34
2.8. RT-PZR (GeriTranskripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	34
2.8.1. RT Reaksiyonu	34
2.8.2. RT-PZR	35
2.8.3. PZR Ürününün Miktar Arttırma PZR Şartları.....	37
2.9. PZR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi	38
2.10. Jel Dökümantasyon İşlemi	40
2.11. PZR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması	40
2.12. PZR Ürününün Plazmite Eklenmesi (Ligasyon)	41
2.12.1. Kullanılan Bakteri Suşları	43
2.12.2. Besi Yeri Hazırlığı	44
2.12.3. Konakçı Bakteri (Kompetent Hücre) Hazırlığı	44
2.13.. Rekombinant Plazmitin Konakçı Bakteri İçine Taşınması (Transformasyon).....	45
2.14. Rekombinant Plazmiti İçeren Kolonilerin Seçimi.....	46
2.15. Koloni PZR	47
2.16. Plazmitin Konakçı Bakteriden İzolasyonu	47
2.16.1. Klasik Plazmit DNA İzolasyon Yöntemi	48
2.16.2. Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) Kiti ile Plazmit İzolasyonu	49
2.16.3. QIAgen Plasmid Mini Kit ile Plazmit İzolasyonu.....	50
2.17. Rekombinant Plazmitin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	51
2.18. Dizi ve Biyoinformatik Analizi	52
2.18.1. Dizi Analizi İçin PZR	52
2.18.2. Etanolle Çöktürme.....	54
2.18.3. DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi	55
2.18.4. Elde Edilen DNA Dizi Bilgisinin Gen	

Bankasında Taranması	56
2.19. <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' Uçlarının Elde Edilmesi (RACE Tekniği).....	56
2.19.1. <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' Ucunun Elde Edilmesi İçin Primer Tasarımı	56
2.19.2. 3' <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının 3' Ucunun 3' RACE Reaksiyonuyla Elde Edilmesi	57
2.19.3. Sitozin Kuyruğunun cDNA'nın 5' Ucuna Eklenmesi(d _C Tailing)	58
2.19.2. 5' <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının 5' Ucunun 5' RACE Reaksiyonuyla Elde Edilmesi	59
2.20. <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının Tamamının Klonlanması İçin Primer Tasarımı	60
2.21. <i>Origanum onites</i> MAPKK cDNA'sının Tamamının Klonlanması İçin PZR	64
2.22. Southern Blot Yöntemi.....	65
2.22.1. <i>Origanum onites</i> Genomik DNA'sının Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi	65
2.22.2. Kesime Uğratılan DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi	65
2.22.3. Southern Blotlama.....	65
2.22.3.1. Klasik Blotlama Yöntemi	66
2.22.3.2. Watman-Biometra FastBlot Cihazı ile Blotlama.....	68
2.22.4. DIG-İşaretli Bulucu DNA (Prob) Hazırlığı.....	68
2.22.5. Prehibridizasyon, Hibridizasyon ve Deteksiyon Aşamaları	69
2.23. <i>Origanum onites</i> MAPKK1 Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi	72
2.23.1. UTR Bölgesi Olmayan <i>Origanum onites</i> MAPKK1 cDNA'sının Eldesi	73
2.23.2. <i>Origanum onites</i> MAPKK1 cDNA'sının Translasyon	

Plazmitine Eklenmesi	74
2.23.3. Translasyon Plazmitinin Konakçı	
Bakteriye Taşınması.....	75
2.24. MBP- <i>OoMAPKKI</i> Füzyon Proteinini Üreten	
Kolonilerin Belirlenmesi	75
2.24.1. <i>OoMAPKKI</i> Geninin Ekspresyonunun	
Gözlemlenmesi.....	75
2.24.2. SDS-PAGE	78
2.25. RT-PZR Analizleri	80
3. BULGULAR	82
3.1. <i>Origanum onites</i> MAPKK Enzim Ailesi	
Üyelerinin cDNA'sının Kısmi ve Bir Tanesinin	
Bütünsel Klonlanması.....	82
3.1.1. <i>Origanum onites</i> RNA'sının İzolasyonu.....	82
3.1.2. RT-PZR ve Yarıbozuk Primerlerle Olası	
MAPKK cDNA Orta Bölgelerinin Eldesi.....	83
3.1.2.1. RT-PZR Ürününün Plazmite Eklenmesi	
(Ligasyon) ve Plazmitin Konakçı Bakteriye	
Taşınması (Transformasyon).....	84
3.1.2.2. Koloni PZR Yöntemiyle Pozitif Kolonilerdeki	
RT-PZR Ürün Varlığının Kanıtlanması	85
3.1.2.3. Plazmitin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	86
3.1.2.4. RT-PZR Ürününün DNA Dizi ve	
Biyoinformatik Analizi	87
3.1.3. cDNA'lardan Birinin (<i>Oo-17-MAPKK</i>)	
Uç Bölgelerinin Klonlanması	94
3.1.3.1. 3' Ucunun Elde Edilmesi İçin PZR	
(3'RACE-PZR).....	94
3.1.3.2. 3' RACE Koloni PZR.....	96
3.1.3.3. 3' RACE Ürününün DNA Dizi	
ve Biyoinformatik Analizi.....	97

3.1.3.4. 5' Ucunun Elde Edilmesi İçin PZR (5'RACE-PZR).....	99
3.1.3.5. 5' RACE Koloni PZR.....	100
3.1.3.6. 5' RACE Ürününün DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi.....	101
3.1.4. <i>Oo-17-MAPKK</i> cDNA'sının 3' ve 5' Uçlarının Orta Bölge ile Örtüştürülmesi.....	103
3.1.5. <i>Oo-17-MAPKK</i> cDNA'sının Tamamının Klonlanması İçin PZR.....	105
3.1.5.1. <i>Oo-17-MAPKK</i> cDNA'sı İçin Koloni PZR.....	106
3.1.5.2. <i>Oo-17-MAPKK</i> cDNA'sının DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi.....	107
3.1.5.3. <i>Origanum onites OoMAPKK1</i> Geninin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi (Haritalanması).....	116
3.2. <i>OoMAPKK1</i> Geninin <i>O. onites</i> Genomundaki Kopya Sayısının Belirlenmesi.....	118
3.2.1 <i>Origanum onites</i> DNA'sının izolasyonu.....	118
3.2.1.1. DNA Purification Kit ile Saflaştırma.....	118
3.2.1.2. Klasik CTAB DNA İzolasyonu.....	120
3.2.2. Southern Blot.....	120
3.3. <i>OoMAPKK1</i> Geninin Farklı Doku ve Farklı Stres Koşullarında mRNA Düzeyinin Araştırılması.....	124
3.4. <i>Origanum onites</i> MAPKK1 Proteininin <i>E. coli</i> 'de Rekombinant Olarak Üretilmesi.....	127
3.4.1. UTR Bölgesi Olmayan <i>Origanum onites</i> MAPKK Geninin Eldesi.....	127
3.4.2. <i>Origanum onites</i> MAPKK1 Geninin Ekspresyon Plazmitine Aktarılması ve <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu.....	128
3.4.3. MBP- <i>OoMAPKK1</i> Füzyon Proteininin Belirlenmesi.....	130

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	133
4.1. Sonuç.....	142
4.2. Öneriler.....	142
KAYNAKLAR.....	144
Ek-1 <i>Oo4-MAPKK</i> Gen Bankası Kayıt Bilgisi	165
Ek-2 <i>Oo14-MAPKK</i> Gen Bankası Kayıt Bilgisi	166
Ek-3 <i>Oo20-MAPKK</i> Gen Bankası Kayıt Bilgisi	167
Ek-4 <i>Oo23-MAPKK</i> Gen Bankası Kayıt Bilgisi	168
Ek-5 <i>OoMAPKK1</i> Gen Bankası Kayıt Bilgisi.....	169

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>Origanum onites</i> bitkisinin genel görüntüsü	4
1.2. Hücre içi genel sinyal iletim yolları	10
1.3. Bitkilerde tanımlanan hücre içi sinyal iletim yolları	13
1.4. MAPK sinyal iletim yolu şeması	15
1.5. <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde patojen, yaralanma ve abiyotik stres uyarılarında MAPK metabolik yolu	17
1.6. Ozmotik stres uyarısı	18
2.1. Laboratuvar ortamında çimlendirerek yetiştirdiğimiz <i>Origanum</i> <i>onites</i> 'in resimleri	26
2.2. <i>O. onites</i> MAPKK enziminin orta bölgesini klonlamak için gerekli yarımbozuk primerlerin dizaynı.	33
2.3. Standart bir PZR reaksiyonunun ısı döngüsünü gösteren şema	36
2.4. Kullanılan DNA marker'ları	39
2.5. Fermentas Fast-Ruler High Range DNA marker	40
2.6. pGEM-T Easy plazmit vektörü	42
2.7. pTZ57R/T plazmit vektörü.....	43
2.8. <i>Oo17</i> -MAPKK cDNA'sının tamamının klonlanması için primer tasarımı.....	63
2.9. Klasik blotlama düzeneği	67
2.10. SDS-PAGE'de kullanılan protein marker'ları	79
3.1. <i>O. onites</i> 'ten toplam RNA izolasyonu	82
3.2. RT PZR sonucu elde edilen ~500 bç büyüklüğündeki ürünün agaroz jeldeki görüntüsü	83
3.3. ~500 bç'lik ürünü taşıyan pGEM-T easy plazmitinin konakçı <i>E.coli</i> XLI-Blue hücrelerine aktarılması	84
3.4. Koloni PZR yöntemiyle plazmit içindeki ~500 bç'lik ürünün gösterilmesi	85
3.5. pGEM-Teasy içine klonlanan PZR ürünlerinin <i>Hind-III</i> enzimiyle kesilerek kontrolü	86

3.6. <i>Oo-4 MAPKK</i> kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi	88
3.7. <i>Oo-14 MAPKK</i> kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi	88
3.8. <i>Oo-20 MAPKK</i> kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi	89
3.9. <i>Oo-23 MAPKK</i> kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi	90
3.10. <i>O. onites</i> 'ten klonlanan MAPKK cDNA parçaları ile diğer bitki MAPKK'larının amino asit dizilerinin EBI veri tabanında ClustalW programı ile hizalanması.....	91
3.11. <i>O. onites</i> 'ten klonlanan MAPKK cDNA parçaları ile diğer bitki MAPKK'larının amino asit dizileri kullanılarak Pyhlip yöntemine göre oluşturulan kısmi filogenetik ağaç	92
3.12. <i>Oo-17 MAPKK</i> kısmi cDNA'sının DNA dizi analizi ham verisi.....	93
3.13. <i>Oo-17 MAPKK</i> kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi.....	94
3.14. 3' RACE reaksiyonunun PZR adımı için yapılan ısı ve kalıp optimizasyonu	95
3.15. <i>Oo17-MAPKK</i> 'nın 3'RACE PZR ürünü	96
3.16. PZR yöntemiyle plazmit içindeki 3'RACE ürünü gösterilmesi.....	97
3.17. <i>Oo-17 MAPKK</i> kısmi cDNA'sının 3' ucu DNA dizi analizi ham verisi	98
3.18. <i>Oo-17 MAPKK</i> cDNA'sının 3' bilgisi ve blast analizi	99
3.19. 5' RACE PZR primer oturma ısı optimizasyonu sonucu oluşan ürünlerin %1.4'lük agaroz jelde görüntüsü	99
3.20. Optimizasyon sonrası 5' RACE Re-PZR sonucu.....	100
3.21. Koloni PZR ile 5'RACE kolonilerin taranması	101
3.22. <i>Oo-17 MAPKK</i> kısmi cDNA'sının 5' ucu DNA dizi analizi ham verisi	102
3.23. <i>Oo-17 MAPKK</i> cDNA'sının 5' ucu bilgisi ve blast analizi.....	103
3.24. <i>Oo-17</i> klonuna ait 5'RACE-Orta Bölge-3'RACE dizilerinin örtüşürülmesi (consensus) ile elde edilen tüm cDNA dizi bilgisi.....	105
3.25. <i>Oo-17</i> MAPKK cDNA ürününün tamamını elde etmek için yapılan PZR sonucu ~1400 bç'lik ürün.....	106
3.26. Koloni PZR yöntemiyle plazmit içindeki ~1400 bç'lik <i>Oo-17 MAPKK</i> cDNA'sının klonlandığının gösterilmesi.....	106

3.27. <i>Oo17-MAPKK</i> cDNA'sının okunan 725bç'lik DNA dizi analizi ham verisi	107
3.28. <i>Oo17-MAPKK</i> cDNA'sının NCBI verileri	108
3.29. <i>Oo17-MAPKK</i> cDNA klonundan elde edilen nükleotid ve amino asit dizisi.....	109
3.30. <i>Oo17-MAPKK</i> cDNA'sının EB1 veritabanındaki interproscan programının sabit ayarlarıyla yapılan analizi	110
3.31. <i>OoMAPKK1</i> 'e ait aminoasit dizi bilgisi ile diğer bitki MAPKK aminoasit dizi bilgilerinin EBI veritabanında karşılaştırılması	112
3.32. <i>OoMAPKK1</i> 'e ait aminoasit dizi bilgisi ile diğer canlılara ait MAPKK aminoasit dizi bilgilerinin EBI veritabanında Dbclustal programında standart ayarlar kullanılarak dikey hizalanması.....	114
3.33. <i>Origanum onites</i> <i>OoMAPKK1</i> 'in diğer bitki MAPKK'leri arasındaki filogenetik ilişki	115
3.34. <i>OoMAPKK1</i> enziminin NCBI Cn3D 4.1 programına göre 3 boyutlu protein yapısı	116
3.35. <i>Oo17-MAPKK</i> tüm cDNAsının (1404 bç) <i>EcoRI</i> enzimiyle kesiminin Gen tool analiz programıyla gösterilmesi.....	117
3.36. <i>OoMAPKK1</i> tüm cDNAsının <i>EcoRI</i> ile kesim reaksiyonu	117
3.37. <i>OoMAPKK1</i> geninin GeneTool 1.0 programıyla genel restriksiyon enzimleriyle kesim bölgelerinin gösterilmesi.....	118
3.38. DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen <i>O.onites</i> genomik DNA örnekleri.....	119
3.39. Klasik CTAB genomik DNA izolasyonu.....	120
3.40. İşaretli DNA probunun işaretleme ve özgünlük açısından test edilmesi.....	121
3.41. Southern Blot yöntemiyle <i>OoMAPKK1</i> 'in genomik kopya sayılarını belirleme	122
3.42. Hibridizasyon ısısı 68°C olan ikinci Southern Blot denemesi	122
3.43. Hibridizasyon ısısı 52°C olan Southern Blot denemesi.....	123
3.44. Hibridizasyon ısısı 42°C olan Southern Blot denemesi.....	123

3.45. CTAB yöntemi ile izole edilen <i>Origanum</i> genomik DNAsı kullanılarak tekrarlanan Southern blotlama	124
3.46. <i>O. onites</i> yaprak materyalinde RT-PZR sonucu <i>OoMAPKK1</i> cDNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	125
3.47. <i>O. onites</i> gövde materyalinde RT-PZR sonucu <i>OoMAPKK1</i> geni ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	125
3.48. <i>OoMAPKK1</i> geninin farklı stres koşullarındaki mRNA düzelelerinin araştırılması	126
3.49. UTR'sız <i>OoMAPKK1</i> geni için temperature gradient PZR sonuçları.....	127
3.50. <i>OoMAPKK1</i> genini elde etmek için <i>Pfu</i> DNA polimeraz ile yapılan PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü	128
3.51. XLI-Blue ve TB1 kolonilerinden kurulan koloni PZR reaksiyonu sonuçları	129
3.52. pMAL-p2x plazmitinin <i>Hind III</i> enzimiyle kesimi	129
3.53. <i>OoMAPKK1</i> geninin pMAL-p2x (6721bç) translasyon plazmitine eklenmesi.....	130
3.54. <i>OoMAPKK1-MBP</i> füzyon proteinin <i>E. coli</i> 'de rekombinant olarak sentezlenmesi	131
4.1. <i>O.onites</i> <i>OoMAPKK1</i> ve <i>N. tabacum</i> NQK1 MAPKK'in 3 boyutlu protein yapılarının karşılaştırılması	136
4.2. <i>OoMAPKK1</i> 'in <i>A.thaliana</i> 'daki fonksiyonel olarak sınıflandırılmış MAPKK'ler ile karşılaştırılması	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Türkiye <i>Origanum</i> türlerinin uçucu yağlarında kavrakrol ve timol oranları	6
1.2. <i>O. onites</i> 'in farklı biçim yılları, farklı biçim dönemleri ve farklı biçim şekillerine göre uçucu yağ ve bileşenlerinin oranları.....	7
1.3. Biyolojik fonksiyonlarına göre gruplandırılmış bitki MAPKK'leri.....	23
1.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> 'daki MAPKK enzimlerinin gruplandırılması	24
2.1. Standart PCR reaksiyonunun bileşenleri.....	36
2.2. Standart PCR reaksiyonunun ısı ve zaman profili.....	36
2.3. Dizi Analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar tablosu	53
2.4. DTCS mix bileşenleri.....	54
2.5. DNA transferinden önce uygulanan ön aşamalar	68
2.6. Melezleme standart solüsyonu	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absesik asit
AC	: Adenil siklaz
cADP	: Siklik adenzin difosfat
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cGDP	: Siklik guanozin difosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DAG	: Diasilgliserol
DMAPP	: Dimetilallil difosfat
DVD	: Korunmuş birleşme bölgesi
EİB	: Ege ihracatçılar birliği
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
FPP, C ₁₅	: Farnesil difosfat
GGPP	: Geranilgeranil difosfat
GnRH-a	: Gonadotropin-Releasing Hormon analogu
GPP, C ₁₀	: Geranil difosfat
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Hg	: Ligand hedgehog
HR	: Yüksek hassasiyette cevap
InsP3	: Inositol 1,4,5-trifosfat
IPP	: İzopentil difosfat İmidazole
JAKs	: Janus kinazlar
JNK	: c-Jun NH ₂ - terminal kinaz (SAPK) kinaz
L	:Linne
MAPK	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MAPKK	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz kinaz
MAPKKK	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz

MAPKKKK	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz
MAPKs	: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar
MEK	: MAPKK
MEKK	: MAPKKK
NADP	: Nikotinik Asit Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOX	: NADP oksidaz
NPK1	: Tütün MAPKKK'ı
PA	: Fosfatidik asit
PD98059	: 2'-amino-3'methoxyflavone
PLC	: Fosfolipaz C
PtdIns4,5P2	: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PTP	: Protein tirozin fosfataz
Raf	: MAPKKK
RAN	: Ras- ile ilgili çekirdek proteini
Ras	: MAPKKKK
RC	: Ribozil siklaz
ROCs	: Reseptörle çalışan kanallar
S1P	: Sphingosin 1 fosfat
SAPK	: Stres-Aktiveli Protein Kinaz
SB203580	: 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulphonylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H
STATs	: Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörlerini fosforile eden
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü Tirozin kinazlar
UTR	: Translasyona uğramayan bölgeler
U0126	: 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene
VOCs	: Voltajla çalışan kanallar
WIPK	: Yaralanma ile uyarılan protein kinaz
IPTG	: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) içermemektedir

1. GİRİŞ

Türkiye, *Origanum* türlerini de içine alan *Lamiaceae* (*Labiata*, Ballıbabagiller) familyasının gen merkezi konumundadır (Sarıhan ve ark. 2006). Geniş yayılış alanı ve yüksek oranda endemizm bu gerçeğin güçlü bir kanıtıdır (Davis 1988; Alan, 1997; Başer 2001; Shulz ve ark. 2005; Sarıhan ve ark. 2006).

Ülkemizde kekik olarak da bilinen *Origanum* sp, endemikleri de içine alan birçok türle temsil edilmekte ve eskiden beri birçok alanda kullanılmaktadır (Tanker ve İlisulu, 1981; Baytop 1991; Baytop 1994; Tanker ve ark. 1998). *Origanum* türleri, birden fazla dik gövdeye sahip olan, çok yıllık otsu veya yarı çalimsı bitkilerdir. Çiçekleri salkımsı veya gövde uçlarında toplu halde bulunmaktadır (Davis 1982). *Origanum* türleri hem halk ilacı olarak hem de birçok ilacın bileşimine girmesi nedeniyle ayrıca öneme sahiptir (Başer 2001). Aromatik özelliğinden dolayı genellikle baharat veya tatlandırıcı olarak kullanımlarının yanında *Origanum* türlerinin içerdiği uçucu yağlardan izole edilen terpenik maddeler (timol, kavrakrol, simol) birçok ilacın bileşimine katılması nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Meriçli 1986; Başer 2001; Baydar ve ark. 2003; Kaloustian ve ark. 2003). M.Ö. 5. yüzyılda tıbbın babası olarak bilinen Hippocrates, *Origanum* bitkisini insanlarda çeşitli mide ve solunum problemlerinin tedavisi ile gıdaların dayanıklılığını artırmada kullanmıştır (Gemci 2006).

Origanum türlerinden ticareti yapılan ve kültüre alınmış en önde gelen tür *Origanum onites* L.'dir (Baydar 2002). *O. onites* Türkiye'de ticareti yapılan beş tür arasında en çok ihracatı gerçekleştirilen türdür. *O. onites*, doğal floramızın bir ürünü olmasının yanı sıra kültür bitkisi olarak yetiştirilen tek ticari *Origanum* türüdür. Ege Bölgesinde tarımı yapılan *O. onites*'in tarım alanı son yıllarda 6300 dönüme kadar ulaşmıştır (Oflaz 2002).

O. onites türünden elde edilen uçucu yağ oranının farklı iklim ve bölgelere göre farklı oranlarda olduğu, farklı yıl ve hasat şekillerine göre de değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Kekik yağında bir monoterpen olan kavrakrol içeriğinin ileri biçim dönemlerine göre (%63.89'dan %72.43'e) artış gösterdiği belirtilmiştir (Baydar 2002). *Origanum minitiflorum*'da yaz mevsimi kavrakrol oranının güz

mevsimine göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (Baydar, 2005). Yine kekik olarak bilinen *Thymus piperella* L.'de de çevresel faktörlerin (farklı iklim koşulları ve toprak tipleri) uçucu yağ oranı ve içeriğini etkilediği görülmüştür (Boira 1998).

Bitkiler çevresel streslere karşı uyumu sinyal yolları vasıtasıyla sağlamaktadırlar (Ragwal ve Agrawal 2003; Mishra ve ark. 2006; Ortiz-Masia ve ark. 2007). Mitojenler tarafından aktif hale getirilen protein kinazlar (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs), bitki ve hayvanlarda çevresel şartlara karşı uyumu sağlayan sinyal yollarını oluştururlar. MAPK sinyal transfer yolu tüm ökaryotik organizmalarda üçlü kinaz şeklinde bulunur ve kısaca; MAPKKK-MAPKK-MAPK şeklinde ifade edilir (Su ve Karin, 1996; Schenk ve Snaar-Jagalska 1999; Mundy ve Schneitz, 2002; Gabby Krens ve ark. 2006; Noguchi ve ark. 2007).

MAPKK'ler substratları olan MAPK'leri tirozin ve treonin aminoasitlerinden fosforile eden (çift spesifiteye sahip) kinazlardır (Nakagami ve ark. 2005; Mishra ve ark. 2006) ve yüksek substrat spesifitesine sahip olduklarından MAPK modülünün MAPKK → MAPK kısmının minimum düzeyde varyasyonuna izin vererek sinyal yönünü belirlemede etkin rol oynarlar (Bögre ve ark. 2000; Morris, 2001; Zhang ve ark. 2006a). Bitkilerde MAPK sinyal yolu etkin bir şekilde araştırılmasına rağmen çok farklı tiplerinin olması ve çok farklı metabolik yollarla ifade edilmesinden dolayı karmaşık bir duruma sahiptirler (Rakwal ve Agrawal, 2003).

Kekik yağı oranı ve içeriğinin *O. onites* bitkisinde çeşitli çevresel uyarıcıların etkisiyle değiştiği (Baydar 2002) ve bitkilerde genellikle çevresel ve içsel uyarıların ana iletim yollarından birinin MAPK sinyal yolu olduğu (Ichimura ve ark. 2002; Nakagami ve ark. 2005; Ortiz-Masia ve ark. 2007) göz önünde tutulduğunda; MAPK sinyal yolu enzimlerinin, kekik yağının içeriğini oluşturan terpenlerin sentezlendiği terpenoid sentez yolunun çalışmasında bir role sahip olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye kekik ihracatının % 80'nini karşılayan (Baydar, 2002) *O. onites* türünden çevresel uyarılar ve stres etmenlerine karşı hücrel cevabın oluşmasında önemli rol oynayan MAPKK enzim ailesi

üyelerinden birinin klonlanıp enzimatik olarak tanımlanmasıdır. Bu sayede, *O. onites* bitkisinde ilk kez sinyal yollarına ait bir gen klonlanmış, nükleotid ve amino asit dizi bilgisi tanımlanmış ve MAPK sinyal metabolik yolunun varlığı kanıtlanmış olacaktır.

1.1. *Origanum onites* Bitkisinin Sistematik Tanımı

Türkiye *Lamiaceae* (*Labiata*, Ballıbabagiller) familyasının önemli bir gen merkezi konumunda olup, bu familyaya ait 45 cins, 546 tür ve 731 takson bulunmaktadır. Bu familyanın ülkemizdeki endemizm oranı % 44.2'dir ve Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır. *Origanum* cinsi bu familyanın bir üyesidir (Sarıhan ve ark. 2006).

Dünyada bilinen 52 *Origanum* türünün % 60'ı Türkiye'de yayılış göstermektedir. Bunlardan 21'i dünyada sadece ülkemiz sınırları içinde endemik olarak bulunmaktadır. Türkiye'de 22 türe bağlı 32 *Origanum* taksonu yetişmektedir (Davis 1988; Alan, 1997; Başer 2001).

Latince İsimleri: *Origanum onites* L. (Şekil 1.1) Syn: *Origanum smyrnaem* L., *Origanum pollidum* Desf., *Majarona smyrnaem* (L) Bentham, *Majorana onites* (L.) Bentham var. *Columnaris* Rech. Fil (Ceylan 1976; Anonim 2007).

Bilinen Türkçe İsimleri: Kekik, İzmir kekiği, Bilyalı Kekik, Peynir Kekiği, Eşek kekiği, Güveyotu, Akkekik, Taş Kekik (Ceylan 1976; Baydar, 2002; Oflaz 2002)



Şekil 1.1. *Origanum onites* bitkisinin genel görüntüsü

1.2. *Origanum onites* Bitkisinin Genel Morfolojik Özellikleri

Origanum onites; 65 cm. kadar yükseklikte, hirsat tüylü, yarıçalı bir bitkidir. Her gövde 13 cm kadar uzayan 10 çift dal taşır. Yaprakları saplı veya yarı-saplıdır. Yaprak şekli kordat, ovat veya eliptik, 3-22x2-19 mm, tepesi akut veya akuminat ya da değil, kenarları çok hafif serrulat veya düzdür. Damarları alt yüzde belirgindir. Spikulalar korimbus çiçek durumunda yaklaşık 3-17x4 mm'dir. Braktelerin şekli obovat veya eliptik, 2-5x1,5-4 mm, tepesi abtustan akuminata kadar değişir. Kenarları düz veya dentikulat'tır. Kaliks 2-3 mm, korolla beyaz, 3-7 mm.'dir (Davis, 1975). Çimlenme zamanı Mayıs-Haziran aylarıdır (Okan ve Şafak 2004). Çiçeklenme zamanı nisan-ağustos ayları arasındadır. Kayalık tepeler, yamaçlar ve genellikle kireçli topraklarda, bazen gölgelik yerlerde 1400 m yüksekliklere kadar gelişir (Davis, 1975).

1.3. *Origanum onites* Bitkisinin Yayılış Alanı

Origanum onites, Ege ve Doğu Akdeniz'e özgü bir bitki olup (Ceylan ve ark., 1999; Oflaz 2004) Sicilya ve Yunanistan'da da bulunmaktadır. Yunanistan'da 0-1000 m rakımda yayılış göstermektedir (Şafak ve Okan 2004). Ege ve Akdeniz bölgelerinde taşlık ve yamaçlı yerlerde yaygın çok yıllık bir bitkidir (Zeybek ve Zeybek 1994). Kekik genellikle gevşek, ılımlı, humuslu ve kalkerli, kireçli toprakları tercih etmektedir (Okan ve Şafak 2004; Ünal ve ark. 2005). *O. onites* türünün yetiştiği çeşitli yüksekliklerdeki lokalitelerden alınan topraklarda yapılan analizler sonucu bu toprakların organik madde içeriğinin % 1.22 ile % 5.15 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Gönüz ve Özörgücü 1999).

1.4. *Origanum onites* Bitkisinin Kimyasal Yapısı

Kekik suyu, essansiyel yağ ve terpenik yağ (Baydar 2002) olarak da isimlendirilen uçucu yağlar, lignin ve selüloz gibi polimerler ile sudan ibarettir. *Origanum* türlerinin içerdiği uçucu yağlar (% 1-8 oranlarında) kurutulmuş yaprak,

çiçek, tomurcuk ve dallarından elde edilir (Tanker ve İlisu, 1981; Meriçli 1986; Baytop 1994; Başer 2001; Kaloustian ve ark. 2003)

Origanum onites'ten edilen uçucu yağda, % 54.81-72.43 kavrakrol (Baydar 2002, Schulz ve ark. 2005), % 11.91-32.50 linalool, %1-90-6.38 p-cymene, % 0.31-4.64 timol, % 0.00-3.99 γ -terpinene ve % 0.35-3.27 borneol (Baydar 2002, Oflaz 2004), % 0.91-2.31 α -pinen, % 1.07-2.46 β -pinen, % 7.25-12.66 1.8 cineol (Ceylan ve ark. 1999) belirlenmiştir. Kavrakrol oranı ise çiçek salkımlarında %72.8, bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında (drog herbada) % 63.89 ve yapraklarda % 60.17 oranındadır. Timol oranı da çiçek salkımlarında % 0.60, buna karşın yapraklarda ise % 4.64'dür (Baydar 2002).

Kekik suyunda ayrıca doğada ender bulunan paramentendiol türevi oksijenli monoterpenlerin var olduğu da ortaya çıkarılmıştır (Jun ve ark. 2001; Kamel ve ark. 2001; Mockute ve ark. 2001; Gotsiou ve ark. 2002; Şahin ve ark. 2003; Baydar 2003).

Origanum türlerinin ortak özelliği yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşiğinin kavrakrol ve/veya timol olmasıdır (Çizelge 1.1.) (Vera ve Chane-Ming 1999; Baydar 2003) Aynı türün farklı coğrafik bölgelerde farklı oranlarda uçucu yağ ve kavrakrol içerdiği saptanmıştır (Başer 2001).

Çizelge 1.1. Türkiye *Origanum* türlerinin uçucu yağlarında kavrakrol ve timol oranları (Vera ve Ming 1999; Başer 2001; Mockute ve ark. 2001; Baydar, 2002, Baydar 2005)

Tür Adı:	Uçucu Yağ Oranı	Kavrakrol Oranı	Timol Oranı
<i>Origanum onites</i>	% 1-5	% 50-82	% 0.31-4.64
<i>Origanum vulgare</i>	% 1-7	% 23-80	% 0.3-0.5
<i>Origanum minutiflorum</i>	% 1-4	% 42-84	% 0.9
<i>Origanum syriacum</i>	% 4-5	% 63-79	% 25
<i>Origanum majorana</i>	% 5-8	% 32-84	% 0.15

O. onites bitkisinin farklı biçim yılları, farklı biçim dönemleri ve farklı biçim şekillerine göre uçucu yağ ve bileşenlerinin farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 1.2) (Baydar, 2002).

Çizelge 1.2. *O. onites*'in farklı biçim yılları, farklı biçim dönemleri ve farklı biçim şekillerine göre uçucu yağ ve bileşenlerinin oranları (Baydar 2002)

	Uçucu Yağ %	Uçucu Yağ Bileşenleri (%)					
		γ -Terpinene	P-Cymene	Linanool	Borneol	Tymol	Cavracrol
Biçim Yılı							
1998 Yılı	2.74	0.89	6.38	11.91	3.27	0.31	71.77
1999 Yılı	3.22	2.50	3.60	18.23	1.74	1.48	68.70
2000 Yılı	3.30	2.87	3.66	29.40	0.35	2.37	57.66
2001 Yılı	2.60	2.89	2.58	32.50	0.41	3.34	54.81
Biç. Dönemi							
1. Biç. (1999)	3.44	3.53	2.43	22.94	0.55	3.05	63.89
2. Biç. (1999)	3.00	3.99	3.19	15.96	1.83	0.92	69.80
3 Biç. (1999)	1.05	0.00	5.20	15.79	2.86	0.48	72.43
Biç. Şekli							
Çiçek Salkımı	3.94	1.79	1.90	23.06	0.57	0.60	72.08
Yaprak	3.55	2.96	2.67	26.06	0.52	4.64	60.17
Herba	2.85	3.53	2.43	22.94	0.55	3.05	63.89

1.5. *Origanum onites* Bitkisinin Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi

Anadolu'da kekik (*Origanum*) yaklaşık olarak milattan önce 7. yy'dan bu yana tedavide (spazm çözücü, antiseptik, gaz giderici, vb.) ve gıdalarda baharat olarak değişik amaçlı kullanılmaktadır (Kıtık ve ark. 1997).

Origanum türleri ilaç sanayinde antiseptik imalatında, bronşlarda koyu salgıyı sıvılaştırdığı için öksürük şuruplarında, boğmaca çözücü, teskin edici, düşük dozlarda ekspektoran (nefes yollarını açıcı) olarak kullanılmaktadır. Antibiyotik etki olarak mikroorganizmaların üremesini geciktirdiği veya tamamen durdurduğu için ağız antiseptiği olarak kullanılır. Koku giderici özelliğinden dolayı gargara, ağız yıkama sularında, diş macunu ve tozu yapımında kullanılır. Deride mantar hastalıklarına karşı inhibitör etkisi bulunduğu için mantar ilaçlarının bileşiminde yer almaktadır (Alan 1997; Gönüz ve Özgörücü 1999; Başer 2001).

Toprak üstü kısımlar mide rahatsızlıkları, soğuk algınlığı, baş ağrısı gibi durumlarda kullanılır. Uçucu yağı ile yapılan çalışmalarda analjezik (ağrı kesici) etkisi tespit edilmiştir. Yüksek miktarda fenol içermesi nedeni ile antibakteriyel, antispazmodik ve antiseptik etkileri bilinmektedir (Oflaz 2002). *Origanum* türlerinin sahip olduğu uçucu yağların antioksidant özelliği olduğu da bulunmuştur (Milos ve ark. 2000; Pizzale ve ark. 2002).

Bazı ilaç etken maddelerinin sentezinde başlangıç maddesi ve ham ilaç olarak kullanılan timol gibi değerli bir maddenin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağı (Aetheroleum Origani) timol taşır (Zeybek ve Zeybek 1994, Baytop 1999). Kekik yağı, antiseptik losyon, ticari dezenfektan, antiseptik banyo ve sabun hazırlanmasında ve alkollü içeceklerde de kullanılmaktadır (Zeybek ve Zeybek 1994; Alan 1997; Başer 2001). *O. onites*'ten elde edilen uçucu yağın insektisid ve larvacid özelliği olduğu saptanmıştır (Çetin ve Yanıkoğlu 2006). Son yıllarda İzlanda Likeni ve diğer bazı bitkiler ile birlikte bronşit ve nezle tedavisinde kullanılan birçok preparatları hazırlanmıştır ve drog olarak ihraç edilmektedir.

Kekik dünyada üretim ve tüketimi sınırlı olan bir bitkidir ve dış ticaret hacmi 10000 ton civarındadır. Eskiden Yunanistan'a ihraç edilen *O. onites*, bu ülkede işlendikten sonra Avrupa veya Amerika'daki alıcı firmalara sevk edilmekteydi (Baytop 1999). Türkiye dünyada en fazla kekik ihraç eden ülke olup, dünya kekik talebinin 6-7 bin tonunu karşılamaktadır (Şafak ve Okan 2004; Sarıhan ve ark. 2006). Bu miktarın da % 95'i doğadan, % 5'i özel arazilerdeki üretimden elde edilmektedir. Kekiğin yıllık ihracat ortalaması 6680 ton'dur (Şafak ve Okan 2004). Türkiye'de, 1999 yılında 16 milyon \$ değerinde 7600 ton ilaçlık-kekik (2.16 \$/kg) ve yaklaşık 606600 \$ karşılığında 68.5 ton kekik yağı ihracatı yapılmıştır (Baydar, 2002). Ege İhracatçı Birlikleri'nin (EİB) 1997-2003 yılları arasındaki verilerine göre Türkiye'den ağırlıklı olarak kekik ithal eden ülkelerin başlıcaları, sırasıyla, ABD, Almanya, İtalya ve Kanada'dır (Şafak ve Okan 2004). Kekik kültürü sınırlı olarak ülkemizde İzmir, Antalya ve Isparta'da yapılmaktadır. Ayrıca doğal olarak yetişen kekikler, toplanıp kurutularak büyük şehir piyasalarına sürülmektedir (Baydar, 2002). *O. onites* üzerinde ıslah ve agronomi çalışmaları sürdürülmektedir (Tınmaz ve ark. 2002).

Dünya kekik ihracatında Türkiye'yi 1500-2000 ton ile Meksika izlemektedir. Ayrıca Yunanistan (300-400 ton), İsrail (200-300 ton), Arnavutluk (200-300 ton) ve Fas (50-150 ton) kekik ihracatı yapan ülkeler arasındadırlar (Şafak ve Okan 2004).

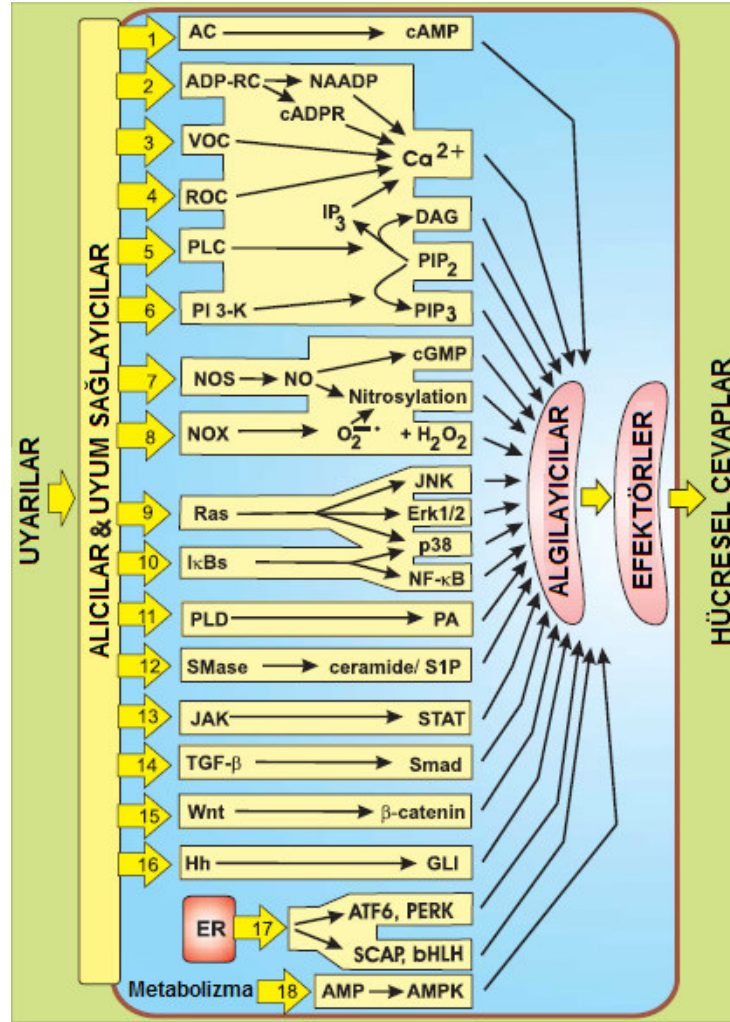
İhracatı en çok yapılan ve uçucu yağ üretiminde kullanılan *Origanum* türleri; *Origanum onites*, *Origanum vulgare subsp. hirtum* (İstanbul kekiği, kara kekik.), *Origanum minutiflorum* (Sütçüler kekiği, yayla kekiği, toka kekiği), *Origanum majorana* (beyaz kekik, Alanya kekiği), *Origanum syriacum var. bevanii* (dağ kekiği, Suriye kekiği, İsrail kekiği) dir. *Origanum onites* bu pazar payının % 80'ini oluşturmakta ve dünya pazarlarında rağbet gördüğü için artan talebi karşılamak amacıyla Ege bölgesinde tarımı yapılmaktadır (Başer, 2001).

1.6. Hücre İçi Sinyal İletim Yolları

Canlılarda hücreler, aktivitelerini düzenleyen metabolik sinyal yolları kullanılmaktadırlar. Bu sinyal metabolik yollar, nasıl aktive edildiklerine bağlı olarak iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Bunların çoğu hücre dışı uyarılar tarafından aktive edilirler ve bilginin hücre yüzeyinden hücre içindeki efektör sistemlere taşınmasında fonksiyon görürler. Bununla birlikte, sinyal sistemlerinin bazıları, genellikle metabolik mesajcılar şeklinde hücre içinde oluşturulan bilgiyi cevaplamaktadırlar. Bu sinyal metabolik yollarının tümü için bilgi, ya protein-protein etkileşimleriyle ya da genellikle ikinci mesajcılar olarak tanımlanan ve diffüze olabilen elementler tarafından iletilmektedir. Temel özelliklerine göre hücre içinde toplam 18 tane sinyal metabolik yolu tanımlanmıştır (Şekil 1.2) (Berridge 2006).

1) cAMP (Siklik Adenozin Mono Fosfat) Sinyal Metabolik yolu: Karakterize edilmiş ilk sinyal sistemlerinden birisi cAMP sinyal metabolik yolu, diğer çoğu sinyal sistemlerinde ikincil mesajcılarının geneline yol göstermektedir. Bir düşünceye göre hücre yüzeyine ulaşan dış uyarıcılar ilk mesajcılardır ve daha sonra hücre yüzeyinde adenil siklaz (AC) enzimi tarafından sinyal yollarının bir parçası olan ikincil mesajcılara (cAMP) dönüştürülmekte ve cAMP sinyal yolunun devamındaki efektörleri aktive etmektedir (Berridge 2006).

2) Ca²⁺ sinyalizasyonundaki cADP Riboz (Siklik Adonozin Difosfat Riboz, CADPR) ve Nikotinik Asit Adenin Dinükleotid Fosfat (NAADP) sinyal metabolik yolu: Bir ADP ribozil siklaz (ADP-RC), bu iki ikincil mesajcının oluşturulmasından sorumludur (Berridge 2006).



Şekil 1.2. Hücre içi genel sinyal iletim yolları (Berridge (2006)'dan uyarlanmıştır)

3) Voltajla-çalışan kanallar (Voltage-operated channels, VOCs) sinyal yolu: Kolayca uyarılabilen hücrelerde dışarıdaki Ca^{+2} 'nin girişini kontrol ederek Ca^{+2} sinyallerine yardımcı olur (Berridge 2006).

4) Reseptörle-çalışan kanallar (Receptor-operated channels, ROCs) sinyal yolu: Kolayca uyarılabilen ve uyarılmayan hücrelerde Ca^{+2} 'nin girişini kontrol ederek Ca^{+2} sinyallerine yardımcı olur (Berridge 2006).

5) Fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eden sinyal yolu: Sinyal yollarının bir kısmını (Inositol 1,4,5-trifosfat (InsP3)/ Ca^{+2} sinyal yolu, Diasilgliserol (DAG)/protein kinaz C sinyal yolu, PtdIns4,5P2 sinyal yolu, Multipurpoz inositol

polifosfat sinyal metabolik yolu) oluşturan ve fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat'ı (PtdIns4,5P2 yada PIP2 olarak da bilinir) hidrolize eden fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eden sinyal yolu (Berridge 2006).

6) Uyarıyla aktive olan PtdIns 3-kinase sinyal yolu: fosfatidilinositol (PtdIns) 3-kinase'ı uyarmakta ve aktive uyarılan enzim PIP2'yi fosforile ederek bir lipid ikincil mesajcı olan fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (PIP3)'a dönüştürmektedir (Berridge 2006).

7) Nitrik oksit (NO)/cGMP (Siklik Guanozin Mono Fosfat) sinyal metabolik yolu: Nitrik oksit sentaz (NOS), Nitrik oksit (NO)'i gaz formuna dönüştürür. Gaz formundaki NO, cGMP ve nitrosilaton reaksiyonlarında rol oynamaktadır. NO, Ca⁺² sinyal yolu gibi diğer metabolik yolların aktivasyonunun düzenlenmesinde özellikle önemli role sahiptir (Lodish ve ark. 2003; Berridge 2006).

8) Redox sinyal yolu: Çoğu reseptör, NADPH oksidaz (NOX) yoluyla, tirozin fosfatazlar, transkripsiyon faktörleri ve iyon kanalları gibi spesifik sinyal proteinlerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynayan süperoksit (O₂⁻) ve Hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşturulmasında rol oynamaktadır (Pandey ve ark., 2005; Berridge 2006).

9) Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolu: Genelde Ras ile başlayan ve paralel metabolik yollar şeklinde devam eden; hücrel stres, proliferasyon ve apoptosis gibi bir çok hücrel proseste rol oynayan klasik bir protein fosforilasyon yolu örneğidir (Berridge 2006; Mishra ve ark. 2006; Lin ve ark. 2007).

10) Nüklear Faktör κB (NF-κB) sinyal metabolik yolu: Bu sinyal sistemi çok sayıda fonksiyona sahiptir. Patojen saldırılarına karşı doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturan makrofaj ve nötrofillerdeki inflamatoral (iltihap kurutucu) cevabın başlatılmasında önemli role sahiptir (Lodish ve ark. 2003; Berridge 2006).

11) Fosfolipaz D sinyal metabolik yolu: Bu sinyal yolu, çeşitli hücrel proseslerin kontrolünde ikincil mesajcı olarak rol oynayan ve Fosfolipaz D tarafından Fosfatidilkolin'in hidroliziyle oluşan Fosfatidik asit (PA)'ya bağımlı bir lipid temelli sinyal sistemidir (Berridge 2006).

12) Sphingomyelin sinyal metabolik yolu: Belirli büyüme faktörleri ve sitokinlerin sphingomyelin hidroliziyle hücrede zıt etkilere sahip oldukları gözlenen iki tane ikinci mesajcıyı oluştururlar. Sphingosin 1 fosfat (S1P) hücre proliferasyonunu uyarırken, apoptozis'e yardımcı olmaktadır. S1P'nin fonksiyonlarından biri de dış depolardan Ca^{+2} 'nin salınmasıdır. Hücreden salınan S1P'nin hareketi karmaşıktır ve dış reseptörleri uyaran bir hormon gibi rol oynayabilir (Berridge 2006).

13) JAK/STAT sinyal metabolik yolu: Bu sinyal yolu, hücre yüzey reseptörlerinden hücre çekirdeğine bilgi transferini hızlı yoldan yapan sinyal iletim metabolik yoludur. Janus kinazlar (JAKs), hücre çekirdeğine bilgi taşıyan sinyal iletileri ve transkripsiyon aktivatörlerini (STATs) fosforile eden tirozin kinazlardır (Doğan ve Güç 2004; Berridge 2006)).

14) Smad sinyal metabolik yolu: Bu metabolik yol, Smad transkripsiyon faktörleri yoluyla transkripsiyonu kontrol edilen, dönüştürücü büyüme faktör (transforming growth factor) β (TGF- β) süper ailesinin çalışmalarında arabuluculuk yapmaktadır (Berridge 2006).

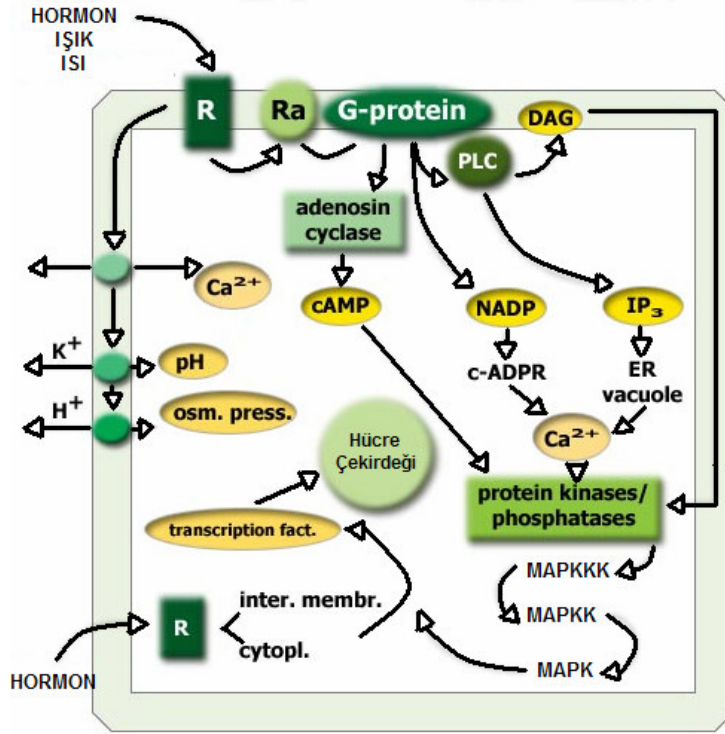
15) Wnt sinyal metabolik yolu: Bu metabolik yol gelişim ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır (Lodish ve ark. 2003; Berridge 2006).

16) Hedgehog sinyal metabolik yolu: Bu metabolik yol Wnt sinyal metabolik yoluna benzer şekilde gelişim ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde de fonksiyonları vardır. Ligand Hedgehog (Hg), transkripsiyon faktör GLI aracılığıyla fonksiyon göstermektedirler (Lodish ve ark. 2003; Berridge 2006).

17) Endoplazmik retikulum stres sinyal yolu: Endoplazmik retikulum (ER) stres sinyal metabolik yolu, ER lümeni içinde işlenen proteinin durumuyla ilgili hücre çekirdeğine bilgi iletmek için ER tarafından kullanılan mekanizmalarla ilgilidir (Berridge 2006).

18) AMP sinyal metabolik yolu: Bu metabolik yol, hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli bir metabolik yolu aktive eden bir metabolik mesajcı fonksiyonuna sahip olan Adenozin monofosfat (AMP) tarafından düzenlenmektedir (Berridge 2006).

Bitkilerde bilinen hücre içi sinyal iletim yolları genel olarak Şekil 1.3’de tasvir edilmiştir.



Şekil 1.3. Bitkilerde tanımlanan hücre içi sinyal iletim yolları (<http://www.ueb.cas.cz/sidros/english/signaly.html> adresinden uyarlanmıştır)

1.7. Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPKs)

MAP kinazlar; p38 MAP kinaz ailesi, c-Jun NH2- terminal kinaz (JNK) ailesi ve hücre dışı sinyalleri düzenleyen kinazlar (Extracellular Signal Regulated kinase, ERK) ailesi şeklinde üç ana gruba ayrılmaktadırlar (Lodish ve ark. 2003; Doğan ve Güç 2004). p38 MAP kinaz ailesi ve c-Jun NH2- terminal kinaz (JNK) ailesi sadece memelilerde tanımlanmış olan metabolik yollardır (Lodish ve ark. 2003). p38 MAP kinaz ailesi, inflamator sitokinler ve çevresel stresler tarafından aktive edilirler. JNK ailesi üyeleri ise transkripsiyonun kritik düzenleyicileridirler. JNK’lar Stres-Aktiveli Protein Kinaz (SAPK) olarak da adlandırılmaktadırlar ve UV ışınları, ısı şoku, gibi hücre dışı streslere karşı yanıtta rol oynarlar (Klotz ve ark. 1999; Chuang ve ark. 2000; Johnson ve Lapatat 2002; Lejeune ve ark. 2002).

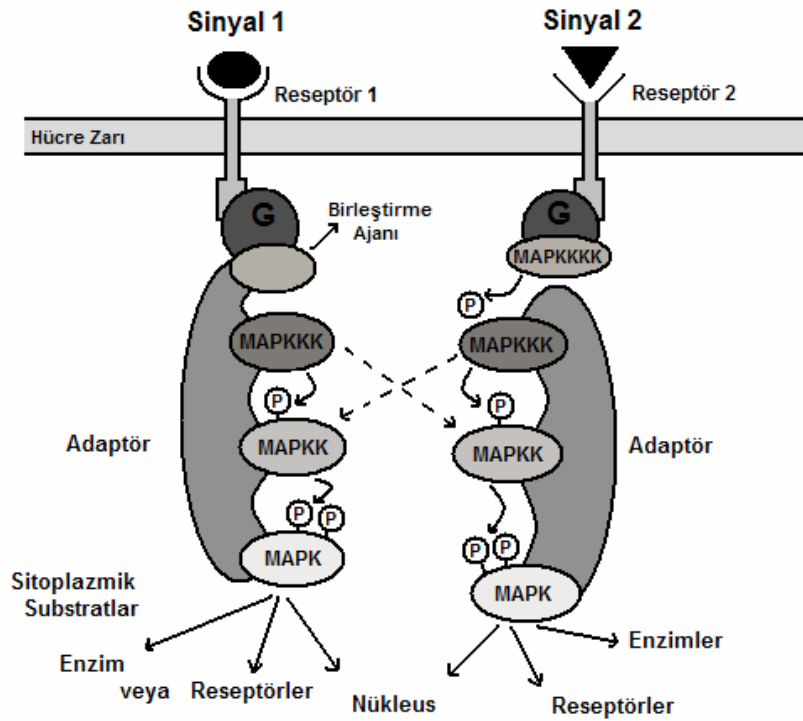
Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazlar (MAPKs), insan (Panteva ve ark. 2003; Haddad 2005), bitki (Jonak ve ark. 1999; Bent 2001; Morris 2001; Cardinale 2002; Ichimura ve ark. 2002; Nakagami ve ark. 2005; Ortiz-Masia ve ark. 2007), hayvan (Kamata ve ark. 1996; Guadagno ve Ferrell Jr. 1998; Gabby Krens ve ark. 2006), böcek (Zhuang ve ark. 2006), fungus (Müller ve ark. 2003; Noguchi ve ark. 2007), tek hücreli (Wang ve ark. 1999; Arslanyolu 2006) ve mayalarda (Pan ve Chang 1999; Wang ve Shiozaki 2006; Sharma ve Mondal 2006) bulunan genel sinyal iletim modülleridir (Innes 2001; Ichimura ve ark. 2002) ve serin/treonin protein kinazlar olarak bilinirler (Jonak ve ark. 1999; Miyata ve ark. 1999; Bent 2001; Cardinale 2002; Olson ve Hallahan 2004; Hamel ve ark. 2006; Ortiz-Masia ve ark. 2007). MAP Kinaz'lar, ERKs olarak da adlandırılmaktadırlar (Stone ve Walker 1995; Zhai ve ark. 2005; Smith ve ark. 2006; Ohori ve ark. 2007).

MAPK sinyal yolu tüm ökaryotik organizmalarda üçlü kinaz şeklinde bulunur ve kısaca; MAPKKK-MAPKK-MAPK şeklinde ifade edilmektedir. MAPK enzimleri MAPKKK-MAPKK-MAPK olarak yukarıdan aşağıya reseptör-hedef şeklinde bağlantılıdır (Twyman, 1998, Nakagami ve ark. 2005; Gabby Krens ve ark. 2006; Mishra ve ark. 2006; Nicole ve ark. 2006).

MAPKKK'ler dıştan gelen sinyallerle aktif hale gelir ve MAPKK'i serin/treonin motifinden fosforile eder. Aktif hale gelen MAPKK, substratı olan MAPK'in treonin ve tirozin amino-asitlerini fosforile ederek MAPK'i aktif hale getirir. Bu özelliklerinden dolayı MAPKK enzim ailesi **treonin ve tirozini fosforile edebilen çift-spesifiteye sahip kinazlar** olarak da adlandırılmaktadırlar (Su ve Karin 1996; Schenk ve Snaar-Jagalska 1999; Mundy ve Schneitz 2002; Rakwal ve Agrawal 2003). Aktif MAPK'ler, sitoplazma ve çekirdekdeki ilgili substratların serin/treonin'lerini fosforile etmek suretiyle onları aktif veya inaktif hale getirerek dışarıdan gelen sinyale göre transkripsiyon, translasyon, hücre metabolizması gibi hücresel mekanizmaların çalışmasıyla hücrenin cevabın oluşturulmasını sağlarlar (Rakwal ve Agrawal 2003).

Fonksiyonel olarak birbiriyle ilişkili olan bu üç spesifik protein kinaz, temel bir MAPK sinyal yolu modülünü oluşturur ve (Mizoguchi ve ark. 1998; Bögre ve ark. 2000; Kurz ve Ewbank 2003) birkaç modül aynı zamanda bir

hücrede hücre zarıyla birlikte de bulunabilmektedir (Baluska ve ark. 2003). Ras veya heterotrimerik proteinler ile kompleks oluşturan MAPKKK kinaz (MAPKKK) ya da G proteinleri olarak adlandırılan diğer kinazlarla etkileşerek daha yukarıdaki bir sinyal yoluyla birleşebilmektedir (Xing ve Jordan 2000). Bu MAPKKK veya G proteinleri, plazma membranında bulunan hücre dışı uyarılara duyarlı bir reseptör protein ile bahsedilen MAPK modülü arasında bir birleştirme ajanı fonksiyonu görmektedirler (Şekil 1.4) (Bögre ve ark. 2000).



Şekil 1.4. MAPK sinyal iletim yolu şeması (Bögre ve ark. (2000)'dan uyarlanmıştır)

Bitki MAPKKK'leri yapısal özelliklerine göre üç temel grupta (*STE11MEKK*-benzeri, Raf-benzeri ve *NPK1*'in temelini oluşturduğu bitki-spesifik MAPKKK) tanımlanmıştır (Bögre ve ark 2000). MAPKKK'lerin *MEKK*-benzeri kinaz ailesinin spesifik motifi D-I-W-S-X-G-C-T-X-X-E-X-X-T-X-X-X-P (X= farklı amino asiti temsil eder) şeklindedir. Raf-benzeri kinaz ailesinin spesifik motifi ise G-V-X-X-W-E-L-X-T-X-X-X-P-W'dir (Tena ve ark. 2001). Tütün bitkisinden *NPK1* olarak adlandırılan 268 amino asitlik katalitik domeine sahip bir MAPKKK'nin bulunduğu rapor edilmiştir (Wang 2005).

Bitki MAPKK'leri ayrıntılı olarak bölüm 1.8.'de ele alınmıştır.

