

Tetrahymena thermophila
MAPK ENZİM AİLESİNDEN BİRİNİN
cDNA'SININ KLONLANMASI
ve mRNA İFADESİNİN KARAKTERİZASYONU

Mehmet Taha Yıldız
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz 2009

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:031018**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet Taha Yıldız'ın “**Tetrahymena thermophila MAPK Enzim Ailesinden Birinin cDNA'sının Klonlanması ve mRNA İfadesinin Karakterizasyonu**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 27/05/2009 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. MUHİTTİN ARSLANYOLU
Üye	: Prof. Dr. AHMET ÖZATA
Üye	: Doç. Dr. FERAY KÖÇKAR
Üye	: Doç. Dr. ADNAN ÖZCAN
Üye	: Yard.Doç. Dr.F.ZERRİN SALTAN

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Tetrahymena thermophila

MAPK ENZİM AİLESİNDEN BİRİNİN

cDNA'SININ KLONLANMASI

ve mRNA İFADESİNİN KARAKTERİZASYONU

Mehmet Taha YILDIZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman:Yard.Doç.Dr.Muhittin ARSLANYOLU

2009, 212 sayfa

Tüm ökaryotik organizmalar çeşitli hücresel proseslerde önemli bir yeri olan mitojenlerle aktive olan protein kinazları (MAPK) ekspres etmektedirler. MAPK ailesi üyelerinin fonksiyonelliği ve çeşitliliği hakkındaki bilgi genellikle hayvan, bitki ve mayalardan gelmektedir. Kendi içinde yüksek düzeyde çeşitlilik gösteren Protistaya ait MAPK'lar hakkındaki bilgilerinin gün geçtikçe artıyor olması, literatürde bilinen MAPK ailesi hakkındaki bilginin güncelleştirilmesini gerekli kılmaktadır.

T.thermophila, strese karşı oluşan cevapta önemli bir rol alan MAPK ailesi üyelerinin “tek-hücreli organizma seviyesinde” araştırılmasına olanak sağlayabilecek önemli bir model organizmadır. Bu tez çalışmasında *Tetrahymena thermophila*'da bulunan 11 adet MAPK aile üyesi gen tespit edilmiş ve tuz, açlık, sıcaklık değişikliği ve konjugasyon gibi farklı stres şartları altında mRNA düzeyinde ifade edilip edilmedikleri araştırılmıştır.

Sonuç olarak analiz edilen 11 üyenin dokuz adedinin test edilen şartlar altında mRNA düzeyinde varlık gösterdiği tespit edilmiştir. Buna ilave olarak bu tezde ortaya konan filogenetik analiz sonuçları en az iki adet protist MAPK grubunun var olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler:*Tetrahymena thermophila*, Stres, MAPK, mRNA ifadesi, MAPK ailesi, Protist MAPK ailesi.

ABSTRACT

PhD Dissertation

CLONING AND CHARACTERIZATION of mRNA EXPRESSION PROFILE of ONE of THE MAPK FAMILY ENZYMES FROM *Tetrahymena thermophila*

Mehmet Taha YILDIZ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2009, 212 pages

All eukaryotes express mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that govern diverse cellular processes. Knowledge of functionality and diversity of MAPK family members are mostly comes from animal, plant and fungus. Since the knowledge of MAPK's of Protista, which has high level of divergence among its members increases day by day, necessity of revision of the current literature knowledge about MAPK family shows itself as an emerging need.

Tetrahymena thermophila is an important model organism gives an opportunity for research on MAPK's which is one of the most important components of signal transduction pathways in response to stress, on level of single celled organism. In this thesis 11 MAPK members of *Tetrahymena thermophila* has been identified and analyzed for their existence on the level of mRNA expression in different kind of stress conditions such as salt, starvation, temperature shift and conjugation.

As a result it has been shown that nine members of the analyzed MAPK family members show existence as a mRNA in most of the tested stress conditions. Additionally the phylogenetic results presented in this thesis offer existence of at least two distinct protist MAPK groups.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*, MAPK, mRNA expression, stress, Protist
MAPK family

TEŞEKKÜR

Varoluőumu anlamlı kıłana,

Barındıran toprağıma,

Çok sevgili Babam Âlim YILDIZ, annem Semahat YILDIZ ve canım kız kardeőime,

Hocam Muhittin ARSLANYOLU'na,

İsimlerinin burada geçmesini önemsemeyecek, unutulmaz dostlarım ve sevgili çalışma arkadaőlarım ve biricik yol arkadaőıma,

Bana verdikleri karőılıksız sevgi destek ve műsamaha için teőekkűr ediyorum.

Mehmet Taha YILDIZ
Haziran - 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv

1. GİRİŞ	1
1.1. Kinom	3
1.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> Kinomu	4
1.3. <i>Tetrahymena</i> Kinazları ile İlgili Çalışmalar	6
1.4. Protein Kinazların Karakteristik Özellikleri	7
1.5. Protein Kinazların Kontrolüne Katıldığı Biyolojik Durumlar	9
1.6. MAPK Ailesi Protein Kinazlar	11
1.7. MAPK Sinyal Ağı ve Kontrolüne Katıldığı Diğer Olaylar	12
1.8. MAPK'lerin Sınıflandırılması	17
1.9. Çalışma Organizması: <i>Tetrahymena thermophila</i>	18
1.10. <i>Tetrahymena thermophila</i> Stres Biyolojisi	20
1.11. <i>Tetrahymena thermophila</i> MAPK Üyeleri ile İlgili Çalışmalar	23
1.12. Amaç	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1. Materyal	26
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar	26
2.1.1.1. Çalışma Organizması: <i>Tetrahymena thermophila</i>	26

2.1.1.2. Klonlama Konakçısı <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue Irkı	26
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Plazmit DNA'lar	26
2.1.2.1. pGEM®-T Easy Vector System I Klonlama Vektörü	26
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	28
2.1.3.1. LB (Luria-Bertani) Broth (Sıvı) Besiyeri.....	28
2.1.3.2. LB (Luria-Bertani) Agar (Katı) Amfisilin Besiyeri.....	28
2.1.3.3. PPY Besiyeri	28
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	28
2.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	30
2.1.6. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	30
2.1.7. Çalışmada Kullanılan Enzim Setleri	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	31
2.2.2. Toplam RNA İzolasyonu	32
2.2.3. Toplam RNA'ya DNase Uygulanması	34
2.2.4. İzole Edilen DNA ve RNA'ların Spektrofotometrik Analizleri.....	35
2.2.5. Toplam RNA'dan Geri Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA'nın Üretilmesi	35
2.2.6. Gene Özgül Primerler Kullanılarak MPK4 Geninin DNA'sının Üretilmesi	26
2.2.7. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektforezinde Görüntülenmesi ve Jelden İzole Edilmesi.....	37
2.2.8. PZR Ürünlerinin Klonlama Vektörüne Aktarılması.....	38
2.2.9. <i>E. coli</i> Kompetent Hücre Hazırlığı.....	39
2.2.10. Plazmit DNA'nın Kompetent Hücelere Transformasyonu.....	40
2.2.11. Plazmit DNA'nın İzolasyonu	41
2.2.12. Restriksiyon Enzim Analizi	43
2.2.13. <i>Escherichia coli</i> 'de MPK4'ün Protein İfadesi İçin Gerekli Nokta Mutasyon İçeren Primerlerin Tasarlanması	44

2.2.14. MPK4 cDNA'sının 3' Ucunun 3' RACE Reaksiyonuyla Klonlanarak Karakterizasyonu	46
2.2.15. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu.....	47
2.2.16. MPK4'ün Dotblot Yöntemi ile Analizi.....	48
2.2.17. Southern Blotlama	50
2.2.18. Northern Blot Analizi	56
3. BULGULAR	61
3.1. T.thermophila MAPK Ailesi Üyeleri Hakkında Deneysel Bulgular.....	61
3.1.1. PZR reaksiyonu ile T.thermophila MAPK ailesi üyelerinin genomik kopyalarının büyüklük analizi.....	62
3.1.2. Geri-PZR reaksiyonu ile <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin cDNA kopyalarının analizi.....	63
3.1.3. Farklı Stresler Altında MAPK Ailesi Üyelerinin mRNA İfadelerinin Geri-PZR Yöntemiyle Karakterizasyonu	65
3.1.4. Sıcaklık Değişik Stresi Uygulanan Hücrelerden RNA İzolasyonu, DNase ile Muamelesi ve DNA Kontaminasyonu için PZR Kontrol Analizi	66
3.1.5. Sıcaklık ve Soğuk Stresi Uygulanmış Hücrelerin Farklı Zaman Dilimlerinden Elde Edilen cDNA Popülasyonunun 17s rRNA Geni Kullanılarak Örnek Miktarlarının Eşitlenmesi	67
3.1.6. Sıcaklık ve Soğuk Stresi Uygulanan Hücrelerin mRNA İfadelerinin MAPK Primerleri Kullanılarak Geri-PZR Analizi	68
3.1.7. Çeşitli Şartlar Altında T.thermophila MAPK mRNA İfadelerinin Var/Yok Analizi.....	70
3.2. <i>T.thermophila</i> MPK4 Geni ile İlgili Biyoinformatik ve Deneysel Bulgular.....	72

3.2.1. <i>T.thermophila</i> Genom Projesi Ön Sonuçlarına Göre MPK4 Geninin Genomik Dizisinin Bir Araya Getirilmesi ve Biyoinformatik Analizi	72
3.2.2. <i>T.thermophila</i> MPK4 Kinaz Domaini Motif Analizi	74
3.2.3. PZR Reaksiyonu ile MPK4'ün Genomik DNA ve cDNA Kopyasının Üretilmesi	77
3.2.4. PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4'ün cDNA Kopyasının Direk DNA Dizileme Yöntemi ile Analizi.....	78
3.2.5. Geri-PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4'ün cDNA Kopyasının pGEM T-Easy Plazmitine Klonlanması	79
3.2.6. PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4 cDNA'sı Kullanılarak Southern Blot Yöntemiyle Genom Analizi	80
3.2.7. MPK4 cDNA'sının 3' ve 5' Protein Kodlamayan Uç Bölgelerinin RACE Yöntemi İle Belirlenmesi.....	82
3.2.8. MPK4 Geni Transkriptinin Northern Blot Analizi İle Tespit Edilmesi.....	87
3.2.9. MPK4'ün Rekombinant Protein Olarak Üretilmesi İçin Gerekli Olan Çoklu Mutasyonların MPK4 cDNA'sı Üzerinde PZR Yöntemiyle Gerçekleştirilmesi.....	90
3.2.10.PZR Çoklu Mutasyon Yöntemiyle İle Üretilen reMPK4'ün pGEMT-Easy Plazmitine Klonlanması.....	97
3.3. Biyoinformatik Analiz Bulguları	99
3.3.1. <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyelerinin Protein Kinaz Motiflerinin Tespiti.....	99
3.3.2. <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyelerinin Protein Kinaz Alt-Aile Motiflerinin Tespiti Ve Analizi	101
3.3.3. <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyelerinin Gen Yapısı Analizi	105
3.3.4. <i>T.thermophila</i> MPK4 Geninin ve Diğer MAPK Seti Üyelerinin Tahmini Protein Yapılarının Analizi.....	106

3.3.5. <i>T.thermophila</i> MPK4 Geninin ve Diğer MAPK Seti Üyelerinin	
Substrat Bağlanma Bölgelerinin Analizi	107
3.3.6. <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyeleri Filogenetik Ağaç	
Analizi	116
4. TARTIŞMA.....	127
4.1. Protista ve <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyelerinin MAPK Ailesi	
İçindeki Konumu Nedir?	127
4.2. Tetrahymena MAPK Ailesi Üyelerinin Diğer Organizma MAPK	
Ailesi Üyeleri ile Yapısal Benzerlik ya da Farklılıkları	
Var mıdır?	130
4.3. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi Üyeleri Farklı Stres Koşulları Altında	
Oluşturulan Cevapta mRNA Düzeyinde Temsil	
Edilirler mi?	131
4.3.1. Sıcaklık ve Soğuk Şoku Koşullarında Tetrahymena MAPK	
Üyelerinin mRNA İfadeleri	131
4.3.2. Açlık, Tokluk, 30°C ve 37°C’lerde Gelişim, Hidrojenperoksit	
ve Konjugasyon Evrelerinde MAPK Üyelerinin mRNA	
İfadeleri	132
4.3.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> MAPK Sinyal Yollarına Bütünsel	
Bakış	133
5. SONUÇ	134
KAYNAKLAR	136
Ek.1 <i>T.thermophila</i> MAPK Ailesi Üyelerine Ait Gen, Erişim	
Numarası, Primer Seti Aminoasit Dizisi Bilgileri	145

Ek.2 <i>T.thermophila</i> SB210 cDNA'sından Geri-PZR ile Elde Edilen MAPK Seti Genleri ve Kontrol Geni 17s rRNA İçin BLAST Analizi Sonuçları	185
Ek.3 Tezde Kullanılan MAPK Ailesi Üyeleri Kısaltmaları, Erişim Numaraları ve Dikey Hizalamaları	191
Ek.4 <i>T.thermophila</i> ve <i>P.tetraurelia</i>'ya ait MAPK Dizilerinin Benzerlik Matrisleri ve Oluşturulan Filogenetik Ağaçlar	198
Ek.5 Filogenetik Analizlerde Kullanılan MAPK Ailesi Üyelerine Ait Katalitik Bölgelerin Dikey Hizalaması	201
Ek.6 Protist MAPK ailesi üyeleri ile yapılan NJ, ME ve MP Filogenetik ağaçları	210

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Protein kinaz katalitik bölgesinin grafik gösterimi	8
1.2. MAPK enzimlerinin aktivatör ve substratlarıyla etkileşimi	16
1.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> 'nın şematik gösterimi	20
2.1. pGEM-T Easy vektör DNA yapısı	27
2.2. Nokta mutasyon birleştirme PZR program akışı	47
3.1. MAPK enzim ailesi üyelerinin <i>T.thermophila</i> SB210 genomik DNA'sından MAPK primerleri ile yapılan PZR analizi	65
3.2. <i>T.thermophila</i> SB210 cDNA'sından MAPK primerleri ile yapılan Geri-PZRreaksiyonu	65
3.3. Örnek Bir Deneye Ait RNA'ların DNA kontaminasyonundan arındırılması	69
3.4. PZR'de kalıp olarak kullanılan cDNA miktarlarının 17s rRNA'ya göre eşitlenmesi	70
3.5. <i>T.thermophila</i> MAPK enzim ailesi üyelerinin mRNA seviyelerine 30°C→37°C, 37°C→42°C, ve 37°C→30°C sıcaklık değişikliğinin etkisi	71
3.6. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin farklı stresler altında mRNA ifadelerinin analizi	73
3.7. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin farklı stresler altında mRNA ifadeleri	74
3.8. MPK4'e ait iki farklı gen kaydına ait aminoasit dizilerinin karşılaştırılması	75
3.9. <i>T.thermophila</i> MPK4 proteini üç boyutlu modellemesi.....	77
3.10. <i>T.thermophila</i> MPK4 geninin makronukleer genomik DNA ve cDNA'dan F4EcoRI ve R4Sall primerleri kullanılarak üretimi.....	81
3.11. MPK4 geni dizi analizi BLAST sonucu	82

3.12. MPK4'ün cDNA kopyasının pGEM T-Easy plazmitine klonlanması	83
3.13. Southern Blot problama etkinliğinin test edilmesi	83
3.14. <i>T.thermophila</i> MPK4 geninin southern blot yöntemiyle genom analizi	84
3.15. 4F5 ve 4F7 primerleri ile kurulan 3' RACE –PZR stratejisi.....	86
3.16. 3'RACE sonuçları	87
3.17. MPK4 geni 3'RACE reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin şematik gösterimi	87
3.18. MPK4 geni 3'RACE reaksiyonu sonucunda elde 240 bç'lik ürüne ailt dizi bilgisinin MPK4 geni ile hizalanması	88
3.19. 3'RACE dizi analizi sonuçları ile MPK4 ve problemlü Adenin bazı pozisyonunun analizi	88
3.20. R1,R2 ve R3 primerleri ile kurulan 5' RACE –PZR stratejisi	89
3.21. MPK4 geni için yapılan 5' RACE reaksiyonları	90
3.22. DIG etiketli MPK4 probunu etkinliğinin belirlenmesi	90
3.23. MPK4 ve katalaz geni için total RNA örneklerinden yapılan Northern Blot	91
3.24. MPK4 ve katalaz geni için total RNA örneklerinden yapılan ikinci northern blot analizi	92
3.25. MPK4 geni nokta mutasyonu primer bölgeleri.....	94
3.26. MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi birinci aşama	96
3.27. MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi İkinci Aşama	97
3.28. MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi Üçüncü Aşama	98
3.29. Koloni PZR'si ile elde edilen sonuçları	99
3.30. Koloni PZR'si ile reMPK4 varlığı konfime edilen plazmitlerin	

EcoRI enzimi ile kesim reaksiyonu	100
3.31. Plazmitten izole edilen reMPK4 genin PZR sonuçları.....	100
3.32. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin dikey hizalaması	102
3.33. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin protein kinazlarının bölgesel konumlarının grafik gösterimi	103
3.34. C terminal uçlarının hizalanmasında kullanılan referans dizilerine ait dikey hizalama klasik	110
3.35. Protista MAPK'leri ile CD bölgesi tanımlanmış MAPK dizilerin C terminal uçlarının dikey hizalaması	111
3.36. Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve uzak CD bölgeleri	112
3.37. 5mapk aminoasit dizisinin 3B modeli üzerinde potansiyel CD bölgelerinin gösterimi	113
3.38. MPK18_Pt aminoasit dizisinin 3B modeli üzerinde potansiyel CD bölgelerinin gösterimi	114
3.39. Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve Grup I bölgeleri	114
3.40. 5mapk proteininin tahmini yüzey yapısı üzerinde Grup I motifinin konumsal analizi.....	114
3.41. 5mapk proteininin tahmini yüzey yapısı üzerindeki EDE dizisinin substrat ile oluşabilecek etkileşimi	116
3.42. Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve Grup II motif bölgeleri	117
3.43. MAPK ailesi üyeleri için NJ metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç	120
3.44. MAPK ailesi üyeleri için ME metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç	121

3.45. MAPK ailesi üyeleri için MP metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç	122
3.46. NJ, MP ve ME metotları ile oluşturulan protista MAPK ailesi üyeleri filogenetik ağaçlarının kıyaslaması	123
3.47. MAPK aile üyelerinin dağılımı	123
3.47. Olası MAPK ailesi grupları	124
3.48. T.thermophila MAPK ailesi üyeleri ile biyolojik fonksiyonları bilinen MAPK'lerin birlikte değerlendirildiği NJ filogenetik ağacı	125
4.1. Tetrahymena MAPK ailesi üyelerinin üç farklı algoritma ile oluşturulan filogenetik ağaçtaki konsensüs konumları	129

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Melezleme standart solüsyonu (Prehibridizasyon Tamponu)	51
3.1. <i>T.thermophila</i> SB210 Makronükleer Genom Taraması Sonucu	
Elde Edilen MAPK Enzim Ailesi Üyeler	64
3.2. <i>T.thermophila</i> SB210 gDNA'sı ile yapılan PZR	
reaksiyonunda beklenen MAPK genlerine ait büyüklükler	66
3.3. <i>T.thermophila</i> SB210 Geri-PZR reaksiyonunda beklenen	
MAPK genlerine ait büyüklükler	66
3.4. Kültz'ün MAPK sınıflandırması ile oluşturduğu MAPK	
alt ailelerine ait sinyal motifleri	104
3.5. <i>T.thermophila</i> MAPK ailesi üyelerinin Kültz'ün sınıflandırmasına	
göre motif analizi	105
3.6. <i>T.thermophila</i> 'ya ait MAPK dizilerine ait genomik DNA ve	
cDNA bilgisi	107
3.7. SwissProt servisinin yaptığı homoloji modellemesine göre	
kullanılan kalıp proteinler ve hedef proteinler arasındaki	
kıyaslama çizelgesi	109
4.1. <i>Tetrahymena</i> MAPK'lerinin mRNA düzeyinde ifade bulduğu	
belirlenen stres koşulları	133
4.2. <i>T.thermophila</i> MAPKK, MAPKKK ve MAP4K üyeleri	134
5.1. <i>T.thermophila</i> Makronükleer Genom MAPK Enzim Ailesi	
Üyeleri İçin İsimlendirme Önerisi	135

1.GİRİŞ

Hücreler buldukları ortamda oluşan kimyasal ve fiziksel değişikliklere karşı duyarlılık göstermektedirler. Çeşitli iç ve dış etmenlere karşı canlılığın devamının sağlanması; gelişim ve büyüme gibi canlılığı ilgilendiren her türlü biyolojik olayın eş zamanlı olarak birbirleriyle uyum içinde düzenlenebilmesi karmaşık bir sinyal ağının varlığı ile gerçekleşebilmektedir. Hücrenin çevresel şartlarda meydana gelen birtakım değişiklikleri algılayabilmesi ve buna karşı tepki verebilmesi bu değişimlerin sonucu oluşan bir takım uyarıcı özgün sinyal molekülleri vasıtasıyla oluşmaktadır [1-3]. Hücre ile direkt etkileşime giren sinyal moleküllerinin hücre tarafından algılanması genellikle hücre yüzeyinde bulunan sinyale özgün algılayıcı proteinler (reseptörler) yoluyla gerçekleşmektedir. Bilgi olarak hücre yüzeyine erişen sinyal öncelikle diğer kimyasal formlara çevrilerek içselleştirilir. Böylelikle mesaj bütünsel sinyal ağı içinde çoğaltılarak biyolojik cevap oluşturulur [2, 4]. Moleküler etkileşimlerin yer aldığı bu süreç genellikle hedef proteinlerin fosforillenmesi yolu ile gerçekleşmektedir [4]. Hücresel kontrol ve uyumda rol alan ve evrensel bir mekanizma olan fosforilasyon; sinyal transfer yollarının temelini oluşturmaktadır [1, 5]. Protein kinazlar tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon, proteinin birçok niteliğini ve dolayısıyla da fonksiyonunu düzenleyebilmekte ve tüm temel hücresel işlevlerde rol oynamaktadır [5-7]. Fosforilasyon hücresel sinyal ağının temelini oluşturan bir mekanizma olup ökaryotik genlerinin yaklaşık olarak %2'sinde bu tür bir fosfat transferini gerçekleştirebilecek korunmuş protein bölgeleri bulunmaktadır [8, 9]. Fosforilasyon mekanizması kısaca ATP'nin terminal fosfat grubunun alıcı bir substrata –ki bu bir protein ya da lipid olabilir- transferi olayı olarak tanımlanmaktadır. Fosforillenen proteinler; fonksiyonel durumlarının değişmesine neden olan biçimsel değişiklikler geçirirler. Fosforilasyon ile proteinlerin üç boyutlu yapısında meydana gelen bu tür farklılaşmalara ilave olarak; katalitik bölgede bulunan aminoasitlerde meydana gelecek elektrostatik etkileşimler ve iyonizasyon durumlarındaki değişiklikler ile aktifleşen proteinler sinyal ağı içindeki görevlerini yerine getirmektedirler [5, 10, 11]. Fosfat transferini katalizleyen enzimlere ise “kinaz” enzimleri denilmektedir ve kinazların hücresel

ve fizyolojik rolleri çok çeşitli olabilmektedir [4-6, 12, 13]. Kinazların büyük bir çoğunluğu sinyal transfer yollarında görev alırken bir kısmı da karbonhidratların, nükleotitlerin, aminoasitlerin, kofaktörlerin ve vitaminlerin metabolizmasında merkezi bir rol oynamaktadırlar [13]. Bunun yanı sıra, bazı kinazlar ise gen regülasyonu, nörotransmitter biyosentezi, DNA transkripsiyonu ve replikasyonu, organel trafiği, düz kas kasılması ve hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi oldukça geniş hücresel işlevleri düzenleyebilmektedir [5].

Protein kinaz ailesi içinde bulunan içsel ve dışsal streslere karşı cevapta rol alan MAPK (**M**itojenlerle **A**ktive edilen **P**rotein **K**inazlar) ailesi üyeleri, hedef protein substratları üzerinde bulunan spesifik Serin (Ser) ve Treonin (Thr) aminoasitlerini fosforilleyerek birçok önemli hücresel fonksiyonda görev alırlar [14]. Genel olarak üç kinaz modülünden (MAPKKK→ MAPKK→MAPK) oluşan MAPK sinyal yolunda bulunan kinazlar fosfat transferi ile birbirlerini ardışık bir şekilde aktive ederler ve hücre yüzeyinden başlayıp çekirdekte sonlanan bir sinyal ağının merkezinde görev almaktadırlar [14-16]. Çevresel durum ve değişimi algılama ve cevaplama ökaryotlar öncelikler MAPK yolunu kullanırken; prokaryotik canlılar “iki bileşenli sinyal yolunu” kullanırlar [17, 18]. Tek hücreli organizmalar genel anlamda sinyal yollarının anlaşılmasına çok önemli katkılar sağlamıştır. Ancak MAPK sinyal yolu bileşenleri ile ilgili olarak tek hücreli ökaryotik protistlerde yapılan çalışmalar, diğer ökaryotiklere nispeten oldukça azdır [19-22]. Tek hücreli ökaryotiklerin çoğunun deneysel kullanılabilirliğinin yaygınlaşması, *Tetrahymena* gibi tek hücreli model ökaryotları popüler kılmıştır [23-27]. Silli bir protist olan *Tetrahymena thermophila* üzerine yapılan araştırmalar, kırk yılı aşkın bir süredir bilim dünyasına temel biyolojik prensipler ile ilgili çok önemli bilgiler kazandırmaya devam etmektedir. *Tetrahymena thermophila* SB210 ırkının 2006 yılında tamamlanan makronükleer genom projesi bulguları [28], bu organizmayı sinyal transfer yollarının yanı sıra organizmal ve evrimsel biyoloji gibi birçok alanda yapılacak araştırmalar için önemli bir konuma getirmiştir [28]. Böylelikle tek hücreliler seviyesinde, çevresel değişiklikleri algılama ve cevap oluşturma arkasındaki biyolojik mekanizmaların anlaşılmasının önemi bakımından MAPK ailesi üyelerinin araştırılması olanağı da doğmuştur. Bu çalışmada, *Tetrahymena thermophila* makronükleer genom projesinin ortaya çıkardığı dizi bilgisi

kullanılarak tüm kinaz ailesi içinde tespit edilebilen olası 11 MAPK ailesi üyesinin biyoinformatik olarak analizi ile değişik sıcaklık şartları gibi süreçler içerisinde mRNA seviyesindeki ekspresyon profilleri araştırılmıştır.

1.1.Kinom

Bir organizmanın genomunda bulunan protein kinaz ailesi üyelerinin tümünü oluşturan sete ise “kinom” denilmektedir [29]. Tamamlanan genom projeleri ışığında organizmal boyutta kinaz enzimlerinin genom içinde hangi ölçüde temsil edildiğini tespit etmek mümkün olmuştur [29-31]. Genom projeleri tamamlanmış önemli bazı prokaryotik ve ökaryotik model organizmaların genomlarında temsil edilen protein kinaz genlerinin tüm genoma oranları; *S.cerevisiae* % 3, *C.elegans* % 2,7, *D.melanogaster* ve *E.coli* % 2,5, *A.thaliana* % 2,3, *M.jannaschii* % 1,8 ve *H.sapiens* % 1,5 olarak tespit edilmiştir [13]. Bu tezin çalışma organizması olan *Tetrahymena thermophila*'nın genomunda ise 1069 adet protein kinaz tespit edilmiştir ve bu rakam tahmin edilen *Tetrahymena* proteomun'un yaklaşık olarak % 3.8'ine denk gelmektedir [28].

Uzun yıllar boyunca kinomu oluşturan “protein kinazlar”; Ser (Serin) ve/veya Thr (Treonin) aminoasitlerini fosforilleyen protein kinazlar ve Tyr (Tirozin) aminoasitini fosforilleyen protein kinazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmışlardır [7]. Ser ya da Thr'ni fosforilleyen protein kinazlara “Serin Protein Kinazlar” (SPK) olarak isimlendirilirken sadece Tyr'i fosforilleyen protein kinazlar “Tirozin Protein Kinazlar” (TPK) olarak adlandırılmıştır. Ancak bu iki gruptan farklı olarak hem Ser'i hem de Tyr'i fosforilleyebilen bir üçüncü grup vardır ve “her iki grup aminoasiti fosforilleyebilen kinazlar” anlamında “Dual Specific Protein Kinases” olarak bilinmektedir [12]. Protein kinazlara ait aminoasit dizi bilgilerinden yararlanılarak yapılan analizlerle ökaryotik protein kinazlar katalitik bölgelerindeki farklılık ve benzerliklerine göre beş ana-aileye ayrılmıştır. Bu aileler sırasıyla; **ACG** (cAMP-dependent protein kinase (PKA) \ protein kinase C (PKC) \ protein kinase G), **CaMK** (calcium/calmodulin-dependent protein kinase), **CMGC** (Cyclin-dependent kinases (CDKs), MAP Kinases, Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) family, Casein kinase family), **PTK** (Protein-Tyrosine Kinases) ve diğerleri anlamında “**Others**” aileleridir [6, 32]. Birçok protein kinaz ailesi üyesinin aktif ya da inaktif formlarına ait

kristalografik yapıların aydınlatılmasıyla, tespit edilen protein katlanmaları ile aminoasit dizileri arasındaki benzerlik ilişkisi dikkate alınarak proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını tahmin etmeye yönelik sınıflandırmalar da yapılmıştır [12, 13]. Yaklaşık olarak 60 bin dizinin sınıflandırıldığı bir çalışmada 25 aile belirlenmiş ve bu aileler yapısal katlanmalarındaki benzerliklerine göre 12 grup oluşturacak şekilde (Grup1-Grup12) sınıflandırılmıştır [12]. Son olarak kabul edilen sınıflandırma protein kinazları ilk olarak iki büyük gruba bölmektedir; (1) “conventional protein kinases” olarak isimlendirilen klasik protein kinazlar (ePK) ve (2) atipik protein kinazlar (aPK). ePK, grup olarak kıyaslandığında aPK’a göre çok daha büyük olup sekiz aile içermektedir. Bunlar sırasıyla; AGC, CAMK, CK1, CMGC, RGC, STE, TK, TKL aileleridir. Bu ailelere ilave olarak “other” yani “diğer” olarak adlandırılan ve üyelerinin belirlenen ailelerden herhangi birine yerleştirilemediği karışık kinaz grubu olarak belirlenen bir sınıf da oluşturulmuştur [33]. aPK’ler ise ePK’ler ile net bir şekilde dizi benzerliği göstermeyen ancak deneysel olarak protein kinaz aktivitesi gösterdiği tespit edilen üyelerden oluşmaktadır. Bu gurubu oluşturan aileler Alpha, PIKK, PHDK, RIO, BRD, ABC1, T1F1’dir. Ayrıca; H11, FASTK, G11, BCR, TAF ve A6 olarak isimlendirilen aileler de aPK grubuna dâhil edilmiştir. Ancak tüm bu aileler içinde sadece Alpha, PIKK, PHDK ve RIO ailelerinin protein kinaz aktiviteleri hakkında güçlü deneysel veriler vardır. Dolayısıyla ePK gurubu 8 aileden oluşurken aPK gurubu 4 aileden oluşmaktadır ve toplamda protein kinazlar için 12 aile belirlenmiştir. Ancak *C.elegans*, *S.cerevisiae*, *D.melanogaster*, *H.sapiens*, *M.musculus*, *P.falciparum*, *D.discoideum* organizmalarına ait kinomların tamamıyla dâhil edildiği bu sınıflandırma içinde *T.thermophila*’nın kinom bilgisi kullanılmamıştır [33].

1.2. *Tetrahymena thermophila* Kinomu

T.thermophila makronükleer genom projesi bu organizmanın kinomunun toplam olarak 1069 protein kinazdan oluştuğunu bildirmiştir. Kinomun 439 üyesi (tespit edilen kinazların %40’ı) bilinen 54 farklı kinaz aile ve alt-ailesine dâhil olurken, 37 grupta toplanan 630 adet kinaz (tespit edilen kinazların %60’ı) bilinen hiçbir bilindik aileye dâhil edilememiştir [28].

T.thermophila protein kinazları 8 gruba ayrılmıştır. Bunlar sırasıyla; AGC, Atipik, CAMK CK1, CMGC, STE, TKL ve sınıflandırtamayan protein kinazların oluşturduğu “Others” olarak isimlendirilen gruptur. Mayalarda olmayan ancak insan ve *Tetrahymena*'da bulunan 12 sınıf kinazın birçoğunun insan hastalıklarıyla ilişkili bulunması da önem arz etmektedir. *T.thermophila*'nın kinomunda, ökaryotik protein kinazlar için belirlenen sekiz aileden altısı bulunurken, RGC ve TK ailelerine ait üyeler belirlenememiştir. Ayrıca ökaryotik organizmaların bir çoğunda geniş bir şekilde bulunan bazı kinaz ailesi üyeleri *T.thermophila* kinomunda temsil edilmemektedir. Temsil edilmeyen gruplara örnek olarak; hücre siklusunda kontrol noktası kinazları olan CHK1/RAD53 kinazlar, P13 kinaz ilişkili kinaz olan TRRAP ve siklin bağımlı kinazlardan ikisi CDK7 ve CDK8'e ait üyeler verilebilir. Ayrıca önceleri *Tetrahymena*'da var olduğu düşünülen tirozin kinazlara hiç rastlanmamıştır [28]. Ancak tirozin kinazlara alternatif olabilecek wee1, Ste7 gibi çifte özellikli (dual specificity) yani tirozin ve treonin fosforilasyonu yapabilen kinazlar kinomda bulunmaktadır [28].

Genom projesi tamamlanmış diğer organizmalarla karşılaştırıldığında *T.thermophila* kinomunda birçok kinaz sınıfında genişleme olduğu tespit edilmiştir. Bilinen kinaz aileleri ile kıyaslandığında en çarpıcı genişleme, genellikle dış ortamdaki gelen sinyalleri içe ileten 83 adet üyesi ile protein histidin kinaz (HPK) ailesindedir [28]. Prokaryotik organizmalardaki sinyal iletim ağı iki bileşenli sistem olarak adlandırılan bir enzim ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu sistem iki bileşenden oluşmaktadır; “algılayıcı kısım” ve “cevap düzenleyici” kısım. Algılayıcı kısım HPK ailesi proteinlerinden oluşmaktadır. Bu kinaz proteininin N-terminal bölgesi hücre dışı sinyalleri direkt olarak algılar. C-terminal kısmı ise burada bulunan His (Histidin) aminoasitinin kendiliğinden fosforillenmesiyle “iletici-dönüştürücü” gibi davranarak sinyali cevap düzenleyici kısma iletir. Cevap düzenleyici kısımda bulunan Asp (Aspartat) aminoasiti fosfat alıcısı olarak davranır ve böylelikle fosforil grubunun His'den Asp'a transferinin katalizlenmesi sağlanmış olur [7, 17]. Böylelikle organizma dış ortamda meydana gelen ani değişikliklere gereken kısa zaman dilimi içerisinde cevap oluşturabilmektedir. *T.thermophila* kinomunda bulunan HPK üyelerinin birçoğu “sinyal algılayıcı” kısma sahiptirler ve birçoğunun transmembran domainleri olduğu tahmin edilmektedir. *T.thermophila*'nın tek hücreli bir

organizma olması ortamda meydana gelen değişiklikleri hızlı bir biçimde algılayabilmesini gerektirmektedir; dolayısıyla da bu grup protein kinazların kinomda yüksek yoğunlukta temsil edilmeleri, olasılıkla bu tür bir görevi üstlenmiş olabildiklerini düşündürmektedir [28].

T.thermophila kinomunda genişleme gösteren diğer bir grup ise mitotik kinaz ailesi üyeleridir. Mitotik kinaz ailesi üyelerinin genişleme göstermesinin olası sebebi; *T.thermophila*'nın mitoz esnasında eş zamanlı olarak birbirinden oldukça farklı prosesler içine giren iki farklı çekirdeğe (mikronükleus ve makronükleus) sahip olmasıdır. Bu durum ilave bir sinyal kompleksliği gerektirmektedir. Bu grupta genişleme gösteren kinazlara içinde CDC2, PLK ve Aurora kinazlar bulunmaktadır. Bu öngörüü destekleyen bir diğer veri de NRK ve ULK kinazlar gibi mikrotübül ağı ile ilişkili kinazlarda görülen genişlemedir [28].

1.3. *Tetrahymena* Kinazları ile İlgili Çalışmalar

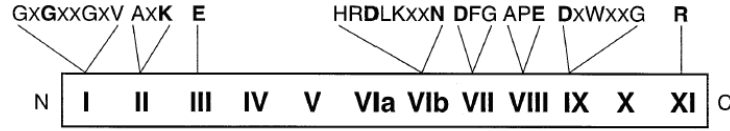
Literatür kayıtları (ISI Web of Knowledge -2009) “*Tetrahymena*” ve “kinaz” anahtar terimleri ile “başlık” sorgusu altında taratıldığında 29 kayıta rastlanırken aynı anahtar kelime kombinasyonu maya için 1165, *A.thaliana* için 129, bitki için 256 ve memeliler için 740 literatür kaydı ile sonuç bulmuştur. Bir model organizma olmasına rağmen *Tetrahymena*'nın kinaz enzimleri üzerine yapılan çalışma sayısı diğer organizmalara göre nispeten düşüktür.

Tetrahymena'da kinazlarla ilgili araştırmaların ilki 1966 yılında yapılmış ve bu çalışmada *T.pyriformis* sillerinden “arjinin kinaz” izole edilmiştir [34]. 1970 yılındaki bir çalışmada ise arjinin kinazların siller üzerindeki lokalizasyonu belirlenmiştir [35]. 1970 ile 1980 yılları arasında uridin sitidin kinaz [36], adenilat kinaz [37], sfingozin kinaz [38], timidin kinaz [39, 40], UMP CMP kinaz [41] enzimleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. 1980 ile 1990 yılları arasında ise timidin kinazlar üzerine yapılan çalışmalar devam etmiş [42, 43] ayrıca L-asparaginase/kinazlar da çalışılmıştır [44, 45]. Doksanlı yıllardan sonra *Tetrahymena* kinazları üzerinde yapılan çalışmalar daha da artmış ve cdc2 kinazlar [46, 47], cAMP bağımlı protein kinazlar [48], tirozin kinaz [49, 50], protein kinaz C [51], MAPK-ilişkili kinaz [52], kalsiyum bağımlı protein kinaz [53], NIMA bağımlı protein kinazlar [54] çalışılmıştır.

1.4. Protein Kinazların Karakteristik Özellikleri

Proteinlerin geri dönüşümlü olarak fosforile edilmeleri hücrede gerçekleşen en önemli translayon sonrası modifikasyonlardandır [5]. Protein kinazlar ATP-bağımlı fosfotransferazlar olup, ATP'nin γ pozisyonunda bulunan fosforil gurubunu; Ser (Serin), Tyr (Tirozin), His (Histidin) ve Thr (Treonin) amino asit rezidülerinin hidrosil gruplarına transfer ederler. ATP'yi bağlamada ve de fosforil gurubun transferi reaksiyonunda esasnsiyel bir divalent iyon olan Mg^{2+} 'a ihtiyaç duyarlar. Protein kinazlar genel olarak substratları üzerindeki fosforilasyon bölgesinin hemen etrafında bulunan aminoasitlerin özelliklerine göre bu bölgeyi fosforillemektedir. Bu bölgeye "P Bölgesi" denilmektedir ve P bölgesinin N-terminal yönünde bulunan aminoasitler P-1, P-2 ve P-3 olarak adlandırılırken, C-terminal yönüne doğru sıralanan aminoasitler P+1, P+2 ve P+3 aminoasitleri olarak isimlendirilmektedir [5]. Örneğin; CMGC ailesi içinde bulunan MAPK ve CDK ailesi üyeleri substratlarının P bölgesinde Ser(Serin) aminoasidi olduğu ve P+1'de de Pro (Prolin)'in bulunduğu durumlarda Ser'i fosforillemeyi tercih eden protein kinazlardır [5, 7, 55]. Fosfat transfer mekanizması kimyasal olarak basit bir reaksiyon olsa da substratların protein kinaz aktif bölgesinde fosforillenmesi yapısal değişikliklere neden olan kompleks bir olaydır [5, 56]. Tüm ökaryotik protein kinazlar "katalitik bölge" olarak da bilinen ve yaklaşık olarak 250-300 aminoasitten oluşmuş homolog "kinaz domain"leri bakımından ortaklık taşımaktadırlar [6, 32, 56, 57]. Bu bölge birbirinden farklı üç temel fonksiyonu yerine getirmektedir: (1) ATP (ya da GTP)'nin terminal fosfatının divalent bir katyon yardımıyla (Mg^{2+} ya da Mn^{2+}) tutulması ve oryantasyonu, (2) substrata bağlanma ve oryantasyon ve (3) ATP(GTP)'nin terminal fosfatı (γ -fosfat)'nin substratta bulunan Ser-Thr ya da Tyr aminoasitlerin aktarılması [32]. Kinaz domaini 12 korunmuş alt kısma ayrılmıştır. Bu alt bölümler sıkı korunmuş aminoasit motifleri taşırlar ve çok nadiren uzun aminoasit dizi bloklarıyla bölünme gösterirler [56, 58]. Kinaz bölgesi iki loblu bir yapı şeklindedir. Bunlardan küçük olanı I-IV arası kısımları içeren N-terminal lobu olup ATP'nin bağlandığı bölgeyi teşkil etmekteyken; büyük olan C-terminal lobu VIa-XI arasındaki kısımları içeren, substrata bağlanma ve fosfotransfer olayının büyük oranda gerçekleştiği kısımdır. V numaralı kısmı oluşturan aminoasitler kendi içlerinde iki alt kısma ayrılır. İki ana lobun arasında bulunan

girinti şeklindeki bölge katalitik kısımdır. Substrat bağlanmasına bağlı olarak bu iki bölge arasında bir esneklik söz konusudur ve bu “indirgenmiş oturma mekanizması” olarak adlandırılır [58].



Şekil 1.1: Protein kinaz katalitik bölgesinin grafik gösterimi: Protein kinazlar sıkı korunmuş 12 alt bölgeden oluşmaktadır. Şekilde bu bölümler ve ilgili korunmuş aminoasit motifleri görülmektedir.

Açık (aktif) formasyondan kapalı (inaktif) formasyona geçiş bu kısımda gerçekleşir. MAPK enzimlerinin katalitik bölgesini oluşturan korunmuş 12 alt kısma ait temel özellikler aşağıdaki gibi izah edilebilir [58]:

Alt bölge I, GxGxxGxV konsensüs motifi içermektedir. Motiftteki G (glisin) korunmuştur ve X herhangi bir aminoasidi temsil etmektedir. Bu kısım esnek bir toka gibi hareket ederek, ATP'nin transfer edilmemiş fosfatlarına bölgenin bağlanmasını sağlar. Alt bölge II, maksimal kinaz aktivitesi için gerekli olan korunmuş Lys (K) aminoasiti bulunur. Lys aminoasitinin bir aminoasit önünde ise Alanin (A) aminoasiti bulunur ve AxK motifi olarak ifade edilir. Bu kısım ATP'nin tutulması ve oryantasyonunda önemli bir rol oynar. Bu bölgedeki Lys aminoasiti Alt bölge III'de bulunan korunmuş glutamat (E) aminoasiti ile etkileşimdedir. Alt bölge IV ve Alt bölge V korunmuş veya yarı korunmuş hiçbir aminoasit taşımaz. Alt bölge VIa temelde destek yapısı olarak görev yapar. Alt bölge VIb, aspartat (D) ve asparjin aminoasitlerini korunmuş olarak HRDLKxxN motifinde taşır. Korunmuş aspartatın (D) bulunduğu bölge Katalitik Loop olarak adlandırılmıştır, çünkü bu aminoasit katalitik aktiviteye temel teşkil eder. Loopta bulunan lisin (K) aminoasiti de ATP'nin γ -fosfatıyla ilişkiye girer ve fosfat transferinin gerçekleşmesine yardımcı olur. Alt bölge VII, ATP ile şelat yapan metallerin bağlandığı kısımdır. Alt bölge VIII'de korunmuş APE motifi bulunur ve bir loop oluşturacak şekilde katlanmış olan bu bölge katalitik cleft ile yüz yüzedir. APE'deki E (Glu) aminoasiti, Alt bölge IX.'daki R(Arg) aminoasiti ile bir iyon çifti oluşturarak C terminal lobunun stabilitesini sağlar. IX. bölgedeki D (Asp) aminoasiti neredeyse korunmuş olup DxWxxG konsensüs motifinde bulunur. Bu aminoasit katalitik loop'un stabilitesini sağlar. Alt bölge X'un

korunmuşluğu çok zayıftır. Alt bölge XI. ise Alt bölge VIII. ile birlikte büyük kinaz lobunun yapısal dengesinin sağlanmasına yardımcı olur. DFG ve APE motifleri arasındaki bölgede bulunan VII ve VIII bölgeleri “aktivasyon bölgesi” olarak tanımlanmıştır. Bu segmentin merkezi kısmında yer alan aminoasitler protein kinaz aile üyeleri arasında genellikle iyi derecede korunmuşluk gösterirler. Örneğin; MAPK ailesinde bulunan TxY motifi bu tür bir motiftir ve aileye ait üyelerin kinaz düzenleyicileri tarafından fosforile edildiği, dolayısıyla da “fosforilasyon motifi” olarak bilinen kısımdır. İnaktif kinazların konformasyonu düşünüldüğünde DFG bölgesi ile N-terminal uç arasındaki etkileşimler sayesinde küçük ve büyük loblar açık yapıda (fosforile edilebilecek şekilde) tutulmaktadır. DFG ve APE motifleri arasında bulunan segmentin fosforilasyon ile modifikasyonu sayesinde büyük ve küçük kinaz domainlerinin doğru bir şekilde pozisyon değişikliği geçirmesini tetikler ve böylelikle aktif form oluşur [7, 55, 58].

1.5. Protein Kinazların Kontrolüne Katıldığı Biyolojik Durumlar

Canlıların yaşamsal süreçleri boyunca gerçekleşen gen ekspresyon profilleri sürekli olarak çeşitli uyarıcılar tarafından düzenlenmektedir. Hücre membranını geçebilen lipofilik sinyal molekülleri dışında transkripsiyon aktivitesinin düzenlendiği ortak mekanizma hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda protein fosforilasyonudur [59]. Protein fosforilasyonu, transkripsiyon aktivitesinin hızlı bir biçimde gerçekleşmesinin gerekli olduğu durumlarda tercih edilen bir tür transkripsiyon sonrası modifikasyondur ve ileri derece önemli bir modifikasyon türüdür [7, 59]. Bir molekülün fosforillenmesi o molekülü aktive ya da inaktive edebilmektedir. Örneğin bir transkripsiyon faktörü olan cJun’ın hem N-terminal ucunda hem de DNA’ya bağlanma bölgesine yakın bir konumda fosforilasyon bölgeleri vardır. cJun’ın N-terminal ucundan fosforillenmesi (MAPK ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilir) cJun’ı aktive ederken, DNA bağlanma bölgesine yakın konumundan fosforillenmesi cJun’ı inaktive etmektedir [7].

Protein fosforilasyon döngüsünü etkinleştiren üç büyük sınıf stimülasyon vardır. Bunlar; hücre dışından gelen sinyaller, hücre siklusu kontrol noktaları ve çevresel ve besin azlığı stresleridir. Bu tür etkilerin sebep olduğu protein

fosforilasyon döngüleri birbiriyle paralel veya çapraz etkileşimli bir şekilde çalışmaktadır. Örneğin birçok memeli büyüme faktörü hücrelerin hücre siklusuna girişini tetiklerken, mayanın eşleşme faktörleri ve TGF Beta gibi bazı memeli büyüme faktörleri hücre siklusuna girişi bloke eder. Aynı şekilde maya da besin kıtlığına bağlı strese cevap olarak hücre siklusuna giriş bloke edilmektedir [32, 60].

Hücre Dışı Sinyaller: Hücrenin protein fosforilasyonu yoluyla cevap oluşturduğu uyarıcılar içinde en fazla yer alan ekstraselüler kaynaklı sinyallerdir. Bu tür ekstraselüler sinyaller içinde hormonlar, nörotransmitterler, büyüme ve farklılaşma hormonları, ekstraselüler matriks molekülleri, komşu hücrelerle iletişim ve adhezyon olaylarına katılan membran proteinleri yer almaktadır. Genellikle çok hücreli organizmalarda bulunan bu gibi uyarıcıların benzerleri tek hücreli ökaryotlarda da mevcuttur [32, 60].

Hücre Siklusunu Kontrol Noktaları: Hücre bölünmesi esnasında gerçekleşen DNA replikasyonu ve mitoz hücre siklusunun belirli noktalarında zamanlama bakımından tam bir kesinlikle gerçekleşmek zorundadır. Hücre siklusunu kontrol noktaları; bir önceki fazda gerçekleşmesi gereken mitoz ve kardeş kromatitlerin duplikasyonu gibi olayların tamamlanıp tamamlanmadığının kontrol edildiği ve aksi durumda hücre siklusunun durdurulduğu noktalardır. Siklus içindeki herhangi bir proses tamamlandığında bir sonraki faza geçiş protein fosforilasyonu siklusları ile tetiklenmektedir. Burada özellikle rol alan protein kinazlar sikline bağımlı protein kinaz (CDPK) ailesi üyeleridir. CDPK üyeleri aynı zamanda büyüme ve farklılaşma hormonları gibi ekstraselüler sinyaller ve de besin durumu ile ilgili faktörler tarafından da uyarılmaktadır [32, 60].

Açlık ve Çevresel Stresler: Tek hücreli ökaryotik organizmalar için, buldukları ortamın besin içeriğinin kontrol edilmesi hayati bir önem taşımaktadır. Ortamda eksilen bazı esansiyel besin maddeleri ile oluşan açlık durumuna hücrenin vereceği cevabı oluşturan çok sayıda protein kinaz sistemi bulunmaktadır. Örneğin maya için, glukoz yokluğunda Snf1, fosfat yokluğunda Pho85 ve aminoasit yokluğunda Gen2 protein kinazları aktive olmaktadır. Çok hücreli organizmalarda ise hücreler genellikle besin bakımından içeriği nadiren değişen bir ortam içine gömülü olduklarından, tek hücrelilerde açlığa karşı

oluşturulan cevapta etkin olan protein kinazların benzerleri sıcaklık şoku gibi çevresel stres koşullarında aktif olmaktadır [32, 60].

1.6. MAPK Ailesi Protein Kinazlar

İlk kez 1987 yılında tanımlanan MAPK'ler sekiz büyük ökaryotik protein kinaz ailesinden biri olan CMGC ailesine dâhildir [61]. CMGC ailesi; CDK (siklin bağımlı kinazlar), MAPK (mitojenlerle aktive olan protein kinazlar), GSK3 (glukoz sentez kinazlar) ve Cdk (Cdc benzeri kinazlar) olmak üzere dört alt-aile içermektedir. MAPK alt ailesi; CMGC ailesinin prototipi olarak kabul görmektedir [7, 55]. CMGC ailesi protein kinazlar, dolayısıyla da MAPK'ler, alt bölgeleri X ile XI arasında bulunan insersiyonlar sebebiyle diğer protein kinaz domainlerine göre daha büyük bir domaine sahiptirler [6]. MAPK ailesi üyeleri, P+1 bölgesinde Pro bulunan substratları fosforillemeleri bakımından ve fosforilasyonda Ser aminoasitlerini tercih etmeleri bakımından “proline directed ser-thr kinases” olarak isimlendirilmişlerdir [7].

MAPK ailesi üyelerinin oluşturduğu sinyal ileti ağı, ökaryotik hücre regülasyonunda görev alan en geniş mekanizmalar arasında yer almaktadır [7]. Bütün ökaryotik hücrelerde birbirinden ayrı kümeler oluşturan sinyal gruplarına cevap oluşturabilmek amacıyla özelleşmiş birden fazla sayıda MAPK sinyal yolağı bulunmaktadır. Böylelikle hücreler aynı anda farklı kümelerden gelen sinyallere karşı uygun hücresel cevabı oluşturabilmektedir [7, 15] .

MAPK yolları çok çeşitli reseptör aileleri yoluyla etkileşim oluşturan çok geniş ve farklı uyarıcılar -hormonlar ve büyüme faktörleri- tarafından aktive olurlar ve aktivasyonlarında rol alan reseptörler içinde reseptör tirozin kinazlar, sitokin reseptörleri, GPCR, Ser-Thr Kinaz reseptörleri yer almaktadır [7, 15, 16, 62]. Bu reseptörleri uyaran sinyal molekülleri arasında ise hormonlar, büyüme ve farklılaşma faktörleri (insülin, EGF, PDGF, FGF / ANG II, endotelin, TNF gibi), viral enfeksiyonlar, kanser yapıcılar ve çevresel stresler yer almaktadır [14, 15]. MAPK'ler ayrıca, mayoz, mitoz ve farklılaşmış hücrelerde oluşan mitoz sonrası fonksiyonlara da katılmakta ve hareket, metabolizma, programlı hücre ölümü gibi hücresel aktiviteleri düzenlemektedirler [16].

1.7. MAPK Sinyal Ağı ve Kontrolüne Katıldığı Biyolojik Durumlar

MAPK sinyal ağları evrimsel olarak korunmuş ardışık bir şekilde aktive edilen üç bileşenden meydana gelmektedir. Tüm MAPK yollarının merkezinde üç grup enzim (MAPKKK, MAPKK, MAPK) bulunmaktadır ve MAPKKK→MAPKK→MAPK sıralamasıyla birbirlerini fosforillerler [14-16, 62-64]. Bu modülün en üstünde bulunan MAPKKK üyelerinin N-terminal kısımlarında düzenleyici domainler bulunurken C-terminal domainlerinde ise protein kinaz domaini bulunmaktadır. Genellikle STE20/PAK kinazlar tarafından fosforillenerek, ya da küçük GTP bağlanı proteinler ile (Ras ve Rho ailesi üyeleri gibi) etkileşime girerek aktive edilirler [65-67]. Ser/Thr kinaz olan MAPKKK'ler aktive edildiklerinde modüldeki ikinci grup kinazları (MAPKK) Ser ve Thr aminoasitlerinden fosforilleyerek aktive ederler [66, 67]. Bir organizmada MAPK modülünü oluşturan üç kinaz ailesi içinde MAPKKK'ler sayısı MAPK'lere ya eşit ya da daha fazladır [66, 67]. MAPKKK'lerin genellikle sayıca daha fazla olmasının olası sebebi; organizmanın/hücresinin karşılaştığı yüksek çeşitlilikteki sinyal sayısındaki fazlalığa karşı seçici bir cevap oluşturulabilmesine olanak tanınmasıdır. Bu yolla sinyaller ayırt edilebilmekte ve uygun cevap eş zamanlı olarak oluşturulabilmektedir. Bir diğer olasılık da MAPKKK'lerin substratlarının sadece MAPKK'ler ile sınırlı olmamasıdır. Bir MAPKKK olan MEKK1'in hem MAPK-JNK yolağını hem de NFκB yolağını düzenlemesi bu duruma örnek olarak verilebilir [15, 66-69]. MAPKKK'ler tüm MAPK modülü içinde “**sinyal toplayıcı – dağıtıcı**” tek birimdir [70].

MAPKKK'ler tarafından fosforillenen MAPKK'ler substratları olan MAPK'lerin aktivasyon lollarında bulunan hem Thr hem de Tyr'ni fosforile edebilme özelliklerinden ötürü çifte spesifiteli kinazlar olarak bilinmektedirler [71]. Sinyal modülünün merkezinde yer alan MAPKK'ler, MAPKKK'ler kadar yüksek sinyal özgünlüğüne sahip değildirler, dolayısıyla da sadece **sinyal toplayıcı noktalar** olarak görev yapmaktadır ve genellikle sayıca MAPKKK ve MAPK'lerden daha az bulunmaktadır [66, 70]. MAPK'ler ise ağ içinde yukarıdan aşağıya doğru toplanan sinyalleri uygun efektörlere iletmekle görevli **sinyal dağıtıcılar**'dır [70]. MAPKK'ler tarafından fosforillenerek aktive edilen MAPK ailesi üyeleri aktivasyon lollarında TxY motifi taşımaları ile diğer üyelerden ayrılırlar.

S.cerevisiae'de farklı hücresel prosesleri kontrol eden beş ayrı MAPK yolu belirlenmiştir. Bu yolların kontrol ettiği biyolojik olaylar sırasıyla; eşleşme (mating) , sporülasyon, hücre duvarı bütünlüğünün sağlanması (cell wall integrity), yayılcı bölünme (invasive growth) ve yüksek ozmolariteye cevaptır. Örneğin yüksek ozmolariteye cevabın oluşturulduğu MAPK yolu HOG (high osmolarity glycerol-1) yolu olarak adlandırılmıştır. Hücrenin bulunduğu ortamdaki ozmolaritenin yükselmesi durumunda HOG-1 yolu aktive olarak ozmotik dengeleyici gliserol'ün üretilmesi sağlanır. HOG1'in aynı zamanda sıcaklık şoku (heat shock), oksidatif stres ve sitrik asite karşı cevap oluşturduğu bildirilmiştir [30, 67]. Eşleşme feromonuna (mating pheromones) karşı Fus3 ve Kss1 aktive olarak eşleşme cevabı oluştururlar. Kss1 aynı zamanda diploid hücrelerdeki yalancı hif gelişimde ve haploid hücrelerdeki yayılcı bölünmede önemli bir rol almaktadır [72]. Ayrıca Kss1'in hücre duvarı bütünlüğünün sağlanması yoluna da katıldığı bilinmektedir. Slr2 ise birbirinden farklı çevresel stresler altında hücre duvarı bütünlüğünün sağlanması yolunda görev almakta olan diğer bir MAPK'dir [72].

Mayada bulunan MAPK yolları çok farklı koşullara karşı modüller halinde organize olmuşlardır. Modüller şeklinde gerçekleşen bu tür bir organizasyon sayesinde MAPK yolları ile gerçekleşen sinyalizasyonun hücrede oluşan diğer sinyalizasyon olaylarından ayrılması sağlanır [66]. Modüller organizasyonun diğer bir katkısı da, belli bir MAPK'in birden fazla MAPK modülü içinde, oluşturulan cevabın özgünlüğünü bozmadan görev yapabilmesini sağlamasıdır. Modüller arasındaki çapraz etkileşimi ve modüllerin içerdikleri MAPK'lerin fonksiyonelliğe göre organizasyonunu sağladığı düşünülen mekanizmanın arkasında yatan iki temel etmenden biri MAPK'ler üzerinde bulunan özgün bağlanma domainleri iken diğeri. MAPK iskele (scaffold) proteinleridir [66, 73]. Örneğin mayada bulunan Ste5 iskele proteini, enzimatik olarak herhangi bir fonksiyonel bölgeye sahip olmamakla birlikte mayadaki eşleşme yolu için esansiyeldir. Ste5 seçici olarak bu yolda yer alan Ste11 (MAPKKK), Ste7 (MAPKK) ve Fus3 (MAPK)'e bağlanır ve modülün üst aktivatörlerle etkileşimini sağlar [66, 73]. Memelilerde de MAPK modüllerinde görev yaptığı düşünülen benzer iskele proteinleri belirlenmiştir (JIP1, JIP2, JSAP1, JLP, KSR) [73].

İskele proteinlerinin bir diğer önemi de MAPK yolağında oluşan sinyal gücünün ve süresinin belirlenmesinde etkin olmasıdır [74], çünkü herhangi bir sinyalin hiperaktivasyonu yani sinyal yoğunluğu ya da aktive edilme süresinin normalden fazla olması hücrelerde ölümcül sonuçlara sebep olabilmektedir [75]. Bu tür bir dengesizliğin oluşmasını önlemek konusunda iskele proteinleri dışında etkili olan bir diğer moleküler mekanizma ise protein fosfatazlar tarafından gerçekleştirilmektedir [75]. Aktivasyon loplardaki Thr ve Tyr aminoasitlerinden fosforillenerek aktive edilen MAPK'ler aynı şekilde Thr ve Tyr aminoasitlerindeki fosfatların uzaklaştırılmasıyla defosforile edilerek inaktive olurlar ve bunu gerçekleştiren protein fosfatazlar “çifte spesifiteli protein fosfatazlar” dır (DSPs- Double Specifity Protein Phosohotases). Buna ek olarak “protein tirozin fosfatazlar” ve “protein serin/treonin fosfatazlar” da MAPK yolağı içinde düzenleyici görev yapmakta olan diğer iki grup protein fosfatızı oluşturmaktadır [75].

Karmaşık sinyal ağı içinde MAPK'ler üzerinde bulunan özgün bağlanma domaileri spesifik etkileşimleri garantileyen diğer bir mekanizmayı etkin kılmaktadır ve bu mekanizma MAPK'lerle etkileşen proteinler üzerinde bulunan ve “MAPK docking sites” olarak isimlendirilen kısımlar tarafından gerçekleştirilmektedir [76, 77]. Bu kısa aminoasit dizileri MAPK'ler üzerindeki “bağlanma bölgeleri” ile etkileşir ve böylelikle MAPKK→MAPK aktivasyonu, MAPK→Substrat fosforilasyonu ve MAPK defosforilasyonu gibi etkileşimlerin özgün bir biçimde gerçekleşmesi sağlanır [76, 77]. Ancak bu güne değin hakkında en fazla çalışma yapılan bölge D bölgeleri olarak bilinir.

D Bölgesi; MAPK'lerle etkileşen MAPKK'lerde, transkripsiyon faktörlerinde, iskele proteinlerinde ve MPK'larda bulunan “ MAPK bağlanma bölgeleri buldukları proteinlere göre “docking site”, “D Domain” ve δ Domain” gibi ortak isimlerle adlandırılmıştır. Ancak bu bölgelerin tümü, sahip oldukları ortak özellik bakımından tek bir isim altında “ D Bölgesi” adı altında toplanmıştır [64]. MAPKK'lerde, MAPK substratlarında, fosatazlarda ve iskele proteinlerinde bulunan D Bölgeleri üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları ve kristalografik çalışmalar, bu bölgelerin MAPK'ler üzerinde aynı bölgeye bağlandıklarını göstermiştir. D bölgesinin taşıdığı uzlaşma dizisi olan $(Arg/Lys)_{1-2}-(X)_{2-6}-\emptyset_A-X-\emptyset_B$ (\emptyset_A ve \emptyset_B hidrofobik aminoasitler Leu, Ile, ya da Val'i temsil etmektedir)

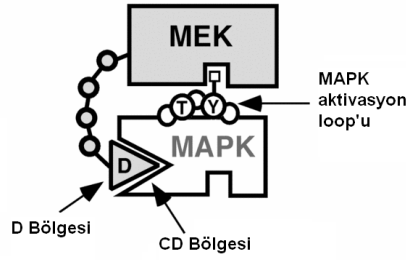
üzerindeki bazik aminoasitler, MAPK'lerin yüzey kısmında bulunan asidik bir yama ile elektrostatik olarak etikleşirken [64, 78], hidrofobik kısımlar da bu etkileşime önemli ölçüde katılım yapmaktadırlar [79]. D bölgelerine ilave olarak bazı diğer tanımlanmış diğer bir bölge de FXFP (Phe-X-Phe-Pro) bölgesidir ve bu bölge D bölgesinin bağlandığı bölgeden farklı bir yere bağlanmaktadır [80, 81].

CD Bölgesi; D bölgelerinin MAPK'ler üzerinde etkileştikleri bölge ise CD (Common Docking ya da Cognate Docking Domain) bölgesi olarak tanımlanmıştır. CD bölgesi, MAPK'lerin aktif bölgesinin sırtında (zıt yönünde) yer almaktadır [64, 78-80, 82]. Buraya bağlanan MAPKK, MAPKAP ve fosfatazlar, N-Terminal kısımlarında yer alan D Bölgeleri vasıtasıyla MAPK üzerindeki CD bölgesi ile etkileşirler. CD bölgesi asidik bir yama şeklindedir ve bu yama hidrofobik aminoasitler ile çevrilmiş durumdadır. MAPK'ler üzerindeki yeri α D- α E ve β 7- β 8 arasında kalmaktadır. CD bölgesi MAPK'lere bağlanan substratlarda görülen ve bazik aminoasitlerle hidrofobik aminoasitlerin oluşturduğu D bölgesine bağlanma dizisini içermektedir. Bütün MAP kinazlarda korunmuş olan bu bölge DXX(D/E) motifi sergilemekte ve korunmuş kinaz katalitik bölgesinin hemen ardından gelmektedir. Burada bulunan asidik aminoasitler olasılıkla substratların D bölgelerine ve diğer bağlanma bölgelerinde bulunan bazik aminoasitlere bağlanmaktadır. Aktif ve inaktif MAPK formları arasındaki en büyük yapısal değişikliklerin gözlendiği CD bölgesinde yer almaktadır. Ancak CD bölgesinin bağlanma üzerindeki etkinliği, birbirinden farklı birçok MAP kinazın gösterdiği farklı bağlanma özgünlüklerini tek başına açıklamaya yetmemektedir. Bunun üzerine yapılan çalışmalar sonucunda CD bölgesine ilaveten yeni bir bölge daha belirlenmiştir. Bu bölge MAPKAP'lerle oluşan karşılıklı bağlanma etkileşimine katılmaktadır ve ED bölgesi olarak isimlendirilmiştir. ED bölgesi de aktif merkezin aksi kısmında yer almaktadır. ED bölgesi MAPKAP (MAPK'lerle aktifleşen Protein Kinazlar) etkileşimlerinde gereklidir ve β 7- β 8 bölgesinde yer alır [64, 78-80, 82].

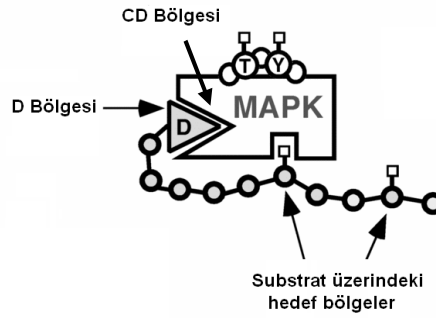
ED ve CD bölgelerinin bulunduğu sterik oluk (groove) genel bağlanma oluşu olarak görev yapmaktadır. MAP kinazlarla etkileşen her tür proteinin bu bölgeye bağlanması gerekmektedir ve bu bölgedeki her bir aminoasit her bağlanma reaksiyonuna farklı şekilde katılmaktadır. MAPK'ler, yolağı oluşturan üst ve alt elemanlarla etkileşimi esnasında CD/ED bölgesi sıklıkla

kullanılmaktadır. MAPK'ler üst elemanlar tarafından fosforillenirken en az iki noktada fiziksel kontak kurarlar. Aynı şekilde substratlarından biri olan transkripsiyon faktörleri ile etkileşirken bir yandan substrat üzerinde bulunan PXS/TP ya da S/TP motifi ile etkileşirken diğer yandan D-CD bölgesi etkileşimi ile ilişki kurarlar (Şekil 1.2) [79-82].

A



B



Şekil 1.2: MAPK enzimlerinin aktivatör ve substratlarıyla etkileşimi. A: MAPK aktivasyonu esnasında MAPKK ve MAPK'in birbiriyle etkileşimi. MAPKK'ler taşıdıkları D bölgesi ile MAPK'lerin CD bölgesine bağlanırlar. **B:** Substrat fosforilasyonu esnasında substrat ve MAPK'lerin etkileşimi. MAPK'ler substratlarında bulunan D bölgesi ile sahip oldukları CD bölgeleri ile etkileşirler. Substratlar üzerinde bulunan etkileşim bölgeleri. (Bardwell, L., 2006. Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochemical Society Transactions*, 34, sf.838 deki şekilden adapte edilmiştir.)

Klasik MAPK'lerden farklı olarak; taşıdıkları C terminal kısmının normalden fazla uzun olması, proteinlerin normalden büyük olması, fosforilasyon motiflerindeki farklılıklar, bilinen MAPK aktivatörlerinden farklı proteinler tarafından aktive edilebiliyor olmaları ya da otonom olarak kendi kendini fosforile ederek aktive olan ya da aktivasyonunu yitiren başka bir grup MAPK'de mevcuttur. ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7 ve ERK8 gibi MAPK üyeleri bu grupta bulunmaktadır [83]. Araştırmalar bu grup MAPK üyelerinin bir kısmında (ERK7 ve ERK8 gibi) CD bölgesi gibi bilinen klasik oturma bölgesi bulunmamaktadır. Dolayısıyla da üst ve alt yolak elemanlarıyla olan

etkileşimlerinde, alışlagelmişin dışında bir ilişkinin söz konusudur. Ayrıca, klasik aktivasyon domaini içeren bazı MAPK'lerin de CD bölgesi içermediği bilinmektedir [20, 22].

1.8. MAPK'lerin sınıflandırılması

MAPK'lerin sınıflandırılması konusunda yapılan ilk detaylı çalışma Kültz [11] tarafından gerçekleştirilmiş olup günümüzde de büyük ölçüde geçerliliğini korumaktadır. Kültz [11], farklı canlı gruplarından gelen 93 adet MAPK aminoasit dizisi ile yaptığı sınıflandırmada MAPK ailesi üyelerini diğer protein kinazlardan ayırt etmeye yönelik olarak bir uzlaşım dizisi tespit etmiştir. Buna göre MAPK'ler arasında korunmuş uzlaşım dizisi relative characterisation of t.thermohila rela [TS]

XX [LIVM] XT [RK] [WY] YRXPX [LIVM] [LIVM] olarak belirlenmiştir ve MAPK ailesi üyelerinin diğer protein kinazlardan ayırt edilmelerinde güçlü bir kriterdir [11, 62]. Kültz'ün [11] yaptığı sınıflandırmada A, B ve C olarak isimlendirilmiş üç ana grup oluşmuştur

A Grubu (SAPK) : Stres ile aktive edilen protein kinazların oluşturduğu SAPK alt gurubu en az üç alt-aileden meydana gelmektedir. Alt ailelerin dışında olan ancak SAPK alt gurubuna dahil bir dizi olan *C. elegans* SAPK proteini, belirlenen alt ailelerden hiçbirisine uygunluk göstermemektedir. Diğerlerinden farklı olarak TQY fosforilasyon motifi taşımakta olan *C. elegans* SAPK diğer tüm SAPK altailerinden filogenetik olarak da ayrılık göstermektedir. Alt-aileler sırasıyla şöyledir; (1) SAPK1, (2) SAPK2, (3) YSAPK, (4) *C.elegans* SAPK [11].

B Grubu (ERK) : Ekstraselüler sinyallerle düzenlenen protein kinazlar olarak adlandırılan ERK alt gurubu; en az beş alt-aile içermektedir. Bu aileye dahil olan iki protein beş altailenin hiçbirine uygunluk göstermemektedir. Bu dizilerden biri olan *Dictyostelium discoideum* ERKa hem PERK hem de YERK1 altilesi ile ilişkili görülmeyle birlikte dizilerindeki dikkate değer farklılık sebebiyle herhangi bir guruba dahil edilememiştir. Dizi benzerliğindeki zayıflığıyla beraber dallanma bölgesindeki nispeten düşük bootstrap değeri de bu durumu desteklemektedir. Diğer dizi olan yeast SMK1 ise sahip olduğu TNY çifte fosforilasyon motifi üçüncü YERK altilesini (YERK1 ve YERK2 ye ilaveten)

oluşturacak gibi durmaktadır. Bu alt grup için tespit edilen alt-aileler sırasıyla; (1) PERK, (2) YERK1, (3) YERK2, (4) ERK1, (5). ERK5, (6) *Dictyostelium discoideum* ERKa, (7) Yeast SMK1 [11].

C Grubu (MAPK3): MAPK3 alt-gurubu ise, diğer iki grupla önemli kabul edilebilecek bir dizi benzerliği içermeyen dizilerden oluşmaktadır. Tanımlanabilen sadece bir adet alt-ailesi vardır ve bu alt aile “Hayvan MAPK3 alt-ailesi” olarak isimlendirilmiştir. Bu gurubu oluşturan dizilerin 5 tanesi protista’dan gelmektedir. Ayrıca alışılmadık insan ve sıçan MAPK’leri ve *Caenorhabditis elegans* ve *Dictyostelium discoideum*’dan gelen MAPK dizileri de bu alt-ailede bulunmaktadır. Bu sınıflandırmada değerlendirilen protista MAPK’leri diğer gruplarda düşük derecede dizi benzerliği göstermektedir ve alt-aile oluşturup oluşturamadıklarına dair herhangi bir veri elde edilememiştir dolayısıyla, Kültz’ün [11] elde edilen yeni MAPK dizileri ile bu sınıflandırmanın gözden geçirilmesini gerekli olduğunu vurgulamaktadır [11].

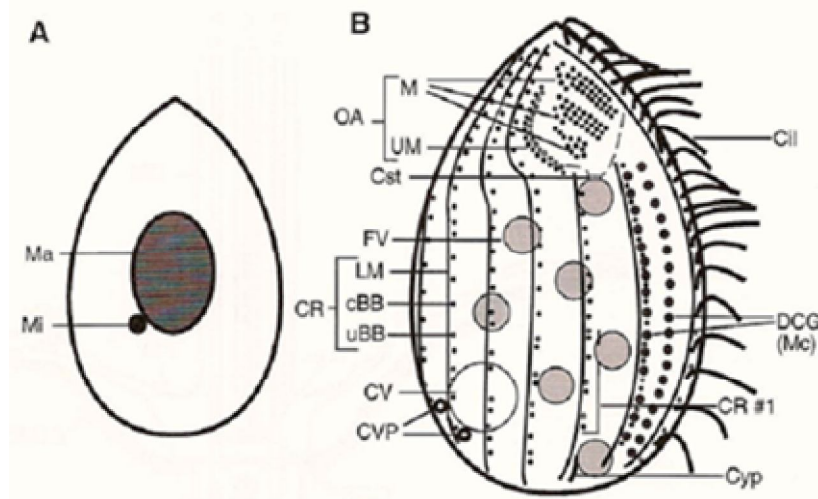
1.9. Çalışma Organizması: *Tetrahymena thermophila*

İlk kez Antony van Leeuwenhoek tarafından 1678’de “animalcule-küçük hayvancık” olarak genel bir isim altında toplanan organizmalar içinde bulunan [23] *Tetrahymena*’nın türlerine ait suşların laboratuvar kültürü haline getirilebilmesi ilk kez 1923’de Andre Lwoff tarafından başarılmıştır [84, 85]. 1940 yılında ağız yapısının (oral apparatus) dört zarlı bir yapı olduğunu tanımlayan Furgason, organizmaya “dört zarlı” anlamında “*Tetrahymena*” cins ismini vermiştir. 1951 yılında eşleşmeme tiplerinin David Gruchy tarafından tanımlanması ile *Tetrahymena* üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaşmış ve 1976’da Nanney ve McCoy yüksek sıcaklığa toleransı ile diğer *Tetrahymena* türlerinden ayrılarak *Tetrahymena thermophila* olarak isimlendirmiştir [86]. Örneğin *T.pyriformis* için maksimum sıcaklık 34°C iken *T.thermophila* için optimum sıcaklık 35C°’dir ve yaşayabileceği en yüksek sıcaklık 41°C–42°C olarak belirlenmiştir. Nanney ve arkadaşları [87] 1998’de *Tetrahymena* türlerini 23sRNA dizilerine dayalı olarak filogenetik olarak sınıflandırmıştır. Son olarak; Histonlar, SSU rRNA ve telomeraz RNA (TER) dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda *Tetrahymena* türleri *australis* ve *borealis* olmak üzere iki

büyük gruba ayrılmış ve bu sınıflandırmada *T.thermophila*, borealis grubuna dâhil olmuştur [88].

Ökaryotik organizmaların rRNA dizi temelli filogenisinde oluşan altı büyük gruptan (Archaeplastida, Opisthokonta, Amoebozoa, Rhizaria, Chromalveolata, Excavata) Chromalveolata'ya dâhildir. *Toxoplasma* ve *Plasmodium* gibi parazitik tek hücreli cinslerin içinde bulunduğu bu grup; Dinozoa, Apicomplexa ve Ciliophora olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır. *Tetrahymena thermophila* ise *Paramecium* (insan ve memelilerde sıtma gibi önemli hastalıkların etmeni) ve *Ichthyophthirius* (balık paraziti) gibi önemli türlerle birlikte *Ciliophora*'ya dâhil olmuştur. Ayrıca, Excavata'da yer alan *Trichomonas*, *Giardia*, *Trypanosoma* ve *Leishmania* gibi insan sağlığı için tehlike arz eden cinslerin filogenetik olarak *Tetrahymena*'ya yakınlığı [89, 90] bu organizmayı potansiyel olarak aşı geliştirimi için uygun kılmaktadır [91, 92]. *Tetrahymena*'nın ekonomik olarak uygun besi ortamlarında büyük miktarlarda ve kısa zamanda üretilebiliyor olması endüstriyel biyoteknoloji alanında protein üretimi için aday bir organizma olmasına sebep olmuştur [92].

Tetrahymena thermophila tipik ökaryotik hücre özelliklerine sahip yüksek organizasyonlu tek hücreli ökaryotik model organizmadır (**Şekil 1.3**). Sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel kompleksliği ile insan ve diğer metazoonlara benzemekte olup bazı durumlarda daha kompleks özellikler sergilemektedir [23]. Tatlı su ve göletlerde yaşayan bu organizma biri küçük diğeri büyük iki nükleusa sahip olmasıyla tipik silli organizma özelliği sergilemektedir. Bu nükleuslardan küçük olanı (MIC) mikrokromozom, çok hücreli organizmaların üreme hücrelerindeki nükleus gibi seksüel progeni ile aktarılan genetik bilginin bulunduğu 5 çift metasentrik kromozomdan oluşmuş ve mitotik bölünen diploid (2C) nükleustur. Vejetatif çoğalma esnasında MIC'de RNA sentezi ya da RNA içeren yapılar (nükleolus, nükleer RNP) ya da ekspres edilen herhangi bir gen de tespit edilememiştir [23-25, 85, 93]. Büyük olan makronükleus (MAC) çok hücreli organizmaların somatik nükleusları gibi vejetatif çoğalmada etkin olup, asentrik kromozomlar gibi davranan yaklaşık olarak 225 minikromozomdan oluşmaktadır [23-25, 85].



Şekil 1.3: *Tetrahymena thermophila*'nın şematik gösterimi: Diyagramlarda hücre anterior kısmı üstte olacak şekilde konumlandırılmıştır. **A:** Nükleer organizasyon. Hücrede tek bir germinal mikronükleus (**Mi**) ve buna ilaveten somatik makronükleus bulunmaktadır (**Ma**). **B:** Sitoplazmik organizasyon hücrenin ventral (oral) yüzeyinden referans alınarak gösterilmiştir. **CR:** Ciliary Rows, Toplamda 18-21 adet olan sil eksenleri, **cBB:** (ciliated basal bodies) Silli kökler, **uBB:** (un-ciliated basal bodies) Silsiz kökler, **LM:** (longitudinal microtubule bands) Dikey mikrotübül bantları, **Cil:** Siller, **DCG:** Yoğun salgılayıcı granüller (Dense-core secretory granules, ya da mukositler (Mc) olarak bilinen yapılar bir sil eksenine paralel olacak şekilde iki set halinde bulunurlar. Tetrahymena'da bulunan üç özel kortikal yapı ise **OA:** Oral aparat **Cyp:** hücre anüsü (cytopyge) ve **CVP:** kontraktıl vokuol porları olarak gösterilmiştir. **Cst:** OA'nın posterior ucunda hücre ağızı (cytosome) görülmektedir. **CV:** Kontraktıl vakuol **FV:** Besin vakuolleri (Asai, D.J., Forney, J.D., *Tetrahymena thermophila*. Illustrated ed. 1999: Academic Press.)

Minikromozomlar nükleer reorganizasyon sonucunda oluşmuş ve kaynağını mikronükleustan alan poliploid kromozomlardır ve genomik içerikleri yaklaşık olarak 45C'dir. Amitotik olarak bölünen MAC minikromozom kopyaları, bölünen hürelere rastgele bir şekilde dağılır ve yaşam için gerekli olan tüm fizyolojik olayları kontrol eder [23-25, 85, 93].

T.thermophila'nın eşeysiz çoğalması; küçük çekirdeğin mitozla girmesi, büyük çekirdeğin ise hücre sitoplazmasının enine bölünmesi sırasında boğumlanmasıyla meydana gelir. Eşeyli çoğalma (konjugasyon) iki farklı eşeye (çiftleşme tipi) sahip ergin bireylerin aç kalmasıyla başlar ve hücreler arası çarpışmalarla meydana gelen uyarıcı sinyaller sonucu ağız kısımlarının birleşmesi ve küçük çekirdeğin mayozu ile devam eder. Eşeyli üreme sonunda çiftleşmiş bireylerde bulunan yeni küçük çekirdek, döllenmiş çekirdekten (diploid) mitoz bölünme ile meydana gelir. Yeni büyük çekirdek ise gelişen bu çekirdeğin bazı genetik işlemlerden (makronükleer reorganizasyon) geçmesi sonucu meydana

gelir. Eşlerin eski büyük çekirdekleri bu esnada parçalanarak yok olur [23, 24, 93].

1.10. *Tetrahymena thermophila* Stres Biyolojisi

Ökaryotik organizmalar çeşitli çevresel streslerle karşılaştıklarında normal şartlar altında ürettikleri bazı hücrel proteinlerin üretiminde keskin bir azalmaya eşlik eden birtakım yeni set proteinlerin üretimi safhasına geçmektedir [94, 95]. Strese karşı oluşturulan cevap; gen ekspresyonunun kontrolünde rol alan temel hücrel proseslerin analizine olanak tanıyan mükemmel bir modeldir. Bütün organizmalar çevrelerinde oluşan değişikliklere öncelikli ve hızlı bir şekilde cevap oluşturmak için “sıcaklık şoku” ya da “stres proteinleri” olarak isimlendirilen bir dizi proteini sentezler ve biriktireler. [96]. *Tetrahymena* hücreleri yaşadıkları doğal ortam itibariyle sıklıkla; sıcaklık, pH, iyonik konsantrasyon, oksijen miktarındaki değişiklikler, besin kaynaklarının durumundaki artış ve azalışlar gibi değişikliklerle yüz yüzedir. Dolayısıyla da bu tür çevresel değişkenlerin, organizmanın adaptasyonu için gerekli olan genlerin, ekspresyon profilinde değişikliklere sebep olması beklenen bir sonuçtur [97]. Her ne kadar *Tetrahymena* hücrelerinin açlık, sıcaklık şoku, osmotik stres, desilizasyon, oksijen kıtlığı, arsenit ve infrared gibi koşullara karşı oluşturduğu adaptasyon mekanizmalarının fenotipik, fizyolojik ve moleküler düzeyde araştırılmaları yapılmış ve bir takım özel polipeptitlerin sentezini artırdığı belirlenmiş olsa da fenotipik ve moleküler düzeyde meydana gelen değişikliklerin nispeten daha detaylı olarak çalışıldığı iki koşul açlık ve sıcaklık değişiklikleri olmuştur [51, 52, 96-102].

***T.thermophila*'da açlık stresi:** *T.thermophila* hücreleri inorganik besi ortamında aç bırakıldıklarında bir takım fenotipik değişiklikler geliştirirler. Meydana gelen değişiklikler arasında; vücut yüzeyinde normalden çok daha fazla sayıda sil oluşumu, hücre posteriorunda normalden daha uzun kaudal sillerin oluşumu, oral membranellerde “deep pocket” formasyonu olarak tanımlanan form değişikliği, sıvı akışı esnasında meydana gelebilecek sürtünmeyi en aza indireyecek şekilde vücut formasyonundaki değişiklikler yer almaktadır. Tüm bu değişiklikler hücrelerin buldukları ortamda hızlı bir şekilde besin bulmalarını sağlayacak biçimde yeniden yapılanmalarını sağlamaktadır. Meydana gelen fenotipik değişiklikler hücrelerin normalden 4-5 kata daha hızlı hareket

etmelerini sağlamaktadır dolayısıyla da yeni fenotipe sahip hücreler “rapid swimmers” yani “hızlı yüzücüler” olarak isimlendirilmişlerdir. Aç bırakıldıktan 5-7 saat sonra en yüksek sayıya ulaşan hızlı yüzücü formasyonu, tamamen stabil bir formasyon değildir. Hızlı yüzücü fenotipi *Tetrahymena*'nın geçirdiği hücresel siklusa ait fazların herhangi biri ile ilişkili olmamakla birlikte farklı eşleşme tiplerine ait hücreler birlikte aç bırakıldıklarında hücreler ya hızlı yüzücü formasyonu oluşturur ya da eşleşerek konjugasyon yaparlar. Ancak hızlı yüzücü formasyonu gösteren hücrelerin de eşleşmem yapabildikleri gözlenmiştir [103].

Tetrahymena'nın açlık karşısında gösterdiği en iyi bilinen gelişimsel cevap ise konjugasyondur. Bu durum için gerekli olan üç ön koşul sırasıyla ; (1) farklı eşleşme tipine ait hücrelerin bir arada bulunması, (2) hücrelerin cinsel olgunluğa erişmiş olması ve (3) hücrelerin aç olmalarıdır. Konjugasyonda birbirini takip eden bir takım nükleer prosesler yer almaktadır. Bu prosesler sırasıyla; mikronükleer mayoz, postmitotik mitoz (ya da üçüncü prezigotik bölünme), gametik nükleusun oluşması (pronüclei), çapraz fertilizasyon ve son olarak yeni mikronükleus ve makronükleusun oluşturulmasıdır. Konjugasyon için gereken hazırlık süreci birbirini takip eden iki aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalardan ilki olan “initiation” yani başlangıç aşaması 30°C’de en az 73 dakika ortalama olarak da 2 saat sürmektedir ve gereken tek ön koşul farklı eşey tiplerine ait hücrelerin önceden aç kalmış olmasıdır. İkinci aşama “Co-stimulation” ise minimum 28 dakika, ortalama olarak 1 saat sürmektedir ve ön koşulu ise hücrelerin “initiation” safhasını geçirmiş olmalarıdır. Bu süreç farklı eşey tiplerine ait hücrelerin birbirleriyle fiziksel olarak temas kurdukları safhadır [103].

Yapılan çalışmalar *Tetrahymena* hücrelerinin açlık stresine karşı oluşturduğu adaptasyonda çeşitli mekanizmlarla gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Translasyon seviyesinde etkin olduğu düşünülen mekanizmada total protein sentezinde bir azalma görülürken 38, 70 ve 100-kDa’luk bazı proteinlerin seviyesinde artış tespit edilmiştir. Transkripsiyon seviyesinde ise normal koşullarda ekspres edilmeyen 29-34-kDa ve 50-kDa’luk proteinlerin ekspres edildiği gözlenmiştir. Ayrıca sıcaklık stresi koşullarında gözlenen strese spesifik protein ekspresyon profili ile açlıkta tespit edilen profil arasında önemli değişiklikler olduğu tespit edilmiştir [97]. Bir diğer çalışmada ise açlık stresi altındaki *Tetrahymena* hücrelerinde bazı “multi-stress-inducible metallothionein”

ailesi üyelerinin ekspresyonunda artış olduğu [104, 105] belirlenmiştir. *Tetrahymena*'da uzun ve kısa süreli açlık durumlarında ürettiği bazı hormonlar bakımından test edilmek için 24 saatlik, 30 dakikalık açlık ve 24 saat açlıktan sonra 30 dakikalık besleme ile test edilmiştir. 24 saatlik açlıkta test edilen tüm hormonlarda (β -endorfin, adrenokortikotropin (ACTH), serotonin, histamin, insulin ve triiodothyronine-T₃) bir artış olduğu gözlenirken 30 dakikalık açlıkta sadece serotonin miktarında tespit edilebilir bir artış olmuştur. 24 saat açlıktan sonraki 30 dakikalık besleme sonucunda ise β -endorfin ve histamin düzeyi bazal seviyelerine gerilerken, ACTH ve serotonin kısa süreli açlık örneklerine nazaran oldukça azalmıştır. 24 saat süre ile açlık stresine tabi tutulan *Tetrahymena* hücrelerinde insülin miktarında bir artış olduğu tespit edilmiştir [106, 107] benzer bir şekilde artış β -endorfin, ACTH, serotonin, histamin, ve T₃'de de tespit edilmiştir

***T.thermophila*'da sıcaklık stresi:** Genel olarak sıcaklık şoku fenomeni organizmanın gen ekspresyon profilinde ve diğer hücresel aktivitelerinde meydana gelen programlı ve geri dönüşümlü değişiklikleri içermektedir. Ancak organizmalar arası bazı detaysal farklılıklar da söz konusudur. Örneğin *Drosophila*'da oluşan sıcaklık şoku cevabı hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel seviyede oluşruken [108] *Xenopus* oositlerinde cevap büyük oranda translasyonel düzeyde gerçekleşmektedir [109]. *thermophila pyriformis*'in 28°C'den 34°C'ye olan sıcaklık değişimine normal hücresel proteinlerin sentezinde önemli derecede bir düşüşle cevap verdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte moleküler ağırlıkları 70-75 kDa ve 25-29 kDa arasında değişiklik gösteren iki major protein gurubunun ve 92, 58, 46 ve 35 kDa'luk sıcaklık-şoku proteinlerinin sentesinde artış olduğu gözlenmiştir [96]. Sıcaklık değişikliğine karşı kodlanan mRNA 'ların kısa bir ömre sahip oldukları da gösterilmiştir [110, 111]. *T.thermophila* hücreleri değişen sıcaklık koşullarında immünolojik olarak farklı peptitler üretebilmektedir. *Tetrahymena*'nın immünolojik yüzey proteinleri immobilizasyon antijenleri olarak bilinirler çünkü bu peptitlere karşı oluşturulan antisera yaşayan tetrahymena hücrelerinin olduğu ortama eklendiğinde hücreler hareketliliklerini yitirmektedirler. İmmünolojik olarak farklı olan en az beş adet serotip vardır. Bu serotiplerin üç adedinin sıcaklığa bağımlıdır. Serotip H (Ser H1-H4) 20-35°C' arasında ekspres edilirken serotip T 35 derecenin üzerindeki

sıcaklıklarda ekspres edilmemektedir. serotip L 35 derecenin üzerindeki sıcaklıklarda üretilmektedir. Serotip L, 20°C'nin altındaki inkübasyon sıcaklıklarında ekspres edilmektedir. SerH proteinleri 44-58 kDA arasındadır ve sıcaklığa oluşan değişikliğe 1 saat içinde cevap olarak oluştururlar. SerH3 ün sentezi sıcaklığa karşı oluşturulan cevapta yüksek derecede regüle edilmektedir. 30°C' ve 40°C'de üretilen Ser3 miktarı nisbi olarak en az iki kat fazladır. Bununla birlikte SerH3 mRNA stabilitesi 30 ve 40 dercede gelişen hücreler arasında değişiklik göstermektedir. 35°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda Ser3h üretilmemektedir. 30°C'den 40°C'ye yapılan sıcaklık değişikliğinden sonraki 40 dakika içinde Serh3 mRNA seviyesi tespit edilemeyecek kadar azalmıştır. Aynı hücre popülasyonu 30 °C' ye alındıktan 60 dakika sonra ise Serh3 mRNA seviyesi %100 artmıştır [51, 96, 102, 110].

1.11. *Tetrahymena thermophila* MAPK Üyeleri ile İlgili Çalışmalar:

Serbest olarak tatlı su göletlerinde bakterilerle beslenerek yaşayan *T. thermophila*, diğer organizmalarda olduğu gibi çevresel faktörlerin (örneğin mevsimsel ve günlük ısı değişimleri) direk etkisi altındadır [23, 25, 26]. Çevresel faktörler hücrenin çalışma mekanizması (üreme, hücresel yapı, bölünme, büyüme, hareket ve stres adaptasyonu) üzerinde olumlu veya olumsuz etkiler meydana getirir [23]. Çevresel şartlara adaptasyonun hızlı bir şekilde sağlanmasından sorumlu hücresel sinyal ileti yolunun en önemli bileşenlerinden birisi olan MAPK sinyal yolu diğer organizmalarda çok iyi çalışılmış olmakla birlikte bu organizmanın seviyesinde henüz bilinmemektedir [15, 19, 20, 66, 67]. *T.thermophila*'nın çevresel stresler karşısında oluşturduğu adaptasyon esansında görev yapan proteinlerin tespitine yönelik olarak yapılan çalışmaların ilk örneklerinde ilk kez *T.thermophila*'da MAPK ailesi ile ilişkili bir protein tespit edilmiştir. Sıcaklık stresi ve osmotik stres koşullarında görev yaptığı tespit edilen bu protein "MAPK ilişkili protein kinaz olarak" tanımlanmıştır [52]. Sonraki yıllarda *T. thermophila*'dan 3 farklı MAPK cDNA'sı Geri PZR (RT-PCR) ve 5' ile 3' RACE (5' ve 3' cDNA uçlarını hızlı üretimi) teknikleri kullanılarak klonlanmış ve bu yeni MAPK enzimleri MPK1, MPK2 ve MPK3 olarak isimlendirilmiştir [112, 113]. Bu üç enzimin DNA diziminden yola çıkılarak edilen tahmini aminoasit dizisinin analizi sonucunda, her üç enzimin MAPK enzimlerin katalitik kısımlarında bulunan 12 adet alt-domainine (I-XI) sahip

olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca sekizinci alt-domain de yer alan fosforilasyon motifinde MAPK ailesinin TXY motifini taşıtmaktadır. MPK1 ve MPK3'ün kinaz aktivitesi, enzimlere özel üretilen anti-peptid poliklonal antikorları kullanılmasıyla enzimlerin hücresele (endojenik) formlarının antikorla-çökertilmiş ve *in vitro* kinaz reaksiyonuyla aktiviteleri analiz edilmiştir. MPK2 ise yapısında meydana getirilen 11 tane nokta mutasyondan sonra *E.coli*'de GST-MPK2 rekombinant proteini olarak üretilmiş ve izole edilen rekombinant enzim *in vitro* kinaz reaksiyonunda kullanılarak kinaz özelliğine sahip olabileceği ortaya konulmuştur. MAPK'lerin, BLAST analizi sonucu; bitki, bira mayası ve insana ait ERK grubu MAPK'lere benzerlik gösterdiklerini ortaya çıkmıştır. Bu enzimlerin hücresele görevlerinin teorik olarak ortaya çıkartılması için 28 farklı MAPK kullanılarak yapılan filogenetik ağaç analizi sonuçları MPK2'nin muhtemelen hücre membranının yapısının kontrolünde ve MPK3'ün ise hücre bölünmesi ve çiftleşmeyi kontrolde rol alabileceğini önerilmiştir. MPK1'in ise görevi ise tam olarak belirlenmemiş tek hücreli organizmaların MAPK'leri ile strese karşı aktif hale gelen p38/Hog1/Sty1 grubuna yakınlık gösterdiği ortaya çıkmıştır. *Tetrahymena thermophila* SB210 suşu'nun 2006 yılında tamamlanan makronükleer genom projesinden [28] edinilen bilgiler ışığında biyoinformatik olarak 11 adet MAPK üyesi varlığı tespit edilmiştir. Bu 11 MAPK'den sadece 4 tanesi genom projesinden önce tespit edilmiş MPK1, MPK2, MPK3 ve MPK4'tür.