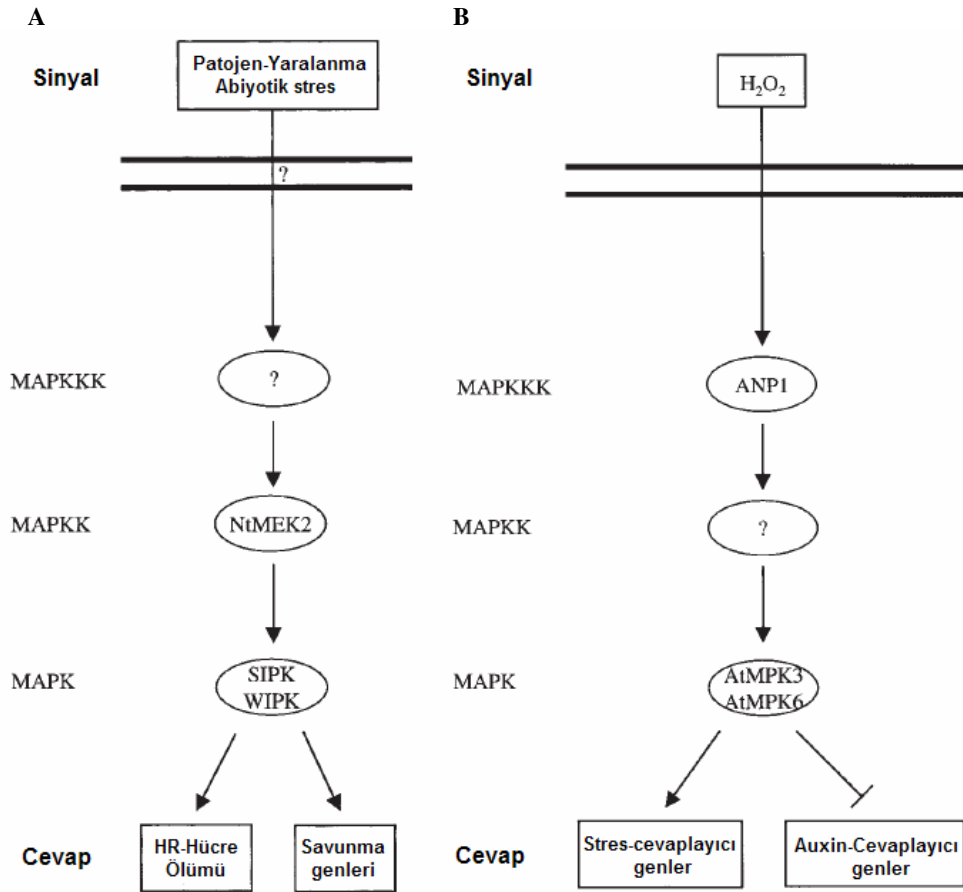
MAPK enzim ailesi üyeleri ise; transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar ve hücre iskeletiyle birlikte bulunan proteinleri substrat olarak kullanan çok geniş substrat yelpazesine sahip serin/treonin kinazlardır (Rakwal ve Agrawal 2003; Nakagami ve ark. 2005). Bitki MAPK enzim ailesinin amino asit zincirlerinin, serin/treonin protein kinazların katalitik fonksiyonları için gerekli olan 12 alt domain'de çok yüksek oranda benzer oldukları ve tüm zincirde yüksek oranda korunmuş oldukları görülmektedir. 11 alt domainin dışında N ve C uzantıları katalitik merkezden çok daha farklıdır, fakat yine de spesifik bitki MAPK'lerinin alt gruplarında korunmuşlardır ve substrat spesifitesine veya diğer proteinlerle etkileşime uyum sağlama gibi olası önemli biyolojik fonksiyonlar üstlenirler. Tüm bitki türlerinde MAPK'lerin aktif bölgelerinde TEY veya TDY motifi bulunmaktadır (Bögre ve ark. 2000; Vasconsuelo ve ark. 2004; Ley ve ark., 2006; Ortiz-Masia ve ark. 2007). TEY MAPK'lerin aksine tüm TDY MAPK'leri daha uzun bir C terminal uzantısına sahiptirler. MAPK'lerin aktivasyonu için fosforilasyonda gerekli olan treonin ve tirozin amino asitleri, tüm bitki MAPK'lerinde katalitik merkez 6. ve 8. alt domainler arasında bulunmaktadır (Bögre ve ark. 2000; Vasconsuelo ve ark. 2004). Spesifik motifleri T-X-Y-V-X-X-R-W-Y-R-A-P-E şeklindedir (Tena ve ark. 2001).

Medicago (Kültz 1998; Tena ve ark. 2001; Zhang ve Klessig 2001; Nakagami ve ark. 2005), *Arabidopsis* (Ichimura ve ark. 1998a; Mizoguchi ve ark. 1998; Huang ve ark. 2000, Asai ve ark. 2002), ve *Oryza sativa* (pirinç) (Agrawal ve ark. 2002; Agrawal ve ark. 2003) gibi bitkilerin genomik veya EST dizilerinin karşılaştırılması ve imza niteliğindeki motiflerin araştırılmasıyla, 20'den fazla MAPK (Zhang ve Klessig 2001; Nakagami ve ark. 2005), 10 tane MAPKK ve 60 tane MAPKKK tanımlanmıştır (Ligterink ve Hirt, 2000; Jonak ve ark. 2002; Pedley ve Martin 2004; Nakagami ve ark. 2005; Zhang ve ark. 2006a; Sreenivasulu ve ark., 2007). Sadece *Arabidopsis*'te 23 putatif MAPK, 10 putatif MAPKK ve 25'ten fazla (toplam 60 (Zhang ve ark. 2006a)) putatif MAPKKK bu araştırmalar sonucu bulunmuştur (Jin ve ark. 2002).

MAPK sinyal transfer yolu enzimleri, ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Liu ve ark. 2000;

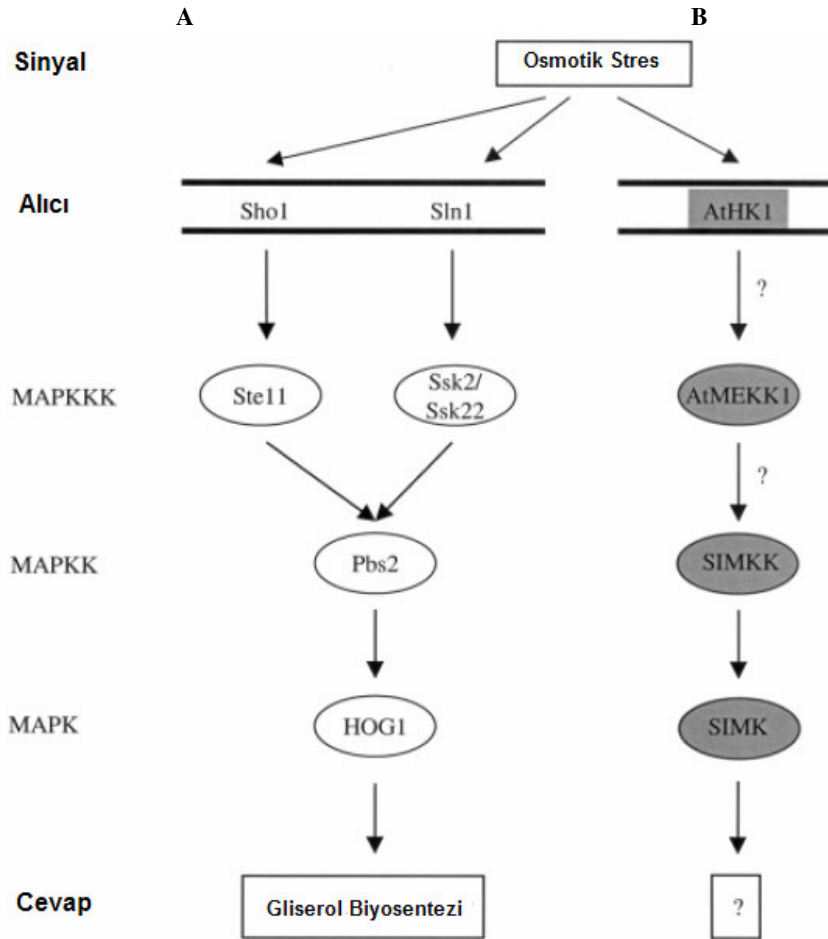
Yang ve ark. 2003; Mishra ve ark. 2006). Bu protein fosforilasyon enzimleri, hücre içi iletişim ve hücre dışı uyarıların arttırılmasında ve sonuçta uygun biyokimyasal ve fizyolojik hücresel cevabın oluşturulmasında arabuluculuk yapmaktadırlar (Su ve Karin 1996; Mizoguchi ve ark. 1998; Schenk ve Snaar-Jagalska 1999; Tena ve ark. 2001; Asai ve ark. 2002; Mundy ve Schneitz 2002; Samaja ve ark., 2003; Soyano ve ark. 2003; Mora-Álvarez ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2006a; Lin ve ark. 2007).

Son günlerde belli bazı MAPK'ler için yapılan moleküler ve biyokimyasal çalışmalar, MAPK sinyal yolunun hormonal yanıt (Johri ve Mitra 2001; Lim ve ark. 2004), hücre döngüsünün düzenlenmesi ve sitokinezde (Nishihama ve ark. 2002; Soyano ve ark. 2003), dokunma (Zhang ve Klessig 2001), yaralanma



Şekil 1.5. A. *Nicotiana tabacum* bitkisinde patojen, yaralanma ve abiyotik stres uyarılarında MAPK metabolik yolu, B. *A. thaliana* bitkisinde H₂O₂ uyarısındaki MAPK metabolik yolu (Zwerger ve Hirt (2001) ve Mishra ve ark. (2006)'dan uyarlanmıştır)

(Pedley ve Martin 2005) ve patojen saldırılarına karşı savunma oluşturulmasında (Wan ve ark., 2002), abiyotik stres sinyallerinde (Sangwan ve ark. 2002), hiper ve hipo osmolarite (Munnik ve Mijer 2001; Mora-Álvarez ve ark. 2004; Boudsocq ve Lauriere 2005), düşük ısı ve kuraklık (Zhang ve Klessig 2001), UV radyasyonu, ozon (Cvetkovska ve ark. 2005), yüksek tuz (Zu 2001a; Zu 2001b), reaktif oksijen türlerinin (Grant ve ark. 2000; Kovtun ve ark. 2000) sinyalini içeren temel fizyolojik fonksiyonlarda hayati öneme sahip olduğunu göstermiştir (Tena ve ark. 2001; Zhang ve Klessig 2001; Zwerger ve Hirt 2001; Minorsky 2003) (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Osmotik stres uyarısı **A.** *S. cerevisiae*'de MAPK metabolik yolu, **B.** *A. thaliana*'da MAPK metabolik yolu (Zwerger ve Hirt (2001) ve Mishra ve ark. (2006)'dan uyarlanmıştır)

Kısaca tüm ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş olan MAPK sinyal metabolik yolu (Nakagami ve ark. 2005); büyüme (Kovtun ve ark. 1998), ölüm, farklılaşma, çoğalma ve hemen hemen tüm stres uyarılarını düzenlemektedir (Soyano ve ark. 2003; Nakagami ve ark. 2005).

Değişik bitkilerde MAPK sinyal yollarında görev yapan enzimlerin bazıları klonlanarak karakterize edilmiştir (Ligterink ve Hirt 2001). Çalışılan MAPK sinyal yollarına örnek olarak dikotiledonlardan *Arabidopsis* (tere), *Nicotiana tabacum* (tütün), *Lycopersicon esculentum* (domates), *Pisum sativum* (bezelye), *Petunia* (petunya), maydanoz, *Medicago sativa* (yonca), *Beta vulgaris* (şeker pancarı) (Mora-Álvarez ve ark. 2004) *Hibiscus sabdariffa* (Lin ve ark. 2007) ile monokotiledonlardan *Oryza sativa* L. (pirinç) *Zea mays* (mısır) ve *Avena* bitkileri verilebilir (Bögre ve ark. 2000; Sangwan ve Dhindsa 2002; Rakwal ve Agrawal 2003; Nakagami ve ark. 2005).

Oryza sativa'da MAPK gen ailesinin filogenetik analizi yapılmış ve MAPK genlerinin 1-6., 10-11. kromozomlar üzerinde buldukları saptanmıştır (Liu ve Xue, 2007). Domates bitkisinde ısı stresiyle aktive olan 50 kDa. moleküler ağırlığında bir MAPK ile *Arabidopsis*'de ABA (absisik asit) ile aktive olan 42 ve 46 kDa. moleküler ağırlıkta iki MAPK (Lu ve ark. 2002; Zhang ve ark. 2006a), pirinç bitkisinde de yine ABA ile aktive olan 1396 bç, 369 amino asit'lik 42.9 kDa. ağırlığında *OsMAPK5a* adında bir MAPK (Xiong ve Yang, 2003) bulunmuştur. *Chorispora bungeana* bitkisinde 369 amino asit uzunluğunda 42.5 kDa. moleküler ağırlıkta bir MAPK klonlanmıştır (Zhang ve ark. 2006b). MAPK sinyal yolunun *Alfalfa* kök hücrelerinde hücre aktin iskeletinin düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur (Samaja ve ark. 2003). H₂O₂ ile uyarılmış *Medicago sativa* (Alfalfa) bitkisinde *OMTK1* adlı bir MAPKKK enzimin direk olarak *MMK3* adlı bir MAPK'yi aktive edebildiği gösterilmiştir (Nakagami ve ark., 2004). Ayrıca H₂O₂'nin MAPK sinyal yolunu aktive ederek patojenlere karşı hücrel cevabın oluşmasında rol oynadığı saptanmıştır (Grant ve ark. 2000; Morris 2001; Overmyer 2002; Zang ve ark. 2003; Huitema ve ark., 2004).

Nicotiana tabacum bitkisinde MAPKK'nin (*NtMEK1*) substratları olan SIPK (salisilik asitle uyarılan protein kinaz) enzimi ile WIPK (yaralanma ile uyarılan protein kinaz) enzimi arasındaki etkileşim incelenmiş ve WIPK'nin iki

şekilde, ya SIPK'nin pozitif geri besleme düzenleyicisi (feed-back regulator) olarak ya da yeni bir metabolik yol başlatıcısı olarak rol oynadığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2003).

Nicotiana benthamiana'da bulunan SIPK adındaki MAPK enzimi, *NtMPK1* adındaki MAPK fosfataz enzimine bağlanarak onun aktivasyonunu sağlarken, aktif hale gelen fosfataz SIPK'yi defosforilasyon yoluyla inaktif hale getirmektedir. Aktif MAPK enzimleri, gerektiğinde MAPK fosfatazlar tarafından defosforilasyonla inaktive edilmektedirler (Katou ve ark. 2005).

Hücre dışı sinyal molekülleri ve hormonlar, gelişimsel programların önemli bir bölümünü oluşturan hücre-hücre iletişimindeki gelişimsel işaretlerdir ve çevreye karşı hücre sel cevabın oluşması sırasında hücreler arası bilgi iletişiminde önemli rol oynamaktadırlar (Meyerowitz, 1997).

Bitkilerde öksin (auxin) hormonunun MAPK sinyal yolunu aktive ettiği bulunmuştur (Moller ve Chua 1999; Morris 2001). Öksin hormonu; apikal üstünlük, tropik cevaplar, lateral kök ve kök tüyü oluşumu, iletim (vascular) doku farklılaşması ve hücre bölünmesi (mitoz) gibi bir çok önemli bitki büyüme ve gelişim durumlarını düzenler (Moller ve Chua 1999; Bögre ve ark. 2000). Öksin, tütün bitkisindeki *NP1* (MAPKKK) enzimini aktive ederken (Moller ve Chua 1999; Bögre ve ark. 2000; Morris, 2001), aktive olan *NP1*'in MAPK benzeri proteini aktive ettiği ve öksin-indükleyici gen ekspresyonunu spesifik olarak inhibe ettiği gözlenmiştir (Bögre ve ark. 2000; Morris, 2001). *NP1*'nin mitoz sırasında da aktive olduğu gözlenmiştir (Nishihama ve ark. 2002). *NP1*'in, bir mikrotübül motor protein ile birlikte olabileceği veya düzenlenebileceği düşünülmektedir. Tütünde *NP1*'in hücre plağında bulunması, onun *NTF6* (*Nicotiana tabaccum FUS3*-ile ilgili kinaz) ile beraber bir mitotik sinyal modülü oluşturarak, bir mitoz-spesifik aktivasyon'a sahip olduğunu göstermektedir.

ABA (absesik asit), bitki fizyolojisinde embriyo gelişimi, tohum çimlenmesi ve abiyotik strese cevap gibi birçok prosesi etkileyen negatif bir hücre bölünmesi regülatörüdür. ABA'nın, arpa alevron protoplastlarında MAPK benzeri bir aktiviteyi indükleyebileceği bildirilmiştir (Bögre ve ark 2000).

MAPK modüllerinin sinyalizasyonu en iyi mayalarda bilinmektedir (Madhani ve Fink 1998). Maya genomunda dizisinin tümü bilinen altı MAPK

kodlanmıştır. Bu MAPK'lerin beş tanesi; feromon sinyalizasyonu, filamentasyon, yüksek osmolariteye adaptasyon, hücre duvarının yeniden düzenlenmesi ve sporulasyonu içine alan spesifik metabolik yollar için tahsis edilmiştir (Madhani ve Fink 1998). MAPK sinyalizasyonunun çok hücreli organizmalarda çok daha kompleks olduğu gözlenmiştir (Bögre ve ark 2000).

Fungal patojenlerin oluşturduğu stres sinyallerinin heterotrimerik G proteinleri ile iletilmektedir (Lev ve ark. 1999). Eşek arısı zehirinden elde edilen mastoparan maddesinin heterotrimerik G proteinlerine bağlı olan MAPK sinyal iletim yolunu normalden daha hızlı uyardığı saptanmıştır (Miles ve ark. 2004). Hayvan hücrelerinde H₂O₂'nin, PTP (Protein Tirozin Fosfataz)' in korunmuş sistein bölgelerini oksidasyona uğratarak bu sayede MAPK metabolik yolunun aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur (Xiong ve Zhu 2002).

İlginçtir ki, bitkilerde patojenlere karşı savunma mekanizmasında rol oynayan MAPK sinyal yolunun, *Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis* bitkilerinde HR (hipersensitif respons, yüksek hassasiyette cevap) mekanizmasını tetikleyerek bir çeşit programlanmış hücre ölümüne neden olmakta ve bitkinin patojenlere karşı korunmasını sağlamaktadır (Romeis 2001; Overmyer 2002; Huitema ve ark. 2004; Menke ve ark. 2004). Benzer bir mekanizma, insanlarda p38-MAPK enziminin aktivasyonunun programlanmış hücre ölümüne (apoptosis) neden olduğu (Olson ve Hallahan, 2004; Fang ve Richardson 2005) ve bu durumun kanser terapisi çalışmalarında tümör hücrelerinin programlı olarak yok edilmesinde kullanılabileceği şeklindedir (Olson ve Hallahan, 2004; Brozovic ve Osmak 2007). Yamamizo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; patates bitkisinde patojen uyarıcı promotorlarını kontrol eden bir MAPKK (*StMEK1^{DD}*)'nin sürekli aktif formunu taşıyan transgenik patatesler üretilmiş, erken çürümeye neden olan *Alternaria solani* ve *Phytophthora infestans* patojenlerine karşı yüksek dayanıklılık kazandıkları görülmüştür (Yamamizo ve ark., 2006).

1.8. MAPKK Enzim Ailesi

MAPKK'ler substratı olan MAPK'lerin sahip olduğu T-X-Y motifindeki treonin ve tirozin amino asitlerinden fosforile ederek aktive ederler ve bu nedenle çift spesifiteye sahip kinazlar olarak adlandırılırlar (Nakagami ve ark. 2005). MAPKK enzim ailesi üyeleri 38-55 kDa. moleküler ağırlığındadırlar ve 310-380 amino asite sahiptirler (Jonac 2002; Cardinale 2002). Tütün bitkisinde yaklaşık 52 kDa. ağırlığında bir MAPKK (SIPKK) bulunmuştur (Liu ve ark. 2000).

MAPKK'ler MAPKKK'ler tarafından korunmuş serin/treonin bölgeleri olan S/T-X_{3,5}-S/T motifindeki serin ve treonin amino asitlerinden fosforile olurlar (Su ve Karin 1996; Meskiene ve ark. 1998; Mizoguchi ve ark. 1998; Schenk ve Snaar-Jagalska 1999; Bögre ve ark. 2000; Zang ve ark. 2001; Zwerger ve Hirt 2001; Mundy ve Schneitz 2002; Tang ve Innes 2002; Kim ve ark. 2003; Rakwal ve Agrawal 2003; Nakagami ve ark. 2005). Bitki MAPKK'lerinde S/T-X₅-S/T motifi bulunurken hayvanlarda S/T-X₃-S/T motifi bulunmaktadır (Mizoguchi ve ark. 1997; Ichimura ve ark. 1998b; Liu ve ark. 2000; Wrzaczek ve Hirt, 2001; Zwerger ve Hirt 2001; Ichimura ve ark. 2002).

Putatif MAPKK analizlerinde, N terminallerinde MAPK-bağlanma bölgesi motifi K/R-K/R-K/R-X₁₋₆-L-X-L/V/I (Cardinale ve ark. 2002; Ichimura ve ark. 2002; Jonak ve ark. 2002; Nakagami ve ark. 2005) *Medicago* SIMKK (stres-indükleyici MAPKK)'sinde (Quaked ve ark. 2003) rastlanmıştır fakat bunun MAPKK aktivasyonu için yeterli olmadığı saptanmıştır (Nakagami ve ark. 2005). Çünkü bu motife hayvan MAPKK'lerinde rastlanmaktadır ve fonksiyoneldir (Ichimura ve ark. 2002). Bitki MAPKK'lerinde aktif bölgedeki motif S-T-X-X-G-T-X-X-Y-M-X-P-E-R' dir (Tena ve ark. 2001).

MAPKK'lerin MAPK sinyal modüllerinde en az üyeye sahip olduğu gözlenir. MAPKK'ler yüksek substrat spesifitesine sahiptirler ve MAPK modülünün MAPKK → MAPK kısmının minimal varyasyonuna izin verir. İki protein kinazın birleşmesi muhtemelen sinyal gücünü artırıcı etki yapar ve sonrasında protein fosfatazlar tarafından geri besleme (feed-back) inhibisyonla sinyal sona erdirilerek sinyal aktivasyonunun süresi belirlenmiş olur (Schenk ve Snaar-Jagalska 1999; Bögre ve ark. 2000).

Buldukları bitki türlerine ve biyolojik fonksiyonlarına göre gruplandırılmış MAPKK enzimleri Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Biyolojik fonksiyonlarına göre gruplandırılmış bitki MAPKK'leri (Kültz 1998; Nakagami ve ark. 2005)

MAPKK	Bitki Adı	Grup	Biyolojik Fonksiyonu
AtMKK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A1	Soğuk, kuraklık, yüksek tuz, oksidatif stres, yaralanma, bakteriyel kaynaklı sinyal
AtMKK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A1	Soğuk, yüksek tuz stresi
MsPRKK	<i>Medicago sativa</i>	A1	Fungal kaynaklı sinyal
AtMKK6/AtANQ1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A2	Sitokinez
NtMEK1/NtNQK1	<i>Nicotiana tabaccum</i>	A2	Sitokinez, hücre ölümü, bakteriyel kaynaklı sinyal
OsMEK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	A2	Soğuk stresi
ZmMEK1	<i>Zea mays</i>	A2	Kök apeksinin çoğalması
AtMKK4, AtMKK5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C1	Bakteriyel kaynaklı sinyal, HR
MsSIMKK	<i>Medicago sativa</i>	C1	Ağır metal, hiperozmotik stres, fungal kaynaklı sinyal, etilen sinyali
NtMEK2	<i>Nicotiana tabaccum</i>	C1	HR, hücre ölümü, bakteriyel kaynaklı sinyal, etilen sinyali, polen çimlenmesi
LeMKK2	<i>Lycopersicum esculentum</i>	C1	Bakteriyel kaynaklı sinyal
PcMKK5	<i>Pisum</i>	C1	Fungal ve bakteriyel kaynaklı sinyal
LeMKK4	<i>Lycopersicum esculentum</i>	D1	Bakteriyel kaynaklı sinyal

Ichimura ve arkadaşlarına göre *Arabidopsis thaliana* genomu üzerinde yapılan kapsamlı araştırmalarda bu bitkiye ait MAPKK enzimleri dört ana gruba ayrılmıştır (Çizelge 1.4.) (Ichimura ve ark. 2002).

A grubu MAPKK'ler tüm abiyotik streslerde aktive olmaktadır. Ayrıca hücre bölünmesinde de rol oynamaktadırlar. B grubu MAPKK'ler, NTF2 (çekirdek taşıma faktörü, nuclear transport factor) domeini'nin ender yapısal özelliklerini taşırlar. NTF2, RAN-GDP (RAN: Ras- ile ilgili çekirdek proteini-Guanozin difosfat)'ye bağlanarak RAN-GDP'nin çekirdek dışına taşınmasında arabuluculuk yapan küçük bir proteindir. C ve D grubu MAPKK'ler intron bölgeleri içermezler. C grubu MAPKK'ler, A grubu MAPKK'ler gibi stres-yanıtımlama faktörlerini içerirler. Tuz ve elicitor streslerinde indüklenirler. D grubu MAPKK'lerin fonksiyonları henüz bilinmemektedir (Ichimura ve ark. 2002).

Çizelge 1.4. *Arabidopsis thaliana*'daki MAPKK enzimlerinin gruplandırılması

Grup Adı	<i>A. thaliana</i> 'daki	Diğer Bitkilerde
A	<i>AtMKK1</i> , <i>AtMKK2</i> (A1); <i>AtMKK6</i> (A2)	<i>LeMEK1</i> (<i>L. esculentum</i>), <i>NtSIPKK</i> (<i>N. tabacum</i>), <i>MsPRKK</i> (<i>M. sativa</i>) (A1); <i>NtMEK1</i> (<i>N. tabacum</i>), <i>OsMEK1</i> , <i>OsMKK1</i> (<i>O. Sativa</i>), <i>ZeMEK1</i> (<i>Z. mays</i>) (A2)
B	<i>AtMKK3</i> (B1)	<i>NtNPK2</i> (<i>N. tabacum</i>) (B1)
C	<i>AtMKK4</i> , <i>AtMKK5</i> (C1)	<i>NtMEK2</i> (<i>N. tabacum</i>), <i>MsSIMKK</i> (<i>M. sativa</i>), <i>ZmMAPKK1</i> (<i>Z. mays</i>) (C1)
D	<i>AtMKK7</i> , <i>AtMKK8</i> , <i>AtMKK9</i> , <i>AtMKK10</i> (D1)	-----

Arabidopsis thaliana'da soğuk ve tuz streslerinin sinyal iletiminde görev yapan *MKK2* adlı bir MAPKK ve bu enzimin substratı olarak sinyal iletiminde görevli iki tane MAPK (*MPK4* ve *MPK6*) enzimi izole edilmiştir (Teige ve ark. 2004).

Son yıllarda MAPK metabolik yolunu inhibe eden küçük molekülü inhibitörlerin potansiyel kanser tedavi ajanları olarak geliştirilmesi dikkat çekmektedir. Çeşitli hücrel streslerde ve sitokinezde rol oynayan proinflamator sitokinlerin aktivasyonunda MAPK metabolik yolu önemli rol oynamaktadır. Özellikle MAPKK, ERK ve p38 MAPK'lerin inhibitörleri, proinflamator genlerin uyarılmasını önlemede etkindirler (Newton ve ark. 2000). PD98059 (2'-amino-3'methoxyflavone) (Berman ve ark. 1998; LaMontagne ve ark. 2000; Kim ve ark. 2002) ve U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene), spesifik MAPKK inhibitörleridir (Saawedra ve ark. 1999; Newton ve ark. 2000). İnsan bronş epiteli hücrelerinde; PD98059, bir mitogen-activated protein kinase kinase olan *MEK1*'in ; U0126, hem *MEK1* hem de *MEK2*'nin, SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulphonylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) p38 MAPK'in inhibitörü olarak kullanılmıştır. Bu maddeler genel MAPK inhibitörleri olarak adlandırılmaktadırlar (Newton ve ark. 2000). Monoterpenlerin büyük bir kısmının MAPK metabolik sinyal yolunu aktive eden ras (MAPKKKK) enzimini inhibe ettikleri bilinmektedir (End 1999; Holstein ve Hohl 2003; Mo ve Elson 2004).

MAPKK enzimleri üzerine yapılan çalışmalarda genel olarak kullanılan aktivatörler, MAPKK enzimin doğal aktivatörü olan MAPKKK enzimleri

olmaktadır. Bu enzimlerin aktivasyonu için metabolik yolun G proteinlerinden başlayarak (ras), raf olarak da adlandırılan MAPKKK'lerin aktivasyonunu sağlamak yeterli olmaktadır (Saawedra ve ark. 1999; Newton ve ark. 2000).

α T3-1 doku kültürü hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, GnRH-a (Gonadotropin-Releasing Hormon analogu: [D-Trp6] GnRH), MAPKK'ı aktive etmek için kullanılmış ve bu sayede dolaylı olarak MAPK aktivasyonu sağlandığı bildirilmiştir (Reis ve ark. 1997). Bu durum GnRH-a'nın bir MAPKK aktivatörü gibi kullanılabileceğini göstermektedir.

Memeli MAPKK'leri üzerine yapılan bir çalışmada, 3 altgrup insan MAPKK'sının (*MEK1*, *MKK4-7*, *MKK3-6*) DVD olarak adlandırılan (Conserved Docking Site, korunmuş birleşme bölgesi) ve katalitik domein'inin C terminal ucundaki 24 amino asitlik bölgesi mutasyona uğratılmıştır. Bu bölgenin MAPKKK bağlanma bölgesi olduğu ve mutasyon ile hem inhibisyon hem de aktivasyon kazanabildiği gözlenmiştir (Takekawa ve ark. 2005).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan *Origanum onites* **tohumları**, Ali Osman SARI'dan (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir) temin edilmiş ve herhangi bir irk kaydının olmadığı bildirilmiştir.

2.1. *Origanum onites*'in Çimlendirilmesi

O. onites tohumları içinde steril su emdirilmiş kurutma kağıtları bulunan petrilere 20-50 adet kadar serpilerek 23°C ısıda, 12 saat gündüz ve 12 saat gece periyodunda Sanyo iklimlendirme kabini içinde çimlendirilmeye bırakılmıştır (Şekil 2.1). Bir hafta içinde primer kök ve gövde oluşumu gözlenen *O. onites* tohumları seçilerek 180°C'de 2 saat fırınlanmış toprakla hazırlanmış saksılara aktarılmıştır.



4-5 günlük



4 haftalık



10 haftalık



14 haftalık

Şekil 2.1. Laboratuvar ortamında çimlendirerek yetiştirdiğimiz *Origanum onites* 'in resimleri

İklim kabinde düzenli olarak sulanan bitkiden latex eldivenler kullanılarak yaprak, gövde ve kök materyalleri elde edilmiştir. Bu materyaller RNA ve DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

2.2. Çalışma Materyalinin Hazırlanması

Bitki materyalleri, DNA izolasyonu çalışması için yıkanmış ve % 95'lik etanolden geçirilmiş temiz havanlarda sıvı azot kullanılarak öğütülmüştür. RNA çalışmaları için, bir gece DEPC'li (diethylpyrocarbonate) suda bekletilmiş ve 180°C'de 4 saat fırınlanmış havanlarda sıvı azotla öğütülmüştür. Öğütülerek toz haline getirilen materyaller 1.5 ml'lik ependorf tüplerine yaklaşık 50-250 mg arası miktarlar halinde alınarak izolasyon için hazır hale getirilmiştir.

2.3. *Origanum onites* Total RNA'sının izolasyonu

Origanum onites toplam RNA'sının izolasyonu, bitki yapraklarından TRIzol (Sigma) solüsyonu ile yapılmıştır (Chomczynski 1995).

Sıvı azotla ezilerek un haline getirilmiş 1.5 ml'lik ependorf tüplerindeki *O. onites* yaprak, gövde veya kök materyaline, her 50-100 mg dokuya karşılık 1 ml Tri-Reagent eklenmiştir. TRIzol ile homojenize veya lize edilen örnekler -70 °C'de 1 ay saklanabilmektedir. Nükleoproteinlerin tam olarak ayrılmasını kesinleştirmek için örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir (Chomczynski 1995).

TRIzol eklenen sıvı karışım 4 °C'de 12 000 g'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Bu aşamada süpernatant yani üstte kalan sıvı kısım RNA ve protein içermektedir. Süpernatant alınmış ve başka bir ependorf tüpüne aktarılarak oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir (Chomczynski 1995).

Her 1 ml Tri-Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklenmiş ve örnek sıkıca kapatılarak 15 sn. güçlü bir şekilde çalkalanmıştır. Tüp 2-15 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışımın bulunduğu 4 °C'de 12 000 g'de 15 dk. santrifüjlenir. Altta bulunan kırmızı organik faz proteinleri, ince bir tabaka

şeklinde ara faz (interfaz) DNA'yı ve üstte berrak sulu faz ise RNA'yı içermektedir (Chomczynski 1995).

Sulu faz yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Her 1 ml TRIzol için 0,5 ml izopropanol eklenmiş ve 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 4 °C'de 12 000 g'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin sonunda RNA peleti tüpün dibinde bir kenarda görülmektedir. Süpernatant kısmı dökülmüş ve pelet her 1 ml TRIzol için 1 ml % 75'lik etanol ile yıkanmıştır. Tüpler vorteks cihazıyla çalkalanmış ve 4 °C'de 7 500 g'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Pelet yüzer şekildeyse 4 °C'de 12 000 g'de yine santrifüjlenip çökmesi sağlanmaktadır. Örnekler etanolde 4 °C'de 1 hafta, -20°C'de 1 yıl süreyle saklanabilmektedir (Chomczynski 1995).

Etanolla yıkama işleminden sonra etanol dökülmüştür. RNA peleti 5-20 dakika süreyle vakumla ya da çeker ocakta kurutulmuştur. RNA peleti istenilen miktarda ve çalışmanın uygunluğuna göre su, formamid veya % 0,5'lik SDS ile çözülmüştür. Bu işlemi hızlandırmak için mikropipet ile 55-60 °C'de 10-15 dakika alıp verme işlemi yapılabilmektedir (Chomczynski 1995).

Bu yöntemle elde edilen RNA'nın, spektrofotometrede OD₂₆₀ dalga boyunda ölçülerek OD₂₆₀ x dilüsyon oranı x 40 µg/ml formülüyle hesaplanarak 1.1673 µg/µl konsantrasyonda ve OD_{260/280} oranıyla 1.99 (2 ≥ 1.8) saflıkta olduğu tespit edilmiş ve bu materyal RT-PZR (Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) aşamasında kalıp olarak kullanılmıştır.

2.4. *Origanum onites* DNA'sının İzolasyonu

Çalışmamızda iki farklı şekilde DNA izolasyonu başarıyla kullanılmıştır. DNA Purification Kiti (#K0512, Fermantas) ve klasik CTAB DNA izolasyonu protokolü DNA izolasyonlarında başarı ile kullanılmıştır.

2.4.1. Fermantas DNA Purification Kiti ile Saflaştırma

50-100 mg sıvı azotla öğütülmüş *O. onites* dokusu, 1.5 ml'lik ependorf tüpünde 200 µl TE tamponunda çözülmüş ve 400 µl lizis tamponu ile karıştırılarak

65°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında her 5 dk. bir tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır.

İnkübasyon sonunda tüpe 600 µl kloroform eklenmiş ve oda ısısında 1-2 dakika yavaşça alt üst edilmiştir. Karışım tüpü 10 000 rpm (dakikadaki dönme sayısı)’de 2 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sırasında ayrı bir ependorf tüpüne 80 µl kitten gelen 10 x konsantre tampon ile 720 µl steril deiyonize su eklenmiştir. Bu sayede 800 µl 1x tampon elde edilmiştir.

Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı kısım 1x tampon bulunan tüpe eklenmiş ve oda ısısında 1-2 dakika alt üst edilmiştir. Bu aşamada DNA tüp içinde sarmal yapmış halde gözle görülebilmektedir.

Karışım 10 000 rpm’de 2 dakika santrifüjlemiş ve pelet 100 µl 1.2 M NaCl ile yavaşça çözülmüştür. Bu aşamada isteğe bağlı olarak final konsantrasyonu 0.2 mg/ml olacak şekilde Ribonükleaz A (RNase A) eklenip 37°C’de 30 dk. inkübe edilerek RNA’lar ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu işlem izolasyon sonunda aynı koşullarda da yapılabilir.

NaCl ile muameleden sonra veya inkübasyon sonunda -20°C’de bekletilen saf etil alkol’den 300 µl tüpe eklenerek -20°C’de 30 dk. bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 10 000 rpm’de 3-5 dakika santrifüjlenmiştir.

DNA peleti %75’lik etil alkol ile yıkanmış ve 15-20 dk. çeker ocakta bekletilerek kurutulmuştur. Peletler 100 µl steril deiyonize su ile çözümlenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

2.4.2. Klasik CTAB DNA İzolasyonu

Çalışmadan önce 2x CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) tamponu 65°C’de ısıtılmış ve hazır hale getirilmiştir. Sıvı azotta öğütülmüş 200-500 mg *O. onites* dokusu 2ml’lik ependorf tüplerine alınarak üzerine 800-1500 µl CTAB tamponu eklenerek homojen hale gelene kadar yavaşça pipetlenmiştir. Karışım tüpü 62°C’de 30-60 dakika inkübe edilmiş ve her 5 dk. bir tüpler alt üst edilmiştir.

Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform:isoamil alkol eklenmiş ve 10 dakika boyunca alt üst edilerek karıştırılmıştır. Karışım 7500 rpm’de 10 dakika

santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarılmıştır. Aktarılan miktar μl cinsinden kayıt edilmiştir.

Aktarılan miktarın $2/3$ 'ü kadar -20°C 'de bekletilen isopropanol karışıma eklenmiş birkaç kere alt üst edildikten sonra -20°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım tüpü 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir.

DNA peleti 300 μl % 70'lik etil alkol ile yıkanmış ve çeker ocakta kuruyana kadar bekletilmiştir. Kuruyan DNA peleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre steril deiyonize suda çözündürülmüştür.

CTAB Litik Tampon Hazırlığı:

1 gr CTAB

14 ml 1.4 M NaCl veya 4.095 g toz NaCl

5 ml 1 M Tris

2 ml 0.5 M EDTA (EtilenDiamin TetraAsetikası)

0.5 g PVP (polyvinil pyrodine) 50 ml'ye steril

distile su ile tamamlanmış ve 120°C 'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Steril edildikten sonra tampona 200 μl merkaptotanol eklenmiştir.

Bu yöntemlerle final konsantrasyonu 10 μg olacak şekilde Southern Blot yönteminde kullanılmak üzere $\text{OD}_{260/280}$: 1.8-2.0 arasında değişen kalitede çok sayıda izolasyon yapılmıştır.

2.5. *Origanum onites* RNA ve DNA'sının Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini

DNA veya RNA örneklerinin spektrofotometrede 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde 260 ve 280 oranı RNA ve DNA'nın kalitesini göstermektedir ve ≥ 1.8 olmalıdır. RNA ve DNA peleti hangi madde ile çözündürülmüşse o madde kör olarak kullanılmıştır. Ölçüm işleminde örneklerin cihazda okunabilmesi için 100 veya 200 kat dilüsyon yani sulandırma işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra spektrofotometrede okunan değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak RNA ve DNA miktarı saptanmıştır.

$$\text{RNA miktarı} = \text{Od}_{260} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 40 \mu\text{l/ml}$$

$$\text{DNA miktarı} = \text{Od}_{260} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 50 \mu\text{l/ml}$$


```

L.esculentum-MAPKK ATTCAGGAGG-----TGCCTATGATTACAAAAGCGACATTTGGAGCTTGGGTTTAGTC 768
M.sativa-MAPKK ATCAATGGAAGCCAACGTGGCTACAACACAAAAGTGATATATGGAGTTGGGACTGATA 774
A.thaliana-ATMKK2 ATCGTTGGAAA-----CAAGTACGGAATAAAAAGTGATATATGGAGCTTGGGTTTAGTA 768
O.Sativa-MAPKK1 ATTAGTGGAAAG-----CTCCTATGACTACAAGAGTGACATATGGAGTTGGGCTTAGTA 771
Z.mays-ZmMEK1 ATTAGTGGTAG-----CACTTATGACTACAAAAGTGACATATGGAGTTGGGCTTAGTT 771
N.tabacum-MAPKK ATAAGTGGAAAG-----TACCTATGACTACAAGAGTGATATCTGGAGCTTGGGCATGGTC 765
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK TTGCTCGAGTGTGCAACAGGTCATTTCCCATATAAACACCCGAGGGAGATGAAGGATGG 828
M.sativa-MAPKK TTGCTGGAGTGTGCTATGGGGCGGTTTCCTTACACACCACCAGATCAAAGTGAAGATGG 834
A.thaliana-ATMKK2 GTAATCGAATGTGCAACAGGAAAGTTCCTTATGCACCTCCGAATCAAGAGGAAACATGG 828
O.Sativa-MAPKK1 ATACTCGAGTGTGCCATTGGTCGGTTCCTTATATACCTCAGAAGG--GGAAGGTTGG 828
Z.mays-ZmMEK1 ATACTTGAGTGTGCCATTGGCCGGTTCCTTATATACCTTCGGAAGG--TGAAGGTTGG 828
N.tabacum-MAPKK ATCCTTGAATGTGCTATTGGACGTTTTCCATACATACAGTCGGAGGACCAGCAAGCATGG 825
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK GTC AATGTCTATGAAC TTATGAAACC ATAGTTGACCA ACCAGA ACCTTGTGCACCTCCT 888
M.sativa-MAPKK GAAAGTATATTTGAGCTTATTTGAAACTATTTGGGATAAACCTCCTCCTAGTGCTCCATCT 894
A.thaliana-ATMKK2 ACCAGTGTTTTCGAGTTGATGGAAGCCATTGTTGACCAACCGCCACCCGCTCTTCCITCA 888
O.Sativa-MAPKK1 TTAAGCTTCTACGAATTATTAGAAGCAATTGTTGACCAGCCACCACCCTCTGCACCAGCG 888
Z.mays-ZmMEK1 TTAAGCTTTTATGAAC TCTGGAGGCCATTGTGATCAGCCACCACCTTCTGCACCTGCA 888
N.tabacum-MAPKK CCGAGCTTTTATGAGCTTCTGGAGGCTATTGTTAGCAGTCCACCACCGTCTGCTCCAGCA 885
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK GACCAATTTTCTCCACAATTCTGCTCATTTCATATCTGCATGTGTCCAGAAGCACCAGAAG 948
M.sativa-MAPKK GAACAATTTTCTCCAGAAATTTGCTCATTATCTCTGCATGTCTACAGAAAGACCCAGGA 954
A.thaliana-ATMKK2 GGAAATTTCTCCCTGAGTTATCTTCATTTCATCTCCACATGTTGTCAGAAAGGATCCAAAC 948
O.Sativa-MAPKK1 GACCAGTTCTCTCCAGAATTTTGTCATTTATCTCCTCCTGCATACAAAAGGATCCTGCG 948
Z.mays-ZmMEK1 GATCAGTTCTCTCCAGAATTTGCTCATTTCATCTCCTCTTGCATACAGAAAGATCCGGCT 948
N.tabacum-MAPKK GATCAATTTTCCCAGAATTCTGTTTCATTTGTTCTGCTTGCATACAAAAGGACCCAAAG 945
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK GACAGACTGTCGGCAAATGATCTCATGAGTCACCCCTTTCATCACCATGTACGATGACCAG 1008
M.sativa-MAPKK AGCAGACTGTCGGCTCAGGAACTTATGGAACCTCCTTTCATCAGCATGTATGATGACTTG 1014
A.thaliana-ATMKK2 AGTCGAAGCTCTGCAAAGGAACTGATGGAACATCCTTCTTGAACAAAATACGACTACTCG 1008
O.Sativa-MAPKK1 GAGCGGATGTCTGCTTCAAGACTCTTGAATCATCCTTTCATCAAGAAGTTTGAGGATAAG 1008
Z.mays-ZmMEK1 CAGAGGATGTCTGCTTCAAGAACTCTGAAATCACCCTTTTTTGAAGAAGTTCGAGGATAAG 1008
N.tabacum-MAPKK GATAGATCTTCAAGCTTTGGACCTTTTGGCCACCCTTTCATTAAGAAGTTGAAAGACAAA 1005
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK GATATCGATCTTGATCTTACTTCACTTCCGCAGGACCTCCATTGGCAACACTTACTGAG 1068
M.sativa-MAPKK CATGTGGATCTCTCAGCTTATTTCCGATGCAGGATCTCCACTCGCAAC-CTTATAA-- 1071
A.thaliana-ATMKK2 GGGATCAATCTCGCGTCTACTTACAGATGCAGGATCGCCACTTGC AACACTTGGGAAC 1068
O.Sativa-MAPKK1 GATTTAGACCTGCGCATTTCTGTGAGAGCCTTGAACCTCCAATGAATATATCCGAGTAA 1068
Z.mays-ZmMEK1 GACTTAAACCTGGGATTCTTGTGGAGAACCCTGGAACCTCCAATGAATATACCCGAATAG 1068
N.tabacum-MAPKK GACATAGATTTCCGCATACTTGTGAGTAGCCTGGAACCTCCTGTAATTTTCCAAGATAA 1065
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

L.esculentum-MAPKK CTATAA----- 1074
M.sativa-MAPKK -----
A.thaliana-ATMKK2 CTGTCTGGTACGTTCTCCGTGTA 1092
O.Sativa-MAPKK1 -----
Z.mays-ZmMEK1 -----
N.tabacum-MAPKK -----

```

Şekil 2.2. *O. onites* MAPKK enziminin orta bölgesini klonlamak için gerekli yarımbozuk primerlerin dizaynı. >> Hind-II-FYbKK ileri(forward) primer bölgesi, << Hind-III-RYbKK geri (reverse) primer bölgesi. Gen Bankası Kodları: *Lycopersicon esculentum* MAPKK (LeMKK3) AY691332, *Nicotiana tabacum* mRNA for *NQK1* MAPKK AB055514, *Arabidopsis thaliana* ANQ1/AtMKK6 AB104460, *Zea mays* *ZmMEK1* U83625, *Oryza sativa* MAPKK1 AF216314, *Medicago sativa* subsp. *x varia* AJ293275'dir (* ortak nükleotidleri göstermektedir)

2.7. Stok ve Çalışma Primer Solüsyonlarının Hazırlanması

Dizayn edilen primerler üretici firmaya sipariş verilmiş ve gelen primerler liyofilize yani toz halinde olduğundan bu primerlerden stok ve çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Primer bilgi formunda 100 μM 'lık stok solüsyon için tüpe eklenecek steril deiyonize su miktarı verilmektedir. Bu işlem yapıldıktan sonra **2.5 μM 'lık çalışma solüsyonu** hazırlamak için 2.5 μl stok solüsyonundan alınarak 97.5 μl steril deiyonize su ile 100 μl 'ye tamamlanır.

2.8. RT-PZR (Geri Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

2.8.1 RT Reaksiyonu

Moloney Murine Leukemia Virüsü tarafından kodlanan MMLV geri (reverse) Transkriptaz (MMLV RT) enzimi, RNA'ya bağımlı bir DNA polimerazdır. Bu enzim bir primerin hibridize olduğu tek iplikli kalıp RNA'ya karşılık gelen (komplementer) cDNA'nın ilk ipliğini sentezler. MMLV RT enzimi ayrıca tek iplikli DNA ile hibridize olan primerleri de uzatmaktadır MMLV RT cDNA'nın ikinci ipliğinin sentezi, bazı mRNA kalıplarında ilave DNA polimeraza gerek kalmaksızın başarılabilir. Kalıp RNA'nın μg 'ı başına 5 ünite MMLV RT enzimi tüm cDNA sentezi için yeterli miktardır. *Avian myeloblastosis virus* (AMV)'den elde edilen AMV geri transkriptaz enzimi de RT reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu iki enzim arasındaki en büyük farklılık ise bu enzimlerin sahip olduğu RNaz H aktivitesidir. M-MLV geri transkriptaz'ın RNaz H aktivitesi *Avian myeloblastosis virus* (AMV)'den elde edilen geri transkriptaz'a göre daha zayıftır. AMV RT'deki yüksek düzeyli RNaz H aktivitesi sebebiyle AMV enzimiyle normalde sentezlenecek olan toplam ürün DNA'nın boyu kısaltılmaktadır. M-MLV geri transkriptaz'ın diğer bir özelliği de AMV geri transkriptaz enzimine göre daha yüksek sıcaklıklarda bile iyi çalışmasıdır. Bu yüzden RT reaksiyonunda M-MLV geri transkriptaz enzimi kullanılmıştır (Roth 1985; Sambrook 1989).

RT reaksiyonu için RevertAid First Stand cDNA Synthesis (#K1622 Fermantas) kiti kullanılmıştır. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır.

İlk aşamada RNA izolasyonundan elde edilen RNA örneğinden reaksiyona 3 µg girecek şekilde 0.5'lik PZR tüplerine buz içinde alınmış ve 1 µl (0.5 µg/µl) oligo dT₁₈ primeri eklenerek hacim 12 µl'ye steril deiyonize su ile tamamlanmıştır. Damlacık oluşumunu önlemek için tüpe santrifüjde kısa bir spin atırılmıştır. Reaksiyon tüpü 70°C'de 5 dk. tutulmuş ve buza konulmuştur.

Buz içinde reaksiyon tüpüne sırasıyla;

5x reaksiyon tamponu	4 µl
Ribolock Ribonükleaz inhibitör (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP mix	2 µl

eklenmiş ve 37°C'de 5 dk. inkübe ettikten sonra 1 µl M-MuLV reverse transcriptase (200 u/µl) enzimi eklenmiş ve 42°C'de 60 dk. inkübe edilmiştir.

Enzimi inhibe etmek için reaksiyon tüpü 70°C'de 10 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon buza konmuştur. Uzun süre saklanması düşünülen reaksiyonlar -20°C'ye kaldırılmaktadır.

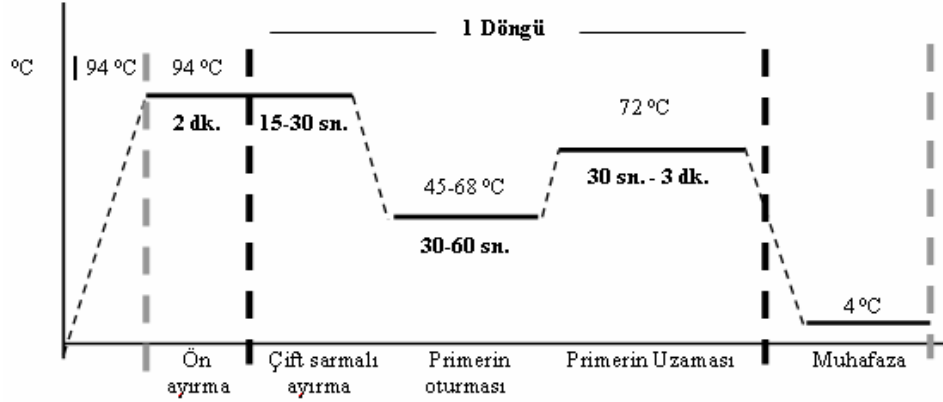
2.8.2. RT-PZR

PZR (polimeraz zincir reaksiyonu), her biri hedef DNA dizisinin bir ucuna tamamlayıcı olacak şekilde ileri ve geri oligonükleotid primerler kullanılarak DNA zincirinin çoğaltılmasıdır. Isıya dayanıklı DNA polimerazlarla üç basamaklı reaksiyon döngüsünde primerler üzerinden uzayan iplik yeni bir kopya DNA'yı oluşturmaktadır. Bu aşamalar DNA ipliğinin açılması (denatürasyon), primer primer dizilerinin DNA kalıbına oturması (annealing) ve DNA polimeraz enzimin primerlerden uzayarak yeni kopya zinciri sentezlemesi (polimerizasyon) şeklindedir (Şekil 2.3) (Mullis ve Faloona 1987; Sharma ve ark. 2002; Turner ve ark. 2004).

Aşağıda çalışmamızda çoğunlukla kullanılan standart bir PZR reaksiyonu (Çizelge 2.1) ve ısı döngüsünün zaman profili gösterilmektedir (Çizelge 2.2):

Çizelge 2.1. Standart PCR reaksiyonunun bileşenleri

Çalışma Solüsyonu. Konsantrasyonu	Miktar (μ l)	Miktar (μ l)	Final Konsantrasyonu	Kabul Edilebilir Standart Aralık
H ₂ O	8,8 μ l	17,6 μ l	-	Hacime tamamlanır.
10x PCR Tamponu	2,5 μ l	5 μ l	1x	1x
MgCl ₂ 25mM	1,5 μ l	3 v	1,5 mM	1-5 mM
10x dNTP 2,5 mM	2 μ l	4 μ l	1x 0,2 mM	0,2 mM
cDNA Kalıbı 0,001 μ g/ μ l	5 μ l	10 μ l	200 pg/ μ l	10 pg- 1 μ g/ μ l
İleri Primer 2,5 μ M	2,5 μ l	5 μ l	0,25 μ M	0,1-1 μ M
Geri Primer 2,5 μ M	2,5 μ l	5 μ l	0,25 μ M	0,1-1 μ M
Taq Polimeraz 5 u/ μ l	0,2 μ l (1u/ μ l)	0,4 μ l	0,04 u/ μ l	2 u/100 μ l = 0,02 u/ μ l
Toplam:	25 μl	50 μl		



Şekil 2.3. Standart bir PZR reaksiyonunun ısı döngüsünü gösteren şema

Çizelge 2.2. Standart PCR reaksiyonunun ısı ve zaman profili

	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç ayrılması	94°C	2 dk	
Çift ipliğin ayrılması (Denatürasyon)	94°C	15 sn - 30 sn	25-30x
primerin oturması (Anealing)	50-65 °C	30 sn – 60 sn	
Uzama (Elongasyon)	72 °C	30 sn – 3 dk	
Final uzaması	72 °C	7 dk.	

RT-PZR reaksiyonunda kalıp olarak RT reaksiyonunun kendisi veya uygun dilüsyonları kullanılmaktadır. Bu reaksiyonda amaç tek iplikli mRNA dizisinden RT reaksiyonuyla çift iplikli hale getirilen cDNA'ların uygun primerlerle çoğaltmaktır. Çalışmamızda *O. onites* MAPKK enzimine ait olduğunu

düşündüğümüz gen parçasının orta bölgesini çoğaltmak için aşağıdaki reaksiyon kurulmuştur.

PZR Reaksiyon bileşenleri (25µl'lik reaksiyon için):

Steril deiyonize H ₂ O	7.3 µl
10x PCR Tamponu ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lü)	2.5 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	3 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
Hind-III-FYbKK Primer (2.5 µM)	2.5 µl
Hind-III-RYbKK Primer (2.5 µM)	2.5 µl
cDNA kalıbı	5 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.2 µl
Toplam:	25 µl

Reaksiyonun Isı Döngüsü:

94°C	2 dk.	1 döngü	} 35 döngü
94°C		40 sn.	
52°C		50 sn.	
72°C		50 sn.	
72°C	7 dk.	1 döngü	
4°C			

2.8.3. RT-PZR Ürününün Miktar Arttırma PZR Şartları

İlk RT-PZR reaksiyonundan elde edilen ürünlerin agaroz jelde görülen bantlarının ince veya silik olması durumunda, ürünün saflaştırılmasında kullanılmak üzere PZR ürününü miktar olarak arttırmak gerekmektedir. Bu durumda ilk RT-PZR reaksiyonunun ürünü ikinci bir PZR reaksiyonuna kalıp olarak kullanılmaktadır ve aynı döngü koşulları tekrarlanmaktadır. Çalışmamızda bu reaksiyon aşağıdaki gibi kurulmuştur:

RT-RePZR Reaksiyon bileşenleri (25µl'lik reaksiyon için):

Steril deiyonize H ₂ O	11.8 µl
10x PCR Tamponu ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lü)	2.5 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	1.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
Hind-III-FYbKK Primer (2.5 µM)	2.5 µl
Hind-III-RYbKK Primer (2.5 µM)	2.5 µl
cDNA kalıbı	2 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.2 µl

Toplam: 25 µl

RT-PZR reaksiyonunun aynı ısı döngüsü koşullarında reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

2.9. PZR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi

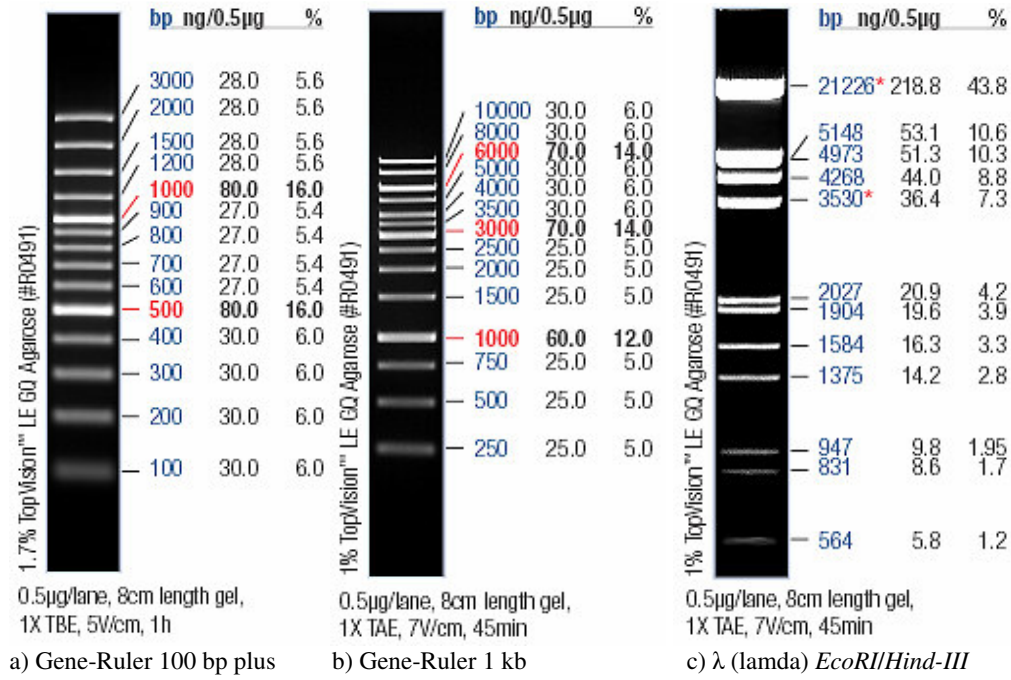
RT-PZR reaksiyonunun ürünlerinin görsel olarak tanımlanması, ürünlerin boyut (baz çifti) ve miktarlarının tespiti için agaroz jelde yürütülmeleri gerekmektedir. Bu yöntemde negatif olarak yüklü olan DNA parçaları (ürünler), elektrik akımı verilerek negatif kutuptan pozitif kutuba doğru belli konsantrasyonlardaki agaroz jelde yürütülmektedirler. Büyük ürünler agaroz jel porlarından daha yavaş geçerlerken, küçük baz çiftine sahip ürünler daha hızlı hareket etmektedirler. Bu sayede ürünler boyutlarına göre ayrılmış olurlar.

Çalışmamızda RT-PZR ürününün 10 µl'si, 2 µl 6x yükleme (loading) tamponuyla karıştırılıp % 1.4'lük agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Agaroz jel 0.5x TBE (Tris Borik asit EDTA) tamponunda 90 volt'luk akıma maruz bırakılmıştır. RT-PZR ürünüyle birlikte ürün büyüklüğünü tespit edebilmek için agaroz jelle 5 µl marker DNA (1 kb marker, 100 bp marker vb.) yüklenmiştir.

Agaroz jel için gerekli malzemeler:

6x Yükleme tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromophenol blue, % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 glycerol, 60mM EDTA.