1.12. Amaç

Bu araştırma, *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin değişik şartlar altında mRNA ifadesinin analizini ve üyelerin biyoinformatik karakterizasyonu amaçlamaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar

2.1.1.1. Çalışma Organizması: *Tetrahymena thermophila*

Çalışmada genom projesinde kullanılan ırk olan *Tetrahymena thermophila* SB 210 ırkı kullanılmıştır. Organizma Dr. Orias Eduardo'dan (Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology University of California, Santa Barbara/USA (orias@lifesci.ucsb.edu) temin edilerek kullanılmıştır. Konjugasyon deneylerinde ise "Tetrahymena Stock Center, Cornell University"den temin edilen çiftleşme paneli (Mating Type Panel #MTP01) setinden *Tetrahymena thermophila* Tip III eş olarak kullanılmıştır.

2.1.1.2. Klonlama Konakçısı: *Escherichia coli* XL I – Blue Irkı

Klonlama konakçısı olan *Escherichia coli* XL I – Blue ırkı satın alınarak çalışmada kullanılmıştır (Stratagene, katalog no 2000249). Bu ırkın özelliği uygun plazmitler ile pozitif kolonilerin seçilmesi için mavi/beyaz tarama yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Bu sayede klonlama verimi ve pozitif klon sayısına rahatça ulaşılabilir.

Irka ait rekombinasyon (*recA*) ve endonükleaz (*endA*) aktivitelerini yerine getirecek enzim sistemleri baskılanmıştır. Bu da plazmite klonlanan parçanın bozunmadan kararlı olarak taşınmasını sağlar. Ayrıca mavi/beyaz taramaya izin verecek bölge de genomuna yerleştirilmiştir (*lacI^qZAm15*). Irk besi yerinde pozitif kolonilerin seçimi için mavi/beyaz tarama dışında tetrasikline direnç özelliğine de sahiptir [114].

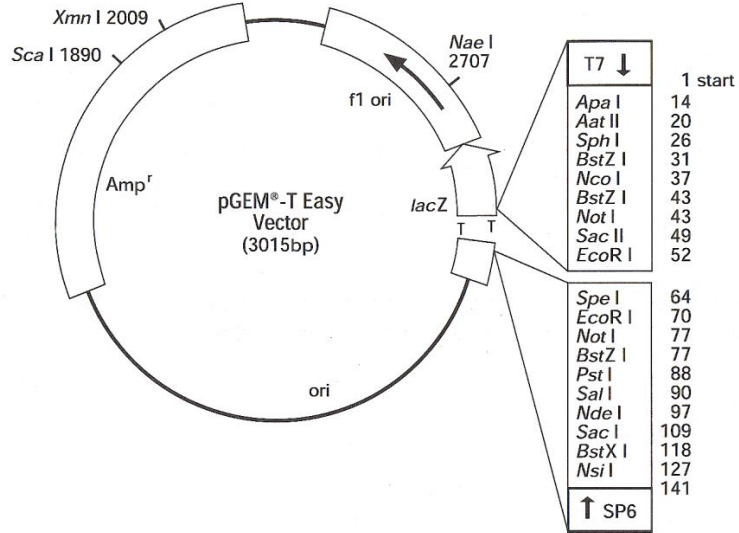
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Plazmit DNA'lar

Genin klonlanması ve rekombinant proteinin ifadesi için iki farklı plazmit DNA ticari olarak satın alınarak çalışmada kullanılmıştır.

2.1.2.1. pGEM[®]-T Easy Vector System I Klonlama Plazmitü

pGEM-T Easy plazmidi PZR ile üretilen genlerin klonlanması amaçlanarak üretilmiştir (Promega, A1360). Plazmitün klonlama bölgesine sarkık timin bazları yerleştirilmiş ve plazmit üzerinde bulunan 3' uçların fosfat grupları çıkarılmıştır. Bu sayede plazmitün ligasyon esnasında halkasal yapı oluşturması engellenerek klonlama etkinliği artırılmıştır. Bu tür plazmitlere yapılacak olan klonlanmanın gerçekleşebilmesi için klonlanacak parçanın uç kısmında sarkan adenin bazı (karşı iplikte tamamlayıcısı olmayan) olmalıdır. Böylelikle klonlanacak parçada bulunan sarkan A ile, plazmitte bulunan sarkan T ligasyon ile hibridize olur. Birleşmeyen diğer uçlar ise konağın DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır böylelikle tam bir halkasal DNA molekülü oluşmuş olur.

Klonlama bölgesi plazmit üzerinde β -galatosidaz enzimini üreten *lacZ* geni içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede pozitif klonların taranması kolonilerdeki renk farklılığına göre yapılabilmektedir. Klonlama 3' sarkık timin bazları ile yapılabileceği gibi istenirse plazmitün çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzimlerinde kullanılabilir (Şekil 2.1.) [115].



Şekil 2.1. pGEM[®]-T Easy Plazmit DNA yapısı: *lacZ* bölgesi çoklu klonlama bölgesini de içeren mavi/beyaz seçilimin oluşması için β -galaktosidaz kodlayan genidir. Amp^r amfisilin antibiyotikine karşı direnç genidir ve ori bölgeleri Plazmit DNA'nın konakçı içerisinde çoğalması için gerekli replikasyon başlangıç noktalarıdır [116][116].

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.3.1. LB (Luria-Bertani) Broth (Sıvı) Besiyeri

Tryptone'dan 10 gr. (Fluka, katalog no T9410), 5 gr. Yeast Extract (Sigma, katalog no Y1625), 5 gr. NaCl (Merck, katalog no 567441) erlende tartılarak 600 ml dH₂O eklenir. Maddeler çözüldükten sonra 1 lt'ye tamamlanır. İstenilen miktarlarda erlenlere aktararak bölünür. 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

2.1.3.2. LB (Luria-Bertani) Agar (Katı) Amfisilin Besiyeri

LB Agar ve 1000X amfisilin stok Solüsyonu kullanılmıştır. LB Agar'dan 37 gr. tartılır ve dH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir. 50°C'ye soğutulduktan sonra 1000x stok amfisilinden 1 ml. eklenerek son hacimdeki amfisilin miktarı 100µg/ml olacak şekilde besiyeri hazırlanır. Steril petri tabaklarına uygun miktarlarda (yaklaşık olarak 20-25ml) dökülür ve çeker ocakta kapakları yarı açık bırakılarak nem uzaklaştırıldıktan sonra gece boyu oda sıcaklığında donmaya bırakılır. Donduktan sonra petriyerler hava almayacak şekilde poşetlenerek 4 °C'de 1 ay ya da oda sıcaklığında 1 hafta saklanır.

2.1.3.3. PPY Besiyeri

Proteaz Pepton'dan 10 gr. ve 1,5 gr. Yeast Extract bir erlende, 600 ml dH₂O ile manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. Daha sonra üzerlerine 1 ml 10 mM FeCl₂.6H₂O eklenir, pH 7'ye ayarlanır ve dH₂O ile 1lt'ye tamamlanır. İstenilen miktarlarda erlenlere aktarılır. 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilir.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar Ve Çözeltiler

- Amfisilin, (Sigma, A0104)
1000X stok solüsyon için 1ml steril dH₂O'da 100 mg amfisilin çözülür, filtre ile steril edilir ve 100 - 500 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanır.
- Etidyum bromür, (Sigma, E8751)
Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 500 µl'lik hacimlerde dH₂O'da çözümlenerek stok solüsyon olarak hazırlanır ve 4 °C'de saklanır.

Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde kullanılır.

- X-Gal, (Bio Basic, 12872)
100mg X-Gal 2 ml N,N'-dimethylformamid'de son hacim 50 mg/ml olacak şekilde çözülerek alüminyum folyo ile kaplanmış ependorflarda -20 °C'de saklanır.
- Gliserol (Sigma, G2289; Merck, 1.04092).
% 80 oranında steril dH₂O ile seyreltilerek kullanılmıştır.
- Trizma Base (Applichem A2264).
- Tris HCl (Sigma, 05432).
- EDTA (Fluka, 03620)
- TE Tamponu (Tris-EDTA)
10 mM Tris-HCl pH 7,4 ile 1 mM EDTA, pH 8,0 eşit hacimlerde karıştırılır.
- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA)
108 gr trizma base ve borik asit 600 ml dH₂O da çözüldükten sonra 40 ml 0,5 M EDTA eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.
- Etanol (Riedel, 071029)
Farklı konsantrasyonlarda etanollar kullanılmıştır (% 70, % 75, % 90 ve % 100).
- Kalsiyum Klorit, CaCl₂ 2H₂O (Sigma, C1016, Duchefa C0504).
7.34 gr CaCl₂ üzerine 1 lt steril su ile hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır.
- İzopropanol (Riedel, 24137).
- Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (24:23:1) (Sigma, P2069). Birçok amaç için kullanılan bu solüsyon Equilibration Buffer içermektedir. Genomik DNA izolasyonu gibi yüksek pH gerektiren uygulamalarda Equilibration Buffer ile fenolik fazın pH'sı 8 civarına yükseltilmelidir (Fenolik faz sarı ya da kahverengi ise kullanılmamalıdır). Bunun için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol solüsyonuna Equilibration Buffer'in tümü katılarak yavaşça karıştırılır ve yaklaşık 2-4 saat içinde (tercihen gece boyu) fazlar ayrıldıktan sonra DNA izolasyonunda kullanılabilir. Sonuçta pH, 6.7± 0.2 'den 8.0 ± 0.2 ye yükselecektir. Tampon eklendikten sonra ışıktan koruyarak -20'de 1 yıl saklanabilir. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol'ün

pH'nın pH metre ile doğru şekilde ölçülmesi çok güçtür, bunun amaç için pH kağıtları kullanılabilir.

- Kloroform (Sigma, C2432).
- TRIzol Reagent (Sigma, T9424).
- Tween-20 (Polietilen Sorbitan Monolaurat) (Sigma P9416).
- Borik Asit (BioBasic, BB0044).
- Agaroz A (BioBasic, D0012).
- MOPS (Appllichem A2947).
- Sodyum Klorür NaCl (Merck, 1.06400).
- Maleik Asit (Maleic Acid Disodium Salt Hydrate) (Aldrich, 234575).
- 10x MOPS Tamponu: 200 mM morpholineopropanesulfonic acid (MOPS), 50 mM sodium acetate, 20 mM EDTA ile hazırlanır. NaOH kullanılarak pH 7,0'ye ayarlanır ve otoklavlanır. Otoklavlandıktan sonra çözelti sarıya dönüşecektir ancak bu durumun performans üzerinde bir etkisi yoktur. RNA koşma tamponu için 1:10 oranında seyreltilmelidir.
- %10 SDS stock solusyonu: Sodium dodecyl sulfate %10 (w/v) oranında suda çözülür ve membran kullanılarak (0.2– 0.45 µm) filtre edilir.
- 20x SSC: 3M NaCl ve 0.3 M sodium citrate (Trisodium citrate dihydrate) kullanılır. pH 7'ye ayarlanarak otoklavlanır.
- Low stringency yıkama tamponu: 2x SSC (Stok 20x SSC'nin 1:10 dilüsyonu), % 0.1 SDS (Stok %10 SDS'nin 1:100 dilüsyonu)
- High stringency yıkama tamponu: 0.1x SSC (Stok 20x SSC'nin 1:200 dilüsyonu), 0.1% SDS (Stok %10 SDS'nin 1:100 dilüsyonu)
- Maleik Asit Tamponu: 0,1 M Maleik asit ve 0.15 M NaCl kullanılarak hazırlanır. pH, katı NaOH kullanılarak 7,5'a ayarlanır.
- Deteksiyon Tamponu: 0,1M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9.5
- Yıkama Tamponu: 0,1 M Maleik asit, 0.15 M NaCl; pH 7.5; %0.3 (v/v) Tween 20
- RNA yükleme tamponu: 250 µl, %100 deiyonize formamid, 83 µl, %37'lik formaldehid, 50 µl 10x MOPS tamponu, 10 µl, %12.5 bromophenol blue, 50 µl RNase-free 100% gliserol ve DEPC'li su ile 500 µl'ye tamamlanır.

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IC, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Avanti J 30I), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC25090), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), UV Cross Linker (Stratalinker UV Crosslinker, Model 2400), pH Metre (Orion), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV-2101 PC Shimadzu), Terazi (Ohaus pro AV812).

2.1.6. Çalışmada Kullanılan Kitler

QIAquick PCR purification kiti (Qiagen, 268106), QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123), pGEMTeasy plazmit sistemi (Promega, 212440), RNeasy Midi Kit (Qiagen, 75144), RevertAid first strand cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622), Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, K0519), DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche, 11093657910).

2.1.7. Çalışmada Kullanılan Enzim Setleri

Taq DNA Polymerase, (Fermentas, EP0401), Pfu DNA Polymerase (Fermentas, EP0501), SpeedSTAR® HS DNA Polymerase (Takara, RR070A), PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara, R010A), Rnase A Solution (BioBasic), RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega, M610A), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant (Promega, M828A).

2.2. Yöntem

2.2.1. *Tetrahymena thermophila* Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu katalaz geninin genomik kopyasının üretilmesi amacı ile yapılmıştır. Üretilen bu genomik kopya ile Southern Blots deneyi, DNA parmak izi analizi ve ekson/intron analizi yapılabilir. Genomik DNA izolasyonu için “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” kitabı temel alınarak oluşturulan Dr. Harry van Keulen'nin laboratuvar protokolleri uygulanmıştır [117]. Taze olarak 30 ml steril PPY besiyerine ekimi yapılan hücre kültürü gece boyunca çalkalamalı etüvde 120 rpm'de çalkalamayla büyütülmüştür. Ertesi sabah bulanıklık, koku ve mikroskopik gözlem kriterlerine göre kontaminasyon gözlenmeyen kültürlerden genomik DNA izolasyonuna geçilmiş ve bunun için *T. thermophila* hücreleri öncelikli olarak 7000 rpm'de santrifüjlenerek toplandıktan sonra üst sıvı dökülmüş ve elde edilen hücre-çökeltisi kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA; sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü ile RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

Not: Çalışmada kullanılan santrifüj cihazı Thermo marka modelidir.

- 1) PPY besiyerine ekilen *T. thermophila* hücreleri gece boyu 37°C ve 120 rpm'de büyütülür.
- 2) Gelişim istenilen düzeye erişince, 25 ml'lik hücre kültürü alınır ve 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ile yıkanır.
- 3) 25 ml'lik yıkanmış hücre kültürü 7000 rpm'de 10 dk. Santrifüj edilir. Az bir miktar süpernatant tüpte bırakılır ve geri kalan dökülür.
- 5) Hücre peleti kalan sıvı içerisinde yavaş bir biçimde çalkalanarak çözülür.
- 6) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilir ve yavaşça ters-düz edilerek karıştırılır.
- 7) Hücre süspansiyonu 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilir.

- 8) Santrifüj sonrası üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle (veya ağzı jilette kesilen 1000 µl'lik mikropipetle) alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.
- 9) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek yavaşça ters-düz edilir (ikinci phenol:chloroform saflaştırması).
- 10) Karışım 15 dk. 3500 rpm.de santrifüj edilir.

8, 9 ve 10'uncu adımlar bir kere daha tekrarlanır. Toplamsa 3 kez fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) muamelesi yapılır.

- 11) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle yeni bir tüpe alınır.
- 12) Alınan miktar kadar izopropil alkol ilave edilir ve karıştırılır.
- 13) Karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
- 14) Üst faz dökülür ve pelet kurumaya bırakılır.

Burada peletin tamamen alkolden arınmış olması gerekir. Bu nedenle alkol çeker ocakta ya da konsantratörde de uçurulabilir.

- 15) Pelet kurduktan sonra 100 µl TE ile çözülür.
- 16) Elde edilen genomik DNA agaroz jel elektroforezinde ve spektrofotometrede analiz edilerek kalitesi ölçülür.

2.2.2. *Tetrahymena thermophila* Hücrelerinden Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA İzolasyonu – TRI Reagent (*Tetrahymena thermophila*):

Deneyin amacına göre klasik yöntem (Trizol) ve kitle (RNeasy Mini Kit, Qiagen,74104) gerçekleştirilmiştir. Protokol aşağıdaki gibidir:

- 1) PPY besiyerinde 24 saat gelişen *T.thermophila* hücrelerinden 1-3 ml alınarak 15.000 rpm'de 1 dk.santrifüjlenir.
- 2) Pelet 350µl RLT tamponu ile iyice pipetlenir.
- 3) Taze hazırlanmış %70'lik alkolden 350 µl eklenerek iyice karıştırılır.

- 4) Karışımdan en fazla 700 µl alınarak RNeasy spin kolonlarına aktarılır ve hemen 23 saniye 13200 rpm'de santrifüjlenir ve dipte kalan sıvı atılır.
- 5) Kolona 700 µl RW1 aktarılarak hemen 23 saniye 13200 rpm'de santrifüjlenir ve dipte kalan sıvı atılır.
- 6) Kolona 500 µl RPE katılır ve 23 saniye 13200 rpm'de santrifüjlenir. Dipte kalan sıvı atılır.
- 7) Kolona 500 µl RPE katılır ve 2 dakika 13200 rpm'de santrifüjlenir. Dipte kalan sıvı atılır.
- 8) Kolon kitte bulunan biriktirme tüpüne aktarılarak 15000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek kalan etanol uzaklaştırılır.
- 9) Kolon yeni bir ependorf tüpüne (kitte bulunmuyor) yerleştirilir ve kolonun tam ortasına yavaşça kitte bulunan Rnase free Water'dan 35 µl eklenir ve 1 dakika 13200 rpm'de santrifüjlenir.
- 10) Santrifüj sonunda toplanan sıvı tekrar kolona yüklenir ve bir kez daha 1 dakika 13200 rpm'de santrifüjlenir.

Klasik yöntemde ise DNA izolasyon protokolünde bahsedildiği şekilde büyütülen hücre kültürleri 7000 rpm'de santrifüjlenerek toplandıktan sonra üst sıvı dökülmüş ve hücre-çökeltisinden, TRI reagent kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. TRI RNA'nın bütünlüğünü korur ve diğer hücre yapılarının parçalanmasını sağlar. Sonra ortama eklenen kloroform ile organik faz ve sulu faz ayrılır. TRI, RNA'ya bağlanarak RNA'nın sulu faza geçmesini sağlar. Bu şekilde sulu fazda toplam RNA elde edilir. Geriye kalan organik fazda ise protein ve DNA yapıları bulunmaktadır. İstenirse bu faz daha sonra protein ve DNA izolasyonları için kullanılabilir. Toplam RNA izolasyonu adımları aşağıda verildiği şekli ile uygulanmıştır.

TRIZol yöntemi ile toplam RNA izolasyonu adımları aşağıda verilmiştir.

- 1) *Tetrahymena thermophila* 20 ml PPY içerisinde gece boyu 37 °C ve 140 rpm'de büyütülür.
- 2) 3 ml hücre 7500 rpm'de 10 dk santrifüj ile peletlenir.

- 3) Süpernatant atılır ve pelet üzerine 1 ml TRI Reagent eklenir ve pelet pipetlenerek iyice karıştırılır.
- 4) Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 5) Sonrasında karışıma TRI'nin her 1 ml'si için 200 µl Kloroform eklenir. Örnek ağzı sıkıca kapalı olarak 15 sn'ye güçlü bir şekilde çalkalanır. Bu adımda kesinlikle vorteks kullanılmaz.
- 6) Karışım 2-15 dk oda sıcaklığına bırakılır. Sonrasında 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dk süre ile santrifüj edilir.
- 7) Renksiz sıvı üst faz dikkatlice alınır ve yeni bir tüpe aktarılır. İleride DNA ve proteinlerin izolasyonu için, ara-faz ve organik faz 4°C'de saklanabilir.
- 8) Üst faza 3. Basamakta kullanılan TRI'nin her 1ml'si için 500µl izopropil alkol eklenerek RNA çöktülür.
- 10) Karışım 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilir. Sonrasında 4°C'de 12.000 rpm'de 8 dk santrifüj edilir.
- 11) RNA peleti tüpün dip kısmında jelimsi bir hal ile görünür olur.
- 12) Süpernatant atılır ve RNA peleti 3. Adımda kullanılan TRI'nin her 1ml'si için en az 1ml %75'lik etil alkol ile vortekslenerek yıkanır.
- 13) Yıkamadan sonra örnek 4°C'de 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek peletin tüpün dibine oturması sağlanır. Eğer pelet hareketli ise santrifüj işlemi 4°C'de 12.000 rpm'de 5 dk olarak tekrarlanır.
- 14) Süpernatant dökülerek ve pelet çeker ocakta 15-20 dk kurutularak etil alkol uzaklaştırılır ve RNA peleti 50-100 µl dH₂O ile çözülür.

2.2.3. Toplam RNA'ya Dnase Uygulaması

Total RNA'dan DNA uzaklaştırılması işleminin yapılması, üretilecek cDNA kopyalarının RNA kalıp topluluğundan üretilmesini sağlar. Aksi halde üretilen cDNA'lar içerisinde gDNA'dan gelen kopyalar da bulunur. Bu nedenle Promega RQ1 RNase-Free DNase enzimi toplam RNA örneklerinden DNA'ların giderilmesi amacı ile uygulanmıştır. Üretici firmanın tavsiye ettiği ve uygulanan

protokol takip eden şekildedir: Toplam RNA 1-8 µl, RQ1 RNase-Free DNase 10x Tamponu 1 µl, RQ1 RNase-Free DNase 1 U/µg RNA eklenir ve nükleazsız su ile son hacim 10 µl'ye tamamlanarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilir (Not: Kullanılan RNA'nın µg'ı başına 1 ünite DNase kullanılır). İnkübasyon sonunda 1 µl RQ1 DNaseStop Solution eklenerek reaksiyon durdurulur. Son olarak 65°C'de 10 dakika inkübasyona tutularak DNase enzimi inaktive edilir. Bu protokole alternatif olan ve daha az enzim kullanılarak gerçekleştirilebilecek klasik protokol ise aşağıdaki gibidir:

- 1) Total RNA örneği nükleazsız su ile 250 µl'ye tamamlanır.
- 2) 50 mM Tris-HCl'den (pH=8,8) 80 µl eklenir. Daha sonra 5,5 µl RQ1 Rnase-Free Dnase eklenir.
- 3) Su banyosu ya da PZR cihazında 38 °C'de 45 dakika bekletilir.
- 4) Sonra DNaz enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dakika bekletilir.
- 5) Üzerine 33 µl, 0,3 M NaOAc ve 660 µl % 95'lik EtOH eklenir. -20°C'de gece boyu RNA çöktürülmesi yapılır.
- 6) Ertesi gün 7.500 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek peletin tüpün dibine oturması sağlanır. Eğer pelet hareketli ise santrifüj işlemi 12.000 rpm'de 4°C'de 5 dakika süre ile tekrarlanır.
- 7) RNA peleti 50-100 µl dH₂O ile çözülür. Elde edilen RNA, agaroz jel elektroforezinde ve spektrofotometrede analiz edilerek kalitesi ölçülür.

2.2.4. İzole Edilen DNA ve RNA'ların Spektrofotometrik Analizleri

DNA ve RNA örneklerinden 1,5 µl kullanılarak nanodrop'ta uygun programlar (DNA için Double Stranded DNA, RNA için RNA) seçilerek ölçümler yapılmıştır.

Klasik spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak RNA ve DNA miktarı saptanmıştır.

- RNA miktarı= OD₂₆₀ değeri x dilüsyon katsayısı x 40 µg/ml
- DNA miktarı= OD₂₆₀ değeri x dilüsyon katsayısı x 50 µg/ml

2.2.5. Toplam RNA'dan Geri Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA'nın Üretilmesi

Toplam RNA içerisinde katalazın cDNA'sının oluşturulması için mRNA'lar hedeflenerek mRNA'lardan cDNA'lar üretilir. Bu toplam cDNA havuzu kullanılarak istenilen genin mRNA kopyası DNA olarak oluşturulabilir. cDNA sentezi adımları aşağıda verilmiştir. Reaksiyonda Fermentas "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" kullanılmıştır.

- 1) Aşağıda verilen maddeler uygun miktarda buz üzerinde hazırlanır.
 - Total RNA 10 ng-5µg (Genellikle 2 µg kullanılmıştır)
 - Oligo(dT)18 primer (0.5 µg/µl, HPLC saflığında) 1 µl
- 2) Karışım dH₂O ile 12 µl'ye karıştırılarak tamamlanır.
- 3) 70 °C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra buza alınır.
- 4) Buz üzerinde aşağıdakiler verilen miktarlarda aşağıdaki sıra ile eklenir.
 - 5x M-MLV Rtase Buffer 5µl
 - Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (20 u/µl) 1 µl
 - 10 mM dNTP mix 2 µlYavaşça karıştırılır ve 37 °C 5 dk su banyosunda inkübe edilir.
- 5) RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (200 u/µl) enziminden 1 µl eklenerek, 42 °C'de 60 dk su banyosunda inkübe edilir.
- 6) Reaksiyon 70 °C'de 10 dk inkübe edilerek enzimin durdurulması ile sonlandırılır.

2.2.6. Gene Özgün Primerler Kullanılarak MPK4 Geninin cDNA'sının Üretimi

Klonlamada kullanılan ileri ve geri gen spesifik primerleri ve nokta mutasyonları için tasarlanmış olan primer setleri, *Tetrahymena thermophila* SB210 ırkına ait EST veritabanından elde edilen kısmi MPK4 geni bilgisi ile TIGR firmasının kendi internet sitesinde yayınladığı ön analiz sonuçlarının oluşturduğu dizi kümelerinin dikey hizalanması suretiyle elde edilen MPK4 genine ait konsensüs dizisine dayalı olarak katalitik bölgeyi içerecek şekilde belirlenmiştir. Genom projesinin tamamlanmasının ardından diziler kontrol edilmiş ve bir değişikliğe ihtiyaç duyulmamıştır. Kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olan kısımları ortalama olarak 20-30 bp arasında olan dış primerlerin 5' terminal

uçlarına yapışkan uç oluşturması amacıyla restriksiyon kesim tanıma bölgeleri eklenmiştir. Buna göre dış primer setini oluşturan 2F4 ileri primerine EcoRI ve Sall bölgesi; 2R4 geri primerine ise BamHI ve HindIII restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri eklenmiştir. GC oranı ortalama olarak %60 olan primerlerin Tm değerleri $[2(A+T)+4(G+C)]-5$ denklemine göre ayrı ayrı hesaplanmıştır. Dış primerlerin ortalama kullanım Tm'si 56 °C olarak belirlenmiştir. Dış primerler ATG başlangıç ve TGA dur kodonlarına karşılık gelen dizileri de içermektedirler. İlgili primerlere ait dizi bilgisi aşağıdaki gibidir:

Gen Spesifik İleri Primer: 2F4BamEcoRI:

5'- GCGGGATCCGAATTCATGAGCAGCAACGAAGAAATTGAACCA- 3'

Tm: 63 °C

Gen Spesifik Geri Primer: 2R4Sall

5'- GCGGGATCCGAATTCATGAGCAGCAACGAAGAAATTGAACCA- 3'

Tm: 54 °C

2.2.7 PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Jelden İzole Edilmesi

PZR ile elde edilen genomik ve cDNA kopyaaları agaroz jelde yürütülerek UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde elde edilen parçalar kesilerek saflaştırılmaya alınmıştır. Saflaştırma için QIAquick Gel Extraction Kit kullanılmıştır. Protokol adımları aşağıda verilmiştir [118]. Yapılan değişiklikler ilgili adımın altına italik olarak eklenmiştir.

- 1) İstenilen DNA bantları agaroz jelden steril bir bisturi ile kesilerek alınır.
- 2) Kesilen jel parçası tartılarak mg miktarı kadar QG tamponundan 3 hacim eklenir (100mg ~ 100µg).
- 3) Tüp 50 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek jelin çözünmesi sağlanır, 2-3 dakikada bir vorteks ile karıştırılmalıdır.

Jelin tamamen çözünmesi 10 dakikadan fazla zaman alabilir, bu nedenle süre uzatılabilir.

- 4) Jel tamamen çözüldükten sonra karışımın renginin sarımtırak olması gereklidir. Karışım üzerine 2'nci adımda tartılan jel miktarına göre 1 hacim izopropil alkol eklenir ve iyice pipet ile karıştırılır.
- 5) Karışım 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş kolon üzerine eklenir ve 13,000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 6) Tüpün içindeki karışım dökülür ve kolona 0,5 ml QG tamponu eklenir, 13,000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 7) Tüpün içindeki karışım dökülür ve kolona 0,75 ml PE tamponu eklenerek kolon 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüjlenerek yıkanır.

Adımda PE tamponu eklendiğinde 2-5 dakika beklenebilir. Bu yıkamanın oranını artırabilir.

- 8) Tüpün içindeki karışım dökülerek kolon boş olarak maksimum hızda 1 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 9) Kolon 1,5 ml'lik tüpe alınır ve kit içeriğindeki EB'den 50 µl eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir.

Burada EB tamponu yerine dH₂O'de kullanılabilir. Burada en düşük 30 µl hacim kullanılabilir ve tampon (veya su) eklendikten sonra 2-5 dakika beklenebilir.

- 10) İzole edilen DNA agaroz jelde kontrol edilir.

2.2.8.PZR Ürünlerinin Klonlama Plazmitüne Aktarılması

cDNA parçasının klonlanması için Promega "pGEM-T[®] Easy Vector System I" kullanılmıştır [119]. Plazmit sistemi klonlama için klonlanacak parçaların uç kısımlarında A bazına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle klonlanacak parçaların uç kısımlarına A bazı eklenmesi Taq polimeraz (Fermentas EP0401) enzimi ile gerçekleştirilmiştir [120].

3' A Ekleme Reaksiyonu: PZR ürünlerine A ekleme reaksiyonunda kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.

- 1 µl 10X Taq Polimeraz tamponu
- 1 µl 25 mM MgCl₂
- 0,5 µl 2,5 µM dATP
- 6.5 µl PZR ürünü
- 1 µl Taq DNA Polimeraz ile hazırlanan karışım 70°C'de 30 dakika süre ile PZR cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur.

3' ucuna A eklenmiş olan DNA parçaları herhangi bir saflaştırmaya alınmadan doğrudan ligasyon reaksiyonuna alınır [121]. Ligasyon reaksiyonunda klonlanacak DNA parçasının nanogram miktarı hesaplanır. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$X^* = \frac{\text{Vektör (ng)} \times \text{Insert (kb)}}{\text{Vektör Büyüklüğü (kb)}} \times \frac{\text{Insert (mol)}}{\text{Plazmit (mol)}}$$

(*) X = Ligasyonda Kullanılması gereken Insert Miktarı (ng)

Hesaplamaya göre klonlanacak DNA miktarı (x) nanogram olarak bulunur. Kullanılması gereken klonlanacak DNA miktarı yukarıda formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon aşağıda belirtildiği gibidir: 2X Rapid Ligation Bufer 5 µl, pGEM-T Easy Plazmit (50ng/µl) 1 µl, Klonlanacak DNA x µl, T4 DNA Ligase (5u/µl) 1 µl ve son olarak reaksiyon deiyonize su ile 10µl'ye tamamlanır ve 16 °C'de PZR cihazında maksimum 18 saat süre ile inkübe edilir.

2.2.9. *E. coli* Kompetent Hücre Hazırlığı

Çalışmada kullanılan klonlama konakçısı *Escherichia coli* XL I – Blue ve protein ifade konakçısı *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS ırklarının klonlama öncesinde dışarıdan DNA alabilecek yapı kazanmaları, yani kompetent hale getirilmeleri gerekmektedir. Hücreler kompetent özellik kazandırmak için aşağıdaki protokol takip edilmiştir [117].

- 1) Kompetent yapılmak istenen hücre tipi LB agar besiyerine ekilir ve yayılır. Oluşan tek kolonilerden LB Broth besiyerine ekilerek gece boyu 37°C’de 120 rpm’de inkübe edilir.
- 2) Ertesi gün canlılığı yüksek olan hücre kültüründen 0,3-0,5 ml alınarak 100 ml’lik taze LB Broth besiyerine ekilir. 120 rpm, 37°C’de inkübasyona devam edilir.
- 3) Erken logaritmik faza erişen kültürün 550 nm’deki OD alınarak hücre yoğunluğu ölçülür. OD 0,4 ile 0,6 arasında olmalıdır. Bu işlem için, inkübasyon başlamasından 70-80 dakika sonra spektrofotometrik ölçümler belirli aralıklarla yapılmaya başlanır. Spektrofotometri ölçümleri için kör olarak dH₂O kullanılmıştır.
- 4) İstenilen OD aralığına ulaştığında, kültürün alınarak 6000 rpm’de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Miktar fazla ise peletleme birkaç santrifüj adımı ile yapılır.
- 5) Santrifüj sonunda süpernatant dökülür ve pelet 7,5 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülür ve 15 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda karışım tekrar 6000 rpm’de 15 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 7) Santrifüj sonunda üst faz dökülür ve hücre peleti 0,25 ml 50 mM soğuk CaCl₂ ile “yavaş” pipetleme ile çözülür.
- 8) Eğer hücrelere hemen DNA transformasyonu yapılacaksa hücreler 50 µl hacimlerde bölünerek transformasyona geçilir. Fakat hücreler saklanacaksa 0,6 ml % 80’lik gliserol eklenerek karıştırılır ve 30 µl hacimlere bölünerek -86 °C’ye kaldırılır. Hazırlanan kompetent hücrelerin kompetentliği bir gün sonra eşit hacimde insert bulunduran ve bulundurmayan klonlama plazmitü ile test edilir.

2.2.10. Plazmitin Kompetent Hücelere Transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmitün çoğaltılması veya protein ifadesinin gerçekleştirilmesi için kompetent hücelere plazmitün aktarımı gereklidir. Transformasyon protokolünde aşağıdaki adımlar takip edilir [117].

- 1) Kompetent hüceler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den alınır ve buzda 5 dakika süre ile bekletilir.
- 2) Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenir ve buzda 30 dakika süre ile bekletilir.
- 3) Süre sonunda örnekler buzdan alınır ve $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan ısı bloğuna yerleştirilir.
- 4) Hüceler ısı bloğunda 2 dakika süre ile bekletilir ve sonrasında hemen buza alınarak 3 dakika da buzda bekletilir.

Burada $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve buzda bekletilme süreleri önemlidir ve aşılmamalıdır.

- 5) Sürenin bitiminde örneklerin üzerine $500\text{ }\mu\text{l}$ LB Broth eklenir ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika süre ile inkübe edilir.

Burada 30 dakikalık süre çok fazla aşılmamalıdır. Aksi takdirde hüceler katı besiyerine ekildiklerinde çok fazla üremeye bağlı petri yüzeyini kaplayarak, halı oluşturabilir ve bu nedenle tek koloniler seçilemez.

- 6) Bu süre içinde ekim yapılacak LB Agar petrilere $40\text{ }\mu\text{l}$ X-Gal eklenir ve besiyerinin çözeltiyi çekmesi beklenir.
- 7) Hüceler süre bittikten sonra $8,000\text{ rpm}$ de 2 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 8) Tüp içerisindeki yaklaşık $50\text{ }\mu\text{l}$ sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür.
- 9) Pelet kalan sıvı içerisinde çözülür, sonra LB-agar-ampisilin-Xgal tabağının yüzeyine yayılır ve bir gece boyu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilir.

Eğer mavi/beyaz seçim yapılıyorsa beyaz renkli olan kolonilerden 10-20 adet koloni seçilerek numaralandırılır ve öze yardımıyla alınarak, önceden hazırlanmış olan 40 µl X-Gal içeren LB Agar Amfisilin (100 µg/µl) petrilere çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturulur. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 ml'lik 100 µg/µl amfisilinli LB medium besiyerine ekim yapılır. X-Gal içeren LB Agar amfisilin tabakları ve LB Broth besiyerleri 37 °C'de bir gece inkübe edilir. Ertesi gün sıvı besiyerinden plazmit DNA izolasyonu yapılarak klonlamanın olup olmadığı restriksiyon enzim analizi ile kontrol edilir.

2.2.11. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu, klonlamanın kontrol edilmesi için ya da plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapılabilir. Bunun dışında klonlanan parçanın kalıp olarak kullanılarak üzerinde değişiklik yapılması veya tekrar çoğaltılması amacıyla da plazmit izolasyonu yapılabilir. Plazmit izolasyon protokolü adımları aşağıda verilmiştir [117, 122].

- 1) Pozitif koloni LB Broth ampisilin besiyerine ekilerek gece boyu 37°C, 120 rpm'de büyütülür.
- 2) Sabah, besiyeri yoğunluğuna göre 1-5 ml hücre alınarak 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 3) Süpernatant dökülür ve hücre peleti 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 ile “**çok iyi pipetlemeyle**” çözülür. Tekrar 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 4) Üst faz dökülür ve hücre peleti üzerine
 - 150 µl 10 mg/µl Lizozim
 - 20 µl 0,5 M EDTA pH 8
 - 10 µl Rnase A Solution

Eklenerek pipet yardımı ile çözülür.

- 5) Karışım 30 dakika süre ile buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda “**taze**” hazırlanmış 2 ml, 0,2 M NaOH/200 µl % 1'lik SDS karışımı eklenir ve dikkatlice oldukça “**yavaş**” alt/üst edilerek karıştırılır.

0,2 M NaOH ve % 1'lik SDS *ayrı ayrı hazırlanır ve kullanımdan hemen önce karıştırılır.*

- 7) 5 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 8) Süre bitiminde hemen 300 µl 7,5 M NH₄Ac eklenir ve dikkatlice alt/üst edilerek karıştırılır. Devamında 10 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 9) Süre sonunda 15 dakika süre ile 15.000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üst faz yeni tüpe aktarılır.
- 10) Alınan üst faz hacmi kadar Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1), eklenir ve tüp **“güçlü”** bir şekilde yaklaşık 10 saniye boyunca çalkalanarak karıştırılır. Sonrasında 10 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanır.
- 11) Sonrasında tür 15.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edilir ve santrifüj sonrası oluşan sıvı üst faz yeni bir tüpe alınır. Burada alınan hacim belirli olmalıdır.
- 12) Alınan hacmin 0,6 katı kadar İzopropanol eklenerek pipet yardımı ile karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 13) İnkübasyon sonrası tüp 15,000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 14) Üst faz atılır ve pelet 200 µl 0,3 M NaAc ile dikkatlice çözülür.
- 15) Gece boyu -20 °C'de bekletilir. Ertesi gün tüp 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 16) Üst faz atılır ve pelet kurumaya bırakılır. Sonrasında pelet 10 µl dH₂O ile çözülür.
- 17) Restriksiyon enzim analizi, agaroz jel ile miktar analizi, saflığı ve kalitesi kontrol edilebilir.

2.2.12. Restriksiyon Enzim Analizi

Restriksiyon enzimler DNA zincirini istenilen özgül noktadan kesmek için kullanılan enzimlerdir. Bu enzimler hedef DNA'nın Plazmit DNA içerisine

klonlanması ve hedef DNA'nın tekrar çıkarılması için kullanılabilceği gibi [123], DNA parmak izi çıkarılmasında ve Southern Blot deneyinde genomik DNA'nın parçalanmasında da kullanılabilir.

İzole edilen plazmit DNA'nın analizi için ise aşağıda verilen reaksiyon hazırlanır.

1 µl restriksiyon enzimi, 1 µl 10X enzim tamponu, plazmit DNA yoğunluğuna göre 1-8 µl eklenir ve artan hacim 10 µl'ye dH₂O ile tamamlanır.

Eğer plazmit DNA'nın kesim reaksiyonu iki farklı restriksiyon enzim ile yapılacaksa, bu enzimler için ortak bir tamponun seçilmesi gereklidir. Ortak tampon seçildikten sonra yukarıda verilen reaksiyona diğer enzim 1 µl olarak eklenir ve toplam hacim yine 10 µl'ye dH₂O ile tamamlanır. Uygun tampon bulunamazsa kesim reaksiyonu iki basamakta yapılır. Tampon içeriğinde daha az tuz bulunan enzim ilk olarak kesim reaksiyonuna eklenir, 2-4 saat reaksiyon sürmesi beklenir, daha sonra tuz miktarı yüksek olan ikinci enzimin tamponu ve ikinci enzim eklenerek kesime devam edilir. Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da enzimlerin çalışma sıcaklıklarıdır. Çoğu restriksiyon enzim 37 °C'de çalışırken bazı restriksiyon enzimleri daha yüksek veya daha düşük sıcaklıklarda çalışabilirler.

Kesim reaksiyonu istenilen şartlarda 2-18 saat arası devam ettirilir. Sonrasında ise agaroz jele doğrudan yüklenerek analizi yapılır.

2.2.13. *Escherichia coli*'de MPK4'ün Protein İfadesi İçin Gerekli Nokta Mutasyon İçeren Primerlerin Tasarlanması

Tetrahymena thermophila iyi bir model organizma olmasına [124] karşın kodon kullanımının standart kodon sözlüğüne uymaması *Tetrahymena* proteinlerinin ifadesi için zorluk oluşturmaktadır. Siliyat kodon sözlüğüne göre TAA ve TAG kodonları glutamin (Q, Gln) aminoasidini kodlamaktadır, fakat bu kodonlar standart kodon sözlüğünde protein yapımını sonlandıran "DUR" kodonuna karşılık gelmektedir [125, 126]. Bu nedenle protein ifadesi standart kodon sözlüğü kullanan *Escherichia coli*'de yapılacaksa bu kodonlarda nokta mutasyon oluşturularak müdahale edilmesi gereklidir.

Tetrahymena thermophila MPK4 geninin üzerinde glutamin kodlaması gereken, fakat standart kodon sözlüğüne göre “DUR” anlamına gelen 16 tane nokta mutasyon bulunmaktadır. Bu nedenle bu 16 nokta mutasyon taşıyan bölgeye 8 çift primer tasarlanmıştır. Bu yaklaşıma rağmen 16 adet mutasyonun varlığı ve bunlardan bir kısmının birbirlerine çok yakın olması, mutasyon PZR adımının 3 ayrı büyük adımda gerçekleştirmeyi neden olmuştur. Her büyük adım da genelde 2 ayrı PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. Her iki PZR’de; 5’ >3’ yönünde hata düzeltme fonksiyonu bulunan Pfu DNA polimeraz kullanılmıştır. Her büyük adım kendi içinde iki ayrı şekilde programlanan PZR programıyla yapılmıştır. Bunlardan ilki normal PZR iken, diğeri ilk 5-7 döngüsünde primer içermemesi ve sonrasında primer eklenmesinden dolayı farklılık arz eder. PZR’lerden ilkinde oluşturulan örtüşebilen iki ürün, saflaştırıldıktan sonra ikinci PZR reaksiyonun da kaynak DNA olarak kullanılır. Burada “örtüşen bölgelerin uzaması (splicing of overlap extension PCR/SOEing PCR)” tekniği kullanılarak katalaz geni cDNA’sı içerisinde PZR ile çoklu mutasyonlar yerleştirilmiştir [127-129]. Tasarlanan nokta mutasyon primerleri için belirli noktalara dikkat edilmesi gereklidir. Bu noktalar şunlardır;

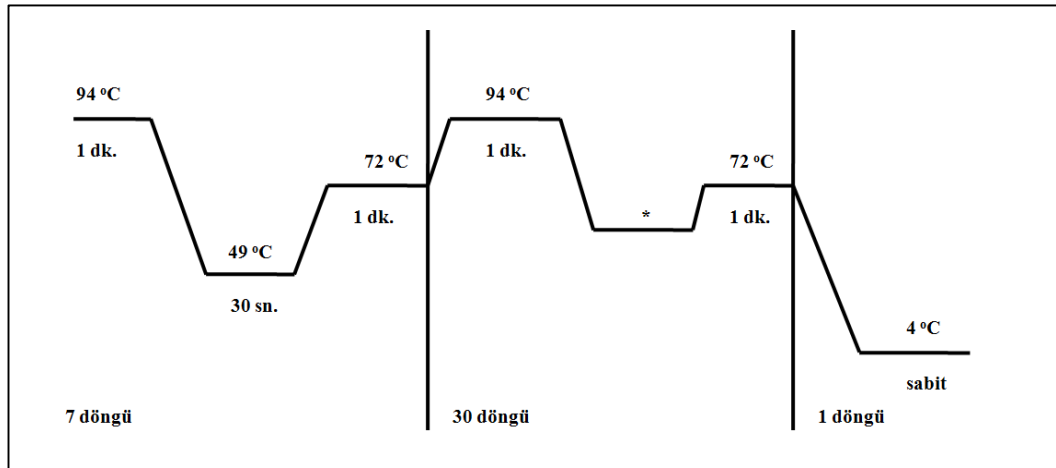
- Tasarlanan primer 1 nokta mutasyon içeriyorsa 15-18 bazdan oluşmalıdır. Eğer daha fazla mutasyon içeriyorsa daha uzun olabilir.
- Nokta mutasyon bölgesinde tasarlanan primer çiftinin örtüşme bölgeleri 15-20 baz olmalıdır.
- Mutasyon bölgesi veya noktası tasarlanan primerin 3’ ucuna 12-15 baz uzakta olmalıdır.
- İki farklı primer tasarlamak için mutasyonlar arası en az 70-80 baz olmalıdır. Aksi takdirde ya bu iki mutasyon aynı primer içerisine alınır ya da mutasyon taşıyan parçaların birleştirilmesinde farklı stratejiler kullanılır.

Nokta mutasyon oluşturulması için iki adımlı PZR deneyi kurulur. İlk adımda klasik PZR yapılarak nokta mutasyonlu parçalar üretilir. PZR deneyinde proofreading aktivitesine sahip polimeraz enzimleri kullanılmalıdır. İlk aşamada primerler sahip oldukları mutasyonları ürettikleri parçalara yerleştirirler. Mutasyonları içeren parçaların üretiminden sonra bu parçaların birleştirilmesi gereklidir. Primerler tasarlanırken oluşturulan örtüşen bölgeler birleştirme

reaksiyonunun olmasını sağlar. Buradaki polimeraz zincir reaksiyonunun yapısı özeldir. Ortama kalıp olarak birleştirilmesi istenilen iki parça da konulur. Parçaların mol ve baz çifti büyüklükleri üzerinden denk miktarlarda kullanılması gerekmektedir. Reaksiyonun ilk 4-7 döngüsü ortamda dış primerler bulunmadan gerçekleştirilir Burada kullanılan kalıp DNA'ların örtüşen bölgelerinden birbirleri hibridize olmaları sonucunda 3' OH⁻ ucu oluşmuş olur. Bu da DNA polimerazın primer olarak kullanabileceği bir yapı olduğundan polimerizasyon başlar. Nokta mutasyon oluşturulmasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu şartları ve reaksiyon içeriği aşağıda verilmiştir.

Pfu DNA Polimeraz (2.5u/μl) (Fermentas)	0,3 μl
10X Pfu DNA Polimeraz Enzimi tamponu + MgSO ₄	2,5 μl
Kalıp 1	0,5 – 2 μl
Kalıp 2	0,5 – 2 μl
dH ₂ O	20 μl'ye tamamlanır.