Kullanılan DNA Marker'ları: Çalışmamız genelinde PZR ürünlerinin büyüklüğünü öğrenmede; Fermantas Gene Ruler 100 bç marker, 1 kb marker ve λ (lamda) *EcoRI/Hind-III* marker'ları kullanılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kullanılan DNA marker'ları. a) Gene-Ruler 100 bp marker, b) Gene Ruler 1 kb marker, c) λ (lamda) *EcoRI/Hind-III* (Ürün bültenlerinden alınmıştır)

% 1.4'lük Agaroz jel (50 ml): 0.7 g agaroz jel tartılmış ve 50 ml'ye 0.5x TBE tamponuyla tamamlanmış ve mikrodalga fırında kaynatılıp donmadan önce 5 µl etidyum bromit (10 mg/ml) solüsyonu eklenerek jel tablasına dökülmüştür.

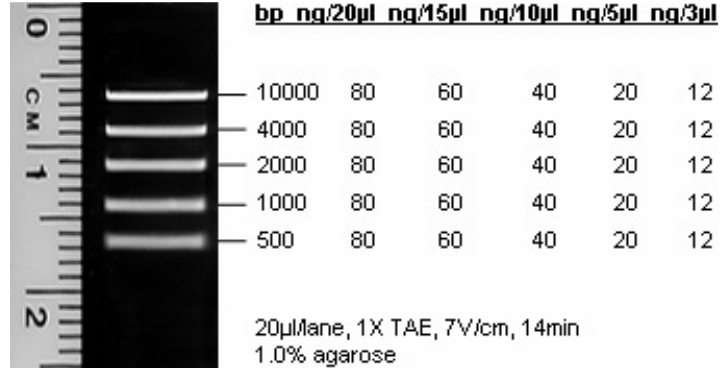
5x TBE Tamponu (1 litre stok): 54 g Tris, 27.5 g Borik asit, 2 ml 0.5 M EDTA.

0.5x TBE tamponu (1 litre çalışma solüsyonu): 100 ml 5x TBE tamponu 1 litreye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

10x etidyum bromit solüsyonu: Final konsantrasyonu 10 mg/ml'dir 10 ml distile suda 100 mg etidyum bromit çözündürülmüştür.

O. onites genomik DNA'sının ng cinsinden miktarını tespit etmek için çalışmamızda Fermentas Fast-Ruler High Range DNA marker kullanılmıştır (Şekil 2.5). Örnekler bu marker'a özel 6x MassRuler tamponunda yürütülmüştür.

6x Mass-Ruler Tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 60% glycerol, 60mM EDTA.



Şekil 2.5. Fermentas Fast-Ruler High Range DNA marker (Kit bülteninden alınmıştır)

2.10. Jel Dökümantasyon İşlemi

% 1.4'lük agaroz jelde yürüyen örnekler ilk önce UVP transilluminator cihazında UV ışıkta kontrol edilmiş ve pozitif sonuçları resimlenmek üzere UV-Photometer jel dökümantasyon cihazına (UviTec) yerleştirilmiştir. Jel dökümantasyon cihazında çekilen resimler görsel verilerin kaydedilmesinde yararlı olmuştur.

2. 11. PZR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jelde yanyana yürüyen ve beklenen büyüklüğe sahip PZR ürününün 1 yada daha fazla aynı büyüklükteki bandı jelden kesilmiş ve plazmite ekleme (ligasyon) reaksiyonu için QIAquick Gel Extraction kit (Cat. No. 28704, QIAGEN) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu kit ile 70 bç-10kb arası DNA'lar saflaştırılabilmektedir.

Bir kolon için, miktarı 400 mg'dan fazla olmayacak şekilde PZR ürün bandının bulunduğu agaroz jel kesilmiş ve jel ekstraksiyonu için 1.5 ml ependorf

tüpüne alınmıştır. Jel ağırlığının 3 katı µl cinsinden QG tamponu (Guanidine tiocyanate içerir, kit'ten) tüpe eklenmiş ve tüp yavaşça alt üst edilmiştir.

Karışımın tüpü 50°C'lik su banyosunda 10-30 dk. inkübe edilmiştir. Tüp içindeki karışım sarı renkte (QG tamponu renginde) olmalıdır. Aksi takdirde 10 µl 3 M sodyum asetat eklenerek sarı renk oluşana kadar eklemeye devam edilir.

Jel ağırlığı ile eşit miktarda µl isopropanol tüpe eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Tüpteki karışım QIAquick spin kolonuna hacmi 800 µl'yi geçmeyecek şekilde konularak 13 000 rpm'de 1 dk. ve altta kalan sıvı kısım dökülmüştür. Tüpte kalan miktar bir sonraki aşamada aynı spin kolonuna yüklenerek işlem tekrar edilmiştir.

Şayet dizi analizi için saflaştırılma yapılmışsa, spin kolonuna 500 µl QG tamponu eklenerek yine 13 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Daha sonra spin kolonuna 750 µl PE tamponu (kit'ten) eklenmiş ve oda ısısında 1 dk. beklenmiştir. Kolon 13 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve sıvı kısım dökülerek sadece kolon 13 000 rpm'de tekrar 1 dk. santrifüjlenmiştir.

Yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpü kolonun altına yerleştirilmiş ve isteğe bağlı olarak 30-50 µl steril deiyonize su (ya da kit içindeki EB tamponu (10 mM Tris-HCl, pH: 8.5)) kolonun tam orta bölgesine eklenmiştir. Bu işlemden sonra oda ısısında 1 dk. beklenmiş ve spin kolonu 13 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenerek yeni ependorf tüpünde kalan sıvı kısım buz içinde korunmaya alınmıştır.

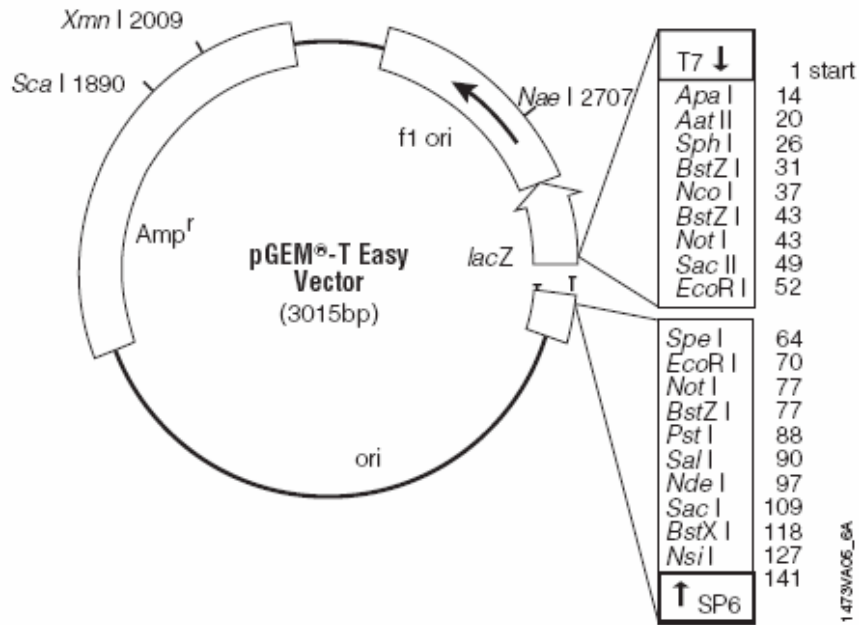
2.12. PZR Ürününün Plazmite Eklenmesi (Ligasyon)

Çalışmamızda agaroz jelden saflaştırılan PZR ürünümüzü taşıyıcı plazmite eklemek için, T-A klonlaması (plazmitdeki bulunan T nükleotid ile Taq polimeraz tarafından PZR ürününün uçlarına eklenen A nükleotidin birleşmesi) temeline dayalı iki klonlama kiti kullanılmıştır. Bu kitler pGEM-T Easy Vector System (Promega) (Şekil 2.6) ve InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (#K1214, pTZ57R/T Vector System) (Şekil 2.7)'dir.

pGEM-T Easy plazmiti 3015 bp büyüklükte olup ligasyon reaksiyonu aşağıdaki gibi kurulmuştur:

2x ligasyon tamponu	5 µl
pGEM-T Easy plazmiti (50 ng)	1 µl
PZR ürünü (50 ng)	3 µl
T ₄ DNA Ligaz (5 u/µl)	1 µl
Toplam :	10 µl

Ligasyon reaksiyonu oda ısısında bir gece inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyona giren plazmit ile PZR ürün oranı 1/3 olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 2.6. pGEM-T Easy plazmiti (pGEM-T Easy kiti bülteninden alınmıştır)

pTZ57R/T plazmiti 2886 bp büyüklükte olup ligasyon reaksiyonu aşağıdaki gibi kurulmuştur:

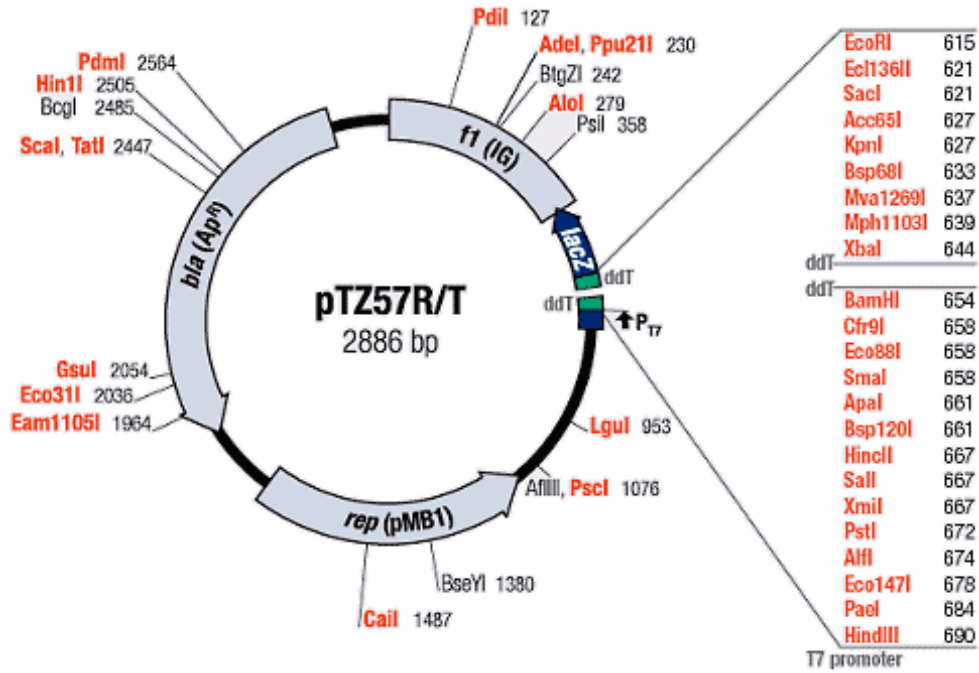
Plazmit pTZ57R/T (0.1 µg/µl)	3 µl
PZR ürünü (0.225 µg/µl)	4 µl
10x ligasyon tamponu	3 µl
PEG 4000 Solüsyonu	3 µl

Deiyonize H₂O 30 µl'ye tamamlanacak
şekilde eklenmiştir

T₄ DNA Ligaz (5u/µl) 1 µl

Toplam : 30 µl

Oda ısısında bir gece inkübe edilmiştir. Reaksiyona giren plazmit ile PZR ürün oranı 1/3 olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 2.7. pTZ57R/T plazmiti (InsT/Aclone PCR Product Cloning bülteninden alınmıştır)

2.12.1 Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışmamızda çeşitli konakçı bakteriler kullanılmıştır. Bu bakteriler *E.coli*'nin kompetent (hücre duvarı yıkılmış, plazmit geçirgenliğine sahip) hücre olarak kullanılabilen farklı suşlarıdır. Çalışmamızda XLI-Blue, JM-105, JM-109, DH5-*a* ve *E.coli* SURE bakterileri kompetent hücre olarak denenmiş ve kullanılmıştır. Çalışmamız için bu hücrelerden en uygun olanının XLI-Blue olduğu görülmüş ve klonlama çalışmamızda temel olarak bu hücre suşu tercih edilmiştir.

2.12.2 Besi Yeri Hazırlığı

Kullandığımız bakterilerin çoğaltılması için LB-Agar, LB Broth ve bu iki besiyerinin Amfisilin antibiyotiği katılmış formları tercih edilmiştir.

LB-Broth besiyeri (1 litre):

10 g Bacto Tripton

5 g Bacto Maya ekstraktı (yeast extract)

5 gr NaCl

pH:7'ye NaOH ile ayarlanmıştır.

LB-Agar besiyeri (1 litre):

10 g Bacto Tripton

5 g Bacto Maya ekstraktı

5 gr NaCl

15 gr Agar

pH:7'ye NaOH ile ayarlanır.

Tüm besiyerleri 120°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.

Amfisilin hazırlığı:

Final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde 100x'lik amfisilin stoğu hazırlanmıştır. Her 1 litre LB broth veya agar için için 10 ml 100x'lik amfisilin kullanılmıştır. Hazırlanan amfisilin 0.45 µm por çaplı steril filtrelerden (Orange Scientific Gyrodisc CA) şırınga yardımıyla geçirilerek steril edilmiş ve besiyerlerine otoklavdan sonra yaklaşık 60°C'ye geldikten sonra eklenmiştir.

X-Gal Hazırlığı (50 mg/ml):

pGEM-T Easy kitine göre 100 mg 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktosid, 2 ml N-N'-dimetil formamide içinde çözündürülmüş ve alüminyum folyo içinde -20°C'de saklanmıştır.

2.12.3. Konakçı Bakteri (Kompetent Hücre) Hazırlığı

Kullandığımız XLI-Blue bakteri suşu için CaCl₂ yönü uygulanarak hücre duvarı yıkımı gerçekleştirilmiş ve bu sayede plazmitin hücreye girişine olanak sağlanmıştır.

Ön Hazırlık:

4°C'deki petrielerde katı besi yerine ekili haldeki hücre kolonilerinden morfolojileri gözlenerek sağlıklı olanlar veya -80°C'de gliserolle stoklanmış hücre kültüründen kazıma yöntemiyle hücreler 10 ml LB-Broth içeren 25 ml'lik erlenlere ekilmiştir.

Kültür ekimi yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dk.) gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün 10.00 sularında üreme olan erlenlerden 300 µl örnek alınarak 100 ml'lik yeni LB-Broth besi yerine aktarılmıştır.

Kompetent hücre aşaması:

Yeni ekilen 100 ml'lik kültür 37°C'de çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dakika) inkübe edilmiş ve kültür istenilen yoğunluğa (erken lag faza) ulaşip ulaşmadığını gözlemek için her 30 dk.'da bir spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

Bu dalga boyunca ölçüm değeri 0.5-0.6 aralığına geldiğinde kültür 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılmış ve 5000 g (veya 4000 rpm)'de 4°C'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve bu işlem ikinci 50 ml için aynı falcon tüpünde tekrarlanmıştır.

Santrifüj işleminden sonra süpernatant dökülmüş ve pelet 50 ml -20°C'de muhafaza edilen 50 mM CaCl₂ ile yavaşça çözündürülmüştür. Tüpteki karışım homojen hale gelince tüp buza konulmuş ve 15 dakika bekletilmiştir.

Buzdan alınan CaCl₂'li hücre karışımı 4°C'de 5000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant dökülmüş ve pelete 4 ml 50 mM CaCl₂ yavaşça eklenerek çözündürülmüştür.

4 ml CaCl₂'de çözünen pelet homojen hale gelince karışıma 600 µl % 80'lik soğuk gliserol eklenmiş ve daha önce soğutulmuş karyojenik tüplere 200'er µl halinde paylaştırılmıştır. Karyojenik tüpler buzda 5 dk. bekletildikten sonra -86°C'ye kullanılmak üzere kaldırılmıştır.

2.13. Rekombinant Plazmitlerin Konakçı Bakteri İçine Taşınması (Transformasyon)

O.onites MAPKK geninin orta bölge PZR ürününü taşıyan plazmitleri çoğaltmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada konakçı hücre olarak *E. coli* XLI-Blue suşundan hazırlanan kompetent hücreler kullanılmıştır.

-86°C'da saklanan kompetent hücrelerde buza alınarak 5-6 dk. bekletilmiştir. Önceden pGEM-T Easy plazmitiyle yapılmış ligasyon reaksiyonu, karyojenik tüp içindeki kompetent hücre kültürünün tam ortasına 10 µl ligasyon reaksiyonu eklenmiş ve buzda 30 dakika beklemeye alınmıştır. Bu aşamada plazmit DNA ortama salınmakta ve hücrelere giriş için hazır hale gelmektedir.

Buzdan alınan karyojenik tüp 42°C'deki su banyosuna konularak 2 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda tüp hemen buza alınmış ve 3 dk. bekletildikten sonra üzerine 500 µl amfisilinsiz LB-Broth eklenmiştir.

Karyojenik tüp 37°C'lik etüve kaldırılmış ve 35 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon devam ederken amfisilinli LB-Agar petrisine bek alevinin yanında 20 µl (veya 2 kat dilüe edilmiş solüsyondan 40 µl) X-Gal solüsyonu eklenerek Dragaski spatülü yardımıyla petri yüzeyine yayılmıştır.

İnkübasyon sonunda karyojenik tüp 5000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant yavaşça dökülmüştür. Tüpün dibinde bir miktar (50-70 µl kadar) süpernatant bırakılmış şayet tamamı dökülmüşse LB besi yerinden pelete bu miktar kadar konularak pelet çözündürülmüştür.

Homojen hale gelen pelet pipetle alınarak X-Gal yayılmış amfisilinli LB-Agar petrisine aktarılmış ve sıvı Dragaski spatülüyle petri yüzeyine yayılmıştır. Petri 5-10 dk. oda ısısında bekletildikten sonra ters çevrilmiş halde 37°C'lik etüvde gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi sabah petrilere koloni oluşumu gözlenmiştir (Sambrook ve ark. 1989; Turner ve ark. 2004).

2.14. Rekombinant Plazmiti İçeren Kolonilerin Seçimi

Gece boyunca 37°C'de inkübe edilen petrilere ertesi gün 2 farklı renkte koloni oluşumu gözlenmiştir. Bu kolonilerin morfolojileri aynı olmakla birlikte sadece renk mavi ve beyaz olarak renk farklılığı gözlenmiştir.

Elimizdeki klonlama plazmitlerinin çalışma prensibi bakterilerdeki *lac* operon sistemi üzerine kurulmaktadır. Plazmitlerin yapısında amfisilini parçalayan dirençlilik geniyle birlikte *lac* operon genleri de bulunmaktadır.

Taşıyıcı plazmit konakçı hücre girdiği takdirde hücre amfisiline dirençlilik kazanmakta ve amfisilinli besi yerinde üreyebilmektedir. *Lac* operon β -galaktosidaz enzimini kodlayan geni içermektedir ve bu enzim ortamdaki laktozu parçalamaktadır. X-Gal bir laktoz analogu olduğu için ortamda X-Gal varsa bu enzim tarafından parçalanmaktadır. X-Gal'in özelliği *lac Z* geninin kodlağı β -galaktosidaz enzimiyle parçalandığında mavi renk oluşturmasıdır. PZR ürünü, *lac* operunun β -galaktosidaz enzimini kodlayan bölgesine eklendiği takdirde bu enzim inaktif olacağı için, PZR ürününü taşıyan hücreler beyaz renkli (yani pozitif), taşımayan hücreler ise mavi renkli (yani negatif) olacaktır (Turner ve ark. 2004).

Çalışmamızda mavi ve beyaz renkli koloniler görülmüş ve pozitif sonuç olan beyaz koloniler seçilerek yeni X-Gal içeren amfisilinli LB-Agar petrisine (master plate) aktarılmış ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

2.15. Koloni PZR

Amfisilinli LB-Agar master plate petrisindeki beyaz kolonilerin gerçekten istenen gen ürününü taşıyıp taşımadığı belirlemek için koloni PZR kullanılmıştır. Bunun için, beyaz kolonilerden öze ile küçük bir miktar alınıp 50 μ l steril su içinde çözündürülmüş ve 100 °C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

Santrifüjlenen örneklerin 0.5 μ l'si kalıp olarak kullanılmış ve PZR reaksiyonu, 2.8.2'de bahsedilen PZR ısı döngüsü ve koşullarındakiyle aynı olacak şekilde yapılmıştır. Beklenen ürün büyüklüğünde bant oluşturan koloniler alınarak plazmit izolasyonu için LB broth besi yerlerine (Gussow ve Clackson, 1989).

2.16. Plazmitin Konakçı Bakteriden İzolasyonu

Çalışmamızda hem klasik yöntemle hem de ticari kitler (Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), QIAgen Plasmid Mini (QIAGEN) kullanılarak izolasyon işlemi yapılmıştır. DNA dizi analizine girecek plazmitlerin saflıklarının yüksek kalitede olması gerektiğinden plazmit izolasyon kitlerinin kullanılması zorunlu olmaktadır. Klasik yöntemle izolasyonda her ne kadar iyi çalışılsa da plazmit içinde tuz kalıntısı bulunmakta ve dizi analizinde çok

iyi sonuç vermemektedirler. Klasik yöntemle izole edilen plazmitler, pozitif sonuçlar arasında hedef PZR ürününü taşıyan plazmitin seçimi için restriksiyon enzimleriyle muamele işlemi sırasında kullanılmıştır.

2.16.1. Klasik Plazmit DNA İzolasyon Yöntemi

İlk gün, 25 ml'lik erlenlere 10 ml steril LB-Broth hazırlanmış ve her 10 ml LB-Broth için 100 µl 100x'lik amfisilin eklenmiştir. Pozitif sonuç olan beyaz koloniler steril bir öze yardımıyla petriden (master plate) alınarak 10 ml'lik besi yerlerine eklenmişlerdir. Çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dakika) 37°C'de gece boyunca inkübe edilmişlerdir.

İkinci gün, eğer saklamak isteniyorsa 10 ml'in 5 ml'i 800 µl %80'lik gliserol eklenerek -86°C'ye kaldırılmıştır. Kalan 5 ml'lik kültür veya saklanmayacaksa 10 ml'lik kültür 5000-7000 rpm'de 10 dakika santrifüjleniş ve süpernatant boşaltılmıştır.

Pelet 1 ml 50 mM Tris HCl pH: 8.0 ile çözündürülmüş ve 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Ependorf tüpü 5000-7000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülerek tüplerin içinde kalan sıvı kısımlar temiz kurutma kağıdıyla alınmıştır.

Ependorf tüpüne 150 µl lizozim solüsyonu (10 mg/ml), 20 µl 0.5 M EDTA pH: 8.0 ve 10-15 µl RNaz eklenmiştir. Pelet steril bir kürdan dairesel olarak beyazımsı renk alana karıştırılmıştır.

Ependorf tüpü 30-60 dakika buzda inkübe edilmiş ve sürenin sonunda taze olarak hazırlanmış 0.2 M NaOH / % 1 SDS solüsyonundan 400 µl tüpe eklenmiştir. Tüp yavaşça ters yüz edilip buz içinde 5 dk. bekletilmiştir.

Süre sonunda yüksek su nötralizasyonu için hemen 300 µl 7.5 M NH₄OAc (Amonyum orto asetat) eklenmiş ve ters yüz edilerek 10 dk. buzda beklemeye alınmıştır. Süre sonunda 12 000-15000 rpm'de 15 dk. santrifüjleniş ve süpernatant dikkatlice yeni steril bir ependorf tüpüne alınmıştır. Bu aşamada hücre duvarı, membran ve genomik DNA uzaklaştırılmıştır.

Proteinleri uzaklaştırmak için yeni ependorf tüpündeki süpernatant'a 800 µl fenol (Tris ile dengelenmiş) kloroform (kloroform: izoamil alkol: 24: 1) eklenmiştir. Karışım gçlce çalkalanmıştır.

Karışım 15 000 rpm'de 2 dk.santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda üç faz oluşmuştur. En alta organik faz, ortada proteinleri içeren ara faz ve üstte plazmitleri içeren sulu faz bulunmaktadır. Sulu faz dikkatlice alınmış ve yeni steril ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada aktarılan sıvı kısmın (sulu faz) miktarı kaydedilmiştir.

Sulu fazın miktarının % 60'ı kadar izopropanol sulu faza eklenerek çalkalanmış ve oda ısısında 10 dk. beklenmiştir. Süre sonunda tp 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant dikkatlice boşaltılmıştır. Tp ters çevrilerek temiz kurutma kağıdıyla pelet kurutulmuştur.

Pelete 200 µl 0.3 M NaOAc (sodyum orto asetat) eklenerek pelet çzndrlmştir. Tüpe 400 µl saf etil alkol eklenmiş ve 15 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant boşaltılarak çeker ocakta 15-20 dk. hava ile kurutulmuştur. Etil alkol uçan pelet 40-50 µl steril deiyonize su ile veya TE tamponu ile çzndrlmştir.

2.16.2. Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemi (Promega) Kiti ile Plazmit İzolasyonu

İlk gün, 25 ml'lik erlenlere 10 ml steril LB-Broth hazırlanmış ve her 10 ml LB-Broth için 100 µl 100x'lik amfisilin eklenmiştir. Pozitif sonuç olan beyaz koloniler steril bir öze yardımıyla petri yüzeyinden alınarak 10 ml'lik besi yerlerine ekilmişlerdir. Çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dk.) 37°C'de gece boyunca inkübe edilmişlerdir.

İkinci gün, 1-10 ml 1 gecelik kültür 7000 rpm'de 5 dk.santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülerek pelet 250 µl hücreleri yeniden çözme tamponu ile çzndrlmştir. Karışıma 250 µl hücre lizis solüsyonu eklenmiş ve 4 kere alt üst yapılmıştır. Daha sonra 10 µl alkalın proteaz solüsyonu eklenmiş ve tekrar 4 defa alt üst edilerek 5 dk. oda ısısında bekletilmiştir.

Süre sonunda karışıma 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenmiş ve 4 defa alt üst edilerek oda ısısında 12 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir.

Kitin içindeki toplama tüpüne spin kolonu yerleştirilmiş ve kolonun içine santrifüj sonunda üst kısımda oluşan sıvı faz eklenerek oda ısısında 12 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiştir.

Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ve spin kolonuna 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. Oda ısısında 12 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve toplama tüpündeki sıvı dökülerek aynı işlem 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek oda ısısında 12 000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenerek tekrarlanmıştır.

Spin kolonu alınarak altına yeni steril 1.5 ml'lik ependorf tüpü yerleştirilmiştir. Spin kolonuna 80-100 µl nükleazsız su eklenerek oda ısısında 12 000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Ependorf tüpü kullanılmadan önce saklamak için -20°C'ye konulmuştur.

2.16.3. QIAGEN Plasmid Mini Kit ile Plazmit İzolasyonu

İlk gün, 25 ml'lik erlenlere 10 ml steril LB-Broth hazırlanmış ve her 10 ml LB-Broth için 100 µl 100x'lik amfisilin eklenmiştir. Pozitif sonuç olan beyaz koloniler steril bir öze yardımıyla petriden alınarak 10 ml'lik besi yerlerine ekilmişlerdir. Çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dk.) 37°C'de gece boyunca inkübe edilmişlerdir.

İkinci gün, 10 ml kültür 7000 rpm'de 6 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. 300 µl PB1 (kit'ten, RNase içeren solüsyon) eklenmiş ve pelet çözüldürülmüştür.

Karışım 1.5 ml'lik steril ependorf tüpüne alınmış ve üzerine 300 µl PB2 (lizis tamponu) eklenerek oda ısısında 5 dk. beklenmiştir. Tüp yavaşça alt üst edilmiş hemen 4°C'de bekletilen PB3'ten 300 µl eklenerek nötralizasyon için buzda 5 dk. bekletilmiştir.

Süre sonunda 13 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiş ve üst kısımdaki temiz süpernatant elde edilmiştir. Santrifüj sırasında kit içindeki yer çekimi prensibi ile

kolona 1 ml QBT tamponu konulmuş ve kolondan yer çekimiyle akması sağlanmıştır.

Partikülsüz süpernatant yavaşça kolona eklenmiş ve tamamının kolondan geçmesi beklenmiştir. Altta biriken kısım atılmıştır. Toplam 4 ml QC tamponu 1'er ml şeklinde kolondan geçirilmiştir.

QC tamponuyla yıkama işleminden sonra yeni steril ependorf tüpü kolonun altına yerleştirilmiş ve 800 µl QF tamponu kolona eklenmiştir. Kolon içinden tamponun ependorf tüpüne akması beklenmiş ve işlem sonunda ependorf tüpüne 560 µl isopropanol eklenmiştir.

Ependorf tüpü 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülerek pelete 1 ml % 70'lik etil alkol eklenmiştir. Yavaşça ters yüz edip pelet yerinden kalkmıyorsa yeniden kısaca santrifüjlenmiş, şayet pelet yerindeyse etil alkol dökülmüş ve pelet çeker ocakta kuruyana kadar havalandırılmıştır. Kuruyan pelete 50 µl steril deiyonize su eklenerek çözündürülmüştür.

2.17. Rekombinant Plazmitin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Saflaştırılan rekombinant plazmit içinde *O. onites* MAPKK'ine ait gen parçasının varlığını teyit etmek için; klonlama için dizayn edilen primerlerin uçlarında bulunan Hind-III kesim bölgeleri kullanılarak plazmit kesime uğratılmıştır. Ayrıca klonlama plazmitlerinin kendi üzerlerinde bulunan restriksiyon kesim bölgeleri de denenmiştir. Primerlerimizin içerdiği Hind-III kesim reaksiyonu aşağıdaki gibidir:

Steril deiyonize H ₂ O	6 µl
Hind-III (10 u/µl)	1 µl
10x enzim tamponu	1 µl
Plazmit	2 µl
Toplam :	10 µl

Kesim reaksiyonu 37°C'lik etüvde 1.5-3 saat inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonundan sonra reaksiyon karışımı % 1.4'lük agaroz jelle Gene Ruler 100 bp plus marker ile yüklenerek kesilmiş plazmit ve plazmitten ayrılmış PZR ürünü (insert) jelle gözlenmiştir.

2.18. DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi

Ürün içeren plazmitler bölümümüzdeki Beckman Coulter CEQ8000 dizi analizi aletinde dizi analiz kiti doğrultusunda dizi analizine tabii tutulmuşlardır. Dizi analizi sonuçları NCBI (National Centre for Biotechnology Institute, www.ncbi.nlm.nih.gov) Gen Bankası ve EBI (European Bioinformatics Institute, www.ebi.uk) veri tabanına girilerek değişik biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool, Blast, ClustalW ve interproscan) analiz yapılmıştır.

2.18.1. Dizi Analizi İçin PZR

Plazmite eklenmiş olan ve *O. onites* MAPKK genine ait olduğunu düşündüğümüz gen parçasının DNA dizisini belirlemek için; plazmit üzerinde bulunan F-M13-47 (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'), R-M13-47 (5'GAGCGGATAA-CAATTCACACAGG3'), T7 (ileri primer: 5'TAATAC-GACTCACTATAGGG3'), SP6 (geri primer: 5'ATTTAG-GTGACACTATAG3') gibi ticari primerlerin tanıdığı bölgelerden yararlanarak PZR reaksiyonu kurulmuştur. Bu reaksiyon tek yönlü ve tek zincirli bir ürün vermektedir. Bu zincir DNA dizi analizinde okunarak dizi bilgisi elde edilmektedir.

DNA dizi analizine girecek örnekler için kurulan PZR reaksiyonu;

Öncelikle PZR için kullanılacak kalıp plazmitin iyi kalitede saflaştırılmış olmasına ve RNA kontaminasyonunun olmamasına dikkat edilmiştir. Plazmitin konsantrasyonu ve saflık derecesi ($od_{260/280}$ en az 1.8) spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir.

Plazmit ve eklenmiş olan gen parçasının toplam büyüklüğü hesaplanarak PZR reaksiyonuna eklenecek kalıp miktarı optimal değerleri gösteren çizelge 2.3.'den saptanmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünleri için 50 fmol, plazmitler için 50-100 fmol kalıp DNA kullanılmıştır.

Örneğin, pGEM-T Easy plazmiti 3015 bp ve *O. onites* MAPKK geninin orta bölgesi için beklenen ürün yaklaşık 500 bp dir. Toplam 3515 bp büyüklüğündeki plazmit için kalıp miktarı Beckman Coulter CEQ8000 kitindeki çizelge'yeye göre 195 fmol dür (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Dizi Analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar tablosu (* 1.5 µg'dan daha fazla kalıp kullanılmaz) (Beckman Coulter CEQ8000 dizi analizi kkti teknik bülteni)

Büyülük (kb)	25 fmol'e denk gelen değer (ng)	50 fmol'e denk gelen değer (ng)	100 fmol'e denk gelen değer (ng)
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	100	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390
8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.0	790	1500*	1500*

Dizi analizi PZR için girecek plazmit DNA'mız 120 ng/µl konsantrasyondadır.

1 µl stokta 120 ng DNA varsa

X µl stokta 195 ng DNA olmalıdır.

X= 1.625 µl miktarında kalıp DNA PZR için kullanılmıştır.

DNA dizi analizi PZR için (20µl):

Kalıp DNA 1.165 µl

Deiyonize H₂O 3.705 µl

F-M13-47 Primer 3.13 µl

DTCS Mix 12 µl

Toplam : 20 µl

DNA dizi analizi PZR için ısı döngüsü:

0.2 ml'lik PZR tüpüne önce kalıp ve su eklenir. 95°C'de 2 dakika bekletilmiş ve buza alınarak 1 dakika tutulmuştur.

Buzda sırasıyla primer ve DTCS mix (karışımı) eklenerek aşağıdaki ısı döngüsü uygulanmıştır (F-M13-47 için primer oturma ısı 64°C'dir).

96°C	25 sn.	} 40 döngü
64°C	30 sn.	
60°C	4 dk.	
4°C	∞	

PZR'den sonra tüpler cihazdan alınıp birkaç sn santrifüjlenmiş ve etanolle çöktürme aşamasına hazır hale gelmiştir.

DTCS Mix: Beckman Coulter CEQ8000 cihazı için kullanılan hazırlık kitinde bulunan bileşenler reaksiyondan önce DTCS mix (Çizelge 2.4.) hazırlığında kullanılmaktadır. Bu karışım A/T zengini veya G/C zengini diziler için iki farklı şekilde hazırlanabilmektedir. Kit tarafından standart olarak tavsiye edilen dITP bileşenli karışımdır.

Çizelge 2.4. DTCS mix bileşenleri

Bileşen	dITP için	dGTP için
10x sequencing Reaction buffer	200 µl	200 µl
dNTP mix	100 µl	100 µl
ddUTP Dye terminator	200 µl	200µl
ddGTP Dye terminator	100 µl	400 µl
ddCTP Dye terminator	200 µl	200 µl
ddATP Dye terminator	200 µl	200 µl
Polymerase enzyme	100 µl	100 µl
Toplam hacim	1100 µl	1400 µl

2.18.2. Etanolle Çöktürme

Çalışmamızda kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) cihaza ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PZR ürünlerinin etanolle çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

1,5 ml'lik steril ependorf tüpleri isimleriyle etiketlenmiştir. Tüplere 4 µl **stop solüsyonu** ve 1 µl 20 µg/µl glikojen (Kit'ten) eklenmiştir.

Stop Solüsyonu: 3M NaOAc (pH: 5.2) ile 100 mM NaOEDTA (pH: 8.0) eşit hacimde karıştırılmıştır. Bu karışım oda ısısında yapılmış ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

PCR ürünleri yukarıda hazırlanmış olan karışıma eklenmiş ve pipetleyerek karıştırılmıştır. -20°C'de saklanan %95'lik etanolden 60 µl eklenmiş ve pipetleyerek karıştırılmıştır.

Tüpler 4°C'de 14 000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenmiş ve dipte oluşan pelet rahatsız edilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde atılmıştır. Pelete -20°de saklanan %70'lik etanolden 200 µl eklenmiştir.

Reaksiyon tüpleri 4°C'de 14 000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülmüştür. Tekrar pelete -20°de saklanan %70'lik etanolden 200µl eklenmiş ve 4°C'de 14 000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenmiştir.

Süpernatant dökülerek pelet şeffaf hale gelinceye kadar hava ile kurutulmuştur. Pelete 40 µl SLS (Sample Loading Solution-Kit'ten) eklenmiş ve 10 dakika buzda bekletilmiştir. İyice pipetleyerek pelet çözülmüş ve santrifüjde kısa bir spin attırılıp 4°C'ye kaldırılmıştır.

2.18.3. DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi

Cihaz içinde örnek tablası ve tampon tablası adında iki aparat bulunmaktadır. Örnek tablasına 40 µl SLS içeren örnekler sırayla eklenerek üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ eklenmiştir. Tampon tablasına da yine kit içinden ayırma tamponu, kuyucukların % 70'ini dolduracak kadar eklenmiş ve kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlanmıştır. Dizi analizi sonunda cihaz tarafından okunan ve ham veri adı verilen piklerden oluşan çizelge otomatik olarak DNA dizisine çevrilerek bir word belgesine kopyalanmıştır.

2.18.4. Elde Edilen DNA Dizi Bilgisinin Gen Bankasında Taranması

Dizi analizi sonuçları NCBI (National Centre for Biotechnology Institute, www.ncbi.nlm.nih.gov) Gen Bankası ve EBI (European Bioinformatics Institute, www.ebi..uk) veri tabanına girilerek tarama yapılmıştır.

Dizi analizinden elde edilen DNA bilgisi, ticari primerlerin plazmit üzerindeki bölgelere oturmasından dolayı genellikle plazmitten parça içermektedirler. Bu fazla gen parçaları kendi gen primerlerimizin yerleri tespit edilerek manuel olarak temizleneceği gibi, NCBI gen bankası veri tabanında kullanılan VecScreen programı ile de tespit edilip temizlenebilmektedir. Temizlenen DNA dizisi, NCBI veri tabanındaki nükleotit-nükleotit eşleştirmesi ve nükleotit'i proteine çevirerek eşleştirme olarak adlandırılan programlara girilerek, dizi bilgisinin gen tabanında eşleşme yaptığı genler tespit edilmiştir. Benzer dizi bölgeleri ve benzerlik oranlarıyla birlikte elde edilen veriler ile elde edilen gen parçası tanımlanmış olmaktadır.

2.19. *Origanum onites* MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' Uçlarının Elde Edilmesi (RACE Tekniği)

2.19.1. *Origanum onites* MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' Uçunun Elde Edilmesi İçin Primer Tasarımı

O. onites MAPKK'sine ait olduğu saptanan gen parçasının bilinmeyen 3' ve 5' uçlarının elde edilebilmesi (RACE tekniği, Frohman 1988). için gen parçasının uç bölgelerine ileri ve geri olarak iki primer dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerlerden forward primer poli-A bölgesine oturan oligo dT primeriyle birlikte çalışarak 3'ucunu belirlemede; reverse primer de terminal transferaz ile eklenmiş C kuyruğuna oturan dG primeriyle birlikte çalışarak 5' ucunu belirlemede kullanılmıştır.

3' ve 5' RACE için tasarlanan primerler;

FOo3'MAPKK1 (5'aaaattacagattttggtg3')

GOo5'MAPKK1 (5'cgccataaatgggttggacgttg3')'dir.

2.19.2. *Origanum onites* MAPKK cDNA'sının 3' Ucunun 3' RACE Reaksiyonu ile Elde Edilmesi

Oo17 MAPKK cDNA'sının bilinmeyen 3' bölgesi 3' RACE tekniği (Frohman 1988; Matz ve ark. 1989; Soimato ve ark. 2001) kullanılarak elde edilmiştir. RT reaksiyonu ile oluşturulan cDNA popülasyonu ile bu kez FOo3'MAPKK1 ve d-T₂₀ primer seti kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR reaksiyonları için primer oturma ısıları (44.9, 48.6, 51.7 ve 55.3°C) ve kalıp (1/10, 1/50 ve 1/100 dilüsyon) optimizasyonu yapılmıştır. PZR ürünleri jelden QIAquick Gel Extraction kiti ile saflaştırıldıktan sonra pGEM-TEasy kiti kullanılarak *E. coli*'de klonlanmış ve DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

3'RACE Reaksiyonu (25 µl):

Steril deiyonize H ₂ O	11.75 µl
10x PCR Tamponu ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lü)	2.5 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	1.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
dT ₂₀ Primer (2.5 µM)	2.5 µl
FOo3'MAPKK1 primer (2.5 µM)	2.5 µl
cDNA kalıbı	2 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.25 µl
Toplam:	25 µl

3' RACE Reaksiyonunun Isı Döngüsü:

94°C	2 dakika	
94°C	30 sn.	35 döngü
48°C	30 sn.	
72°C	50 sn.	
72°C	7 dk.	
4°C	∞	

2.19.3 Sitozin Kuyruğunun cDNA'nın 5' Ucuna Eklenmesi (d_C Tailing)

5' RACE reaksiyonunda 5'ucunda, 3'ucundaki gibi bir poliA kuyruğu bulunmadığı için, bir primer oturma bölgesi de bulunmamaktadır. *O. onites* MAPKK geninin bilinmeyen 5' ucunu sentezleyebilmek için cDNA'nın mRNA'ya ters yöndeki 3' ucuna terminal transferaz enzimiyle (TdT) bir poli C kuyruğu eklenmiştir. Bu yöntem d_C Tailing adı verilmektedir. Bu işlem için iki farklı marka enzim kiti denenmiştir. RNA örneğimizin yoğunluğu 1.167 µg/µl'dir. Bu total RNA'nın % 5'i mRNA'lardan oluşmaktadır. Yani mRNA miktarı 58.365 ng/µl'dir.

Biolab marka terminal transferaz enzimi ile hazırlanan reaksiyon;

H ₂ O	8 µl
10x NE tamponu (BSA'sız, 20 mM Tris asetat, 50 mM potasyum asetat, 10 mM magnezyum asetat, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 25°C'de pH: 7.9.)	2 µl
5 mM dCTP (final konst.:~800 µM)	3.2 µl
cDNA kalıbı (final konst.: µl/10-20 ng mRNA)	5 µl
25 mM CoCl ₂ (kobalt klorür) (final konst.: 1 mM)	0.8 µl

0.5'lik bir PZR tüpüne eklenerek karıştırılıp santrifüjde kısa bir spin atırılmış ve 5 dk. 95°C'de bekletilmiştir. Daha sonra hemen buza konularak 2 dk. bekletilmiş ve 0.5 µl TdT (terminal transferaz) (20 u/l) enzimi eklenip kısaca spin atırılmıştır.

Tüp 37°C'de 1 saat inkübe edilmiş ve daha sonra 75°C'de 20 dakika tutulmuştur. İşlem sonunda tüp buza alınarak muhafaza edilmiştir.

Promega marka terminal transferaz enzimi ile hazırlanan reaksiyon;

5x TdT tamponu (500mM kakodilat tamponu (pH 6.8), 5mM CoCl ₂ , 0.5mM DTT)	4 µl
cDNA kalıbı	14 µl
2 mM dCTP (sitozin tri fosfast)	1 µl

3 dk. 95°C'de tutulmuş ve ardından buza alınmıştır. Tüp kısaca spin atırılmış ve 1 µl TdT enzimi eklenmiştir. 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiş ve

ardından 70°C’de 10 dakika bekletilmiştir. İşlem sonunda tüp buza alınarak muhafaza edilmiştir.

2.19.4. *Origanum onites* MAPKK cDNA’sının 5’ Ucunun 5’ RACE Reaksiyonuyla Elde edilmesi

RT reaksiyonu ile üretilen cDNA populasyonunun 3’ uçlarına terminal transferaz enzimi (Promega) aracılığıyla poli(C) kuyruğu (dC tailing) takılmıştır (Frohman 1988; Matz ve ark. 1989; Soimato ve ark. 2001). cDNA’nın 3’ ucu mRNA kalıbının 5’ ucuna karşılık gelmektedir. Oligo-dG₂₀ primeri ile GOo5’MAPKK1 primerinin 5’RACE-PZR reaksiyonunda karşılıklı çalışmasıyla olası *O. onites* MAPKK cDNA’sının bilinmeyen 5’ kısmı üretilmiştir. Reaksiyon için farklı primer oturma ısıları (58, 60.1, 61.9, 64.4, 68°C) ile optimizasyon yapılmıştır. Agaroz jelde koşturulan PZR ürünleri jelden kesilerek QIAquick Gel Extraction kiti ile saflaştırılmış ve pGEM-TEasy plazmitine klonlanarak dizi analizleri yapılmıştır.

5’RACE Reaksiyonu (25 µl):

Steril deiyonize H ₂ O	11.75 µl
10x PCR Tamponu ((NH ₄) ₂ SO ₄ ’lü)	2.5 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	1.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
dG ₂₀ Primer (2.5 µM)	2.5 µl
GOo5’MAPKK1 primer (2.5 µM)	2.5 µl
cDNA kalıbı	2 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.25 µl
Toplam:	25 µl

5’ RACE Reaksiyonunun Isı Döngüsü:

94°C	2 dakika		
94°C	30 sn.		
68°C	30 sn.		35 döngü
72°C	50 sn.		
72°C	7 dk.		
4°C	∞		

L.esculentum-MAPKK GCGGATTTACTTTTGAACCAGAAAGGACTCAGACTCATTCTGAAGAGA-----ATGAA 173
N.tabacum-MAPKK GCGGATTTACTTTTGAACCAGAAAGGACTGAGATTGATCTCTGAAGAGA-----ATGAA 332
O.onites-OoMAPKK1 GCGGATTTGCTGCTGAATCAGAAAGGGGCTTCGGTTGATTTCTGATGAGA-----ATGAA 351
A.thaliana-ATMKK6 GGAGATTTTCTTCTGAATCAAAGGGGCTAAGGTTGACGTGAGATGAGA-----AGCAA 197
O.sativa-MAPKK1 GGTGAACCTGCGGCTTAATCAAAGAGGTTTGCAGCTTATATCCGAGGAAACTGCAGATGAA 291
Z.mays-ZeMEK1 GGTGAGCTGAGGCTCAATCAGAGCGGCTTGCAGCTTATCTCTGAGGAAAACGGGGATGAA 212
M.sativa-MAPKK GGAGATCTGCTTGTAAACAGAGACGGTGTTCGAATTGTTTCTGAGACTGA---AGTTGAA 162
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TCTCTGCCCTCAGAACTAAGGAGATAGATCTTCAGTTTTTCATTGGAAGATCTTGAAACC 233
N.tabacum-MAPKK TCTCCGGCCTCAGAACTAAGGAGATAGATCTTCAGTTCTCATTGGAAGATCTTGAAACC 392
O.onites-OoMAPKK1 CCCCGCCATCAGAGATGAAGGAGCTTGACCTCAATTCTCGTTGGAAGACCTTGAGACC 411
A.thaliana-ATMKK6 TCAAGGCAATCTGATAGCAAGGAGCTTGATTTGAAATTACTGCTGAAGACTTAGAGACT 257
O.sativa-MAPKK1 CCTCAGTCAACAACTGAAGGTGGAAGATGTCAGTTGTCAATGGATGACCTTGAGATG 351
Z.mays-ZeMEK1 GATGAATCTACAAAGCTGAAGGTGGAAGATGTCAGTTATCAATGGATGATCTTGAGATG 272
M.sativa-MAPKK GCTCCACCCCAA---TCAAGGCAACAGACAACCAGTTAAGTTTGGCAGACATAGACATA 219
* * * * *

L.esculentum-MAPKK ATCAAAGTCATTGAAAAGGAAGTGGGGTGTGTTCAACTTGTTCGTATAAATGGGTT 293
N.tabacum-MAPKK ATCAAAGTCATCGGAAGGAAGTGGTGGTGTGTTCAACTTGTTCGCCATAAATGGGTT 452
O.onites-OoMAPKK1 ATCAAAGTCATTGGTAAGGGAAATGGTGGCGTTGTTCAACTTGTTCGCCATAAATGGGTT 471
A.thaliana-ATMKK6 GTCAAAGTCATCGGAAAGGCAGTGGTGGTGTGTTCAATTAGTTCGTATAAATGGGTT 317
O.sativa-MAPKK1 ATTCAAAGTCATTGGTAAGGGGAGTGGTGGTATCGTCCAAC TAGTTCGGCACAAAGTGGGT 411
Z.mays-ZeMEK1 ATTCAAAGTCATTGGCAAAGGAGCGGTGGTGTGTTCCAGCTAGTGGGACAAATGGGTG 332
M.sativa-MAPKK GTGAAAGTGTGTTGAAAAGGAAACGGAGGGTGGTTCAATTGGTGAACACAAATGGACT 279
* * * * *

L.esculentum-MAPKK GGAACATTGTTTGTCTGAAGGTTATCCAGATGAATATACAAGAAGATATTCGTAAGCAG 353
N.tabacum-MAPKK GGAACATTGTTTGTCTTGAAGGTTATCCAGATGACTATACAGGAAGATATTCGTAAGCAG 512
O.onites-OoMAPKK1 GGAACGTTGTTTGCCTTGAAGGTTATCCAGATGACTATACAGGAGGAGATTCGGAACAA 531
A.thaliana-ATMKK6 GGCAAATTTCTTGTATGAAGGTCATACAGATGAATATACAAGAAGAAATCCGTAAGCAA 377
O.sativa-MAPKK1 GGGACATTATATGCCTTGAAGGCATACAATGAACATTCAGAGGCAGTTCGCAACAA 471
Z.mays-ZeMEK1 GGCACATTATTTGCCTTAAAGGGTATTCAAATGAACATTCAGGAGTCAGTTCGTAACAG 392
M.sativa-MAPKK AATCAGTTTTTTGCAATAAAGATAATTCAAATGAATATTGAAGATCCGTGCGCAACAG 339
* * * * *

L.esculentum-MAPKK ATAGTGCAAGAACTGAAAATAAATCAAGCATCA---CAATGTCCACATGTTGTTGTATGC 410
N.tabacum-MAPKK ATAGTGCAAGAACTGAAAATAAATCAAGCATCA---CAATGTCCACATGTTGTTGTATGC 569
O.onites-OoMAPKK1 ATAGTTCAGGAGACTAAAATTAATCAAGCATCT---CAATGTCCAAATGTTGTAGTTGC 588
A.thaliana-ATMKK6 ATTTGTTCAAGGACTTAAAATAAACAAGCATCATCAATGTCCACATGTAGTAGTTTGC 437
O.sativa-MAPKK1 ATAGTACAAGAGCTCAAATAAATCAAGCAACA---CAGAAGCCACATATAGTCTTTGC 528
Z.mays-ZeMEK1 ATAGTACAGGAGCTCAAATAAACAAGCAACA---CAGAGCCCTCATATAGTTATGTGC 449
M.sativa-MAPKK ATAGCTAAAGAGCTGAAAATAAATCAAGCAGCA---CAGTGTCTTATGTTGTTGTCTGC 396
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TACCACCTTTTCTATCACAATGGAGCTATATCTCTGGTTTTGGAGTATATGGACCGTGG 470
N.tabacum-MAPKK TACCACCTTTTCTATCACAATGGAGCTATTTCTCTGGTTCTTGTAGTATATGGACCGTGG 629
O.onites-OoMAPKK1 TATCATTTCTATCACAACCGAGCTATATCTATTTGTTTGAATACATGACCTGGTGA 648
A.thaliana-ATMKK6 TACCATTCTTTCTATCACAATGGAGCTTTTCTGCTTGTGCTTGAATACATGGACCGTGG 497
O.sativa-MAPKK1 CACCAATCTTTCTACCATAATGGTGAATATATCTTGTTC TAGAATACATGGACCGTGG 588
Z.mays-ZeMEK1 CATCAATCTTTTACCACAATGGTGAATATATCTTGTTC TTGAGTACATGGACCGTGG 509
M.sativa-MAPKK TACCAGTCAATTTGACAACGGTGTATATCAATCATTTTAGAGTACATGGATGGAGGC 456
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TCTTTAGTTGATGTAATCGGGCAACTTAAGACCATCTTGAACCATATCTCGCAGTTGTT 530
N.tabacum-MAPKK TCTTTAGCTGACGTAATCAGGCAACTTAAGACTATTCTTGAACCATATCTCGCAGTTGTT 689
O.onites-OoMAPKK1 TCATTAGTTGATATAATCAGACAAGTCAAGACAATCCCTTGAACCATACCTTGACGTTGN 708
A.thaliana-ATMKK6 TCTCTGCGGATGTGATTAGACAAGTCAAGACTATTCTTGAACCTTACCTTGTCTGTGTC 557
O.sativa-MAPKK1 TCTCTGCGAGATATCATTAACAAGTCAAACAATCTGGAGCCATACCTGGCAGTACTT 648
Z.mays-ZeMEK1 TCGCTTGACAGACTTGTTAAGCAAGTGAAGACTATTCTGGAGCCATACCTTGACGTA 569
M.sativa-MAPKK TCCATGGCTGATCTTCTGAAGAAAGTTAAAACAATACCAGAGCCTTATCTTCTGCATT 516
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TGCAAGCAGGTTTTACAAGGCTTGTCTACTTGCATCACGAGAGACATGTTATCCACAGA 590
N.tabacum-MAPKK TGCAAGCAGGTTTTACAAGGCTTGTCTACTTGCATAACGAAAGACATGTTATCCACAGA 749
O.onites-OoMAPKK1 TGCAAACAGGTTTTACAGGGTTAGTTTACTTGCATCATGAGAGACATGTTATCCATAGA 768
A.thaliana-ATMKK6 TGTAACAGGTTTTGTAGGCTTGTGTACCTACACAACGAAAGACATGTCATACACAGA 617
O.sativa-MAPKK1 TGCAAACAGGTTTTGGAGGCTTACTGTATCTTTCATCATGAAAGGCATGTTATCCACAG 708
Z.mays-ZeMEK1 TGTAAGCAGGCTTGGAGGTTTTATTGTATCTTCATCATCAAAGGCAGCTGATTCACAGG 629
M.sativa-MAPKK TGTAAGCAGGTTCTGAAGGTTTTAATATATCTTACCATGAAAGACACATTATCCACAGA 576
* * * * *

L.esculentum-MAPKK GACATAAAGCCATCAAACCTTGGCTAGTGAACCACAAAGGAGAGGTAATAAATTACAGATTTT 650
N.tabacum-MAPKK GACATAAAGCCATCAAACCTTGGTGTAGTGAACCACAAAGGAGAGGTAATAAATTACTGATTTT 809
O.onites-OoMAPKK1 GATTAAAGCCTTCTAATCTGCTAGTGAACCACAAAGGGGAAGTAAAAATTACAGATTTT 828
A.thaliana-ATMKK6 GACATTAAGCCATCAAACCTTCTTGTAAACCATAAAGGGGAAGTAAAAATCTCAGATTTT 677
O.sativa-MAPKK1 GATATAAAGCCATCTAACTTGTAGTTAACCCTAAAGGTGAAGTAAAGATTACCGATTTT 768
Z.mays-ZeMEK1 GACATAAACCATCTAACTTGTGGTCAACCCTAAAGGTGAAGTCAAGATTACCGACTTC 689
M.sativa-MAPKK GACTTGAAGCCTTCTAATTTGTTGATCAATCACACAGGCGAGGTTAAGATTACTGATTTT 636
* * * * *

L.esculentum-MAPKK GGTGTAAGTGCAATGCTAGCCAGCTCTATGGGTCAGAGGGATACATTTGTTGGAACCTAC 710
N.tabacum-MAPKK GGTGTAAGTGCAATGCTAGCCAGCTCTATGGGTCAAAGAGATACATTTGTTGGGACTTAC 869
O.onites-OoMAPKK1 GGTGTTAGTGCCATGCTGGCAAGCTCTATGGGCCAACGTGACACATTTGTTGGGACTTAC 888
A.thaliana-ATMKK6 GGTGTAAGTGCAAGTCTTGTAGCTCCATGGGACAGAGGGACACATTTGTTGGAACCTAC 737
O.sativa-MAPKK1 GGGGTAAGTGCCGTGCTAGCAAGTTCAATGGGTCAGCGGGATACGTTTGTGGAACTAC 828
Z.mays-ZeMEK1 GGAGTGAGTGCTGTAGCAAGCTCAATAGGTCAGCGAGATACATTTGTTGGAACCTAC 749
M.sativa-MAPKK GGTGTTAGTGCAATTTGGAAGTACATCTGGTCAAGCAAATACTTTCATTGGCACATAC 696
* * * * *

L.esculentum-MAPKK AATTATATGGCACCTGAAAGAATAAGTGGAAGT-----ACCTATGACTACAAGAGTGAT 764
N.tabacum-MAPKK AATTACATGGCACCTGAAAGGATAAGTGGAAGT-----ACCTATGACTACAAGAGTGAT 923
O.onites-OoMAPKK1 AATTACATGGCGCCTGAAAGGATCAGTGGGAGC-----ACCTATGACTATAAAAAGTGAT 942
A.thaliana-ATMKK6 AACTATATGTCGCCTGAGAGGATTAGTGGAAGC-----ACATATGACTACAGCAGTGAC 791
O.sativa-MAPKK1 AACTATATGGCGCCTGAGCGTATTAGTGGAAGC-----TCCTATGACTACAAGAGTGAC 882
Z.mays-ZeMEK1 AACTATATGGCGCCTGAGCGGATTAGTGGTAGC-----ACTATGACTACAAAAGTGAC 803
M.sativa-MAPKK AACTATATGTCTCCAGAGAGAATCAATGGAAGCCAACGTGGTCAACATACAAAAGTGAT 756
* * * * *

L.esculentum-MAPKK ATCTGGAGCTTGGGCATGGTCATCCTTGAATGTGCTATTGGACGTTTCCCATACATACAG 824
N.tabacum-MAPKK ATCTGGAGCTTGGGCATGGTCATCCTTGAATGTGCTATTGGACGTTTCCCATACATACAG 983
O.onites-OoMAPKK1 ATTTGGGAGTCTGGGCATGGTGATTCTTGAATGTGCTATTGGACGTTTCCCTTATACAAA 1002
A.thaliana-ATMKK6 ATTTGGAGTTTGGGGATGTCAGTGTAGAATGTGCAATAGGAAGATTTCCTTATTTAGAA 851
O.sativa-MAPKK1 ATATGGAGTTTGGGCTTAGTAATACTCGAGTGTGCCATTGGTCCGTTCCCTATATACCT 942
Z.mays-ZeMEK1 ATATGGAGTTTGGGCTTAGTATACTTGAGTGTGCCATTGGCCGTTCCCTTATATACCT 863
M.sativa-MAPKK ATATGGAGTTTGGGACTGATATTGCTGGAGTGTGCTATGGGCGGTTTCCTTACACCCA 816
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TCAGAGGACCAGCAAGCTCGGCCTAGCTTTTACGAGCTTTTGGATGCTATTGTTAGCAGT 884
N.tabacum-MAPKK TCGGAGGACCAGCAAGCATGGCCGAGCTTTTATGAGCTTCTGGAGGCTATTGTTAGCAGT 1043
O.onites-OoMAPKK1 TCTGAAGACCAACAAAGTGGCCCCAGCTTTTACGAGCTTCTGCAGGCAATTGTTGGAAGT 1062
A.thaliana-ATMKK6 TCTGAAGATCAGCAAAACCCGCCAAGCTTTTATGAACCTTGGCAGCAATAGTAGAGAA 911
O.sativa-MAPKK1 TCAGAAGG---GGAAGGTGGTAAAGCTTCTACGAATATTAGAAGCAATTGTTGACAG 999
Z.mays-ZeMEK1 TCGGAAGG---TGAAGGTTGGTAAAGCTTTTATGAACCTTCTGGAGGCCATTGTCGATCAG 920
M.sativa-MAPKK CCAGATCAAAGTGAAGATGGGAAAGTATATTGAGCTTATTGAAACTATTGTTGATAAAA 876
* * * * *

L.esculentum-MAPKK CCACCACCTTCTGCTCCAGTAGATCAATTTTCCCAGAATCTGTTCATTGTTTCTGCT 944
N.tabacum-MAPKK CCACCACCTTCTGCTCCAGAGATCAATTTTCCCAGAATCTGTTCATTGTTTCTGCT 1103
O.onites-OoMAPKK1 CCACCACCTTCTGCTCCGCGCAGATCAATTTTCCCAGAATCTGTTCATTGTTCTGCA 1122
A.thaliana-ATMKK6 CCACCACCAACTGCTCCTTCTGATCAATTTCTCACCTGAATCTGCTCCTTTGTATCAGCC 971
O.sativa-MAPKK1 CCACCACCTTCTGACCCAGCGGACCAGTCTCTCCAGAATTTGTGCAATTTATCTCCTCC 1059
Z.mays-ZeMEK1 CCACCACCTTCTGACCTGCAGATCAGTCTCTCCAGAATCTGCTCATTATCTCCTCT 980
M.sativa-MAPKK CCTCCTCTAGTGTCCATCTGAACAATTTTCTCAGAATTTGCTCATTATCTCTGCA 936
* * * * *

L.esculentum-MAPKK TGCATTCAAAGGATCCAGGGATAGATCTTCAGCTTGGACCTTTTGGAGTACCCTTTT 1004
N.tabacum-MAPKK TGCATACAAAAGGACCAAGGATAGATCTTCAGCTTGGACCTTTTGGACCCACCTTTC 1163
O.onites-OoMAPKK1 TGCGTACAGAAAGATCCTAGAGACAGATCTTCGGCCTTGGAACTACTGAGCCATCCTTTC 1182
A.thaliana-ATMKK6 TGCATACAAAAGATCCTCCAGCAAGAGCATCATCTTGGACCTCTGAGTCAATCCATTC 1031
O.sativa-MAPKK1 TGCATACAAAAGGATCCTCGGGAGCGGATGCTGCTTCAGAACTCTTGAATCATCCTTTC 1119
Z.mays-ZeMEK1 TGCATACAGAAAGATCCGGCTCAGAGGATGCTGCTTCAGAACTCTTGAATCACCCCTTTT 1040
M.sativa-MAPKK TGTCTACAGAAAGACCAGGAAGCAGACTGTCCGGCTCAGGAACTTATGGAACCTTCCTTTC 996
* * * * *

L.esculentum-MAPKK GTTAAGAAGTTTGAAGACAAGACATGATCTCAGCATACTTGTGAGTACGCTGGAACCC 1064
N.tabacum-MAPKK ATTAAGAAGTTTGAAGACAAGACATAGATTTTCGGCATACTTGTGAGTACGCTGGAACCT 1223
O.onites-OoMAPKK1 ATCAAGAATTTGAAGAGAAGACATGATCTCAGCATATATGTGGGTAGCCTTGGATCA 1242
A.thaliana-ATMKK6 ATAAAAAGTTTGAAGACAAGGATATCGATCTCGGGATACCTTGTGGCACTCTGGAACCA 1091
O.sativa-MAPKK1 ATCAAGAAGTTTGAAGATAAGGATTTAGACCTGCGCATTCTTGTGAGAGCCTTGAACCT 1179
Z.mays-ZeMEK1 TTAAGAAGTTCGAGGATAAGGACTTAAACCTGGGGATTCTTGTGGGAACCTGGAACCT 1100
M.sativa-MAPKK ATCAGCATGATGATGACTTGCATGTGGATCTCTCAGCTTATTTCTCCGATGCAGGATCT 1056
* * * * *

2.21. *Origanum onites* MAPKK cDNA'sının Tamamının Klonlanması İçin PZR

Bu primerler ile olası tüm *O. onites* MAPKK genini elde etmek için yine RT reaksiyonundan elde edilen cDNA populasyonunda kullanılarak *Pfu* DNA Polimeraz (Promega) ile PZR reaksiyonu yapılmıştır.