Reaksiyon 94 °C'de 1 dakika, 49 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika süre ile 7 döngü reaksiyon kurulmuştur. 7 döngü sonunda ise dış primerlerden 2,5 μl eklenerek iyice karıştırılır ve reaksiyona klasik PZR olarak devam edilir. Oturma sıcaklığı eklenen primerlerin T_m değerlerine göre belirlenir. Nokta mutasyon içeren iki DNA parçasının birleştirilmesi PZR haritası şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Nokta Mutasyon Birleştirme PZR Program Akışı: Yıldız (*) ile gösterilen yere kullanılan dış primerlerin oturma sıcaklıkları ve oluşacak tüm parçanın kb büyüklüğüne göre oturma süresi yerleştirilir. İlk yedi döngüden sonra program geçici olarak durdurulur ve dış primerler eklenir.

2.2.14. MPK4 cDNA'sının 3' Ucunun 3' RACE Reaksiyonuyla Klonlanarak Karakterizasyonu

MPK4 cDNA'sının bilinmeyen 3'bölgesi 3' RACE tekniği kullanılarak elde edilmiştir. RT reaksiyonu ile oluşturulan cDNA popülasyonu ile F6 ve dT primer seti kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR ürünleri jelden QIAquick Gel Extraction kiti ile saflaştırıldıktan sonra direkt DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

3'RACE Reaksiyonu (25 µl):

5x Takara Prime Star tamponu 5 µl, dNTP 2 µl, F7 (veya F8 primer,) 2,5 µl, dT primer 2,5 µl, steril deiyonize su 12,25 µl, cDNA kalıbı 0,5 µl ve prime star polimeraz (2.5 u/µl) 0.25 µl kullanılarak kurulmuştur. Kullanılan gen spesifik primerlerin konsantrasyonu 2,5µM'dır. dNTP, Takara Prime Star enzim setinden kullanılmıştır.

3'RACE reaksiyonun PZR programı

98°C'de 10 saniye, 51°C'de 10 saniye ve 72°C'de 1dk. ayarlı PZR programında 30 tekrarlı yapılmıştır.

2.2.15. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi reaksiyonu öncesinde parçanın PZR ile çoğaltılması gerekmektedir. PZR reaksiyonuna girecek DNA miktarı büyüklüğünü bağlı olarak fmol olarak hesaplanmalıdır ve bu hesap kadar DNA alınarak PZR reaksiyonunda çoğaltılır.

Dizi analizine girecek DNA'dan gerekli miktarda alınarak dH₂O ile 10 µl hacme tamamlanır. Eğer dizi analizi plazmit ile yapılacaksa tüp 94 °C'de 4 dakika süre ile PZR cihazında bekletilir. Sonrasında oda sıcaklığına gelmesi beklenir ve 8 µl DTCS ile 2 µl primer eklenir. Reaksiyon her bir döngüde 96 °C'de 20 saniye, 50 °C'de 20 saniye ve 60 °C'de 4 dakika olacak şekilde 35 döngü olarak devam ettirilir.

Eğer dizi analizi doğrudan PZR ürünü olan DNA parçasından yapılıyorsa PZR'de 94 °C'de 4 dakika olan ilk adım yapılmaz ve reaksiyon son hacimde 20 µl olarak DTCS ve primer ile birlikte hazırlanır.

Etanol çöktürmesi: Çalışmada kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) DNA dizi analizi cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PZR ürünlerinin etanolle çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

Protokole aşağıdaki adımlar ile devam edilir.

- 1) Durdurma Çözeltisi (Stop Solution) hazırlanır çözeltiden 4'er µl PCR ürünlerine eklenir ve 1 µl 20 µg/µl glikojen eklenerek iyice karıştırılır.

***Stop Solüsyonu:** 3 M Sodyum Asetat (pH: 5,2) ile 100 mM Na₂EDTA (pH: 8,0) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım oda ısısında yapılmış ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır*

- 2) Taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilmiş % 95'lik etanoldan 60 µl pelet hareket ettirilmeden yavaşça eklenir.
- 3) Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir ve dipte oluşan pelet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırılır.
- 4) Pelete 200 µl taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilen %70'lik etanoldan pelet hareket ettirilmeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakılır.
- 5) Tüpler 14,000 rpm'de 4°C'de 2 dakika süre ile santrifüj edilir ve dipte oluşan pelet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır.
- 6) Süpernatant dökülür, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40°C'de 10 dakika süre ile konsantratörde alkol uçurulur.
- 7) Pelet 40 µl SLS (Sample Loading Solution) eklenir ve iyice çözülür. Daha sonra dizi analizi için gerekli özel tablolara yerleştirilir.

- 8) Yerleştirme işleminde örnek tabağına 40 µl SLS içeren örnekler sırasıyla eklenir ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatılır.
- 9) Tampon tablasına da kit içinde bulunan ayırma tamponu, kuyucukların %70'ini dolduracak kadar eklenerek analiz başlatılır.

2.2.16. MPK4'nın Dotblot Yöntemi ile Analizi

MPK4 bulucu DNA (prob)'sının DIG (Dioksijenin) ile işaretleme reaksiyonu;

MPK4 genini taşıyan plazmit DNA, tüm genin klonlandığı PZR reaksiyonunun ısı döngüsü ve koşullarında kalıp olarak kullanılarak bulucu DNA (prob) üretmek amacıyla 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-işaretleme ve tespit etme kiti kullanılmıştır.

DIG işaretleme kitine göre, 0,5 ve 1,5 ml'lik ependorf tüpler kullanılarak, 0,5-3 µg kalıp DNA (yukarıda jelden kesilip saflaştırılan DNA parçası) toplam 15 µl'ye steril deiyonize su ile tamamlanarak 100°C'de su banyosunda denatüre edilmiştir. Tüp kısa bir spin atırılıp hemen buza konmuştur. Üzerine kitten sırasıyla 2 µl hekzonükleaz karışımı, 2 µl dNTP karışımı ve 1 µl Klenow enzimi eklenmiş ve 37°C su banyosunda 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için 65°C'de 10 dk. bekletilmiştir.

Prehibridizasyon, Hibridizasyon ve Deteksiyon Aşamaları;

Öncelikli melezleme prehibridizasyon standart tamponu Çizelge 2.1'deki formüle göre distile su ile iki ayrı 20ml'lik hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. Melezleme standart solüsyonu (Prehibridizasyon Tamponu)

Prehibridizasyon Tamponu	100 ml için	20 ml için	Son konsantrasyon
20X SSC	25 ml	5 ml	5x
% 10 SDS	200 µl	40 µl	% 0.02
Na-laurylsarkozin	0,1 g	0.02 g	% 0.1
Bloklama stok solüsyonu	1 ml	200 µl	% 0.1

İlki prehibridizasyon için kullanılmıştır. İkincisi de 5 dk. 100°C’de tutulup sonra buza konularak denatüre edilmiş bulucu DNA eklenerek hibridizasyon tamponu olarak kullanılmıştır. -20°C’de bekletilen DIG işaretli bulucu DNA kullanılacağı zaman 68°C’de 10 dk. bekletilmiş ve sonrasında 10 dk. buza konularak tek zincirli kullanılabilir hale getirilmiştir. Prehibridizasyon aşaması 68°C’de 2 saat süreyle 3 kez yapılmış ve bu işlem hibridizasyon fırınında gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon 16 saat 68°C’de hibridizasyon tüpü içinde gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon tamponu bir falkona boşaltılmış ve -20 °C’de tekrar kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Membran 1.yıkama tamponu (2x SSC, % 0,1 SDS) ile oda ısısında iki kere 5’er dakika hafifi harekette yıkanmış ve süzülmüştür. Tekrar membran 2. yıkama tamponu ile (0,5x SSC, % 0,1 SDS) ile 65°C’de 5 dk. yıkanmış ve süzülmüş, daha sonra 3. yıkama tamponunda (0,1x SSC, % 0,1 SDS) 68°C’de 5 dk. yıkanmıştır. 3. yıkama tamponu membrandan süzülerek uzaklaştırılmıştır.

Yıkamalardan sonra naylon membran DIG-Maleik asit tamponunda oda ısısında 5 dk. yıkanmış ve süzülmüştür. Daha sonra membran 10 ml 1x tamponu içinde oda ısısında 30 dk. yıkanmıştır.

Antikor solüsyonu (kit içinde) kullanılmadan önce 5 dk. 10000 rpm’de santrifüjlenmiş sonra antikor pipetle alınarak 1x bloklama tamponunda 1:5000 oranında 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 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 kit'ten çözündürülen vial 9 tüpünden 40 µl alınarak 2 ml saptama tamponu ile hazırlanmış ve karanlıkta tutulmuştur.

DIG saptama tamponu döküldükten sonra membranın üzerine 2 ml Colorsubstrate solüsyonu eklenmiş ve karanlıkta “**çalkalamadan**” bant oluşumu gözlenmiştir.

2.2.17.Southern Blotlama

T. thermophila SB210'dan izole edilen genomik DNA (10µg/reaksiyon) uygun restriksiyon enzimleri (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *XbaI*, *SmaI*) ile kesilmiştir. % 0.8'lik agaroz jelinde büyüklüklerine göre ayrılarak “pozitif yüklü nylon” membranına transfer edilmiştir. 1200 bç'lik MPK4 cDNA'sı DIG (digoxigenin-dUTP) DNA işaretleme kiti (Roche) kullanarak bir gece boyunca işaretlenmiş ve işaretlenmenin kalitesi ve probun özgünlüğü önce basit ölçekte sınanmıştır. Agaroz jelde ayrılan genomik DNA, önce denaturasyona, nötrilizasyona ve sonra kapilleri blotlama yöntemi ile bir gece transfer işlemiyle pozitif yüklü nylon membran aktarılmıştır. Mikrowave 'de 1 dk inkübasyon ile membrana tespit edilen DNA parçaları sırasıyla önhibridizasyon (3 saat) ve hibridizasyon işlemine(1 gece) tabi tutulmuştur. Ertesi gün, membrane 2X SSC % 0.1, oda ısısında 15 dk ve 0.5 SSC %0.1, 42 °C 15 dk olmak üzere yıkama işleminden geçirilmiştir. Son olarak membrane, DIG kitindeki (Roche) görüntüleme adımlarıyla görüntülenmiştir. Bantların büyüklükleri hesaplanmış ve beklenen genom patternine uyup uymadığı tartışılmıştır. Southern Blot protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Kullanılacak DNA ve Miktarı:

Tek kopyalı dizilerin yüksek spesifik aktivite ile tespit edilmesi isteniyorsa 500bp den büyük proplar için memeli genomik DNA'sından 10ug DNA kullanılmalıdır. Eğer ilgilenilen dizi yüksek kopyalı olduğu bilinen bir dizi ise daha az miktarda DNA kullanılabilir. Kullanılacak DNA mümkün olduğunca

kaliteli, temiz ve yoğun olmalıdır. Dolayısıyla DNA izolasyonunda takip edilen yöntem ve yöntemin tatbik ediliş şekli büyük önem taşımaktadır.

1. DNA'nın yoğun olması, sonraki adımda kurulacak olan restriksiyon kesim reaksiyonunun istenilen toplam hacme denk getirilebilmesine de olanak sağlayacaktır.

2. DNA'nın temiz olmaması ilk olarak restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonunun başarısını etkilemektedir. Bu da kısmi kesimlere sebep olacağı gibi taşıdığı kirlilik membrana aktarım esnasında da problem yaratacaktır.

2. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim:

Deneyin amacına uygun olarak genellikle aynı miktar genomik DNA'nın birden fazla restriksiyon enzimi ile kesildiği setler kullanılmaktadır. Seçilen restriksiyon enzimlerinin çalışılan geni içeriden kesmiyor olmasına dikkat etmek gerekmektedir. Eğer deney ilgilenilen genin kopya sayısını tespit etmeye yönelik olarak kurulacaksa, restriksiyon enzimleriyle kesimi yapılan genomik DNA setlerindeki DNA miktarlarının eşit olması gerekmektedir. Aksi durumlarda bu gerekli değildir. Ancak örnek gDNA miktarı çok yoğunsa viskoz olacaktır. Viskoz bir solüsyon halindeki DNA miktarının ölçümü genellikle doğru bir sonuç vermeyecektir. Bu da; ya olması gerekenden fazla ya da daha az miktarda DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınmasına ve dolayısıyla da istenilen miktarın dışında bir miktarın jele yüklenmesine sebep olur. Ancak kullanılan miktardan daha önemli olan, restriksiyon kesiminin tamamen gerçekleşmiş olmasıdır. Yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın belli bir enzimle eşit bir biçimde kesime uğramasına engel olan en büyük faktör DNA'nın lokal konsantrasyonlarındaki eşitsizlik ve DNA izolasyonu ile taşınan kirliliktir. Kısmi kesime mani olmak için toplam reaksiyon hacmi mümkün olduğunca yüksek tutulmalıdır. Genomik DNA'nın bazı bölgelerinde topaklanmaların oluşması, restriksiyon enzimlerinin bu bölgelere erişimine engel olacaktır bu da homojen olmayan bir kesime sebep olur ki bu istenmeyen bir durumdur. DNA'nın homojen bir şekilde kesildiğinden emin olmak için aşağıdaki işlemler yapılmalıdır:

1. Eğer mümkünse total reaksiyon hacmi en az 45ul'ye ayarlanmalıdır.

2. Total hacme göre hesaplanan restriksiyon enzim tamponu ve su DNA'ya eklenmeli ve 4C'de Birkaç saat inkübe edilmelidir.

3. DNA'nın ug'ı başına 5 ünite enzim olacak şekilde belirlenen enzim miktarının yarısı solüsyona eklendikten sonra 4C'de 2-3 dakika nazikçe karıştırılmalı daha sonra da solüsyon enzime uygun inkübasyon ısısında 15-30 dk inükbe edilmelidir.

4. İnkübasyondan sonra enzimin geri kalan kısmı da solüsyona eklenip yukarıdaki gibi muamele edildikten sonra uygun sıcaklıkta 8 -12 saat inkübe dilmelidir.

Not: Fazla miktarda enzim kullanımının (bu yüksek hacimli bir restriksiyon kesim reaksiyonu kurulduğu anlamına gelmektedir) ortama taşıyacağı tuzlar da kesimin homojen olmasını engellemektedir.

3. Agaroz Jel Hazırlığı

Genelde 0.5xTBE ya da 1xTAE ile hazırlanan binde yedilik (% 0.7) 20X20x0.5 boyutlarındaki agaroz jeli, southern blotlama için uygundur. Gece boyunca sürdürülen jel koşturulmasında TAE tamponları TBE tamponlarına göre nispeten daha iyi çözünürlükte bantlar oluşmasına sebep olabilmektedir. TAE tamponlarının dezavantajı tamponlama kapasitelerinin daha düşük oluşudur. Gece boyu süren koşturmalarda tampon polarize olma eğilimindedir bu da jelin zayıflamasına (erimesine) sebep olmaktadır. Buna imkân vermemek için bol miktarda tampon alabilme kapasitesi olan aparatlar kullanılmalıdır. Böylelikle katot ve anot arasındaki tampon değiş-tokuşu bol miktarda olacağı için polarizasyon minimize edilir.

Jel hazırlanırken EtBr kullanılmamalıdır. Kuyucuklar ~50-60 µl alacak büyüklükte olmalıdır ve mümkünse restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA solüsyonunun tamamı yüklenebilmelidir. Bu büyüklükte kuyucuklara sahip bir jeli oluşturmaya uygun aparatınız yoksa, restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunuz etanol presipitasyonundan geçirildikten sonra uygun hacimdeki TE ile gece boyu resüspanse edilebilir. Buna alternatif bir yol olarak 2mm eninde dişleri olan taraklarla kuyucukların hacmi artırılabilir. Tarak dişlerinin "eni" jelin

çözünürlüğünü etkilemesi bakımından dikkate alınması gereken diğer bir önemli faktördür. 3mm'lik tarakların kullanılması çözünürlük açısından sakıncalıdır. Bununla birlikte 2mm'lik taraklar hem iyi bir jel çözünürlüğü sağlamakta hem de daha büyük hacim oluşturmaktadır.

4. Jelin Yüklenmesi

Jel yüklenirken sarı uçlu pipet uçları kullanılmalı ve 6x sukroz yükleme boyası ile boyanmalıdır. Yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA restriksiyon enzimleri ile yetersiz kesilmişse ya da NotI gibi büyük fragmentler oluşturan restriksiyon enzimleri kullanıldıysa, bu durumda jele yüklenen DNA'nın kuyucuğun dibine çökmesi zor olacaktır. Bu riski minimize etmek amacıyla örnekler jele yavaş bir şekilde yüklenmeli ve yükleme tamamlandıktan sonra birkaç dakika beklenmelidir. Eğer yüklenecek örnekler 4 derecede muhafaza edildiyse yüklemeden önce 56C'de 2-3 dakika inkübe edilmelidir.

5. Jelin Koşturulması

Yükleme tamamlandıktan sonra jel düşük voltajda (<1V/cm) yavaşça koşturulmalıdır. Genel bir kural olarak saat başına 35V olacak şekilde gece boyu koşturulur. Mesela; 14 saat boyunca 35V'da koşturulması totalde 490V yapar. Genelde totalde 500V olacak şekilde hesaplama yapılmaktadır.

6. Jelin Görüntülenmesi

0.5 µg/ml EtBr solüsyonu ile 45-50 dk. (şart olmamakla birlikte) çalkalamalı olarak muamele edilmeli ve daha sonra distile su ile birkaç kez yıkandıktan sonra görüntülenmelidir. Görüntüleme yapılırken şeffaf ve UV altında ışımaya yapan cetvel kullanılarak görüntülenmelidir. Görüntülenme esnasında cetvelin "0" değeri kuyucuklara denk gelmelidir.

7. Jelin Transfer için Hazırlanması

Görüntülenme tamamlandıktan sonra jelde bulunan marker sütunu ve kuyucukların üzerinde kalan fazla kısım temiz bir jilette kesilerek atılmalıdır. Ayrıca jelin üst yüzeyinin belli olması için sol alt köşesinden ufak bir kısım üçgen şeklinde kesilmelidir. Son olarak da jelin boyutları ölçülerek not edilmelidir.

8. Denatürasyon

Jel, alkali transfer tamponu içinde 15 dakika oda ısısında nazik bir şekilde çalkalanmaya bırakılmalıdır. Jel tamamen tampona gömülmelidir. Süre sonunda tampon yenisi ile değiştirilir ve 20 dakika oda ısısında nazik bir şekilde çalkalanmaya bırakılır.

9. Membranın Transfer İçin Hazırlanması

Denatürasyon olurken membranın hazırlığına geçilebilir. Bunun için temiz bir jiletle ya da makasla jelin boyutlarından ~1mm daha büyük olacak şekilde ve plastik eldivenli bir şekilde membran kesilmelidir. Sol alt köşesinden ufak bir üçgen kısım da kesilmelidir. Kesinlikle membrana çıplak elle dokunulmamalı ve koruyucu mavi kağıt son ana kadar membrandan ayrılmamalıdır. (Membranın çok pahalı olduğu unutulmamalı ve bunu için dikkatli davranılmalıdır)

Membran uygun bir şekilde kesildikten sonra mavi koruyucu kağıt uzaklaştırılır ve membran tamamen ıslanacak şekilde deiyonize suya batırılır ve tamamen ıslatılır.

Tamamen ıslanması sağlanan membran yeni bir kapta alkali transfer tamponunda en az 5 dakika olmak üzere inkübe edilir.

10. Transfer (Blotlama) düzeneğinin Hazırlanması

Düzeneğin hazırlanmasında kullanılan tüm blotlama kağıtları alkali transfer tamponu ile ıslatılır ve düzenekte kullanılan tampon yine aynıdır.

11. Nötralizasyon

Membran, Nötralizasyon Tamponun'a daldırılır ve 15 dakika oda ısısında inkübe edilir.

12. DNA'nın Membrana Fikse Edilmesi

Alkali transfer DNA'nın pozitif yüklü naylon membrana kovalent olarak bağlanmasını sağlamaktadır ve bunun için DNA'nın membrana hibridizasyondan önce fikse edilmesine gerek yoktur. Ancak bazı markalara ait pozitif yüklü

naylon membranların UV ışığa maruz bırakılması hibridizasyon sinyalini belirgin bir şekilde arttırmaktadır (Khandjian, 1987). Ancak maksimum etki için membranın gereğinden fazla UV'ye maruz kalmaması gerekmektedir. Amaç DNA'daki Timin bazlarının az bir kısmı ile (+)naylon membranın yüzeyindeki pozitif yüklü amin gurupları arasında çapraz bağların oluşmasını sağlamaktır. UV ışığı ile uzun süren bir temas DNA'da bulunan timin bazlarının büyük bir kısmının membran ile bağ yapmasını sağlayacaktır ki bu da hibridizasyon sinyalini azaltacaktır. Tetrahymena genomunun timince zengin olduğu düşünülecek olursa fiksasyon süresinin kısa tutulması daha da kritik bir hal almaktadır.

Fiksasyon yapılırken DNA içeren membran yüzeyinin UV ışık kaynağına dönük olmasına dikkat edilmelidir.

Islatılmış membranlar total olarak 1.5 J/cm^2 UV'ye maruz kalmalıdır.

Kuru membranlar $0,15 \text{ J/cm}^2$ UV'ye maruz kalmalıdır.

13. Pre-Hibridizasyon

Membran tamamen ıslanıncaya kadar 6 x SSC (Ya da SSPE) tamponu üzerinde yzündürülür ve daha sonra tampona daldırılarak 2 dakika bekletilir.

Plastik Torbalar İçin: Membran uygun boyutlarda kesilerek hazırlanmış torba içine yerleştirildikten sonra, poşete membranın her santimetre karesi için 0.2 ml. pre-hibridizasyon tamponu eklenir ve poşet hava kabarcığı kalmayacak şekilde mühürlenir.

İkinci kez mühürleme yapılır ve poşet tahfifçe sıkılarak sağlamlığı test edilir.

Poşet uygun sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda 1-2 saat inkübe edilir.

Cam Şişeler İçin: Membran şişeye nazik bir şekilde yerleştirildikten sonra – DNA olan yüzeyi içeri bakacak şekilde- membranın her santimetrekaresi için 0.1ml. pre-hibridizasyon tamponu eklenir.

Uygun ısıya önceden getirilmiş olan hibridizasyon fırınında inkübasyona bırakılır.

14. Hibridizasyon

Plastik Torbalar İçin: Plastik poşet su banyosundan alınır ve hızlı davranarak bir köşesi kesildikten sonra pre-hibridizasyon tamponu boşaltılır.

Hibridizasyon tamponu kesik köşeden poşet içine doldurulur ve hava boşaltıldıktan sonra tekrar mühürlenir.

15. Membranın Yıkanması

1. Poşetin bir köşesi kesildikten sonra hibridizasyon tamponu saklanabileceği uygun bir kaba aktarılır. Membran hemen 200–300ml 2 x SSC ve her santimetrekare membran için 1ml % 0,5 SDS içeren tampon içine gömülür ve oda ısısında yavaşça çalkalanır.

2. Beş dakika sonra solüsyon dökülür ve 200–300 ml 2xSSC ve her santimetrekare membran için 1ml %0,1 SDS içeren tampon eklenerek oda ısısında çalkalanarak 15 dakika inkübe edilir.

3. Süre sonunda 0.1 x SSC ve % 0.1 SDS 'den oluşan tamponda 30 dakika – 4 saat, 65 derecede hafif bir çalkalamayla inkübe edilir.

4. Membran 0,1 x SSC ile yıkanır.

2.2.18. Northern Blot Analizi

Northern Blot deneyinde prob olarak Southern Blotlamada kullanılan DIG işaretli DNA problemleri kullanılmıştır. Takip edilen protokol aşağıdaki verilmiştir.

RNA'nın Jel'de Ayrılması

- 1) 1x MOPS solüsyonu ile %1-2'lik jel hazırlanır: %1-2 olacak miktardaki agaroz, 1xMOPS ile mikrodalga fırın ya da ısıtıcıda çözülür. Jel çözüldükten sonra 55-60 °C'de iken son hacim %2 olacak şekilde %37'lik formaldehit çeker ocakta jele yavaşça eklenerek karıştırılır. Jel tanka yüklendikten sonra donması için en az 1 saat beklenmelidir.
- 2) Taze hazırlanmış iki hacim yükleme tamponu ile bir hacim RNA karıştırılır. Yüklenecek RNA miktarı, 5 µg toplam RNA, ya da 500 ng

mRNA olmalıdır. (DIG etiketli RNA Probları Kullanılacaksa 1 µg toplam RNA ya da 100 ng mRNA) DIG etiketli RNA marker kullanılacaksa 5µl marker yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklenmelidir.

- 3) RNA yükleme tamponu karışımı 65 °C’de 10 dakika süre ile inkübe edilir.
- 4) Denatüre edilen örnekler hemen buza alınır ve 1 dakika süre ile inkübe edilir. Örnekler kuru jele yüklenir.
- 5) Kuyucuklara dikkatlice koşma tamponu ile doldurulur.
- 6) Tank koşma tamponu ile tamamen doldurulur. Bu işlem yapılırken kuyucukların üstünden dökülmemelidir. Jelin sadece üstünü örtecek kadar doldurulmalıdır.
- 7) Jel en yüksek voltajda (en az 3-4 V/cm) yaklaşık 10 dakika koşturulup durdurulur. Jeli tamamen gömmek için ilave tampon eklenir.
- 8) 3-4 V/cm’de en az 2 saat (tercihen gece boyu) koşturulur.
- 9) Jel 0,25– 0,50 µg/ml Etidyum Bromid ile kısaca (15-30 dk) boyanıp UV’de görüntülenir (EtBr’in Northern Etkinliğini azalttığı düşünülmektedir mümkünse katılmamalıdır)

RNA’nın Membrana Aktarılması

- 1) Formaldehiti uzaklaştırmak için jel 2 kez 15 dakika süre ile 20X SSC’de inkübe edilir.
- 2) Jel üst yüzeyi altta kalacak şekilde 20X SSC tamponu ile ıslatılmış 3MM Whatman kâğıdının üzerine yerleştirilir.
- 3) RNA Jeli blotlama aparatı kurularak 20X SSC ile membrana transfer edilir
- 4) Blotlama bittikten sonra membran kurumadan 2X SSC ile ıslatılmış 3MM whatman kâğıdının üzerine RNA’lı tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilir ve UV kros link yapılır (120 mJ) Autocroslink-Stratalinker.
- 5) Membran steril ddH₂O ile kısaca yıkanır.

- 6) Nemli membran iki adet 3MM Whatman kâğıdı arasında, mühürlü poşet içinde 4 °C’de saklanabilir.

Prehibridizasyon

- 1) Kitte bulunan plastik şişedeki DIG Easy Hyb. Granulleri’ne 64 ml steril DEPC’li su eklenir ve 5 dakika 37 °C’de karıştırılarak çözülür.
- 2) Kullanılacak Hibridizasyon tamponunun miktarı belirlenir. İşlemler hibridizasyon poşetleri kullanılarak yapılacaksa, membranın her 100 cm²’si için prehibridizasyonda 10-15 ml, hibridizasyonda ise 3,5 ml hibridizasyon tamponu kullanılmalıdır. (Midi jelde maksimum membran büyüklüğü 60 cm²).
- 3) Belirlenen miktarda pre-hibridizasyon tamponu steril bir tüpe konulduktan sonra 50 °C’ye ayarlı su banyosuna alınır ve membran hibridizasyon poşetine aktarılır.
- 4) Uygun miktarda önceden ısıtılmış pre-hibridizasyon tamponu hibridizasyon poşetine aktarılarak mühürlenir. Poşet son hali ile hafif kabarık görülmelidir.
- 5) Hibridizasyon fırınında 30 dakika 50 °C’de hafif çalkalama ile inkübe edilir. Bu esnada hibridizasyon solüsyonu hazırlanmalıdır.

Hibridizasyon

- 1) Eğer bulucu DNA ilk kez hibridizasyon tamponuna katılacaksa son hacimde kullanılacak probun miktarı 20-50 µl olacak şekilde hibridizasyon tamponu hazırlanmalıdır. Gerekli miktarda bulucu DNA, önceden içine 50 µl Rnase olmayan su eklenmiş tüpe alınır. Tüp kaynamakta olan su içinde 5 dakika inkübe edilir. Süre sonunda hemen buza kaldırılır ve kısaca santrifüjlenerek sıvının tüpün dibine toplanması sağlanır. Önceden miktarı ayarlanmış ve ısıtılmış hibridizasyon tamponuna hemen aktarılır ve ters-düz edilerek karıştırılır.

Eğer önceden hazırlanmış Probu Hibridizasyon tamponu kullanılacaksa problu tampon (-20'de saklanır) kullanılmadan önce 10 dakika 50 °C'de inkübe edilir. Hibridizasyon işlemleri aşağıdaki sıra ile yapılmalıdır:

- 2) Prehibridizasyon solüsyonunu boşaltmak için poşet kesilir ve hemen önceden ısıtılmış DNA problu hibridizasyon tamponundan gereken miktar poşetin içine aktarılır ve poşet tekrar mühürlenir.
- 3) Membran içeren poşet hibridizasyon fırınında 50°C'de gece boyu inkübe edilir.

Membranın Yıkanması

- 1) Hibridizasyon kabı membranı tamamen örtecek kadar 2X SSC ile doldurulur (Low Stringency Buffer).
- 2) Poşet kesilir ve Hibridizasyon Tamponu -20'de saklamak üzere kaldırılır.
- 3) Membran hemen 2X SSC içeren kaba alınır ve oda sıcaklığında 5 dakika çalkalamalıda inkübe edilir. İşlem 2 defa tekrarlanır. İnkübasyon esnasında High Stringency Buffer (% 0,1 SDS içeren 0,1X SSC) tamponu 50 °C su banyosunda inkübe edilmelidir.
- 4) 2X SSC uzaklaştırılır ve kap hızlı bir biçimde 50 °C'ye ısıtılmış High Stringency Buffer ile doldurulur ve 50 °C'de çalkalanarak inkübe edilir. İşlem 2 defa tekrarlanır.

Membranın Görüntülenmesi

Bu aşamayı oluşturan adımlar üretici firmanın tavsiyesine göre değişiklik yapılmadan gerçekleştirilmiştir (Dig DNA Labeling and Detection Kit, Roche,11093657910).

- 1) Membran 100 ml yıkama tamponu içeren plastik kapa aktarılır ve oda sıcaklığında 1-5 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak inkübe edilir ve süre sonunda tampon dökülür.

- 2) 100 ml bloklama solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 30 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak inkübe edilir (bu süre 3 saati geçmemelidir). Süre sonunda solüsyon uzaklaştırılır.
- 3) Membran 20 ml antikor çözeltisinde oda sıcaklığında 30 dakika süre ile orbital karıştırıcıda inkübe edilir ve süre bitiminde solüsyon uzaklaştırılır.
- 4) Membran iki kez 15 dk 100 ml'lik yıkama tamponu ile yıkanır.
- 5) Membran 2-5 dakika süre ile 20 ml deteksiyon tamponunda inkübe edilir.
- 6) Membran hibridizasyon poşetine (ya da uygun bir kaba) RNA'lı yüzeyi üste gelecek şekilde aktarılır.
- 7) Sonrasında membran 10 ml taze hazırlanmış renklendirme substratı ile karanlıkta muamele edilir. Renklenme başladığında alınarak distile suda yıkanır ve kurutularak kaydedilir.

3. BULGULAR

Tezin deneysel kısımlarında 1mapk olarak isimlendirilen TTHERM_00204120 geninin esas olarak “kinazlar arasındaki sınıflandırması yapılamamış” (unclassified) bir gen olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu gen dizisi kullanılarak dizayn edilen primer setleri ile gerçekleştirilen RT-PZR reaksiyonları ile elde edilen sonuçlar gerçek 1mapk genini temsil etmemesi bakımından göz ardı edilmesi gerekmektedir. Bu gene ait DNA ve aminoasit dizi bilgisi Ek 1’de bulunabilir. Ancak biyoinformatik analizlerde ve filogenetik ağaçlarda gerçek bir MAPK olan ve 1mapk olarak adlandırılan gen TTHERM_0133212 olup deneyselde eksik olan kısımlar tez yazımından sonra tamamlanacaktır.

3.1. *T.thermophila* MAPK Ailesi Üyeleri Hakkında Deneysel Bulgular

Tetrahymena thermophila SB210 suşuna ait makronükleer genomununun TGD [27], NCBI [130] ve Kinaz veritabanları [131] aracılığıyla taranmasıyla elde edilen MAPK katalitik bölgesi içeren diziler üzerinde yapılan ön değerlendirmeler neticesinde 11 MAPK geni tespit edilmiştir (**Ek-1**). Bu genlerden bir kısmı için (3mapk, 4mapk, ERK7a, ERK7c, MPK4) sadece katalitik bölgeyi kapsayan primer setleri kullanılarak sırasıyla; genomik DNA’dan PZR ile toplam RNA havuzundan Geri-PZR reaksiyonlarıyla çoğaltılmış ve beklenen gDNA ve cDNA büyüklükleri bakımından analizi yapılmıştır. Beklenen büyüklüğe sahip bantlar jelden kesilerek saflaştırılmış ve DNA dizi analizine tabi tutularak genlerin teyidi yapılmıştır. Çalışılan genlerin ATG ve TGA arasında kalan gDNA ve cDNA büyüklüklerine ilişkin bilgiler **Çizelge 3.1**’de görülmektedir. Genlere ait dizi bilgileri ve bu genleri elde etmek için kullanılan primer dizilerin ait bilgiler **Ek-1** de verilmiştir.

Çizelge 3.1: *T.thermophila* SB210 Makronükleer Genom Taraması Sonucu Elde Edilen MAPK Enzim Ailesi Üyeleri: Genlere ait erişim numarası, tezde kullanılan isimlendirme ve genomik DNA ile cDNA dizilerine ait büyüklükler çizelgede görülmektedir. Erişim numaraları NCBI veri tabanından elde edilen genlere ait gDNA-cDNA bilgileri TGD veri tabanı kullanılarak çıkarılmıştır. (*): Protein kodlayan DNA bölgesinin başla (ATG) ve dur (TGA) arasında kalan kısmın baz çifti eindsinden uzunluğu. (**): Sınıflandırılmamış (unclassified) MAPK

	<i>Erişim Numarası</i>	<i>Geçici Gen İsmi</i>	<i>gDNA (*)</i>	<i>cDNA(*)</i>
1	XP_001007098 XP_001010007	1mapk (**) 1mapk	1263	1263
2	XP_001031643	2mapk	3517	1620
3	XP_001026993	3mapk	3067	2388
4	XP_001023129	4mapk	12498	9132
5	XP_001017253	5mapk	2612	1827
6	XP_001025119	MPK1	1185	1185
7	XP_001031635	MPK2	2236	1212
8	XP_001020076	MPK3	2714	1449
9	XP_001010453	ERK7A	1881	1881
10	XP_001023534	ERK7C	3975	3360
11	XP_001009345	MPK4	3155	2835

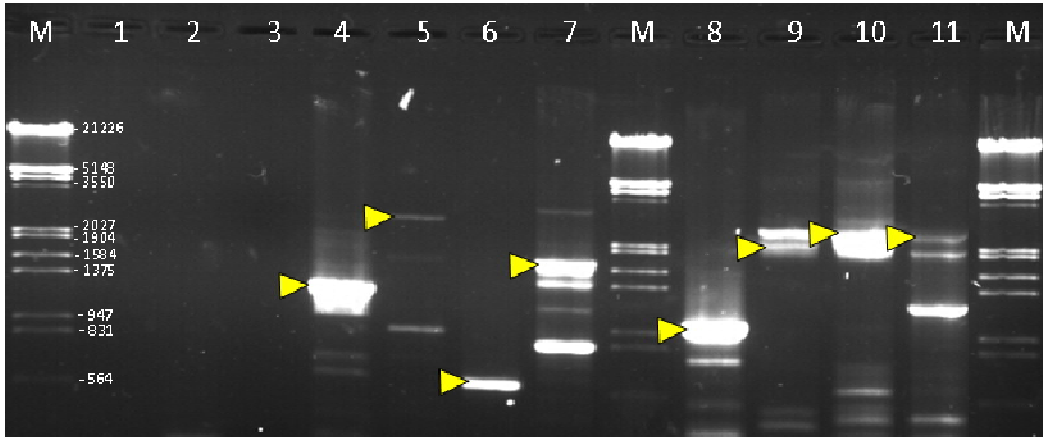
3.1.1. PZR reaksiyonu ile *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin genomik kopyalarının büyüklük analizi

Tasarlanan primer setleri için PZR koşulların belirlenmesi ve genlerin genomdaki varlıklarının teyidi için genomik DNA'dan PZR reaksiyonu kurulmuştur. Tasarlanan primer setleri ile beklenen bant büyüklükleri **Çizelge 3.2'**de görülmektedir.

Çizelge 3.2: *T.thermophila* SB210 gDNA'sı ile yapılan PZR reaksiyonunda beklenen MAPK genlerine ait büyüklükler.

No	Gen Adı	gDNA Büyüklüğü
1	1mapk	1291 bç.
2	2mapk	1620 bç.
3	3mapk	1368 bç.
4	4mapk	1327 bç.
5	5mapk	2612 bç.
6	Erk7a	600 bç.
7	Erk7c	1715 bç.
8	MPK1	1001 bç.
9	MPK2	2236 bç.
10	MPK3	2439 bç.
11	MPK4	1194 bç.

PZR reaksiyonu, tüm primer setlerinin Tm değerleri dikkate alınarak elde edilen ortalama Tm değeri olan 53°C ile kurulmuştur [94°C, 4dk (94°C-50 sn, 53°C-55 sn, 72°C-3 dk) x 27 döngü]. Deney sonucunda elde edilen ürünlere ilişkin bantlar **Şekil 3.1**'de görülmekte olup; 1mapk (Kuyu 1), 2mapk (Kuyu 2) ve 3mapk (Kuyu 3) için tasarlanmış primer çiftleri ile genomik DNA'dan herhangi bir ürün oluşumu gözlenmemiştir. Diğer genlere ait primer setleriyle ise spesifik olmayan bantlaşmalarla birlikte, beklenen büyüklüklerde bantlar elde edilmiştir (**Şekil 3.1**'de oklar). Ürün elde edilemeyen 1mapk, 2mapk ve 3mapk genleri için farklı bir polimeraz enzimi olan *SpeedSTAR HS DNA Polymerase* enzimi ile farklı Tm değerleri kullanılarak deney tekrarlanmıştır [94°C-3 dk (98°C-5 sn, 50-60°C-10 sn, 72°C-35 sn) x 27 döngü]. Sadece 3mapk'dan (Tm 53°C) ürün alınmış olmasına rağmen, 1mapk ve 2mapk primer setleri ile herhangi bir ürün tekrar edilen deneylerden elde edilememiştir. Deneyin esas amacının primer setlerinin çalışıp çalışmadığının anlaşılması ve PZR reaksiyon şartlarının tespiti olması bakımından bantlar dizi analizine alınmamıştır.



Şekil 3.1: MAPK enzim ailesi üyelerinin *T.thermophila* SB210 genomik DNA'sından MAPK primerleri ile yapılan PZR analizi: Primer setleri için hesaplanan Tm değerlerinin ortalaması olan 56 °C ile yapılan PZR reaksiyonu sonuçları %1'lik agaroz jelde görülmektedir. Beklenen büyükteki bantların konumu şekilde oklarla işaret edilmiş ve parantez içinde belirtilmiştir; **1:** 1mapk (1291 bç), **2:** 2mapk (1620 bç) **3:** 3mapk (1368 bç), **4:** 4mapk (1327 bç), **5:** 5mapk (2612 bç), **6:** Erk7a (600 bç), **7:** Erk7c (1715 bç), **8:** MPK1, (1001 bç) **9:** MPK2 (2236 bç), **10:** MPK3, (2439 bç), **11:** MPK4 (2355 bç), **M:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker.

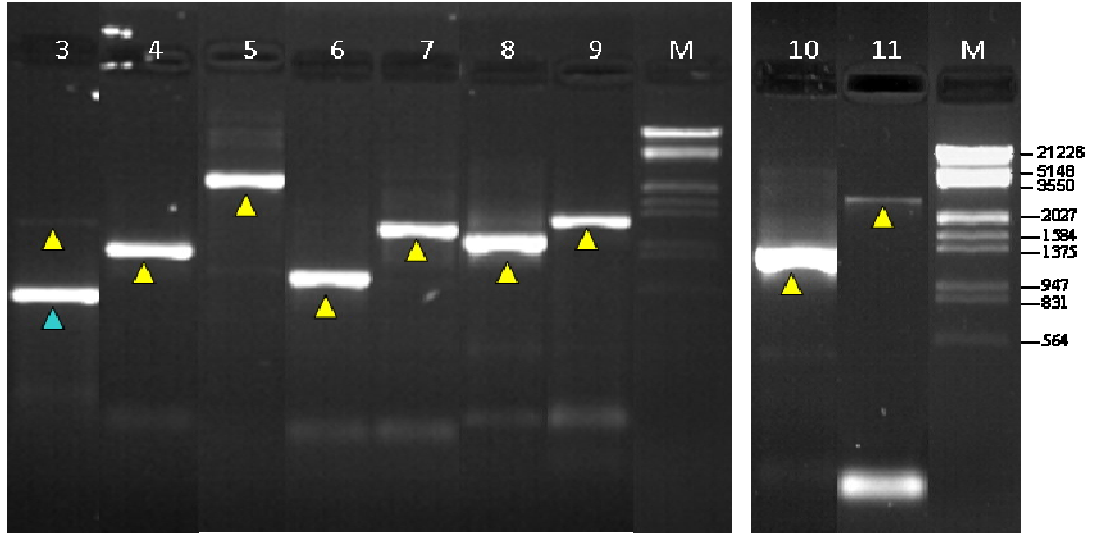
3.1.2. Geri-PZRreaksiyonu ile *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin cDNA kopyalarının analizi

Çalkalamalı etüvde 37°C’de, 24 saat süre ile büyütülen *T.thermophila* hücrelerinden izole edilen toplam RNA’dan 2 µg kullanılarak Geri Transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA havuzu oluşturulmuştur. Seyreltilmesi 1:10 oranında yapılan cDNA’dan 3 µl’nin kalıp olarak kullanıldığı Geri-PZR ile 1mapk ve 2mapk genleri hariç beklenen cDNA büyüklüklerindeki bantlar oluşmuştur (**Çizelge 3.3**). Genomik DNA’dan yapılan PZR reaksiyonuna göre spesifik olmayan bantlaşmaların çok az olduğu bu reaksiyonlarda, sadece 3mapk genine ait reaksiyonda görülen spesifik olmayan bantlaşma daha güçlü olduğu görülmüştür (**Şekil 3.2**, 3 numaralı kuyucuk).

MPK4 hariç tüm primer setleri için Tm değeri olarak 53°C kullanılmıştır [94°C-4 dk (94°C-50 sn, 53°C-55 sn, 72°C-3 dk) x 27 döngü]. Yapılan Tm değeri optimizasyonunda MPK4 için bu değer 61°C olarak tespit edilmiştir. Çalışma boyunca PZR reaksiyonlarında MPK4 için bu Tm değeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3: *T.thermophila* SB210 Geri-PZR reaksiyonunda beklenen MAPK genlerine ait büyüklükler. Deneysel olarak herhangi bir bantlaşma görülmeyen 1mapk ve 2mapk genleri çizelgeye dâhil edilmemiştir.

Bant No.	Gen Adı	cDNA Büyüklüğü
3	3mapk	1003 bç.
4	4mapk	811 bç.
5	5mapk	1837 bç.
6	Erk7a	603 bç.
7	Erk7c	1100 bç.
8	MPK1	1001 bç.
9	MPK2	1212 bç.
10	MPK3	1392 bç.
11	MPK4	1194 bç.



Şekil 3.2: *T.thermophila* SB210 cDNA'sından MAPK primerleri ile yapılan Geri-PZR reaksiyonu: PZR reaksiyonu sonuçları % 1'lik agaroz jelde analizi görülmektedir. Beklenen büyüklüğe uygun bantlaşmalar; bantların altında bulunan oklarla işaret edilmiştir. 3 numaralı kuyucukta işaret edilen iki okdan alttaki ok spesifik olmayan güçlü bandı göstermektedir. Herhangi bir ürünleşmenin gerçekleşmediği 1mapk ve 2mapk'ya ait jel kuyucukları resme dâhil edilmemiştir. Bantların beklenen büyüklükleri parantez içinde belirtilmiştir; **3:** 3mapk (1003 bç), **4:** 4mapk (811 bç), **5:** 5mapk (1837 bç), **6:** Erk7a (603 bç), **7:** Erk7c (1100 bç), **8:** MPK1 (1001 bç), **9:** MPK2 (1212 bç), **10:** MPK3 (1392 bç), **11:** MPK4 (2355 bç), **M:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Markır. **Not:** Fotoğrafta görülen sütunlar, ilgili markara olan mesafeleri korunarak dijital olarak bir araya getirilmiştir.

Reaksiyon sonucunda 1mapk, 2mapk ve MPK4 genleri hariç diğer genlerin beklenen büyüklükte bantları elde edilmiştir. Bantlaşma olmayan genler için daha sonra kurulan optimizasyon PZR reaksiyonları ile MPK4 geni istenilen büyüklükte elde edilmiş olsa da, 1mapk ve 2mapk genlerine ait herhangi bir ürünleşme genomik DNA PZR'sinde olduğu gibi gerçekleşmemiştir. cDNA'dan elde edilen ürünlerin tümü dizi analizi ile teyit edilmiştir (Ek-2).

3.1.3. Farklı Stresler Altında MAPK Ailesi Üyelerinin mRNA İfadelerinin Geri-PZR Yöntemiyle Karakterizasyonu

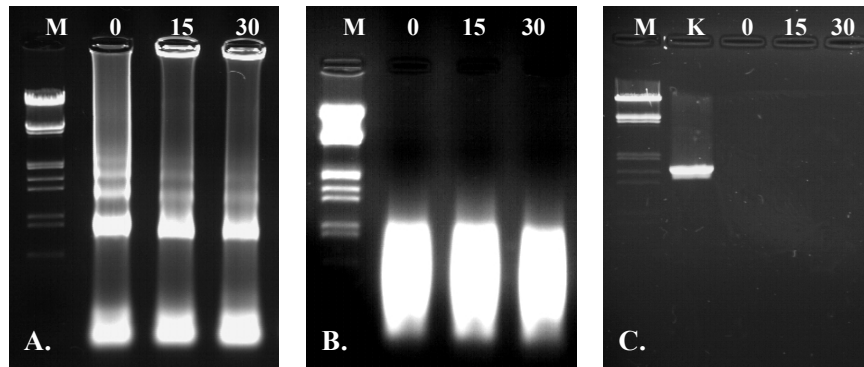
Ökaryotik organizmaların yaşadıkları ortamda oluşan çevresel streslerin hücresel adaptasyonda etkin olan MAPK yolağını aktive ettiği bilinmektedir. *T.thermophila*'nın optimum ortam koşullarının dışındaki sıcaklıklara karşı bazı membran glikoproteinleri ve metabolik proteinler üretmek ya da üretimini durdurmak yoluyla tepki verdiği bilinmektedir. *T.thermophila*'nın yaşadığı doğal ortam olan göletlerde mevsimsel değişimlere bağlı olarak ani sıcaklık değişikliklerinin olması, organizmanın adaptasyonda MAPK sinyal yolağının rol aldığı bir sinyalizasyonun kullanıldığı olduğunu düşündürmektedir.

T.thermophila'nın optimum yaşam sıcaklığı 12–22°C aralığının üzeri ve altında ölümcül olmayan sıcaklıklara geçiş şartlarını taklit edecek şekilde üç farklı sıcaklık deneyi tasarlanmıştır. Yüksek sıcaklığa alınan *T.thermophila* hücrelerinde oluşan mRNA'ların kısa bir yarı ömüre sahip olduğu bilinmektedir [96, 102, 132]. Örneğin, 30°C'de büyütülen hücrelerin RNA'larının yarı ömrü 60 dakikadan fazla iken, 40°C'de büyütülen hücrelere ait RNA'lar da bu süre 3 dakikaya kadar düşmektedir [96, 102, 132]. Yüksek sıcaklığa geçişi temsil eden 30°C→37°C ve 30°C→42°C deney şartları ile düşük sıcaklığa geçişi temsil için 37°C→30°C deneyleri tasarlanmıştır. MAPK sinyal yolu üyeleri sinyal proteinleri olmalarından dolayı genellikle mRNA seviyesinde çevresel değişimlere hızlı cevap verirler. Çalkalamalı etüvde, 30°C'de 24 saat büyütülen hücreler; 37°C ve 42°C'lere transfer edilirken, 37°C'de yine çalkalamalı etüvde 24 saat boyunca büyütülen hücreler 30°C'ye transfer edilmiştir. Transfer edildikleri sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilen hücrelerden 15 ve 30'uncu dakikalarda ve transfer öncesinde (0 zamanı) alınan örneklerden RNA izolasyonu yapılarak, MAPK ailesi üyelerine özgün primerlerle Geri-PZR deneyi yapılmıştır. Deneysel süreç; RNA izolasyonu, DNase muamelesi, RNA Clean Up, DNA kontaminasyonu için PZR reaksiyonu, cDNA üretilmesi için Geri-PZR reaksiyonu, 17s rRNA primerleri ile cDNA miktar optimizasyonu ve son olarak da her gen için Geri-PZR reaksiyonları adımlarını içermektedir. MAPK genlerinin sıcaklık değişikliğine karşı biyolojik cevaba katılıp katılmadığını anlayabilmek için mRNA seviyesindeki gen ekspresyon analizi yardımcı bir yaklaşımdır [133-135]. Kalitatif (Var/Yok) analizler açılıp kapanarak (switch-on/off) prosese katılan genleri tespit ederken, kantitatif (Oransal Değişim) analizler proses esnasında, ekspresyon seviyelerindeki artış ya da azalış olan genlerin değişimleri hakkında bilgilendiricidir [136-138]. Bu ekspresyon seviyesinde; Northern Blot, Ribonuclease Protection Assay, Eş Zamanlı Geri-PZR (Real Time PCR), Geri-PZR yöntemlerinin sıklıkla kullanılmaktadır. Araştırılan genin farklı şartlar altındaki davranışını ve numunelerden ya da eşit olmayan yükleme gibi deneysel hatalardan kaynaklanan konsantrasyon farklılıklarını normalize etmek amacıyla kontrol genleri kullanılır [139]. Bu tür genlerin mRNA ve protein seviyesindeki ifadelerinde, organizmanın çevresinde gerçekleşebilecek değişikliklere bağlı bir değişim genellikle görülmez. Evci (Housekeeping) genler olarak bilinen bu genler arasında; aktin, tübülün, albumin, GAPDH ve rRNA genleri sıklıkla

kullanılmaktadır [140, 141]. *Tetrahymena* ile yapılan ekspresyon analizlerinde rRNA genleri kontrol geni olarak kullanılmaktadır [142, 143]. Dolayısıyla, bu çalışmada kontrol geni olarak 17s rRNA geni kullanılmıştır. Kontrol geni 17s rRNA'nın genomik gen kopya sayısının yüksek olması, RNA izolatlarının DNase muamelesi sonrası DNA kontaminasyonunun tekrar kontrolü için uygun bulunmuştur.

3.1.4. Sıcaklık Değişik Stresi Uygulanan Hücrelerden RNA İzolasyonu, DNase ile Muamele ve DNA Kontaminasyonu PZR Kontrol Analizi

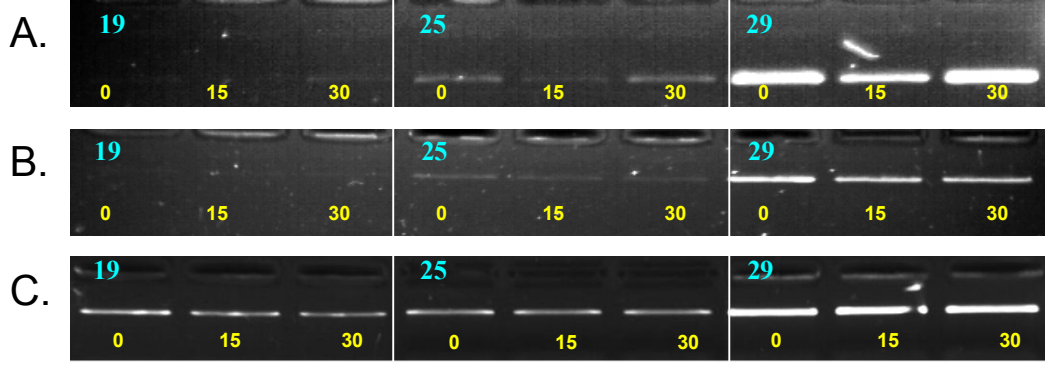
Geri-PZR reaksiyon sonuçlarını güvenilir kılabilmek için kullanılacak kalıp, DNA kontaminasyonu içermemelidir. Geri-PZR reaksiyonuna taşınabilecek gDNA kontaminasyonu, yapay pozitif sonuçlara sebep olacağından bulgunun analizini engeller. Dolayısıyla izole edilen RNA örneklerinde görülen genomik DNA kontaminantları (Şekil 3.3.a) DNase uygulaması ile uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3.b). DNase uygulaması gören RNA izolatları, Geri Transkripsiyon reaksiyonunda cDNA üretmek üzere kalıp olarak kullanılacağı için DNase uzaklaştırılmalıdır. Bunun için izolatlar RNA izolasyon kiti kullanılarak DNase enziminden arındırılmıştır. DNase muamelesinin başarısı, RNA izolatlarının direkt 17s rRNA primerleri ile PZR reaksiyonuna alınmasıyla test edilmiştir. Reaksiyon sonucunda bant oluşmaması genomik DNA kontaminasyonu olmadığını göstermektedir (Şekil 3.3.c).



Şekil 3.3: Örnek Bir Deneye Ait RNA'ların DNA Kontaminasyonundan Arındırılması: **A:** 0, 15 ve 30 dk. zamanlarına ait RNA izolatları ve genomik DNA kontaminasyonu, **B:** DNase uygulaması sonrası RNA izolatları (Sadece RNA bantlaşması), **C:** DNase uygulaması gören RNA izolatlarından 17s primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu sonuçları; **K:** Pozitif kontrol olarak genomik DNA'dan 17s primerleri ile yapılan PZR reaksiyon ürünü (~1400), **0, 15, 30 kuyuları:** Sıfır, onbeş ve otuzuncu dakikalarda alınan örneklerin 17s primerleri ile PZR sonuçları, **M:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Markır, Fermentas, %1'lik agaroz jel.

3.1.5. Sıcaklık ve Soğuk Stresi Uygulanmış Hücrelerin Farklı Zamanlarından Elde Edilen cDNA Popülasyonunun 17s rRNA Geni Kullanılarak Örnek Miktarlarının Eşitlenmesi.

Gece boyunca çalkalamalı etüvde deneye göre *T.thermophila* hücreleri 30°C veya 37°C’de inkübe edilmiştir. Hücreler sıcaklık değişikliği stresine alındıktan sonraki 15 ve 30’uncu dakikalarda alınan örneklerden toplam RNA izole edilmiştir. Geri Transkripsiyon yöntemi ile izole edilen toplam RNA’dan cDNA üretilmiş ve 17s rRNA primerleri ile PZR reaksiyonuna alınmıştır. DNA dizi analizi yöntemiyle doğruluğu teyit edilen 17s rRNA genleri (Ek.2) için sırasıyla 19, 25 ve 29’uncu döngülerde, PZR reaksiyonu tüplerinden alınan eşit hacimli örnekler, %1’lik agaroz jele eşit miktarlarda yüklenmiştir. Jel görüntüleme aparatı yardımıyla fotoğraflanan jellerdeki bantların yoğunluğu (Şekil 3.4) ImageJ programı ile değerlendirilmiştir [144]. Elde edilen yoğunluk değerleri, kullanılan kalıp cDNA miktarlarının birbirleriyle mukayesesinde kullanılmıştır. Aynı yoğunluktaki DNA bantları elde edilinceye kadar eşitleme deneyi tekrar edilmiştir. DNA miktarlarının eşitlendiği düşünülen kalıp miktarları kaydedilerek, takip eden Geri-PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır. Her sıcaklık stres testi için ayrı ayrı yapılan bu denemeler sonucunda sabit bir hacim değeri tespit edilmemiştir. Dolayısıyla her deney setinde kullanılan cDNA’nın hacmi değişiklik göstermektedir. cDNA miktarı örnekler arasında eşitleninceye kadar süren denemelerden birisi Şekil 3.4’de örnek olarak verilmiştir. Buradaki eşitleme süreci ardışık üç denemede gerçekleştirilmiştir (A, B ve C). Her aşamada 0, 15 ve 30’uncu dakikalara ait cDNA örneklerinden (1:10 seyreltik cDNA) eşit hacimde alınarak 17srRNA primerleri ile 29 döngülük Geri-PZR kurulmuştur. Reaksiyon esnasında 19, 25 ve 29’uncu döngülerden alınan örnekler sırasıyla jele yüklenmiş ve bant yoğunlukları tespit edilmiştir. Ölçülen yoğunluklar arasındaki farklara göre ters orantılı katlar halinde cDNA örneklerinin miktarları artırılmış ya da azaltılmış, böylelikle ikinci Geri-PZR tekrarına (B) geçilmiştir. Bu şekilde devam eden denemeler 17s RNA bantlarındaki yoğunluklar eşitleninceye kadar devam etmiş ve eşitlendikten sonra takip eden deneylerde tespit edilen cDNA miktarları kullanılmıştır.



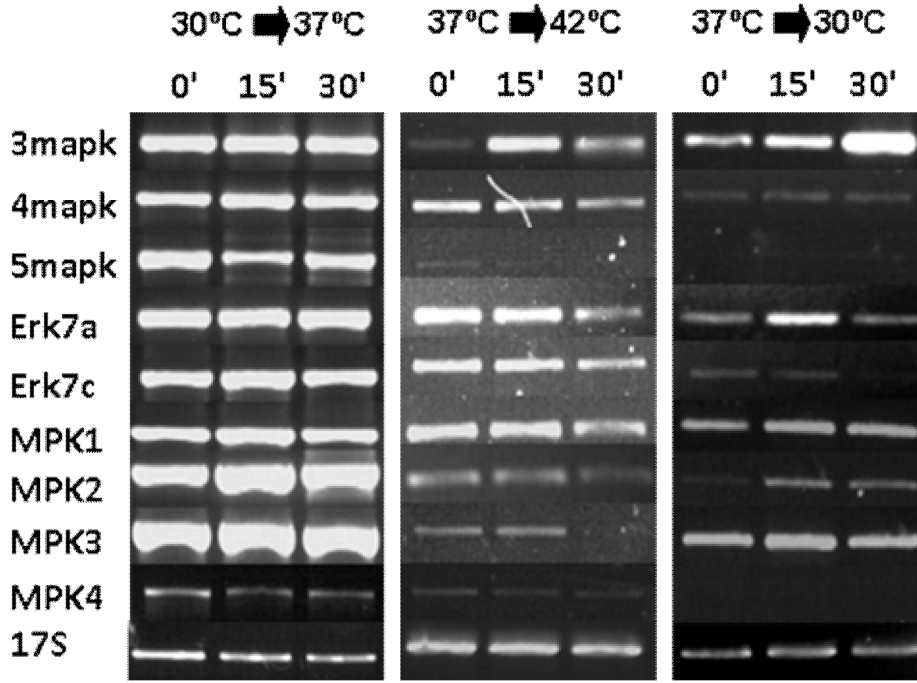
Şekil 3.4: PZR’de Kalıp Olarak Kullanılan cDNA miktarlarının 17s rRNA’ya Göre Eşitlenmesi Deneyi: A: Birinci deneme, B: İkinci deneme, C: Üçüncü deneme. 19, 25, 29: PZR döngü sayıları, 0, 15, 30: Dakika olarak örneklerin alındığı zamanlar.

3.1.6. Sıcaklık ve Soğuk Stresi Uygulanan Hücrelerin mRNA İfadelerinin MAPK Primerleri Kullanılarak Geri-PZR Analizi

Önceki bölümde miktarları belirlen kalıp cDNA hacimleri, bu bölümde PZR ile mRNA ifadesi analizinde kullanılmıştır. Sıcaklık değişikliklerinin analizi için üç farklı deney; $37^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$, $30^{\circ}\text{C} \rightarrow 42^{\circ}\text{C}$ ve $30^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında 1mapk ve 2mapk genleri dışında diğer genler beklenen büyüklüklerde elde edilmiştir. Bununla birlikte bazı streslerde, örneğin $37^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$ geçişinde MPK4’de olduğu gibi ürün oluşturmayan genler de olmuştur. Elde edilen ürünlerin spesifik olup olmadıklarının kesin olarak anlaşılabilmesi için beklenen büyüklükteki bantlar jelden kesilerek saflaştırılmış ve daha sonra dizi analizine tabi tutulmuştur. Dizi analizi sonuçları cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR reaksiyonlarından elde edilen bantların hedeflenen ürünler olduğu BLAST analizi ile doğrulanmıştır. Sonuçlar **Ek-2**’de sunulmuştur. Üç farklı sıcaklık stresine göre elde edilen bulgular aşağıda açıklanmıştır.

MAPK ailesi üyeleri için her üç sıcaklık değişikliği stresi için yapılan Geri-PZR reaksiyonlarında; 1mapk ve 2mapk haricinde tüm genlerin primerleri beklenen büyüklüklerde cDNA ürünleri oluşmuştur. Elde edilen ürünlere ait jel görüntüleri **Şekil.3.5**’de verilmiştir. Bu stres altında elde edilen bulgular MPK4 hariç tüm MAPK’ların mRNA ifadelerinin üç sıcaklık değişikliği stresinin 0, 15 ve 30 dakikalarda varlığını göstermektedir. Yalnız $37^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$ sıcaklık değişikliği PZR reaksiyonlarında MPK4’ait ürün oluşmamıştır. Fakat bu çalışma bulguları, mRNA ifadelerindeki zamana bağlı değişimlerin oransal bir ilişki olup

olmadığı hakkında (2 bağımsız tekrarlı deney olmasına karşılık) yeterli görülmemiştir

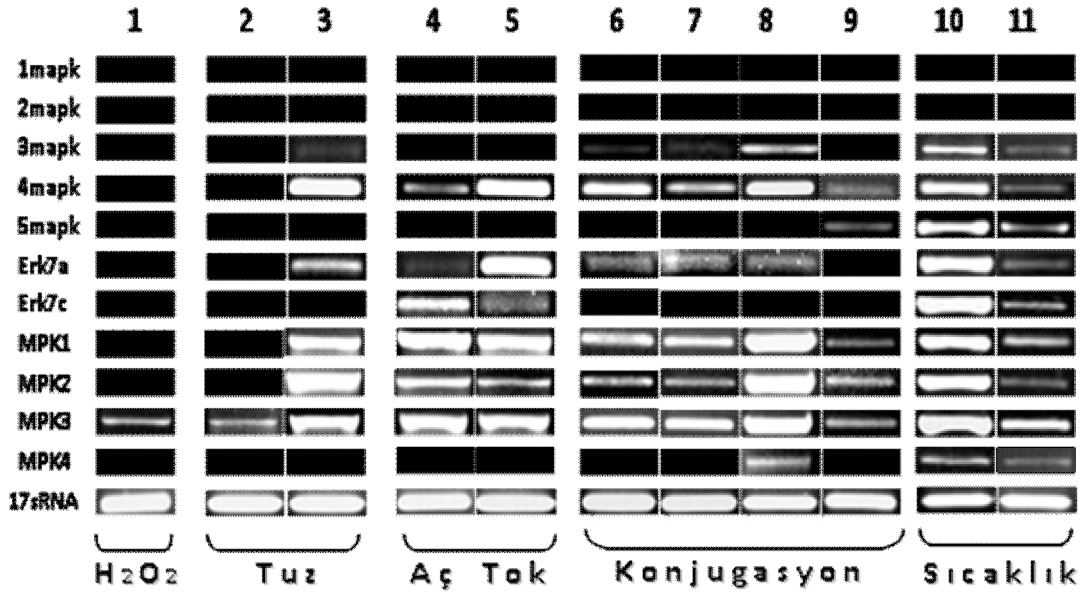


Şekil.3.5: *T.thermophila* MAPK enzim ailesi üyelerinin mRNA seviyelerine 30°C→37°C, 37°C→42°C, ve 37°C→30°C sıcaklık değişikliğinin etkisi. PZR reaksiyonlarında ürün oluşturan MAPK seti enzimleri ve evci kontrol geni 17sRNA'ya ait Geri-PZR reaksiyon ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri görülmektedir. Hiçbir sıcaklık değişikliği koşulunda ürün oluşturmayan 1mapk ve 2mapk genleri şekle dâhil edilmemiştir. 37°C→30°C sıcaklık değişikliği için yapılan PZR reaksiyonlarında herhangi bir ürün oluşturmayan MPK4 için şekilde karşılık gelen bölge karanlık bırakılmıştır.

Elde edilen bantlaşmalar gözle değerlendirildiğinde 30°C→42°C sıcaklık değişikliği durumunda test edilen genlerin büyük bir çoğunluğunda genel bir azalma olduğundan bahsedilebilir. Bunun aksine 37°C→30°C sıcaklık stresine karşı MAPK üyelerinin genelinde bir artış eğilimi olduğu gözlenmiştir. Genel olarak 37°C→30°C sıcaklık değişikliği örneklerinde ise ilk 15 dakika içerisinde kendisini belli eden ufak bir artış ve sonraki 15 dakika içinde bir miktar azalma olduğu görülmektedir. Ancak bu varsayımlar sadece gözle yapılan değerlendirmelere dayanmaktadır. Dolayısıyla MAPK üyelerinin test edilen sıcaklık değişimlerindeki davranışları hakkında kesin bir bilgiye ulaşmak ancak Real Time PCR yöntemi ile elde edilecek sonuçların değerlendirilmesiyle mümkün olabilecektir.

3.1.7. Çeşitli Şartlar Altında *T.thermophila* MAPK mRNA İfadelerinin Var/Yok Analizi

T.thermophila MAPK ailesini oluşturan 11 üye için tasarlanan primer setleri kullanılarak farklı biyolojik koşullar altındaki hücrelerden izole edilen toplam RNA'dan yapılan geri transkripsiyon reaksiyonları ile MAPK ailesi üyelerinin mRNA ifadesi olarak varlık gösterdiği biyoloji koşullar tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaç için hücreler sırasıyla; hidrojen peroksit stresi, 20 ve 100mM tuz stresi, 24 saatlik açlık stresine tabi tutulmuş ayrıca 24 saat açlığın ardından beslenme durumu, 30°C ve 37°C'lerde gelişim ve konjugasyonun 1,5 , 3, 8 ve 9'uncu saatlerine ait transkriptomda MAPK ailesi üyelerinin varlığı mRNA ifadesi bakımından en az iki bağımsız deney ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6'de görülmektedir. Deneylere ait sonuçların pozitif ve negatif olarak ifade edildiği grafik gösterim Şekil 3.7'da görülmektedir.



Şekil 3.6: *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin farklı stresler altında mRNA ifadelerinin analizi: Çeşitli biyolojik dırımalar ve streslere maruz kalan hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan geri transkripsiyon reaksiyonları ile elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PZR reaksiyon sonucu 11 MAPK ailesi üyesi için oluşan ürünlere ait bantlaşmalar görülmektedir. Ürünleşme olmayan reaksiyonlar için ilgili bölmeler siyah bırakılmıştır. Ürünleşmenin zayıf olduğu bazı bantları görünür kılabilmek amacıyla dijital olarak iyileştirme yapılmıştır. 1: H₂O₂ Stresi, 2: 20mM Tuz, 3:100mM Tuz, 4:Açlık, 5:30 dk beslenmiş hücreler, 6: Konjugasyon 1,5'uncu saati, 7: Konjugasyon 3'üncü saati, 8: Konjugasyon 8'inci saati, 9: Konjugasyon 9'uncu saati, 10: 30°C inkübasyon, 11: 37°C inkübasyon.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1mapk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2mapk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3mapk	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
4mapk	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5mapk	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Erk7a	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Erk7c	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
MPK1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPK2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPK3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPK4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
17sRNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Şekil 3.7: T.thermophila MAPK ailesi üyelerinin farklı stresler altında mRNA ifadeleri: Denenen koşullar altında ürün oluşumu gözlenen durumlar için (+), herhangi bir ürünleşme olmayan durumlar için (-) işareti kullanılmıştır. **1:** H₂O₂ Stresi, **2:** 20mM Tuz, **3:**100mM Tuz, **4:** Açlık, **5:** 30 dk beslenmiş hücreler, **6:** Konjugasyon 1,5'uncu saati, **7:** Konjugasyon 3'üncü saati, **8:** Konjugasyon 8'inci saati, **9:** Konjugasyon 9'uncu saati, **10:** 30°C inkübasyon, **11:** 37°C inkübasyon.

3.2. T.thermophila MPK4 Geni ile İlgili Biyoinformatik ve Deneysel Bulgular

T.thermophila SB210 genom projesi tamamlanmadan önce halka sunulan ön veriler kullanılarak MPK4 olarak isimlendirilen MAPK geni biyoinformatik analizleri ve deneysel bulguları takip eden bölümlerde sunulmuştur.

3.2.1. T.thermophila Genom Projesi Ön Sonuçlarına Göre MPK4 Geninin Genomik Dizisinin Bir Araya Getirilmesi Ve Biyoinformatik Analizi

Amerika Ulusal Bilim Kuruluşu (NSF) ve Ulusal Sağlık Enstitüsünce (NIH-NIGMS) desteklenen ve Genomik Araştırma Enstitüsü (TIGR) [27] tarafından yürütülen *T.thermophila* SB210 makronükleer genom projesi boyunca elde edilen dizi bilgileri belirli aralıklarla TIGR resmi web sitesi vasıtasıyla kullanıma açılmıştır. Genom projesi öncesi *T.thermophila* EST veri tabanından elde edilmiş olan bir MAPK EST dizi parçası (~340 bç), bulucu dizi olarak kullanılarak, 2003 yılında kullanıma açılan diziler arasında sorgulanmıştır. BLAST analizi ile elde edilen ilk benzer diziler, kromozom yürümesine benzer bir teknikte tekrar 5' ve 3' yönüne doğru bütünsel diziyi oluşturmak için ardışık BLAST analizleri ile hedef gen bölgesi genişletilmiştir. Her iki yönde de yapılan BLAST ilerlemesi ile toplamda yirminin üzerinde kısmi nükleotid dizisi elde edilmiştir. Elde edilen diziler, Gene Tool Lite 1.0 (BioTools Incorporated,

Advanced Bioinformatic Solutions) programının “Assembly Editor” alt programı yardımıyla varsayılan ayarlar kullanılarak yatay hizalanmıştır. Örtüşen bölgelerdeki benzerlik yüzdesi % 80’nin altında olan dizileri hizalama sonucunda oluşan konsensüs dizisine dahil etmeyen program, toplamda 14 diziyi örtüştürerek bir kontik oluşturmuştur. Elde edilen uzlaşım dizisinde benzeşmezliklerin olduğu problemlili noktaları kapsayan diziler referans alınarak, bu noktalarla örtüşen diğer diziler BLAST programı yardımıyla TIGR veri tabanında tekrar taranarak problemlili noktaları içeren dizi sayısı mümkün olduğunca artırılmıştır. Sonuç olarak, bu noktalarda bulunan gerçek baz dizisinin tespitinde, dizilerin önerdiği bazlar sayılmış ve sayıca çok olan baz doğru olarak kabul edilmiştir. Genellikle iki baz arasındaki sayımlar birsinin lehine herhangi bir şüpheye yer bırakmayacak şekilde yüksek çıkmıştır. Ancak sadece bir bölgede, 6 diziden 2’si problemlili pozisyonda A olmasını önerirken, geri kalan 4 dizi bu pozisyonda bir baz eksilmesi olabileceğini (delesyon) önermekteydi. Sayısal çoğunluğa göre altı diziden sadece ikisinde mevcut olan A bazının dizi analizi hatasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Bu durumu analiz etmek gayesiyle her iki dizi de (A içeren ve içemeyen) NCBI ORF finder programında sillerle ait kodon sözlüğü kullanılarak tüm okuma çerçeveleri (6 adet) ile aminoasit dizisine dönüştürülmüştür. Elde edilen aminoasit dizileri içerdikleri katalitik domainleri tespit etmek maksadıyla BLAST programıyla taranmış ve alternatif her iki dizinin de teorik olarak protein kinaz motifi içerdiği tespit edilmiştir. Adenin’in olduğu varsayılan dizinin oluşturduğu teorik protein 1593 aminoasiten oluşurken, Adenin içermeyen dizi ile oluşturulan protein dizisi 392 aminoasit içerdiği tespit edilmiştir. MAPK enzimlerinin çoğunun küçük bir amino ve karboksi terminal uç taşıdığı ve sahip oldukları protein kinaz domainlerinin yaklaşık olarak 300 amino asitten oluştuğu bilinmektedir [11]. 1593 aminoasitlik teorik proteinin katalitik bölgeden sonra gelen C terminal bölgesi bilinen MAPK’lere göre anormal sayılabilecek bir büyüklükte olduğu için 392 aminoasitlik peptidi oluşturan, yani Adenin içermeyen uzlaşma dizisinin, doğru olması bu veriyle daha yüksek bir olasılık kazanmıştır (**Şekil 3.8**).

(1593 aa)

(392 aa)

MSERTNMQKLMKQKSEKKEPHLKTNQNLQEKLL
EGEEKLTNQSRSGTIKHTLSCVFPQSSYQSFIKEII
LIEALVANHQKLSLGCQFQKQPRAAAFKTKIQPT
TNKIDYHGRKQKQFQQQTVIEKTKNTKEEDHQKFL
BAEKFPQLKFIQTVKIIERMSSNEEIEPHILMKF
EIIQKLCNGRYGIVWKAFCFKSKQIVALKVDFDAF
HNATDAQRTFREVHFLQELNGHENIIRLINIKA
NNKDLVMVDFMETHAVIPANILEEIHKQYVVY
QILKAMKYIHSGLIHRDLKPSNILLNSECLVFLA
DEGLARSAVATDDDDNPVRYEVATRMVRAPEILL
GSTKYAKAVDMWSIGCIVGELITNRAIFPGNSTLNQIEKVL
ELTGKPTQEDIESLESQAWNISSINVO
KKT F HQMPPGASEEAIDLKLLCFNPKNRLTVE
QALEHPYVKDFHCPPEEIVCGRVIPI SHMDMKFS
IKEYREALYNQIYQEKRIKQQNRDIYKQQQQIT
TTGNGQVSQAGQSSQPVSQQIPSSSQSTQSSVTQ
QQQQQQQEKSKNQYQSSSSQQQAQQYQQQQSLQ
QQQVPQRSSQSSQPSQSSIQNQKQYQSSQQQ
QRYFDQEKQYKPMNAQQQYLQQQQQLQQQALQQ
QHQSRYNSQNFNSQVQVQCGNSQSTSQGNNYSG
YKSGSQASTTNASSAQAQYDDKVLHNSNQIQ
NKNSSQVYTQSQGANQASSNTQQQYLPSSNTIY
GQCVTNSIANSNLYNQAQLNGSKQSSSLGHTQN
KYSSTQAYQQAQPSKYTNQTONAQKYVIBNNNSIC
QLGCSQNNIGCSQTNQNHYAAQYLOQHMQQQQ
QQQQVQQPOTKYCVTYHHCHSQSSGSSNTFAQYQ
HYQQQQQRTTGV TANHQRP SNNAQKVHKVEQKI

MSSNEEIEPHILRKFEEIQKLCNGRYGIVWKAFC
CKKSKQIVALKVDFDAFHNATDAQRTFREVHFL
QELNGHENIIRLINIKAENNKDLVMVDFMETH
DLHAVIPANILEEIHKQYVVYQILKAMKYIHS
ELIHRDLKPSNILLNSECLVFLADEGLARSAV
ATDDDDNPVRYEVATRMVRAPEILLGSTKYAKA
VDMWSIGCIVGELITNRAIFPGNSTLNQIEKVL
ELTGKPTQEDIESLESQAWNISSINVOKKT
F HQMPPGASEEAIDLKLLCFNPKNRLTVEQA
LEHPYVKDFHCPPEEIVCGRVIPI SHMDMKFS
IKEYREALYNQIYQEKRIKQQNRDIYKQQQQ
ITTTGNGQVSQAGQSSQPVS SHKLYPLNLLNLH
L

Şekil 3.8: MPK4'e ait iki farklı gen kaydına ait aminoasit dizilerinin karşılaştırılması: Bütünsel dizilerin oluşturulmasında kullanılan parçalar; TYBHX95TR, TXAQ657TF, TYBMQ28TF, TXDGY89TR, TYATI43TR, TYBNP66TR, TYAYA79TR, TYAJS60TR, TYBIW11TF, TYAFP58TR, TYCC52TF, TYASH30TF, TXBAM32TF, TYAYP33TF'dir. Aminoasit dizilerinin MAPK'lara özel domainleri kırmızı renkle işaret edilmiştir. Kinaz domainini dışında kalan diziler altı çizili olarak vurgulanmıştır.

Sonuç olarak TIGR'dan elde edilen diziler ile oluşturulan 1194 bç'lik uzlaşma dizisi NCBI gen bankasına "olası cDNA dizisi" olarak teslim edilmiş ve AY560586 erişim numarası ile 16 Nisan 2004'de veri tabanına kayıt edilmiştir. Ancak 2006 yılında tamamlanan *T.thermophila* SB210 makronükleer genom projesi ile ortaya çıkan bütünsel makronükleer genom dizisi MPK4 geninde olmadığını düşündüğümüz adenin bazının var olduğunu önermektedir. Bu durumum açıklığa kavuşması ancak, MPK4 geni mRNA'sına ait büyüklüğün Northern Blot'la tespit edilmesiyle mümkündür.

3.2.2. *T.thermophila* MPK4 Kinaz Domaini Motif Analizi

Kristalografik yapısı bilinen MAP kinazlar ile MPK4'ün kinaz domain'inin kıyaslaması yapıldığında büyük oranda önemli benzerliklerle birlikte bazı farklılıklar da gözlenmiştir. MPK4'ün kinaz domaininde yer alan onbir alt bölgeye ait motif dizisinin tespit edildiği bu analizde (Şekil 3.9), α -heliks bölgeleri gri, β şeritler ise siyah renk ile vurgulanmıştır. Buna göre;

Alt-bölge I (Phe¹⁷⁵-Gln¹⁹⁹): [FEIIQKLGKGYGI[VWKAFCCKSK]

MPK4 kinaz domainin NH₂ terminalinde Gly¹⁸² ile başlayıp Val¹⁸⁹ ile son bulan ve GXGXXGXV motifini içeren alt-bölge I'in başlangıç noktası, konsensüsdeki ilk Gly'den 7 aminoasit önceki Phe¹⁷⁵'dir. Burada genellikle hidrofobik bir aminoasit bulunduğu bilinmektedir ve Phe¹⁷⁵ buna uygun bir aminoasittir. Alt-bölge I tarif edildiği gibi β1 ve β2 şeritlerini içermektedir.

Alt-bölge II (Gln¹⁹⁹-Asn²¹²): [KQIVALKKVFDAFHN]

Alt-bölge II β3 şeridini içermektedir ve bu şerit içinde AXK motifi olduğu görülmektedir. (Ala²⁰² Leu²⁰³ Lys²⁰⁴). Genelde β3 şeridini hemen α-heliks-B takip eder ancak Cdk2 ve ERK2'de olduğu gibi MPK4'de de bu α-heliks bulunmamaktadır.

Alt-bölge III (Asn²¹²- Ile²³⁹): [ATDAQRTFREVMFLQELNGHENIIRLI]

Alt-bölge III büyük bir heliks olan Ala²¹³ ile Glu²²⁸ arasındaki bölgeyi oluşturan α-heliks-C ile başlamakta ve öncekiler gibi küçük lobun içinde yer almaktadır. Heliksin merkezi bir noktasında bulunan Glu²²²; AXK motifindeki Lys²⁰⁴ ile ATP'nin α ve β fosfatlarını stabilize etmede yardımcı rol oynuyor olabilir.

Alt-bölge IV (Asn²⁴⁰ - Asp²⁴⁹): [NIIKAENNKD]

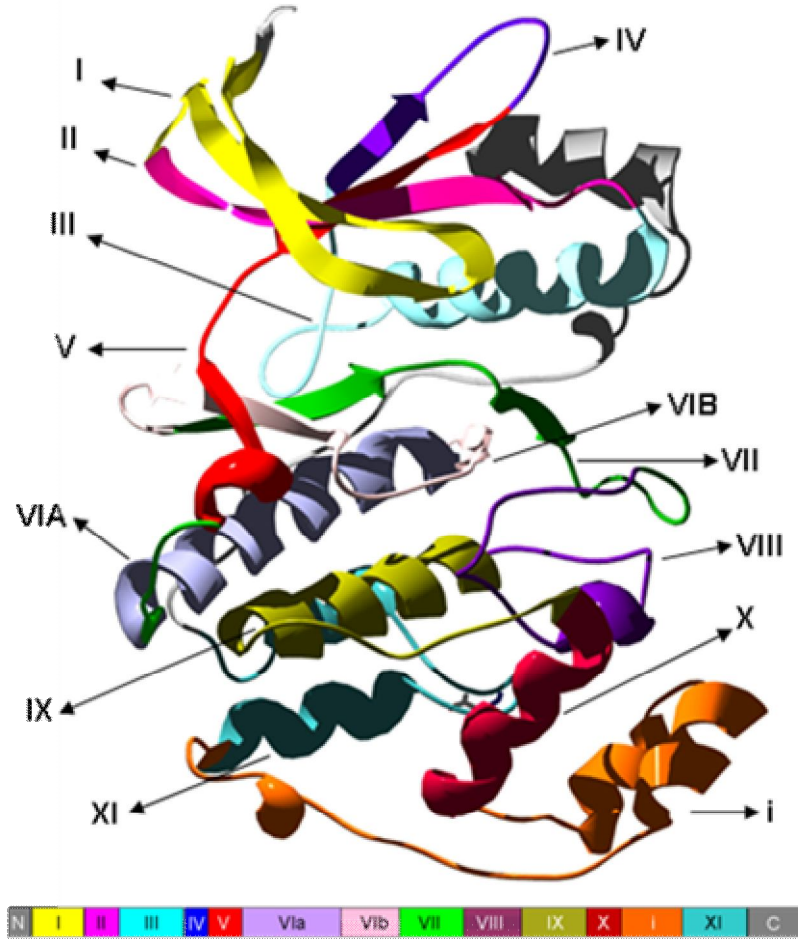
Alt-bölge IV; Asn²⁴⁰ ile Ile²⁴²'nin oluşturduğu dördüncü β şeridi küçük lobda yer almakta ve hidrofobik bir karakter göstermektedir. Bu bölgenin herhangi bir katalize ya da substrat tanıma reaksiyonuna doğrudan katıldığına dair bir bilgi yoktur.

Alt-bölge-V (Leu²⁵⁰- Ile²⁶⁵): [LYMVFDLHAFVI]

Küçük ve büyük lobları birbirine bağlayan alt-bölge-V, Leu²⁵⁰ ile başlayıp Phe²⁵⁴ ile sonlanan tamamen hidrofobik β-şerit 5 (L²⁵⁰YMF²⁵⁴), 4 aminoasidin oluşturduğu bir zincir ve son olarak His²⁶² - Ile²⁶⁵ arasındaki α-heliks D'den oluşmaktadır.

Alt-bölge VIA(Glu²⁷²- Ser²⁹¹): [EIHKQYVVYQILKAMKYIHS]

Büyük ve hidrofobik özellikli Glu²⁷² ile Ser²⁹¹ arasında büyük loba doğru uzanan



Şekil 3.9: *T.thermophila* MPK4 proteini üç boyutlu modellemesi: MPK4'ün üç boyutlu modellemesinde kalıp olarak fosforillenmiş MAPK Erk2 (pdb kodu:2erkA) kullanılmıştır, MPK4 modellemesi; Erk2'nin 173 ile 501'inci aminoasitleri arasındaki kısmıyla gerçekleşen % 41.867'lik örtüşmeye göre oluşturulmuştur. Katalitik bölgeyi oluşturan alt bölgeler farklı renklerle renklendirilmiş ve roma rakamları ile ilgili bölgeler işaret edilmiştir. X ve XI'inci bölgeler arasındaki insersiyon (i) ile işaret edilmiştir.

α -heliks E'yi içermektedir. α -heliks E'yi oluşturan aminoasitlerin hiç birisinin direkt olarak Mg^{+2} , ATP ya da peptit substratı ile ilişkisi olmadığı dolayısıyla da destek yapısı olarak görev yaptığı düşünülmektedir.

Alt-bölge VIB (Gly²⁹² - Cys³¹⁰): [GELIH]RDLKPSNILLNSEC]

Bu alt bölge; hidrofobik nitelikli β -şerit 6 (Glu²⁹³-His²⁹⁶) , bir loop ve β -şerit 7'den (Asn³⁰³-Asn³⁰⁷) oluşmuştur. Loop HRDLKXXN imza dizisini içermekte olup MPK4'de (²⁹⁶HRDLKPSN³⁰³) şeklindedir. “Katalitik Loop” olarak bilinen bu loop'ta bulunan Asp²⁹⁸'in, fosfotransfer mekanizmasında, substrattan atak yapan hidroksil gurubunun protonunu kabul eden katalitik taban olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Asp²⁹⁸'i takip eden Lys³⁰⁰'in ise transfer esnasında γ fosfatın negatif yükünü nötralize ettiği düşünülmektedir. Klasik protein-tirozin kinazlarda bu aminoasit Arg'dir. Motifin sonundaki Asn³⁰⁷'in yan zincirleri,

Asp²⁹⁸,ın karbonil gurubuyla hidrojen bağı oluşumu esnasında katalitik loop'un stabilizasyonu sağladığı ve ATP'nin α ve γ fosfatları ile köprü kuran ikincil Mg⁺² iyonu ile şelat yaptığı düşünülmektedir.

Alt-bölge VII (Leu³¹¹ – Val³³³): [LVKLA^{DFGL}ARSVAVTDDDDNPV]

PKA α 'da β -şerit/loop/ β -şerit olarak katlanma yapan bu bölge Cdk2'nin inaktif formundaki kristalografik yapısında β -şerit/loop/ α -heliks olarak katlanmıştır MPK4'de de tıpkı PKA α 'da olduğu gibi β -şerit/loop/ β -şerit katlanması olduğu görülmektedir. Leu³¹¹-Leu³⁴⁹ arasında uzanan bu bölgenin içerdiği loop'da yüksek derecede korunmuşluk gösteren DFG üçlüsü yer almaktadır (Asp³¹⁶ Phe³¹⁷ Gly³¹⁸) ve bu loop Asp³¹⁶ ile Gly³¹⁸ arasında oluşan hidrojen bağı tarafından stabilize edilmektedir..

Alt-bölge VIII (Arg³³⁴ - Lys³⁵⁷): [RTEYVATRWRAP^{EILL}GSTKYAK]

Peptit substratların tanınmasında en önemli rolü oynayan bölgedir. Bu alt bölgede bulunan ve yüksek korunmuşluk gösteren diğer motif ise APE motifidir (Ala³⁴⁵ Pro³⁴⁶ Glu³⁴⁷) . Bu motifin 7-10 aminoasit yukarısında farklı protein kinaz aileleri arasında iyi derecede korunmuşluk göstermektedir. MPK4 proteinin bu bölgesinde TEY fosforilasyon motifi bulunmaktadır

Alt-bölge IX (Arg³⁵⁸-Ser³⁸²): [AVDMWSIGCIVGELITNRAIFPGNS]

Büyük lobda yer alan α -heliks-F bu bölgeyi oluşturur. Neredeyse değişmez olan Asp³⁶⁰ α -heliks-F'nin NH₂ ucu kısmında yer almaktadır. Asp³⁶⁰ Katalitik lopun stabilizasyonuna katılır. PKA-C α 'ya göre düşünülecek olursa Arg³⁷⁵-Phe³⁷⁸ arası aminoasitler inhibitör peptitlerle hidrofobik etkileşimler içine girmektedir.

Alt-bölge X (Thr383-Thr394): [TLNQIEKVLELT]

Korunmuşluğu en az olan bölge olup fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. α -heliks-G bu bölgede yer almaktadır ve bu heliks büyük lobun tabanını meydana getirir. CMGC gurubu protein kinazlar alt-bölge X ile XI arasında büyük insertler taşırlar ve MPK4'de de Gly³⁹⁵-Ser⁴³³ arasında yer alan 38 aminoasitlik bir insert vardır.

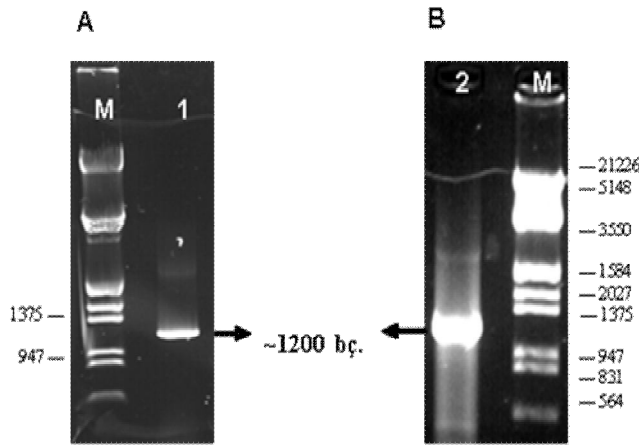
Alt-bölge XI (Glu⁴³⁴ Val⁴⁶³): [EEAIDLKLLCFNPKNRLTVEQALEHPYV]

Alt bölge XI, kinaz bölgesinin COOH ucu sınırına kadar uzanmaktadır. Bu bölgede bulunan neredeyse değişmez Arg aminoasidi MPK4'de Arg⁴⁵¹'e denk gelmektedir ve bu aminoasit α -heliks H ve α -heliks I arasında yer almaktadır. Bu bölgenin COOH ucu sınırı tam olarak tarif edilememekle birlikte, birçok proteinlerin kinazda, Arg'den 9-13 aminoasit sonra His-X-Aromatik-Hidrofobik uzlaşma dizisi bulunmaktadır. MPK4'de Arg⁴⁵¹'den 9 aminoasit sonra His-Pro-Tyr-Val dizisi bu motife uyumluluk göstermektedir. Protein-tirozin kinazlarda Arg'den 10 aminoasit sonra yer alan hidrofobik aminoasit bu bölgenin COOH ucu sınırını oluşturmaktadır. MPK4'de bu Pro⁴⁶¹'e denk gelmektedir ancak Pro hidrofobik değildir. Genel olarak değerlendirildiğinde MPK4, β 3 şeridini içeren Alt Bölge II'de β 3 şeridini hemen α -heliks B'nin takip etmemesiyle Cdk2 ve ERK2'ye (ERK ailesine) benzerlik göstermektedir. β 6 ve β 9-şeritlerinin bulunmaması ile de p38 protein kinazlarına benzerlik göstermektedir. Çünkü β 6 ve β 9 bir tek p38'lerde yoktur. Ayrıca Alt-bölge VII'de PKA α 'da olduğu gibi β -şerit/loop/ β -şerit katlanması olduğu görülmüştür. Bunlara ilave olarak alt bölgeler X ile XI arasında büyük insertler taşımalarıyla diğerlerinden ayrılan MAPK'lere özgü bu uzun insert MPK4'de de 38 aminoasitlik bir insert ile kendisini göstermektedir.

3.2.3. PZR Reaksiyonu ile MPK4'ün Genomik DNA ve cDNA Kopyasının Üretilmesi:

Yapılan biyoinformatik analizler MPK4 geninin klasik bir MAPK geninin sahip olması gereken tüm özellikleri barındırdığını göstermiştir. MPK4 geninin deneysel olarak karakterizasyonu için gerekli olan intron-ekson bilgisi gibi sonraki deneysel girişimler için gerekli bilgilerin elde edilmesi MPK4 geninin öncelikli olarak klonlanmasını gerekli kılmıştır. Bunun için öncelikli olarak MPK4 geni Genomik DNA'dan ve cDNA'dan çoğaltılarak restriksiyon analizleri ile elde edilen biyoinformatik bilgi ile uyumu analiz edilmiştir. MPK4 geni; "başla" ve "dur" kodonları dâhil arada kalan tüm bölgeyi içerecek şekilde çoğaltılması planlanmış ve primerlere MPK4 geninin rekombinant protein üretimi için aktarılacağı ekspresyon plazmiti pGEX'e uygun kesim enzimleri tanıma bölgeleri de ilave edilmiştir. Genomik DNA'dan PZR reaksiyonu için kaynak DNA olarak *T. thermophila* SB210 nesli makronukleus genomik DNA'sı

kullanılmıştır. Materyal ve yöntemler kısmında tarif edildiği şekilde kurulan PZR reaksiyonu sonucunda beklenen büyüklüğe uygun bir bant elde edilmiştir (**Şekil 3.10.B**). MPK4 geninin intron içerip içermediğinin anlaşılması için *T. thermophila* SB210 hücrelerinden TRI Reagent ile izole edilen RNA öncelikle DNase muamelesinden geçirilmiş daha sonra da Geri-PZR reaksiyonu ile aynı primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır. Oluşan ürün, intron içermediğini düşündüğümüz için genomik DNA'dan elde edilen ürünle aynı büyüklükte olması beklenen büyüklükte bir bant oluşturmuştur (**Şekil 3.10.A**).



Şekil 3.10: *T.thermophila* MPK4 geninin makronükleer genomik DNA ve cDNA'dan F4EcoRI ve R4SalI primerleri kullanılarak üretilmesi: PZR reaksiyonları %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. M olarak işaretlenen kuyucuklarda Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker kullanılmıştır. **A.:** cDNA kullanılarak elde edilen ürün 1 numaralı kuyucukta görülmektedir. **B.** Genomik DNA'dan yapılan PZR reaksiyonu sonucu 2 numaralı kuyucukta görülmektedir.

Makronükleer ve cDNA'dan PZR reaksiyonları ile elde edilen bantlar büyüklükleri bakımından eşit görülmektedirler. Bu da MPK4 geninin intron içermediğini gösteren ön biyoinformatik bulguları desteklemektedir.