Tüm gen için PZR Reaksiyonu (25 µl):

Steril deiyonize H ₂ O	13.25 µl
10x PZR tamponu (MgCl ₂ 'li)	2.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
F2MAPKK1-5'UTR (2.5 µM)	2.5 µl
R1MAPKK1-3'UTR (2.5 µM)	2.5 µl
cDNA kalıbı	2 µl
Pfu DNA polimeraz (3u/µl)	0.25 µl
Toplam:	25 µl

Tüm gen için PZR Reaksiyonunun Isı Döngüsü:

94°C	2 dakika		
	94°C	30 sn.	} 35 döngü
	50°C	30 sn.	
	72°C	1.5 dk.	
72°C	7 dk.		
4°C	∞		

Agaroz jelde koşturulan PZR ürünü jelden kesilerek QIAquick Gel Extraction kiti ile saflaştırılmış ve *Taq* polimeraz enzimiyle 72°C'de 10 dk. inkübe edilerek genin uçlarına A nükleotidi eklenmiştir. Daha sonra PZR ürünü pGEM-T plazmitine ligasyon ile eklenmiş ve konakçı XLI-Blue hüresine transforme edilmiştir. Konakçı hücrede çoğaltılan plazmit Wizard Plus SV Minipreps DNA saflaştırma sistemi kiti ile saflaştırılmış ve dizi analizi için kurulan PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. PZR reaksiyonu ürünleri Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analizi cihazında analiz edilmiştir.

2.22. Southern Blot Yöntemi

2.22.1. *Origanum. onites* Genomik DNA'sının Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

Southern blot yönteminde ilk olarak genomik DNA, elimizdeki uygun restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılmıştır. *O. onites* MAPKK geninin elde ettiğimiz dizi bilgisinin Gene Tool analiz programı ile oluşturulmuş restriksiyon enzim haritasına ve ayrıca mevcut enzimlerle deneysel olarak yapılan kesim reaksiyonlarına göre uygun restriksiyon enzimleri seçilmiştir. Bu enzimlerle (*EcoRI*, *Hind-III*, *BamHI*, *XbaI*, *DraI*, *PstI*, *SpeI*) *O. onites* genomik DNA'sı kesime uğratılmıştır.

Kesim reaksiyonları: 10 µg *O. onites* DNA'sı örneği ile 2 µl enzim ve 2 µl enzime ait tampon eklenerek reaksiyon kurulmuştur. Reaksiyon 20 µl ye steril deiyonize su ile tamamlanmıştır 37°C'de bir gece inkübasyonun ardından 3.5 µl 6x yükleme tamponu eklenerek reaksiyon sona erdirilmiştir.

2.22.2. Kesime Uğratılan DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi

Kesim reaksiyonunun tamamı % 0.7'lik (70 ml çift taraflı ve 2 µl 10x etidyum bromit) agaroz jele yüklenerek gece boyunca 10-15 volt ya da gün boyunca 40-50 volt uygulanarak yürütülmüştür.

Jel UV'de en fazla 2 dk. tutulmuş ve bu sayede marker'daki gibi büyük DNA parçalarının kırılması sağlanmıştır. Bu zaman zarfında jelin resmi bir cetvel ile birlikte çekilmiştir.

2.22.3. Southern Blotlama

Çalışmamızda blotlama yöntemi hem klasik ve hem blotlama cihazı ile denenmiştir.

Agaroz Jel ile Southern Blot düzeneği kurulmuş ve naylon mebranın ve jelin bir kenarı kesilerek işaretlenmiştir. Klasik düzenekte gece boyunca transfer

işlemi yapılmıştır. Cihazla bu işlem en fazla bir saat sürmektedir. Bu işlemle beraber gece boyunca işaretli prob hazırlığı da yapılmıştır.

2.22.3.1. Klasik Blotlama Yöntemi

Sigma Southern Breeze Blot Kiti, tek kullanımlık paketler halinde transfer tekniklerinin birkaç tipi için standart çözeltileri içermektedir. Kitin tamamı, hazır kesilmiş BioBond naylon membran, fitil ve blot kağıtları ile agaroz jelden nükleik asitlerin transferi ve ön işlemleri için gerekli tüm solüsyonları içermektedir.

Depürinasyon: Şayet ilgili fragmentler 15 kb'den daha büyük ise, transferden önce depürinasyon ile çentiklenmelidir. DNA'yı depürine etmek için jel 250 ml 1X Depürinasyon solüsyonu (kit) ile 30 dk. yavaşça sallanmıştır.

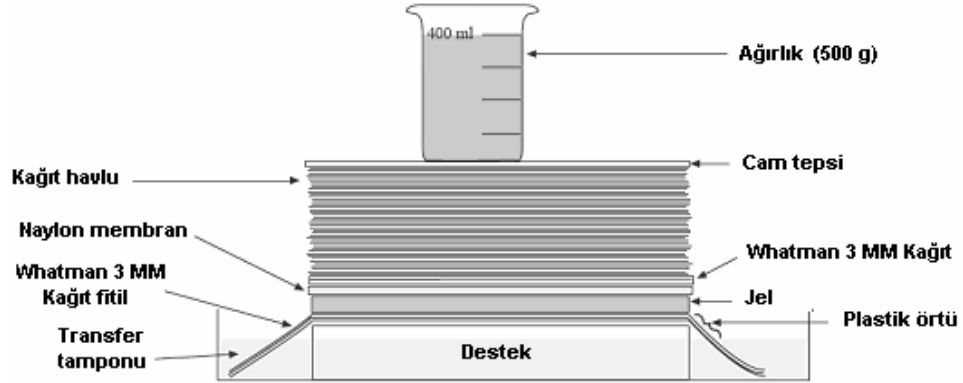
Denatürasyon: Jel, herhangi bir koşturma veya depürinasyon solüsyondan kalan atıklardan temizlemek için kısaca deiyonize sudan geçirilerek yıkanmıştır. Jel, DNA'yı denatüre etmek için, 250 ml 1X Denatürasyon solüsyonu (kit) ile 30 dk. yıkanmıştır.

Nötralizasyon: Jel, denatürasyon solüsyonundan kalan atıklardan temizlemek için kısaca deiyonize sudan geçirilerek yıkanmıştır. Jeli nötralize etmek için jel, 250 ml 1X Nötralizasyon solüsyonu ile 30 dk. yıkanmıştır.

Jel nötralize edilirken transfer için membran ve filtre kağıdı hazırlanmış ve membran, 10 parça ekstra kalın blotlama kağıdı ve fitilleme (wicking) kağıdı 1X transfer tamponunda yıkanmıştır.

200 ml 1X transfer tamponu içeren kaba destek ve kağıt yerleştirilmiştir. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranı durulamak için geriye kalan 50 ml 1X transfer tamponu saklanmıştır. Kağıdın her iki ucunun transfer solüsyonu ile iyice bağlanmış ve solüsyon seviyesinin desteğin üst kısmından daha aşağıda olduğunu kontrol edilmiştir. Kağıt tamamen ıslatılmış ve yüzeyin altında kalabilecek herhangi bir hava kabarcığı temiz bir pipet ile yuvarlanarak temizlenmesi sağlanmıştır.

Transfer aparatları Şekil 2.10' da görüldüğü gibi bir araya getirilmiştir. Her basamakta yüzeyin altındaki hava kabarcıkları temiz bir pipetle dikkatlice yuvarlanıp kenarlara itilerek temizlenmiştir.



Şekil 2.9. Klasik blotlama düzeneği (Anonim 2004'den uyarlanmıştır)

Tamamen ıslatılmış kağıdın üstüne üzerine nötralize edilmiş jel yerleştirilmiş ve dikkatlice hizalanmıştır. Jelin her iki yanı streç film ile örtülmüş ve böylece streç örtü jelin kenarlarını kısmen kaplamıştır.

Membran (+ yüklü) ve aynı ebatlarda bir parça whatman blotlama kağıdı, jelin yıkandığı nötralizasyon solüsyonu içinde önceden ıslatılmıştır. Jelin üstüne daha önceden ıslatılmış membran yerleştirilmiş ve bir kalemle yönünü belirlemek için işaretlenmiştir.

Daha sonra, membran üzerine daha önceden ıslatılmış bir parça ekstra kalın blotlama kağıdı dikkatlice yerleştirilmiştir.

Bunun üstüne de ekstra kalın blotlama kağıdının geriye kalan 9 tane kuru kağıdı yerleştirilmiştir. Üstüne yaklaşık 100 gr ağırlığında cam veya plastik bir plate (cam petri kapağı veya tabak vb.) yerleştirilmiştir. Çok fazla ağırlık jele baskı yapacağından etkisiz (verimsiz) transferle sonuçlanabilmektedir.

Transfer işleminin gece boyunca sürmesi sağlanmıştır. Transfer tamamlandıktan sonra, tüm blotlama kağıtları ayrılarak alınmış ve yumuşak kurşun kalem kullanarak jel üzerindeki kuyucuklar naylon membranda işaretlenmiştir. Membran jelden dikkatlice kaldırılmış ve daha önceden saklanan 50 ml 1X transfer solüsyonu ile kısa bir süre durulanmıştır.

Membran yeni bir parça kurutma kağıdına alınmış ve birkaç dakika süreyle hava etkisiyle kurumaya bırakılmıştır. DNA'yı membrana kalıcı olarak yapıştırmak için membran, 80°C'de 2 saat fırınlanmıştır. Membranlar, yeteri kadar

blotlama kağıtları arasında oda sıcaklığında saklanabilmektedir. Transferin yeterliliğini ölçmek için jel, oda sıcaklığında 30 dakika 0,5 µg/ml etidyum bromit solüsyonuyla boyanmış ve ultraviyole ışıkta transferin gerçekleştiği teyit edilmiştir.

2.22.3.2. Watman-Biometra FastBlot Cihazı ile Blotlama

Fastblot nükleik asitleri membranlara transfer etmede de kullanılan bir cihazdır. Transfer için blotlama kalitesini arttırmada öncelikle DNA bir ön işleminden geçirilmiştir. (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. DNA transferinden önce uygulanan ön aşamalar (Cihaz teknik bülteni)

Depürinasyon	0.25 M HCl	7 dakika
Denatürasyon	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl	15 dakika
Nötralizasyon	3.0 M NaCl 0.5 M Tris, pH 7.4	15 dakika

Blotlama sandvici cihaz teknik bültenine göre hazırlanmıştır; transfer tamponu olarak 1x TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu kullanılmıştır ve membran/jel sandvicin her iki kısmına 10 kat blotlama kağıdı (Whatman 3MM Chr paper, Code No. 3030700, 3030704, 3030861, 3030917 ve 3030931) konmuştur. DNA'yı transfer etmek için, membran (çalışmamızdaki naylon membran) jelin anot kısmına gelen yüzeyine konulmuştur. 10x6.5 cm ebatındaki jele (cm²'sine 3-5 miliamper) 260 miliamper güç yaklaşık 30 dk süresince uygulanmıştır. Temel solüsyonları stabil olmadığı için Nitroselüloz membranlarda bu cihaz kullanılamamaktadır. Transfer işleminden sonra membran 1x TBE tamponuyla durulandıktan sonra 80°C'de 2 saat fırınlanmıştır.

2.22.4. DIG-İşaretli Bulucu DNA (Prob) Hazırlığı

O. onites MAPKK enzim genini taşıyan plazmit DNA, tüm genin klonlandığı PZR reaksiyonunun ısı döngüsü ve koşullarında kalıp olarak

kullanılarak bulucu DNA (prob) olarak kullanılacak olan PZR ürünü (insert) sentezlenmiştir. PZR reaksiyonundan sonra ürün %1.4'lük agaroz jele yüklenmiş ve yürütülen jelden ilgili bant kesilerek saflaştırılmıştır. İşaretli prob için DIG-ışaretleme ve tespit etme kiti (Roche) kullanılmıştır.

DIG ışaretleme kitine göre, 0.5 veya 1.5 ml'lik ependorf tüpler kullanılarak, 0,5-3 µg kalıp DNA (yukarıda prob için hazırlanmış DNA parçası) toplam 15 µl'ye steril deiyonize su ile tamamlanarak 100°C'de su banyosunda veya ısı bloğunda kaynatmadan 10 dk. bekletilip denatüre edilmiştir. Tüp kısa bir spin atılarak hemen buza konmuştur.

Üzerine kit'ten sırayla 2 µl heksonükleaz karışımı, 2 µl dNTP karışımı ve 1 µl Klenow enzimi eklenmiştir. 37°C su banyosunda 16 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) eklenmiş ya da aynı işlem 65°C'de 10 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

İşaretli bulucu DNA'yı çöktürmek için 6.25 µl 4M LiCl ve 200 µl soğuk saf etil alkol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Karışım tüpü 30 dk. -70°C'de bekletilmiş ve 15 dk. 14000 rpm'de oda ısısında santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve DNA peleti oda ısısında kurutulmuştur.

Kuruyan DNA peleti 50 µl TE buffer ile çözündürülmüş ve bulucu DNA istenildiğinde kullanılmak üzere 1 yıl saklanabileceği -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.22.5. Prehibridizasyon, Hibridizasyon ve Deteksiyon Aşamaları

Çalışmamızda bu aşamaların hepsi DIG ışaretleme ve tespit etme Kiti prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Daha önce fırınlanmış membran prehidridizasyon ve hibridizasyon işlemi için kullanılmıştır.

Öncelikle melezleme standart tamponu (prehibridizasyon tamponu) hazırlanmıştır (Çizelge 2.6.).

Çizelge 2.6. Melezleme standart solüsyonu (Prehibridizasyon Tamponu) (Temizkan ve Arda 2004)

Prehibridizasyon Tamponu	100 ml için	20 ml için	Final Konst.
20x SSC	25 ml	5 ml	5x
%10 SDS	200 µl	40 µl	% 0.02
Na-laurylsarcocine	0,1 g	0.02 g	% 0.1
Bloklama stok solüsyonu (Kit içindeki tozdan DIG-Maleik asit tamponu ile %10'luk (10x) hazırlanır)	1 ml	200 µl	% 0.1

Toplam hacim 20 ml olacak şekilde steril distile su ile tamamlanmıştır. Bu solüsyondan iki tane 20 ml'lik hazırlanmıştır. ilki prehidridizasyon için kullanılmıştır. İkincisi de 5 dk. 100°C'de tutulup sonra buza konularak denatüre edilmiş bulucu DNA eklenerek hibridizasyon tamponu olarak kullanılmıştır. Daha önce kullanılan ve -20°C'de bekletilen DIG işaretli bulucu DNA tekrar kullanılacağı zaman 68°C'de 10 dakika bekletilmiş ve 10 dakika buzda bekletilerek kullanılabilir hale getirilmiştir. (Ko, 2005).

Fırınlama işleminden sonra hazır hale gelen naylon membran prehibridizasyon işlemi için hibridizasyon tüpüne alınmıştır. Prehibridizasyon aşaması 68°C'de 1.5-2 saat süreyle hibridizasyon fırınında gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon 16 saat ya da gece boyunca 68°C'de hibridizasyon tüpü içinde yapılmıştır. Hibridizasyon ve prehibridizasyon ısıları bulucu DNA'daki G/C oranına göre hesaplanmıştır. Genelde prehibridizasyon sıcaklığı hibridizasyon sıcaklığı ile aynı tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonraki ikinci yıkamada da bu sıcaklık kullanılmıştır. 3. yıkamada genelde 68°C kullanılmaktadır. Fakat bu yıkama yüksek spesifiteye sahip bulucu DNA'lar için temiz bir zemin oluşturmak için yapılmaktadır.

Kit prosedürüne göre hibridizasyon sıcaklığını hesaplamak için gerekli formül:

$T_m = 49.82 + 0.41 (\%G/C) - (600/\text{bulucu DNA'daki baz çifti sayısı yani bulucu DNA uzunluğu})$ örneğin 1200 bç için bu değer 1200 dür. Bizim bulucu DNA'mız 1200 bç ve G/C oranı yaklaşık % 43.2 dir. A/T ise % 56.5 .

$$T_{opt} = T_m - 20-25^{\circ}\text{C}$$

Bizim değerlerimize göre $T_m = 67,032$ çıkmıştır. Buna göre T_{opt} yani hibridizasyon sıcaklığımız 47, 032 veya 42,032 değerleri arasındadır.

Hibridizasyon tamponu bir falcona boşaltılmış ve -20°C 'de tekrar kullanılmak üzere saklanmıştır. Membran 1.yıkama tamponu (2x SSC, % 0.1 SDS) ile oda ısısında iki kere 5'er dakika hafif harekette yıkanmış ve szlmştir. Tekrar membran 2. yıkama tamponu ile (0.5x SSC, % 0.1 SDS) ile 65°C 'de 5 dk. yıkanmış ve szlmş, daha sonra 3. yıkama tamponunda (0.1x SSC, % 0.1 SDS) 68°C 'de 5 dk. yıkanmıştır. 3. yıkama tamponu membrandan süzülerek uzaklaştırmıştır.

Yıkamalardan sonra naylon membran DIG-Maleik asit tamponunda oda ısısında 5 dk. yıkanmış ve szlmştir. Daha sonra membran 10 ml 1x bloklama tamponu içinde oda ısısında 30 dk. yıkanmış ve burada yeni 1x bloklama tamponu mevcut durumdaysa dklmştir.

Antikor solüsyonu (kit) kullanılmadan önce 5 dk. 10000 rpm'de santrifüjlenmiş sonra tüpteki sıvının yüzeyinden antikor pipetle alınmıştır. Yenisi hazırlanmadıysa eski 1x bloklama tamponuna 1:5000 oranda dilüe olacak şekilde antikor solüsyonu eklenerek oda ısısında 30 dk. hafif sallamada yıkanmıştır.

Antikor solüsyonu uzaklaştırılıp DIG-yıkama tamponu ile 2 defa 15'er dk. yıkama yapılmış ve DIG saptama tamponu ile 2-5 dk. dengelenmiştir.

DIG ile işaretlenmiş bulucu DNA'lara bağlanan antikorlara bağlanarak renk oluşumuna neden olan Colorsubstrate solüsyonundan 2 ml taze olarak hazırlanmıştır. Bu solüsyon karanlıkta tutulmalıdır. Solüsyon, kit'ten zndrlen vial 9 tüpünden 40 μl alınarak 2 ml saptama tamponu ile hazırlanmıştır. Yetmediği takdirde bu solüsyondan daha fazla aynı oranda hazırlanabilmektedir.

DIG saptama tamponu döküldükten sonra membranın üzerine 2 ml Colorsubstrate solüsyonu eklenmiş ve karanlıkta çalkalamadan bant oluşumu gözlenmiştir. İşlemi sonlandırmak için membran DIG TE bufrer ile yıkanmıştır.

Gerekli Solüsyonlar Hazırlanması:

1x Blocking Solution:

Kit içindeki bloklama tozundan DIG maleik asit tamponu ile % 1'lik hazırlanmıştır.

50 ml DIG Yıkama Tamponu:

5 ml 1 M Maleik asit (Final kons. 0.1 M) 7.5 ml 1 M NaCl (Final kons. 0.15 M) 1.5 ml %10'luk Tween 20 (Final Kons. % 0.3). pH'ını 7.5'a ayarlayıp 50 ml'e distile su ile tamamlanmıştır.

DIG Saptama Tamponu:

Final konsantrasyonları: 0.1 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, pH: 9.5

DIG Maleik Asit Tamponu:

Final konsantrasyonları: 0.1 M Maleik asit, 0.15 M NaCl, NaOH ile pH: 7.5'ayarlanmıştır. 100 ml için: 10 ml 1M Maleik asit, 7.5 ml 2 M NaCl karıştırılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

DIG TE Buffer:

Final konsantrasyonları: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH: 8

20x SSC Çözeltisi (1 litre):

175.3 g NaCl (3M NaCl), 88.2 g Na₃Sitrat (0.3 M) önce steril distile suyla 800 ml'ye tamamlanmış. 1 M HCl ile pH:7.0'a ayarlandıktan sonra 1 litreye steril distile suyla tamamlanmıştır.

200 ml 2x 1. Yıkama Tamponu:

20 ml 20x SSC, 2 ml %10'luk SDS, 200 ml'e distile su ile tamamlanır.

200 ml 0.5x 2. Yıkama Tamponu:

5 ml 20x SSC, 2 ml %10'luk SDS, 200 ml'e distile su ile tamamlanır.

200 ml 0.1x 3. Yıkama Tamponu:

1 ml 20x SSC, 2 ml %10'luk SDS, 200 ml'e distile su ile tamamlanır.

2.23. *Origanum onites* MAPKK Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi

Çalışmamızda *O. onites* MAPKK proteinini rekombinant olarak üretebilmek için pMAL Protein Füzyon and Saflaştırma Sistemi (Biolabs) kiti kullanılmıştır.

2.23.1. UTR Bölgesi Olmayan *Origanum. onites* MAPKK1 cDNA'sının Eldesi

O. onites MAPKK proteinin rekombinant olarak üretilebilmesi için, daha önce UTR bölgeleriyle birlikte klonlanan genin bu bölgelerden arındırılarak sadece start ve stop kodonları arasındaki bölgeyi ekspres plazmitine aktarmak gerekmektedir. Bu nedenle start ve stop kodonları içine alan yeni yönlendirilmiş ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Primerlerin özelliği, translasyon için kullanılacak plazmitin sahip olduğu restriksiyon kesim bölgelerini içermesidir. Bu sayede rekombinant olarak üretilmesi istenen gen parçası doğru yönde plazmit içine eklenebilecektir. Primer bilgileri;

Ex-OoMAPKK1F (ileri):

5'CGGGATCCATGAAGTTGAAGAAACCTCTCAAGGAA3' (italik bölge *BamH I* restriksiyon enzimi kesim bölgesi, koyu bölge start kodon).

Ex-OoMAPKK1R (geri):

5'GGCGAAGCTTTTATGGGATATTCACAGGTGATCCAAG3' (italik bölge *Hind III* restriksiyon enzimi kesim bölgesi, koyu bölge stop kodon).

Yönlendirilmiş primerler ile PZR reaksiyonu için uygun primer oturma sıcaklığını bulabilmek için ısı skala reaksiyonu kurulmuş, reaksiyon tüpleri 52, 54.8, 57.3, 60.9 ve 65.1°C'lik primer oturma ısılarında reaksiyona sokulmuştur. Sonuç olarak primerlerin 57.3°C'de en verimli şekilde çalıştıkları saptanmıştır. Temperature gradient esnasında Taq polimeraz kullanılmış iken asıl reaksiyonda Pfu polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bunun nedeni bu enzimin diğerine göre hata yapma oranının çok daha düşük olmasıdır. Bu ısıda yapılan reaksiyon bileşenleri ve ısı döngüsü aşağıdaki gibidir:

PZR Reaksiyonu (25 µl):

Steril deiyonize H ₂ O	14.25 µl
10x PZR tamponu (MgCl ₂ 'li)	2.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	2 µl
Ex-OoMAPKK1F(2.5 µM)	2.5 µl
Ex-OoMAPKK1R (2.5 µM)	2.5 µl
1/10 RT kalıbı	1 µl

Pfu DNA polimeraz (3u/μl)	0.25 μl
Toplam:	25 μl

Tüm gen için PZR Reaksiyonunun Isı Döngüsü:

94°C	2 dakika			
	94°C	30 sn.	}	35 döngü
	57.3°C	30 sn.		
	72°C	1.5 dk.		
72°C	7 dk.			
4°C	∞			

2.23.2. *Origanum onites* MAPKK1 cDNA'sının Translasyon Plazmitine Eklenmesi

PZR reaksiyonu sonucu elde edilen ürün ile translasyon plazmiti olan pMAL-p2x plazmiti (pMAL Protein Fusion and Purification System, New England Biolabs) *Hind III* ve *BamH I* enzimleriyle kesime uğratılmıştır. Kit bilgisine göre kesim reaksiyonu 500 ng'lık ürünler (plazmit ve insert gen) ile yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri

50 μl'lik reaksiyon için:

pMAL-p2x plazmiti (200 μg/ml)	2.5 μl	insert (12,7ng/μl)	35μl
<i>Hind III</i>	1 μl		1 μl
<i>BamH I</i>	1 μl		1 μl
10x SB tampon	5 μl		5 μl
Nükleazsız deiyonize H ₂ O	40.5 μl		8 μl
Toplam:	50 μl		50 μl

Kesim ürünleri kit bilgisine göre saflaştırılmıştır. Her iki kesime taşıyıcı olarak 10 μg glikojen (veya tRNA) eklenmiş, daha sonra 1/9 hacimde 3 M sodyum asetat eklenmiştir. Karışıma eşit hacimde isopropanol eklenmiş ve oda ısısında 10 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra 15 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülerek pelet % 70'lik etanol ile yıkanmıştır. Etanol döküldükten sonra pelet

kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan peletler 25 µl 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH:8 ile resüspanse edilmiştir.

Kesim reaksiyonundan sonra saflaştırılan plazmit ve insert'ün miktar tayinleri yapılmış ve 40 ng plazmit ile 20 ng insert olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur. Reaksiyon için pGEM-Teasy kitinin ligasyon buffer ve T4 DNA ligaz'ı kullanılmıştır.

Ligasyon reaksiyonu (20 µl):

Kesilmiş pMAL-p2x plazmit (8.3 ng/µl)	4 µl
Kesilmiş insert (2.6 ng/µl)	5 µl
2x Ligasyon tamponu	10 µl
T4 DNA ligaz(5u/µl)	1 µl
Toplam:	20 µl

2.23.3. Translasyon Plazmitinin Konakçı Bakteriye Taşınması

Ligasyon reaksiyonunun 10 µl'si kompetent *E. coli* TB1 suşuna ve diğer 10 µl'si de bir lacZα-komplementasyon suşu olan kompetent *E. coli* XLI-Blue'a eklenmiş ve buzda 5 dk. inkübe edilmiştir. 42°C'de 2 dakika ısıtıldıktan sonra 0.5 ml LB eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve 50 µg/ml ampisilin ve 80 µg/ml Xgal içeren LB petrilere yayılmıştır (petriler IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) içermemektedir). Gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve steril bir öze ile beyaz koloniler kazınıp bir ayrı bir LB amfisilin petrisine ekilmiştir. 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Petrideki beyaz kolonilerden koloni PZR yöntemiyle pozitif koloniler seçilmiştir.

2.24. MBP-OoMAPKK1 Füzyon Proteinini Üreten Kolonilerin Belirlenmesi

2.24.1. OoMAPKK1 Geninin Ekspresyonunun Gözlemlenmesi

pMAL Protein Fusion and Purification System kiti kullanılarak MBP (Maltose Binding Protein) ve OoMAPKK1 protein füzyonu ile rekombinant olarak OoMAPKK1 proteininin üretimi amaçlanmıştır. pMAL-p2x translasyon

plazmitine eklenmiş olan *OoMAPKK1* geninin ekspresyonunu gözlemlemek için kit teknik bülteninde tavsiye edilen pilot deney uygulanmıştır.

pMAL-p2x plazmit için toplam 6 örnek koloni (1) uyarılmamış ve 2) uyarılmış hücreler, 3) total hücre ekstratı, 4) total ekstratın çözünmeyen materyal kısmı, 5) amiloz resin'e bağlanan fraksiyon, ve 6) (sadece pMAL-p2x yapımı için) soğuk ozmotik şok prosedürüyle hazırlanmış bir periplazmik fraksiyon, hazırlanmıştır.

1) Füzyon plazmit içeren bir gecelik hücre kültürünün 0.8 ml'si 80 ml rich broth + glukoz ve amfisilin besi yerine eklenmiştir (**besi yeri için:** 1 litreye 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 2 g glukoz hazırlanıp otoklavlanmış ve 800 µl steril amfisilin eklenmiştir).

2) 37°C'de bakteri kültürü 2×10^8 hücre/ml (A_{600} 'de yaklaşık 0.5) olacak şekilde büyütülmüş ve kültürün 1 ml'si 2 dk. santrifüjlenmiştir (örnek 1: uyarılmamış hücreler). Süpernatant boşaltılmış ve hücreler 50 µl SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile resüspanse edilmiştir. Daha sonra örnekler vortekslenmiş ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

3) Kalan kültüre 0.1 M stok solüsyondan 0.24 ml IPTG eklenmiş ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. 0.5 ml kültür ayrılmış (örnek 2: uyarılmış hücreler) ve 2 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüş ve hücreler 100 µl SDS-PAGE örnek yükleme tamponuyla resüspanse edilmiştir. Daha sonra örnekler vortekslenmiş ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

4) Kalan kültür iki eşit parçaya (A ve B örnekleri) bölünmüş ve 4000 g'de 10 dk. santrifüjlenerek hücreler toplanmıştır. Süpernatantlar dökülmüş ve peletin biri 5 ml kolon tamponu (1 litreye: 20 ml 1.0 M Tris-HCl, pH:7.4 (final: 20 mM); 11.7g NaCl (final: 200 mM); 2 ml 0.5 M EDTA (final: 1 mM); 1 ml 1M sodyum azit (final: 1 mM); 0.7 ml β-mercaptoethanol) ile A örneği için resüspanse edilmiştir. Diğer pelet 10 ml 30 mM Tris-HCl, %20 sükröz, pH:8 ile B örneği için resüspanse edilmiştir.

A örneği için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

5A) Kolon tamponu içindeki hücreler, gece boyunca -20°C'de dondurulmuş ve daha sonra soğuk suda çözündürülmüştür.

6A) Hücreler soğuk su banyosuna konmuş ve 15 sn. veya daha az sürelik kısa vuruşlarla sonikate edilmiştir. Protein eldesi maksimum düzeye gelene kadar (genellikle yaklaşık 2 dk.) sonikasyon işlemi devam etmiştir.

7A) 4°C'de 9000 g'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant ayrı yere boşaltılarak buzda korunmuştur. Pelet 5 ml kolon tamponu ile resüspanse edilmiş ve çözünmeyen materyaller süspanse halde bırakılmıştır. Çözünen ve çözünmeyen materyal fraksiyonlarının 5 µl'sine 5 µl 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu eklenmiştir (belirtilen sıraya göre örnek 3: total hücre ekstraktı ve örnek 4: total ekstraktan çözünmeyen materyal).

8A) Bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl Amiloz resin eklenmiş ve 8000 g de 1 dk. santrifüjlenmiştir, boşaltılarak süpernatant atılmıştır. Resin 1.5 ml column buffer ile resüspanse edilmiş, daha sonra kısaca santrifüjlenerek süpernatant tekrar boşaltılmıştır. Bu işlem yeniden tekrar edilmiş ve son aşamada resin 200 µl kolon tamponu ile resüspanse edilmiştir. Amiloz resin bulamacının 50 µl'si ile çözünen materyal fraksiyonunun 50 µl'si karıştırılmış ve buzda 15 dk. inkübe edilmiştir. 1 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmış veya boşaltılmıştır. Pelet 1 ml column buffer ile yıkanmış, 1 dk. santrifüjlenerek resin 50 µl SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile resüspanse edilmiştir (örnek 5: Amylose'a bağlanan fraksiyon).

B örneği için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

5B) Tris-sükroz'daki hücelere 20 µl 0.5 M EDTA eklenmiş ve çalkalayıcı veya karıştırıcı ile oda ısında 5-10 dk. inkübe edilmiştir.

6B) 4°C'de 8000 g'de 10 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve pelet 10 ml soğuk 5 mM MgSO₄ ile buzda resüspanse edilmiştir.

7B) Örnek, soğuk su banyosunda 10 dk. çalkalanmıştır.

8B) Yukarıdaki gibi tekrar santrifüjlenenen örneğin süpernatantı soğuk ozmotik şok sıvısı olarak kullanılmıştır. Soğuk ozmotik şok sıvısının 10 µl'sine 10 µl 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu eklenmiştir (Örnek 6: soğuk ozmotik şok prosedürüyle hazırlanmış bir periplazmik fraksiyon).

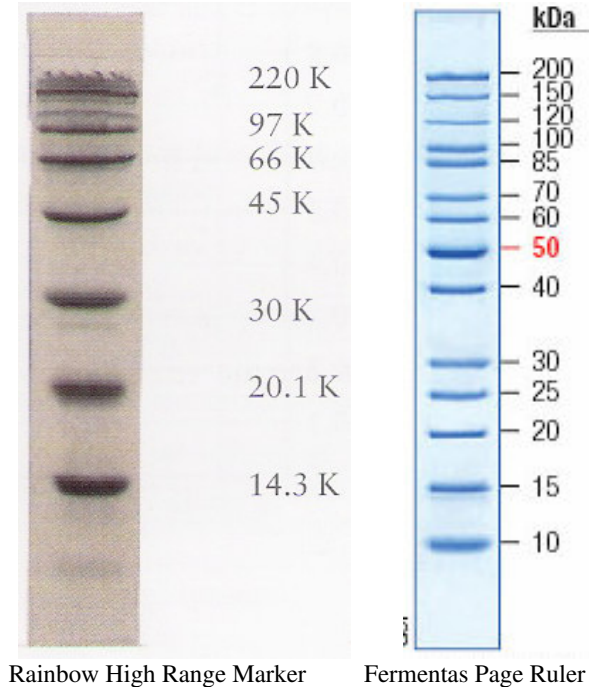
2.24.2. SDS-PAGE

Önceki deney aşamalarında elde edilen 6 örnek, kaynar su banyosunda 5 dk. bekletilmiş ve 12 000 g'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. uyarılmamış hücreler, uyarılmış hücreler ve Amiloz resin örneklerinin peletlerininin dağılamamasına dikkat edilmiştir. Örneklerin tümünden 20 µl alınarak, %10'luk SDS-PAGE jele yüklenmiştir.

SDS-PAGE için	(%10'luk Yürütme Jeli)	(%5'lik Yükleme Jeli)
H2O	4 ml	2.1 ml
% 30 Akrilamid Mix	3.3 ml	0.5 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.5 ml	-
1 M Tris (pH: 6.8)	-	0.38 ml
% 10 SDS	100 µl	30 µl
% 10 Amonyum persülfat	100 µl	30 µl
TEMED	4 µl	3 µl

SDS-PAGE için Thermo EC120 dikey elektroforez seti kullanılmıştır. Düzenek hazırlandıktan sonra önce %10'luk yürütme jeli hazırlanıp iki cam arasına dökülmüş ve saf bütanol ile dengelenmiştir. Jel donduktan sonra bütanol kurutma kağıdı ile yüzeyden çekilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Kurutma kağıdı ile yüzeyden distile suyun tamamı çekilmiş ve %5'lik yükleme jeli hazırlanıp dökülmüştür. Jel donmadan hemen tarak yerleştirilmiş ve jel dopnduktan sonra tarak çıkartılıp kuyucuklar SDS yürütme tamponuyla yıkanmıştır.

Yüklenecek protein örnekleri bire bir 2x SDS-PAGE yükleme tamponuyla karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra 1 dakika santrifüjlenmiş ve yükleme hazır hale getirilmiştir. Protein marker'i olarak Amersham Biosciences High-Range Rainbow Molecular Weight Markers ve Fermantas Page Ruler unstained Protein Ladder kullanılmıştır (Şekil 2.11).



Şekil 2.10. SDS-PAGE’de kullanılan protein marker’ları (Marker’ların teknik bültenlerinden alınmıştır).

Yükleme işlemi bittikten sonra güç kaynağı 80 volt’a ayarlanmış ve örnekler yüklemeye jelini geçtikten sonra voltaj 120 volt’a yükseltilmiştir. Yürütme işlemi bittikten sonra jel tankın içinden alınıp 1-1.5 saat Brilliant Blue boyama solüsyonuyla yıkanmıştır. Boyama işleminden sonra jel destaninin solüsyonuyla 1-2 kere yıkanıp boya jelden çıkana kadar bu solüsyonda bekletilmiştir. Hazır hale gelen jel digital fotoğraf makinesine ve jel dökümantasyon cihazıyla resmedilmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar:

Yürütme tamponu: 72 g Glycin, 25 ml % 10 SDS, 15.15 g Tris.

TEMED (N’N’N’N’ Tetramethylethylenediamine): Hazır satılmakta.

% 10 Amonyum persülfat (AMP): 1 g AMP distile suyla 10 ml’e tamamlanır.

Fiksatif solüsyon: 50 ml Methanol, 75 ml Glacial acetic acid, 530 ml dH₂O

Boyama solüsyonu: 1.25 g Comassie Brilliant Blue, 500 ml fiksatif solüsyon.

Destainig Tamponu: 50 ml Methanol, 75 ml Glacial acetic acid, 875 ml dH₂O.

2x SDS Örnek yüklemeye Tamponu: 100 mM Tris pH6.8, % 1 β-mercaptoethanol,

% 4 SDS, % 4 Glycerol, % 0.2 Bromophenol blue (Temizkan v2 Arda, 2004).

2.25. RT-PZR Analizleri

Klonladığımız *OoMAPKK1* geninin farklı dokularda aktif olup olmadığını araştırmak için *O. onites* bitkisinin yaprak, gövde ve kökünden alınan materyaller sıvı azot kullanılarak öğütülmüş ve TRizol ile RNA izolasyonları yapılmıştır (Bkn. Bölüm 2.3). *OoMAPKK1* geninin farklı stres şartlarında aktivitesindeki değişimleri gözlemek için ayrı ayrı saksılarda yetiştirilmiş yaklaşık 3 aylık *O. onites* bireylerine farklı zaman dilimlerinde ABA (absesik asit), yaralanma ve soğuk (+4°C) stresleri uygulanmıştır. Stresler yaprak dokusunda izlenmiştir. ABA stresi için 0.5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde 0.1 mM'lık ABA çözeltisi bitki yapraklarına spreylenecek uygulanmıştır. Soğuk stresi için bitkiler 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde +4°C'de tutulmuşlardır (Zhang ve ark. 2006b). Yaralanma stresi için ilk yaralanma stresi uygulandıktan sonra 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saatlerde kesilen yapraklardan RNA izolasyonu yapılarak stres sürerliliği devam ettirilmiştir. RT-PZR reaksiyonları için *OoMAPKK*'e ait UTR bölgelerine tasarlanmış ileri (F1MAPKK1-5'UTR 5'GAGAGGAGAGAGAGAGTA-CCGTTG3') ve geri (R2 MAPKK1-3'UTR 5'CAYTTAAACCGAGAATA-ACATCACTTAC3') primerler ile birlikte, reaksiyonda kullanılacak kalıp miktarının aynı olduğunu göstermek için kontrol olarak Aktin genine ait primerler ileri aktin primeri (P-FACT: ATGGCYGABRCTGABGACATTCARCC) ve geri aktin primeri (P-RACT: GAAGCAYTTYCTGTGRACAATBSMTGGACC) kullanılmıştır. *OoMAPKK1* ve aktin geni için primer oturma ısı 50° °C kullanılmıştır.

İzol edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık değerleri NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçülmüş ve RT reaksiyonunda kullanılacak RNA miktarları hesaplanmıştır. Reaksiyona 2 µg total RNA eklenmiş ve RevertAid First Stand cDNA Synthesis kiti kullanılarak RT reaksiyonları yapılmıştır (Bkz. Bölüm 2.8.1).

RT-PZR Reaksiyonu (25 µl):

Steril deiyonize H ₂ O	11.7 µl
10x PCR Tamponu ((NH ₄) ₂ SO ₄ 'lü)	2.5 µl
MgCl ₂ (2.5 mM)	2µl

dNTP Mix (2.5 mM)	2.5 µl
dG ₂₀ Primer (2.5 µM)	2.5 µl
GO ₅ 'MAPKK1 primer (2.5 µM)	2.5 µl
1/20 cDNA kalıbı	1 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.3 µl
Toplam:	25 µl

Tüm gen için PZR Reaksiyonunun Isı Döngüsü:

94°C	2 dakika		
	94°C	30 sn.	} 25 döngü
	50°C	30 sn.	
	70°C	1.5 dk.	
72°C	7 dk.		
4°C	∞		

Reaksiyonlar % 1.4'lük agaroz jele yüklenip yürütüldükten sonra UviTec UV-Photometer jel dökümantasyon cihazı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

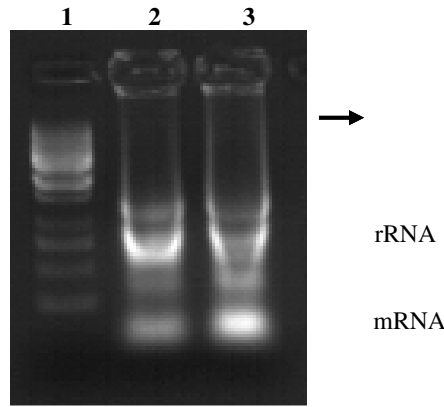
3. BULGULAR

3.1 *Origanum onites* MAPKK Enzim Ailesi Üyelerinin cDNA'sının Kısmi ve Bir Tanesinin Bütünsel Klonlanması

Origanum onites bitkisinden izole edilen toplam RNA'nın yaklaşık %5'ini oluşturan mRNA'lardan RT reaksiyonuyla elde edilen cDNA'lar arasında yarımbozuk primerler kullanılarak, MAPKK enzim ailesi üyelerine ait cDNA'lar kısmi olarak klonlandıktan sonra aralarından seçilen bir tane MAPKK cDNA'sı, 3' ve 5' RACE tekniği ile bütünsel olarak klonlama deneyinin ara bulgularının ışığında adım adım açıklanmıştır.

3.1.1. *Origanum onites* RNA'sının İzolasyonu

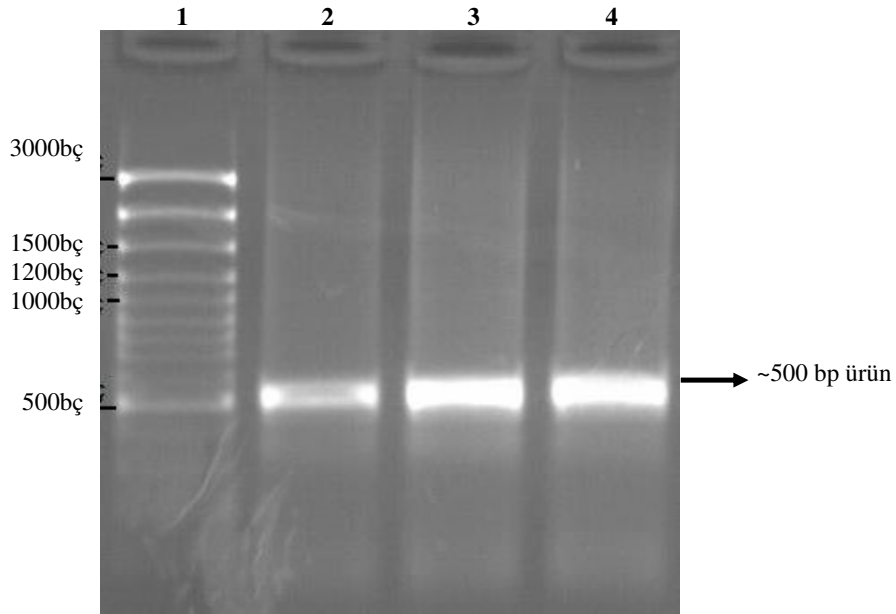
TRIZol (Sigma) solüsyonu ile *Origanum onites* bitki yapraklarından toplam RNA izolasyonu yapılmış (Chomczynski 1995) ve 1.1673 µg/µl konsantrasyonda ve OD_{260/280} : 1.99 saflıkta RNA yüksek kalitede elde edilmiştir. Saflaştırılan RNA örnekleri, elimizde çalışır durumda RNA marker'ı bulunmadığı için 1 kb DNA marker ile birlikte % 0.8'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jel'de RNA'ların DNA içermediği, mRNA ve rRNA ayrımının net olduğu gözlenmiştir (Şekil. 3.1).



Şekil 3.1. *O. onites*'ten toplam RNA izolasyonu. 1) Fermentas 1 kb DNA marker, 2 ve 3) Ögütülmüş aynı örnekten iki ayrı tüpte total RNA izolasyonu yan yana yüklenmiştir. Oklar ile rRNA ve mRNA'ların oluşturduğu bantlar gösterilmiştir

3.1.2. RT-PZR ve Yarıbozuk Primerlerle Olası MAPKK cDNA Orta Bölgelerinin Eldesi

RNA izolasyonundan elde edilen toplam RNA'da (1,1673 µg/µl, OD_{260/280}= 1,99 saflıkta) bulunan mRNA'ların DNA kopyaları (cDNA), RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) kitiyle yaptığımız RT reaksiyonu ile elde edilmiştir. Daha sonra, olası MAPKK cDNA orta bölgesini elde etmek için materyal ve metotta da belirtilen tasarladığımız *HindIII*-F-YbKK (ileri primer 5'ACGAAGCTTATTGGNAARGGAARHGGTGG3') ve *HindIII*-R-YbKK (geri primer 5'ACGAAGCTTGGMGMCATATARTTGTADGTBCC3') ile PZR yapılmıştır. PZR verimliliğini arttırmak için MgCl₂ optimizasyonunun yapılmıştır. MgCl₂'nin 1.5, 2 ve 3 mM'lık final konsantrasyonları PZR'de kullanılmış ve PZR ürünleri % 1.4'lük agaroz jele 100 bp Gene-Ruler plus marker ile yüklenmiştir (Şekil 3.2).



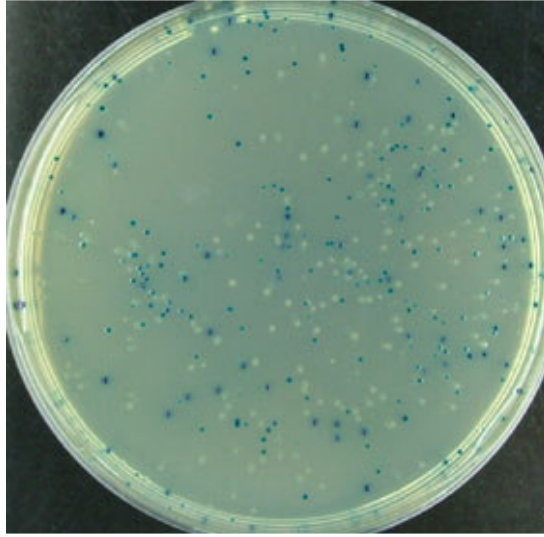
Şekil 3.2. RT PZR sonucu elde edilen ~500 bp büyüklüğündeki ürünün agaroz jeldeki görüntüsü.;
1) Gene Ruler 100 bp plus marker, MgCl₂ optimizasyonu ile ürün verimliliği artırılmıştır; 2) 1.5 mM MgCl₂, 3) 2 mM MgCl₂, 4) 3 mM MgCl₂, %1.4'lük agaroz jel

RT-PZR sonucu beklenen büyüklükte olan ~500 bp'lik ürün elde edilmiştir (Şekil 3.2). Ürün bandı jel'den kesilerek QIAquick Gel Ekstraksiyon kit ile jelden

saflaştırılmış ve spektrofotometrede ölçümleri yapıldıktan sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.1. RT-PZR Ürününün Plazmite Eklenmesi (Ligasyon) ve Plazmitin Konakçı Bakteriye Taşınması (Transformasyon)

Saflaştırılan PZR ürününün spektrofotometre ölçümünde 90 ng/μl konsantrasyona sahip olduğu tespit edilmiş ve iki farklı klonlama kiti pGEM-T Easy vektör sistem ile InsT/Aclone PCR Ürün Klonlama Kiti (pTZ57R/T), kullanılarak ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. 37°C’de bir gece bekletilen reaksiyonlardan ertesi gün plazmite eklenmiş PZR ürünü konakçı hücre XLI-Blue’ a aktarılmıştır (transformasyon) (Şekil 3.3). Her iki kit ile de yapılan reaksiyonlarda başarı sağlanmıştır. pGEM-T Easy kiti küçük hacimde ve kolay kurulabilen reaksiyon sistemine sahip olduğu için InsT/Aclone PCR Ürün Klonlama Kitine göre daha fazla tercih edilmiştir.



Şekil 3.3. ~500 bç’lik ürünü taşıyan pGEM-T easy plazmitinin konakçı *E.coli* XLI-Blue hücrelerine aktarılması. Amfisinlinli-LB agar petrilerindeki mavi (negatif)-beyaz (pozitif) koloni oluşumu

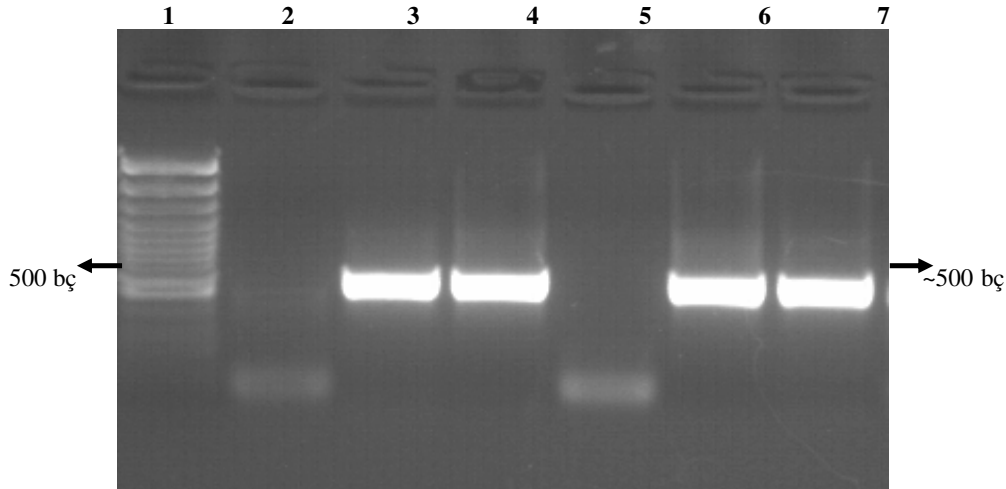
Amfisinlin-LB agar petrisinde transformasyon sonrasında mavi (31 tane)-beyaz (127 tane) koloni oluşumu gözlenmiş ve transformasyon verimliliği

ortalaması yaklaşık % 85 olarak hesaplanmıştır. Pozitif olarak kabul edilen beyaz koloniler yeni amfisilin-LB agar petrilere (master plate) çizgi ekimi tekniğiyle ekilip bir gece 37°C’de inkübe edilerek sonraki aşamalarda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Koloni PZR Yöntemiyle Pozitif Kolonilerdeki RT-PZR Ürün Varlığının Kanıtlanması

Pozitif olduğu bilinen konakçı *E. coli* XLI-Blue hücreleri, koloni PZR yöntemiyle plazmit içindeki ürün varlığının görülmesi için kullanılmıştır. Koloni PZR ürünleri % 1.4’lük agaroz jelle Gene-Ruler 100 bp marker ile yüklenmiştir.

Beyaz renkli koloniler pozitif kabul edilseler de aralarında hedef gen parçasının dışında farklı boyutlarda küçük gen parçalarını alarak beyaz görüntü veren koloniler de bulunma ihtimalinden dolayı koloni PZR yöntemiyle bu koloniler ayıklanmıştır. Koloni PZR yönteminde her petri için en az 12 koloni seçilerek reaksiyona sokulmuştur. Agaroz jel’de ~500 bç beklenen büyüklükteki ürün bandı net olarak bulunmuş ve negatif kolonilerde bu bandın olmadığı görülmüştür (Şekil 3.4).



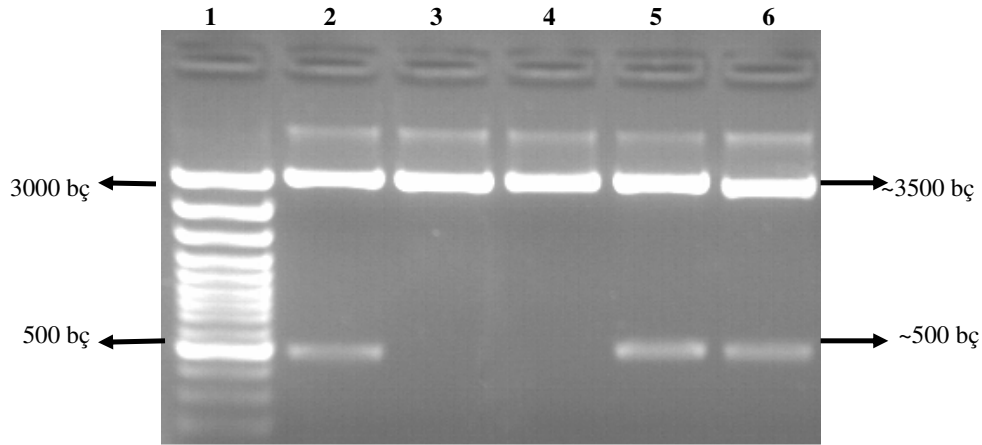
Şekil 3.4. Koloni PZR yöntemiyle plazmit içindeki ~500 bç’lik ürünün gösterilmesi. 1) Gene Ruler 100 bp plus marker, 2 ve 5) ürün içermeyen negatif sonuç, 3, 4, 6 ve 7) ~500 bç’lik ürün içeren pozitif sonuçlar (sırasıyla *Oo-4*, *Oo-14*, *OoMAPKK1* ve *Oo20* klonları)

Mini agaroz jel aparatı kullanılımasından dolayı klonlanan kısmi cDNA ürünleri 6'lı gruplar halinde jele yüklendikleri için hepsi aynı jelde görünmemektedir. Şekillerde kullanılan agaroz jeller ilk yüklenen gruptan seçilmiştir. Diğer grupta 6 koloniden bir tanesi negatif çıkmıştır.

3.1.2.3. Plazmitin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Koloni PRZ yönteminden sonra plazmit içindeki ürün varlığı, pozitif (beyaz renkli) kolonilerden saflaştırılan plazmitlerin spesifik bir restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle de teyit edilmiştir. MAPKK geninin orta bölgesini elde için dizayn edilen primerler uç bölgelerinde *Hind III* enzimi kesim bölgesi içermektedir (Şekil 3.5).

Toplam 12 koloninin koloniden saflaştırılan plazmit DNA *Hind III* enzimi ile kesime uğratılmış ve kesim reaksiyonu %1.4'lük agaroz jelde yürütülerek pozitif olarak beklenen 5 kolonide ~500 bç'lik bandın varlığı gözlenmiştir.



Şekil 3.5. pGEM-Teasy içine klonlanan PZR ürünlerinin *Hind-III* enzimiyle kesilerek kontrolü. 1) Gene Ruler 100 bp plus marker, 2, 5 ve 6) kesilmiş plazmit ve ~500 bç'lik ürün (sırasıyla *Oo-4*, *Oo-14* ve *OoMAPKK1*), 3 ve 4) kesilmemiş plazmit, %1.4'lük agaroz jel

Kesim reaksiyonu sonucu *Oo-4*, *Oo-14*, *Oo-20*, *Oo23* ve *OoMAPKK1* klonlarını taşıyan plazmitlerden ~500 bç'lik PZR ürününün kesilebilmesi, klonlanan ürünlerin ~500 bç olduğunu teyit etmektedir. Ayrıca 500 bç'lik bu ürünlerde içsel *Hind-III* kesim bölgesinin bulunmadığını ortaya çıkmıştır.

3.1.2.4. RT-PZR Ürününün DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi

Toplam 8 adet plazmit Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analizi aletinde dizi analizine tabii tutulmuştur ve kullanılan primer dizileri temizlenmiştir. Nükleotid dizisi belirlenen PCR ürünleri NCBI veri tabanında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda toplam 5 adet ürünün MAPKK olduğu bulunmuştur. Klonlanan gen parçalarına izole edildikleri koloni isimleri verilmiştir (*Oo4-MAPKK*, *Oo14-MAPKK*, *Oo17-MAPKK*, *Oo17-MAPKK*, *Oo20-MAPKK* ve *Oo23-MAPKK*). Aşağıda dizi analizi sonucu elde edilen ham nükleotid dizileri ve dizilerin NCBI veri tabanı sonuçları verilmektedir. Sonuçlar benzerlik oranı en yüksek olan dizi şeklinde verilmiştir. Veri tabanı bilgilerinde gen parçasına en yakın tür, gen adı, benzerlik oranı vb. kriterler bulunmakta ve “**query**” veri tabanında analiz edilen dizi bilgisini temsil ederken, “**sbjct**” benzerlik gösteren diğer bitki türüne ait dizi bilgisini göstermektedir.