3.2.4. PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4'ün cDNA Kopyasının Direk DNA Dizileme Yöntemi ile Analizi

cDNA'dan çoğaltılan MPK4 genin kesin olarak teyit edilebilmesi için dizi analizi ile doğrulanması gerekliliği sebebiyle, klonlama yapılmadan önce direkt olarak dizi analizine alınmıştır. Yapılan dizi analiz sonucu elde edilen 378 bp'lik DNA dizisi aşağıdaki gibidir:

```
GTGTTGTA AACTGATACCTGTCGTGCAGCTTGTAATGGCCATGCTAATATGCGCTGCCTATAATATGGCGAAT
GGCTTGIGTTAAATTATGGCTGAATTTAGGAGCTTGGCCCGTTCCGTTGCATGTTACCGATGATGATGACAA
ATCGCTGTCAAGAAACAGAAGTATGTTGGCTACTCGTTGGTATCGTGCCCTGAAATCTTAATTAATGTAGTA
CTATAATATGCTAAGTGCTGTTGATATGTGGATGCATCGTGCTGCATAAGTAGTGAATAACTTATAAGCTATC
TGAGTCTATTCTTTCCCTGTGTTAATCCCTCTCTCTTTCATTATTGATTTTGTITTAAGTAAATATAGACTGGT
TATTACCCCTC
```

Dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisi, hedeflenen gen MPK4 olup olmadığını araştırmak için NCBI GenBankası web sayfasında bulunan BLASTx programı kullanılarak analiz edilmiş ve pozitif sonuç alınmıştır. **Şekil.3.11**'de yapılan analize ait sonuç görülmektedir.

```
>gb|AY560586.1| Tetrahymena thermophila mitogen activated protein kinase 4 gene,
complete cds; macronuclear
Length=1899

Score = 265 bits (143), Expect = 1e-67
Identities = 268/319 (84%), Gaps = 45/319 (14%)
Strand=Plus/Plus

Query 9      AACTGATACCTGTCGTGCAGCTTGAATGGCCATGCTAATATGCGCTGCCTATAATATGG 68
          ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 797     AACTGAT-CC-ATCGTG-A-CTTG-AA--GCCAT-CTAATAT-C-CT-CCTA-AATA--G 842

Query 69     CGAATGGCTTGTGTTAAATTATGGCTGAATTTTAGGAGCTTGGCCCGTTCGGTTGCATGT 128
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 843     CGAAT-GCTTG-GTTAAATTA--GCTG-ATTTT-GGA-CTT-GCCCGTTCGGTTGCA-GT 893

Query 129    TACCGATGATGATGACAAATCGCTGTCAAGAAACAGAAAGTATGTTGGCTACTCGTTGGTA 188
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 894     TACCGATGATGATGAC-AATC-CTGTC-AG-AACAG-AGTATGTT-GCTACTCGTTGGTA 947

Query 189    TCGTGCCCTGAAATCTTAATTAATGTAGTACTATAATATGCTAAGTGTGTTGATATGT 248
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 948     TCGTGCCCTGAAATCTTA-TTAG-GTAGTACTA-AATATGCTAAG-GCTGTTGATATGT 1003

Query 249    GGATGCATCGTGCTGCATAAGTAGTGAATAACTTATAAGCTATCTGAGTCTATTCTTTCC 308
          ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1004    GGA-GCATCG-GCTGCATA-GTAG-GAG-AACTTATAA-CTAACAGAG-CTAT-CIT-CC 1054

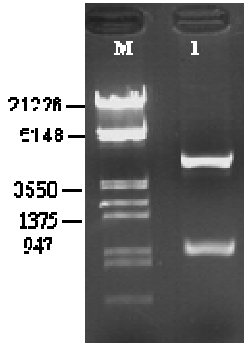
Query 309    CTGTGTTAATTCC-CTCTC 326
          || || ||||| |||||
Sbjct 1055    CAG-GT-AATTCCACTCTC 1071
```

Şekil.3.11: MPK4 geni Dizi Analizi BLAST Sonucu: Dizi analizi ile elde edilen dizi bilgisinin BLAST analizi ile elde edilen sonucu. Analiz sonucunda ilk sırada gen bankasına teslim edilen AY560586 MPK4 geni olmuştur.

Böylelikle araştırmada kullanılan DNA dizisinin, PZR ürününün hedef gen olduğunu doğrulamaktadır.

3.2.5. Geri-PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4'ün cDNA Kopyasının pGEM T-Easy Plazmitine Klonlanması

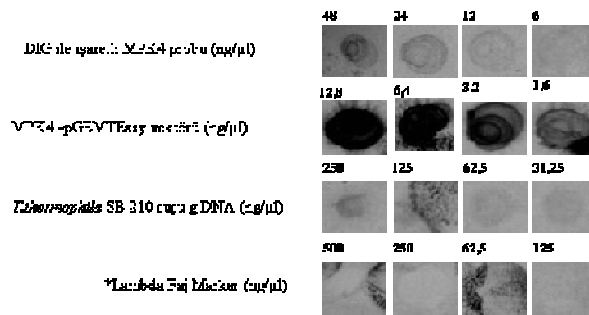
F4EcoRI ve R4Sall primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Geri-PZRreaksiyon sonucu elde edilen ~1200 bç'lik ürün, gerekli doğrulamalar yapıldıktan sonra TA klonlama tekniği ile pGEM T-Easy plazmitine aktarılmış ve plazmit XL1-Blue konakçı hücrelerine aktararak klonlanması sağlanmıştır. Elde edilen plazmitlerden yapılan restriksiyon kesim analizi ile klonların ~1200 bç'lik ürün taşıdığı görülmüştür **Şekil.3.12**.



Şekil 3.12: MPK4'ün cDNA Kopyasının pGEM T-Easy Plazmitine Klonlanması: Klonlama işlemi sonucunda elde edilen beyaz kolonilerden birisinden izole edilen plazmitlerin EcoRI enzimi ile kesiminden sonra salınan ~1200 bp'lik MPK4 geni. **M:** Marker Lamda DNA EcoRI/HinIII, **1:** EcoRI ile kesilmiş pGEM T-Easy plazmiti.

3.2.6. PZR Reaksiyonu ile Üretilen MPK4 cDNA'sı Kullanılarak Southern Blot Yöntemiyle Genom Analizi

Genomdaki varlığını teyit etmek ve eğer varsa kopyalarının sayısını belirleyebilmek için, klonlanması tamamlanan ~1200 bp'lik MPK4 geni jelden saflaştırılarak radyoaktif olmayan DIG DNA labelling kit ile protokolde tarif edildiği şekilde işaretlenmiş ve bulucu DNA (prob) haline getirilmiştir.

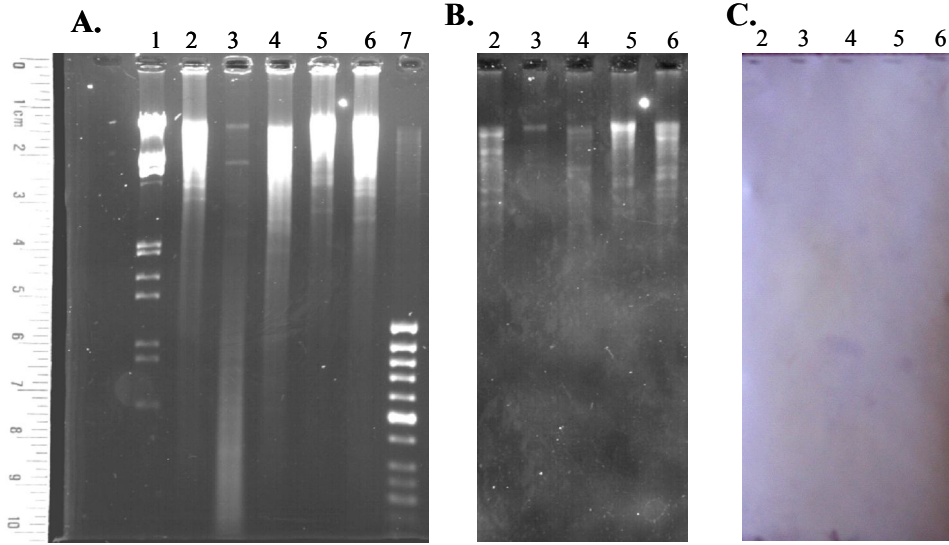


Şekil.3.13: Southern Blot Problema etkinliğinin test edilmesi. Test için 3 örnek ve bir negatif kontrol (Marker) yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru 1/2 seri dilüsyon şeklinde soldan sağa dört damla halinde pozitif yüklü membrana damlatılmıştır (*). **Lambda Faj Marker:** LambdaDNA/EcoRI+HindIII Marker, Deneysel aşamada oluşan ve ekipman

ile parmak izlerinin yarattığı görüntü kirliliğini uzaklaştırmak maksarıyla membran fotoğrafı şeklindeki gibi sadece damlacıkları içerecek şekilde parçalara ayrılmıştır. Fotoğrafta herhangi bir dijital iyileştirme işlemi yapılmamıştır.

Problema etkinliğinin tayini için asıl deneyden önce membran üzerinde damlatılan gDNA, MPK4 pozitif klondan gelen pGEM T-Easy plazmiti ve negatif kontrol olarak Lamda DNA EcoRI/HindIII kullanılarak ile öncül deneme yapılmış ve sonuç olarak MPK4 cDNA'sının etkin bir şekilde problandığı görülmüştür (Şekil.3.13). Problema işleminin başarılı olduğuna kanaat getirildikten sonra MPK4 genini içeriden kesmeyen EcoRI, HindIII, SmaI ve XhoI ile; içeriden 3 kez kesen DraI kesim enzimleriyle genomik DNA gece boyunca kesime uğratılmış ve %0,7'lik jelde gece boyunca 30 V'da koşturulduktan sonra kesim reaksiyonunun kalitesi resmedilmiş ve biraz daha uzun inkübasyona ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 3.14.A). Agaroz jeldeki DNA için denatürasyon ve

nötralizasyon adımları gerçekleştirildikten sonra klasik southern blotlama düzeneği kurularak fragmentler pozitif yüklü naylon membrana 1 gece boyunca



Şekil 3.14.: *T.thermophila* MPK4 geninin southern blot yöntemiyle genom analizi **A.** Genom DNA'sının çeşitli enzimler ile kesimlerinin agaroz jel görüntüsü, **B.** Southern blotlama işleminden sonra jelde kalan transfer edilemeyen DNA miktarı, **C.** Problemadan sonra elde edilen başarısız southern sonucu, 1: Lamda DNA EcoRI/BamHI markırı (Fermentas), 2: EcoRI kesimi, 3: HindIII kesimi, 4:DraI kesimi, 5: SmaI kesimi, 6: XhoI kesimi, 7: 50 kb markırı (Fermentas).

aktarılmış ve sonra transferin gerçekleştiği jelin tekrar etidium bromid boyamasıyla kontrol edilmiştir. Ancak blotlama sonucu küçük DNA parçalarının tamamıyla transfer olduğunun görülmesine karşılık büyük DNA parçaların bir kısmının transfer olmadığı gözlenmiştir (Şekil.3.14.B.). Bu da transfer etkinliğinin zayıf olması nedeniyle deneyin çalışmamış olabileceğini düşündüren bir bulgu olarak değerlendirilmiş ve pozitif yüklü membranlarda transfer etkinliğini artıracak bir iyileştirme olabileceği düşünülen alkali transfer yöntemi Turbo Blotter kullanılarak denenmiş ancak yine pozitif bir sonuç elde edilememiştir. 2-10 µg arasında değişen farklı DNA miktarının kullanılması, farklı yöntemlerle izole edilen genomik DNA'nın denenmesi ve membran transferi sonunda membranın UV ile fiske edilmesi gibi değişiklikler de deneyin sonucunu değiştirmemiştir.

3.2.7. MPK4 cDNA'sının 3' ve 5' Protein Kodlamayan Uç Bölgelerinin RACE Yöntemi İle Belirlenmesi

MPK4 geninin mRNA ifadesinin 3' ve 5' yönlerindeki sınırlarının belirlenmesi; genin mRNA ifadesinin sınırları hakkında bilgi vermesi ve MPK4 geninin gerçek büyüklüğünün tespit edilmesi bakımından önemli görülerek

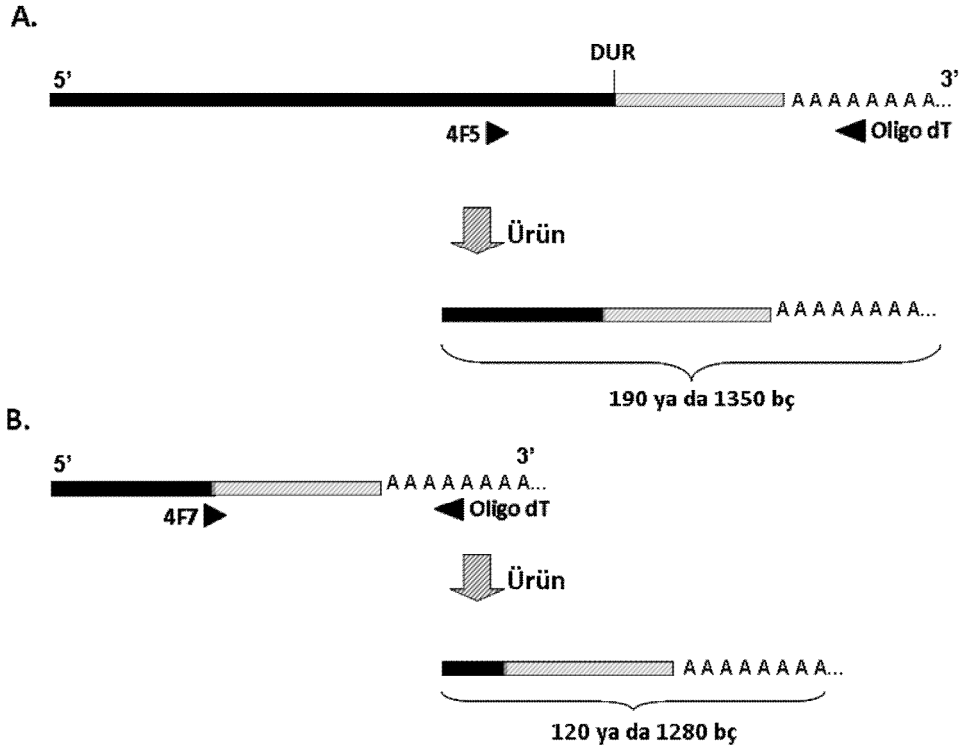
deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kalıp olarak toplam RNA'dan Geri Transkripsiyon reaksiyonu yoluyla OligodT primerleri kullanılarak elde edilen cDNA havuzu kullanılmıştır. 5' RACE reaksiyonlarında ise elde edilen cDNA'ların 5' kısımlarına C eklemesi yapılan ürünler kalıp olarak kullanılmıştır.

3'RACE Deneyleri: Kalıp olarak OligodT ile oluşturulmuş cDNA havuzunun kullanıldığı 3'RACE reaksiyonlarında, MPK4 geninin nokta mutasyonu için tasarlanan primer setinden 3' ucuna en yakın olan iki tanesi (4F5 ve 4F7) ileri primerler olarak kullanılmıştır. Geri primer olarak ise mRNA'nın poli A kuyruğuna bağlanacak olan Oligo dT primeri kullanılmıştır. İki aşamada gerçekleştirilen 3'RACE reaksiyonunda ilk olarak iki primerden 3' ucuna daha uzak olan 4F5 primeri ile OligodT primeri birlikte kullanılarak bir PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise, ilk aşamının sonunda elde edilen PZR reaksiyon ürünü kalıp olarak kullanılarak 4F7 ve OligodT primerleri ile yeni bir PZR reaksiyonu yapılmıştır. **Şekil 3.15**'de özetlenen 3'RACE stratejisinde de görüldüğü gibi 4F5 ve 4F7 ileri primerleri kullanılarak elde edilebilecek muhtemel ürün büyüklükleri geri primer olarak kullanılan Oligo dT'nin oturacağı 3' bölgesindeki pozisyona bağlı olarak değişmektedir. Ancak, 3' ucunun sonlandığı noktanın "dur" kodonundan 30-35 bç mesafe uzaklıkta olabileceği düşünülerek yapılan bir hesaplama ile 4F5'in ileri primer olarak kullanılacağı bir reaksiyonda MPK4 geni için en az 190 ya da 1350 bç lik bir ürün beklenmiştir. İki farklı büyüklükte ürün beklenmesinin sebebi ise MPK4 geni ile ilgili olarak gen bankasında bulunan iki farklı kayıttan ileri gelmektedir.

İkinci aşamada kurulan PZR reaksiyonunda geri primer olarak yine OligodT kullanılırken ileri primer olarak 3' ucuna daha yakın olan 4F7 primeri kullanılmıştır. Bu sayede bir önceki PZR reaksiyonunda kullanılan 4F5-Oligo dT primer seti ile oluşmuş olan spesifik olmayan ürünleşmeler PZR ortamında çoğalma şansı bulamaz ve dolayısıyla da oluşan ürünler daha spesifik olurlar. Böylelikle beklenen ürünler en az 120 ya da 1280 bç olmalıdır

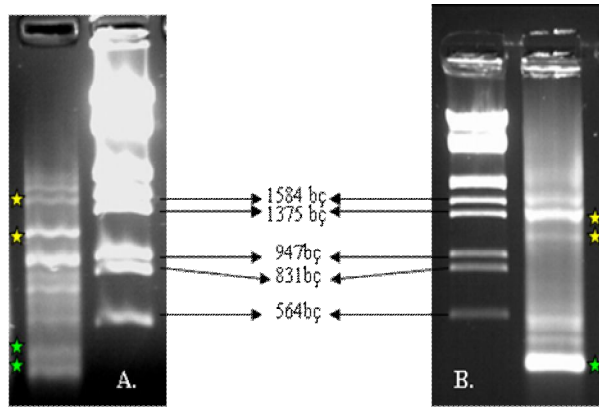
Her iki aşamadan elde edilen PZR reaksiyonlarına ait ürünler ayrı ayrı jele yüklendiğinde beklenen büyüklüklere ait bantlaşmalar görülmüştür (**Şekil 3.16**). **Şekil 3.16B**'de işaret edilen üç ürüne ait bantlar (~1375 bç, ~1250 bç ve ~250 bç) jelden kesilerek saflaştırılmış ve dizi analizine alınmıştır. Her üç bandın da

BLAST sonuçları gen bankasından MPK4 genini birinci sırada çekmiştir. Büyüklükleri birbirinden farklı üç ürünün BLAST analizinde aynı gene ait 3' bölgesi ile eşleşiyor olması iki olasılığı düşündürmektedir; ya gen bankasında bulunan iki ayrı MPK4 geni bilgisi aynı genin farklı versiyonlarından gelmektedir ya da AT oranı %68 olan MPK4 geninde OligodT primeri poli A kuyruğu dışında adenince zengin başka bir bölgeye oturmakta ve böylelikle daha kısa ürünler oluşmaktadır.

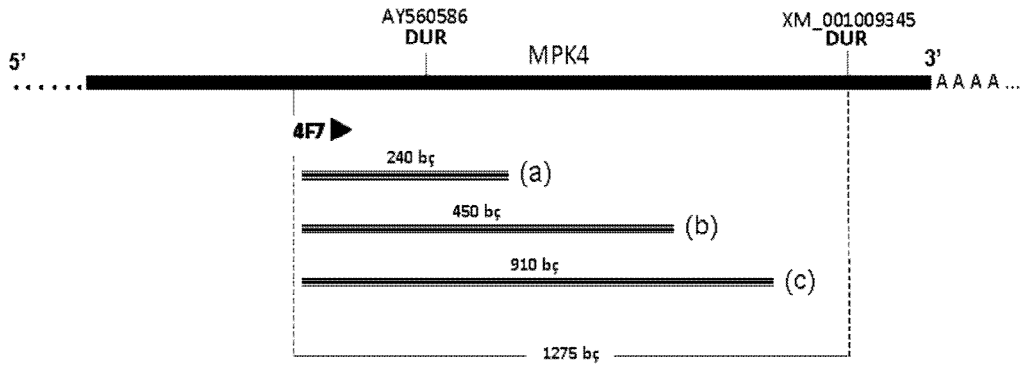


Şekil 3.15: 4F5 ve 4F7 primerleri ile kurulan 3' RACE –PZR stratejisi. A: 3'RACE reaksiyonundaki ilk adımda 4F5 ile OligodT primer seti kullanılarak RZR reaksiyonu kurulmuştur. Beklenen ürün büyüklüğü en az 190 ya da 1350 bç. olmalıdır. **B:** İlk adımda elde edilen ürün ikinci adım için kalıp görevi görmüş ve 4F7 ile OligodT primer seti kullanılarak PZR reaksiyonu yapılmıştır. Beklenen ürün büyüklüğü en az 120 ya da 1280 bç. olmalıdır.

MPK4 geninin birden fazla versiyonu olup olmadığını kesin bir biçimde ortaya koymanın yolu Northern Blot analizi olduğu için bu olasılık Northern Blot deneyi ile cevaplanmak üzere tezin sonraki kısımlarında yapılmıştır.



Oligo dT primerinin nonspesifik bağlanma yapıp yapmadığı hakkında bir ön bilgi edinebilmek amacıyla, 3'RACE reaksiyonunun ikinci aşamasında elde edilen yaklaşık olarak 1200–1400 arasındaki iki bant jelden saflaştırıldıktan sonra OligodT ve 4F7 primerleri ile tekrar PZR reaksiyonuna alınmış ve ufak (200-300 bç arası) ürünlerin de oluştuğu gözlenmiştir. Elde edilen bantların 3'RACE reaksiyonunun ikinci adımında elde edilen bantlarla kıyaslandığında büyüklük olarak aynı olması, Oligo dT primerlerin non spesifik olarak oturarak küçük ürünler oluşturduğu olasılığını güçlendirmektedir. Dizi analizine direkt olarak alınan bantlar büyüklüklerine göre en küçükten büyüğe doğru sırasıyla 240, 450 ve 910 baz çiftlik okumalar vermiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17: MPK4 geni 3'RACE reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin şematik gösterimi: MPK4 genini temsil eden çubuk üzerinde olası iki dur kodunu ilgili gen bilgisi kayıt numaraları ile işaret edilmiştir. 4F7 ile OligodT primer çifti ile yapılan PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen üç farklı üründen (~250 bç, ~1250 bç ve ~1375 bç) yapılan dizi analizi ile sırasıyla (a) 240, (b) 450 ve (c) 910 bç'lik okuma elde edilmiştir.

Buna göre MPK4 için olası dur kodonlarından AY560586 kayıtlı gene göre olan dur kodonunundan itibaren 3' yönüne doğru en fazla 792 bç okuma yapılmıştır (Şekil 3.17 c). En kısa olan 240 bç.'lik okuma her ne kadar çoklu adenin dizisi ile sonlanıyor olsa da bu bölge orijinal gen üzerinde analiz edildiğinde yüksek oranda adenin içermektedir. Dolayısıyla da OligodT primerinin nonspesifik olarak oturma olasılığı olan bölgelerdir.

MPK4 genine ait 3'RACE reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin büyüklükleri itibariyle dur kodonundan 3' yönüne doğru en fazla 792 baz çiftlik ürün elde edilmiş olması bu büyüklükte bir 3' bölgesi olamayacağı için diğer gen kaydı olan XM_001009345'e ait bilginin doğru olabileceğini düşündürmektedir.

```

240 bç...CATAGTAATAATAATAGCGTTACTTTGATCAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
240 bç...CATAGTAATAATAATAGCGTTACTTTGATCAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
MPK4 ...CATAGTAATAATAATAGCGTTACTTTGATCAGGAAAAGAATAGTACAAAACCAAATGCT
*****

```

Şekil 3.18: MPK4 geni 3'RACE reaksiyonu sonucunda elde 240 bç'lik ürüne ait dizi bilgisinin MPK4 geni ile hizalanması: 240 baz çiftlik banttardan elde edilen dizi bilgisinin MPK4 geni dizisiyle yapılan hizalamada da görüleceği gibi 3'RACE ürününün sonlandığı bölge orijinal dizi üzerine OligodT primerinin oturmasına uygun olacak düzeyde adenin içermektedir.

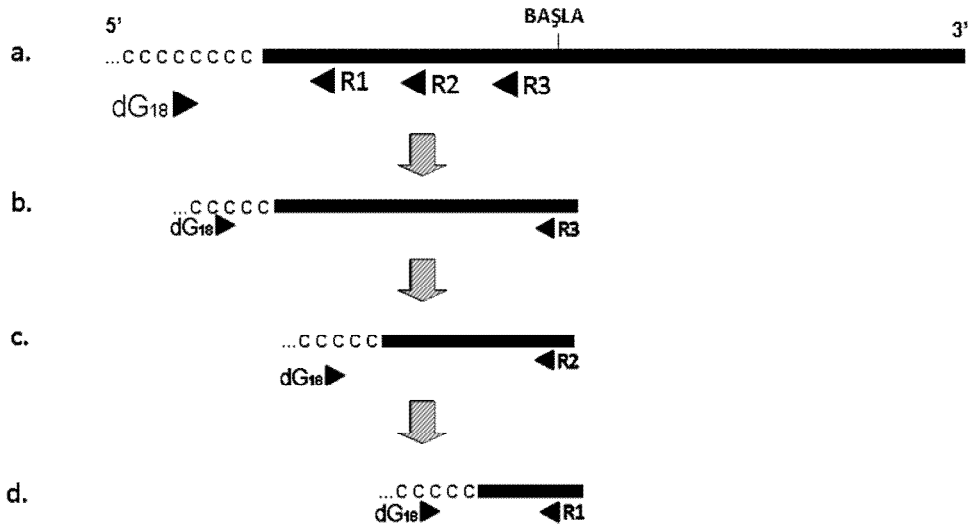
3' RACE PZR reaksiyonu ile elde edilen bir diğer önemli netice ise dijital klonlama yöntemiyle elde edilmiş olan MPK4 geni dizisinde olmadığını düşündüğümüz adenin bazının dizi analizi yapıldığında bulunduğu görülmüş olmasıdır (Şekil 3.19). Bu durum da MPK4 genine ait kayıtlardan XM_001009345'in doğruluğunu teyid edici yönde olmuştur.



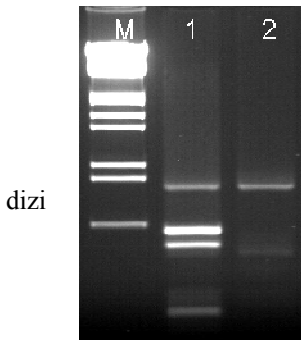
Şekil.3.19: 3'RACE dizi analizi sonuçları ile MPK4 ve problemlili A bazı pozisyonunun analizi. Problemlili olan A dizisinin pozisyonu kırmızı okla gösterilmiştir. Dizi analizi yapılan 3'RACE ürünleri ile MPK4 geni dikey hizalanmıştır. Dur kodonu MPK4 AY560586.1 genine göre işaretlenmiştir.

5'RACE deneyleri: İlk olarak, OligodT ile oluşturulmuş cDNA havuzunun kalıp olarak kullanıldığı C kuyruğu takma reaksiyonu ile havuzda bulunan cDNA'ların

5' uçlarına çoklu C dizileri takılmıştır. Bu reaksiyon sonucunda elde edilen ürünün kalıp olarak kullanıldığı takip eden reaksiyonlarda, MPK4 geninin 5' ucuna yakın olarak tasarlanan 3 ayrı geri primer ardışık olarak dG₁₈ ileri primeri ile kullanılmıştır (Şekil 3.20). C kuyruğu takılmış cDNA kalıpları ilk olarak R3 ve dG₁₈ primer seti ile PZR reaksiyonuna tabi tutulmuştur ve elde edilen ürün aynı primer seti ile güçlendirildikten sonra sırasıyla R2-dG₁₈ ve R1-dG₁₈ primer seti kullanılarak PZR reaksiyonuna alınmış ve her reaksiyon sonunda aynı primer seti ile güçlendirme yapılmıştır. Elde edilen ürünler agaroz jelde koşturularak hedeflenen büyüklüğe uygun bantlar kesilerek saflaştırılmış ve pGEMTeasy plazmitüne klonlanmıştır (Şekil 3.21). Transformasyon sonucunda elde edilen pozitif kolonilerden 20 adedi restriksiyon kesim reaksiyonları ile analiz edilerek pozitif klonlar dizi analizine alınmıştır. Ancak MAPK geninin 5' ucuna ait bir klona rastlanmamıştır.



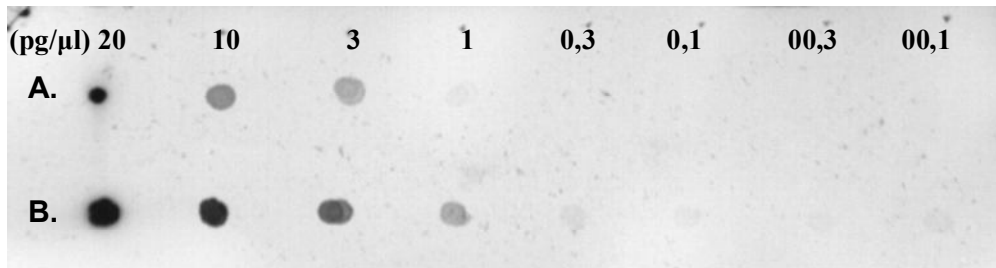
Şekil 3.20: R1,R2 ve R3 primerleri ile kurulan 5' RACE –PZR stratejisi. a: 5'RACE reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak olan cDNA'ların 5' ucuna Terminal Transferaz enzimi ile c kuyruğu takılmıştır. b: R3 ve dG₁₈ primer seti kullanılarak gerçekleştirilen ilk adım. c: İlk adımda elde edilen ürünün kalıp olarak kullanıldığı ikinci adım. R2 primeri ve dG₁₈ primer seti kullanılmıştır. d: R1 ve dG₁₈ primer setinin kullanıldığı üçüncü adım PZR reaksiyonu. Bu adımda kalıp olarak ikinci adımda elde edilen ürün kullanılmıştır.



Şekil 3.21: MPK4 geni için yapılan 5' RACE reaksiyonları. M: EcorI Hin III Lambda Faj Marker. 1: R2-dG₁₈ primer seti ile elde edilen ürünün kalıp olarak kullanıldığı R1-dG₁₈ PZR reaksiyonu. 2: R3-dG₁₈ primer seti ile oluşturulan ürünün kalıp olarak kullanıldığı R2-dG₁₈ primer seti ile oluşturulan PZR ürünleri. Elde edilen tüm bantlar saflaştırılarak klonlanmış ve dizi analizi ile bilgileri elde edilmiştir.

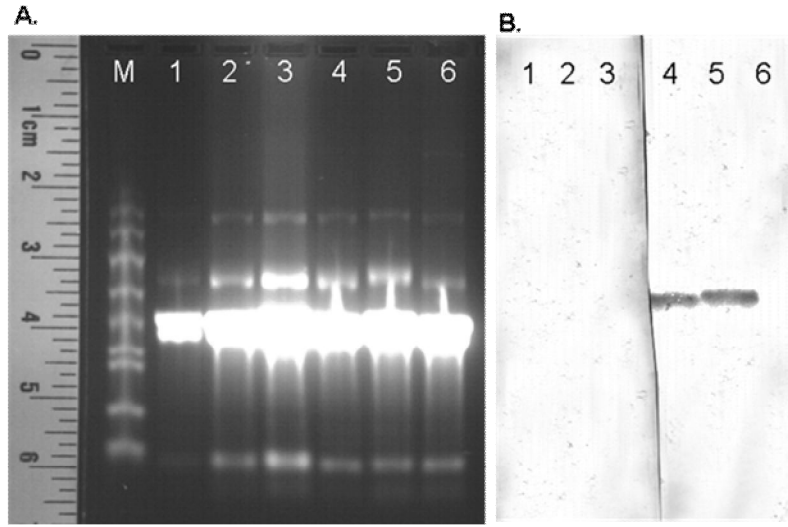
3.2.10. MPK4 Geni Transkriptinin Northern Blot Analizi İle Tespit Edilmesi

MPK4 geninin transkripsiyon seviyesindeki temsil sayısını tespit etmek amacıyla Northern Blot analizi yapılmıştır. Total RNA'nın kullanıldığı blotlamalarda prob olarak MPK4 cDNA'sı kullanılmıştır. Probu DIG ile uygun bir şekilde etiketlenip etiketlenmediğini test etmek için 20 ila 0,1 pg/μl aralığında seyreltilen DIG etiketli MPK4 probu ve kittede bulunan DIG etiketli kontrol DNA'sı membran üzerine damlatılarak deteksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve MPK4 probunun tavsiye edilen 0,1 pg/μl'de de görünür olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.22). *T. thermophila* katalaz genine ait DIG etiketli cDNA probu, Northern Blot analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İki kez gerçekleştirilen Northern Blot analizinin ilkinde MPK4 için oda sıcaklığında büyütülmüş olan *T. thermophila* hücrelerinden izole edilen total RNA'dan sırasıyla 2, 5 ve 10 μg total RNA; katalaz için ise sırasıyla oda sıcaklığı, 30°C ve açıklık tamponunda büyütülmüş hücrelerden izole edilen 5 μg total RNA formaldehit jelde denatüre edilmiştir.



Şekil 3.22: DIG etiketli MPK4 probunun etkinliğinin belirlenmesi: (A) DIG etiketli MPK4 probu ve kittede bulunan (B) DIG etiketli kontrol DNA'sı sırasıyla 20, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 ve 0,01 pg/μl konsantrasyonlarında seyreltilerek pozitif yüklü naylon membran üzerine damlatılarak emdirilmiş ve standart deteksiyon prosedürü uygulanmıştır. MPK4 probu 0,01 pg/μl'de dahi görülmektedir.

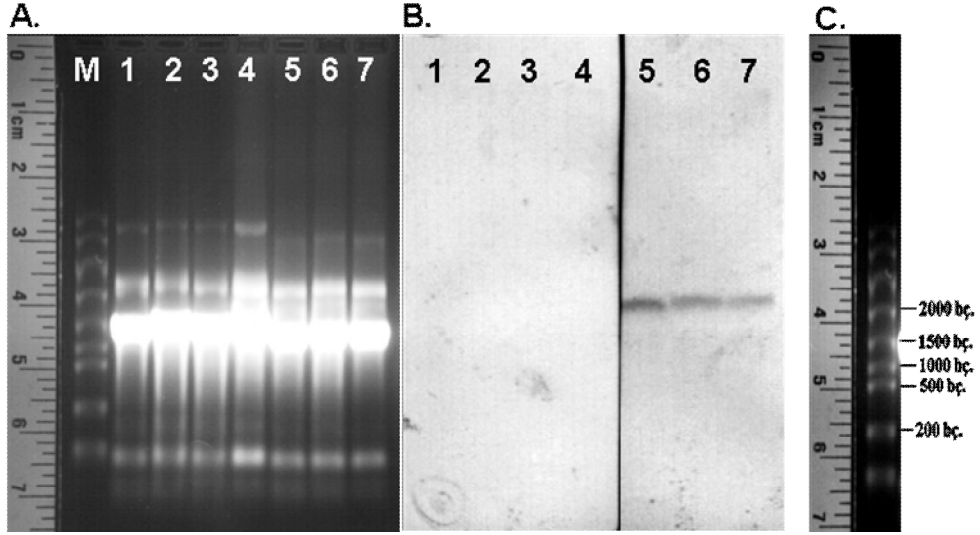
Denatüre edilen jelin içerdiği total RNA'lar negatif yüklü membrana Turbo Blotter aparatı kullanılarak yukarıdan aşağıya transfer edilmiş üretici firmanın tavsiye ettiği protokole uygun olarak prehibridizasyon, hibridizasyon ve deteksiyon aşamaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; MPK4 genine ait herhangi bir sinyal tespit edilemezken, katalaz genine ait transkript; oda sıcaklığı ve 30°C'de büyütülmüş hücrelerden elde edilen total RNA örneklerinde tespit edilmiş, ancak açlık tamponunda 24 saat süre ile büyütülmüş hücrelerden elde edilen total RNA'da katalaz genine ait bir sinyal tespit edilememiştir (**Şekil 3.23**).



Şekil 3.23: MPK4 ve Katalaz Geni İçin Total RNA Örneklerinden Yapılan Northern Blot: A.: *Total RNA örneklerinin formaldehit jeldeki görüntüsü:* Oda sıcaklığında büyütülmüş hücrelerden izole edilen total RNA, sırasıyla; 2, 5 ve 10 µg olacak şekilde 1,2 ve 3 numaralı kuyucuklara yüklenmiştir. 4,5 ve 6 numaralı kuyucuklara ise sırasıyla oda sıcaklığı, 30°C ve açlık tamponunda büyütülmüş hücrelerden izole edilen 5 µg total RNA yüklenmiştir. M: RiboRuler RNA Ladder, High Range, *Fermentas* SM1821. B.: *Northern Blot sonrası membran görüntüsü:* 1,2 ve 3 numaralı kuyucukların bulunduğu soldaki membran MPK4 cDNA probu ile hibridize edilmişken; 4,5 ve 6 numaralı kuyucukları içeren sağdaki membran katalaz cDNA probu ile hibridize edilmiştir.

Oda sıcaklığında büyütülmüş hücrelerden elde edilen total RNA'nın farklı konsantrasyonları ile yapılan Northern Blot analizi MPK4 geni için sonuçsuz olunca, oda sıcaklığında üretilen MPK4 transkriptinin Northern Blot yöntemi ile tespit edilemeyecek düzeyde az temsil ediliyor olma olasılığından yola çıkarak farklı koşullardan izole edilen RNA örnekleri ile ikinci bir Northern Blot analizi yapılmıştır (**Şekil.3.24**). Katalaz geninin (1640 bp) pozitif kontrol olarak kullanıldığı bu denemede MPK4 için 23°C'de büyütülmüş hücrelerden 5 µg total RNA, 37°C'de büyütülmüş hücrelerden 5 µg , 30°C'de büyütülmüş hücrelerden izole edilen total RNA'dan 5 ve 10 µg örnekler formaldehitjele yüklenmiş; katalaz

için ise 30°C’de büyütülen ve 37°C’ye aktarılan hücrelerden 0, 15 ve 30’uncu dakikalarda alınan örneklerden izole edilen total RNA’lardan 5 µg total RNA formaldehit jele yüklenerek Northern Blotlama yapılmıştır. Ancak MPK4 cDNA probu ile yapılan blotlamada herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bununla beraber katalaz cDNA probu ile yapılan northern blot hibridizasyonu beklenen büyüklükte sinyaller oluşturmuştur (Şekil.3.24).



Şekil 3.24: MPK4 ve Katalaz Geni İçin Total RNA Örneklerinden Yapılan İkinci Northern Blot Analizi: A.: Total RNA örneklerinin formaldehit jeldeki görüntüsü: M: RiboRuler RNA Ladder, High Range, *Fermentas* SM1821.1: 23°C’de büyütülmüş hücrelerden 5 µg total RNA, 2: 37°C’de büyütülmüş hücrelerden 5 µg total RNA, 3: 30°C’de büyütülmüş hücrelerden 5 µg total RNA, 4: 30°C’de büyütülmüş hücrelerden 10 µg total RNA. 5,6,7: 30°C’de büyütülmüş hücrelerden sırasıyla 0, 15 ve 30’uncu dakikalarda izole edilen 5 µg total RNA **B.:** Northern Blot sonrası membran görüntüsü: MPK4 cDNA probu ile yapılan hibridizasyon 1,2,3 ve 4 numaralı kuyucuklarda herhangi bir sinyal oluşturmamıştır. Katalaz cDNA probu ile yapılan hibridizasyonda 5,6 ve 7 numaralı kuyucuklarda ilgili transkriptte ait sinyal elde edilmiştir. **C.:** RiboRuler RNA Ladder, High Range markırının ilgili bant büyüklükleri.

Farklı koşullarda büyütülen hücrelerden izole edilen total RNA’ların farklı konsantrasyonları ile yapılan Northern Blot hibridizasyonlarında MPK4 geni için herhangi bir sonuç alınamamış olması bu genin transkriptom içinde northern blotla tespit edilmesi güç olan düşük bir seviyede bulunduğunu düşündürmüştür. Ekspresyon seviyesi düşük genler için ait transkriptlerin hibridizasyon yöntemi ile tespit edilmesine alternatif bir yöntem olarak cDNA havuzunun hibridizasyonda hedef molekül olarak kullanılması teklif edilmiştir [145]. Buna göre 5µg total RNA’dan oligo dT primerleri kullanılarak oluşturulan cDNA topluluğu standart Southern Blot’lama yöntemi ile MPK4 cDNA probu ile hibridize edilmiş ancak herhangi bir sinyal tespit edilememiştir.

3.2.11. MPK4'ün Rekombinant Protein Olarak Üretilmesi İçin Gerekli Olan Çoklu Mutasyonların MPK4 cDNA'sı Üzerinde PZR Yöntemiyle Gerçekleştirilmesi

MPK4'ün *E. coli*'de üretilmesi için 16 adet nokta mutasyonu gerçekleştirilmesi gerekmektedir. MPK4'ün DNA dizisinde içinde bu 16 adet nokta mutasyonunun yeri **Şekil 3.25**'de büyük harflerle gösterilmiştir. Bunun sebebi ise *T. thermophila*'nın kodon sözlüğünde, TAA ve TAG kodonları glutamini (Q) kodlamaktayken, *E. coli*'de translasyonu durdurucu kodon (STOP yani DUR) olarak kullanılmasıdır. Çok fazla mutasyon söz konusu olduğu için tercih edilen teknik '**PZR ile birden fazla nokta mutasyon**' olarak bilinmekte olup bu yaklaşımla TAA ve TAG'lerdeki T (timin)'lerin hepsi C (sitozin)'lere çevrilmesi planlanmıştır. PZR ile birden fazla nokta mutasyon yöntemi için gerekli olan 22 adet primer **Şekil 3.25**'de siyah (Geri Primer) ve gri (İleri Primer) olarak renklendirilmiş bölgelerdir. Bu bölgelerde ileri primerlerde T yerine C ve aynı pozisyonun geri primerinde A yerine G yerleştirilerek mutasyon primerleri hazırlanmıştır. Bazı durumlarda, primerlerden bir kısmını birden fazla mutasyonu taşıyacak şekilde tasarlamak zorunluluğu doğmuştur. Bu yaklaşıma rağmen 16 adet mutasyonun varlığı ve bunlardan bir kısmının birbirlerine çok yakın olması, PZR deneyinin 3 büyük aşamada gerçekleştirmesini zorunlu kılmıştır.

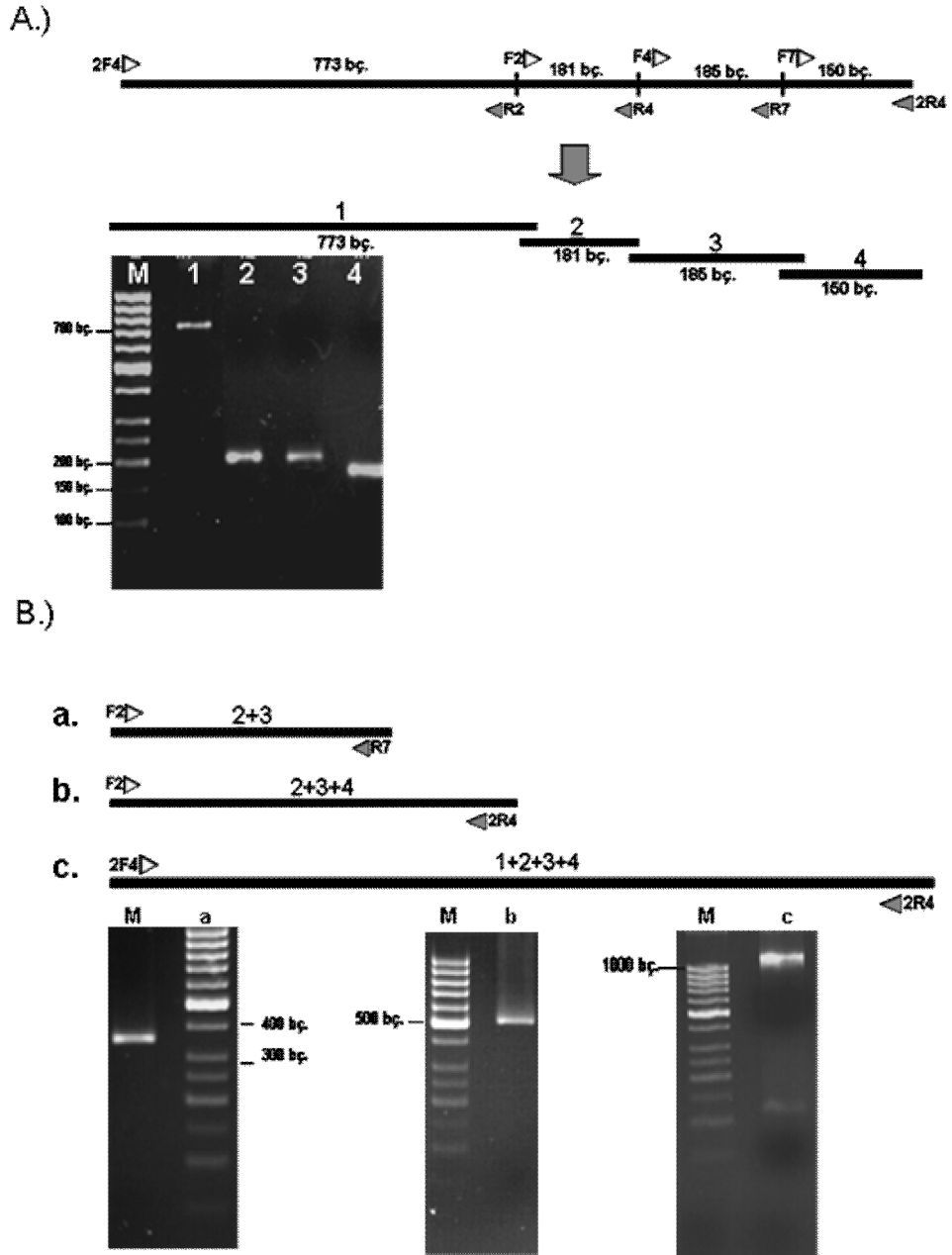
-50 aagaatTTTTTTtagctaaaatTTTaaactgtaaaaatcatagaaaga -1
tcttaaaaaaatcgattTTTaaataaatttgacattTTTTtagtatctttct
M S S N E E I E P H I L R K F E I I Q K
1 atgagcagcaacgaagaattgaaccacatTTTTaagaaagttgaaatcattcaaaa 60
tactcgctcgttgcttctttaacttgggtgataaaaattctttcaaaactttagtaagtttt
L G K G A Y G I V W K A F C K K S K Q I
61 ttgggtaaaggagcttatggattgTTTgaaagcattttgcaagaagtcaaagcaata 120
aaccattttcctcgaataaccataacaaacctttcgtaaaacgttcttcagtttctgtttat
V A L K K V F D A F H N A T D A Q R T F
121 gttgctTTTaaaaaagtattcgtatgcattccataacgctactgatgctcaaagaacattc 180
caacgaaatTTTTcataagctacgtaaggatttgcgatgactacgagtttcttgtaag
R E V M F L Q E L N G H E N I I R L I N
181 cgtgaagtaattgcttgaagagcttaattggacacgagaatatcattaggctaatcaac 240
gcatttcattacaagaacgttctcgaattacctgtgctcttatagtaatccgattagttg
I I K A E N N K D L Y M V F D F M E T D
241 atcatcaaagcagaaaaataaaagatttgtacatggtTTTTgacttcatggaaactgat 300
tagtagtttctgcttttattttctaaacatgtacaaaaactgaagtaccttttgacta
L H A V I R A N I L E E I H K * Y V V Y
301 ttacatgctgTTatttagagcaaatatattagaagaaatacacaaa**Tag**tatgTTtctat 360
aatgtacgacaataatctcgtttatataatcttcttt**atgtgTTTAt**catacaacagata
* I L K A M K Y I H S G E L I H R D L K
361 **Taa**attcttaaaagctatgaaatacattcattcaggtgaactgatccatcgtgacttgaag 420
AtttagaatttcgatacTTtatgtaagtaagtcaccattgactaggtagcactgaactc
P S N I L L N S E C L V K L A D F G L A
421 ccatctaataatcctcctaaatagcgaatgcttggTTaaattagctgattttggacttggc 480
ggtagattataggaggatttatcgcttacgaaccaatttaacgactaaaactgaacgg
R S V A V T D D D D N P V R T E Y V A T
481 cgttccgTTgcagttaccgatgatgatgacaatcctgtcagaacagagtatgTTgctact 540
gcaaggcaacgtcaatggctactactgTTtaggacagtcctgtctcatacaacgatg
R W Y R A P E I L L G S T K Y A K A V D
541 cgttggTatcgtgcccctgaaatcttattaggtagtactaaatgctaaaggctgTTgat 600
gcaaccatagcaccgggactttagaataatccatcatgattttacgattccgacaacta
M W S I G C I V G E L I T N R A I F P G
601 atgtggagcatcgctgcatagtaggagaacttataactaacagagctatcttcccaggt 660
tacactcgttagccgacgtatcatcctcttgaatattgattgtctcgatagaaggTTca
N S T L N Q I E K V L E L T G K P T * E
661 aattccactctcaatcaaatgaaaaagTTTTagaattgactggTaaaccct**Tag**gaa 720
ttaaggTgagagttagTTtaactTTTTcaaaatcttaactgaccattt**gggtgA**tcctt
D I E S L E S Q L A W N I I S S I N V *
721 gatattgagTcgttagaatcccaactagcatggaatatcataagttca**atta**atgTT**Taa** 780
ctataactcagcaatcttagggttgatcgctaccttatagTattcaagTTaa**tt**acaa**Att**
K K K T F H * M F P G A S E E A I D L I
781 aagaaaaaa**cattccatTaa**atgTTcctgTTgcaagcagaagaatTgactatc 840
ttctTTTTTgTaaggT**Att**ttacaagggaccagTTcgcttctcgttaactgagtag
K K L L C F N P K N R L T V E * A L E H
841 aagaaactcctctgTTTcaaccctaaaaat**cgTct**acagTTgaa**Taa**gcTTtagagcat 900
ttctTTgaggagacaaagTTggattTTtagcaga**at**gt**caact**Att**cg**gaatctcgta
P Y V K D F H C P E E E I V C G R V I P
901 ccttacgTTaaagacttccactgtcctgaagaagaaattgTTTgCGgaagagTcatcccc 960
ggaatgcaatTTcgaaggTgacaggacttcttcttaacaaacgcttctcagtagggg
I S M N D N K K F S I K E Y R E A L Y N
961 atcagcatgaacgacaataaaaaatTctcaatcaagaatacagagaag**gcact**ttataat 1020
tagTcgtactTgctgTTatTTTTaagagTTtagTTtcttatgTctctcgt**gaa**atatta
* I Y * E K R I K R * * N R D I Y L K Q
1021 **Taa**atttac**Taa**gaaaagagaatcaaacgc**TaaTaa**aacagagacatttaccttaagcaa 1080
Atttaaatg**Att**cttttctccttagTT**gCGAtt**AttTTTgTctctgTaaatggaatt**cg**tt
* * * I T T T G N G * V S * A G * S S Q
1081 **TaaTaaTaa**attactacaactggaat**gggTag**gTTtct**Taa**gctgga**Taa**tcttccaa 1140
AttAttAtttaatgatgTTgacctttac**ccAtt**ccaaaga**Att**cgacct**Att**agaagggt
P V S S H K Y L P L L N L L N H L *
1141 ccagTTTcatcccaaaataccttctcttcttaatctacttaatcatctg**Tga**ctcaat 1200
ggTcaaagtagggTgTTtatggaaggagaagaattagatgaattag**tag**acact**gag**TTa
1201 agTaatagcaataatagcagtaagaaaaaagcaagaaccaatatcaaagc 1250
tcattatcgttattatcgtcattctTTTTcgttcttggTTatagTTtctg

Şekil 3.25: MPK4 geninin rekombinant protein olarak ifade edilecek bölgesinde yer alan mutasyonların konumu (*) ve tasarlanmış primerlerin konumu (gri ve siyah) olarak vurgulanmıştır

Tüm nokta mutasyonlarını yapabilmek için önceden de değinildiği gibi üç büyük adımlı strateji geliştirilmiştir. Temelde yatan mantık; nokta mutasyonu primerlerinin orijinal DNA ipliğine kalıp gibi davranması yoluyla, orijinal iplikte değişikliğe sebep olmaktır. Bunu gerçekleştirmek için tasarlanmış primerler; değişikliğin olması istenilen pozisyondaki baza değil de bu bazın yerine geçmesi umulan baza sahiptir. Mutasyon yapılacak nokta sayısı fazlaştıkça primer sayısı da artacaktır. Tasarlanan primerler ile bir PZR reaksiyonu kurulduğunda kullanılan primer çifti sayısınınca parça oluşacaktır. Mutasyonlu parçaların daha sonra birleştirilmesi işlemi ise yine primer tasarımı sırasında dikkate alınan bir ayrıntı ile gerçekleşir. Bu da primerlerin birbirleri ile örtüşecek şekilde tasarlanmış olmasıdır. Böylelikle primerlerle çoğaltılan her parça komşu parça ile birleşebileceği, örtüşen bir bölge içerecektir. Birleştirme işleminde ise bu parçaların birbirlerine primer gibi davranmalarını kolaylaştıracak şartlar sağlanır. Bu yolla birden fazla adımda nokta mutasyonları gerçekleştirilebilir.

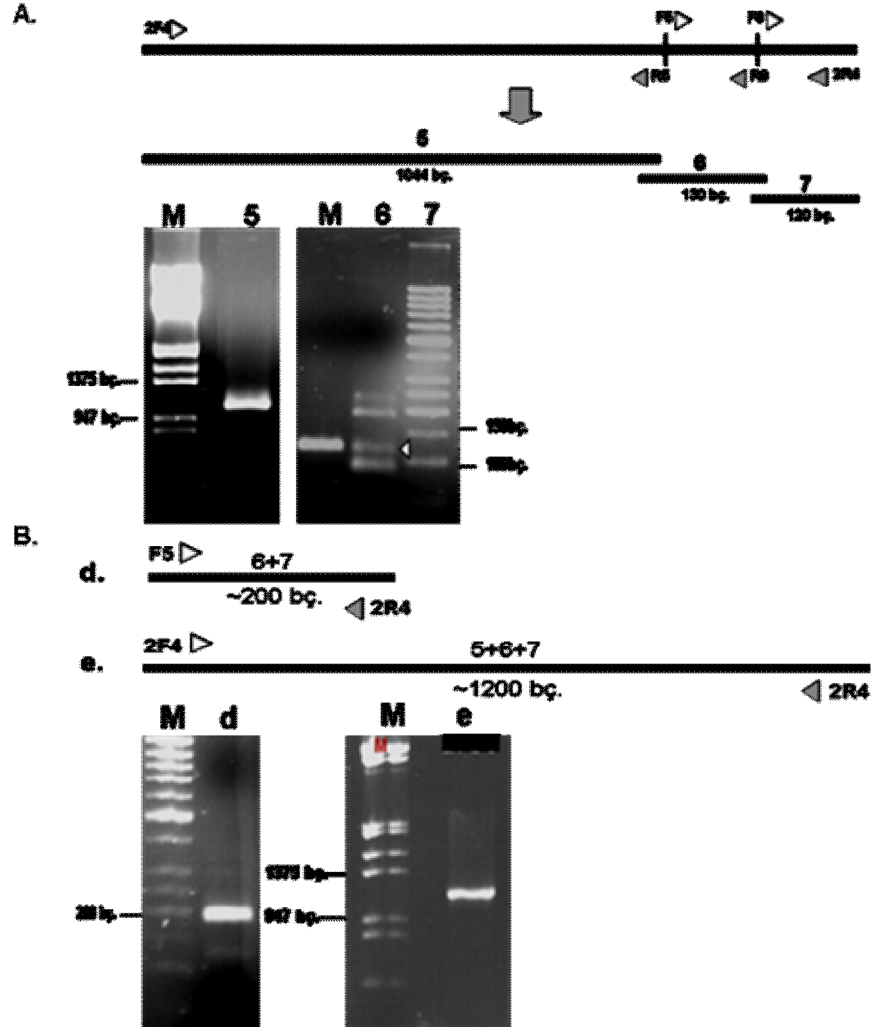
MPK4 geni üzerinde yapılacak nokta mutasyonları için 3 büyük aşama tasarlanmıştır. Her büyük aşamanın sonunda bütün bir MPK4 geni elde edilecektir. Ancak en son aşamada elde edilecek olan ürün tüm mutasyonları tamamlanmış hedeflenen gen parçası olacaktır. Deneysel olarak gerçekleştirilen üç aşamaya ait strateji aşağıdaki gibidir;

1. Birinci Aşama: Bu aşamada öncelikli olarak 2F4/R2, F2/R4, F4/R6 ve F6/2R4 setleri ile dört parçalık PZR reaksiyonu kurulmuştur. Daha sonra elde edilen parçalar üç adımda birleştirilerek 4 mutasyon yerleştirilerek birinci aşama tamamlanmıştır. Reaksiyonları özetleyen diyagram ve elde edilen reaksiyonlara ait sonuçlar **Şekil 3.26.**' da görülmektedir. Birinci aşamada elde edilen dört parça (1,2,3 ve 4) jelden kesilerek saflaştırılmış ve üç adımda birleştirilerek altı adet nokta mutasyonu yerleştirilmiştir. Birleştirme adımları ve elde edilen yeni ürünlere ait diyagram ve jel fotoğrafları aşağıdadır:



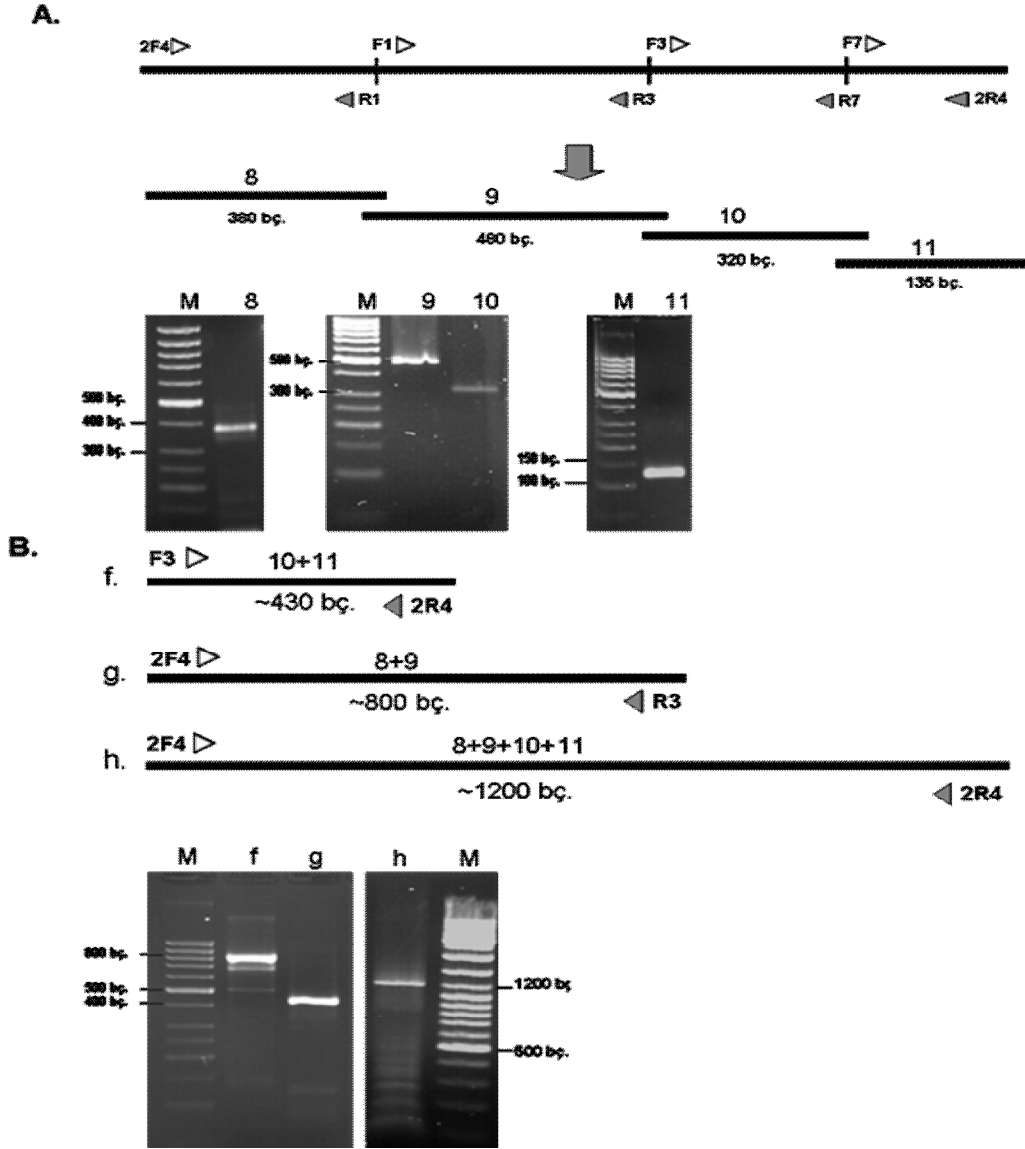
Şekil 3.26: MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi Birinci Aşama: A) Birinci aşamayı özetleyen diyagram ve ürünlere ait jel görüntüleri: 1:2F4-R2 primer seti ile 773 bp, 2:F2-R4 primer seti ile 181 bp, 3:F4-R7 primer seti ile 185 ve 4:F7-2R4 primer seti ile 150 bp'lik parçalar üretilmiştir. %1'lik Agaroz Jel üzerinde M: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas, SM0371. B) Birinci aşamada elde edilen ürünlerin birleştirilmesi PZR reaksiyonları ve elde edilen ürünler: a: 2 ve 3 numaralı ürünlerin F2/R7 primer seti ile birleştirilmesi ile elde edilen ürün, b: Elde edilen ürün a'nın (2+3) 4 numaralı ürünle F2/2R4 primer seti ile birleştirilmesi sonucu elde edilen ürün, c: Ürün b'nin (2+3+4), 2F4/2R4 primer seti kullanılarak 1 numaralı parça ile birleştirilmesi reaksiyonu ve elde edilen son ürün.

2. İkinci Aşama: Birinci aşamanın sonunda elde edilen 1+2+3+4 ürününün kalıp olarak kullanıldığı ikinci aşamaya geçilmiştir. Toplamda dört nokta mutasyonu içeren 2F4/4R5, 4F5/4R6 ve 4F6/2R4 primer çiftleri kullanılarak; beklenen büyüklükleri sırasıyla yaklaşık olarak 1044 bp, 130 bp. ve 120 bp. olan üç parça oluşturulmuştur (Şekil 3.27). Oluşturulan parçalar jelden saflaştırılmış ve iki adımdan oluşan birleştirme PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır.



Şekil 3.27: MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi
İkinci Aşama: A) İkinci aşama ilk adımı özetleyen diyagram ve ürünlere ait jel görüntüleri: **5:** 2F4/R5 primer seti ile elde edilen 1044 bp'lik ürün, **6:** F5/R8 primer seti ile elde edilen 130 bp'lik ürün, **7:** F8/2R4 primer seti ile elde edilen 120 bp'lik ürün. B) İlk adımda elde edilen ürünlerin birleştirilmesi ve elde edilen ürünler: **d:** 6 ve 7 numaralı ürünlerin F5/2R4 primer seti ile birleştirilmesi ile elde edilen ürün, **e:** Ürün d'nin (6+7), 2F4/2R4 primer seti kullanılarak 5 numaralı ürünle birleştirilmesi ile elde edilen son birleştirme ürünü. **M1:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Fermentas, #SM0191 **M2:** GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas, SM0371.

3. Üçüncü Aşama: İkinci aşamanın sonunda elde edilen ve toplamda 9 nokta mutasyonu içeren ürününün kalıp olarak kullanıldığı üçüncü aşamada iki adımda gerçekleştirilmiştir. 2F4/4R5, 4F5/4R6 ve 4F6/2R4 primer çiftleri kullanılmıştır. Beklenen büyüklükleri sırasıyla yaklaşık olarak 380 bp, 460 bp., 320 bp. ve 135 bp. olan dört parça oluşturulmuştur (Şekil 3.28).

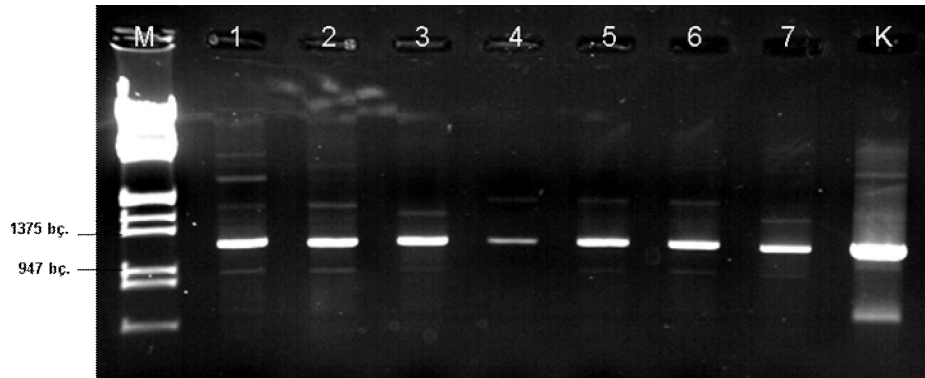


Şekil 3.28: MPK4 geninin nokta mutasyonları için oluşturulan PZR stratejisi
Üçüncü Aşama: A) Üçüncü aşama ilk adımı özetleyen diyagram ve ürünlere ait jel görüntüleri: **8:** 2F4/R1 primer seti ile elde edilen 380 bp'lik ürün, **9:** F1/R3 primer seti ile elde edilen 460 bp'lik ürün, **10:** F3/R7 primer seti ile elde edilen 320 bp'lik ürün, **11:** 4F7/2F4 primer seti ile elde edilen 135 bp'lik ürün **B) İlk adımda elde edilen ürünlerin birleştirilmesi ve elde edilen ürünler:** **f:** 10 ve 11 numaralı ürünlerin F3/2R4 primer seti ile birleştirilmesi ile elde edilen ürün, **g:** Ürün f'in (10+11), 2F4/R3 primer seti kullanılarak 5 numaralı ürünle birleştirilmesi ile elde edilen ürün, **h:** (8+9) ile (10+11) parçalarının 2F4/2R4 primer seti ile birleştirilmesi ile elde edilen tüm nokta mutasyonları yerleştirilmiş son ürün.

Böylelikle üçüncü aşamanın son adımında elde edilen yaklaşık 1200 bç.'lik son ürün üzerinde MPK4 geninin *E.coli*'de ekspres edilebilmesi için gerekli olan 16 nokta mutasyonunu yerleştirmek için tasarlanan tüm reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir ve yeni ürün reMPK4 olarak isimlendirilmiştir.

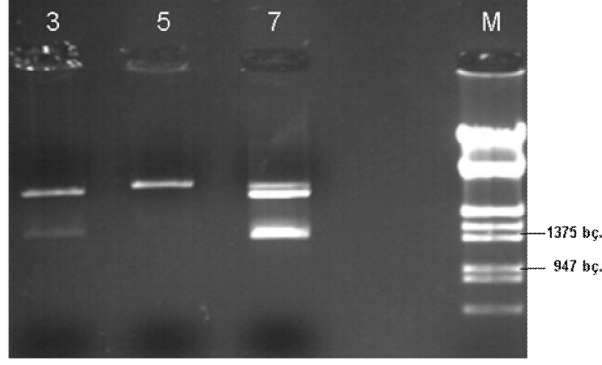
3.2.12. PZR Çoklu Mutasyon Yöntemiyle İle Üretilen reMPK4'ün pGEM T-Easy Plazmitine Klonlanması

Nokta mutasyonlarının tamamlandığı düşünülen MPK4 cDNA'sının klonlama plazmitü olan pGEM T-Easy plazmitine aşağıdaki aşamalarla klonlanması planlanmıştır. Pfu DNA Polimeraz enzimiyle gerçekleştirilen PZR reaksiyonları sonucunda elde edilen reMPK4 küt uçludur. Bunun sebebi kullanılan Pfu polimeraz enziminin oluşturduğu ürünlerin, 3' ucunda oluşturduğu sarkan adenin bazını ekzonükleaz aktivitesi ile uzaklaştırmış olmasıdır. TA klonlama için gerekli olan sarkan adenin bazının eklenmesi için, reMPK4 ürünü jelden saflaştırıldıktan sonra Taq Polimeraz enzimi ile reaksiyonuna alınmıştır. Bu reaksiyon sonucunda elde edilen ürün direk olarak ligasyon reaksiyonuna alınmış ve daha sonra pGEM T-Easy plazmitine standart klonlama prosedürü uygulanarak aktarılmıştır. Elde edilen beyaz koloniler, koloni PZR'ı yapılarak kontrol edilmiştir ve sonuç olarak sekiz koloniden yapılan PZR reaksiyonu ile beklenen büyüklükte ürünleşme elde edilmiştir (**Şekil 3.29**).



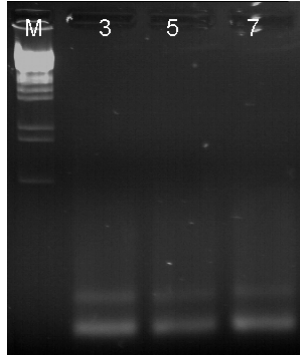
Şekil 3.29: Koloni PZR'si ile elde edilen sonuçları. 1-8: Koloni PZR'si ile kontrol edilen beyaz kolonilerin numaraları **M:** Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Fermentas, *SM0191*.Markırı. **K:** Genomik DNA'dan kurulan pozitif kontrol PZR'si.

Koloni PZR reaksiyonu ile pozitif sonuç veren kolonilere ait plazmitler restriksiyon kesim analizine alınmıştır ancak kolonilerden sadece iki adedi beklenen büyüklükte (1200 bç) bant vermiştir (**Şekil 3.30**).



Şekil 3.30: Koloni PZR'si ile reMPK4 varlığı konfime edilen plazmitlerin EcoRI enzimi ile kesim reaksiyonu: 3,5,7: Koloni numaraları M: Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Fermentas, SM0191.Markırı.

İçerisinde reMPK4 geni olduğu koloni PZR'si ve restriksiyon kesimi ile onaylanan iki plazmit DNA dizi analizine tabi tutulmuş ancak herhangi bir sonuç alınamamıştır. Dizi analizleri farklı iç primerlerle tekrar edilmiş ancak yine bir sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine reMPK4 ürününü güçlendirmek için pozitif plazmitlerden kesilerek tekrar saflaştırılmış ve PZR reaksiyonuna tabi tutulmuştur ancak herhangi bir bantlaşma olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31: Plazmitten izole edilen reMPK4 genin PZR sonuçları: 3, 5, 7: Koloni numaraları M: Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Fermentas, SM0191.Markırı.

Bu durumu bertaraf etmek için iki farklı nokta mutasyon stratejisi daha denenmiş, sonuç olarak elde edilen son ürünler klonlanmış host (XL1-blue), host bir kez değiştirilmiş (*E.coli* SURE) ancak son ürünler hiçbir zaman PZR ile çoğaltılamamıştır. Dolayısıyla deneyin nihai amacı olan ve reMPK4 geninin ekspresyonunu içeren aşaması tamamlanamamıştır.

3.3. Biyoinformatik Analiz Bulguları

T.thermophila SB210 makronükleer genom projesinden elde edilen bilgilerin biyoinformatik araçlar yardımıyla değerlendirilerek, bu organizmadaki olası MAPK'lerin tespit edilmesi ve olası biyolojik fonksiyonları üzerinde fikir yürütebilmek maksadıyla bir takım biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerin diğer bir amacı ise günümüzde kullanılan MAPK sınıflandırılmasının elde edilen yeni MAPK dizilerini içerecek şekilde revize edilmesi gerekliliğine bir katkı sağlamak maksadıyla gerçekleştirilmiştir. Bu analizle hem genel MAPK sınıflandırılması hem de protista MAPK'lerinin birbirleri ile olan mukayesesi hedeflenmiştir.

3.3.1. *T.thermophila* MAPK Ailesi Üyelerinin Protein Kinaz Motiflerinin Tespiti

Tipik protein kinazların katalitik bölgeleri 250-300 aminoasitten oluşmaktadır. Bu bölge 12 alt kısma ayrılmıştır. Bu alt bölümler karakteristik aminoasit motifleri taşırlar ve de çok nadiren büyük aminoasit girdileriyle bölünürler. Protein kinaz domainleri iki loblu bir yapı oluşturmaktadır. I ve IV. altdomainleri içeren ve de yapıca daha küçük olan NH₂ terminal lobu; nükleotidlerin tutulması ve oryantasyonu olaylarına birincil olarak katkı sağlamaktadır. Nükleotidlere bağlanan proteinler arasında özel olan antiparalel β tabakalar, bu lobun yapısında buluna hakim sekonder oluşumlardır. Daha büyük olma COOH- terminal lobu, altdomain VIA-XI 'u içermektedir. Peptit substratına bağlanma ve fosfotransferin başlatılması olaylarının gerçekleşmesi büyük ölçüde bu lob tarafından oluşturulmaktadır. Baskın olan sekonder yapı α -helikal sekonder oluşumlardır. Alt domain V iki lob arasında uzanmaktadır ve iki lob arasındaki derin yarık "kataliz bölgesi" olarak tanımlanmıştır [19]. **Şekil.3.32'**de BoxShade programı kullanılarak yapılan dikey hizalama sonucu ve bahsi geçen domainlerin yerleri gösterilmektedir.

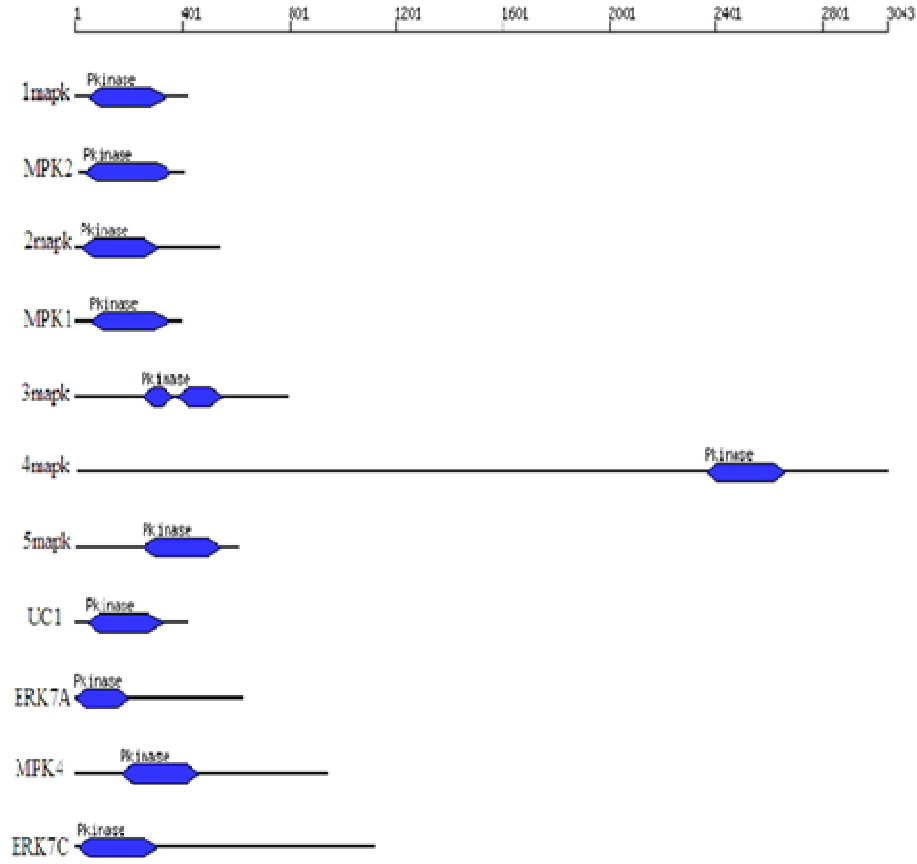
	GXGXXGXV	AXK	E
2mapk	GQGGAYGVVSA	ADVAIKKIEKAFDQR	TYTKRTLREIKLLRL
MPK2	GQGGAYGIVVA	ARDVAIKKIEKAF	EHKIFTKRTLRELRLLRL
3mapk	GIGCGYVVA	KAFDVAIKKIEKPF	FLNPLETKRTLREIKILKAL
5mapk	GHGAYGVVCS	VDIAIKKITNAF	EDLVDAKRIVREIKMLKFF
MPK1	GYGAYGVVCS	AVNVAIKKVQNA	YDDLDAKRIVREIKLLKFF
4mapk	GDGAYGVVFK	ADVAIKKVSDAFL	LDPRDAKRILREIKLLKFC
MPK3	GSGAYGVVRA	KDVAIKKLH-KIE	DVDAKRVLREIRILRYL
MPK4	GKGAYGIVWKA	FCVAKKVFDAF	HNATDAQRTFREVMFLQ
ERK7A	GKGAYGIVWKA	ADVAIKKVFDAF	HNPTDAQRTFREVMFLQ
ERK7C	GRGAYGIVWV	YDLALKKIFDAF	QNSTDAQRTFREIMFLQ
1mapk	GQGTGFGVV	VACQDVAIKKIER	AFAEHTQYARTIREIKLQ

	HRDLKXXN	DFG	TXY
2mapk	DQQLTQDEHCKE	FFIYQILYIHSAN	VIHRDLKERNLLVNS
MPK2	EQPLTDEHCKE	FFIYQILYIHSAK	VVHRDLKERNLLVNS
3mapk	DQILSEDHTQ	FFIYQILYIHSAG	VFHRDLKPCNLLVNS
5mapk	RQELTDDHTQ	YFLYQILYIHSAN	VVMHRDLKPSNILLV
MPK1	RQELSDHTQ	YFLYQILYIHSAN	VVMHRDLKPSNILLV
4mapk	EQALS	PKTIK	NLMWQLLYMHSAD
MPK3	DQKLS	DHTQYIYQILY	IHSANIIHRDLKPSN
MPK4	N-ILEE	IEKQYVYQILY	IHSCELIHRDLKPSN
ERK7A	D-ILEE	IEKQYVYQILY	MHSGDLIHRDLKPSN
ERK7C	N-ILED	IEKQYIMYQIF	IYHSGELIHRDLKPSN
1mapk	QNEINEE	HICFLMYQIIT	YHSAQIVHRDLKPK

	APE	DXWXXG
2mapk	RWYRPP	ELLYTICAMDVWS
MPK2	RWYRAPE	LLYDEKVDVWS
3mapk	RWYRAPE	LLYTTAIDMWA
5mapk	RWYRAPE	VILYTKSIDVWS
MPK1	RWYRAPE	VILYNTQAVD
4mapk	RFYRAPE	ILLYSKPIDIWS
MPK3	RWYRAPE	ILLYAKAVDMWS
MPK4	RWYRAPE	ILLYAKAVDMWS
ERK7A	RWYRAPE	ILLYTKAVDMWS
ERK7C	RWYRAPE	ILLYTKGVDMWS
1mapk	RWYRAPE	ILLYDIAVDMWS

Şekil.3.32: *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin dikey hizalaması: Genom analizi ile *T.thermophila*'da bulunan MAPK üyelerine ait katalitik bölgeler ClustalW kullanılarak dikey hizalanmıştır. Düzensiz ya da uyumsuz hizalanan bölgeler GBlocks Server kullanılarak uzaklaştırıldıktan ve manuel olarak kontrol edilmiş ve sonra Box Shade programı (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) kullanılarak hizalama son haline getirilmiştir. MAPK katalitik bölgelerinde bulunana imza dizileri hizalama bloklarının üzerinde işaret edilmiştir.

T.thermophila MAPK enzim ailesi üyelerinin protein kinaz katalitik domainlerinin pozisyonları ise **Şekil.3.33'** deki gibidir:



Şekil.3.33: *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin protein kinazlarının bölgesel konumlarının grafik gösterimi: Protein kinaz domainleri mavi renk ile vurgulanmıştır.

3.3.2. *T.thermophila* MAPK Ailesi Üyelerinin Protein Kinaz Alt-Aile Motiflerinin Tespiti Ve Analizi

Elimizde bulunan MAPK ailesine ait proteinlerin, kinaz fonksiyonuna sahip olmalarına sebep olan kor domainleri üzerinde yapılan motif taramaları ile aile üyelerinin dâhil olduğu alt aileler tespit edilmeye çalışılmıştır [23]. Buna göre motifleri taranan alt ailelere ait referans sinyal dizileri **Çizelge 3.4**'de görülmektedir. Bu motiflere göre yapılan taramada elde edilen veriler elde **Çizelge 3.5**'de gösterilmektedir. Koyu sarı ile gösterilen bölgeler pozitif uyum gösteren motifleri göstermektedir. Buna göre, örneğin; 1mapk protein dizisinde bulunan 3 ayrı motif tespit edilmiştir. Bunlar PERK MAPK(As), YERK2 FUS3(Sc) ve ERK1 ERKa(Dm) motifleridir. Mesela;

Çizelge 3.4: Kültz'ün MAPK sınıflandırması ile oluşturduğu MAPK alt ailelerine ait sinyal motifleri.

Alt Aile	Sinyal Motifi
SAPK1 SAPK(Ce)	a) LSRPFQNXTHAKRAY b) MXLDHXR[LIVM]SYLLYQM
SAPK2 p38(Ce)	c) LL[KR]X[LIVM]XHEN[LIVM]IXLLDVF[TS]P d) AVNEDCEL[KR][LIVM]LDF
YSAPK STY1(Sp)	e) MKPFSTXVLAKRTY f) AEMIEGKPLFPG g) DLPV[ED]TW[KR]VMMYSE
PERK MAPK(As)	h) ELMDTDLHXII[KR]SXQ i) HCX[FY]F[LIVM][FY]Q[LIVM]LRGL[KR]Y[LIVM]HSAN
YERK1 FUS3(Sc)	i) LSXDHXQYFXYQXLRA
ERK1 ERKa(Dm)	j) ISPFEHQT[FY]CQRTL k) K[TS]QXLSNDH[LIVM]CYFLY l) NRP[LIVM]FPGKHLYLDQLN
YERK2 SLT2(Sc)	m) CKRX[LIVM]RELKX[LIVM]XXF[KR]GHKN
MAPK3 MAPK3(Hs)	n) EQGXLXEEHA[KR]LFMY o) I[LIVM]DXHYSHKGLSEG p) LFAGAHELEQMQL

PERK MAPK(As) imzasına uyumluluk için iki adet motife uyumluluk gerekmektedir. Bu motifler sırasıyla; ELMDTDLHXII[KR]SXQ ve HCX[FY]F[LIVM][FY]Q[LIVM]LRGL[KR]Y[LIVM]HSAN'dır. 1mapk'nın her iki motife de uyumluluk yüzdesi 62'dir bu çizelgede belirtilmiştir. %50'nin altındaki benzerlik yüzdesi gösteren imza dizileri çizelgeye dâhil edilmemiştir.

Çizelge 3.5: *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin Kültz'ün sınıflandırmasına göre motif analizi

	SAPK1 SAPK	SAPK2 p38	YSAPK STY1	PERK MAPK	YERK1 FUS3	ERK1 ERKa	YERK2 SLT2	MAPK3
	a / b	C / d	e / f / g	h / i	i	j / k / l	m	n / o / p
1mapk				62 / 62	84	- / 58 / -		
2mapk		67 / 62	- / 64 / -	82 / 100	67			
3mapk		68 / 70		86 / 63	75	- / 56 / -		
4mapk		64 / -	- / 51 / -	54 / -				
5mapk		65 / 53	- / 56 / -	78 / 80	85	- / 64 / 57		- / - / 52
ERK7a			- / 58 / -	- / 64	58			
ERK7c		- / 63		70 / 60	69			
MPK1		76 / 54	- / 56 / -	71 / 87	84	- / 57 / 58		
MPK2		61 / 62		82 / 94	67			
MPK3				53 / 80	67			
MPK4				55 / 59	67			

Çizelge 3.5'de de görüleceği gibi 11 mapk sırasıyla; SAPK2 p38(Ce), PERK MAPK(As) ve YERK1 FUS3(Sc) imza dizilerine uyumluk açısından yoğunlaşmıştır. Her bir imza dizisinin MAPK üyeleri üzerindeki detaylı karşılaştırması aşağıda görülmektedir.

1. SAPK2 p38(Ce)

MOTİF c.) LL[KR]X[LIVM]XHEN[LIVM]IXLLDVF[TS]P

	LLRXXMX	HENMIXL	LLDVFS	P	
	K I V V	I I V V		T	
1mapk	IRQIK	ENHFK	HENIS	SNHIMME	-----SKNLYIVREFIDTDLHRVNF-SKQELTD 50%<
2mapk (75-93)	LRELK	LLRLLT	HENVIGLES	ILLPKSRE--EFDDIYCVSELMETDLQOIIKS-DQQLTQ 67%	
MPK2 (94-112)	LREL	LLRLLK	HENIIGINTLL	LRPSRE--KPEDIVVSELMETDLASIIKS-EQPLTD 61%	
3mapk (303-321)	LREIK	LKALE	HDNIISIRDVI	SPVPKE--KLEDIYIISQLMDDLHQQIIAS-DQIILS 68%	
4mapk (2411-2429)	LREIK	LLKFON	HDNIIKLNDI	IKPEMPT--GYKDIYLVLEymeIDLDTINS-EQALSP 64%	
5mapk (340-354)	VREIK	LLKFFD	HENIIALHDIV	PEQRT--DYNDIYIVTELMETDLHRVIYS-RQELTD 78%	
MPK1 (122-130)	VREIK	LLKFFE	HENIISLLDVEK	PNAPV--GDEDIYMVFDLMETDLHRVIYS-RQELSD 76%	
ERK7a	VMFLQ	ELNGRE	HENIVKLLNIIKAE	-----NNKDLYLVDFMETDLHAVIRA-D-ILEE 50%<	
ERK7c	FREIM	ELQELD	HENIIVINVERAK	-----NDRDIYVVFeyMDTDLHAVIRV-N-ILED 50%<	
MPK4	FREV	ELQELNGHENI	IRLNI	IIKAE-----NNKDLYMVDFMETDLHAVIRA-N-ILEE 50%<	
MPK3	LREIR	ELRYLV	HENIQ	LSLDILYDDEDENQEPGTIYLVTVNymeIDLQVIKS-DQKLSDD 50%<	

*.

:

MOTIF d.) AVNEDCEL[KR][LIVM]LDF

Sequence alignment for Motif d. The motif sequence is **AVNEDCELRLMDF**, with conserved residues highlighted in red. Conservation percentages are shown on the right.

1mapk (148-167)	TYQILSA-----LFFLHSONVYHTQLRLSNI LLNKNCDLKI	SRF-----I	62%
2mapk (158-170)	IYQILRG-----LKYIHSANVIHRDLKPRNLLVNSNCDLKI	CDLFGGLARSVAN---	62%
MPK2 (177-189)	IYQILRG-----LKYIHSAKVVHRDLKPRNLLVNSNCDLKI	CDLFGGLARTIIP---	62%
3mapk (396-408)	IYQLLCLGLKYVNGIYYFLKYIHSAGVFHRDLKPGNLLVNSDCVVKI	CDLFGGLARTVDT---	70%
4mapk	MWQLLNG-----IFYMHSADIHRDIKPSNILLNKNCTLKLDADMNLARKFDVEQS		50%<
5mapk (391-403)	LYQTLRG-----MLYIHSANVMHRDLKPSNILLVKNCDLKVCDL	LGLARGFEF---	53%
MPK1 (195-207)	VYQILRG-----LLYIHSANVIHRDLKPSNILLNKNCDLKI	CDLFGGLARGFEE---	54%
ERK7a	MYQILKA-----LKYMHSAGDLIHRDLKPSNILLNSECHVVKLADF	GLARSVAQ---	50%<
ERK7c (142-154)	MYQIFRA-----IKYIHSAGELIHRDLKASNILLVNSDCMVKVADF	GLVRSIAN---	63%
MPK4	VYQILKA-----MKYIHSAGELIHRDLKPSNILLNSECLVKLADF	GLARSVAV---	50%<
MPK3	FTQIVNG-----LAYIHSRNIIHRDLKPSNILLDQNLNPKIADF	TLRQNTTANF	50%<

Conservation patterns: : . . . : : : * * : * : : : * * . . : : . . :

1. PERK MAPK(As)

MOTIF h.) ELMDTDLHXII[KR]SXQ

Sequence alignment for Motif h. The motif sequence is **ELMDTDLHXIIKS XQ**, with conserved residues highlighted in red. Conservation percentages are shown on the right.

1mapk (128-142)	HFK-HENISSNLHIMM-----ESKNLYIVRE	FLDITDLHRVNF	S-KQELTDD	62%	
2mapk (107-121)	LLT-HENVIGLESILLPKSRE--EFDDIYCVSE	ELMETDLQQI	IKS-DQQLTQD	82%	
MPK2 (126-140)	LLK-HENIIIGINTLLPRPSRE--KFEDIYVVS	ELMETDLAS	IIKS-EQPLTDE	82%	
3mapk (335-349)	ALE-HDNIISIRDVLSVPKPE--KLEDIYIIS	ELMDTDLHQ	IIKS-DQILSED	86%	
4mapk (2443-2457)	FCN-HPNIIKLDIIKPEMPT--GYKDIYLVLE	YMEIDLD	DKTINS-EQALSPK	54%	
5mapk (340-354)	FFD-HENIIALHDIIVPEQRT--DYNDIYIVT	ELMETDLHRV	YS-RQELTDD	78%	
MPK1 (144-158)	FFE-HDNIISLLDVIKPNAPV--GDEDIYMVFT	ELMETDLHRV	YS-RQELTDD	71%	
ERK7a	-----	ELMETDLH	AVIRA-D	ILEEI	50%<
ERK7c (92-106)	ELD-HENIIKVINVIRAK----NDRDIYVVF	EYMDTDLH	AVIRV-N	ILEDI	70%
MPK4 (255-269)	ELNGHENIIIRLINIKA-----NNKDLYMVFT	ELMETDLH	AVIRA-N	ILEEI	55%
MPK2	HLS-HPNVMKIQNIYYNKELEH-NFDRIYIVM-	EYYPFS	LFDI	LYQYQNLTWS	50%<
MPK3 (121-135)	YLV-HENILQLSDILYDDEDENQDFGTIYLVV	YMEIDLY	QV	IKS-DQKLSAQ	53%

Conservation patterns: . * . . . * . . . *

MOTIF l.) HCX[FY]F[LIVM][FY]Q[LIVM]LRGL[KR]Y[LIVM]HSAN

Sequence alignment for Motif l. The motif sequence is **HCX[FY]F[LIVM][FY]Q[LIVM]LRGL[KR]Y[LIVM]HSAN**, with conserved residues highlighted in red. Conservation percentages are shown on the right.

1mapk (148-167)	CXYFYQMLRG FYFYQILSA	LFFLHSONVYHTQLRLSNI	LLNKNCDLKI	SRF----	62%
2mapk (127-146)	CKFFIYQILRG	LKYIHSANVIHRDLKPRNLLVNSNCDLKI	CDLFGGLAR		100%
MPK2 (146-165)	CQFFLYQILRG	LKYIHSAKVVHRDLKPRNLLVNSNCDLKI	CDLFGGLAR		94%
3mapk (355-374)	IQFFIYQLLGLKLYVNGIYYFLKYIHSAGVFHRDLKPGNLLVNSDCVVKI	CDLFGGLARTVDT---			63%
4mapk	IKNIMWQLLNG	IFYMHSADIHRDIKPSNILLNKNCTLKLDADMNLAR			50%<
5mapk (360-379)	IYFVYQILRG	MLYIHSANVMHRDLKPSNILLVKNCDLKVCDL	LGLARGFEF---		80%
MPK1 (164-183)	IYFVYQILRG	LLYIHSANVIHRDLKPSNILLNKNCDLKI	CDLFGGLAR		87%
ERK7a (18-37)	KKYIMYQILKA	LKYMHSAGDLIHRDLKPSNILLNSECHVVKLADF	GLARSVAQ---		64%
ERK7c (111-130)	KQYIMYQIFRA	IKYIHSAGELIHRDLKASNILLVNSDCMVKVADF	GLVRSIAN---		60%
MPK4 (274-293)	KQYVYQILKA	MKYIHSAGELIHRDLKPSNILLNSECLVKLADF	GLARSVAV---		59%
MPK3 (141-160)	IYIYQILKA	LKYLHSANIIHRDLKPSNILLATEKCAIRMCDFGLSR			80%

Conservation patterns: : . . . : : : * * : * : : : * * . . : : . . :

3.YERK1 FUS3(Sc) MOTİF i.) LSXDHXQYFXYQXLRA

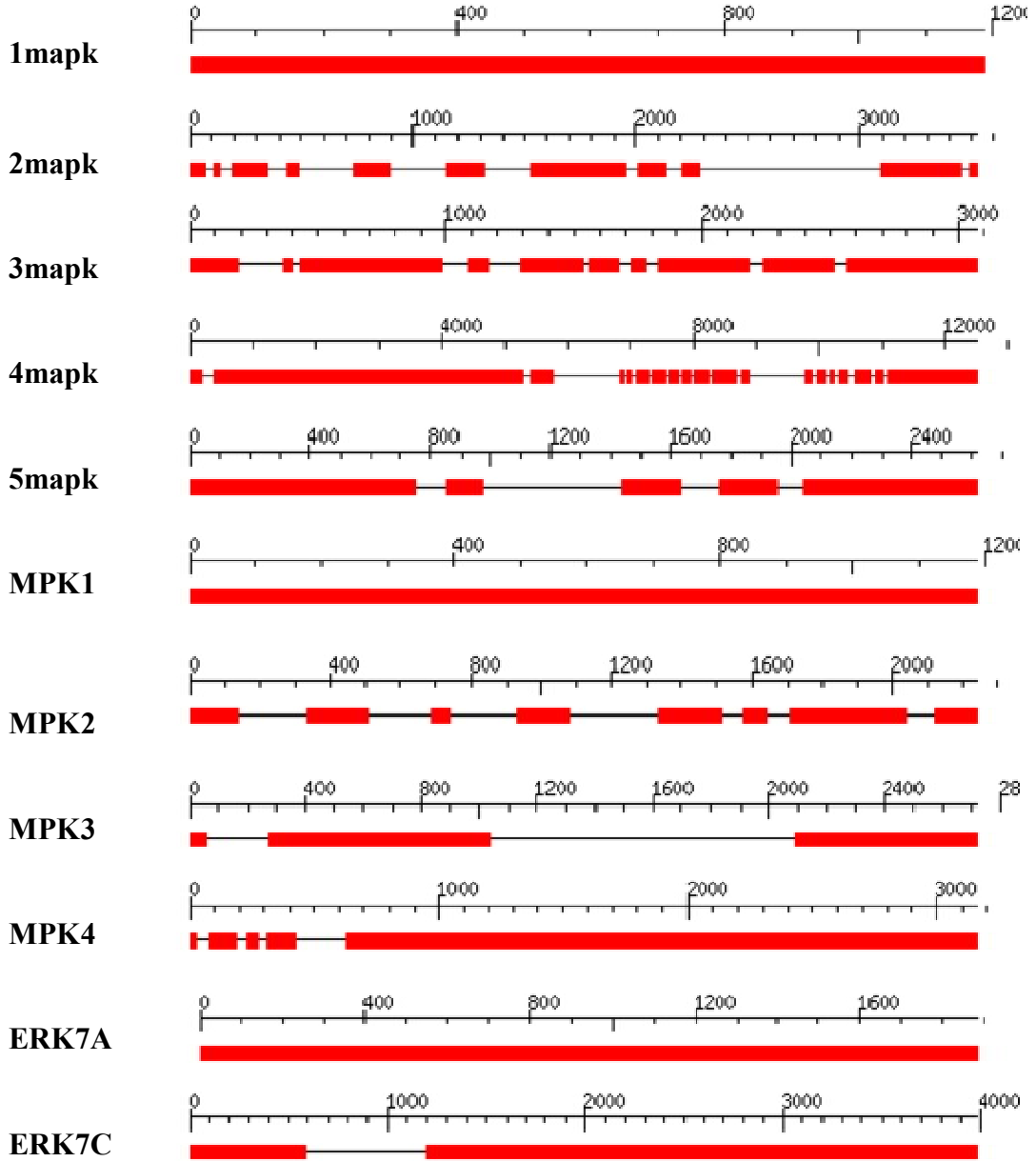
		LSx ⁺ DH	xQYF ⁺ xYQ ⁺ xLRA		
1mapk (144-159)	ESKNLYIVREFIDTDLHRVNFs-KQEL	TD ⁺ DH	IQYFTYQIL ⁺ SA	-----LFFLH	84%
2mapk (123-138)	EFDDIYCVSELMETDLQQIIKS-DQQL	TD ⁺ DH	CKFFIYQIL ⁺ RG	-----LKYIH	67%
MPK2 (351-366)	KFEDIYVVSELMETDLASIIKS-EQPL	TD ⁺ EH	QFFLYQIL ⁺ RG	-----LKYIH	67%
3mapk (335-349)	KLEDIYIISQLMDDLHQIIAS-DQIL	LS ⁺ EDH	IQFFIYQILL ⁺ CC	LKYV ⁺ NQIYYFLKYIH	75%
4mapk	GYKDIYLVLEymeIDLKDTINS-EQAL	LS ⁺ PK ⁺ TI	IKNLMWOLL ⁺ NG	-----IFYMH	50% ^{<}
5mapk (356-371)	DYNDIYIVTELMETDLHRVIYS-RQEL	TD ⁺ DH	IQYFLYQTL ⁺ RG	-----MLYIH	85%
MPK1 (160-175)	GDEDIYMVFDLMETDLHRVIYS-RQEL	LS ⁺ DEH	IQYFVYQIL ⁺ RG	-----LLYIH	84%
ERK7a (14-29)	-----METDLHAVIRA-D-I	LE ⁺ TH	KKYVMYQIL ⁺ KA	-----LKYMH	58%
ERK7c (107-122)	NDRDIYVVFeyMDTDLHAVIRV-N-I	LE ⁺ TH	KQYIMYQIL ⁺ KA	-----IKYIH	69%
MPK4 (270-285)	NNKDLYMVFDFMETDLHAVIRA-N-I	LE ⁺ TH	KQYVYQIL ⁺ KA	-----MKYIH	67%
MPK3 (137-152)	EPGTIYLVNTymeIDL ⁺ YQVIKS-DQK	LS ⁺ DOH	IQYIYQIL ⁺ KG	-----LKYLH	67%
	. *	:	: . : . .	: : : *	

3.2.3. *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin gen yapısı analizi

T.thermophila'ya ait MAPK dizilerine ait genomik DNA ve cDNA bilgisi TIGR resmi internet sitesinden (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ttg/>) elde edilmiştir. Bu bilgiye dayalı olarak aşağıdaki mukayeseli çizelge (Çizelge 3.3) ve ekson intron bilgisinin grafik gösterimi (Şekil 3.34) elde edilmiştir. MAPK proteinlerinin subselüler lokalizasyonları ise web tabanlı CELLO V.2.5 programı (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) kullanılarak tahmin edilmiştir.