A- *Oo4-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi:

```
cgttggtcaactgttcgccataaatgggttggaacgtgtttgcctgaaggttatccagatgactatacaggaggagat
tcggaacaaatagttcaggagcttaaaattaatcaagcatctcaatgtccaatgttggtttgctatcattctatc
acaacggagctatatctattgtttgaatacatggatcgtggatcattgattgatataatcagacaagtcaagacaatcc
atgaaccataccttcgactgtctgcaaacaggttttacagggttttagttacttgcacatgagaacatggtatccatag
agatgtaaagccttctaattctgctagtgaaccacaaaggggaagtaaaaattacagattttggtgtaagtgccatgctg
gcaagctctatggccaacgtgacacatttgggggtataactac
```

B- *Oo4-MAPKK* cDNA NCBI Veri Tabanı Sonucu:

```
gb|AAU04435.1| MAPKK [Lycopersicon esculentum]
Length=354
```

```
Score = 281 bits (720), Expect = 7e-75
Identities = 139/151 (92%), Positives = 146/151 (96%), Gaps = 1/151 (0%)
Frame = +2
```

```
Query 2 VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQASQCPNVVVCYHSFYHNGAIS 181
VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMIQE+IRKQIVQELKINQASQCP+VVVCYHSFYHNGAIS
Sbjct 82 VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMNIIQEDIRKQIVQELKINQASQCPHVVCYHSFYHNGAIS 141

Query 182 IVFEYMDRGS�VDIIRQVKTIHEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHVIHRDVKPSNLLVNH361
+V EYMDRGS�VD+I Q+KTI EPYLAVVCKQVLQGLVYLHHE+HVIHRD+KPSNLLVNH
Sbjct 142 LVLEYMDRGS�VDVIGLQKTIPEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDIKPSNLLVNH201
```

```
Query 362 KGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVG-YNV 451
          KGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVG YNV
Sbjct 202 KGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVGTNY 232
```

Şekil 3.6. *Oo-4 MAPKK* kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotide-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

Oo4-MAPKK cDNA orta bölgesinin nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilmiştir. NCBI veri tabanı, standart kodon sözlüğü kullanarak nükleotid dizisini amino asit bilgisine dönüştürmek ve diğer bitki MAPKK'leri ile karşılaştırarak verinin bir MAPKK'ye ait olduğunu göstermektedir (Şekil 3.6). *Oo4-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilerek kayıt numarası (accession number): EU075083 (Ek-1) alınmıştır.

A- *Oo14-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi:

```
cggtgtcaactgttcgccataatgggttgaacgtgtttgcctgaaggttatccagatgactatacaggaggagat
tcggaacaaatagttcaggagcttaaaattaatcaagcatctcaatgtccaaatgttagttgctatcattcattctatc
acaacggagctatatctattgtttgaatacatggatcgtggatcattagttgatataatcagacaagtcagacaatcc
ttgaaccatacctgcagttgttgcaacaagtttacagggttagttacttgcatcatgagaacatgttatccataga
gatataaagccctctaataatcctgctagttgaaaaccaacaaaaggg
```

B- *Oo14-MAPKK* cDNA NCBI Veri Tabanı Sonucu:

```
gb|AAU04435.1| MAPKK [Lycopersicon esculentum]
Length=354

Score = 223 bits (568), Expect = 3e-57
Identities = 107/118 (90%), Positives = 115/118 (97%), Gaps = 0/118 (0%)
Frame = +2

Query 2 VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQASQCPNVVVCYHSFYHNGAIS181
        VVQLVRHKWVGTLFALKVIQM IQE+IRKQIVQELKINQASQCP+VVVCYHSFYHNGAIS
Sbjct 82 VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMNIEIRKQIVQELKINQASQCPHVVCYHSFYHNGAIS141

Query 182 IVFEYMDRGS�VDIIRQVKTIPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHVIHRDIKPSNILL 355
        +V EYMDRGS�VD+I Q+KTILEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHE+HVIHRDIKPSN+L+
Sbjct 142 LVLEYMDRGS�VDVIGLQKTIPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEHVIHRDIKPSNLLV 199
```

Şekil 3.7. *Oo-14 MAPKK* kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotide-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

Oo14-MAPKK cDNA orta bölgesinin nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilmiştir ve diğer bitki MAPKK'leri ile karşılaştırarak verinin bir MAPKK'ye ait olduğunu gösterilmiştir (Şekil 3.7). *Oo14-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilerek kayıt numarası (accession number): EU075084 (Ek-2) alınmıştır.

A- *Oo20-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi:

```
gtcgtgcggtttgtgcagcataaatggactgcacagttttgcacttaagttattcaaatgaatatcaggagtctgctc
gccagcatattgctcaagagctgaaaattaaccagctcatctcaatgtccatattgctgtgctgctatcaatctttctatga
taatggtgccatttcattatcttgagtatatggagggggggtctcttgagattttctcaagaaagtataaagattccg
gagccttatcttgctgcgattgcaagcaggtactccaaggtctctggtatctcatcatgagaacatatcatccacag
ggacatgaagccttcaatttataataaaccacagggggggaggtggacgtcaagattactgactttggggtagtgca
atactttcagacacatcgggttagccaatactttgttgaacctacaattatatgtctcca
```

B- *Oo20-MAPKK* cDNA NCBI Veri Tabanı Sonucu:

```
emb|AJ000728.2|LEAJ728 Lycopersicon esculentum mRNA for MAP kinase
kinase (MEK1 gene)
Length=1618
Score = 267 bits (577), Expect = 3e-85
Identities = 105/126 (83%), Positives = 118/126 (93%), Gaps = 0/126 (0%)
Frame = +1/+3

Query 1 VVRLQLQHKWTAQFFALKFIQMNIEESARQHIAQELKINQSSQCPYVVICYQSFYDNGAIS180
+VRL+QHKWT QFFALK IQMNI+ES R+HIAQEL+INQSSQCPYVVICYQSF+DNGAIS
Sbjct 423 IVRLVQHKWTGQFFALKVIQMNIDESMRKHIAQELRINQSSQCPYVVICYQSFYDNGAIS602

Query 181 IILEYMEGGSLADFLKVKIKIPEPYLAAICKQVLQGLWYHLHHEKHIIHRDMKPSNLLINH360
+ILEYM+GGSLADFLKVK IPE +LA ICKQVL+GLWYHLHHEKHIIHRD+KPSNLLINH
Sbjct 603 LILEYMDGGSLADFLKVKVTIPERFLAVICKQVLKGLWYHLHHEKHIIHRDLKPSNLLINH782

Query 361 RGEVDV 378
RG+V +
Sbjct 783 RGDVKI 800
```

Şekil 3.8. *Oo-20 MAPKK* kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

Oo20-MAPKK cDNA orta bölgesinin nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilmiştir ve diğer bitki MAPKK'leri ile karşılaştırarak verinin bir MAPKK'ye ait olduğunu gösterilmiştir (Şekil 3.8). *Oo20-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilerek kayıt numarası (accession number): EU075085 (Ek-3) alınmıştır.

A- *Oo23-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi:

```
gtgctgttggtgcagcataaatggactgcaccgtttttgcacttaaggttattccatggatcgcaggagtctgctcgc
aagcatattgctcaagagctgaaaattaccagtcattcaatgtccatcgtcgggatcgtatcaatctttctatgatta
tgggtcaatttcattatcttgaggtatggatgggggtctcttcagattttcaagaaagttataagattcgggag
ctttatctggctgcgattgcaagcaggtactcaaggtctctggtatcttcatcatgagaaacatatcatccacagga
catgaagcctcaaattattaataaaccacagaggtgacgtcaagattactgactttggagttagtgaataactgcga
gcacatcgggttagctaataactttgtggaacctacaattatgtctccaagctt
```

B- *Oo23-MAPKK* cDNA NCBI Veri Tabanı Sonucu:

```
gb|AAU04433.1| MAPKK [Lycopersicon esculentum]
Length=357
```

```
Score = 273 bits (699), Expect = 2e-72
Identities = 133/153 (86%), Positives = 141/153 (92%), Gaps = 0/153 (0%)
Frame = +1
```

```
Query 1 VRLVQHKTAPFFALKVISMDIEESARKHIAQELKIYQSSQCPYVVICYQSFYDYGAISI180
VRLVQHKT FFALKVI M+I+ES RKHIAQEL+I QSSQCPYV ICYQSF+D GAIS+
Sbjct 84 VRLVQHKTGQFFALKVIQMNIDESMRKHIAQELRINQSSQCPYVVICYQSFDDNGAISL143

Query 181 ILEYMDGGSLADFLKKVYKIRELYLAAICKQVLKGLWYLHHEKHIIHRDMKPSNLLINHR360
ILEYMDGGSLADFLKKV I E +LA ICKQVLKGLWYLHHEKHIIHRD+KPSNLLINHR
Sbjct 144 ILEYMDGGSLADFLKKVKTIPERFLAVICKQVLKGLWYLHHEKHIIHRDLKPSNLLINHR203

Query 361 GDVKITDFGVSA LASTSGLANTFVGTNYMSP 459
GDVKITDFGVSA+LASTSGLANTFVGTNYMSP
Sbjct 204 GDVKITDFGVSAV LASTSGLANTFVGTNYMSP 236
```

Şekil 3.9. *Oo23 MAPKK* kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisi B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

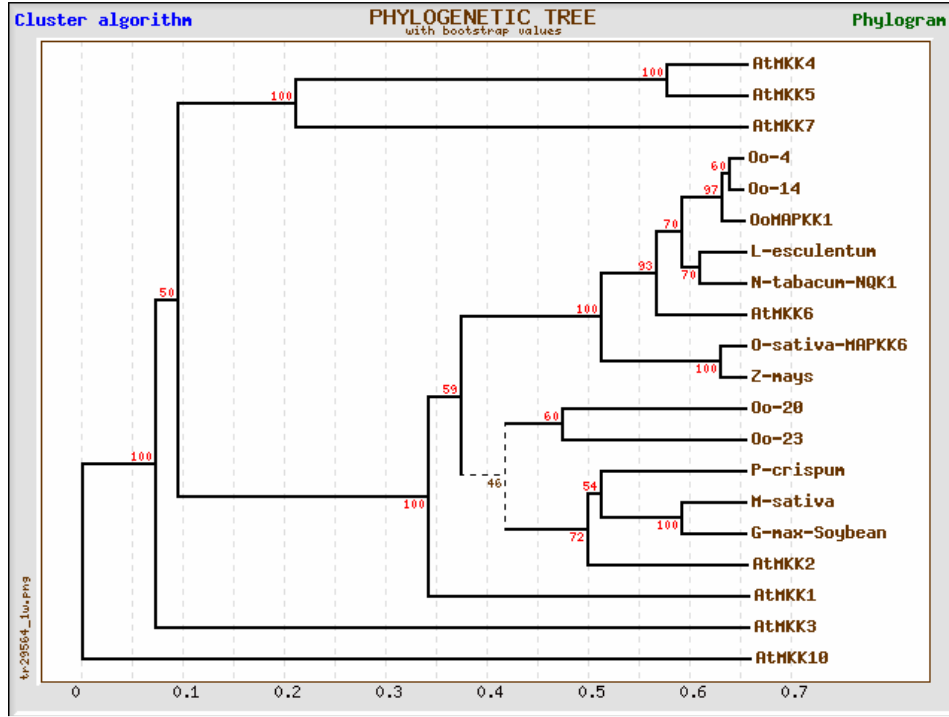
Oo23-MAPKK cDNA orta bölgesinin nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilmiştir ve diğer bitki MAPKK'leri ile karşılaştırarak verinin bir MAPKK'ye ait olduğunu gösterilmiştir (Şekil 3.9). *Oo23-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilerek kayıt numarası (accession number): EU075086 (Ek-4) alınmıştır.

O. onites'ten klonlanan MAPKK cDNA parçaları ile diğer bitki MAPKK'lerinin amino asit dizileri EBI veri tabanında ClustalW programı kullanılarak hizalanmış (Şekil 3.10) ve elde edilen veri http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html adresindeki Phylip yöntemine göre cluster

(gruplama) algoritması ve bootstrap (teyit etme, tekrarlanabilme) kullanılarak kısmi filogenetik ağacı çizilmiştir (Şekil 3.11).

ClustalW Results	
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment	
AtMKK4	TVYKVIHRPSSRLYALKVIYGNHEETVRRQICREIEILRDV-NHPNVVKCHEMFDQ--NG 57
AtMKK5	TVYKVIHTPTSRPFALKVIYGNHEDTVRRQICREIEILRSV-DHPNVVKCHDMFDH--NG 57
AtMKK7	IVYKVHHKTGELYALKSVNGDMSPAFTRQLAREMELRRIT-DSPYVVRCCQGFIEKPIVG 59
Oo-4	VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQAS-QCPNVVVCYHSFY--HNG 57
Oo-14	VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQAS-QCPNVVVCYHSFY--HNG 57
OoMAPKK1	VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQAS-QCPNVVVCYHSFY--HNG 57
L-esculentum	VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEDIRKQIVQELKINQAS-QCPNVVVCYHSFY--HNG 57
N-tabacum-NQK1	VVQLVRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEDIRKQIVQELKINQAS-QCSHVVVCYHSFY--HNG 57
AtMKK6	VVQLVRHKWVGTFFAMKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQASSQCPNVVVCYHSFY--HNG 58
O-sativa-MAPKK6	IVQLVRHKWVGTLYALKGIQMTIQEAVRKQIVQELKINQAT-QNPHIVLCHQSFY--HNG 57
Z-mays	VVQLVRHKWVGTLFALKGIQMTIQESVRKQIVQELKINQAT-QSPHIVMCHQSFY--HNG 57
Oo-20	VVRLVQHKTQFFALKFIQMTIIEESARQHIAQELKINQSS-QCPYVVICYSQSFY--DNG 57
Oo-23	FVRLVQHKTQAPFFALKVISMDIEESARKHIAQELKIYQSS-QCPYVVICYSQSFY--DYG 57
P-crispum	IVRLVQHKTQFFALKVIQMTIQESARKQIAQELKINQSS-QCLNVVVCYQSFY--DNG 57
M-sativa	VVQLVQHKTQFFALKVIQMTIIEESVRKRIAKELKINQAA-QCPYVVICYSQSFY--DNG 57
G-max-Soybean	VVQLVQHKTQFFALKVIQMTIIEESMRKQITQELKINQAA-QCPYVVICYSQSFY--ENG 57
AtMKK2	VVQLVQHKTQFFALKVIQNLNIDEAIRKAIQAQELKINQSS-QCPNLVTSYQSFY--DNG 57
AtMKK1	NVQLVKHKLTKQFFALKVIQNLNTEESTCRAISQELRINLSS-QCPYLVSCYSQSFY--HNG 57
AtMKK3	VVQRAIHIPNHRILALKKINIFEREKRQQLLTERITLCEAPCHEGLVDFHGAFYSPDSG 59
AtMKK10	TVYKTRHRRTKTLYALKVLRPNLNTT----VTVEADILKRI-ESSFIKCYAVFVS--LY 53
AtMKK4	EIQVLEFMDKGSLEGAH---VWKEQQDLADLSRQILSGLAYLH-SRHIVHRDIKPSN 110
AtMKK5	EIQVLEFMDQGSLEGAH---IWQEQLADLSRQILSGLAYLH-RRHIVHRDIKPSN 110
AtMKK7	EVSILMEYMDGGNLES LG---AVTEKQLAGFSRQILKGLSYLH-SLKIVHRDIKPSN 113
Oo-4	AISIVFEYMDRGS LVDIIRQVKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHHVIHRDIKPSN 115
Oo-14	AISIVFEYMDRGS LVDIIRQVKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHHVIHRDIKPSN 115
OoMAPKK1	AISIVFEYMDRGS LVDIIRQVKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHHVIHRDIKPSN 115
L-esculentum	AISLVLEYMDRGS LVDVIGLKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHHEKHHVIHRDIKPSN 115
N-tabacum-NQK1	AISLVLEYMDRGS LADVIRQVKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHNERHVIHRDIKPSN 115
AtMKK6	AFSLVLEYMDRGS LADVIRQVKTILEPEYLAVVCKQVLQGLVYLHNERHVIHRDIKPSN 116
O-sativa-MAPKK6	VIIYLVLEYMDRGS LADIIKQVKTILEPEYLAVLCKQVLEGLLYLHHEKHHVIHRDIKPSN 115
Z-mays	VIIYLVLEYMDRGS LADIVKQVKTILEPEYLAVLCKQVLEGLLYLHHRHVIHRDIKPSN 115
Oo-20	AISIILEYMEGGLLQIFSRKFIREFSLLLLRFCKQVLQGLVYLHHEKHHIHRDMKPSN 115
Oo-23	AISIILEYMDGGS LADFLKVKYKIRELYLAAICKQVLKGLVYLHHEKHHIHRDMKPSN 115
P-crispum	AISIILEYMDGGS LADFLKIVKNIEPEYLAAIFKQVLKGLVYLHHEKHHIHRDLKPSN 115
M-sativa	VISIILEYMDGGS LADLLKVKTIPEPYLSAICKQVLKGLVYLHHEKHHIHRDLKPSN 115
G-max-Soybean	VISIILEYMDGGS LADLLKVKTIPEPYLSAICKQVLKGLVYLHHEKHHIHRDLKPSN 115
AtMKK2	AISLILEYMDGGS LADFLKSVKAPDSYLSAIFRQVLQGLVYLHHRHVIHRDLKPSN 115
AtMKK1	LVSIILEYMDGGS LADLLKVKVPEENMLSAICKRVLKGLVYLHHEKHHIHRDLKPSN 115
AtMKK3	QISIALEYMNGGS LADILKVIKTIPEPYLSSLFHKLQGLSYLHGVRHLVHRDIKPSN 117
AtMKK10	DLCFVMELEMEKGS LHDALLAQQVSEPMVSSLANRILQGLRYLQ-KMGIVHGDIKPSN 110

Şekil 3.10. *O. onites*'ten klonlanan MAPKK cDNA parçaları (*Oo-4*, *Oo-14*, *OoMAPKK1*, *Oo-20*, *Oo-23*) ile diğer bitki MAPKK'larının amino asit dizilerinin EBI veri tabanında ClustalW programı ile hizalanması (Gen bankası kayıt no: Q66MH7: *L.esculentum* MAPKK, Q9AYN9: *N.tabacum* *NQK1* MAPKK, A5C0U3: *V.vinifera* MAPKK, Q0Z7Z4: *O.sativa* MAPKK, 049975: *Z.mays* *ZmMEK1* MAPKK, Q5JCL0: *G.max* (soybean) MAPKK, Q93WR7: *M.sativa* MAPKK, Q6QMT5: *P.crispum*, *A. thaliana*: *AtMKK1*: NM_118740, *AtMKK2*: NM_119127, *AtMKK3*: DQ497565, *AtMKK4*: NM_104044, *AtMKK5*: NM_113017, *AtMKK6*: NM_125041, *AtMKK7*: NM_101693, *AtMKK10*: DQ446313)



Şekil 3.11. *O. onites*'ten klonlanan MAPKK cDNA parçaları ile diğer bitki MAPKK'larının amino asit dizileri kullanılarak Pyhlip yöntemine göre oluşturulan kısmi filogenetik ağaç. Ağacın dallanma köklerinde (nod) kırmızı rakamlarla yazılmış değerler, 100 örnekleme göre yapılmış ve yüzdelerik değer olarak ifade edilmiş bootstrap - tekrarlanma- değerleridir

Veri tabanı sonuçlarına göre *O. onites*'e ait *OoMAPKK1*, *Oo4*, *Oo14* MAPKK dizi bilgisinin daha çok *N. tabacum* ve *L. esculentum*'un MAPKK dizi bilgisi ile *A. thaliana*'nın soğuk ve tuz stresinde görevli *AtMAPKK6*'ya benzerlik gösterdiği görülmüştür. *Oo20* ve *Oo23* MAPKK dizi bilgisinin *P. crispum*, *M. sativa* ve *G. max*'a daha yakın olduğu ve bu grubun yine soğuk ve tuz stresinde görevli *AtMAPKK2*'ye benzedikleri anlaşılmaktadır. *Z. mays* ve *O. sativa* MAPKK6'nın yine *AtMAPKK6*'ya yakınlığının fonksiyonel benzerlikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diğer *A. thaliana* MAPKK'leri, henüz tüm bitkilerde klonlanmamış ve fonksiyonları tam açıklanamamış putatif MAPKK'ler oldukları için diğer bitki MAPKK'lerinden ayrı grup oluşturmuşlardır.

Oo17-MAPKK cDNA orta bölge nükleotid dizisi:

ggccagtgaatacagactcggctacctcgacgaatgctctagattacgaagacttattgtaagggaatggtggcgt
tgttcaactgttcgccataaatgggttgaacgtgtttgccttgaaggttatccagatgactatacaggaggagattcg

gaaacaaatagttcaggagacttaaattaatcaagcatctcaatgttccaaatggttagttgctatcattcattctatcac
aacgggagactatatctattgtttgaatacatggatcgtggatcattagttgatataatcagacaagtcaagacaatcctt
gaaaccataccttcagttgntgcaaacaggttaacaggggttagtttactgcatcatgagaaacatggtatccata
gagatgtaaagcccttctaactgctagtgaacacaaaggggaagtaaaaattacagattttggtgtagtgccgtggct
ggccaagactcctatggggccaacgtgaacaattggtgggaccaacaataattgggccaagctc**cgtaatccga**
tccccggg

Şekil 3.12. *Oo-17 MAPKK* kısmi cDNA'sının DNA dizi analizi ham verisi. Plazmite ait bölgeler (kırmızı ile işaretlenmiş), NCBI plazmit temizleme programı kullanılarak ve primer oturma bölgeleri manual olarak bulunarak tespit edilmiş ve diziden çıkartılmıştır

Okuma kalitesinin diğerlerinden daha iyi olması nedeniyle *Oo17 MAPKK* cDNA'sı sonraki aşamalarda çalışmalarımızın devamı için seçilmiştir. Kırmızı renkli bölgeler yarbozuk primerlerin oturma bölgelerinin dışında olup plazmite ait olduklarından dolayı temizlenmiştir (Şekil 3.12). Temizleme işleminden sonra yarbozuk primerlerin oturma bölgeleri dizi bilgisi üzerinde gösterilmiş ve *Oo17-MAPKK* dizisi üzerinde 3' ve 5'RACE primerler tasarlanmıştır. Dizi üzerinde Altı çizili bölgeler yarbozuk primerler, koyu olanlar ise sonraki aşama için tasarlanan ve genin 3' ve 5' ucunu elde etmek için kullanılacak 3'-5' RACE primerleri'dir (Şekil 3.13).

A- (Yarbozuk forward primer) ↓

acgaagacttattgtaagggaatggtggcgttgtcaactgttcgcataaatgggttgaacgttgttgccttg
aaggttatccagatgactatacaggaggagattcgaaacaaatagttcaggagacttaaattaatcaagcatctcaat
gttccaaatggttagttgctatcattcattctatcacaacgggagactatatctattgtttgaatacatggatcgtggatc
attagttgatataatcagacaagtcaagacaatccttgaaaaccataccttcagttgntgcaaacaggttaacagggg
tttagtttactgcatcatgagaaacatggtatccatagagatgtaaagcccttctaactgctagtgaacacaaagggga
agt**aaaaattacagattttggtg**tagtgccgtggctggccaagactcctatggggccaacgtgaacaattggttg
ggaccaacaataattgggccaagctc ← (Yarbozuk reverse primer)

B-

cgccataaatgggttgaacgttg (5'RACE geri primeri)

aaaaattacagattttggtg (3'RACE ileri primeri)

C- *Oo17-MAPKK* cDNA NCBI Veri Tabanı Sonucu:

gb|AAU04435.1| MAPKK [*Lycopersicon esculentum*]
Length=354

Score = 287 bits (734), Expect = 2e-76
Identities = 140/150 (93%), Positives = 146/150 (97%), Gaps = 0/150 (0%)
Frame = +1

Query 1 VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQETKINQASQCPNVVVCYHSFYHNGAIS180
VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMQ IQE+IRKQIVQE KINQASQCP+VVVCYHSFYHNGAIS
Sbjct 82 VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMNIEQDIRKQIVQELKINQASQCPHVVVCYHSFYHNGAIS141

Query 181 IVFEYMDRGS�VDIIRQVKTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNH360
+V EYMDRGS�VD+I Q+KTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRD+KPSNLLVNH
Sbjct 142 LVLEYMDRGS�VDVIGQLKTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDIKPSNLLVNH201

Query 361 KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN 450
KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN
Sbjct 202 KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN 231

dbj|BAB32405.1| NQK1 MAPKK [*Nicotiana tabacum*]
Length=354

Score = 284 bits (727), Expect = 1e-75
Identities = 139/150 (92%), Positives = 146/150 (97%), Gaps = 0/150 (0%)
Frame = +1

Query 1 VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQETKINQASQCPNVVVCYHSFYHNGAIS180
VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMTIQE+IRKQIVQE KINQASQC +VVVCYHSFYHNGAIS
Sbjct 82 VVQLVRHKWVGTFLFALKVIQMTIQEDIRKQIVQELKINQASQCSHVVVCYHSFYHNGAIS141

Query 181 IVFEYMDRGS�VDIIRQVKTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNH360
+V EYMDRGSŁ D+IRQ+KTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLH+ERHVIHRD+KPSNLLVNH
Sbjct 142 LVLEYMDRGSŁADVIRQLKTIŁEPYLAVVCKQVLQGLVYLHNERHVIHRDIKPSNLLVNH201

Query 361 KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN 450
KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN
Sbjct 202 KGEVKITDFGVSAŁASSMGQRDTFVGTYN 231

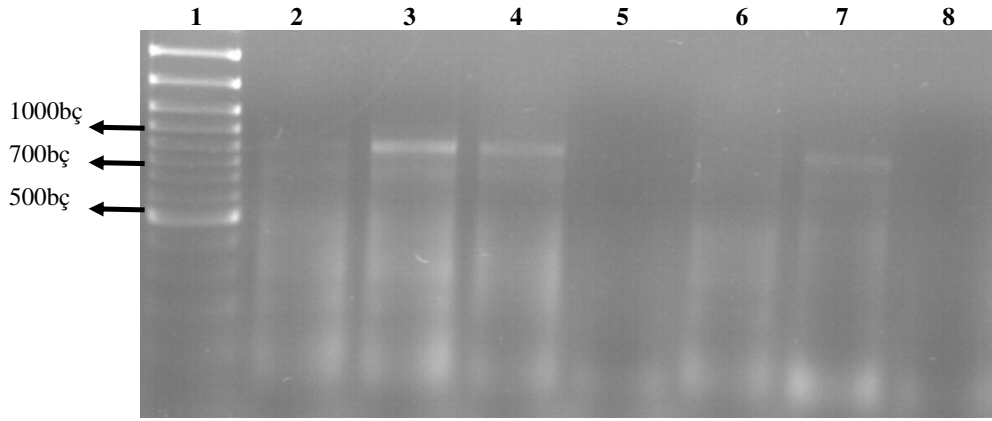
Şekil 3.13. *Oo-17 MAPKK* kısmi cDNA bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisinin plazmitten temizlenmiş hali B- Dizi bilgisi üzerindeki RACE primerleri, C- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

3.1.3. cDNA'lardan Birinin (*Oo-17-MAPKK*) Uç Bölgelerinin Klonlanması

3.1.3.1. 3' Ucunun Elde Edilmesi İçin PZR (3'RACE-PZR)

Çalışmamızda 3'RACE için tasarlanan primer (FOo3'MAPKK1 aaaaattacagattttggtg)ile Oligo dT primeri, RT reaksiyonuyla oluşturulmuş cDNA popülasyonundan *Oo17-MAPKK* cDNA'sının 3' ucunu elde etmek için kullanılmıştır. Bu primerlerle yapılan PZR reaksiyonları için primer oturma ısısı

ve kalıp (template) optimizasyonu yapılmıştır. Isı optimizasyonunda 44.9, 48.6, 51.7 ve 55.3°C'lik ısı değerleri kullanılmıştır. Bu farklı ısı koşulları için 1/10, 1/50 ve 1/100 kat dilüe edilmiş kalıp DNA kullanılmıştır. Kurulan toplam 12 .reaksiyondan 1/10'luk kalıp ile 48.6°C'lik ısı koşulunda PZR ürünü en iyi bandı vermiş olduğu bulunmuştur (Şekil 3.14).

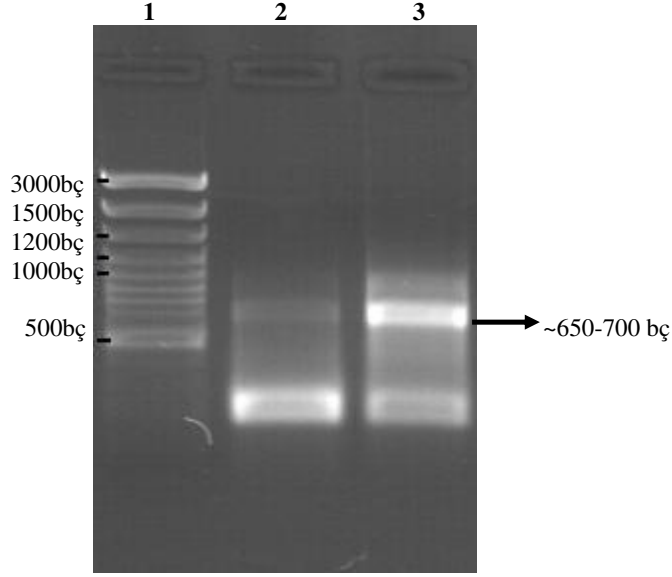


Şekil 3.14. 3' RACE reaksiyonunun PZR adımı için yapılan ısı ve kalıp optimizasyonu, **1)** Gene Ruler 100 bp plus marker, **2)** 1/10 dilüsyon-44.9 °C, **3)** 1/10 dilüsyon-48.6 °C (~750 bç'lik ürün en iyi sonuç olarak görülmektedir), **4)** 1/10 dilüsyon-51.7 °C, **5)** 1/10 dilüsyon-55.3 °C, **6)** 1/50 dilüsyon-44.9 °C, **7)** 1/50 dilüsyon-48.6 °C, **8)** 1/50 dilüsyon-51.7 °C, %1.4'lük agaroz jel

Yarıbozuk primer tasarımı sırasında nükleotid dizisi bilinen bitki MAPKK'lerinin biyoinformatik olarak ClustalW programı kullanılarak hizalanmasıyla elde edilen tabloda 3' RACE primerinin oturma bölgesinin yaklaşık yeri tespit edilerek, 3'RACE PZR'den 600-800 bç arasında bir ürün beklenmesi gerektiği ortaya çıkmış ve reaksiyon sonunda ürün boyutunun yaklaşık 650-700 bç civarında olduğu gözlenmiştir. 1/50'lik kalıbın 48.6°C'lik ısıda gerçekleşen reaksiyonundan sonraki dilüsyon ve ısı skalasından net bir bant gözlenmemiştir.

Jelin banttın kesilip saflaştırılabilmesi için; 1/10'luk dilüsyon ve 48.6°C'lik primer oturma sıcaklığında gerçekleşen reaksiyon kalıp olarak kullanılarak yeniden PZR reaksiyonu (3' RACE-RePZR) kurulmuş ve daha kalın net bir ürün bandı elde edilmiştir. Optimizasyon öncesi ilk reaksiyon ile

optimizasyon sonrası Re-PZR ürünü arasındaki farkı gözleyebilmek için % 1.4'lük agaroz jelle 100 bp marker ile birlikte yan yana yüklenmiştir (Şekil 3.15).

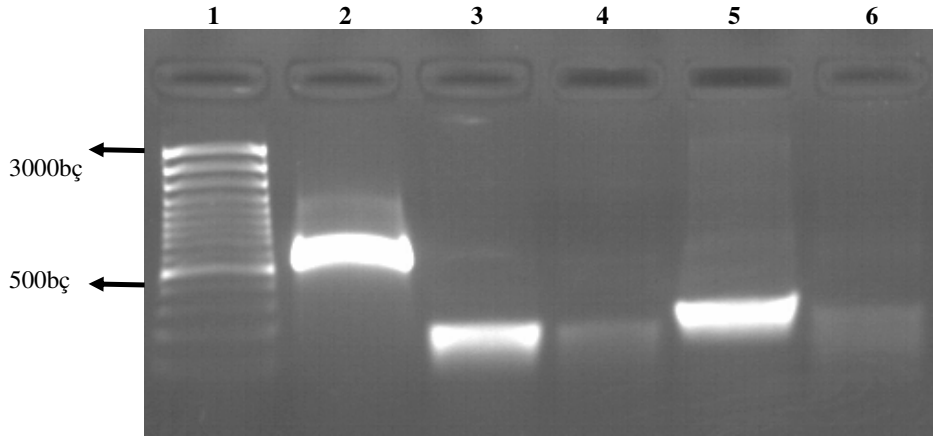


Şekil 3.15. *Oo17-MAPKK'nın* 3'RACE PZR ürünü, 1) Gene Ruler 100 bp plus marker, 2) Optimizasyon öncesi ürün, 3) Optimizasyon sonra verimi artırılmış ~650-700 bç'lik ürün ok ile gösterilmiştir, %1.4'lük agaroz jel

3.1.3.2. 3' RACE Koloni PZR

Optimizasyon sonucu elde edilen ürün bandı jelden kesilerek QIAquick Gel Extraction kit ile saflaştırılmıştır. PZR ürünü ligasyon ile plazmite (pGEM-T Easy ve PTZ57R/T) eklenmiş ve transformasyon ile konakçı bakteriye (*E. coli* XLI-Blue) aktarılmıştır.

Transformasyon sonunda petride 40 adet mavi 5 adet beyaz koloni gözlenmiş ve pozitif olarak kabul edilen beyaz koloniler seçilerek yeni petriye ekim yapılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra yeni petriden örnekler alınarak koloni PZR yöntemiyle plazmit içinde 3'RACE ürününün var olup olmadığına bakılmıştır. Koloni PZR ürünleri agaroz jelle yüklendiğinde 5 koloniden 1 tanesinin beklenen büyüklükte (~650-700 bç) ürün içerdiği gözlenmiştir (Şekil 3.16)



Şekil 3.16. PZR yöntemiyle plazmit içindeki 3'RACE ürünü gösterilmesi. **1)** Gene Ruler 100 bp plus marker, **2)** ~650-700 bç'lik ürünün görüldüğü pozitif sonuç, **3, 4, 5 ve 6)** beklenen ürünün görülmediği negatif sonuçlar, % 1.4'lük agaroz jel

3.1.3.3. 3' RACE Ürününün DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi

3'RACE PZR ürünü içerdiği belirlenen koloniden plazmit izolasyon kiti ile izole edilen plazmit, Beckman Coulter CEQ8000 cihazı ile DNA dizi analizine tabi tutulmuşlardır. Dizi analizi sonunda elde edilen DNA nükleotid dizisi, NCBI gen bankası veri tabanına girilerek MAPKK enzim ailesine ait bir gen parçası olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.18) Aynı plazmite 3 kere daha (F-M13-47 ve R-M13-47 primerleri ile) dizi analizi yapılmış ve dizi bilgileri karşılaştırılarak okuma hatası olasılığı ortadan kaldırılmıştır.

A- *Oo17-MAPKK* cDNA'sının 3' Ucu Dizi Bilgisi:

Dizi analizi ham veri:

cattacgaccagactattaagtgacactatagcaatactgcaagactatgcatccaacgcgttgggagctctcccatat
ggtcgacctgcaggcggccgcgaaattcactagtattgcaagcttaaaaattacagattttgggttagtgccatg
ctggcaagctctatggccaaacgtgacacatttgggacttacaattacatggcgactgaaaaggatcagtgggga
gcacctatgactataaaagtgatattgggagctctggcatggtgattcttgaatgtgctattggacgttttccttatac
aaatctgaagaccaacaaagtggccccagctttacgagcttctgcaggcaattgttgaagtccaccaccttctgctccg
ccagatcaattttctcagaattctgttcttctctgcatgcgtacagaaagatcctagagacagatcttcggccttgg
aactactgagccatcctcatcaagaaattgaagagaagacattgatctcagcatatgggtggnagcttggatcacct
gtgaatatccagataaatcacctctctnactcttactatgcatgtatgttggttgtaagatacatcttaaaatntaatttt

gtaggtgatgtattctcggtaaagaaatgtagctctaattatgagcaataganttaaccgattcgaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaataggaatgattccggcgggcangggcgggacatcacggccaattggccatagagtatcaatact
gcgtgttaacgtcgacg

Şekil 3.17. *Oo-17 MAPKK* kısmi cDNA'sının 3' ucu DNA dizi analizi ham verisi. Plazmite ait bölgeler (kırmızı ile işaretlenmiş), NCBI plazmit temizleme programı kullanılarak ve primer oturma bölgeleri manual olarak bulunarak tespit edilmiş ve diziden çıkartılmıştır. Koyu renkli bölgeler 3'RACE primer oturma bölgesi ve poliA kuyruğunun bulunduğu bölgedir

Yukarıdaki dizi analizinden çıkan ham veri üzerinde bulunan plazmit parçaları (kırmızı işaretli bölgeler), NCBI veri tabanında yer alan plazmit temizleme programı (VecScreen) ve primer oturma bölgelerinin Gen Tool programı ile tespit edilmiştir (Şekil 3.17). Ayrıca 19 tane A nükleotit'ten oluşan poli-A kuyruğunun bulunması bu işlemi kolaylaştırmıştır. Bu bölgeler temizlenerek gerçek ürün bilgisine ulaşılmıştır.

A- İşlenmiş Gen Dizisi:

aaaaattacagatgttggtgtagtgcctatgctggcaagctctatggccaacgtgacacattgtgggacttacaatta
catggcgctgaaaggatcagtgggagcacctatgactataaaagtatattgggagctctgggcatggtgattcttga
atgtgctattggacgttttcttatacctaatctgaagaccaaaaagtggccccagctttacgagcttctgcaggcaat
tgttgaagtccaccacttctgctccgcatcaattttctcagaattctgttctttgtctctgcagcgtacagaag
atcctagagacagatcttggccttgaactactgagccatcttcatcaagaatttgaagagaaagacattgatctc
agcatatattgggtagccttggatcacctgtgaatatccataaatcactcttctactcttctactatgttcatgtatgt
ttgtttgtaagataaccatctttaaatttaattttgtaagtatgtattctcggtttaaggaatgtagctctcattatgagcc
atagaattaaccgaatccg---poliA (19 tane a nükleotid)

B- NCBI Veri Tabanı Sonucu:

gi|51471930|gb|AAU04435.1| MAPKK [*Lycopersicon esculentum*]
Length=354

Score = 236 bits (603), Expect = 4e-61

Identities = 131/148 (88%), Positives = 137/148 (92%), Gaps = 0/148 (0%)

Frame = +2

Query 2 KITDFGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNMAPERISGSTYDYKSDIGSLGMVILECAIGRFP181
KITDFGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNMAPERISGSTYDYKSDI SLGMVILECAIGRFP

Sbjct 206 KITDFGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNMAPERISGSTYDYKSDIWSLGMVILECAIGRFP265

```

Query 182 YTKSEDDQSGPSFYELLQAIVGspppsappdqfspEFCSFVSACVQKDPRDRSSALELLS361
          Y +SEDQQ+ PSFYELL AIV SPPPSAP DQFSPEFCSFVSAC+QKDPRDRSSAL+LLS
Sbjct 266 YIQSEDDQARPSFYELLDAIVSSPPPSAPVDQFSPEFCSFVSACIQKDPRDRSSALDLLS325

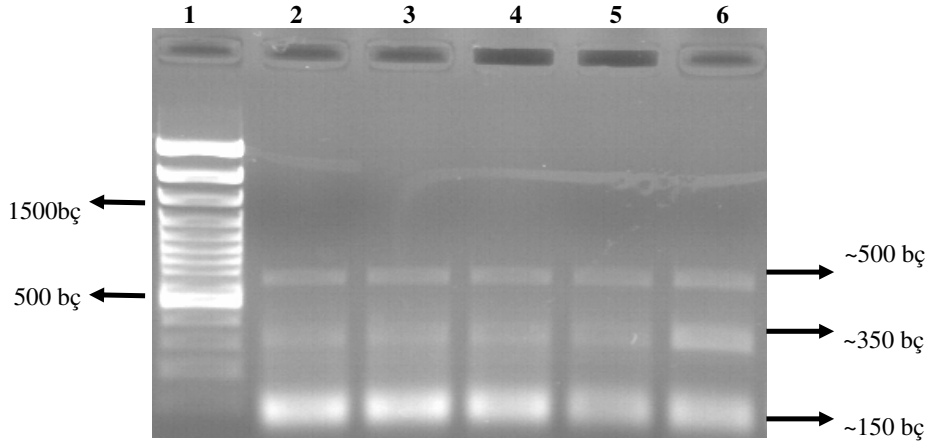
Query 362 HPFIKKFEEKDIDLSIYVGSGLGSPVNIP 445
          HPF+KKFE+KDIDLSI V SL PVN P
Sbjct 326 HPFVKKFEDKDIDLSILVSSLEPPVNF 353

```

Şekil 3.18. *Oo-17 MAPKK* cDNA'sının 3' ucu bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisinin plazmitten temizlenmiş hali B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

3.1.3.4. 5' Ucunun Elde Edilmesi İçin PZR (5'RACE-PZR)

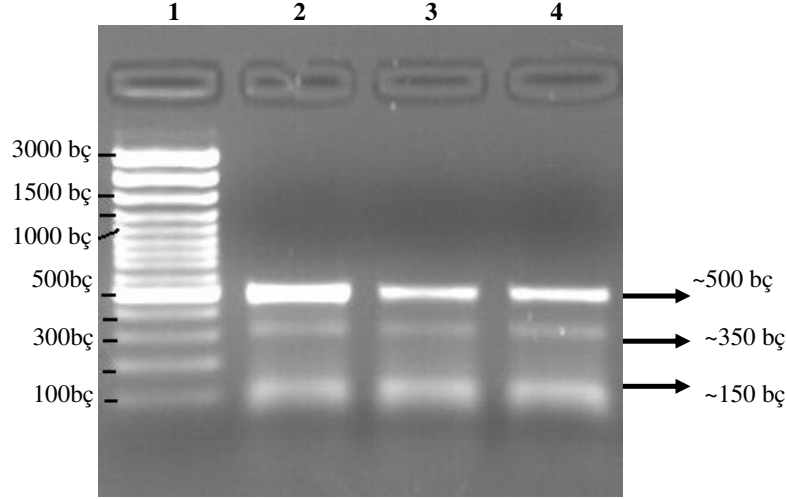
Çalışmamızda RT reaksiyonu ile elde edilen cDNA'ların 5' ucuna Terminal transferaz enzimiyle Oligo C kuyruğu eklenmiştir. 5'RACE için tasarlanan primer (*GOo5'MAPKK1 5'cgccataaatgggttggaacgttg3'*) ile Oligo dG primeri C-kuyruğu eklenen cDNA popülasyonundan *Oo17-MAPKK* geninin 5' ucunun elde etmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.19. 5' RACE PZR primer oturma ısısı optimizasyonu sonucu oluşan ürünlerin % 1.4'lük agaroz jelde görüntüsü. 1) Gene Ruler 100 bp plus marker, 2) 58°C, 3) 60.1°C, 4) 61.9°C, 5) 64.4°C, 6) 68°C'de oklar ile gösterilen ~500, 350 ve 100 bç'lik ürünlerden en iyi verim alınmıştır

Primer oturma ısısı için 58, 60.1, 61.9, 64.4, 68°C kullanılmış ve 68°C'de bant oluşumunun en iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.19). PZR reaksiyonu sonucu elde edilen ~500, 350 ve 100 bç'lik ürünlerden, primer tasarımında kullanılan

hizalama bilgisine bağılı olarak beklenen ürün aralığı tahminen 300-500 bç aralığındadır.



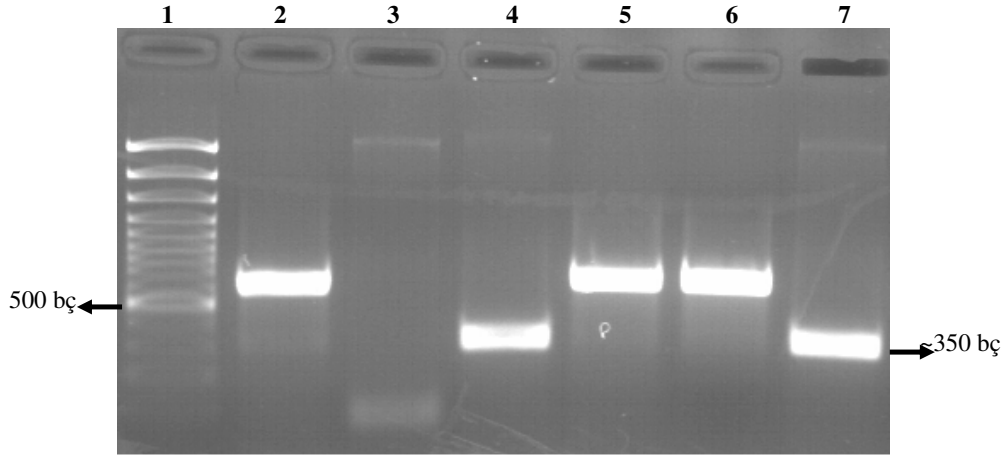
Şekil 3.20. Optimizasyon sonrası 5' RACE Re-PZR sonucu. 1) Gene Ruler 100 bp plus marker, 2, 3 ve 4) 68°C'de oklar ile gösterilen 500, 350 ve 100 bç'lik ürünler % 1.4'lük jelden kesilerek saflaştırılmıştır (yüklenen 3 reaksiyon aynı koşullardaki farklı tüplerdir)

Aynı döngü koşullarında 68°C'lik reaksiyon ürünü kalıp olarak kullanılmış ve 5' RACE Re-PZR ile daha belirgin bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.20) ve ~500 ve ~350 bç büyüklüğündeki 2 bantlın herhangi birinin *Oo17*-MAPKK cDNA'sına ait olma ihtimalinden dolayı her biri jelden kesilerek saflaştırılmış ve pGEM-Teasy plazmitine ligasyon reaksiyonuyla eklenerek *E. coli* XLI-Blue konakçı hücrelerine transforme edilmiştir.

3.1.3.5. 5' RACE Koloni PZR

Transformasyon petrisinde ~500 bç'lik ürün için ~100 mavi ve ~900 beyaz koloni oluşumu gözlenmiş ve pozitif olarak kabul edilen beyaz kolonilerden 26 tanesi X-gal içeren yeni amfisilinli-LB petrisine ekilerek bunların arasından 12 tanesi koloni PZR reaksiyonuna sokulmuştur. 12 tane koloninin tamamı ~500 bç'lik ürünü içerdiği gözlenmiş ve örneklerle dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonucu örneklerin MAPKK olmadıkları saptanmıştır. ~350 bç'lik ürün için kullanılan transformasyon petrisinde ~90 adet mavi ve ~950 adet beyaz koloni

gözlenmiş ve bunlardan 26 tanesi seçilerek daha önceki gibi yeni petrilere ekimleri yapılmıştır. Bu kolonilerden 13 tanesine koloni PZR yöntemi uygulanmış ve 12 tanesinde beklenen ürün gözlenmiştir. ~500 ve ~350 bç'lik koloni PZR ürünleri birlikte fotoğraflanmak üzere aynı jele yüklenmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Koloni PZR ile 5'RACE kolonilerin taranması (%1.4'lük agaroz jel) **1)** Gene Ruler 100 bp plus marker, **2, 5 ve 6)** ~500 bç'lik ürünü içeren pozitif sonuçlar, **3)** ürün içermeyen negatif sonuç, **4 ve 7)** ok ile gösterilmiş ~350 bç'lik ürünü içeren pozitif sonuçlar

3.1.3.6. 5' RACE Ürününün DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi

Yaklaşık 500 bç ~350 bç ve ~150 bç'lik 5'RACE PZR ürünlerini içerdiği belirlenen kolonilerden plazmit izolasyon kiti ile izole edilen plazmitler Beckman Coulter CEQ8000 cihazı ile DNA dizi analizine tabi tutulmuşlardır. Dizi analizi sonunda elde edilen DNA nükleotid dizileri (Şekil 3.22), NCBI gen bankası veri tabanına girilmiş ve bu PZR ürünlerinden 350 bç'lik gen parçası'nın MAPKK enzim ailesine ait bir gen parçası olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.23).

Oo17 MAPKK cDNA'sının 5' Ucu Dizi Bilgisi:

Dizi analizi ham veri:

```
ataccagcataagtgacctatacactcagcatgctacacgctaggactctcccatatggtcgactgcagcgccg  
caactactagtattgcaagcttcgactttgatggtctcaaggtttccaacgagaattgaaggtcaagctccttcac  
tctgatggcggggttcatttcatcagaaatcaaccgaagcccctctgattcagcagcaaatgccgctgtaag
```



```

Query 415 KV 420
      KV
Sbjct 73 KV 74

```

Şekil 3.23. *Oo-17 MAPKK* cDNA'sının 5' ucu bilgisi ve blast analizi. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizi bilgisinin plazmitten temizlenmiş ve ters çevrilmiş hali B- Bu dizi bilgisinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programı kullanılarak tanımlanması

3.1.4. *Oo-17-MAPKK* cDNA'sının 3' ve 5' Uçlarının Orta Bölge ile Örtüştürülmesi

RACE reaksiyonlarıyla elde edilen *Oo17 MAPKK* cDNA'sının 3' ve 5' uçlarına ait diziler orta bölge dizisi ile Gene Tool lite 1.0 programı yardımıyla örtüştürülmüştür. Bu işlemin yapılması, tüm genin elde edilmesi için gerekli primerlerin güvenli bir şekilde tasarımı için gerekmektedir. Orta bölge ile uç bölgelerin hizalanmasıyla örtüşen bölgeler bize elde edilen 5' ve 3' uç parçalarının *Oo17 MAPKK* cDNA orta bölgesine ait olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tüm gene ait dizi bilgisi de ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.24).

```

Consensus TCGGACGTACCCATTATGGCAACTCAGACAAAGCCACCGGCCATTTCATTGGACT 57
5' ucu TCGGACGTACCCATTATGGCAACTCAGACAAAGCCACCGGCCATTTCATTGGACT 57
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

Consensus TTTGGAGTTATATTAGAGAGAGAGAGAGAGTACCGTTGGAGTGAGGCGGCCATTTC 114
5' ucu TTTGGAGTTATATTAGAGAGAGAGAGAGAGTACCGTTGGAGTGAGGCGGCCATTTC 114
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

Consensus ATTTGAATTTTCTCTTCAAACCTCTCTTATTCTCTCGCCTGCTACTGAACCCTAGG 171
5' ucu ATTTGAATTTTCTCTTCAAACCTCTCTTATTCTCTCGCCTGCTACTGAACCCTAGG 171
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

Consensus CAGAATTTCTGCTGCTCAATCAAATCATGAAGTTGAAGAAACCTCTCAAGGAACTC 228
5' ucu CAGAATTTCTGCTGCTCAATCAAATCATGAAGTTGAAGAAACCTCTCAAGGAACTC 228
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

Consensus AAGCTCTCTGTCCCTGCTCAGAATTCCCCATCTCCTCTTTCCTGACGGCTAGCGGT 285
5' ucu AAGCTCTCTGTCCCTGCTCAGAATTCCCCATCTCCTCTTTCCTGACGGCTAGCGGT 285
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

Consensus ACCTTTCACGACGGCGATTGCTGCTGAATCAGAAGGGGCTTCGGTTGATTTCTGAT 342
5' ucu ACCTTTCACGACGGCGATTGCTGCTGAATCAGAAGGGGCTTCGGTTGATTTCTGAT 342
Orta Bolge ----- 0
3'ucu ----- 0

```

Consensus GAGAATGAACCCCGCCCATCAGAGATGAAGGAGCTTGACCTTCAATTCTCGTTGGAA 399
 5' ucu GAGAATGAACCCCGCCCATCAGAGATGAAGGAGCTTGACCTTCAATTCTCGTTGGAA 399
 Orta Bolge ----- 0
 3'ucu ----- 0

Consensus GACCTTGAGACCATCAAAGTCATTGGTAAGGAAATGGTGGCGTTGTTCAACTTGT 456
 5' ucu GACCTTGAGACCATCAAAGTCAT**TGGTAAGGAAATGGT**----- 438
 Orta Bolge -----**ATTGGTAAGGAAATGGT**GGCGTTGTTCAACTTGT 36
 3'ucu ----- 0

Consensus CGCCATAAATGGGTTGGAACGTTGTTGCCTTGAAGGTTATCCAGATGACTATAACAG 513
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge CGCCATAAATGGGTTGGAACGTTGTTGCCTTGAAGGTTATCCAGATGACTATAACAG 93
 3'ucu ----- 0

Consensus GAGGAGATTCGGAACAAATAGTTCAGGAGACTAAAATTAATCAAGCATCTCAATGT 570
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge GAGGAGATTCGGAACAAATAGTTCAGGAGACTAAAATTAATCAAGCATCTCAATGT 150
 3'ucu ----- 0

Consensus CCAAATGTTGTAGTTTGCTATCATTCTATCACAACGGAGCTATATCTATTGTG 627
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge CCAAATGTTGTAGTTTGCTATCATTCTATCACAACGGAGCTATATCTATTGTG 207
 3'ucu ----- 0

Consensus TTTGAATACATGGATCGTGGATCATTAGTTGATATAATCAGACAAGTCAAGACAATC 684
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge TTTGAATACATGGATCGTGGATCATTAGTTGATATAATCAGACAAGTCAAGACAATC 264
 3'ucu ----- 0

Consensus CTTGAACCATACCTTGCAAGTTGNTGCAAACAGGTTTACAGGGGTTAGTTTACTTG 741
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge CTTGAACCATACCTTGCAAGTTGNTGCAAACAGGTTTACAGGGGTTAGTTTACTTG 321
 3'ucu ----- 0

Consensus CATCATGAGAGACATGTTATCCATAGAGATTTAAAGCCTTCTAATCTGCTAGTGAAC 798
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge CATCATGAGAGACATGTTATCCATAGAGATTTAAAGCCTTCTAATCTGCTAGTGAAC 378
 3'ucu ----- 0

Consensus CACAAAGGGGAAGTAAAAATTACAGATTTTGGTGTAGTGCCATGCTGGCAAGCTCT 855
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge CACAAAGGGGAAGT**AAAAATTACAGATTTTGGTGTAGTGCCATGCTGGCAAGCTCT** 435
 3'ucu -----**AAAAATTACAGATTTTGGTGTAGTGCCATGCTGGCAAGCTCT** 43

Consensus ATGGGCCAACGTGACACATTTGTTGGGACTTACAATTACATGGCGCCTGAAAGGATC 912
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge **ATGGGCCAACGTGACACATTTGTTGGGACTTACAATT**----- 472
 3'ucu **ATGGGCCAACGTGACACATTTGTTGGGACTTACAATT**ACATGGCGCCTGAAAGGATC 100

Consensus AGTGGGAGCACCTATGACTATAAAAGTGATATTGGGAGTCTGGGCATGGTGATTCTT 969
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge ----- 472
 3'ucu AGTGGGAGCACCTATGACTATAAAAGTGATATTGGGAGTCTGGGCATGGTGATTCTT 157

Consensus GAATGTGCTATTGGACGTTTTCCCTTATACCAAATCTGAAGACCAACAAAGTGGCCCC 1026
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge ----- 472
 3'ucu GAATGTGCTATTGGACGTTTTCCCTTATACCAAATCTGAAGACCAACAAAGTGGCCCC 214

Consensus AGCTTTTACGAGCTTCTGCAGGCAATTGTTGGAAGTCCACCACCTTCTGCTCCGCCA 1083
 5' ucu ----- 438
 Orta Bolge ----- 472
 3'ucu AGCTTTTACGAGCTTCTGCAGGCAATTGTTGGAAGTCCACCACCTTCTGCTCCGCCA 271

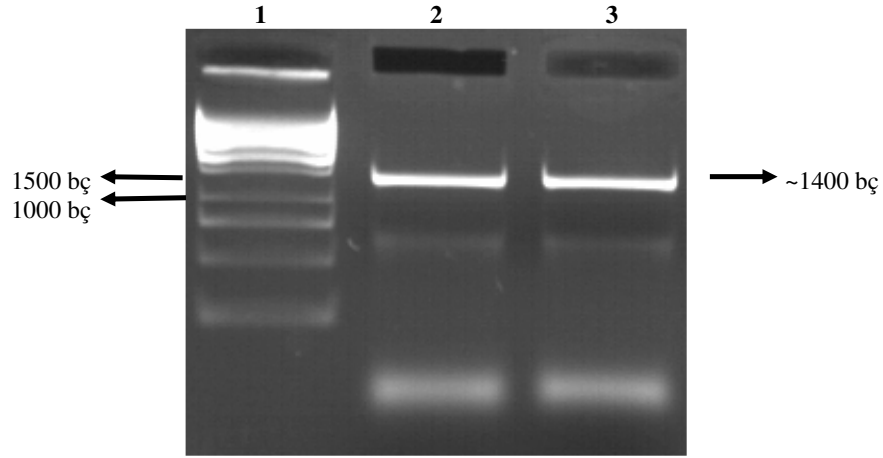
Consensus	GATCAATTTTCTCCAGAATTCTGTTCTTTTGTCTCTGCATGCGTACAGAAAGATCCT	1140
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	GATCAATTTTCTCCAGAATTCTGTTCTTTTGTCTCTGCATGCGTACAGAAAGATCCT	328
Consensus	AGAGACAGATCTTCGGCCTTGGAACACTAGCCATCCTTTCATCAAGAAATTTGAA	1197
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	AGAGACAGATCTTCGGCCTTGGAACACTAGCCATCCTTTCATCAAGAAATTTGAA	385
Consensus	GAGAAAGACATTGATCTCAGCATATATGTGGGTAGCCTTGGATCACCTGTGAATATC	1254
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	GAGAAAGACATTGATCTCAGCATATATGTGGGTAGCCTTGGATCACCTGTGAATATC	442
Consensus	CCATAAATCACCTCTCTTCACTCTTCTTACTATGTTTCATGTATGTTTGTGTTAAG	1311
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	CCATAAATCACCTCTCTTCACTCTTCTTACTATGTTTCATGTATGTTTGTGTTAAG	499
Consensus	ATACCATCTTTAAATTTAATTTTTGTAAGTGATGTTATTCTCGGTTTAAGGAAATGT	1368
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	ATACCATCTTTAAATTTAATTTTTGTAAGTGATGTTATTCTCGGTTTAAGGAAATGT	556
Consensus	AGCTCTCATTATGAGCCATAGAATTAACCGAATCC	1404
5' ucu	-----	438
Orta Bolge	-----	472
3'ucu	AGCTCTCATTATGAGCCATAGAATTAACCGAATCC	591

Şekil 3.24. *Oo-17* klonuna ait 5'RACE-Orta Bölge-3'RACE dizilerinin örtüştürülmesi (consensus) ile elde edilen tüm cDNA dizi bilgisi. Örtüşen bölgeler kırmızı renkle renklendirilmiştir.

3.1.5. *Oo-17*-MAPKK cDNA'sının Tamamının Klonlanması İçin PZR

Oo-17-MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' UTR'lara (translasyona uğramayan bölge) tasarlanan primerler (F1-MAPKK1-5'UTR 5'gagaggagagagagtaccgttg 3', ileri primer ve R2-MAPKK1-3'UTR 5'cayttaaccgagaataacatcacttac 3', geri primer) ile *pfu* DNA polimeraz kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünleri % 1.4'lük agaroz jelle gene ruler 1 kb marker ile birlikte yüklenmiştir (Şekil 3.25).

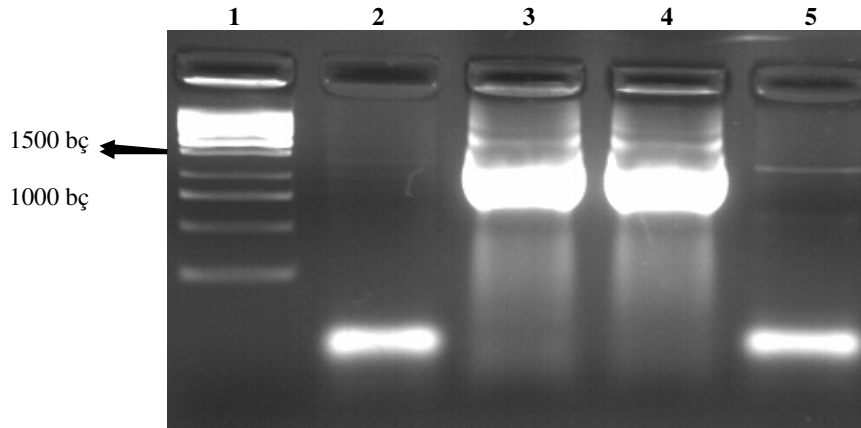
PZR'de beklenen ürün büyüklüğü yaklaşık olarak 1400 bp'dir. Bunun nedeni tasarlanan primerlerin UTR bölgelerini içermesidir. Reaksiyon sonunda oluşan PZR ürününün agaroz jelde yaklaşık 1400 bp olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. *Oo-17* MAPKK cDNA ürününün tamamını elde etmek için yapılan PZR sonucu ~1400 bç'lik ürün. 1) Fermentas 1 kb marker, 2 ve 3) ok ile gösterilen UTR bölgelerini içeren ~1400 bç'lik ürünün %1.4'lük agaroz jel'deki görüntüsü

3.1.5.1. *Oo-17*-MAPKK cDNA'sı İçin Koloni PZR

PZR ürünü agaroz jelden kesilerek saflaştırılmış ve ligasyon ile plazmite (pGEM-T Easy, pTZ57/RT) eklenmiştir. PZR ürününü taşıyan plazmit transformasyon ile konakçı bakteri hücrelerine (*E.coli* XLI-Blue) aktarılmıştır. Koloni PZR yöntemi ile ürün içeren plazmitin olduğu koloniler tespit edilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Koloni PZR yöntemiyle plazmit içindeki ~1400 bç'lik *Oo-17* MAPKK cDNA'sının klonlandığının gösterilmesi. 1) Fermentas 1 kb marker, 2 ve 5) ürün içermeyen negatif sonuç, 3 ve 4) ~1400 bç'lik ürün içeren pozitif sonuç

3.1.5.2. *Oo-17-MAPKK* cDNA'sının DNA Dizi ve Biyoinformatik Analizi

O. onites MAPKK genini içerdiği tespit edilen pozitif kolonilerden plazmit izolasyon kiti ile izole edilen plazmitler Beckman Coulter CEQ8000 cihazı ile DNA dizi analizine tabi tutulmuşlardır. Beckman Coulter CEQ8000 cihazı'nın baz okuma kapasitesi 800-1000 bç olduğu için ~1400 bç'lik ürünü okumak için farklı yönlerde olan Forward-M13-47, Reverse-M13-47, T7, SP6 ve geni elde etmede kullanılan orta bölge üzerinde tasarlanmış RACE primerleri kullanılmıştır. Plazmite eklenmiş ürünün kısmen dizi analizinde okunarak NCBI gen bankası veri tabanına girilmesi, MAPKK ailesine ait olup olmadığını göstermek için yeterli olmaktadır. Böylece elde edilen ürünün doğru olup olmadığı kanıtlanmış olacaktır.

Dizi analizi cihazı tarafından okunabilen tüm gene ait DNA dizisi ham verisi NCBI gen bankası veri tabanına girilmiş ve MAPKK olduğu tekrar teyit edilmiştir. Aşağıda ~1400 bç'lik ürünün MAPKK olduğunu teyit etmek için dizi analizi aleti tarafından okunan 725 bç'lik nükleotid dizisi bulunmaktadır (Şekil 3.27).

OoMAPKK1 dizi analizi ham verisi:

Attacgccaagctatttaaagtacattatattcacatactcagagctatgcaataaccaacgcggtgggagctctccca
tatggtcgacctgttatggcggccgcgaattcactagtgattcctaaaccgagaataacatcactacaaaattaaatt
taaagatggtatcttaacaacaacatacatgacatagtaagaagagtgaagagaggtgatttatctgggaatattca
caggtggatccaagctaccaaccaatgctgagatcaatgtcttctctcaaattcttgatgaaggatggctcagta
gtccaaggccgaagatctgtctctaggatcttctgtatgcatgcagagacaaaagaacagaattctggagaaaattg
atctggcggagcagaaggtggtggactccaacaattgcctgcagaagctcgtaaaagctggggccactttgttggtc
ttcagattggtataaggaaaacgtccaatagcacattcaagaatcaccatgccagactccaaatcacttttatagtc
ataggtgctcccactgatccttcaggcgacatgtaattgtaagtccaacaaatgtgtcacgttgcccatagagcttg
ccagcatggcactaacaccaaaaatctgtaaatttaacttccccctttgtgggtcacctaaacagattaagaaggccttt
acatt

Şekil 3.27. *Oo17-MAPKK* cDNA'sının okunan 725 bç'lik DNA dizi analizi ham verisi. Plazmite ait bölgeler (kırmızı ile işaretlenmiş), NCBI plazmit temizleme programı kullanılarak

ve primer oturma bölgeleri manual olarak bulunarak tespit edilmiş ve diziden çıkartılmıştır (Okunan bölge cDNA'nın 3' ucundadır)

Dizi analizi cihazına ait software'da okuma kalitesi düşük olan bölgeler tespit edilebilmektedir. Bu bölgeler yukarıdaki dizide kırmızı olarak işaretlenmiş ve bu bölgeler NCBI veri tabanı bilgilerine bakıldığında görülebilmektedir. Veri tabanı en yakın gen bilgisinin benzer bölgelerini gösterdiği için, okuma hatası olan bölge çıkarıldığında benzerlik oranı da artmaktadır (Şekil 3.28).

A- Ham veri'nin NCBI veri tabanı sonucu:

```
gi|51471930|gb|AAU04435.1|    MAPKK [Lycopersicon esculentum]
Length=354
Score = 246 bits (629), Expect = 5e-64
Identities = 135/157 (85%), Positives = 143/157 (91%), Gaps = 1/157 (0%)
Frame = -2

Query 697 VTHKGG*NLQIFGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYMSPERISGSTYDYKSDIWSLGMVIL518
V HKG + FGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYM+PERISGSTYDYKSDIWSLGMVIL
Sbjct 199 VNHKGEV-KITDFGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYMAPERISGSTYDYKSDIWSLGMVIL257

Query 517 ECAIGRFPYTKSEDQQSGPSFYELLQAIVGspppsappdqfsPEFCSFVSACIQKDRDR338
ECAIGRFPY +SEDQQ+ PSFYELL AIV SPPPSAP DQFSPEFCSFVSACIQKDRDR
Sbjct 258 ECAIGRFPYIQSEDQQARPSFYELLDAIVSPPPSAPVDQFSPEFCSFVSACIQKDRDR317

Query 337 SSALELLSHPFIKKFEEKDIDLSILVGLDPPVNIPR 227
SSAL+LLSHPF+KKFE+KDIDLSILV SL+PPVN PR
Sbjct 318 SSALDLSHPFVKKFEDKDIDLSILVSSLEPPVNFPR 354
```

B- İşlenmiş veri'nin NCBI veri tabanı sonucu:

```
gi|51471930|gb|AAU04435.1|    MAPKK [Lycopersicon esculentum]
Length=354
Score = 244 bits (624), Expect = 1e-63
Identities = 131/145 (90%), Positives = 138/145 (95%), Gaps = 0/145 (0%)
Frame = -3

Query 600 FGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYMSPERISGSTYDYKSDIWSLGMVILECAIGRFPYTKS421
FGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYM+PERISGSTYDYKSDIWSLGMVILECAIGRFPY +S
Sbjct 210 FGVSAM LASSMGQRDTFVGTYNYMAPERISGSTYDYKSDIWSLGMVILECAIGRFPYIQS269

Query 420 EDQQSGPSFYELLQAIVGspppsappdqfsPEFCSFVSACIQKDRDRSSALELLSHPFI241
EDQQ+ PSFYELL AIV SPPPSAP DQFSPEFCSFVSACIQKDRDRSSAL+LLSHPF+
Sbjct 270 EDQQARPSFYELLDAIVSPPPSAPVDQFSPEFCSFVSACIQKDRDRSSALDLSHPFV329

Query 240 KKFEEKDIDLSILVGLDPPVNIPR 166
KKFE+KDIDLSILV SL+PPVN PR
Sbjct 330 KKFEDKDIDLSILVSSLEPPVNFPR 354
```

Şekil 3.28. *Ool7-MAPKK* cDNA'sının NCBI verileri. A- DNA dizi analizi sonucu elde edilen 725 bç'lik okuma bilgisinin plazmitten temizlenmemiş halinin NCBI gen bankasında Blast (nucleotid-translated-protein) programıyla tanımlanması, B- Temizlenmiş hali

```

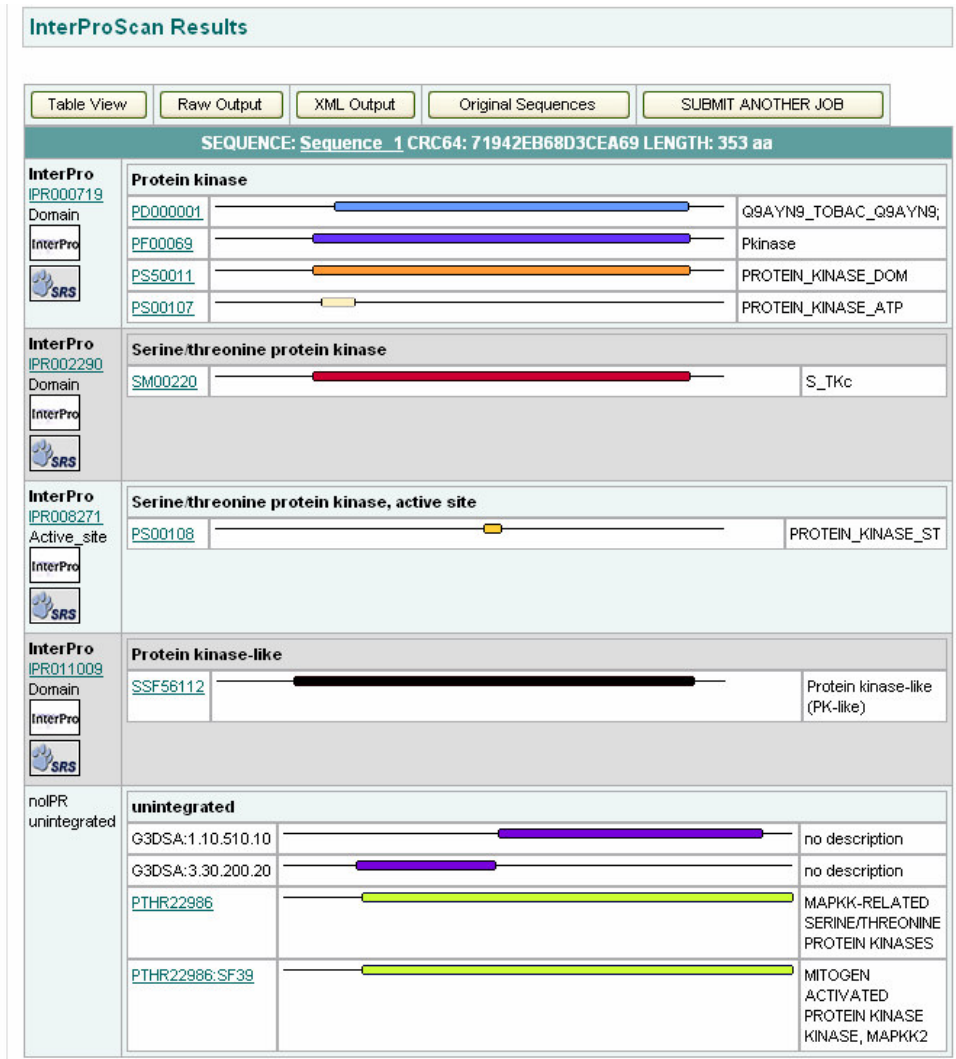
tcggacgtaccattatggcaactcagacaaaagccaccggccatttccatttgg -54
acttttggagttatattagagagagagagagagagtagtaccggttgagtgaggcggcc -108
atttccatttgaattttctcttcaaacttctcttcattctctcgctgctactg -162
                                     M K L K K P
aaccttaggcagaatttctgctgctcaatcaaaatcatgaagttgaagaaacct 216
L K E L K L S V P A Q N S P I S S F
ctcaaggaactcaagctctctgctccctgctcagaattccccatctcctctttc 270
L T A S G T F H D G D L L L N Q K G
ctgacggctagcggtagctttcagcagcggcgatttgctgctgaatcagaagggg 324
L R L I S D E N E P R P S E M K E L
cttcggttgatttctgatgagaatgaaccccgcccatcagagatgaaggagctt 378
D L Q F S L E D L E T I K V I G K G
gaccttcaattctcggttgaagaccttgagaccatcaaagtcattggtaagggg 432
N G G V V Q L V R H K W V G T L F A
aatgggtggcggttgttcaacttgttcgccataaatgggttgaacggttgtttgcc 486
L K V I Q M T I Q E E I R K Q I V Q
ttgaaggttatccagatgactatacaggaggagattcggaaacaaatagttcag 540
E T K I N Q A S Q C P N V V V C Y H
gagactaaaattaatcaagcatctcaatgtccaaatggttagtttgcattatcat 594
S F Y H N G A I S I V F E Y M D R G
tcattctatcacaacggagctatatctattgtgttgaatacatggatcgtgga 648
S L V D I I R Q V K T I L E P Y L A
tcattagttgatataatcagacaagtcaagacaatccttgaaccataccttgca 702
V V C K Q V L Q G L V Y L H H E R H
ggtgttgcaaacagggttttacagggttagtttacttgcacatgagagacat 756
V I H R D L K P S N L L V N H K G E
ggtatccatagagatttaagccttctaactctgctagtgaaccacaaaggggaa 810
V K I T D F G V S A M L A S S M G Q
gtaaaaattacagattttgggttagtgccatgctggcaagctctatggggccaa 864
R D T F V G T Y N Y M A P E R I S G
cgtgacacatttgttgggacttacaattacatggcgcctgaaaggatcagtggg 918
S T Y D Y K S D I G S L G M V I L E
agcacctatgactataaaaagtgatattgggagctctgggcatggtgattccttgaa 972
C A I G R F P Y T K S E D Q Q S G P
tgtgctattggacggttttcccttataccaaatctgaagaccaacaaagtgggccc 1026
S F Y E L L Q A I V G S P P P S A P
agcttttacgagcttctgcaggcaattggttgaagtccaccaccttctgctccg 1080
P D Q F S P E F C S F V S A C V Q K
ccagatcaattttctccagaattctgttcttttctctgctgcatgcgtacagaaa 1134
D P R D R S S A L E L L S H P F I K
gatcctagagacagatcttcggccttgaactactgagccatcctttcatcaag 1188
K F E E K D I D L S I Y V G S L G S
aaatttgaagagaagacattgatctcagcatatagtgggtagccttggatca 1242
P V N I P *
cctgtgaatatcccataaatcacctctcttcaactcttcttactatgttcatgta 1296
tgtttgttggtaagataccatctttaaatttaatttttgaagtgatgttatt 1350
ctcggtttaaggaaatgtagctctcattatgagccatagaattaaccgaatccg 1404
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1423

```

Şekil 3.29. *Oo17-MAPKK* cDNA klonundan elde edilen nükleotid ve amino asit dizisi. Bu veri Gene tool 1.0 programıyla elde edilmiş ve NCBI veritabanında teyit edilmiştir. 1404 bp'lik cDNA, 198 bp'lik 5' UTR, 144 bp'lik 3' UTR ve 19 bp'lik poliA kuyruğuna sahiptir. Gen bankası No: EF558371 (yeşil: substrat bağlanma, mavi: aktivasyon, sarı: fosforilasyon, kırmızı: katalitik bölge motifi)

Dizi analizi verilerinin örtüştürülmesiyle *O. onites* MAPKK'sine ait tüm genin dizi bilgisi, tüm UTR bölgeleriyle birlikte ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen tüm cDNA dizisinin amino asit dizi bilgisi GeneTool 1.0 programında oluşturulmuştur (Şekil 3.29).

Ayrıca, EBI interproscan programıyla (European Bioinformatics Institute) da *Oo17-MAPKK* cDNA'sının tahmini amino asit dizisinin motif analizi MAPKK'lara ait imza motifleri taşıdığı gösterilmiştir. Bu motifler Şekil 3.30'da gösterildiği gibi protein kinaz, serin-treonin kinaz ve MAPKK motifleridir.



Şekil 3.30. *Oo17-MAPKK* cDNA'sının EBI veritabanındaki interproscan programının sabit ayarlarıyla yapılan analizi. Bu cDNA'nın MAPKK olduğunu göstermektedir.

O. onites bitkisinden ilk kez klonlanan bu MAPKK genine MAPKK'lerin karakteristik enzim motiflerini taşıdığı için *OoMAPKK1* adı verilmiştir. MAPKK enzim ailesinin sahip olduğu alt domeinleri göstermek için; *OoMAPKK1* cDNA'sının amino asit dizisi EBI veri tabanındaki DbClustal programında diğer bitki MAPKK'larının amino asit dizileri ile hizalanmıştır (Şekil 3.31). Bu hizalama üzerinde MAPKK enzim ailesinin içerdiği 11 alt domein bölgesi bulunmuş ve işaretlenmiştir.

DbClustal Results

Multiple Sequence Alignment
 CLUSTAL (1.0) multiple sequence alignment
 56

```

OoMAPKK1      -MKLKKPLKELKLSVPA-QNSPISSFLTASGTFHDGDLNQLKGLRLISDEN--EPRPSE
Q66MH7_SOLLC -MKTAKPLKQLKLSVPA-QDTPISSFLTASGTFHDGDLNQLKGLRLISEEN--ESLPSE
Q9AYN9_TOBAC  -MKTAKPLKELKLSVPA-QDTPISSFLTASGTFHDGDLNQLKGLRLISEEN--ESPASE
M2K6_ARATH    MVKIKSNLQKLSVPA-QESPISSFLTASGTFHDGDFLLNQLKGLRLTSEK--QSRQSD
O49975_MAIZE  -MKGKKPVKELKLTVPA-QETPVDKFLTASGTFKDGELRLNQSGLRLISENGDEDESTK
Q0Z7Z4_ORYSA -MRGKKPHKELKLSVPA-QETPVDKFLTASGTFKDGELRLNQRGLQLISEETADEPQSTN
Q5JCL0_SOYBN MKKGNLGLG-LKLSVPVSDQSNFAKFLTESGTFKDGDLVNRDGVRIVSQND--VEAPP
Q6TKQ8_VITAE MRRGPLNPSNLKLTLP--DEDSLTKFLTQSGTFMDGDLVNRDGVRIVSKSE--AEVPL
Q93WR7_MEDVA MKKGNLGLG-LKLSVPQTDQVAFKFLTESGTFKDGDLVNRDGVRIVSETE--VEAPP
      . . . . . ***:
  
```

116

```

OoMAPKK1      MKELDLQFSLEDLETIKVIGKNGGGVQLVRRHKWVGTLFALKVIQMTIQEEIRKQIVQET
Q66MH7_SOLLC  TKEIDLQFSLEDLETIKVIGKSGGGVQLVRRHKWVGTLFALKVIQMNIQEDIRKQIVQEL
Q9AYN9_TOBAC  TKEIDLQFSLEDLETIKVIGKSGGGVQLVRRHKWVGTLFALKVIQMTIQEDIRKQIVQEL
M2K6_ARATH    SKELDFEITAEDLETVKVIGKSGGGVQLVRRHKWVGTFFAMKVIQMNIQEEIRKQIVQEL
O49975_MAIZE  LKVEDVQLSMDLEMIQVIGKSGGGVQLVRRHKWVGTLFALKGIQMNIQESVRKQIVQEL
Q0Z7Z4_ORYSA  LKVEDVQLSMDLEMIQVIGKSGGIVQLVRRHKWVGTLYALKGIQMNIQEAVRKQIVQEL
Q5JCL0_SOYBN  IKPTDNQLALADIDIVKVVGKNGGGVQLVQHKWTSQFFALKVIQMNIEESMRKQITQEL
Q6TKQ8_VITAE  IKPSDNQLSLADIDITIKVIGKAGGTVQLVQHKWTSQFFALKVIQMNIEAALKHIAQEL
Q93WR7_MEDVA  IKATDNQLSLADIDIVKVVGKNGGGVQLVQHKWTSQFFALKIQMNIEESVRKRIAKEL
      I          II          III
  
```

175

```

OoMAPKK1      KINQAS-QCPNVVVCYHSFYHNGAISIVFEYMDRGS�VDIIRQVKTIILEPYLAVVCKQVL
Q66MH7_SOLLC  KINQAS-QCPHVVCYHSFYHNGAISLVLEYMDRGS�VDVIGLKTILEPYLAVVCKQVL
Q9AYN9_TOBAC  KINQAS-QCSHVVCYHSFYHNGAISLVLEYMDRGS�ADVIRQLKTILEPYLAVVCKQVL
M2K6_ARATH    KINQASSQCPHVVCYHSFYHNGAFSLVLEYMDRGS�ADVIRQVKTIILEPYLAVVCKQVL
O49975_MAIZE  KINQAT-QSPHIVMCHQSFYHNGVIYLVLEYMDRGS�ADVIRQVKTIILEPYLAVLCKQVL
Q0Z7Z4_ORYSA  KINQAT-QNPHIVLCHQSFYHNGVIYLVLEYMDRGS�ADIIKQVKTIILEPYLAVLCKQVL
Q5JCL0_SOYBN  KINQQA-QCPYVVVCYQSFYENGVISIILEYMDGGS�ADLLKVKTIPEPSYLAACKQVL
Q6TKQ8_VITAE  KINQSS-QCPYVVVCYQSFYDNGAFSIIILEYMDGGSLLDFLKKVKSIPPEPYLAACNQVL
Q93WR7_MEDVA  KINQAA-QCPYVVVCYQSFYDNGVISIILEYMDGGSMDLLKVKTIPEPYLSAICKQVL
      IV          V
  
```

235

```

OoMAPKK1      QGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVGTNYMAP
Q66MH7_SOLLC  QGLVYLHHERHVIHRDIKPSNLLVNHKGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVGTNYMAP
Q9AYN9_TOBAC  QGLVYLHNERHVIHRDIKPSNLLVNHKGEVKITDFGVSAMLASSMGQRDTFVGTNYMAP
M2K6_ARATH    LGLVYLHNERHVIHRDIKPSNLLVNHKGEVKISDFGVSASLASSMGQRDTFVGTNYMSP
O49975_MAIZE  EGLLYLHHRHVIHRDIKPSNLLVNRKGEVKITDFGVSAVLASSIGQRDTFVGTNYMAP
Q0Z7Z4_ORYSA  EGLLYLHHERHVIHRDIKPSNLLVNRKGEVKITDFGVSAVLASSMGQRDTFVGTNYMAP
Q5JCL0_SOYBN  KGLVYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHGGEVKITDFGVSAIMESTSGQANTFIGTCNYMSP
Q6TKQ8_VITAE  KGLSYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHRGEVKITDFGVSAILTSTSGQANTFVGTNYMSP
Q93WR7_MEDVA  KGLIYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHTGEVKITDFGVSAIMESTSGQANTFIGTYNYMSP
      VIa        VIb          VII          VIII
      *:*          :          *          **:*
  
```

293 **IX** **X**

OoMAPKK1 ERI**SGST**--YDYKSDIGSLGMVILECAIGRFFPYK**SE**DQQSGPSFYEL**LQA**IVGSPPPSA
Q66MH7_SOLLC ERI**SGST**--YDYKSDIWSLGMVILECAIGRFFPYIQ**SE**DQQARPSFYEL**LDA**IVSSPPPSA
Q9AYN9_TOBAC ERI**SGST**--YDYKSDIWSLGMVILECAIGRFFPYIQ**SE**DQQAWPSFYEL**LDA**IVSSPPPSA
M2K6_ARATH ERI**SGST**--YDYSSDIWSLGMVILECAIGRFFPYL**SE**DQQNPPSFYEL**LAA**IVENPPPTA
O49975_MAIZE ERI**SGST**--YDYKSDIWSLGLVILECAIGRFFPYIP**SE**GE-GWLSFYEL**LDA**IVDQPPPSA
Q0Z7Z4_ORYSA ERI**SGSS**--YDYKSDIWSLGLVILECAIGRFFPYIP**SE**GE-GWLSFYEL**LDA**IVDQPPPSA
Q5JCL0_SOYBN ER**INGSQ**EGYNFKSDIWSLGLLLECALGRFFPYAPPDQ**SE**TWESIYEL**LEA**IV**EK**PPSP
Q6TKQ8_VITAE ER**ISGGK**--YGSKSDIWSLGLVLECATGQFFYSP**PE**QGEWTSFYEL**ME**AIVDQPPPCA
Q93WR7_MEDVA ER**INGSQ**RGYNYKSDIWSLGLLLECAMGRFFPYTP**PD**Q**SE**RWESIFEL**LI**ETIVDKPPPSA

353 **XI**

OoMAPKK1 P**PD**QFSPEFC**SF**VSA**CV**Q**KD**PRDRSSALELLSHPF**IKK**F**E**E**K**DIDLSIYV**GS**LGSPV**NIP**
Q66MH7_SOLLC P**V**DQFSPEFC**SF**VSA**CI**Q**KD**PRDRSSALD**LL**SHPF**VKK**F**E**D**K**DIDLSILV**SS**LEPPV**NFP**
Q9AYN9_TOBAC P**A**DQFSPEFC**SF**VSA**CI**Q**KD**PRDRSSALD**LL**SHPF**IKK**F**E**D**K**DID**F**GILV**SS**LEPPV**NFP**
M2K6_ARATH P**S**DQFSPEFC**SF**VSA**CI**Q**KD**PPARASSL**DL**SHPF**IKK**F**E**D**K**DID**L**GILV**GT**LEPPV**NYL**
O49975_MAIZE P**A**DQFSPEFC**SF**ISS**CI**Q**KD**PAQRMSA**SE**LLNH**PF**L**KK**F**E**D**K**DLN**L**GILVENLEPP**MNIP**
Q0Z7Z4_ORYSA P**A**DQFSPEFC**AF**ISS**CI**Q**KD**PAERMSA**SE**LLNH**PF**L**KK**F**E**D**K**DL**DR**ILVESLEPP**MNIS**
Q5JCL0_SOYBN P**S**EQF**ST**EFC**SF**IS**ACL**Q**KD**PK**DR**LSA**Q**ELMA**HP**V**N**MY**DD**LE**VD**LSAY**FS**NAG**S**PLAT**L**
Q6TKQ8_VITAE **ST**NQ**FS**A**E**F**CS**FIS**ACL**Q**KD**P**NR**KSA**HE**LM**AH**PF**IS**MY**RD**L**N**VD**L**AT**Y**FT**N**AG**S**PLAT**F**
Q93WR7_MEDVA P**S**EQF**SSE**F**CS**FIS**ACL**Q**KD**PG**S**RLSA**Q**EL**ME**L**PF**IS**MY**DD**LH**VD**L**SAY**FS**DAG**S**PLAT**L**

OoMAPKK1 - 353
Q66MH7_SOLLC R 354
Q9AYN9_TOBAC R 354
M2K6_ARATH R 356
O49975_MAIZE E 355
Q0Z7Z4_ORYSA E 355
Q5JCL0_SOYBN - 356
Q6TKQ8_VITAE - 354
Q93WR7_MEDVA - 356

Şekil 3.31. *OoMAPKK1*'e ait aminoasit dizi bilgisi ile diğer bitki MAPKK aminoasit dizi bilgilerinin EBI veritabanında karşılaştırılması. Roma rakamları: 11 alt domain bölgelerini göstermektedir. Kırmızı yıldız ve noktalar motif bölgeleridir (Gen Bankası Kodları: *Lycopersicon esculentum* MAPKK (*LeMCK3*) AY691332, *Nicotiana tabacum* mRNA for *NQK1* MAPKK AB055514, *Arabidopsis thaliana* *ANQ1/AtMCK6* AB104460, *Zea mays* *ZmMEK1* U83625, *Oryza sativa* MAPKK1 AF216314, *Vitis aestivalis* AY395740, *Medicago sativa* subsp. *x varia* AJ293275)

OoMAPKK1'in amino asit dizisi EBI veri tabanında Dbclustal programına girilerek veritabanındaki diğer canlılara ait MAPKK'ler ile dikey hizalaması yapılmış (Şekil 3.32) ve elde edilen veriler kullanılarak Phylip yöntemiyle cluster algoritması ve bootstrap kullanılarak bir filogenetik ağaç çizilmiştir (Şekil 3.33). *Oo14-MAPKK* cDNA orta bölge nükleotid dizisi NCBI gen bankası veri tabanına girilerek kayıt numarası (accession number): EF558371 (Ek-5) alınmıştır.

DbClustal Results

Multiple Sequence Alignment

CLUSTAL (1.0) multiple sequence alignment

```
OoMAPKK1      -----MKLKPLKELKLSVPA-QNSPISSFLTASGTFHDGDDLLLNQ 40
L_esculentum  -----MKTAKPLKQLKLSVPA-QDTPISSFLTASGTFHDGDDLLLNQ 40
N_tabacum     -----MKTTKPLKELKLSVPA-QDTPISSFLTASGTFHDGDDLLLNQ 40
V_vinifera    -----MKSKKPLKQLKLSVPA-QETPITSFLTASGTFQDGDLLLNQ 40
A_thaliana    -----MVKIKSNLKLKLSVPA-QESPISFLTASGTFHDGDFLLNQ 41
O_sativa      -----MRGKKPHKELKLSVPA-QETPVDKFLTASGTFKDGELRLNQ 40
Z_mays        -----MKGKKPVKELKLTVPA-QETPVDKFLTASGTFKDGELRLNQ 40
G_max_soybean -----MKKGNLGLG-LKLSVPVSDQSNFAKFLTESGTFKDGDDLLVNR 41
M_savita      -----MKKGNLGLG-LKLSVPQTDQVAFKFLTESGTFKDGDDLLVNR 41
P_crispum     -----MKKGNLGP-LKLSLPPDEDSLTKFLTQSGTFMDGDDLLVNR 41
D_melanogaster ---MSKNKLNVLVPPVNTAATVAATVAPTPPFKTPSGDTHS-LLGPKTISDALTETL 56
B_mori        -----MPPKRKLNPLNLTLEGSSPIPQQVS-----DLGKKM 32
C_carpio      MSKMSKNKLNLTLPVGSIDTNPATPSNMTPQLKSATANDRRQGLAGSKTISIEALTERL 60
C_intestinalis -----MAPKRFPVPLI IAPTGEQSTNIDAASEANLEALQRKL 38
```

* * * * *

```
OoMAPKK1      KGLRLISDEN--EPRPSEMKELD-LQFSL---EDLETIKVIGKNGGGVQVLRHKKVWGTL 94
L_esculentum  KGLRLISEEN--ESLPSETKEID-LQFSL---EDLETIKVIGKSGGGVQVLRHKKVWGTL 94
N_tabacum     KGLRLISEEN--ESPASETKEID-LQFSL---EDLETIKVIGKSGGGVQVLRHKKVWGTL 94
V_vinifera    KGLRLISEEK--EPRPSEAKELD-VQFSL---EDLETIKVIGKSGGGVQVLRHKKVWGTL 94
A_thaliana    KGLRLTSDEK--QSRQSDSKELD-FEITA---EDLETIKVIGKSGGGVQVLRHKKVWGF 95
O_sativa      RGLQLISEETADEPQSTNLKVED-VQLSM---DDLEMIQVIGKSGGGVQVLRHKKVWGTL 96
Z_mays        SGLRLISEENGEDEESTKLKVED-VQLSM---DDLEMIQVIGKSGGGVQVLRHKKVWGTL 96
G_max_soybean DGVRIVSQND--VEAPPPKPTD-NQLAL---ADIDVIKVVGKNGGGVQVLRHKKVWTF 95
M_savita      DGVRIVSETE--VEAPPPKATD-NQLSL---ADIDVIKVVGKNGGGVQVLRHKKVWTF 95
P_crispum     DGVRIVSQTD--VQAAPPIQATD-NQLSL---ADFDAIKVVGKSGGGVRLVQHKWTF 95
D_melanogaster EGLDMGDTER-KRIKMFSLQKEKIGELS---DEDLEKLGELGSGNGGVVVKVRHTHTLI 112
B_mori        DELNIDETQR-KRLDQFIKQKQVGMENAQNSDFTKKGELEGAGNGGVVHVVHNAATGFV 91
C_carpio      EQIEMDDTQR-RRIEVFLCQKEKIGELS---DDDFEKLGELEGQNGGVVVKVRHSTGLI 116
C_intestinalis GELDLDEQQR-KRLEAFLTQKAQVGELEK---DEDFPICELGAGNGGVVHKKVHKSRLV 94
```

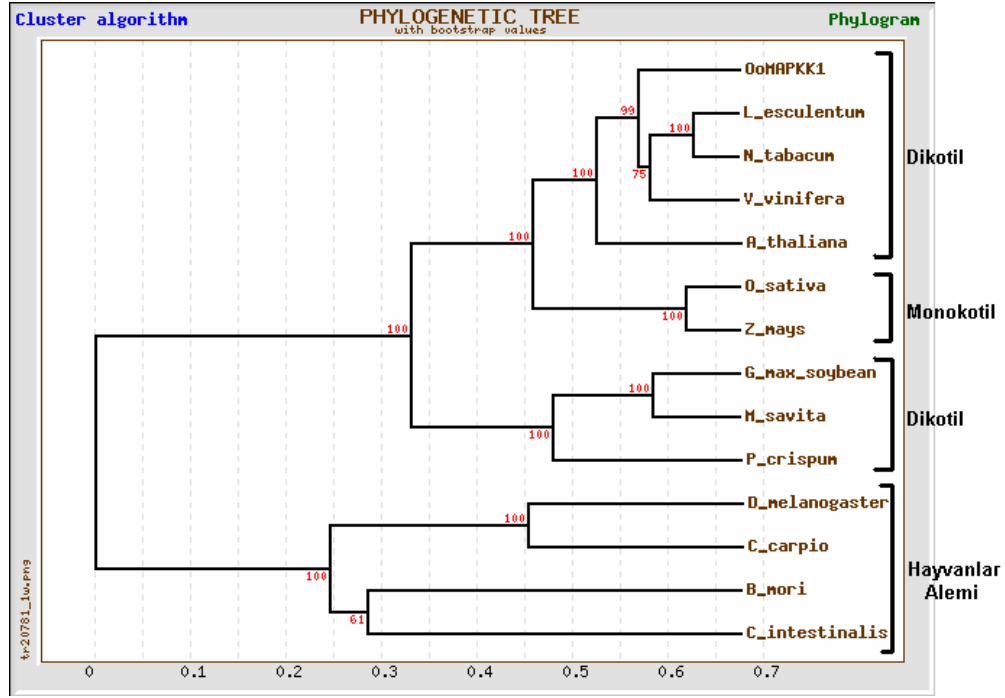
```
OoMAPKK1      FALKVIQMTIQEEIRKQIVQELKINQAS-QCPNVVVCYHSFYHNGAISIVFEYMDRGSVL 153
L_esculentum  FALKVIQMNIQEDIRKQIVQELKINQAS-QCPHVVCYHSFYHNGAISLVLEYMDRGSVL 153
N_tabacum     FALKVIQMTIQEDIRKQIVQELKINQAS-QCSHVVCYHSFYHNGAISLVLEYMDRGSVA 153
V_vinifera    FALKVIQMNIQENFRKQIVQELKINQAS-QCSHIVVCYHSFYHNGVIVSLVLEYMDRGSVL 153
A_thaliana    FAMKVIQMNIQEEIRKQIVQELKINQASSQCPHVVCYHSFYHNGAFSLVLEYMDRGSVA 155
O_sativa      YALKGIQMNIQEAVRKQIVQELKINQAT-QNPHIVLCHQSFYHNGVIVLVLEYMDRGSVA 155
Z_mays        FALKGIQMNIQESVRKQIVQELKINQAT-QSPHIVMCHQSFYHNGVIVLVLEYMDRGSVA 155
G_max_soybean FALKVIQMNIEESMRKQITQELKINQAA-QCPYVVVCYQSFYENGVISIILEYMDGGSVA 154
M_savita      FALKVIQMNIEESVRKRIAKELKINQAA-QCPYVVVCYQSFYDNGVISIILEYMDGGSMA 154
P_crispum     FALKVIQMNIQESARKQIAQELKINQSS-QCLNVVVCYQSFYDNGAISIILEYMDGGSVA 154
D_melanogaster MARKLIHLEVKAIAIKQILRELKVLHEC-NFPHIVGFYGFYSDGEISICMEYMDGGSVA 171
B_mori        MARKLIHLEVKAIAILNQTIRELQVLHDC-RSPYIVGYGYTFYSDGEISICMESMDAGSLD 150
C_carpio      MARKLIHLEVKAIAIKQIIRELKVLHEC-NFAHIVGFYGFYSDGEISICMEYMDGGSVA 175
C_intestinalis MARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHDC-NSPYIVGFYGFYSDGEISICMEHMDGGSVA 153
```

```
OoMAPKK1      DIIRQVKTILEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVS 213
L_esculentum  DVIGQLKTILEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVS 213
N_tabacum     DVIRQLKTILEPYLAVVCKQVLQGLVYLHNERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVS 213
V_vinifera    DVIRQVKTILEPYLAVLCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVS 213
A_thaliana    DVIRQVKTILEPYLAVVCKQVLLGLVYLHNERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKISDFGVS 215
O_sativa      DIIRQVKTILEPYLAVLCKQVLEGLLYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNRKGEVKITDFGVS 215
Z_mays        DIVRQVKTILEPYLAVLCKQVLEGLLYLHHRHVIHRDLKPSNLLVNRKGEVKITDFGVS 215
G_max_soybean DLLKVKVTIPESYLAIAICKQVLKGLVYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHIGEVKITDFGVS 214
M_savita      DLLKVKVTIPESYLSAIAICKQVLKGLIYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHIGEVKITDFGVS 214
P_crispum     DFLKIVNIPPEYLAIFKQVLKGLWYLHHEKHIIHRDLKPSNLLINHIGEVKITDFGVS 214
D_melanogaster LILKRAGRIPESILGRITLAVLKGLSYLRDNHAIHRDVKPSNLLVNSSGEIKICDFGVS 231
B_mori        LVLKARKIPEIYLGKVKAVILGLKYLREERSIIHRDVKPSNLLVNSRGEIKLCLDFGVS 210
C_carpio      LILKAGRIPESILGTITSAVLKGLSYLRDKHAIMHRDVKPSNLLVNSRGEIKICDFGVS 235
C_intestinalis QVLKEARRIPEEILGKVSIAVLRGLVYLREKHQIMHRDVKPSNLLVNSRGEIKLCLDFGVS 213
```

* : *

OoMAPKK1	AMLASSMGQRDTFVGTNYMAPERISGSTYD--KSDIGSLGMVILECAIGRFPYTKSE-	270
L_esculentum	AMLASSMGQRDTFVGTNYMAPERISGSTYD--KSDIWSLGMVILECAIGRFPYIQSE-	270
N_tabacum	AMLASSMGQRDTFVGTNYMAPERISGSTYD--KSDIWSLGMVILECAIGRFPYIQSE-	270
V_vinifera	AMLGSSMGQRDTFVGTNYMSPERIKGSTYD--SSDIWSLGMVALECAIGHFPYMQSE-	270
A_thaliana	ASLASSMGQRDTFVGTNYMSPERISGSTYD--SSDIWSLGMVLECAIGRFPYLESE-	272
O_sativa	AVLASSMGQRDTFVGTNYMAPERISGSSYD--KSDIWSLGLVILECAIGRFPYIPSE-	272
Z_mays	AVLASSIGQRDTFVGTNYMAPERISGSTYD--KSDIWSLGLVILECAIGRFPYIPSE-	272
G_max_soybean	AIMESTSGQANTFIGTCNYMSPERINGSQEGYNFKSDIWSLGLILLECALGRFPYAPPD-	273
M_savita	AIMESTSGQANTFIGTNYMSPERINGSQRGYNYKSDIWSLGLILLECAMGRFPYTPPD-	273
P_crispum	AILATTSGQANTFVGTNYMSPERISGGQHG--SSDIWSLGLVLECATGYFPYSPPE-	271
D_melanogaster	GQLIDSMAN--SFVGTRSYMSPERLQGTHYSV--QSDIWSLGLSLVEMAIGMYPPIPPNT	287
B_mori	GQLIDSMAN--SFVGTRSYMAPERLQGSKYTI--LSDIWSLGLSLIEMAIGRFPPIPPTA	266
C_carpio	GQLIDSMAN--SFVGTRSYMSPERLQGTHYSV--QSDIWSLGLSLVEMAIGMYPPIPPDA	291
C_intestinalis	GQLIDSMAN--SFVGTRSYMSPERLQGTHYSV--QSDVWSMGLSLVLELAIGRFPPIPPDA	269
	: : *:*:*:	
OoMAPKK1	-----DQQSGPSFYELLQAIVGSPPPS	292
L_esculentum	-----DQQARPSFYELLDIAIVSSPPPS	292
N_tabacum	-----DQQAWPSFYELLEIAIVSSPPPS	292
V_vinifera	-----DQQSGPSFYELLEIAIVESPPPS	292
A_thaliana	-----DQQNPPSFYELLAIVENPPPT	294
O_sativa	-----GE-GWLSFYELLEIAIVDQPPPS	293
Z_mays	-----GE-GWLSFYELLEIAIVDQPPPS	293
G_max_soybean	-----QSETWESIYELIEAIVEKPPPS	295
M_savita	-----QSERWESIFELIETIVDKPPPS	295
P_crispum	-----QDEGWSNVFELMDTIVNQAPP	293
D_melanogaster	ATLESIFA-----DNAEES-----GQPTDEPRMAIFELLDYIVNEPPPK	327
B_mori	SQIAAIFNTEVS---GGSGKAPNP-----HDVARPMAIFELLDYIVNEPAPK	310
C_carpio	KTAAIFG-----GQNEHSP-----GQAPNSPRPMAIFELLDYIVNEPPPK	333
C_intestinalis	KELEAIFGRPVLDKGGAEGHSMSPRQPPGRPVSGHGMDSRPMAIFELLDYIVNEPPPK	329
OoMAPKK1	APPDQFSPEFCFSFVSACVQKDPDRSSALELLSHPFIKKFEEKDIDLSIYVGS LGSPVNI	352
L_esculentum	APVDQFSPEFCFSFVSACIQKDPDRSSALDLLSHPFVKKFEDKDIDL SILVSSLEPPVNF	352
N_tabacum	APADQFSPEFCFSFVSACIQKDPDRSSALDLLSHPFIKKFEDKDIDFGILVSSLEPPVNF	352
V_vinifera	APPDQFSPEFCFSFISACIQKNPQDRSSLDLVSHPFIKKFEDKDIDL EILVGSLEPPVNF	352
A_thaliana	APSDQFSPEFCFSFVSACIQKDPARASSLDLLSHPFIKKFEDKDIDL GILVGTLEPPVNY	354
O_sativa	APADQFSPEFCAFISSCIQKDPARMSASELLNHPFIKKFEDKDLDRILVLEPPMNI	353
Z_mays	APADQFSPEFCFSFISCIQKDPARMSASELLNHPFLKKFEDKDLNLGILVENLEPPMNI	353
G_max_soybean	PPSEQFSTEFCSFISACLQKDPKDRLSAQELMAHPVNMYYDLEVDLSAYFSNAGSPLAT	355
M_savita	APSEQFSEFCFSFISACLQKDPGRSLSAQELMELPFISMYDDLHVLDLSAYFGDAGSPLAT	355
P_crispum	APPDEFSEFCFSFVSACVQKDPKRKPSANELLRHPFINMYEHLNIDLGYFTEAGSPLAT	353
D_melanogaster	LEHKIFSTEFKDFVDICLKKQDPERADLKTLLSHPWIRKAELEVDISGWVCKTMDLPPS	387
B_mori	LPQGIFFKDFKDFVASCCLKKEPKERSDLGELMKAPFIKNVSLTQYEFKWKVCTMGLKAP	370
C_carpio	LPSGIFSDDEFKDFVDRCLKKNPDERADLKTLMNHEWIRKAEAEKVVDIAGWVCKTMDLMP	393
C_intestinalis	LPHGVFTTDFEEFVMKCLMKNPADRADLKMMLGHTFIKRAEVEEVDFAGWMCKTMDLGPQ	389
OoMAPKK1	P-----	353
L_esculentum	PR-----	354
N_tabacum	PR-----	354
V_vinifera	PR-----	354
A_thaliana	LR-----	356
O_sativa	SE-----	355
Z_mays	PE-----	355
G_max_soybean	L-----	356
M_savita	L-----	356
P_crispum	L-----	354
D_melanogaster	TPKRNTSPN-----	396
B_mori	SPDTPVD-----	377
C_carpio	-----	404
C_intestinalis	STPTHSAE-----	397

Şekil 3.32. *OoMAPKK1*'e ait aminoasit dizi bilgisi ile diğer canlılara ait MAPKK aminoasit dizi bilgilerinin EBI veritabanında Dbclustal programında standart ayarlar kullanılarak dikey hizalanması (Kırmızı yıldızlar ve noktalar MAPKK motif bölgeleridir)

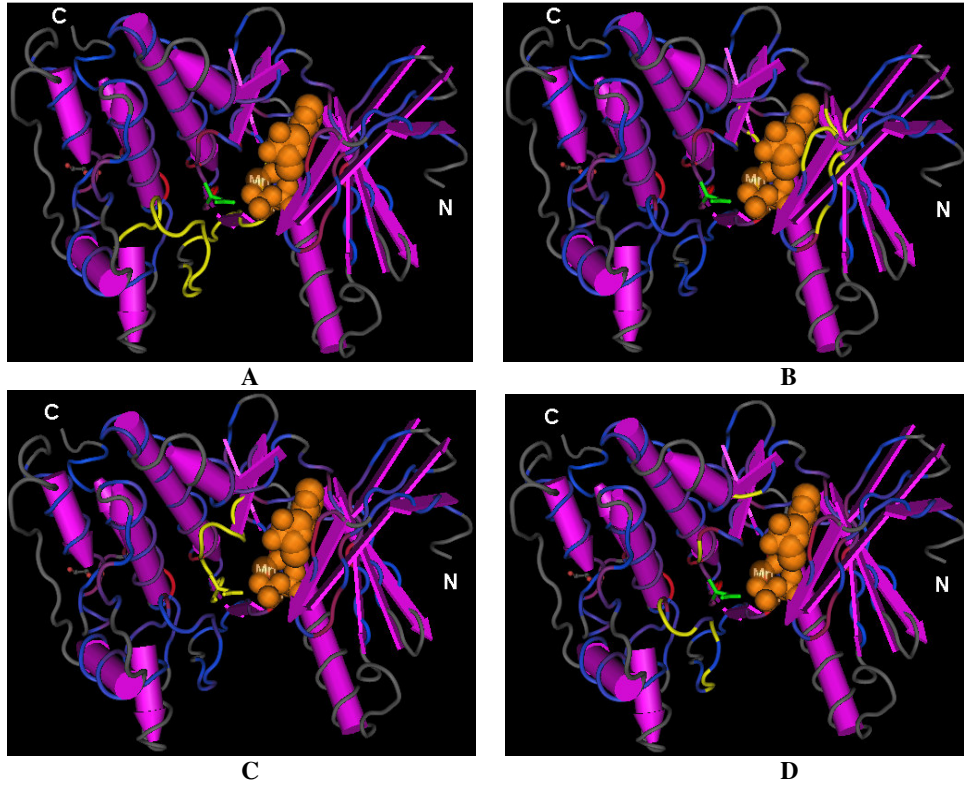


Şekil 3.33. *Origanum onites* OoMAPKK1'in diğer bitki MAPKK'leri arasındaki filogenetik ilişki.

Filogenetik ağaç, amino asit dizisindeki genetik uzaklık temel alınarak <http://www.genebee.msu.su> adresindeki webphylyp programında standart ayarlar ve phylogram görünüm kullanılarak çizilmiştir (EBI veri tabanı kodları: Q66MH7: *L.esculentum* MAPKK, Q9AYN9: *N.tabacum* NQK1 MAPKK, A5C0U3: *V.vinifera* MAPKK, Q9FJV0: *A.thaliana* MAPKK6, Q0Z7Z4: *O.sativa* MAPKK6, 049975: *Z.mays* ZmMEK1 MAPKK, Q5JCL0: *G.max* (soybean) MAPKK2, , Q93WR7: *M.sativa* MAPKK, Q6QMT5: *P.crispum* MAPKK2, Dış grup olarak: Q24324: *D.melanogaster* MAPKK, Q90321: *C.carpio* MAPKK, Q3C2L3: *B.mori* ERK MAPKK, Q4H383: *C.intestinalis* MAPKK, Ağacın dallanma köklerinde (nod) kırmızı rakamlarla yazılmış değerler, 100 örnekleme göre yapılmış ve yüzdelerik değer olarak ifade edilmiş bootstrap –tekrarlanma- değerleridir

Filogenetik ağaç içine dış grup olarak farklı hayvanlar alemi üyelerinden 4 tür eklenmiştir. Bu ağaçta hayvanlar aleminin oluşturduğu dış grup bitkiler aleminden ayrılmış ve farklı bitki MAPKK'lerinin amino asit dizilerindeki homoloji doğrultusunda üç alt grup grupta toplanmıştır. *OoMAPKK1*, *L. esculentum* (domates), *N. tabacum* (tütün) ve *V. vinifera* (asma) ile birlikte dikotil bitkilerin oluşturduğu I. alt grupta yer almıştır. *O. sativa* ve *Z. mays*'ın bulunduğu monotokil bitkiler diğerlerinden ayrı II. Grupta toplamışlardır. Bununla birlikte III. grubu oluşturan bitkiler (*G. max*, *M. sativa*, *P. crispum*)'de dikotil bitkiler

olup diğerk iki gruptan ayrı görünmektedirler. *OoMAPKK1* amino asit dizisi NCBI gen bankasına girilerek Cn3D 4.1 adlı 3D protein analiz programında enzimin 3 boyutlu yapısı çıkartılmıştır. *OoMAPKK1* geninin NCBI veri tabanında değerlendirilerek belirlenen Aktivasyon bölgesi, ATP bağlanma bölgesi, Katalitik bölge ve Substrat bağlanma bölgesi, 3 boyutlu yapı üzerinde sarı renkle işaretlenerek gösterilmiştir (Şekil 3.34).



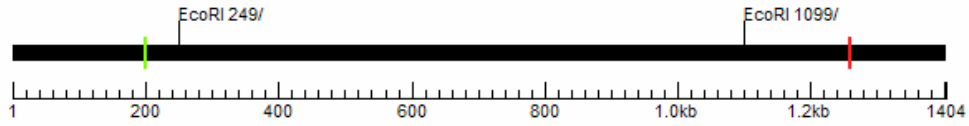
Şekil 3.34. *OoMAPKK1* enziminin NCBI Cn3D 4.1 programına göre 3 boyutlu protein yapısı. A) Aktivasyon bölgesi, B) ATP bağlanma bölgesi, C) Katalitik Bölge, D) Substrat bağlanma bölgesi. İlgili bölgeler şekiller üzerinde sarı renkle gösterilmiştir

3.1.5.3. *Origanum onites* *OoMAPKK1* Geninin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi (Haritalanması)

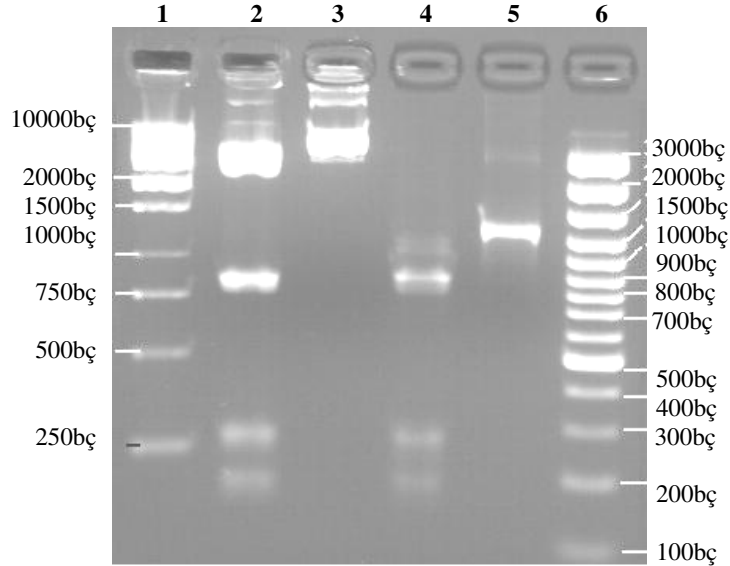
Elde ettiğimiz tüm gene ait nükleotid dizisi üzerinde Gen tool analiz programıyla yaptığımız biyoinformatik çalışmada UTR bölgeleriyle birlikte tüm *OoMAPKK1* geninin (UTR'lı 1404 bç) *EcoRI* enzimiyle 2 bölgeden (249. ve 1099. bç, Şekil 3.35.) kesime uğradığı tespit edilmiştir. Bu enzim ile yapılacak bir

kesim reaksiyonu sonunda ~240 bç, ~300 bç ve ~850 bç'lik 3 bant beklenmiştir. Bu kesim reaksiyonu aynı zamanda biyoinformatik bilginin deneysel olarak ispatını da sağlamada kullanılmıştır.

pGEM-T Easy plazmiti çoklu klonlama bölgesinin her iki ucunda *EcoRI* enzimine ait kesim bölgeleri içermektedir. MAPKK genini taşıyan bu plazmitler (3015 bç + ~1400 bç insert) *EcoRI* enzimi ile kesim reaksiyonuna uğratılmış ve *OoMAPKK1* cDNAsını taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 3.36). Kesim reaksiyonu *OoMAPKK1* cDNAsının nükleotid dizisinden biyoinformatik olarak elde edilen bilgiyi doğrulayan beklenen büyüklükteki 3 bantı vermiştir. Aynı kesim reaksiyonu saflaştırılmış *Oo17*-MAPKK cDNA'sına uygulanmış ve ~1400 bç'lik genin kesimiyle aynı 3 bantın oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.36.).

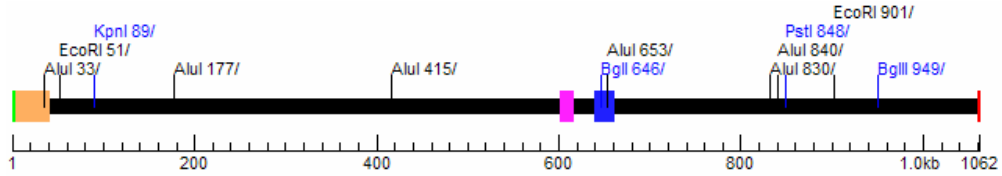


Şekil 3.35. *Oo17*-MAPKK tüm cDNAsının (1404 bç) *EcoRI* enzimiyle kesiminin Gen tool analiz programıyla gösterilmesi (yeşil bölge: Start kodon, kırmızı bölge: Stop kodon)



Şekil 3.36. *OoMAPKK1* tüm cDNAsının *EcoRI* ile kesim reaksiyonu. 1) Fermentas 1 kb marker, 2) Geni taşıyan plazmitin kesimi, 3) Plazmitin kesilmemiş hali, 4) Kesilmiş *OoMAPKK1* tüm cDNA PZR ürünü, 5) Kesilmemiş *OoMAPKK1* cDNA PZR ürünü, 6) Gene Ruler 100 bp plus marker

UTR bölgeleri çıkartılmış olan *OoMAPKK1* geninin GeneTool 1.0 programıyla biyoinformatik olarak program içeriğindeki genel restriksiyon enzimleri (*Alu I*, *BamH I*, *Bg II*, *Bg III*, *EcoRI*, *Hind III*, *KpnI*, *Pst I*, *PvuII*, *Sal I*, *Sma I*, *Xba I*) ile kesim bölgeleri Şekil 3.37’de verilmiştir.



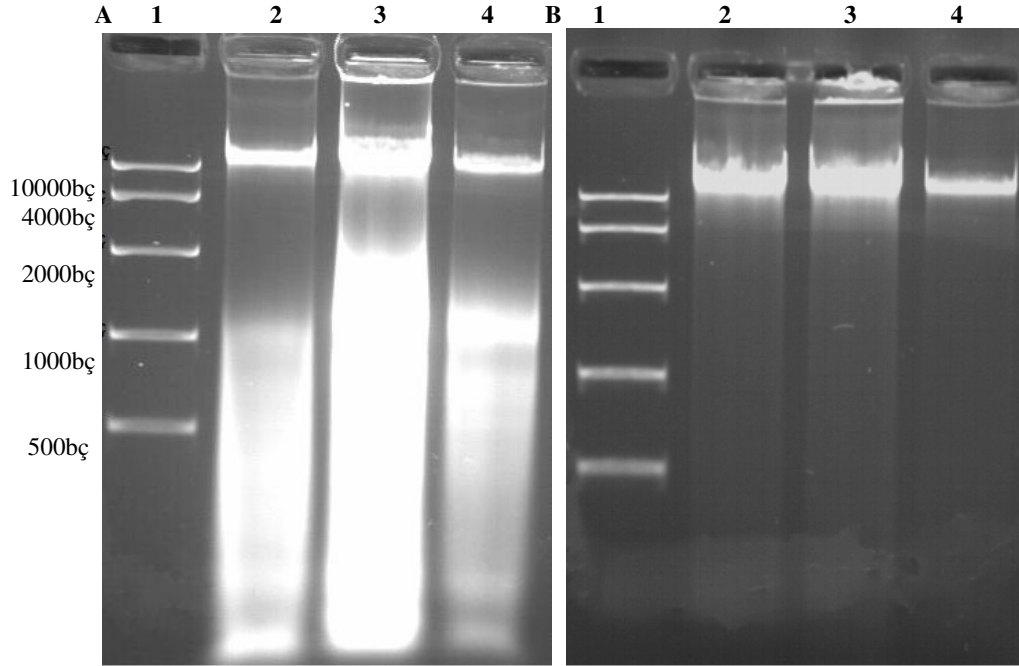
Şekil 3.37. *OoMAPKK1* geninin GeneTool 1.0 programıyla genel restriksiyon enzimleriyle kesim bölgelerinin gösterilmesi (yeşil: Start kodon, kırmızı: Stop kodon, Turuncu: Substrat bağlanma bölgesi, pembe: fosforilasyon bölgesi, mavi: katalitik bölge)

3.2. *OoMAPKK1* Geninin *O. onites* Genomundaki Kopya Sayısının Belirlenmesi

3.2.1 *Origanum onites* DNA’sının izolasyonu

3.2.1.1. DNA Purification Kit ile Saflaştırma

Sıvı azotla öğütülmüş 50-100 mg *O. onites* dokusu, Fermentas DNA Purification Kit ile izole edilmiş ve 5 µl genomik DNA, % 0.8’lik agaroz jel’e bantlarının moleküler ağırlığı bilinen Fast Ruler DNA marker ile karşılaştırılacak şekilde yüklenmiştir (Şekil 3.38a). Genomik DNA’da RNA kalıntısı görüldüğü için RNaz A enzimi ile muamele edilmiştir. RNaz A ile muamele edilen genomik DNA tekrar % 0.8’lik agaroz jelle yüklendiğinde RNA bulutunun kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 3.38b).



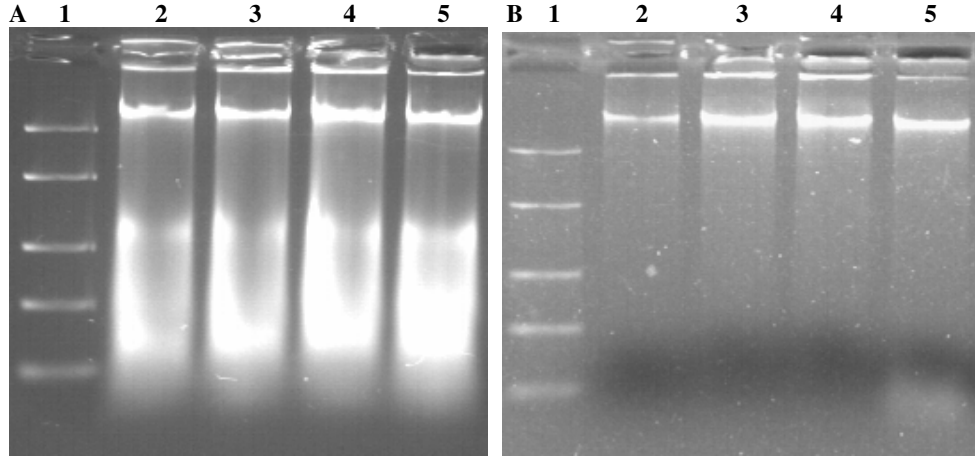
Şekil 3.38. DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen *O.onites* genomik DNA örnekleri. A) RNaz muamelesi yapılmadan önce 1) Fast Ruler Marker, 2, 3 ve 4)RNA içeren DNA örneklerinin; B) RNAase muamelesi yapıldıktan sonra 1) Fast Ruler Marker, 2, 3 ve 4) RNA içermeyen DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Fast Ruler DNA marker DNA'nın ng cinsinden miktarının belirlenmesine imkan sağlamaktadır. 5 µl marker yüklendiğinde her bir bant 20 ng ağırlığındadır. Jel resimlerinde görülen *O. onites* genomik DNA'larından 5'er µl örnek yüklenmiş ve sırasıyla ~30 ng/µl, ~75 ng/µl ve ~25 ng/µl şeklinde hesaplanmıştır.

En yoğun genomik DNA'ya sahip olan 2. örnek Beckman Coulter UV spektrofotometre'de 200 kat dilüe edilerek yapılan ölçümlerde 720 ng/µl şeklinde bir değer çıkmış ve spektrofotometrik ölçümlerde büyük sapmaların olabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle spektrofotometrik ölçümlerin yanında veriler, DNA örnekleri %0.8'lik agaroz jelde Fast Ruler DNA marker ile birlikte yüklenmiştir. Bu marker ile bant yoğunluklarına bakılarak DNA miktar tayini yapılmış ve spektrofotometrik ölçüm değerleri teyit edilmiştir.

3.2.1.2. Klasik CTAB DNA İzolasyonu

Çalışmamızda 200-500 mg *O. onites* dokusu'nun sıvı azotla öğütülerek CTAB tamponuyla klasik DNA saflaştırma yöntemi de denenmiş ve başarılı DNA izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon sonunda örnekler %0.8'lik agaroz jel'e 3 µl (her band 12 ng) Fast Ruler DNA marker'la birlikte yüklenmiştir. Klasik genomik DNA izolasyonunda da RNA kalıntısı görülmüş (Şekil 3.39a) ve DNA örneğine 0.2 mg/ml olacak şekilde RNaz A enzimi eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler tekrar agaroz jel'e yüklendikten sonra RNA'ların oluşturduğu bulutun yok olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.39b).

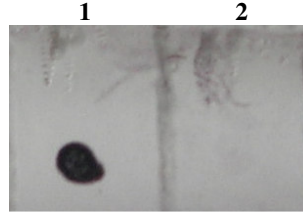


Şekil 3.39. Klasik CTAB genomik DNA izolasyonu. **A)** RNaz ile muamele edilmemiş **1)** Fast Ruler Marker, **2, 3, 4** ve **5)** RNA içeren DNA örneklerinin; **B)** RNaz muamelesi yapıldıktan sonra **1)** Fast Ruler Marker, **2, 3, 4** ve **5)** RNA içermeyen DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü

3.2.2. Southern Blot

Southern blotlama deneyi için yaklaşık 1400 bç'lik gen ürünümüz jelden saflaştırılarak radyoaktif olmayan DIG DNA labelling kiti ile işaretlenmiş ve bulucu DNA (prob) haline getirilmiştir. Probun çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla + yüklü naylon membran parçası üzerine prob DNAsı taşıyan plazmit DNA (+ kontrol) ve boş klonlama plazmiti PTZ57R/T (-kontrol) DNA'sından

yaklaşık 5µl emdirilmiş ve prehibridizasyon, hibridizasyon ve deteksiyon aşamalarından sonra işaretli probun çalıştığı görülmüştür (Şekil 3.40.).

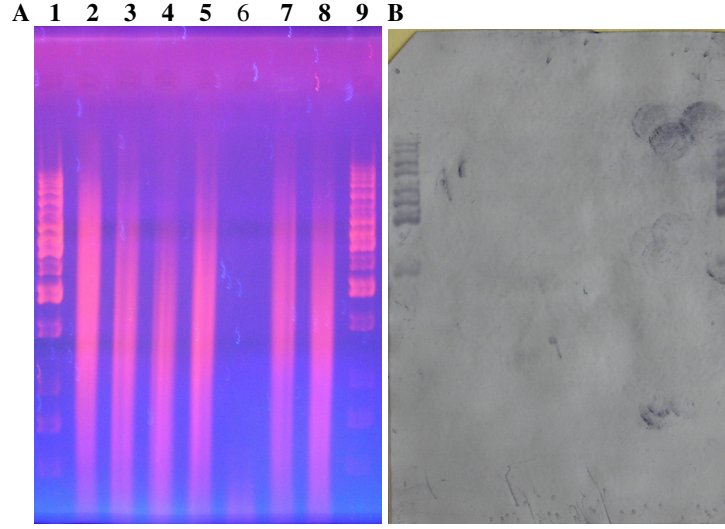


Şekil 3.40. İşaretli DNA probunun işaretleme ve özgünlük açısından test edilmesi. 1) Pozitif kontrol (*Oo17*-MAPKK tüm cDNA'sını içeren PTZ57R/T plazmiti, 2) Negatif kontrol: boş PTZ57R/T plazmiti

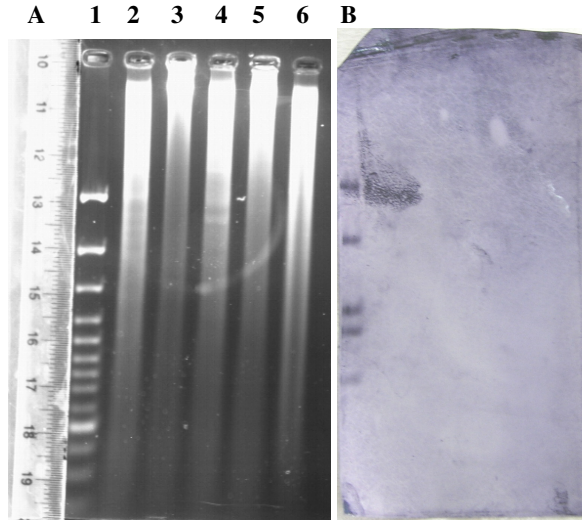
O. onites genomik DNA'sı her bir reaksiyon 10 µg DNA içerecek şekilde *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *DraI*, *PstI*, *SpeI* enzimleriyle bir gece 37°C'de kesime uğratılmış ve ertesi gün 3.5 µl 6X yükleme tamponu eklenerek reaksiyonlar sonlandırılmıştır. Bu reaksiyon karışımları % 0.8'lik agaroz jele 1kb marker ile yüklenmiş ve gece boyunca 15 volt'ta yürütülmüştür. Agaroz jeldeki kesim reaksiyonun resmi çekilmiş (Şekil 3.41a) depürinasyon, denatürasyon ve nötralizasyon işleminden sonra southern blotlama ile fragmentler +yükü nasyon membrana aktarılmıştır.

Sonrasında membran işaretlenmiş MAPKK probuyla bir gece 55°C'de hibridize edilmiştir. Hibridizasyondan sonra boyanan membranda probun sadece 1 kb DNA ladder'ın 3000 bç ve üzeri büyüklükte bantlarına bağlandığı görülmüştür (Şekil 3.41b).

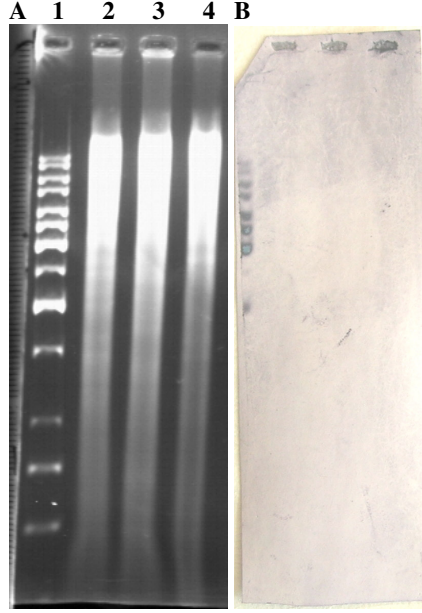
Southern blot yöntemi prob hibridizasyonunda farklı ısıların (68, 52 ve 42°C) denenmesi ile tekrarlanmış, fakat sonuç elde edilememiştir (Şekil 3.42, 3.43, 3.44).



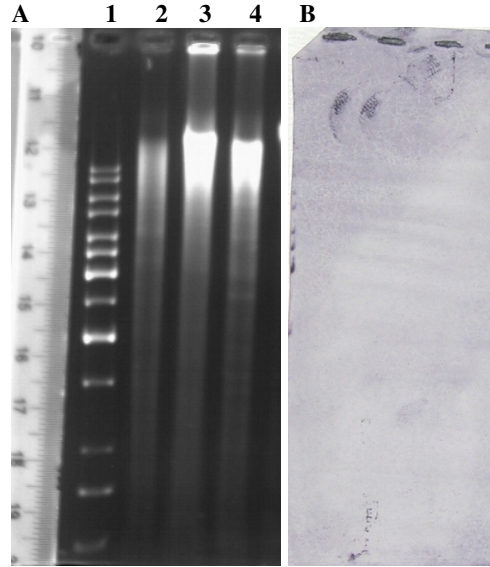
Şekil 3.41. Southern Blot yöntemiyle *OoMAPKK1*'in genomik kopya sayılarını belirleme. **A)** Restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılan *O. onites* genomik DNA'sının jel elektroforezi **1 ve 9)** Fermentas 1 kb marker, **2)***EcoRI*, **3)** *HindIII*, **4)** *BamHI*, **5)** *XbaI*, **6)** *DraI*, **7)** *PstI*, **8)**:*SpeI* ile kesim; **B)** Southern Blotlama sonrasında naylon membranın görüntüsü



Şekil 3.42. Hibridizasyon ısısı 68°C olan ikinci Southern Blot denemesi. **A)** Restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılan *O. onites* genomik DNA'sının jel elektroforezi **1)** Gene Ruler 100bp plus marker, **2)** *EcoRI*, **3)** *HindIII*, **4)** *BamHI*, **5)** *XbaI*, **6)** *SpeI* ile kesim; **B)** Southern Blotlama sonrasında naylon membranın görüntüsü

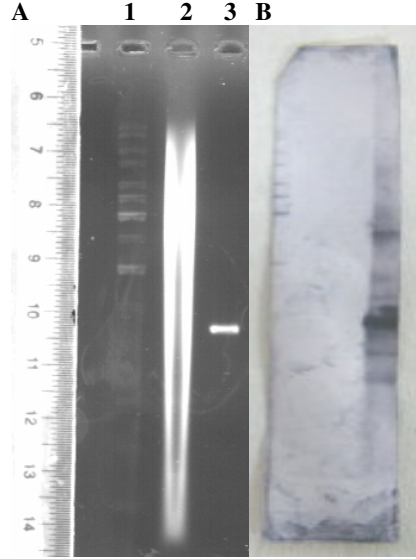


Şekil 3.43. Hibridizasyon ısısı 52°C olan Southern Blot denemesi. **A)** Restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılan *O. onites* genomik DNA'sının jel elektroforezi **1)** Fermentas 1 kb marker, **2)** *EcoRI*, **3)** *HindIII*, **4)** *BamHI*, ile kesim; **B)** Southern Blotlama sonrasında naylon membranın görüntüsü



Şekil 3.44. Hibridizasyon ısısı 42°C olan Southern Blot denemesi. **A)** Restriksiyon enzimleriyle kesime uğratılan *O. onites* genomik DNA'sının jel elektroforezi **1)** Fermentas 1 kb marker, **2)** *EcoRI*, **3)** *HindIII*, **4)** *BamHI*, ile kesim; **B)** Southern Blotlama sonrasında naylon membranın görüntüsü

Bunun yanında, southern blotlamada kullanılan genomik DNA izolasyon metodu değiştirilmiş ve CTAB metodu (Doyle 1987) ile izole edilen DNA ile deneyler tekrar edilmiştir, fakat yine sonuçta bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.45).

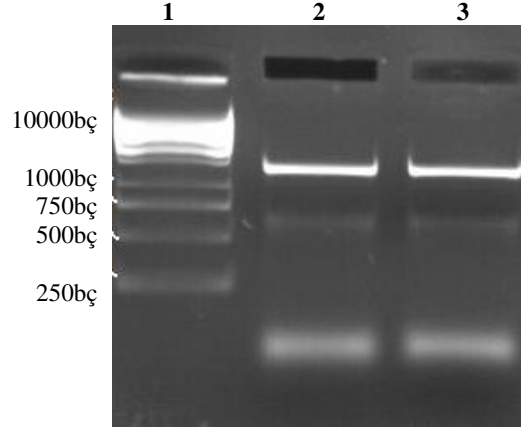


Şekil 3.45. CTAB yöntemi ile izole edilen *Origanum* genomik DNAsı kullanılarak tekrarlanan Southern blotlama. **A) 1)** Fermentas 1kb marker **2)** *EcoRI* ile kesilen genomik DNA **3)** *OoMAPKK1* tüm cDNA'sını içeren plazmit %0.8'lik jelde koşturulmuştur. **B)** Hibridizasyon sonrası işaretli prob kendisini görmektedir, fakat *EcoRI* ile kesilmiş genomik DNA'da herhangi bir bantlaşma görülememiştir

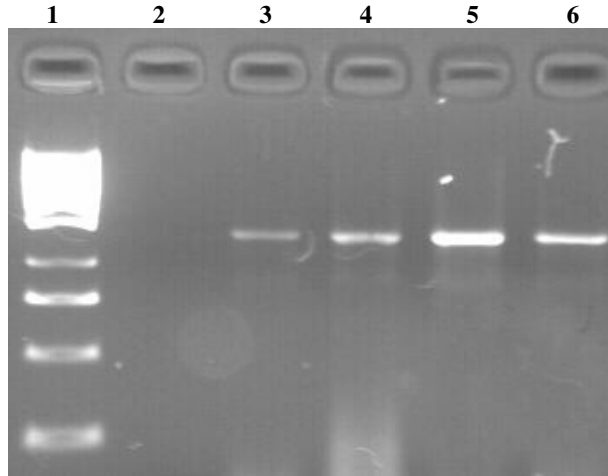
3.3. *OoMAPKK1* Geninin Farklı Doku ve Farklı Stres Koşullarında mRNA Düzeyinin Araştırılması

O. onites bitkisinin farklı dokularında *OoMAPKK1*'in aktif olup olmadığını araştırmak için yaprak, gövde ve kök materyallerinden sırasıyla 702.8 ng/ μ l (OD_{260/280}: 2.05), 946 ng/ μ l (OD_{260/280}: 1.96) ve 210,5 ng/ μ l (OD_{260/280}: 2.06) miktar ve saflıkta RNA örneklerinden RT-PZR kurulmuş ve reaksiyon ürünleri %1.4'lük agaroz jele yüklenerek yürütülmüş ve fotoğraflanmıştır. Yaprak (Şekil 3.46) ve gövde (Şekil 3.47) materyalinde *OoMAPKK1*'in aktif olduğu gözlenirken, kök materyalinde herhangi bir ürün bandı görülmemiştir. Gövde Rt-

PZR için kalıp optimizasyonu yapılmış ve en iyi 1/25'lik (~40 ng) kalıpta en iyi bandı vermiştir.



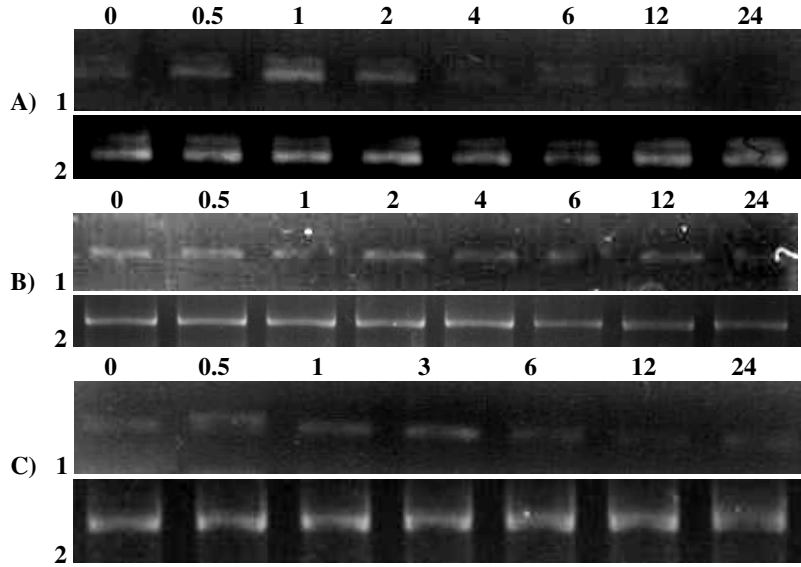
Şekil 3.46. *O. onites* yaprak materyalinde RT-PZR sonucu *OoMAPKK1* cDNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. 1) Fermentas 1kb marker, 2 ve 3) ~1400 bç'lik RT-PZR ürünü



Şekil 3.47. *O. onites* gövde materyalinde RT-PZR sonucu *OoMAPKK1* geni ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. 1) Fermentas 1kb marker, 2) Negatif kontrol: DNA kontaminasyonu olmadığını gösteren RNA'dan kurulan PZR reaksiyonu, kalıp optimizasyonu için 3) 1/10 dilüsyon, 4) 1/50 dilüsyon 5) 1/25 dilüsyon, 6) 1/100 dilüsyon

O. onites bireyelerine farklı zaman dilimlerinde ABA (absesik asit), yaralanma ve soğuk (+4°C) stresleri uygulanmıştır. Stresler yaprak dokusunda izlenmiştir. ABA stresi için 0.5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde 0.1 mM'lık

ABA çözeltisi bitki yapraklarına spreylenecek uygulanmıştır. Soğuk stresi için bitkiler 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saatlik sürelerde +4°C’de tutulmuşlardır (Zhang ve ark. 2006b). Yaralanma stresi için ilk yaralanma stresi uygulandıktan sonra 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saatlerde kesilen yapraklardan RNA izolasyonu yapılarak stres sürerliliği devam ettirilmiştir. Her stres için PZR döngü sayısı 25’dir. RT-PZR reaksiyonları için *OoMAPKK*’e ait UTR bölgelerine tasarlanmış ileri (F1MAPKK1-5’UTR 5’GAGAGGAGAGAGAGAGTACCGTTG3’) ve geri (R2-MAPKK1-3’UTR 5’CAYTTAAACCGAGAATAACATCACTTAC3’) primerler ile birlikte reaksiyonda kullanılacak kalıp miktarının aynı olduğunu göstermek için kontrol olarak Actin genine ait primerler ileri aktin primeri (P-FACT: ATGGCYGABRCTGABGACATTCARCC) ve geri aktin primeri (P-RACT: GAAGCAYTTYCTGTGRACAATBSMTGGACC) kullanılmıştır. Reaksiyon sonuçları %1.4’lük agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 3.48)



Şekil 3.48. *OoMAPKK1* geninin farklı stres koşullarındaki mRNA düzeylerinin araştırılması. A) Soğuk, B) yaralanma ve C) ABA streslerinde *OoMAPKK1* (1) ve Aktin (2) mRNA’sının transkripsiyon seviyelerinin, %1.4’lük agaroz jelde 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 ve 24 saat uygulanan stres koşullarına göre değişimi

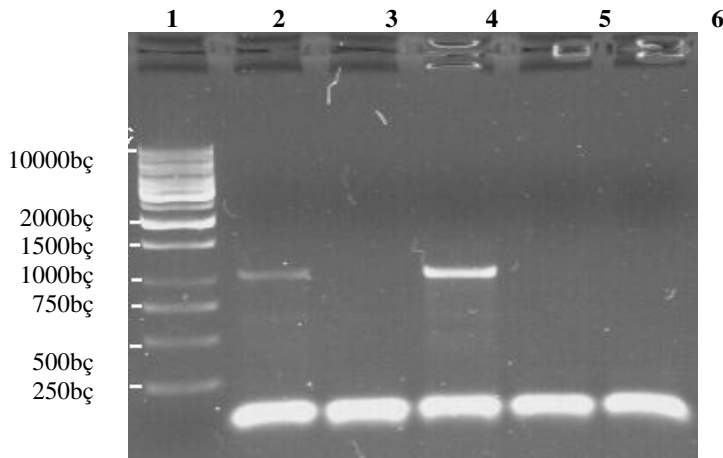
OoMAPKK1 ekspresyonunun hangi stres koşullarında arttığını gözlemek amacıyla kekik bitkilerine yara, soğuk (+4°C) ve ABA (abscisik asit) stresleri uygulanmıştır. Farklı saatlerde bitkilerden alınan yaprak örneklerinden

RNA izole edilmiş ve geri transkripsiyonla cDNA'ları elde edilmiştir. Bu cDNA'lardan *OoMAPKK1* 3' ve 5' UTR bölgelerine tasarlanan gen spesifik primerler ve pozitif kontrol için aktin primerleri kullanılarak RT-PZR reaksiyonları kurulmuştur. Soğuk stresinde 0. saatten 0.5., 1. ve 2. saatlerinde mRNA seviyesinde artma görülürken 4. saatten itibaren azalma ve 24. saatte de kaybolma görülmektedir. Yara stresinde 0.5. saatten 1. saate mRNA seviyesinde artış görülürken 2., 4., 6., 12. saatlerde aynı düzeyde devam etmiş ve 24. saatte düşme görülmüştür. ABA stresinde 0.5. saatten 1. ve 3. saatte aynı düzeyde mRNA görülürken 6. saatten 24 saate kadar fazla düşüş görülmemiştir.

3.4. *Origanum onites* MAPKK1 Proteininin *E. coli*'de Rekombinant Olarak Üretilmesi

3.4.1. UTR Bölgesi Olmayan *Origanum onites* MAPKK Geninin Eldesi

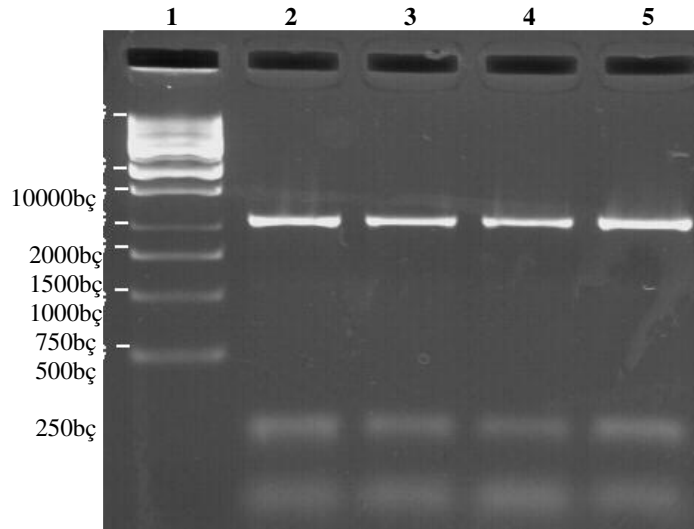
OoMAPKK1 proteinin rekombinant olarak üretebilmek için start ve stop kodonları içeren yönlendirilmiş *Ex-OoMAPKK1F* (ileri) ve *Ex-OoMAPKK1R* (geri) primerleri tasarlanmıştır. Bu primerler ile yapılan ısı skalası PZR sonuçları % 1.4'lük agaroz jele yüklenmiş (Şekil 3.49) ve 57.3 °C'de primerlerin en iyi çalıştığı gözlenmiştir.



Şekil 3.49. UTR'sız *OoMAPKK1* geni için temperature gradient PZR sonuçları. **1)** Fermentas 1kb marker, **2)** 52 °C, **3)** 54.8°C, **4)** 57.3°C'de 1062 bp'lik ürün en iyi verimdedir, **5)** 60.9°C, **6)** 65.1°C

Reaksiyon için optimum primer oturma sıcaklığı bulunduğundan sonra hatalı nükleotid ekleme olasılığı *Taq* polimeraza göre daha az olan *Pfu* DNA polimeraz ile reaksiyon 57.3°C’de yeniden kurulmuş ve reaksiyon sonuçları %1.4’lük agaroz jele yüklenmiştir .

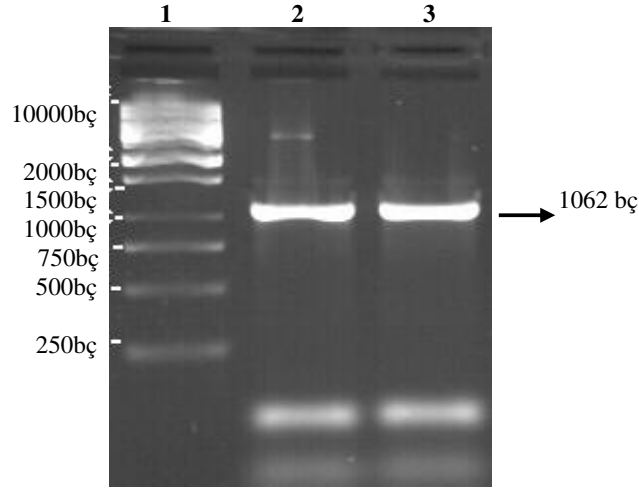
DNA dizi analizi sonuçlarına göre PZR ürünü 1062 bç beklenmektedir. Agaroz jeldeki ürün görüntüsü de bunu doğrular niteliktedir (Şekil 3.50). pMAL Protein Füzyon and Saflaştırma Sistemi kit protokolünde belirtilen PZR ürününü saflaştırma protokolüne göre ürün ligasyon reaksiyonuna hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.50. *OoMAPKK1* genini elde etmek için *Pfu* DNA polimeraz ile yapılan PZR reaksiyon sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü 1) Fermentas 1kb marker, 2, 3, 4 ve 5) 1062 bç’lik ürün

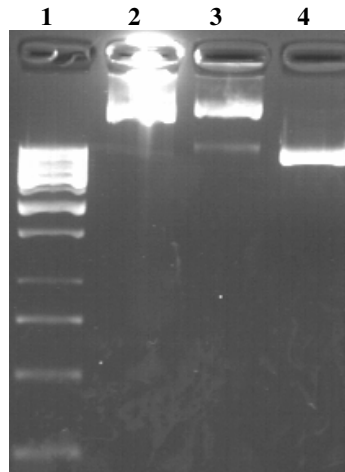
3.4.2. *Origanum onites* MAPKK1 Geninin Ekspresyon Plazmitine Aktarılması ve *E. coli*’ye Transformasyonu

Saflaştırılan PZR ürünü ve pMAL Protein Fusion and Purification System kitindeki (New England Biolabs) pMAL-p2x plazmiti *Hind III* ve *BamH I* enzimleriyle kesime uğratılmıştır. pMAL-p2x plazmitine ligasyon ile *OoMAPKK1* geni eklenmiş ve plazmit transformasyon ile konakçı bakteri hücrelerine (TB1 ve XLI-Blue) aktarılmıştır. Koloni PZR yöntemi ile ürün içeren plazmitin olduğu koloniler tespit edilmiştir (Şekil 3.51).

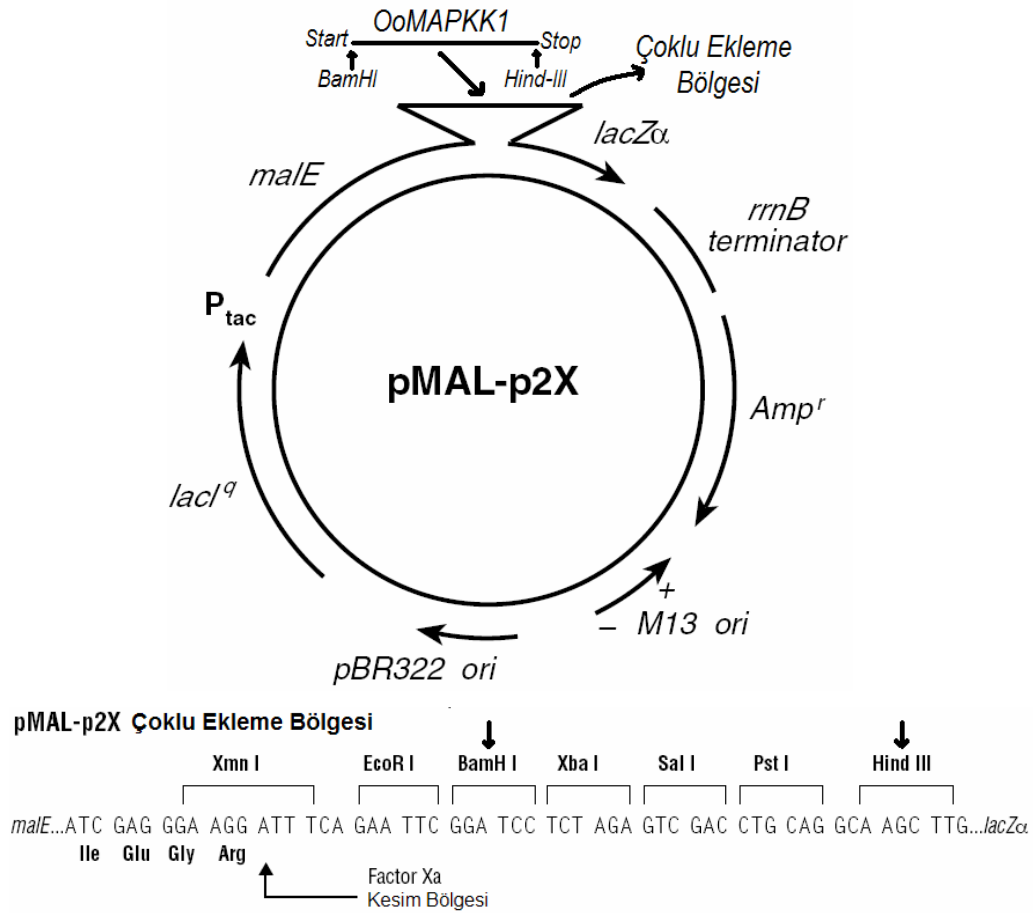


Şekil 3.51. XLI-Blue ve TB1 kolonilerinden kurulan koloni PZR reaksiyonu sonuçları. 1) Fermentas 1kb marker, 2) XLI-Blue kolonisinden 1062 bç'lik PZR ürünü, 3) TB1 kolonisinden 1062 bç'lik PZR ürünü

Ayrıca, bu kolonilerin *OoMAPKK1* genini taşıyan pMAL-p2x plazmiti içerip içermediğini teyit etmek için *OoMAPKK1* geninin 3' ucunda bulunan *Hind III* kesim bölgesi sayesinde plazmit *Hind III* enzimiyle kesime uğratarak lineer hale getirilmiş ve % 1.2'lik agaroz jele yüklenmiştir ve fotoğraflanmıştır (Şekil 3.52). Bu kesim işlemiyle geni taşıyan plazmitin varlığı teyit edilmiştir. *OoMAPKK1*'in pMAL-p2x plazmitine nasıl eklendiği Şekil 3.53'de verilmiştir.



Şekil 3.52. pMAL-p2x plazmitinin *Hind III* enzimiyle kesimi. 1) Fermentas 1kb marker, 2) Kesilmemiş boş pMAL-p2x plazmit, 3) Kesilmemiş insert'lü pMAL-p2x plazmiti 4) *Hind III* ile kesilmiş insert'lü pMAL-p2x plazmiti

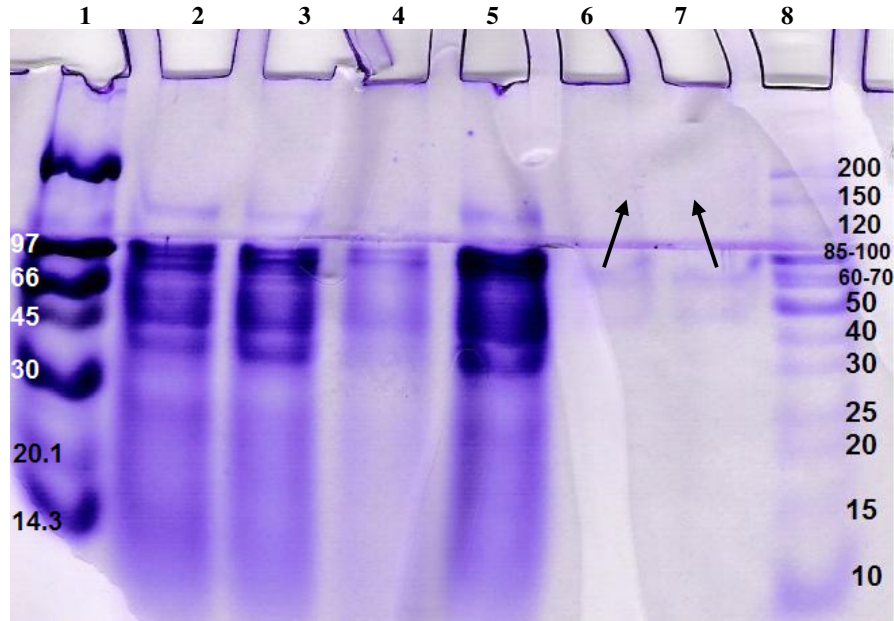


Şekil 3.53. *OoMAPKK1* geninin pMAL-p2x (6721bç) translyasyon plazmitine eklenmesi. *OoMAPKK1* geninin start bölgesine *BamHI*, stop bölgesine *Hind-III* restriksiyon enzimi kesim bölgesi eklenerek yönlendirilmiş ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. *OoMAPKK1* geni *malE* (maltoz) geni ile *lacZ* geni arasında start-stop yönünde eklenmiştir. *malE* geni ile *OoMAPKK1* geni arasında füzyon proteini ayırmaya yarayan Factor Xa kesim bölgesi bulunmaktadır. Plazmit üzerinde pBR322 orjin bölgesi, promotor ve terminator bölge, *lacI^q*, *malE* ve *Amp* (amfisilin) gen bölgeleri gösterilmektedir. Plazmitin gen ekleme bölgesindeki restriksiyon enzim bölgeleri gösterilmektedir (Biolab pMAL Protein Füzyon ve Saflaştırma Kit bülteninden uyarlanmıştır)

3.4.3. MBP-*OoMAPKK1* Füzyon Proteininin Belirlenmesi

pMAL-p2x plazmitine eklenmiş olan *OoMAPKK1* geninin (Şekil translyasyonu sonucu oluşan füzyon proteininin varlığının gözlenebilmesi ve

beklenen büyüklükte olup olmadığının belirlemek için pMAL Protein Füzyon and Saflaştırma Sistemi kitinde tavsiye elden pilot deney uygulanmıştır. pMAL-p2x plazmiti için tanımlanan toplam 6 örnek: (1) uyarılmamış ve 2) uyarılmış hücreler, 3) total hücre ekstratı, 4) total ekstratın çözünmeyen materyal kısmı, 5) amiloz resin'e bağlanan fraksiyon, ve 6) (sadece pMAL-p2x yapımı için) soğuk ozmotik şok prosedürüyle hazırlanmış bir periplazmik fraksiyon hazırlanmıştır. Tüm örnekler sırasıyla % 10'luk SDS-PAGE jeline, Amersham Biosciences High-Range Rainbow Molecular Weight Markers ve Fermantas Page Ruler unstained Protein Ladder ile birlikte yüklenerek yürütülmüştür (Şekil 3.54).



Şekil 3.54. *OoMAPKK1-MBP* füzyon proteininin *E. coli*'de rekombinant olarak sentezlenmesi. **1)** Rainbow protein marker **2)** Uyarılmamış hücre, **3)** Uyarılmış hücre, **4)** Total kaba hücre ekstratı, **5)** Kaba ekstraktan çözünmeyen materyal süspansiyonu, **6)** Amiloz resin'e bağlanmış protein içeren fraksiyon (MBP: ~42 kDa. + *OoMAPKK1*: 39.416 kDa = ~82 kDa.) ok ile gösterilmiş, **7)** Soğuk ozmotik şokla hazırlanmış periplazmik fraksiyon (~82 kDa füzyon protein) ok ile gösterilmiş, **8)** Fermantas PR protein marker

Sonuç olarak, 5. örnekte amiloaz resine bağlanan ve beklenen büyüklükteki füzyon protein (MBP: ~42 kDa. + *OoMAPKK1*: 39.416 kDa = ~82 kDa.) gözlenmiştir. Ayrıca 6. örnekteki periplazmik fraksiyonda da aynı büyüklükte bant gözlenmiştir.

Şekil 3.54’de oklar ile gösterilen bantların gerçekten *MBP-OoMAPKK1* füzyon proteinini temsil edip etmediği Western Blot deneyi ile teyit edilmediğinden şu aşamada kesin protein üretiminin yapıldığı söylenememektedir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Uzun yıllardır *Origanum türlerinin* içerdiği uçucu yağlar, birçok ilacın bileşimine katılan timol, karvakrol, simol gibi terpenik maddeleri içerdiğinden başta tıp olmak üzere kozmetik ve besin endüstrisini kapsayan bir çok alanda kullanılmaktadır (Baytop 1991; Kıtık ve ark. 1997; Baytop 1999; Başer 2001).

O. onites'in biçim yılları, biçim dönemleri ve biçim şekilleri arasında uçucu yağ oranları ve uçucu yağ bileşenleri (kavrakrol, timol, simol, lineol v.b. monoterpen ve terpenler) bakımından istatistiksel anlamda çevresel faktörlere bağlı olarak önemli farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Baydar 2002). Bitkiler çevresel şartları sinyal iletim yollarını kullanarak algırlar (Ragwal ve Agrawal 2003; Mishra ve ark. 2006). MAPK sinyal yolu bitkilerde çevresel uyarıların hücre içine iletiminde önemli role sahiptir (Morris 2001; Cardinale 2002; Ichimura ve ark. 2002; Nakagami ve ark. 2005).

Çalışmada öncelikli olarak *O. onites* bitkisine ait bir kodon sözlüğü bulunmadığı için klonlanmış tüm bitki MAPKK'larının nükleotid dizilerinin korunmuş bölgelerinden yarıbozuk primerler tasarlanmıştır. Yapıktan izole edilen kekik toplam RNA'sından Geri Transkripsiyonla cDNA populasyonu oluşturulmuş ve yarıbozuk primerlerle olası MAPKK cDNA'ları PZR ile çekilerek klonlanmıştır. Klonlanan ürünlerin dizi analizleri yapılmış ve 5 adet (*Oo4-MAPKK*, *Oo14-MAPKK*, *Oo17-MAPKK*, *Oo20-MAPKK*, *Oo23MAPKK*) olası MAPKK cDNA orta bölgesi elde edilmiştir. Bitki MAPKK'lerinde YMXPERI motifi aktif bölge motifidir (Ichimura ve ark. 1998b; Tena ve ark. 2001). Klonlanan cDNA'lardan *Oo17-MAPKK*, YMAPERI katalitik bölge motifi taşırken, *Oo20-MAPKK* ve *Oo23-MAPKK*'nin YMSPERI motifi taşıdığı amino asit dizi bilgilerinden belirlenmiştir. Diğer iki cDNA dizi bilgisi ise aktif bölge motifini kapsamamaktadır. Klonlanan bitki MAPKK'larında hem YMAPERI hem de YMSPERI motifi bulunmaktadır. Örneğin, *A. thaliana* bitkisindeki *AtMAPKK2* (Ichimura ve ark. 1998a), *AtMAPKK3*, *AtMAPKK4* (Ichimura ve ark. 1998b) ve tütün bitkisindeki SIPKK MAPKK'lerinin YMSPERI motifi taşıdıkları görülmüştür. *Zea mays* bitkisindeki *ZmMEK1* MAPKK'sinin YMAPERI motifi taşıdıkları bildirilmiştir (Hardin ve Wolniak 1998). Klonlanan 5 cDNA parçasının

elde edilen tahmini amino asit dizileri, EBI veritabanındaki Dbclustal programı kullanılarak diğer bitki amino asitleriyle dikey hizalanmaları yapılmış ve elde edilen veri Pyhlip yöntemine göre cluster algoritması ve bootstrap kullanılarak (www.genebee.msu.su) kısmi filogenetik ağacı çizilmiştir. Filogenetik ağaçtan elde edilen verilerde; *Oo4-MAPKK*, *Oo14-MAPKK* ve *Oo17MAPKK*'nin daha çok *A. thaliana*'da soğuk ve tuz streslerinde görevli *AtMAPKK6* enzimine yakın olduğu görülürken, *Oo20-MAPKK* ve *Oo23-MAPKK*'nin diğerlerinden ayrılarak yine *A. thaliana*'da soğuk ve tuz streslerinde aktif bir diğer MAPKK enzimi olan *AtMAPKK2*'e benzediği görülmüştür.

Klonlanan cDNA'lardan bir tanesi rasgele seçilerek, *Oo17-MAPKK*, klonlanacak hedef gen olarak belirlenmiştir. *Oo17-MAPKK* cDNA'sından elde edilen orta bölgenin nükleotid dizisi kullanılarak tasarlanan gen spesifik primerler ve oligodT₁₈/oligodG₂₀ primerleri ile cDNA'nın bilinmeyen 5' ve 3' uçları elde edilmiştir. *C. bungeana*'da *CbMAPK3* cDNA'sını klonlamak için 3' ve 5' RACE tekniği kullanılmış, fakat bizim yöntemimizden farklı olarak, oligodG₂₀ ve oligodT₁₈ primerleri yerine her iki yönde spesifik primerler kullanılarak cDNA'nın tamamı kullanılmıştır (Zhang ve ark. 2006b).

Oo17-MAPKK cDNA'sının 3' ve 5' UTR bölgelerine tasarlanan spesifik primerler ile cDNA'nın tamamı elde edilmiş ve *OoMAPKK1* olarak adlandırılmıştır. UTR bölgeleriyle birlikte 1404 bç olan *OoMAPKK1*'in 3' ucunda 19 bç uzunluğunda poliA kuyruğu bulunmaktadır. 5' ucunda 198bç'lik 5' UTR ve 3' ucunda 144 bç'lik 3' UTR bölgesi yer almaktadır. NCBI gen bankası veri tabanında yapılan araştırmada *Nicotiana. tabacum NQK1* MAPKK (NCBI Gen bank No: AB055514) cDNA'sının uzunluğunun 1387 bç, 5' UTR bölgesinin 179 bç, 3'UTR bölgesinin 114 bç, poliA kuyruğunun 29 bç ve açık okuma bölgesi (ORF)'nin 1065 bç; *Oryza sativa* MAPKK1 (NCBI Gen bank No: Q5QN75) cDNA'sının uzunluğunun 1643 bç, 5' UTR bölgesinin 132 bç, 3'UTR bölgesinin 428 bç, poliA kuyruğunun 15 bç ve açık okuma bölgesi (ORF)'nin 1068 bç ve *Petroselinum crispum* MKK2 (NCBI Gen bank No: AY533301) cDNA'sının uzunluğunun 1460 bç, 5' UTR bölgesinin 117 bç, 3'UTR bölgesinin 255 bç, poliA kuyruğunun 23 bç ve açık okuma bölgesi (ORF)'nin 1065 bç olduğu bulunmuştur. Liu ve ark.'da (2000) tütün bitkisinden klonlanan SIPKK (MAPKK)

cDNA'sının uzunluğunun 1715 bç, 5' UTR bölgesinin 123 bç, 3'UTR bölgesinin poliA kuyruğuyla birlikte 421 bç ve açık okuma bölgesi (ORF)'nin 1071 bç olduğunu bildirmişlerdir.

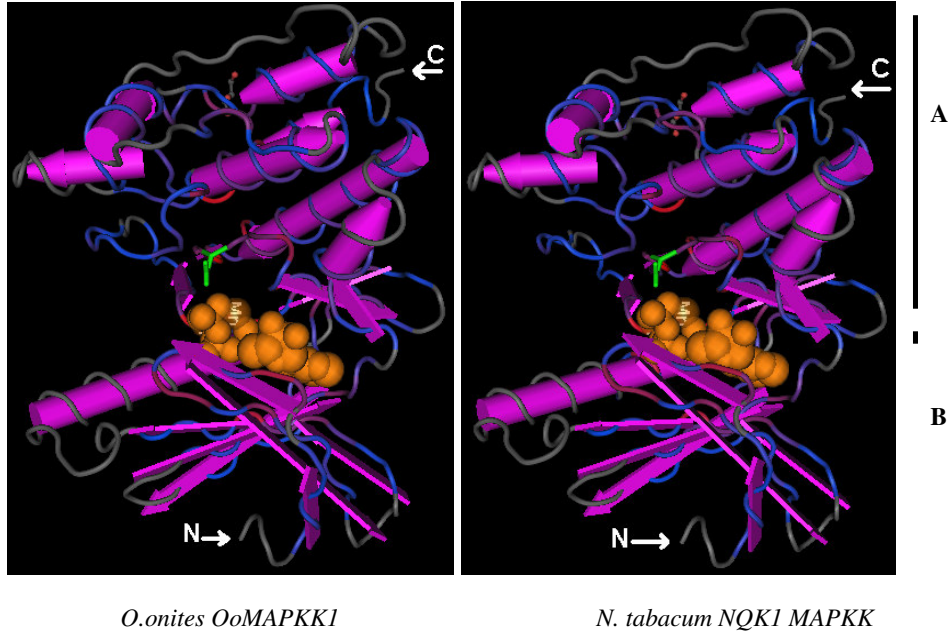
MAPKK enzim ailesinin karakteristik özelliği, 11 temel alt bölge içermeleri, N-terminal bölgede (K/R)-(K/R)-(K/R)-(X1-6)-(L)-(X)-(L/V/I) (Nakagami 2005; Cardinale 2002; Jonak 2002; Ichimura 2002) substrat (MAPK) bağlanma bölgesi motifi, -D-(L/I/V)-K- aktif bölge motifi, 7 ve 8. alt bölgeler arasında fosforilasyon motifi [maya ve hayvanlarda (S)-(X3)-(T/S), bitkilerde (S)-(X5)-(T/S)] (Nakagami 2005) ve 8. alt bölgede katalitik bölge motifi olan (Y)-(M)-(S/A)-(P)-(E)-(R)-(I) bulunmasıdır (Tena 2001). *OoMAPKK1* cDNA'sının tahmini aminoasit dizisi incelendiğinde bu motiflerin hepsini taşıdığı görülmektedir (Bkz. Bulgular, Şekil 3.29). Bunlardan ilki “**KLKK(PLKELK)L(S)V**” substrat bağlanma motifidir. Bu motifteki ilk üç K'dan (lisin) birincisiyle ikincisi arasında bir tane L (lösin) bulunmaktadır, aynı bölgede *L. esculentum LeMKK3* (Gen bank. No: AY691332)'de bir T (treonin), *N. tabacum NQK1* MAPKK (Gen bank. No: AB055514)'da iki T olarak bulunmaktadır (Soyano ve ark. 2003). Bu durum bazı bitki MAPKK'lerinde substrat bağlanma motifinin bilinen genel görünümünden farklı olabileceğini göstermektedir. *OoMAPKK1*'in taşıdığı bir diğer motifler ise “D-(L)-K”, aktif bölge motifi, SMGQRDT fosforilasyon motifi ve YMAPERI katalitik bölge motifleridir. DLK motifi *P. Crispum*, *M. sativa* ve *G. max* bitkilerinde bulunurken, *L. esculentum*, *N. tabacum* ve *O. sativa*'da DIK şeklindedir. SMGQRDT motifinin *L. esculentum*, *N. tabacum*, *V. Vinifera*, *O. sativa* ve *A. thaliana*'da (Ichimura ve ark. 1998b) aradaki amino asitleriyle birlikte aynen korunduğu görülmüştür.

OoMAPKK1 cDNA'sının da 1059 bç'lik açık okuma bölgesi (ORF) 353 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır. Proteinin tahmini moleküler ağırlığı ExpASY veri tabanında 39,416 kDa ve izoelektrik noktası (pI) 6.38 olarak hesaplanmıştır. MAPKK enzim ailesi üyeleri 38-55 kDa. moleküler ağırlığındadırlar ve 310-380 amino asite sahiptirler (Cardinale 2002; Jonac 2002). Tütün bitkisinden klonlanan *SIPKK* cDNA'sı 357 amino asitten oluşan 39.3 kDa.'luk bir proteini kodlamaktadır (Liu ve ark. 2000). *A. thaliana*'da

AtMAPKK3, AtMAPKK4 ve AtMAPKK5 adlı üç MAPKK klonlanmış ve sırasıyla 520, 348 ve 366 amino asite sahip oldukları bulunmuştur (Ichimura ve ark. 1998b). Bu durum *OoMAPKK1* cDNA'sının kodladığı tahmin edilen proteinin özelliklerinin diğer bitki MAPKK'lerinin kriterlerine uyduğunu göstermektedir.

PepTool 1.1 programıyla yapılan analizlerde klonladığımız *OoMAPKK1*'in amino asitlerinin % 52.1'inin hidrofilik, % 47.9'unun da hidrofobik olduğu ve hidrofilik/hidrofobik oranının 1.09 olduğu hesaplanmıştır. Hidrofilik oranının yüksekliği protein molekülünün suda çözünebilirliğini artıran bir faktördür, *OoMAPKK1*'in amino asit dizisi analiz sonuçlarına bakıldığında hidrofilik ve hidrofobik aminoasitlerin oranlarında çok büyük bir farklılık olmadığı görülmektedir.

OoMAPKK1 geninin 3 boyutlu protein yapısı, yine NCBI veri tabanından elde edilen *N. tabacum NQK1* MAPKK enzimine ait 3 boyutlu protein yapısıyla Cn3D 4.1 programı kullanılarak karşılaştırılmış ve protein formasyonlarında yüksek orandaki benzerlik gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *O.onites OoMAPKK1* ve *N. tabacum NQK1* MAPKK'in 3 boyutlu protein yapılarının karşılaştırılması. NCBI veritabanındaki Cn3D 4.1 programında A) büyük ana domein, B) küçük ana domein, C) C terminal ucu, N) N terminal ucu.

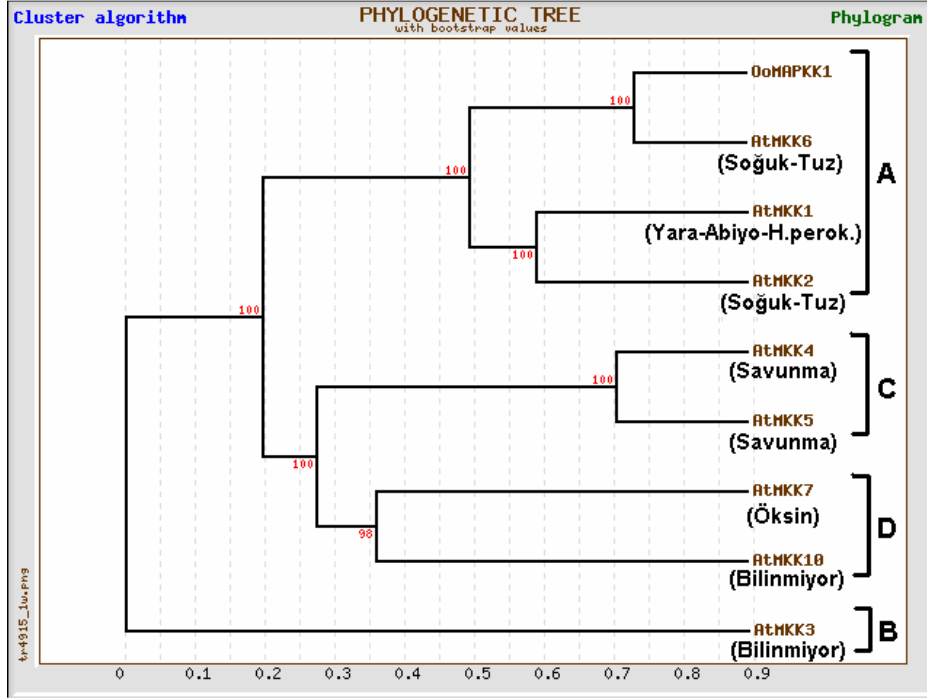
Bu yüksek orandaki benzerlik *OoMAPKK1* gen proteininin amino asit dizisi ve oluşturulan temel 3 boyutlu yapısının MAPKK ailesine girdiğini teyit etmektedir.

Bitkilerdeki MAPK sinyal yolu; dikotiledonlardan *Arabidopsis*, *N. tabaccum*, *L. esculantum* ve *M. sativa*'da, monokotiledonlardan *Oryza sativa* L. ve *Zea mays*'da çalışılmış, birçok MAPK, MAPKK ve MAPKKK genleri klonlanarak karakterize edilmiştir (Bogre 2000; Rakwal 2003; Nakagami 2005). *OoMAPKK1*'in tahmini aminoasit dizisi bitkilerden klonlanan diğer MAPKK genlerinin aminoasit dizileri ile EBI (European Bioinformatics Institute) veri tabanında DbClustal programıyla dikey olarak hizalanmış ve aralarındaki benzerlikler gösterilmiştir (Bkz. Bulgular, Şekil 3.32). Elde edilen veri Pyhlip yöntemine göre cluster algoritması ve bootstrap kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir (Bkz. Bulgular, Şekil 3.33). *OoMAPKK1* filogenetik ağaçta dikotil bitkiler grubunda yer almış fakat monokotil bitki grubu iki dikotil grubun arasında yer almıştır. Benzer durum bir monokotil olan *O. sativa*'dan klonlanan 6 MAPK ailesi üyelerinden *OsMSRMK2* ve *OsBIMK1* için oluşturulan bir filogenetik ağaçta, *A. thaliana* (*AtMAPK3*), *N. tabacum* (*WIPK*) ve *M. sativa* (*MsSAMK*) gibi dikotil bitkiler ile diğer 4 üyeden ayrı bir dikotil grupta toplanabileceğini göstermektedir (Agrawal ve ark. 2002). Böyle durumlar, bitki MAPKK'lerinin birkaç bitki dışında diğer bitkilerde fonksiyonel çeşitlilik açısından sınırlı düzeyde çalışılmış olmasına bağlanabilir.

OoMAPKK1'in tahmini amino asit dizisi NCBI veri tabanına girilerek diğer bitki MAPKK'ları ile karşılaştırıldığında en yüksek homolojiyi *L. esculentum* (% 89) MAPKK geni *LeMKK3* (savunma stresinde) ve *N. tabacum* MAPKK geni *NQK1* (sitokinezde) ile (% 88) göstermektedir. *OoMAPKK1*' in diğer alt gruptaki bitki MAPKKleri ile benzerlik oranları sırasıyla *Arabidopsis thaliana* *ANQ1/AtMKK6* geni (Soğuk ve tuz streslerinde) ile % 82, *Zea mays* *ZmMEK1* geni ile % 74, *Oryza sativa* MAP kinaz kinaz 1 geni ile % 74, *Petroselinum crispum* *MKK2* geni ile % 62, *Vitis aestivalis* putatif MAPKK geni ile % 62, *Medicago sativa* *PRK MAPKK* geni ile de % 60'tır.

OoMAPKK1'in amino asit dizisi, *A. thaliana*'da fonksiyonları çalışılmış ve sınıflandırılmış olan MAPKK'lerin amino asit dizileriyle EBI veri tabanındaki

Clustal W programında karşılaştırılarak fonksiyon bakımından hangi MAPKK genine benzerlik gösterdiği araştırılmıştır. Analiz sonunda oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 4.2) Arabidopsis MAPKK genlerinin 4 ana grupta toplandığını göstermektedir (Nakagami ve ark. 2005).



Şekil 4.2. *OoMAPKK1*'in *A.thaliana*'daki fonksiyonel olarak sınıflandırılmış MAPKK'ler ile karşılaştırılması. Gen bankası kayıt no: *AtMCKK1* NM_118740 (abiyotik stres, H₂O₂, yaralanma), *AtMCKK2* NM_119127 (soğuk ve tuz stresi), *AtMCKK3* DQ497565 (bilinmiyor), *AtMCKK4* NM_104044 (savunma), *AtMCKK5* NM_113017 (savunma), *AtMCKK6* NM_125041 (soğuk ve tuz stresi), *AtMCKK7* NM_101693 (auxin), *AtMCKK10* DQ446313 (bilinmiyor). Ağacın dallanma köklerinde (nod) kırmızı rakamlarla yazılmış değerler, 100 örnekleme göre yapılmış ve yüzdelik değer olarak ifade edilmiş bootstrap –tekrarlanma- değerleridir

I. grup (A) MAPKK'ların soğuk, kuraklık, yüksek tuz gibi oksidatif stres gibi abiyotik stresler, ve yaralanma streslerinde ve sitokinezde rol aldıkları, II. grup (B) MAPKK'ların tam bilinmemekle beraber çekirdek taşıma faktörü (NTF) sinyalizasyonunda, III. grup (C) MAPKK'ların patojenlere karşı savunmada, IV. grup (D) MAPKK'ların tam bilinmemekle beraber öksin metabolizmasında rol

oynadıkları belirtilmektedir (Ichimura ve ark. 2002). *OoMAPKK1*'in I. grup (A) MAPKK'lar ile aynı grupta bulunduğunu ve bu gruptaki MAPKK'lardan soğuk ve tuz stresinde rol alan *AtMKK6* ile en yüksek benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Semi-quantitatif olarak *OoMAPKK1*'in mRNA miktarları üzerinde yapılan çalışma (Bkn. Bulgular Şekil 3.41-A)'da *O. onites* bitkisine yara, soğuk(+4°C) ve ABA stresleri uygulanmıştır soğuk stresine karşı ilk yarım saatteki artış ve ikinci saatten sonraki azalışın 24. saatte tamamen kaybolması bu bulguyu kısmen destekler durumdadır. Zhang ve ark. (2006b) tarafından, *Chorispora bungeana*'da *CbMAPK3* MAPK enzimi için soğuk (+4°C) stresi uygulanmış ve soğuk stresinde ilk yarım saatten birinci saate artış görülürken ikinci saatten itibaren düşme ve 24. saatte kaybolma görmüşlerdir.

O. onites'deki yara stresinde ilk yarım saatten birinci saate mRNA seviyesindeki artış on ikinci saate kadar aynı düzeyde devam ederken 24. saatte düşme görülmüştür. ABA stresinde ilk yarım saatten üçüncü saate aynı düzeyde mRNA görülürken altıncı saatten 24. saate çok az düşüş görülmüştür (Bkn. Bulgular, 3.41). *C. bungeana*'da ABA stresinde ilk yarım saatte mRNA düzeyinde artma ve altıncı saate kadar aynı düzeydeyken 12. saatten itibaren düşme görülmüş ve 24. saate kadar düşüşün devam ettiği kaydedilmiştir (Zhang ve ark. 2006b).

OoMAPKK1'in hangi bitkisel dokularda aktif olarak bulunduğu tespit etmek için kök, gövde ve yaprak dokuları için RT-PZR reaksiyonu kurulmuş; yaprak ve gövdede ekspresyon gözlenirken, kök'te 4 ayrı deneme yapılmasına rağmen ekspresyon gözlenmemiştir. Bu durum *O. onites* bitkisinde *OoMAPKK1*'in ekspresyonunun tek bir dokuya özgü olmadığına dair bize fikir vermektedir. *Arabidopsis MPK6* MAPK geninin RT-PZR analizleri sonucu çoğu dokuda aktif olduğu tespit edilmiştir (Bush ve Kyrsan 2007). Yine *Arabidopsis*'in yaprak, gövde ve kök dokularında yapılan Northern blot analizlerinde, *AtMKK3* (MAPKK) mRNA'sının her üç dokuda da aktif halde bulunduğu gözlenmiştir (Ichimura ve ark. 1998b). *Arabidopsis*'de aynı analiz yöntemiyle *ATMKK2*'nin de her üç dokuda aktif olarak sentezlendiği belirtilmiştir (Ichimura ve ark. 1998a). *Chorispora bungeana*'da da klonlanan bir MAPK geninin sadece yaprak ve kökte ekspres olduğu ve ekspresyonunun dokuya spesifik olmadığı belirtilmektedir (Zhang

ve ark. 2006b). Olası MAPKK geninin kekik genomunda varlığı ve kopya sayısını göstermek amacıyla Southern blotlama çalışması yapılmıştır. *OoMAPKK1*'in 1400 bç'lik cDNA'sından DIG yöntemiyle hazırlanan bulucu DNA (prob) kullanılarak, farklı hibridizasyon sıcaklıkları ve farklı DNA izolasyon yöntemleri kullanılmasına rağmen Southern blotlama deneylerimizde istenen başarı elde edilememiştir. Kullanılan bulucu DNA etkinliği test edilmiş ve problemsiz çalıştığı kanıtlanmıştır (Bkz. Bulgular, Şekil 3.). Bulucu DNA'nın *O. onites* genomik DNA'sını görmemesinin nedeni olarak, kullanılan Southern Blot Kitinin içerdiği solüsyonların etkin olarak çalışmamasına bağlı olarak agaroz jeldeki genomik DNA'nın yeterince denatüre olmaması veya olası kirleticilerden dolayı DNA'nın membrana sağlam bir şekilde bağlanamaması olabilir. Bitki DNA izolasyonlarında en sık karşılaşılan kirletici polisakkaritlerdir. Polisakkaritler ve ayrıca uçucu yağ bakımından zengin olan tıbbi ve aromatik bitkilerdeki alkaloid, flavonoid, fenol, polisakkarit ve terpen gibi sekonder bileşiklerin DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesimini, çoğaltılmasını ve klonlanmasını engellediği belirtilmiştir (Khanuja ve ark. 1999, Doulis ve ark. 2000). Dolayısıyla, Southern Blot analizinde kullanılacak DNA'nın saflığı önemli bir kriterdir. Southern Blot analizinde kullandığımız *Origanum* genomik DNA'sının kalitesine yönelik spektrofotometrik ve agaroz jelle dayalı analizler DNA'nın saf olduğunu açıkça göstermektedir. DNA'nın saflığını gösteren diğer bir basit test de DNA'nın *Hind-III* enzimiyle kesim reaksiyonuna sokulmasıdır; DNA'nın *Hind-III* ile kesilebilirliği DNA örneğinin polisakkarit içermediğine işaret etmektedir (Do ve Adams 1991). *O. onites* DNA'sının *Hind-III* enzimiyle etkin bir şekilde kesimi saflık bakımından sorunsuz olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan DIG işaretleme kitinin tavsiye ettiği ticari hibridizasyon tamponu (DIG Easy Hyb) yerine laboratuvarımızda hazırlanan hibridizasyon tamponu (Kaynak) kullanılmıştır. Bu tampon hibridizasyon için optimum şartları sağlamamış olabilir. Kondoh ve ark. (1998) ile Keil ve ark. (1999)'nın yaptıkları çalışmalarda Southern Blot hibridizasyonu için DIG Easy Hyb ticari tamponu kullanarak çalışmalarını sonuçlandırdıkları bildirilmiştir. Bu düşünceler ışığında Southern Blot deneyinin kullanılan kitle uyumlu yeni bir hibridizasyon tamponu ile

denenmesi, ayrıca klasik blotlama solüsyonları ile deneyin tekrarlanması gerekmektedir.

OoMAPKK1 rekombinant proteinini üretmek için *OoMAPKK1*'in UTR bölgelerini içermeyen 1059 bp'lık ürünü pMAL-p2x (New England Biolabs) ekspresyon plazmitine eklenmiş, ekspresyona uygun *E. coli* TB1 ve XLI-Blue konakçı hücreleri içine aktarılmıştır. IPTG ile uyarılan hücrelerden 2 saat inkübasyondan sonra izole edilen total proteinin bir kısmı amiloz resinle muamele edilmiştir. Rekombinant olarak üretilen yaklaşık 82 kDa.'luk *OoMAPKK1*-MBP füzyon proteininin SDS-PAGE agaroz jelde amiloz resine bağlandığı gözlenmiştir (Bkn. Bulgular, Şekil 3.47). *A. thaliana*'da MAPKK7 (Dai ve ark. 2006) ve MAPKK4 (Huang ve ark. 2000) rekombinant proteinleri pMAL-c2 plazmitine eklenmiş ve *E.coli*'de üretilerek saflaştırılmıştır. Pedley ve Martin (2004), *L. esculentum* (domates) bitkisinde 3 MAPK ve 4 MAPKK rekombinant proteinini pMAL-c2x plazmitine ekleyerek üretmeyi başarmışlardır. Fujita ve ark. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* Ste20p protein kinazını pMAL-p2 plazmitine ekleyerek rekombinant olarak üretmişlerdir. Çalışmamızda *OoMAPKK1* rekombinant proteininin süpernatant ve amiloz resine bağlanmış fraksiyonuna ait bantların beklenen büyüklükte olmasına rağmen zayıf olduğu görülmektedir. Zayıf bandın füzyon proteini olup olmadığı, Western Blot ile analiz edilememiştir. Eğer tahmini büyüklükte elde edilmiş bandın füzyon proteinine karşılık geldiği varsayılırsa, protein miktarının az olmasının nedeni, kullanılan pMAL-p2x plazmitinin konakçı hücredeki protein veriminin %1-5 arası olmasından kaynaklanıyor şeklinde açıklanabilir. pMAL-p2x periplazma dışına taşınabildiği ve saflaştırma işleminde disülfid bağların oluşmasını sağladığından yüksek miktarlarda besi yerinde üretilerek saflaştırılması tavsiye edilmektedir. pMAL-c2x plazmitinin protein verimi %20-40'tır ve ürün miktarı kıyaslandığında pMAL-c2x'in pMAL-p2x'e göre 10 kat daha fazla protein ürettiği ve SDS-PAGE'de az miktarlarının bile görülebildiği kaydedilmiştir. Dolayısıyla deneyin pMAL-c2x plazmitiyle ve farklı konakçı tiplerinde tekrarlanması uygun olacaktır.

4.1. Sonuç

Bitkiler çevresel uyarıları sinyal iletim yollarını kullanarak alırlar (Ragwal ve Agrawal 2003; Mishra ve ark. 2006). MAPK sinyal yolu bitkilerde çevresel uyarıların iletiminde önemli role sahiptir (Morris 2001; Cardinale 2002; Ichimura ve ark. 2002; Nakagami ve ark. 2005). Çevresel uyarıların *Origanum* türlerinde (*O. onites* ve *O. minutiflorum*) uçucu yağ içeriğini oluşturan terpenlerin sentezini etkilediği görülmüştür (Baydar, 2005). Bu çalışmada, Türkiye’de kekik ihracatının % 80’ini karşılayan *O. onites* türünden MAPKK enzim ailesinin bir üyesinin, *OoMAPKK1*, UTR bölgeleriyle birlikte 1404 bp’lik tüm cDNA’sı klonlanmış ve biyoinformatik analizlerle MAPKK motifleri içerdiği gösterilmiştir. Diğer bitki MAPKK’larıyla karşılaştırıldığında en yüksek benzerliği *L. esculentum* ve *N. tabacum* MAPKK’ları ile gösterdiği saptanmıştır. Ekspresyon analizleri *OoMAPKK1* ekspresyonunun dokuya özgü olmadığı bulunmuştur. Ayrıca bitkilere soğuk, ABA ve yara stresleri uygulandığında *OoMAPKK1* ekspresyonunun soğuk ve yara streslerinde uyarıldığı tek bir deney sonucuna göre saptanmıştır. Rekombinant *OoMAPKK1* proteininin *E. coli* içinde üretilmesini amaçlayan çalışmanın öncül deneyleri tamamlanmış ve beklenen büyüklükteki (~82 kDa.) proteininin amiloz resine bağlandığı gösterilmiştir.

Yapılan geniş çaplı literatür taramasında Türkiye ve dünyada *O. onites* ve bu türün dahil olduğu cinse ait bu çalışma dışında herhangi bir moleküler biyolojik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile *Origanum onites* türünde hücre içi MAPK sinyal yollarında görev yapan MAPKK enzim ailesinin olası 5 üyesinin varlığı ilk kez gösterilmiş ve bu enzim ailesi üyelerinden biri klonlanmıştır.

4.2. Öneriler

Çalışmamızdan elde edilen verilerde, beklenen büyüklükte elde edilen rekombinant *OoMAPKK1* füzyon proteininin kitle birlikte gelen spesifik antikolar kullanılarak Western Blot analizinin yapılması ve teyit edilmesi gerekmektedir. Bu sayede üretilen füzyon proteinden rekombinant *OoMAPKK1*

proteininin ayrılarak saflaştırılması ve proteine özgü antikorların kinaz aktivitesi testinde kullanılması; ileride yapılacak olan fizyolojik çalışmalar temelini oluşturacaktır. *OoMAPKK1* geni üzerinde yapılacak aktivite artırıcı veya azaltıcı mutasyon çalışmalarının *O. onites* bitkisindeki etkilerinin araştırılması, gelecekteki transgenik bitki üretme çalışmalarına temel oluşturacaktır. Patates bitkisinde patojen stresinde rol oynayan bir MAPKK (*StMEK1^{DD}*)'nin mutasyonla sürekli aktif hale getirilmesi sayesinde patojenlere karşı dirençlilik kazandığı görülmüştür (Yamamoto ve ark. 2006). *OoMAPKK1* enzim ailesinin tamamının klonlanması ve yapılacak biyoteknolojik çalışmalar, gelecekte *O. onites* bitkisinin uçucu yağ oranını artırma çalışmalarının temelini oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, G.K., Rakwal, R. And Iwahashi, H. (2002), "İsolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive Map kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 1009-1016.
- Agrawal, G., K., Iwahashi, H. and Rakwal R. (2003), "Rice MAPKs," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **302**, 171-180.
- Alan, S. (1997), *Eskişehir çevresinin Thymus L. türleri üzerinde morfolojik ve anatomik araştırmalar*, Anadolu Üniv. Sağlık Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi.
- Anonim, (2004), *Southern hybridization experimental kit teacher's manual*, Carolina Biological Supply Company, 2700 York Road, Burlington, North Carolina 27215.
- Anonim, (2007), <http://www.ics.trieste.it/Documents/Downloads/df3056.pdf>.
- Arslanyolu, M. (2006), "Characterization of putative mitogen activated protein kinases from *Tetrahymena thermophila*," *Anadolu Üniv. Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **7** (2), 393-404.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M., R., Chiu, W., L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F., M. and Sheen, J. (2002), "MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity," *Nature*, **415**, 977-983.
- Baluska, F., Samaj, J., Wojtaszek, P., Volmann, D. and Menzel D. (2003), "Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants Emerging links revisites," *Plant Physiology*, **133**, 482-491.
- Başer, K.H.C. (2001), "Her derde deva bir bitki kekik," *Bilim ve Teknik*, 74-77.
- Baydar, H. (2002), "Isparta koşullarında İzmir Kekiiğinin (*Origanum onites* L.) verimi ve uçucu yağ kalitesi üzerine araştırmalar," *S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **6**, 17-24.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan G. and Karadoğan T. (2003), "Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and

- Satureja* species with commercial importance in Turkey,” *Food Control, In Press*, Corrected Proof, Available online 10.
- Baydar, H., (2005), “Yayla Kekığı (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis)'nde Farklı Toplama Zamanlarının Uçucu Yağ İçeriği ve Uçucu Yağ Bileşenleri Üzerine Etkisi,” *Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, **18**, 175-178.
- Baytop, A. (1991), *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Fakültesi, No:58, 237, İstanbul.
- Baytop, T. (1994), *Türkçe bitki adları sözlüğü*, Türk Dil Kurumu Yayınları, No:578, **168**, 206, Ankara.
- Baytop, T. (1999), *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün*, ilaveli 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Bent, A., F. (2001), “Plant mitogen-activated protein kinase cascades: negative regulatory roles turn out positive,” *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America)*, **98**, 784-786.
- Berman, D. E., Havzi, S., Rosenblum, K., Seger, R. and Dudai, Y. (1998), “Specific and Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades by Unfamiliar Taste in the Insular Cortex of the Behaving Rat,” *The Journal of Neuroscience*, **18**, 10037-10044.
- Berridge, M. J. (2006), “Cell signalling pathways,” *Cell Signalling Biology, Portland Press Limited*, **2**, 1-96.
- Bohlmann, J., Phillips, M., Ramachandiran, V., Katoh, S. and Croteau, R. (1999), “cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of Four New Monoterpene Synthase Members of the *Tpsd* Gene Family from Grand Fir (*Abies grandis*),” *Archives of Biochemistry and Biophysic*, **368**, No: 2, 232-243.
- Bögre, L, Meskiene, I., Heberle-Bors, E. Ve Hirt, H. (2000), “Stressing the role of MAP kinases in mitogenic stimulation,” *Plant Molecular Biology*, **43**, 705-718.
- Boira, H. and Blanquer, A. (1998), “Enviromental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L.,” *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 811-822.

- Boudsocq, M. and Lauriere, C. (2005), "Osmotic Signaling in Plants. Multiple Pathways Mediated by Emerging Kinase Families," *Plant Physiology*, **138**, 1185-1194.
- Brozovic, A. and Omsak, M. (2007), "Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance," *Cancer Letters*, **251** 1-16.
- Bush, S. M., Krysan, P. J. (2007), "Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development," *Journal of Experimental Botany*, May 22, 1-11.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Qaked, F. and Hirt H. (2002), "Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinase," *The Plant Cell*, **14**, 703-711.
- Ceylan, A. (1976), *Origanum smyrnaeum* L.'da verim ve ontogenik varyabilite, Ege Üniv. Zir. Fak. Dergisi, **13**, 139.
- Ceylan, A., Bayram, E. Ve Geren, H. (1999), "İzmir Kekik (Origanum onites L.) Islahında Geliştirilen Klonların Agronomik ve Kalite Özellikleri Üzerinde Araştırma," *Tübitak, Tr. J. of Agriculture and Forestry*, **23**, 1163-1168.
- Çetin, H. ve Yanıkoğlu, A. (2006), "A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey," *Journal of Vector Ecology*, **31**, 118-122.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. (1995), "Modification of the TRI Reagent™ procedure for isolation of RNA from polysaccharide - and proteoglycan-rich sources," *Biotechniques*, **19**, 942-945.
- Chuang, S. M., Wang, I. C and Yang, J. L., (2000), "Roles of Jnk, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium," *Carcinogenesis*, **21**, No: 7, 1423-1432.
- Cvetkovska, M., Rampitsch, C., Baykova, N. and Xing, T. (2005), "Genomic Analysis of MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Defense Responses," *Plant Molecular Biology Reporter*, **23**, 331-343.

- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mouz, Z. and Li, J. (2006), "Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 Causes Deficiency in Polar Auxin Transport and Leads to Plant Architectural Abnormality in Arabidopsis," *The Plant Cell*, **18**, 308-320.
- Davis, P. H. (1975), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. **7**, Edinburgh University Press, 308-309, Edinburgh.
- Davis, P.H. (1982), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, **7**, 300-307, Edinburgh.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (1988), *Flora of Turkey and the Aegean Islands*, Edinburgh Univ. Press, **10**, 209, Edinburgh.
- Do, N. and Adams, R. P. (1991), "A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA," *BioTechniques*, **10**, 163-166.
- Doğan, A. L. ve Güç, D. (2004), "Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser," *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**, 34-42.
- Doulis, A. G., Harfouche, A. L. and Aravanopoulos, F. A. (2000), "Rapid, High Quality DNA Isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and Optimization of the RAPD Marker Technique," *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**, 1-14.
- Doyle, J. J. and Doyle, J.L. (1987), "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, **12**, 13-15.
- End, D. W. (1999), "Farnesyl protein transferase inhibitors and other therapies targeting the Ras signal transduction pathway," *Investigational New Drugs*, **17**, 241-258.
- Fang, J. Y. and Richardson, B. C., (2005), "The MAPK signalling pathways and colorectal cancer," *Lancet Oncology*, **6**, 322-327.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988), "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer," *G. R. Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.*, **85**, 8998-9002.
- Fujita, A., Tonouchi, A., Hiroko, T., Inose, F., Nagashima, T., Satoh, R and Tanaka, S. (1999), "Hsl7p, a negative regulator of Ste20p protein kinase

- in the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth-signaling pathway,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8522-8527.
- Gabby Krens, S. F., Spaink, H. P., Snaar-Jagalska, B. E. (2006), “Functions of the MAPK family in vertebrate-development,” *Federation of European Biochemical Societies, Published by Elsevier*, **580**, 4984–4990
- Gemci, İ. (2006), *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* bitki ekstraktının Broyler piliçlerinin performansına etkileri, Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Gotsiou, P., Naxakis, G. and Skoula, M. (2002), “Diversity in the composition of monoterpenoids of *Origanum microphyllum* (Labiatae),” *Biochemical Systematics and Ecology*, **30** (9), 865-879.
- Gönüz, A. ve Özörgücü, B. (1999), “An Investigation on the Morphology, Anatomy and Ecology of *Origanum onites* L.,” *Tübitak, Tr. J. of Botany* **23**, 19-32.
- Grant, J. J., Yun, B. W. and Loake, G. J. (2000), “Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity,” *The Plant Journal*, **24**(5), 569-582.
- Guadagno, T. M. and Ferrell Jr., J. E. (1998), “Requirement for MAPK Activation for Normal Mitotic Progression in *Xenopus* Egg Extracts,” *Science*, **282**, 1312-1315.
- Gussow, D. and T. Clackson (1989), “Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction,” *Nucleic Acids Res.*, **17** 4000.
- Gül, S., Çevik, İ., Gül, M. ve Özel, N. (2002), “Ege Bölgesinde İzmir Kekiği ve Adaçayının Yağ Analizlerinden Yararlanarak Yörelere Göre Kesim Zamanının Belirlenmesi,” *Orman Bakanlığı Ege Ormanlık Araştırma Müdürlüğü Orman Bakanlığı Yayınları*, No:153, 21.
- Haddad, J. J. (2005), “N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: A

- revolving neurochemical axis for therapeutic intervention?," *Progress in Neurobiology*, **77**, 252-282.
- Hamel, L. P., Nicole, M. C., Sritubtim, S., Morency, M. J., Ellis, M., Ehltng, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen, J., Xing, T., Zang, S., Seguin, A. and Ellis, B. E. (2006), "Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families," *Trends in Plant Science*, **11**, No:4, 192-198.
- Hardin, S. C., and Wolniak, S. M. (1998), "Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinasekinases," *Planta*, **206**, 577-584.
- Holstein, S. A. and Hohl, R. J. (2003), "Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression," *Journal of Lipid Research*, **44**, 1209-1215.
- Huang, Y., Li, H., Gupta, R., Morris, P.C., Luan, S. and Kieber J.J. (2000), "ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation," *Plant Physiology*, **122**, 1301-1330.
- Huitema, E., Bos, J. I. B., Tian, M., Win, J., Waugh, M. E. and Kamoun, S. (2004), "Linking sequence to phenotype in Phytophthora-plant interactions," *Trends in Microbiology*, **12**, 193-200.
- Ichimura, K. et al. (2002), "Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature," *Trends in Plant Science*, **7**, No: 7.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1998a), "Isolation of ATMEKK1 (a MAP Kinase Kinase Kinase)-Interacting Protein and Analysis of a MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis*," *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 532-543.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Hayashida, N., Seki, M. and Shinozaki, K., (1998b), "Molecular Cloning and Characterization of Three cDNAs Encoding Putative Mitogen-activated Protein Kinase Kinases (MAPKKs) in *Arabidopsis thaliana*," *DNA Research*, **5**, 341-348.

- Innes, R. W. (2001), "Mapping out the roles of MAPK kinases in plant defense," *Trends in Plant Science*, **6**, No. 9.
- Jin, H., Axtell, M., J., Dahlbeck, D., Ekwenna, O., Zhang, S., Staskawicz, B. and Baker, B. (2002), "NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants," *Developmental Cell*, **3**, 291-297.
- Johnson, G. L. and Lapata, R., (2002), "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases," *Science*, **298** (5600), 1911-2.
- Johri, M. M. and Mihra, D. (2001), "Action of plant hormones," *Current Science*, **80**, No: 2, 199-205.
- Jonak C., Ökresz, L., Börge, L. and Hirt H. (2002) "Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling," *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 415-424.
- Jonak, C., Ligterink, W and Hirt H. (1999), "MAPK kinases in plant signal transduction," *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 204-213.
- Jun, W. J., Han, B. K., Yu, K. W., Kim, M. S., Chang, I. S., Kim H. Y. and Cho, H. Y. (2001), "Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals," *Food Chemistry*, **75** (4), 439-444.
- Kaloustian, J., El-Moselhy, T.F. and Portugal, H. (2003), "Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*)," *Thermochimica Acta*, **401** (2), 19, 77-86.
- Kamata, H., Tanaka, C., Yagisawa, H., Matsuda, S., Gotoh, Y., Nitsida, E. and Hirata, H. (1996), "Suppression of Nerve Growth Factor-induced Neuronal Differentiation of PC12 Cells, N-Acetylcysteine Uncouples The Signal Transduction from Ras to The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade," *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, No: 51, 33018-33025.
- Kamel, M. S., Assaf, M. H., Hasanean, H. A., Ohtani, K, Kasai R., and Yamasaki, K. (2001), "Monoterpene glucosides from *Origanum syriacum*," *Phytochemistry*, **58** (8), 1149-1152.

- Katou, S., Karita, E., Yamakawa, H., Seo, S., Mitsuhara, I., Kuchitsu, K. and Ohashi, Y. (2005), "Catalytic Activation of the Plant MAPK Phosphatase NtMKP1 by Its Physiological Substrate Salicylic Acid-induced Protein Kinase but Not by Calmodulins," *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, No: 47, 39569–39581.
- Keil, Ch., Husen, B., Giebel, J., Rune, G. and Walther, R. (1999), "Glycodelin mRNA is expressed in the genital tract of male and female rats (*Rattus norvegicus*)," *Journal of Molecular Endocrinology*, **23**, 57-66.
- Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Darokar, M. P. And Kumar , S. (1999), "Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils," *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**, 74.
- Kıtıkı, A., T. Kesercioğlu, A. Tan, M. Nakipoğlu, H. Otan, A. O. Sarı ve B. Oğuz. (1997), "Ege ve Batı Akdeniz Bölgelerinde yayılış gösteren bazı *Origanum* L. türlerinde biyosistemik araştırmalar," *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **7**(2).
- Kim, J., Adam, R. M. and Freeman, M. R (2002), "Activation of the Erk Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Stimulates Neuroendocrine Differentiation in LNCaP Cells Independently of Cell Cycle Withdrawal and STAT3 Phosphorylation," *Cancer Research*, **62**, 1549-1554.
- Kim, J. A., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Han, K. S., Kim, K. N., Yun, C. H., Heu, S., Park, S. Y., Lee, Y. H., and Jwa, N. S. (2003), "Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stres signalling pathways and development," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**, 868–876.
- Klotz, L. O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M. and Sies, H. (1999), "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA," *Eur. J. Biochem.*, **260**, 917-922.

- Ko, Y. P. (2005), *Analysis of matrilin function in knockout mice and knockdown zebrafish*, Doktorgrades, der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln, Deutschland.
- Kondoh, Y., Fujita, S., Kagiya, N. and Yoshida, M. C. (1998), "A Simple, Two-Color Fluorescence Detection Method for Membrane Blotting Analysis Using Alkaline Phosphatase and Horseradish Peroxidase," *DNA Research*, **5**, 217-220.
- Kovtun, Y., Chiu, W., L., Tena, G. and Sheen, J. (2000), "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascades in plants," *PNAS*, **97**, No:6, 2940-2945.
- Kovtun, Y., Chiu, W., L., Zeng, W. and Sheen, J. (1998), "Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants," *Nature*, **395**, 216-720.
- Kurz, C. L. and Ewbank, J. J. (2003), "*Caenorhabditis elegans*: an Emerging Genetic Model for the Study of Innate Immunity," *Nature*, **4**, 380-390.
- Kültz, D. (1998), "Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases," *Journal of Molecular Evolution*, **46**, 571-588.
- LaMontagne, K. R., Moses, M. A., Wiederschain, D., Mahajan, S., Holden, J., Ghazizadeh, H., Frank, D. A. and Arbiser, J. L. (2000), "Inhibition of MAP Kinase Kinase Causes Morphological Reversion and Dissociation between Soft Agar Growth and *in Vivo* Tumorigenesis in Angiosarcoma Cells," *American Journal of Pathology*, 157., No: 6., 1937-1945.
- Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J. J. and Renauld, J. C. (2002), "IL-22 activates the JAK/STAT, ERK, JNK and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line : shared and distinct pathways from IL-10," *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, JBC Papers in Press.*, **26**, 1-22.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H. and Horwitz, B. A. (1999), "A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and

- pathogenicity: Diverse roles for mitogenactivated protein kinase homologs in foliar pathogens,” *PNAS*, **96**, No: 23, 13542–13547.
- Ligterink, W. and Hirt, H. (2000), “MAP kinase pathways in plants: versatile signaling tools,” *Int. Rev. Cyt.*, **201**, 209–258.
- Ligterink, W., Hirt, H. (2001), “Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools,” *Int. Rev. Cytol.*, **201**, 209-275.
- Lim, H. J., Lim, C. J., Hwang, D. Y., Lee, S. H., Min, S. H., Song, Y. S., Seo, S. J., Park, H. K., Sheen, Y. Y., Cho, J. S. and Kim Y. K. (2004), “Carboxyl-terminus of the amyloid protein precursor and ER β are required for estrogenic effect in activating mitogen-activated protein kinase,” *International Journal of Molecular Medicine*, **13**, 691-696.
- Lin, H. H., Chen, J. H., Kuo, W. H. and Wang, C. J. (2007), “Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation,” *Chemico-biological Interactionc*, **165**, 59-75.
- Liu, Y., Zhang, S. and Klessig, D.F. (2000), “Molecular Cloning and Characterization of a Tobacco MAP Kinase that Interacts with SIPK,” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, No:1, 118-124.
- Liu, Y., Jin, H., Yang, K. Y., Kim, C. Y., Baker, B. and Zang, S. (2003), “Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling,” *The Plant Journal*, **34**, 149-160.
- Liu, Q. and Xue, Q. (2007), “Computational identification and phylogenetic analysis of the MAPK gene family in *Oryza sativa*, *Plant Physiology and Biochemistry*,” **24**, 1-9.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., and Darnell, E (2003), *Molecular Cell Biology* (5th Edition) W.H. Freeman & Company.
- Lu, C., Han, M. H., Guevara-Garcia, A. and Fedoroff, N. V. (2002), “Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid,” *PNAS (Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of the America*, 99, 15812-15817.
- Lye, Y. M., Chan, M. and Sim, T. S. (2006), "Pfnek3: An atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*," *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580, 6083-6092.
- Madhani, H.D. and Fink, G. (1998), "The riddle of MAP kinasesignalling specificity," *Trends Genet.*, **14**, 151-155.
- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L. and Chenchik, A. (1999), "Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR.," *Nucleic Acids Research*, **27**, 1558-1560.
- Menke, F. L. H., Pelt, J. A. V., Pieterse, C. M., J. and Klessig, D. F. (2004), "Silencing of the Mitogen-Activated Protein Kinase MPK6 Compromises Disease Resistance in Arabidopsis," *The Plant Cell*, **16**, 897-907.
- Meriçli, F.İ. (2001), "Türkiye’de yetişen endemik *Thymus* türlerinin timol yönünden değerlendirilmesi," *Doğa Tr., Tıp ve Ecz. D.*, **10** (2), 187-200.
- Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstötter, M., Zwerger, K., Amere, G. and Hirt, H. (1998), "MP2C, a plant protein phosphatase 2C, fuctions as A negative regulator of mitogeactivated protein kinase pathways in yeast and plants," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95.**, 1938-1943.
- Meyerowitz, E.M. (1997), "Genetic control of cell division patterns in developing plants," *Cell*, **8**, 299-308.
- Miles, G. P., Samuel, M. A., Jones, A. M. and Ellis, B. E. (2004), "Mastoparan Rapidly Activates Plant MAP Kinase Signaling Independent of Heterotrimeric G Proteins, *Plant Physiology*," **134**, 1332-1336.
- Milos, M, Mastelic, J. and Jerkovic, I. (2000), "Chemical composition and antioxidant efect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*)," *Food Chemistry*, **71**, 79-83.

- Minorsky, P. V. (2003), "Frontiers of Plant Cell Biology: Signals and Pathways, System-Based Approaches," *22nd Symposium in Plant Biology* (University of California—Riverside), *Plant Physiology*, **132**, 428–435.
- Mishra, N. S., Tuteja, R. and Tuteja, N. (2006), "Signaling through MAP kinase networks in plants," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **452**, 55-68.
- Miyata, Y., Adachi, S., Mizuno, H. and Nishida, E. (1999), "A strategy to make constitutively active MAP kinase by fusing with constitutively active MAP kinase kinase," *Biochemica et Biophysica Acta*, **1451**, 334-342.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K. and Shinozaki, K. (1997), "Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases," *Tibtech, Elsevier Science*, **15**, 15-19.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K. and Shinozaki, K. (1998), "Identification of possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants," *FEBS Letters*, **437**, 56-60.
- Mo, H. and Elson, C. E. (2004), "Studies of the Isoprenoid-Mediated Inhibition of Mevalonate Synthesis Applied to Cancer Chemotherapy and Chemoprevention," *Society for Experimental Biology and Medicine*, **229**, 567-585.
- Mockute, D., Bernotiene, G. and Judzentiene, A. (2001), "The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania)," *Phytochemistry*, **57** (1), 65-69.
- Moller, S. G. and Chua, N. H. (1999), "Interactions and Intersections of Plant Signaling Pathways," *J. Mol. Biol. (JMB)*, **293**, 219-234.
- Mora-Álvarez, Y.G., Nava-Vargas, J. M., Valle-Villanueva, C. H., López-Gómez, R., López-Meza J. E., Valdez-Alarcón, J. J., Cano-Camacho, H. H., Baizabal-Aguirre, V. M. (2004), "Osmotic stress induces the activation of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) and a calcium-independent protein kinase from beet root (*Beta vulgaris* L.)," *Plant Science*, **167**, 561–567.

- Morris, P.C.(2001), "MAP kinase signal transduction pathways in plants," *New Phytologist*, **151**, 67–89.
- Mullis, K., Faloona, F. A. (1987), "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reactio," *Methods Enzymology*, **155**, 335-50.
- Mundy, J. And Schneitz, K. (2002), "Protein phosphorylation in and around signal transduction," *Trends in Plant Science*, **7**, No:2, 54-56.
- Munnik T. and Mijer, H., J., G. (2001), "Osmotic stres activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants," *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **498**, 172-178.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. and Kahmann, R. (2003), "Mating and Pathogenic Development of the Smut Fungus *Ustilago maydis* are Regulated by One Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade," *Eukaryotic Cell*, **2**, No:6, 1187-1199.
- Nakagami, H., Kiegerl, S. and Hirt, H., (2004), "OMTK1, a Novel MAPKKK, Channels Oxidative Stres Signaling through Direct MAPK Interaction," *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, No: 26, 26959–26966.
- Nakagami, H., Pitzschke, A. and Hirt, H. (2005), "Emerging MAP kinase patways in plant stres signaling," Abiotic Stres Series Review, *Triends in Plant Science*, 10, No: 7.
- Newton, R., Cambridge, L., Hart, L. A., Stevens, D. A., Lindsay, M. A. and Barnes, P. C. (2000), "The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1 β -dependent PGE2 release via mechanistically distinct processes," *British Journal of Pharmacology*, **130**, 1353-1361.
- Nicole, M. C., Hamel, L. P., Morency, M. J., Beaudoin, N., Ellis, B. E. and Seguin, A. (2006), "MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases," *BioMed Central Genomics*, **7** (223), 1-22.
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asata, T, Irie, K., Ito, M, Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y. and Machida, Y. (2002), "Expansion of the Cell Plate in Plant Cytokinesis Requires a Kinesin-like Protein/MAPKKK Complex," *Cell*, **109**, 87–99.

- Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I. and Fujimura, M. (2007), "Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*," *Fungal Genetics and Biology*, **44**, 208-218.
- Oflaz, S., Kürkçüoğlu, M. ve Başer, K. H. B. (2002), "*Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* üzerinde Farmakognazik Araştırmalar," *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 252-258.
- Ohuri, M, Kinoshita, T., Yoshimura, S., Warizaya, M, Nakajima, H. and Miyake, H. (2007), "Role of a cysteine residue in the active site of ERK and the MAPKK family," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **353**, 633-637.
- Okan, T. ve Şafak, İ (2004), "Akhisar Yöresindeki Kekik ve Tütün Üretiminin Ekonomik Açından Karşılaştırılması," *İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi*, **54** (1), 187-205.
- Olson, J. M. and Hallahan, A. R. (2004), "p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy," *Trends in Molecular Medicine*, **10** (3), 125-129.
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M. A., Carbonell, J. and Marcote, M. J. (2007), "Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*," *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **581**, 1834-1840.
- Overmyer, K. (2002), *Hormonal regulation of radical-induced programmed cell death in ozone-sensitive mutants of Arabidopsis thaliana*, Institute of Biotechnology and Department of Biosciences, Division of Genetics University of Helsinki, Finland.
- Pan, Z. and Chang, C., (1999), Functional complementation of the "Schizosaccharomyces pombe wis1 mutant by *Arabidopsis* MEK1 and non-catalytic enhancement by CTR1," *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **459**, 405-410.

- Pandey, S., Barbeoch, L. P., Taylor, J. P. and Zhao, Z. (2005), "Plant Cell Signaling: In Vivo and -omics Approaches," *Jornal of Plant Growth Regulation*, **24**, 46-54.
- Panteva, M., Korkaya, H. and Jameel, S. (2003), "Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy?," *Virus Research*, **92**, 131-140.
- Pawson T. (2002), "Regulation and targets of receptor tyrosine kinases," *Eur J Cancer*, **38**, 3-10.
- Pedley, K. F. and Martin, G. B. (2004), "Identification of MAPKs and their possible MAPKK activators involved in the Ptomediated defense response of tomato," *The Journal of Biological Chemistry Papers in Press*, September 15, Manuscript M410323200.
- Pedley, K. F. and Martin, G. B. (2005), "Role of Mitogen-activated protein kinases in plant immunity," *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 541-547.
- Pizzale, L., R. Bortolomeazzi, S. Vichi, E. Uberegger, and L.S. Conte. (2002), "Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fructicosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. inderceden*) extracts related to their phenolic content.," *J. Sci. Food Agricult*, **82**, 1645–1651.
- Quaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D. and Hirt, H. (2003), "A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plant," *EMBO Journal*, 22, No: 6, 1282-1288.
- Rakwal R. and Agrawal G.K. (2003), Wound signaling-coordination of the octadecanoid and MAPK pathways, *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 855-861.
- Rakwal R. and Agrawal G.K. (2003), "Wound signaling-coordination of the octadecanoid and MAPK pathways," *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 855-861.
- Reiss, N., Llevi, L. N., Shacham, S., Haris, D., Seger, R. and Naor, Z. (1997), "Mechanism of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Gonadotropin-Releasing Hormone in the Pituitary α T3-1 Cell Line:

- Differential Roles of Calcium and Protein Kinase C,” *Endocrinology*, **138**, No: 4, 1673-1681.
- Romeis, T. (2001), “Protein kinases in the plant defence response,” *Current Opinion in Plant Biology*, 4., 407-414.
- Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. (1985), “Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in Escherichia coli,” *J. Biol. Chem.*, **260**, 9326.
- Saawedra, H. I., Fukasawa, K., Conn, C. W. and Stambrook, P. J. (1999), “MAPK Mediates RAS-induced Chromosome Instability,” *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, No: 53, 38083-38090.
- Samaja, J., Oveckaa, M., Hlavackab, A., Lecourieuxa, F., Meskienea, I., Lichtscheidld, I., Lenarta, P., Salaje, J., Volkmannb, D., Bögre, L., Baluskab, F. and Hirt, H. (2003), “Involvement of MAP kinase SIMK and actin cytoskeleton in the regulation of root hair tip growth,” *Cell Biology International*, **27**, 257-259.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sangwan, V. and Dhindsa, R., S. (2002), In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant MAP kinases, FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters, 531, 561-564.
- Sangwan, V., Örvar, B. L., Beyerly, J., Hirt, H. and Dhindsa, R. S. (2002), “Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways,” *The Plant Journal*, **31**(5), 629-638.
- Sarihan, E. O., İpek, A., Arslan, N. Ve Gürbüz, B. (2006), “Farklı Sıra Arası ve Sıra Üzeri Mesafelerinin Kekik (*Origanum vulgare* var. *hirtum*)’de Verim ve Verim Ögeleri Üzerine Etkisi,” *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*, **12** (3) 246-251.
- Schenk, P.W. and Snaar-Jagalska B.E. (1999), “Signal perception and transduction: the role of protein kinases,” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1449**, 1-24.

- Sharma, P. and Mondal, A. K. (2006), "Evidence that the MAPK-docking site in MAPKK Dpbs2p is essential for its function, Biochemical and Biophysical Research Communications," **346**, 562-566.
- Sharma, R., Singh, M. and Sharma, A. (2002), "Polymerase Chain Reaction: An Emerging Tool for Research in Pharmacology," *Indian Journal of Pharmacology*, **34**, 229-236.
- Shulz, H., Özkan, G., Branska, M., Krüger, H. and Özcan, M. (2005), "Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy," *Vibrational Spectroscopy*, **39**, 249–256.
- Soyano, T., Nishihama, R., Mariyoko, K., Ishikawa, M. and Machida Y. (2003), "NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NtMEK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis," *Genes and Development*, **17**, 1055-167.
- Smith, T. G., Karlsson, M., Simon Lunn, J., Eblaghie, M. C., Kenan, I. D., Farrell, E. R., Tickle, Storey, K. G. and Keyse, S. M. (2006), Negative feedback predominates over cross-regulation to control ERK, MAPK activity in response to FGF signalling in embryos, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **580**, 4242-4245.
- Soimato, A. J., Raberg, C. M. I., Gassmann, M., Sistonen, L. and Nikinmaa, M. (2001), "Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1a) from Rainbow Trout, The Journal of Biochemical Chemistry," **276**, No:23, 19699-19705.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S. K. and Kavi Kishor, P. B., (2007), "Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches," *Gene*, **388**, 1–13.
- Stone, J. M. and Walker J. C. (1995), "Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction', *Plant Physiology*," **108**, 451-457.
- Su, B. and Karin, M. (1996), "Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression," *Current Opinion in Immunology*, **8**, 402-411.

- Şafak, İ ve Okan, T. (2004), “Kekik, Defne ve Çamfıstığının Üretimi ve Pazarlanması, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü,” *DOA dergisi (Journal of DOA)*, **10**, 101-129.
- Şahin, M. Güllüce, D. Daferera, A. Sökmen, M. Sökmen, M. Polissiou, G. Agar and H. Özer, (2003), “Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey,” *Food Control*, In Press, Corrected Proof, Available online 5.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K. and Saito, H. (2005), “Conserved Docking Site Is Essential for Activation of Mammalian MAP Kinase Kinases by Specific MAP Kinase Kinase Kinases,” *Molecular Cell*, **18**, 295–306.
- Tang, D. and Innes, R., W. (2002), “Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in *Arabidopsis*,” *The Plant Journal*, **2**, 975-983.
- Tanker, N., İlisulu, F. (1981), “Türkiyede Kekik olarak kullanılan bitkilerden *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. Et Link,” *Ankara Ecz. Fak. Mec.*, **11**, 127-135.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (1998), *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları No: 78, 343-344, Ankara.
- Teige, M., Scheickl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. and Hirt, H. (2004), “The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in *Arabidopsis*,” *Molecular Cell*, **15**, 141–152.
- Temizkan, G, and Arda, N. (2004), *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*, Nobel Tıp kitapevleri, Millet cad. No: 11, Çapa-İstanbul.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W., L. and Sheen J. (2001), Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades, *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 392-400.
- Tınmaz, A. B., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C. ve Öztürk, M. (2002), “Marmara Bölgesindeki İstanbul Kekiki (*Origanum vulgare* subsp., *hirtum*) Populasyonlarının Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi,” *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, 465-472.

- Trapp, S. C. and Croteau, R. B. (2001), "Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications Genetics Society of America," **158**, 811-832.
- Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D. and White, M. R. H. (2004), (Çev. Ed: Konuk, M.) *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*, 2. baskı'dan çeviri, Nobel Yayın Dağıtım, Adakale Sok. No: 16/2, Yenişehir, Ankara.
- Twyman, R. M. (1998), *Advanced Molecular Biology*, A Concise Reference BIOS Scientific Publishers.
- Ünal, O., Topçuoğlu, Ş. F. ve Gökçeoğlu, M. (2005), "Antalya İli İçin Endemik Olan *Origanum* Türlerinin Biyolojik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma, Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi," **18** (1), 1-14.
- Vasconsuelo, A., Giulietti, A. M. and Boland, R. (2004), "Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*, Plant Science," **166**, 405-413.
- Vera, R. R. and Chane-Ming, J. (1999), "Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island," *Food Chemistry*, **66**, 143-145.
- Wan, J., Dunnign, F. M. and Bent, A. F. (2002), "Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays," *Funct. Integr. Genomics*, **2**, 259-273.
- Wang, K. (2005), "Genetic Acclimation for Freezing Tolerance", *ISB News Report*, January.
- Wang, L. and Shiozaki, K., (2006), "The fission yeast stress MAPK cascade regulates the pmp3+ gene that encodes a highly conserved plasma membrane protein," *Federation of European Biochemical Societies*, **580**, 2409-2413
- Wang, S.L., S. Nakashima, and Y. Nozawa (1999), "Stress-responsive changes in the mRNA levels of MAPK-related protein kinase (TpMAPK) and NIMA-related protein kinase (TpNrk) in *Tetrahymena* cells," *European Journal of Protistology*, **35** (3), 275-280.
- Wrzaczek, M. and Hirt, H. (2001), "Plant MAP kinase pathways: how many and what for?," **Biology of the Cell**, **93**, 81-87.

- Xing, T. and Jordan, M. (2000), "Genetic engineering of plant signal transduction mechanisms," *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**, 309-318.
- Xiong, L. and Zhu, J. K. (2002), "Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress," *Plant, Cell and Environment*, **25**, 131-139.
- Xiong, L. and Yang, Y., (2003), "Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscisic Acid-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase," *The Plant Cell*, **15**, 745-759.
- Yamamoto, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J. D. G., Doke, N. and Yoshioka, H. (2006), "Rewiring Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade by Positive Feedback Confers Potato Blight Resistance," *Plant Physiology*, **140**, 681-692.
- Yang, S., H., Sharrocks, A., D. and Whitmarsh, A., J. (2003), "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades," Review, *Gene*, **320**, 3-21.
- Zang, N., Wu, B., Eudy, N., Wang, Y., Ye, F., Powell, D., Wissner, A., Feldberg, L., R., Kim, S., C., Mallon, R., Kovacs, E., D., Toral-Barza, L. and Kohler C., A. (2001), "MEK(MAPKK) inhibitors. Part 2: Structure-Activity Relationships of 4-Anilino-3-cyano-6,7-dialkoxyquinolines," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11**, 1407-1410.
- Zhang, S. and Klessig, D., F. (2001), "MAPK cascades in plant defense signaling," Review, *Trends in Plant Science*, **6**, No: 11.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T, Zhang, L., Xu, S., Xue, L. and An, L. (2006a), "Diverse Signals converge at MAPK cascades in plant, *Plant Physiology and Biochemistry*" **44**, 274-283.
- Zhang, T., Liu, Y., Xue, L., Xu, S., Chen, T., Yang, T., Zhang, L. and An, L. (2006b), "Molecular cloning and characterization of a novel MAP kinase gene in *Chorispora bungeana*," *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 78-84.
- Zang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R. and Wang, X. (2003), "The Oleate-Stimulated Phospholipase D, PLD δ , and Phosphatidic Acid Decrease H₂O₂-Induced Cell Death in *Arabidopsis*," *The Plant Cell*, **15**, 2285-2295.

- Zeybek, N., Zeybek, U. (1994), *Farmasötik Botanik, Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sıstematiği ve Önemli Maddeleri*, 2. baskı, Ege Üniversitesi Yayınları No: 2, Ege Üniversitesi Basımevi, 369, Bornova-İzmir.
- Zhai, H., Nakade, K., Oda, M., Mitsumoto, Y., Akagi, M., Sakurai, J. and Fukuyama, Y. (2005), "Honokiol-induced neurite outgrowth promotion depends on activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2)," *European Journal of Pharmacology*, 516, 112-117.
- Zhuang, Z. H., Zhou, Y., Yu, M. C., Silverman, N. and Ge, B. X. (2006), "Regulation of Drosophila p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli," *Cellular Signalling*, **18**, 441-448.
- Zu, J., K. (2001a), "Cell signaling under salt, water and cold stres," *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 401-406.
- Zu, J., K. (2001b), "Plant salt tolerance," *Trends in Plant Science*, No: 2.
- Zwenger, K. and Hirt, H. (2001), "Recent Advances in Plant MAP Kinase Signalling," *Biol. Chem.*, **382**, 1123-1131.

Ek-1 *Oo4-MAPKK* Gen Bankası Kayıt Bilgisi

LOCUS EU075083 471 bp mRNA linear PLN 31-
JUL-2007
DEFINITION *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-1.
ACCESSION 1005659
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE *Origanum onites*
 ORGANISM *Origanum onites*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae;
Nepetoideae; Mentheae; *Origanum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 471)
 AUTHORS poyraz,I., sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-1
 JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 471)
 AUTHORS poyraz,I., sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-JUL-2007) Biology, Anadolu University,
Yunus Emre Campus, Eskisehir 26470, Turkey
COMMENT Bankit Comment: esozen@anadolu.edu.tr.
FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..471
 /organism="*Origanum onites*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:452416"
BASE COUNT 144 a 78 c 108 g 141 t

ORIGIN

```
1 attggaaagg gaagtgggtg cgttgttcaa cttgttcgcc ataaatgggt tggaaacgttg
61 tttgccttga agttatcca gatgactata caggaggaga ttcggaaaca aatagttcag
121 gagcttaaaa ttaatcaagc atctcaatgt ccaaagtgtg tggtttgcta tcattcattc
181 tatcacaacg gagctatatc tattgtgttt gaatacatgg atcgtggatc attagttgat
241 ataatcagac aagtcaagac aatccatgaa ccataccttg cagttgtctg caaacaggtt
301 ttacagggtt tagtttactt gcatcatgag aaacatgtta tccatagaga tgtaaagcct
361 tctaactctg tagtgaacca caaaggggaa gtaaaaatta cagattttgg tgtaaagtgc
421 atgctggcaa gctctatggg ccaacgtgac acatttgtgg ggtataacta c
```

Ek-2 *Oo14-MAPKK* Gen Bankası Kayıt Bilgisi

LOCUS EU075084 396 bp mRNA linear PLN 31-
JUL-2007
DEFINITION *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-2.
ACCESSION 1005674
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE *Origanum onites*
 ORGANISM *Origanum onites*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
 eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae;
 Nepetoideae; Mentheae; *Origanum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 396)
 AUTHORS poyraz,I., sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-2
 JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 396)
 AUTHORS poyraz,I., sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-JUL-2007) Biology, Anadolu University,
 Yunus Emre Campus, Eskisehir 26470, Turkey
COMMENT Bankit Comment: Eukaryota; Viridiplantae;
 Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
 Magnoliophyta; Magnoliophytina; Rosopsida; Lamiidae; Lamianae;
 Lamiales; Lamiineae; Lamiaceae; *Origaninae*; *Origanum*;
 esozen@anadolu.edu.tr.
FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..396
 /organism="*Origanum onites*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:452416"
BASE COUNT 128 a 66 c 81 g 121 t
ORIGIN
 1 attggtaaag gaaaagggtg cgttggtcaa cttgttcgcc ataaatgggt tggaaacgttg
 61 tttgccttga aggttatcca gatgactata caggaggaga ttcggaaaca aatagttcag
 121 gagcttaaaa ttaatcaagc atctcaatgt ccaaagtgtg tagtttgcta tcattcattc
 181 tatcacaacg gagctataatc tattgtgttt gaatacatgg atcgtggatc attagttgat
 241 ataatacagac aagtcaagac aatccttgaa ccataccttg cagttgtttg caaacaagtt
 301 ttacagggtt tagtttactt gcatcatgag aaacatgtta tccatagaga tataaagccc
 361 tctaataatcc tgctagttga aaaccaaca aaaggg

Ek-3 Oo20-MAPKK Gen Bankası Kayıt Bilgisi

LOCUS EU075085 462 bp mRNA linear PLN 31-
JUL-2007
DEFINITION *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-3.
ACCESSION 1005677
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE *Origanum onites*
 ORGANISM *Origanum onites*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
 eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae;
 Nepetoideae; Mentheae; *Origanum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 462)
 AUTHORS Poyraz,I., Sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-3
 JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 462)
 AUTHORS Poyraz,I., Sozen,E. and arslanyolu,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-JUL-2007) Biology, Anadolu University,
 Yunus Emre Campus, Eskisehir 26470, Turkey
COMMENT Bankit Comment: Eukaryota; Viridiplantae;
 Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
 Magnoliophyta; Magnoliophytina; Rosopsida; Lamiidae; Lamianae;
 Lamiales; Lamiineae; Lamiaceae; Origaninae; *Origanum*;
 esozen@anadolu.edu.tr.
FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..462
 /organism="*Origanum onites*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:452416"
BASE COUNT 124 a 91 c 96 g 151 t
ORIGIN
 1 gtcgtgcggt tgttcagca taaatggact gcacagtttt ttgcacttaa gtttattcaa
 61 atgaatatcg aggagtctgc tcgccagcat attgctcaag agctgaaaat taaccagtca
 121 tctcaatgct catatgctgt gatctgctat caatctttct atgataatgg tgccatttcc
 181 attatcttgg agtatatgga ggggggtctc ttgcagattt tctcaagaaa gtttataaga
 241 ttccggagcc ttatcttctg cgcattttgc aagcaggtag tccaagggtct ctggtagctt
 301 catcatgaga aacatatcat ccacagggac atgaagcctt caaatttatt aataccacag
 361 gagtgtgacg tcaagattac tgactttggg gttagtgcaa tactttcgag cacatcgggt
 421 ttagccaata cttttgttgg aacctacaat tatatgtctc ca

Ek-4 Oo23-MAPKK Gen Bankası Kayıt Bilgisi

LOCUS EU075086 494 bp mRNA linear PLN 31-
JUL-2007
DEFINITION *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-4.
ACCESSION 1005679
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE *Origanum onites*
ORGANISM *Origanum onites*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae;
Nepetoideae; Mentheae; *Origanum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 494)
AUTHORS Poyraz, I., Sozen, E. and Arslanyolu, M.
TITLE *Origanum onites* MAP kinase kinase partial cDNA-4
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 494)
AUTHORS Poyraz, I., Sozen, E. and Arslanyolu, M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (31-JUL-2007) Biology, Anadolu University,
Yunus Emre Campus, Eskisehir 26470, Turkey
COMMENT Bankit Comment: Eukaryota; Viridiplantae;
Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;
Magnoliophyta; Magnoliophytina; Rosopsida; Lamiidae; Lamianae;
Lamiales; Lamiineae; Lamiaceae; *Origaninae*; *Origanum*;
esozen@anadolu.edu.tr.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..494
/organism="Origanum onites"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:452416"
BASE COUNT 133 a 93 c 110 g 158 t
ORIGIN
1 aagcttattg gcaagggaaa ccggtgcttc gtgcgtttgg tgcagcataa atggactgca
61 ccggtttttg cacttaaggt tatttccatg gatatcgagg agtctgctcg caagcatatt
121 gctcaagagc tgaaaattta ccagtcattc caatgtccat atgtcgggat ctgctatcaa
181 tctttctatg attatggtgc aatttccatt atcttgagat atatggatgg ggggtctctt
241 gcagattttc tcaagaaagt ttataagatt cgggagcttt atctggctgc gatttgcaag
301 caggactca aaggctctcg gtatcttcat catgagaac atatcatcca caggacatg
361 aagccttcaa atttattaat aaaccacaga ggtgacgtca agattactga ctttgagtt
421 agtgcaatac ttgcgagcac atcgggttta gctaatactt ttgttgaac ctacaattat
481 atgtctccaa gctt

Ek-5 *OoMAPKK1* Gen Bankası Kayıt Bilgisi

LOCUS EF558371 1423 bp mRNA linear
PLN 27-JUL-2007
DEFINITION *Origanum onites* mitogen activated protein kinase
kinase 1 (MAPKK1)
mRNA, complete cds.
ACCESSION EF558371
VERSION EF558371
KEYWORDS .
SOURCE *Origanum onites*
ORGANISM *Origanum onites*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae;
Nepetoideae; Mentheae; *Origanum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1423)
AUTHORS Poyraz, I., Sozen, E. and Arslanyolu, M.
TITLE Cloning and characterisation of *OoMAPKK1*, a MAPKK gene,
from *Origanum onites*
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1423)
AUTHORS Poyraz, I., Sozen, E. and Arslanyolu, M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-APR-2007) Biology, Anadolu University,
Yunus Emre Campus, Eskisehir 26470, Turkey
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1423
/organism="Origanum onites"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:452416"
gene 1..1423
/gene="MAPKK1"
/note="OoMAPKK1"
CDS 199..1260
/gene="MAPKK1"
/codon_start=1
/product="mitogen activated protein kinase
kinase 1"
/protein_id="ABT17464"
/translation="MKLKKPLKELKLSVPAQNPSISSFLTASGTFHDGDLNQLKGLR
LISDENEPRPSEMKELDLQFSLEDLETIKVIGKNGGVVQLVRHKWVGTLFALKVIQM
TIQEEIRKQIVQETKINQASQCPNVVVCYHSFYHNGAISIVFEYMDRGLSLVDIIRQVK
TILEPYLAVVCKQVLQGLVYLHHERHVIHRDLKPSNLLVNHKGEVKITDFGVSAMLAS
SMGQRDTFVGTYNYMAPERISGSTYDYKSDIGSLGMVILECAIGRFPYTKSEDQQSGP
SFYELLQAIVGSPPPSAPPDQFSPEFCSFVSACVQKDRDRSSALELLSHPFIKKFEE
KDIDLSTIYVGS LGSPVNIP"
ORIGIN
1 tcggacgtac ccattatggc aactcagaca aagccaccgg ccatttccat ttggactttt
61 ggagttatat tagagagaga gagagagtac cgttggagtg aggcggccat ttccatttga
121 attttctctt caaacttctc ttcattctct cgctgctac tgaaccctag gcagaatttc
181 tgctgctcaa tcaaatcat gaagtgaag aaacctctca aggaactcaa gctctctgctc
241 cctgctcaga attcccccat ctctctttc ctgacggcta gcggtacctt tcacgacggc
301 gatttgctgc tgaatcagaa ggggcttcgg ttgatttctg atgagaatga accccgcccc
361 tcagagatga aggagcttga ccttcaattc tcggtggaag accttgagac catcaaagtc
421 attggtaagg gaaatggtgg cgttgttcaa cttgttcgcc ataaatgggt tggaacgttg
481 ttgccttga aggttatcca gatgactata caggaggaga ttcgaaaca aatagttcag
541 gagactaaa ttaatcaagc atctcaatgt ccaaatgttg tagtttgcta tcattcattc
601 tatcacaacg gagctatata tattgtgttt gaatacatgg atcgtggatc attagttgat

661 ataatcagac aagtcagac aatccttgaa ccataccttg cagttgntg caaacaggtt
721 ttacaggggt tagtttactt gcatcatgag agacatgta tccatagaga tttaaagcct
781 tctaattctgc tagtgaacca caaaggggaa gtaaaaatta cagatthttg tgttagtgcc
841 atgctggcaa gctctatggg ccaacgtgac acatthttg ggacttacia ttacatggcg
901 cctgaaagga tcagtgggag cacctatgac tataaaaagt atattgggag tctgggcatg
961 gtgattcttg aatgtgctat tggacgtttt ccttatacca aatctgaaga ccaacaaagt
1021 ggccccagct tttacgagct tctgcaggca attgthtgaa gtccaccacc ttctgctccg
1081 ccagatcaat tttctccaga attctgttct tttgtctctg catgctgaca gaaagatcct
1141 agagacagat cttcggcctt ggaactactg agccatcctt tcatcaagaa atthgaagag
1201 aaagacattg atctcagcat atatgtgggt agccttgat cacctgtgaa tatcccataa
1261 atcacctctc ttcactcttc ttactatgtt catgtatgtt tgtthgttaa gataccatct
1321 ttaaatttaa tthttgtaag tgatgttatt ctcggttaa ggaaatgtag ctctcattat
1381 gagccataga attaaccgaa tccgaaaaaa aaaaaaaaaa aaa