Çizelge 3.6: *T.thermophila*'ya ait MAPK dizilerine ait genomik DNA ve cDNA bilgisi

Erişim Numarası	Kod	AA uzunluğu	gDNA/cDNA uzunluğu(bç)	İntron Sayısı	Subselüler Lokalizasyonu	Alt Aile
TTHERM_00204120	1mapk	420	1263 - 1263	0	Nükleus	ERK
TTHERM_00760270	2mapk	539	3517 - 1620	10	Nükleus	ERK
TTHERM_00689900	3mapk	795	3067 - 2388	9	Nükleus	ERK
TTHERM_00492370	4mapk	3043	12498-9132	18	Nükleus	ERK
TTHERM_00195990	5mapk	608	2612 - 1827	4	Nükleus	ERK
TTHERM_00469230	MPK1	394	1185 - 1185	0	Stoplazma/Nükleus	ERK
TTHERM_00760190	MPK2	403	2236 - 1212	7	Nükleus	ERK
TTHERM_00660130	MPK3	482	2714 - 1449	2	Nükleus	Unclassified
TTHERM_00575520	MPK4	944	3155 - 2835	4	Nükleus	ERK7
TTHERM_00355550	ERK7A	626	1881 - 1881	0	Nükleus	ERK7
TTHERM_00537240	ERK7C	1119	3975 - 3360	1	Nükleus	ERK7



Şekil 3.34: *T.thermophila*'ya ait MAPK dizilerine ait genomik DNA ve cDNA bilgisinin grafik gösterimi: Genlerde bulunan ekson bölgeleri koyu çizgilerle, intronlar ise ince çizgilerle gösterilmiştir.

3.2.4. *T.thermophila* MPK4 geninin ve diğer MAPK seti üyelerinin tahmini protein yapılarının analizi

11 MAPK protein dizisi, internet tabanlı Swiss-Model servisi kullanılarak [63] First Approach yaklaşımı ile üç boyutlu olarak modellenmiştir. Elde edilen modellemeler için kalıp olarak seçilen model proteinler ve bu proteinlere benzerlik yüzdeleri **Çizelge 3.7**'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.7: SwissProt servisinin yaptığı homoloji modellemesine göre kullanılan kalıp proteinler ve hedef proteinler arasındaki kıyaslama çizelgesi.

Hedef	Kalıp	Dizi Benzerliği (%)	e Değeri	Modellenen Aminoasit Aralığı	Protein Büyüklüğü (aa)
2mapk	3erkA	48	1.04322 e ⁻⁸⁴	24 - 352	539
3mapk	3erkA	46	3.69326e-83	247 - 596	795
4mapk	3erkA	39	4.66861e-58	2349 - 2700	3043
5mapk	3erkA	51	7.24e-96	249 - 588	608
Erk7A	2gphA	47	1.39e-57	1 - 227	394
Erk7C	2gphA	45	2.42696e-72	12 - 321	403
MPK1	3erkA	50	3.07776e-92	55 - 392	482
MPK2	3erkA	45	8.52085e-81	34 - 397	944
MPK3	1p38A	47	2.98266e-37	24 - 193	626
MPK4	2gphA	46	5.36808e-74	174 - 472	1119

Elde edilen modellemelerden Erk7A ve MPK3 için tüm aminoasit dizisini kapsayacak şekilde bütünsel bir model elde edilememiştir. Bununla birlikte modellemeler için kalıp olarak; 3erkA, 2gphA ve 1p38A modelleri kullanılmıştır. Görüntüleme modülü olarak DeepView/Swiss-PdbViewer [67] kullanılmıştır. Elde edilen modellerin çoğu klasik MAPK katlanmasına uygun olarak oluşturulmuştur.

3.2.4. *T.thermophila* MPK4 geninin ve diğer MAPK seti üyelerinin substrat bağlanma bölgelerinin analizi

T.thermophila MAPK enzim ailesi seti üyelerine ait aminoasit dizileri ve diğer protista üyelerine ait MAPK üyeleri aminoasit dizilerinin karboksil terminal uçlarının, içerdikleri muhtemel bağlanma bölgeleri (MAPKK ve substrat) bakımından biyoinformatik analizinde 79 aminoasit dizisi kullanılmıştır. İlk olarak, MAPK'lerin substratları ve aktivatörleri ile etkileşimlerinde önemli bir yeri olan CD bölgesi araştırılmıştır. Bunun için CD bölgesi deneysel olarak belirlenmiş bazı MAPK'lerin C terminal uçları, bu analizde referans dizileri olarak kullanılmıştır. Şekil 3.35'de bu analizlerde kullanılan referans dizileri ve içerdikleri CD bölgesi motifleri dikey hizalanmış bir şekilde görülmektedir.

JNK2b2 (Hs)	HPYITVWY <u>DPAE</u> AEA
JNK1b2 (Hs)	HPYINVWY <u>DPSE</u> AEA
JNK3a2 (Hs)	HPYINVWY <u>DPAE</u> VEA
FUS3 (Sc)	HPYLQTYH <u>DPNDE</u> PE
SUR1 (Ce)	HPYLEQYY <u>DPGDE</u> PV
ERK1 (Rn)	HPYLEQYY <u>DPTE</u> EPV
ERK1 (Hs)	HPYLEQYY <u>DPSDE</u> EPI
p38 (Ce)	HEYLAAYH <u>DETE</u> EPI
SPK1 (Sp)	HPYVAAYH <u>DASDE</u> PT
SPM1 (Sp)	HPYLAVWH <u>DPSDE</u> PV
ERK6 (Hs)	HPYFESLH <u>DETE</u> EPQ
HOG1 (Sp)	HNYLAPYH <u>DPTE</u> EPV
HOG1 (Sc)	HPYSAPYH <u>DPTE</u> EPV
p38 (Cf)	HAYFAQYH <u>DPDE</u> EPV
p38b (Hs)	HAYFSQYH <u>DPEDE</u> PE

Şekil 3.35: C terminal uçlarının hizalanmasında kullanılan referans dizilerine ait dikey hizalama klasik: MAPK CD motifi Dxx(DE) içeren bölgeler kalın ve altı çizili olarak vurgulanmıştır.

Araştırılan CD bölgesi aminoasit dizilerinin C terminalinde olduğu için sadece karboksil uçları kullanılmıştır. Karboksil ucu sınırından itibaren analize alınan diziler öncelikli olarak internet tabanlı ExPASy sitesindeki “3 of 5 Complex Pattern Search” programı [64] kullanılarak uzlaşma dizisinin varlığı Dxx[DE] için taranmıştır. Analiz sonucunda 14 referans dizisi dışında sadece 28 dizide bu motife rastlanılmıştır. Bu da dizilerin yaklaşık olarak yarısında Dxx[DE] motifinin olduğu anlamına gelmektedir. Tespit edilen motiflerin karboksil terminali üzerindeki konumlarının birbirlerine göre mukayesesi için ve de bilinen CD motifi -Dxx[DE]- dışında oluşmuş olabilecek asidik karakterli aminoasitlerin dağılımını görebilmek için tüm diziler Clustal W programı kullanılarak dikey hizalanmıştır (Şekil 3.36).

Tth_4mpk	HE YFKD FDKS QIKA-CNHKFDWTF DE IQ ERNDLIQRAIYNE SCQFHQD
MAPK_Ta	HPYLSNFHKNTPLPRLSRAISIPVCDNVKYDLINRYHLIYKFIQSNNS
MAPK_Bb	HE YFRE FYK PQHVE IPT EQLVTPFNDWINMSESQLRYAFLREIQRYHP
MAPK2_Tp	HPYFKSISKPRNFD SIPKVTLPFNDWVNMS SQLRY SFLREIQRYHK
MAPK2_Ta	HPYFKSISKPRNFD SIPKVTLPFNDWVNMS SQLRY SFLREIQRYHK
MAPK4_Tb	HAYFAKFRNPAAE TGAKE PYVWRHNEGLTLEGLREEMWRIILAHSPGP
Tth_3mpk	HPFFE GIRESEFEVEAKV-KFD DFEREDITLDELKDAIQEMLKFHP
MPK6_Pt	HPMLQKVRDKKKEIVAPG-PIILD FEQEGELQIPRLRELFLREISKYK
MPK13_Pt	HPMLQKVRDKKKEIVAPG-PIILD FEQEGELQIPRLRELFLREISKYK
MPK12_Pt	HPMLQKVRDKKKEIIVAPG-PIYLD FEQEGDLQIPRLRELFLREISKYK
MPK10_Pt	HPMLQKVRDKKKEIIVAPG-PIYLD FEQEGDLQIPRLRELFLREISKYK
ERK3	HPYMSIYSFPT DEPISSHPF-HIEDE VDDINWERYHDCQFSEHDWPIH
Tth_MPK3	HPYFQSIRDVQEEIKFTG-TINFDFETDSEITIE SLRKQILEEVNHFR
MAPK2_Pv	HPYLDVVRKTKLESFTASKIILPFDWMMMLSETQLRYIFLKEIQSFHP
MAPK2_Pf	HPYLDVVRKENLENFSTEKIILPFDWMMVLS ETQLRYIFLKEIQSFHA
ERK7	HPYVQRFHCPDREWTRGS DVRLPVHEGDQLSAP EYRNRLYQMILERRR

Şekil 3.36 : Clustal W kullanılarak yapılan dikey hizalamda CD bölgesi motifi Dxx[DE] tüm hizalama içinde YEŞİL ile vurgulanmıştır. Bunun dışında CD motifi oluşturması muhtemel asidik kümeleşmelerin tespiti için asidik karakterli D ve E aminoasitleri SARI renk ile vurgulanmıştır. Dxx[DE]’den farklılık gösteren ancak diziler arasında korunmuş olduğu belirlenen [DE]xx[DE] motifleri MOR ile vurgulanmıştır.

MAPKp_Bb HPYVRSFHKSNDSIPVMYKAVKIPICDNVKYDVANYRRLIYKFI EEKR
MAPK2_Lm HPYVAAFHRPDEEAVAPEPITVSLPDSQRLPLAKYRDAIYEQIAALRR
Tth_MPK2 HPYLSLHLHPEDEPTCEPVSCLDFEFEHNLTLQQLKGIITSKFVSK
Tth_lmapk HPYLSLHLHPEDEPSRSEVPPFYEFEFEMHSNLTRQQYKDLVYEIILY
ERK7c HPYVVRQFHNPNDEPVCGRIIQIPLDDNKKYSMRFYRDKLLEYEISPRKN
ERK7a HRYVAEFHNPAEEHVCSKPIQIPLNDHEKFSIRKYRESLYADINERKK
MPK19_Pt HPYLKEFYNPKEEITFKGQLMLKLQDDKQYPVSYQRD LLYKQNLDLNK
MPK21_Pt HPYLKEFYNPKEEITFKGQLMLKLQDDKQYPVSSYRD LLYKQNLDLTK
ERK8 HPYVQRFHCPSEDEWAREADVPRPRAHEGVQLSVPEYRSRVYQMILECGG
Tth_MPK1 HPYFEGHLHYPDEEPECEQVFDWSWDKFTPTKEIILQKMIYQEAKSFHPI
ERK1_Pt HPYFEGHLHNPDEEPICECTFDWGWDSFKPTAAILKQMVYEE SLSFHL
MPK16_Pt HRYVKEFKNCEDETKRDSPFETYMDNDRKYSIKYQNFLYNRIVQKKR
MPK14_Pt HPYVKEFKGTEDESISRESPIETYMDNHNKQVNOYRDALYSHIMQKRK
MPK1_Pt HPYMAEFAGSEEEETVIDFPVQTFMDDNVQYSIEEYMTALYQHINQKTQ
MPK22_Pt HPYIAEFAGSEDENVIDFPFIQTFMDDNVQYSIEEYMTTLYQHINQKNT
MAPK3_Tg HPFFKEVRIAEEVETNATEKVRLPFNDWMNDEPQLRYAFVKEIQRYHP
MPK7_Pt HPYFSKFHNEVDEPSSSEKIIITLAI DDNQKFSANEYRDKLYEEIA----
MPK24_Pt HPYFSNFHNVEDDEPISDKIITLAI DDNEKFTANEYRDKLYEEIA----
MPK9_Pt HPYVNAFHNEQQEPTANP-IKISMNDNKKFSIKYREALYLEITKKYD
MPK11_Pt HPYVGAFFHNNQEGTTNP-IIISMDDNKKFSIKYREALYLQISKKYE
MAPK2_Tb HPYVAAFHKPQDEPSAPAPITISLPPDTRFTMQEYRERLYQEIANARR
Tth_2mapk HPFFEGIRESEFEVEAKV-KFDFDFEREDITLDELKDAIYQEMLKFR
Tth_MPK4 HPYVKDFHCPDEEIVCGRVIPI SMNDNKKFSIKYREALYQNIYQEKR
MPK2_Pt HPYVKDFKGTEDESISRDSPIETFMDDNHNKYSVKEYRDNLYAHINQKKK
MPK8_Pt HKYLKEFSSPDEEIECSEPIRIPMNDNKKFSIKYREALYNDINRRKK
MPK23_Pt HKYLKEFSSPDEEIECSEPIRIPMNDNKKFSIKYREALYNDINRRKK
MPK3_Pt HKYVRDFSSPDEEIVCQHPIRITMNDNKKFTIKYREALYADISQRKK
MPK4_Pt HKYVRDFSSPDEEIVCQHPLRITMNDNKKFTIKYREALYADISQRKK
MAPK2_Tg HPYVVRQFHSPDEPVCCKIIAIIPI DDNTKYSVE DYRDKVYSEVIKRRK
MPK15_Pt HKYVIEFSSQPDDEEIVSLQPFKISMNDNKKFTIKDYRESLYDISKRKK
MPK5_Pt HQIMMEFANTDEEKTTLKQNIKIPFNENKKLTIKDYRDKITLNC EQILQ
MPK18_Pt HQLMKEFSNTEDEKTLKSIIRIPFSENKKLTIKDYRDKITLNC EQILQ
MPK20_Pt HSLMKEFANTDEEKTTLKSIIRIPFSENKKLTIKDYRDKITLNC EQILQ
ERK2_G1 HPYLSKFDHPATEPSAPGPIKISIDDDDKRSVSEYRDL LLYSEILRKKK
Tth_5mpk HPYFEGHLHNPDEEPTCEPVDWAWDDDFELTKERLQGMVYDEAIDYQKV
ERK2_Pt HPYFDGLHSDDEPICDSVFDWSWDKME LKKEILQSAVYDEATQWQQK
ERK3_Pt HPYFDGLHSDDEPICDSVFDWSWDKME LKKEILQSAVYDEATQWQQK
ERK4_Pt HPYFEGLHSDDEPRCNSYFDWAWDKME LKKEILQQTVDYDEANQWQQK
ERK5_Pt HDYFDGLHNPEAEPRCDKVFWDGWDFNFKRET LQKMYEESLQFNVP
ERK6_Pt HPYFDELHNPDEEPLSGKAFDWSWDFNFPTEKELLQNM IYQESLSFNDE
ERK7_Pt HPYFDELHNPDEEPLSGKAFDWSWDFNFPTEKELLQNM IYQESLSFNDE
ERK2_G1 HPYLSKFDHPATEPSAPGPIKISIDDDDKRSVSEYRDL LLYSEILRKKK
Tth_lmapk HPYFEDLYDLDDIDECDVKFDHSQFQIGLNEDEIMKEIYFEVEKSYQK
MPK17_Pt HPYVGAFFHNDNQESTTNP-IIISMDDNKKFSIKYREALYLEITKKYET
JNK2b2_(Hs) HPYITVWYDPAEAEAPPPQIYDAQLEEREHAI EWKELIYKEVMDWEF
JNK1b2_(Hs) HPYINVWYDPSAEAPPPKIPDKQLDEREHTIE EWKELIYKEVMDLEF
JNK3a2_(Hs) HPYINVWYDPAEVEAPPPQIYDKQLDEREHTIE EWKELIYKEVMDNSEF
FUS3_Sc HPYLQTYHDPNDEPEGEPIPPSFFFEFDHYKEALTTKDLK KLIWNEIFS
SUR1_(Ce) HPYLEQYYDPGDEPVCEEPFTLEMEFDDL PKEKLELWEEAEAHHR
ERK1_(Rn) HPYLEQYYDPTDEPVAAEPPFTFDMELDDL PKERLKE LIFQETARFQPG
ERK1_(Hs) HPYLEQYYDPSDEPIAEAPFKFDMELDDL PKEKLELIFEE TARFQPG
p38_(Ce) HEYLAAYHDETDEPIAEEMDLNDDVRADTI DEWKKIWE EISDFQKN-
SPK1_SCHPO HPYVAAYHDASDEPTASMPNNLV DLYCNKEDLEI PVLKALIFREVNF
SPM1_SCHPO HPYLAVWHDPSDEPVCD SVFD FSFEYIEDANE-LRRVILDEV LNFQRK
ERK6_(Hs) HPYFESLHDTDEDPQVQKYDDSDVDV DRTLDEWKRVTYKEVLSFKPP-
HOG1_SCHPO (Sty) HNYLAPYHDPTDEPVADAEVFDWSFQNDLPVETWKVMYSEVLSFHNM
HOG1_Sc HPYSAPYHDPTDEPVADAKFDWHFNADLPVD TWRVMYSEILDFHKI
p38_(Cf) HAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFE SRDLLI DEWKS LTYDEVVSF-VPP
p38b_(Hs) HAYFSQYHDPDEPEAEAPYDESVEAKERTLE EWKELTYQEVLSF-KPP
MAPK4_Lm HPYFSKYRDAAEADAFDPFVWNHSHIETKEQLREDLWRVVEAHSQLN
SMK1_Sc HPFLNEVRKPDDEPVCLQGPFDFTYSEELNSMSKLRDYLVEEVKNFRKT

Şekil 3.36 (Devam): Protista MAPK'leri ile CD Bölgesi Tanımlanmış MAPK Dizilerin C Terminal Uçlarının Dikey Hizalaması: Clustal W kullanılarak yapılan dikey hizalamda CD bölgesi motifi Dxx[DE] tüm hizalama içinde YEŞİL ile vurgulanmıştır. Bunun dışında CD motifi oluşturması muhtemel asidik kümeleşmelerin tespiti için asidik karakterli D ve E aminoasitleri SARI renk ile vurgulanmıştır. Dxx[DE]'den farklılık gösteren ancak diziler arasında korunmuş olduğu belirlenen [DE]xx[DE] motifleri MOR ile vurgulanmıştır.

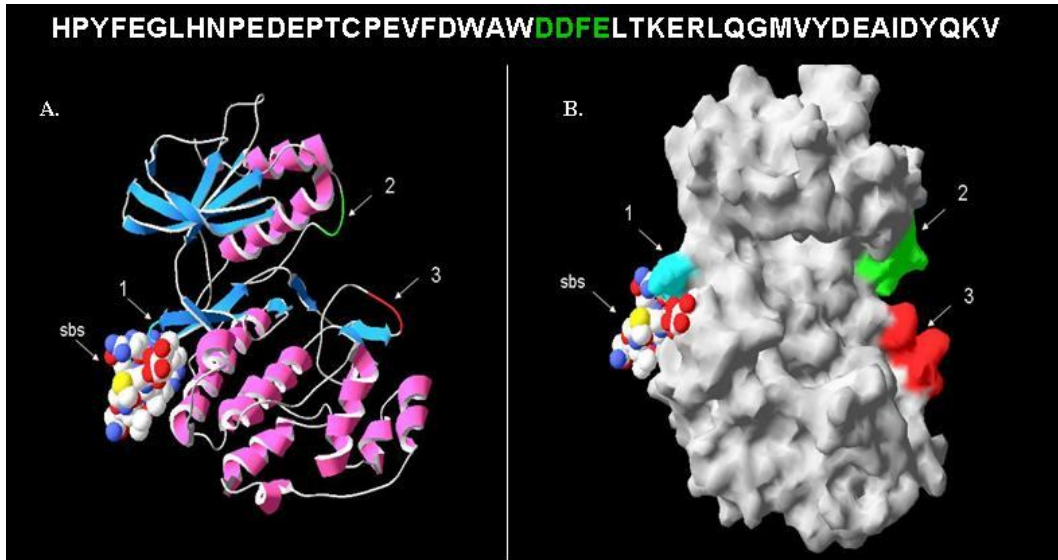
Hizalama sonucunda önceden tespit edilen CD motiflerinin çoğunun referans dizilerinin içerdiği motifi ile aynı pozisyonda olmadığı görülmüştür. Protist dizilerinden sadece MAPK4(Lm), MPK17(Pt), Tth 1mapk dizilerinin aynı konumda CD motifine sahip olduğu belirlenmiştir. Geri kalan CD motifleri referans dizilerindeki motiflere göre daha uzak bölgelerde hizalanmıştır. CD motifine sahip olmayan dizilerde görülen asidik aminoasitlerin (D ve E) dikey hizalamada oluşturduğu kümeleşmeler, bilinen CD motifinin konumuna yakınlıkları bakımından dikkate alındığında ise iki grup kümeleşmenin belirgin olduğu dikkat çekmiştir. Bunun dışında genel olarak C terminal ucunda çok sayıda asidik aminoasitin bulunduğu ve genellikle konumsal olarak benzer pozisyonlarda buldukları gözlemlenmiştir. Sonuç olarak CD bölgesini oluşturan bilinen asidik yama Dxx[DE] motifinin konumu dışında asidik yama oluşturmaya uygun oluşumların konumlandığı iki çeşit gruplaşma belirlenmiştir. Bu kümeleşmeler motif formatında [DE]xx[DE] ve [DE][DE]E olarak ifade edilebilirler. Bu bölgelere ilave olarak Dxx[DE] motifini oluşturan ancak konum bakımından klasik CD bölgesinden uzakta oluşan bir grup daha vardır. Gözlemlenen tüm belirgin gruplaşmalar tez boyunca kolaylık olması bakımından **Uzak CD: (Dxx[DE])**, **Grup I: ([DE][DE]E)** ve **Grup II: [DE]xx[DE]** olmak üzere üç başlık altında toplanmıştır.

Uzak CD: Klasik CD bağlanma motifi Dxx[DE]'dir. Konumu bakımından olması gereken pozisyonda bulunan ve bu bölgeden uzakta olanlar olmak üzere iki grup oluşum söz konusudur. **Şekil 3.37'**de doğru pozisyonlu ve uzak pozisyonlu CD bölgeleri görülmektedir.

MPK5_Pt	HQIMMEFANTEEEKTLKQNIKIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK18_Pt	HQLMKEFSNTEDEKTLKSIIRIPFSENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK20_Pt	HSLMKEFANTEDEKTLKSIIRIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK24_Pt	HPYFSNFHNVDEEPI SDKIITLAI DDNEKFTANEYRDKLYEEIA----
Tth_5mpk	HPYFEGHLNPEDEPTCPEVFDWAWDDFELTKERLQGMVYDEAIDYQKV
ERK4_Pt	HPYFEGHLHSKEDEPRCNSYFDWAWDKMELKKEILQQTVYDEANQWQQK
ERK2_G1	HPYLSKFHDPATEPSAPGPIKISIDDDDKRSVSEYRDLLEYSEILRKKK
JNK2b2_(Hs)	HPYITVWYDPAAEAEAPPQIYDAQLEEREHAIEEWKELTYKEVMDWEE
FUS3_Sc	HPYLQTYHDPNDEPEGEPIPPSFFEFHDHYKEALTTKDLKLIWNEIFS
SUR1_(Ce)	HPYLEQYYDPGDEPVCEEPFTLEMEFDDLKPEKELKELIWEEAEAHHR
ERK1_(Hs)	HPYLEQYYDPSDEPIAEAPFKFDMELDDLKPEKELKELIFEETARFQPG

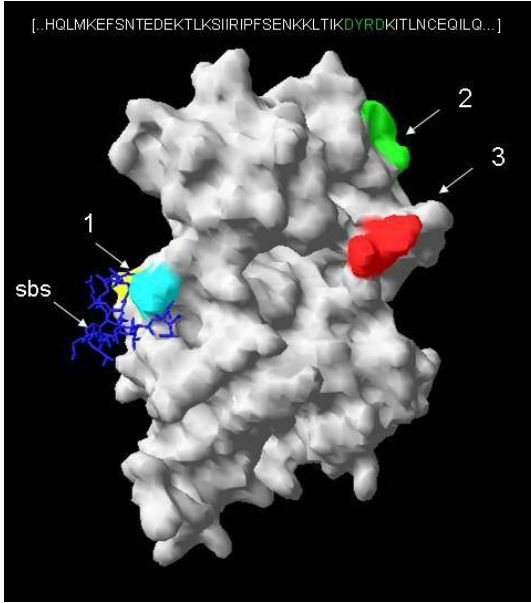
Şekil 3.37: Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve Uzak CD bölgeleri: Referans dizileri SİYAH ile vurgulanırken CD motifi içeren diğer bölgeler GRİ ile vurgulanmıştır. Referans dizileri ile diğerleri yatay bir çizgi ile birbirinden ayrılmıştır.

Hizalamalarda da görüldüğü gibi klasik CD motifi referans dizilerindeki pozisyonu ile kıyaslandığında daha uzakta konumlanmışlardır. Bu bölgelerin, CD bölgesi'nin olması gereken hidrofobik olukta bulunup bulunmadığının ve de MAPK substratları ve aktivatörleriyle elektrostatik etkileşime girip giremeyeceğinin teorik olarak tahmin edilebilmesi için Tth5mapk ve MPK18_Pt temsilci diziler olarak seçilmiş ve Swiss Prot, Project yaklaşımıyla homolog modelleri oluşturulmuştur. Dizilerin modellenmesinde referans dizi olarak ERK2 (PDB ID:2GPH) kullanılmıştır. Zhou, T ve arkadaşlarının [65] yaptığı kristalografi çalışması ile elde edilen bu modelde ERK2; CD bölgesine bağlanmış sentetik bir peptit (2GPH_B) ile birlikte dir. Peptid MAPK substratları ve aktivatörlerine ait D bölgesi uzlaşma dizisini ((R/K)₁₋₂-(X)₂₋₆-Ø_A-X-Ø_B) içeren 16 aminoasitlik bir peptittir (RLQERRGSNVALMLDC) [65]. Elde edilen sonuçlara göre Tth_5mapk dizisinde bulunan ve CD bölgesine uygun motif taşıyan bölgedeki DDFE dizisi **Şekil 3.38**'de de görülebileceği gibi (Ok2, Yeşil Bölge) üç boyutlu modellemede TxY fosforilasyon motifine (Ok3, Kırmızı bölge) çok yakın bir bölgede konumlanmıştır. Hâlbuki klasik MAPK'lerde CD bölgesi, ED bölgesine (Ok1, Açık Mavi Bölge) yakın bir yerde yani TXY motifinin bulunduğu bölgenin sırt kısmında yer alması beklenen bir bölgedir.



Şekil 3.38: Tth_5mapk aminoasit dizisinin 3B modeli üzerinde potansiyel CD bölgelerinin gösterimi: A: Tth5mapk'in ERK2 model alınarak oluşturulan modellemesinin kurdela gösterimi. **B:** Tth5mapk'in ERK2 model alınarak oluşturulan modellemesinin yüzey gösterimi. **1:** Substrat bağlanma bölgelerinden biri olan ED bölgesinin muhtemel pozisyonu (Açık Mavi). **2:** Dxx[DE] motifine uygun DDFE dizisinin muhtemel pozisyonu (Yeşil), **3:** TxY fosforilasyon motifinin muhtemel pozisyonu (Kırmızı), **sbs:** D bölgesi bağlanma dizisine ait uzlaşma dizisini taşıyan peptidin pozisyonu.

Aynı şekilde MPK18_Pt'de görülen DYRD dizisi de protein üzerindeki muhtemel pozisyonu bakımından analiz edilmiştir. Buna göre DYRD dizisi yine TXY motifine yakın bir bölgede konumlanmıştır (Şekil 3.39).



Şekil 3.39: MPK18_Pt aminoasit dizisinin 3B modeli üzerinde potansiyel CD bölgelerinin gösterimi: MPK18_Pt'in ERK2 model alınarak oluşturulan modellenmesinin kurdela gösterimi. Substrat bağlanma bölgesinde (CD) olması gereken 2 ile işaretli DYRD bölgesi TXY fosforilasyon bölgesine yakın görülmektedir. **1:** Substrat bağlanma bölgelerinden biri olan ED bölgesinin muhtemel pozisyonu (Açık Mavi). **2:** Dxx[DE] motifine uygun DDFE dizisinin muhtemel pozisyonu (Yeşil), **3:** Txy fosforilasyon motifinin muhtemel pozisyonu (Kırmızı), **sbs:** D bölgesi bağlanma dizisine ait uzlaşma dizisini taşıyan peptidin pozisyonu.

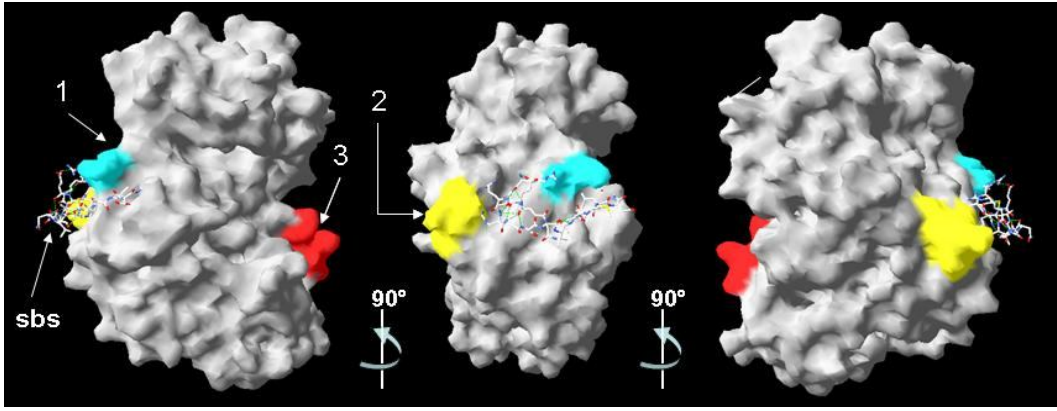
Elde edilen bu bulgular ışığında klasik DXX[DE] motifinin CD bölgesinde yer alabilmesi için karboksil ucunun başlangıç sınırından itibaren yaklaşık on aminoasit sonra başlaması gerekli gibi görülmektedir. Çünkü aynı motifi içeren ancak bu bölgeden uzak motiflerin CD bölgesinden uzaklaşarak TXY fosforilasyon bölgesine yaklaşmaktadır. Dolayısıyla da "Uzak CD" grubuna giren DXX[DE] motifli bölgeler CD bölgesi oluşturmaya uygun olmayabilir.

Grup I: [DE][DE]E motifi ile ifade edilebilecek kümeleşmeler, dikey hizalamalarda DXX[DE] motifi ile hemen hemen aynı sütun üzerinde hizalanmaktadır (Şekil 3.40).

MPK5_Pt	HQIMMEFANTEEEKTLKQNIKIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK18_Pt	HQLMKEFSNTEDEKTLKSIIRIPFSENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK20_Pt	HSLMKEFANTEDEKTLKSIIRIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK24_Pt	HPYFSNFHNVDEEPIISKIITLAIIDNEKFTANEYRDKLYEEI-----
Tth_5mpk	HPYFEGHLHNPEDPTCPEVFDWAWDDFELTKERLQGMVYDEAIDYQKV
ERK4_Pt	HPYFEGHLHNSKEDEPRCNSYFDWAWDKMELKKEILQQTVYDEANQWQOK
JNK2b2_(Hs)	HPYITVWYDPAEAEAPPQIYDAQLEEREHAIEEWKELIYKEVMDWEE
FUS3_Sc	HPYLQTYHDPNDEPEGEPIPPSFFFDHYKEALTTKDLKLIWNEIFS
SUR1_(Ce)	HPYLEQYYDPGDEPVCEEPFTLEMEFDDLPKEKLELWEEAAHRR
ERK1_(Hs)	HPYLEQYYDPSDEPTAEAPFKFDMELDDLPEKLELIFEETARFQPG

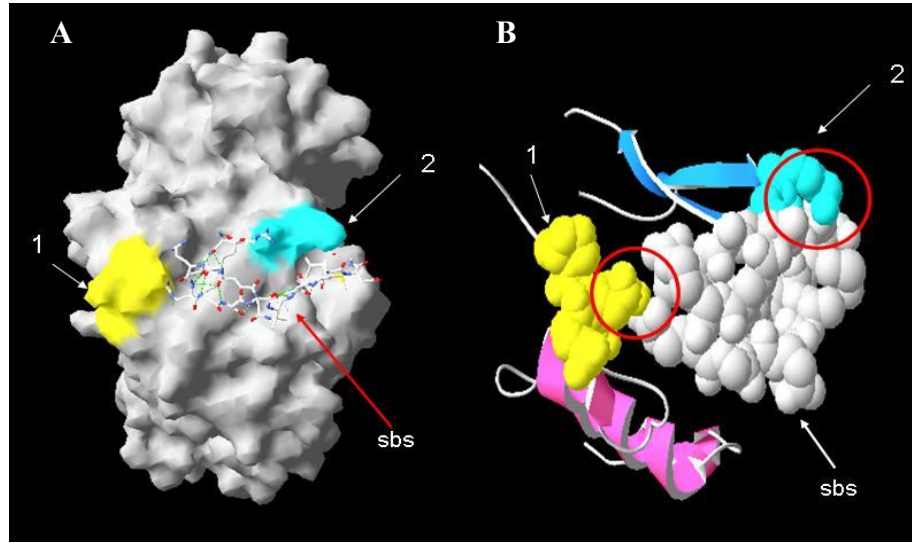
Şekil 3.40: Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve Grup I bölgeleri: Klasik CD motifi içeren referans dizileri SIYAH ile vurgulanmıştır. Grup I bölgeleri ise GRİ ile vurgulanmıştır. Referans dizileri ile diğerleri yatay bir çizgi ile birbirinden ayrılmıştır.

“Uzak CD” bölgelerinin üç boyutlu modeller üzerindeki konumlarının tespitinde kullanılan yöntemin aynısı ile bu defa [DE][DE]E motifi taşıyan bu bölgeler analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda protein üzerindeki [DE][DE]E motifi içeren bölgelerin substrat bağlanma bölgesi olan CD bölgesi olmaya en uygun bölgeler olabileceği tespit edilmiştir. Diğer Uzak CD grubuna ait bölgeler TXY motifine yakın çıkarken, [DE][DE]E motifi içeren bölgeler tam olarak CD bölgesinin olması gereken bölgede görülmüşlerdir. Analiz için kalıp olarak MPK18_Pt ve Tth_5mapk’in kalıp olarak kullanıldığı bu analizde her ikisi ile de aynı sonuç elde edilmiş bu sebeple sadece Tth_5mapk’e ait sonuçlar gösterilmiştir. **Şekil 3.41**’de Tth_5mapk’in kalıp olarak kullanıldığı modelleme analizine ait



Şekil 3.41: Tth_5mapk proteininin tahmini yüzey yapısı üzerinde Grup I motifinin konumsal analizi. 1: Substrat bağlanma bölgelerinden biri olan ED bölgesinin muhtemel pozisyonu (Açık Mavi). 2: “Grup I” motifi motifine uygun [DE][DE]E dizisinin protein yüzeyi üzerindeki muhtemel pozisyonu (Sarı), 3: TxY fosforilasyon motifinin muhtemel pozisyonu (Kırmızı), sbs: D bölgesi bağlanma dizisine ait uzlaşma dizisini taşıyan peptid. Modellemeler ve ilgili şekiller DeepView / Swiss-Pdb Viewer v4.0.1 kullanılarak oluşturulmuştur.

sonuç görülmektedir. Tth_5mapk üzerindeki EDE dizisinin substrat ile elektrostatik bir etkileşime gireme olasılığını görselleştirebilmek için, oluşabilecek muhtemel hidrojen bağları ve elektrosatik alaları hesap ettirilerek yeni bir şekil oluşturulmuştur (**Şekil 3.42**). Sonuç olarak EDE dizisinin substratla etkileşebileceği gözlemlenmiştir. Modellemeni mümkün olabildiğince gerçeğe yakın olabilmesini sağlamak için program yardımıyla öncelikle hidrojen bağlarının oluşum olasılıkları hesaplatılmış, daha sonra yine programa MUSCLE algoritması [66] kullandırılarak hedef protein ile kalıp proteinler hizalanmıştır.



Şekil 3.41: Tth_5mapk proteininin tahmini yüzey yapısı üzerindeki EDE dizisinin substrat ile oluşabilecek etkileşimi. A: CD/D etkileşiminin genel görünümü. Substrat C iskeleti olarak gösterilmiştir B: CD/D etkileşiminin yakın görünümü. Substrat, CD ve ED bölgeleri Van der Waals kürecikleri ile gösterilmiştir. 1: [DE][DE]E motifine uygun EDE dizisinin pozisyonu (Sarı), 2: ED bölgesi (Açık Mavi). sbs: D bölgesi bağlanma dizisine ait uzlaşma dizisini taşıyan peptid. Modellemeler ve ilgili şekiller DeepView / Swiss-Pdb Viewer v4.0.1 kullanılarak oluşturulmuştur

Hizalama sonunda hedef ve kalıp proteinler yine program yardımıyla üst üste bindirilmiş ve proteinlerin son halleri Ramachandran plotu ile incelenerek söz konusu motfi bölgelerini, ED bölgesini, TXY fosforilasyon bölgesini oluşturan aminoasitlerin Psi-Phi torsiyon açıları bakımından tolere edilebilir aralıkta olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

Grup II: Grubu oluşturan üyelerde bulunan [DE]YR[DE] motifi üç grup içinde karboksil ucunun başlangıç sınırına en uzak motif olmuştur (**Şekil 3.42**). Bu guruba ait üyelerin kalıp olarak kullanıldığı üç boyutlu modellemeler bu motifi içermemiştir. Dolayısıyla da bu grubun üç boyutlu yapı analizi yapılamamıştır. Ancak önceki modellemelerde görüldüğü gibi proteinin karboksil ucuna yaklaştıkça oluşan katlanma sebebiyle TXY fosforilasyon motifine de yaklaşmaktadır. Bu da bilinen CD bölgesinden fiziksel olarak yarı bir bölgeyi içermektedir. Dolayısıyla bu bölgenin tıpkı Uzak CD grubundaki bölgeler gibi CD bölgesie uzak bir katlanma yapması olasıdır.

MPK4 için yapılan bütünsel analizde, klasik DXX(D/E) motifine sadece bir bölgede rastlanmıştır. Asp¹⁵⁴-Asp¹⁵⁷ arasındaki DDDD bölgesi her ne kadar

DXX(D/E) motifine uygun olsa da konumu açısından CD bölgesi olabilecek uygunluğa sahip değildir çünkü DDDD dizisi, VII. Alt-bölgenin karboksil ucuna yakın bir yerde bulunmaktadır. Hâlbuki CD bölgesi katalitik bölgenin karboksil

MPK23_Pt	HKYLKEFSSPDEEIECSEPIRIPMNDNKKFSIKEYREALYNDINRRKK
MPK15_Pt	HKYVIEFSQPDEEIVSLQPFKISMNDNKKFTIKDYRESLYSDISKRRK
MPK3_Pt	HKYVRDFSSPDEEIVCQHPIRITMNDNKKFTIKEYREALYADISQRKK
MPK5_Pt	HQIMMEFANTEEEKTLKQNIKIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK18_Pt	HQLMKEFSNTEDEKTLKSIIRIPFSENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK20_Pt	HSLMKEFANTEDEKTLKSIIRIPFNENKKLTIKDYRDKITLNCEQILQ
MPK7_Pt	HPYFSKFHNEVDEPSSEKIITLAIDDNQKFSANEYRDKLYEEIA----
MPK24_Pt	HPYFSNFHNVDDEEPIISKIITLAIDDNKFTANEYRDKLYEEIA----
ERK2_G1	HPYLSKFHDPATEPSAPGPIKISIDDDDKRSVSEYRDLLYSEILRKKK
ERK2_G1	HPYLSKFHDPATEPSAPGPIKISIDDDDKRSVSEYRDLLYSEILRKKK
JNK2b2_(Hs)	HPYITVWYDPAEAEAPPPQIYDAQLEEREHATEEWKELIYKEVMDWEE

Şekil 3.42: Protist MAPK ailesi üyelerinin C terminal uçlarının hizalanmasında belirlenen klasik CD ve Grup II motif bölgeleri: Grup I Motifi olan [DE]YR[DE] bölgelerine uyumlu yerler GRİ ile vurgulanmıştır. Referans dizisi ise yatay bir çizgi ile diğerlerinden ayrılmıştır.

ucuna doğru ve katalitik bölgenin dışında L16'nın N terminal ucunda yer almaktadır. Ancak olası üç boyutlu MPK4 modelinin ERK2 ve p38 modelleriyle üst üste bindirilmesiyle referans proteinlerin bilinen CD bölgesine karşılık gelen MPK4 proteinine ait hidrofobik özellikli kısım tespit edilmiştir. Bu bölgede beklendiği gibi negatif yüklü aminoasitlerin oluşturduğu bir küme ve bu kümeyi çevreleyen hidrofobik aminoasitlerin varlığı, buranın CD bölgesi olarak görev yapabileceği fikrini uyandırmıştır. Muhtemel MPK4 CD bölgesi; 291-KDFHCPEEEIVCGR -304 aminoasitlerinden oluşmaktadır ve burada bulunan EEE dizisi, asidik yama olmaya en uygun aday dizidir. Asidik yamanın etrafında olması gereken hidrofobik aminoasitler de bu dizide bulunmaktadır. Ancak tüm bunlara rağmen gerçek kristalografik veriler olmadan ve de bağlanma bölgesi olduğu tahmin edilen bölgeler üzerinde fonksiyonel mutasyonlarla protein aktivitesi ve bağlanma özgülüğü üzerinde deneyler yapmadan bu yargıya varmak mümkün değildir. Sonuç olarak protistaya ait MAPK üyeleri genel olarak, bilinen CD domaini motifi olan Dxx(DE)'yi uygun pozisyonda içermiyor görülmektedir. Bununla birlikte D bölgeleri ile uygun sterik etkileşimlere girebilecekleri asidik yamalar analiz edildiğinde [DE][DE]E motifi üzerinde pozisyonel olarak genel bir uzlaşma olduğu görülmektedir.

3.2.5. *T.thermophila* MAPK Ailesi Üyeleri Filogenetik Ağaç Analizi

Kültz'ün oluşturduğu SAPK, ERK ve MAPK3 sınıflandırma sisteminin dayandığı “**temel imza**” dizileri kullanılarak (Bkz.Bulgular kısım 3.3.2), *T.thermophila* kinaz ailesi üyeleri taranmış ancak MAPK sınıflandırması içindeki yerlerini kesinleştirememiştir. Temel imza motif dizilerine dayanarak sınıflandırma yapılacak olursa MAPK genlerinin on tanesini Kültz'ün ERK grubuna (B Grubu) girerken sadece bir tanesi (4mapk) SAPK grubuna (A Grubu) yakınlık göstermiştir. Tetrahymena'nın 10 MAP Kinazının ERK grubunu oluşturan alt gruplar içindeki dağılımı ise sırasıyla en fazla YERK1 (Maya ERK1) ve sonra PERK (Bitki ERK1) alt gruplarına olmuştur. Tetrahymena MAP Kinazlarının imza dizilerinin, ERK alt gruplarının imza dizilerine benzerliği ortalama olarak %50 ile %80 arasında değişmektedir. Kültz'ün protistleri de dâhil ettiği MAPK3 grubu için belirlenmiş imza dizileri, Tetrahymena'nın MAPK imza dizilerine yakınlık göstermemektedir. İmza dizilerinin kıyaslanmasına dayalı bu bulgular, Kültz'ün önerdiği sınıflandırma sisteminin *T.thermophila* ve olasılıkla protista MAPK ailesi üyelerinin sınıflandırması için yeterli olmadığını işaret etmektedir fakat filogenetik analiz gibi ilave yöntemlerle durumun tekrar araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

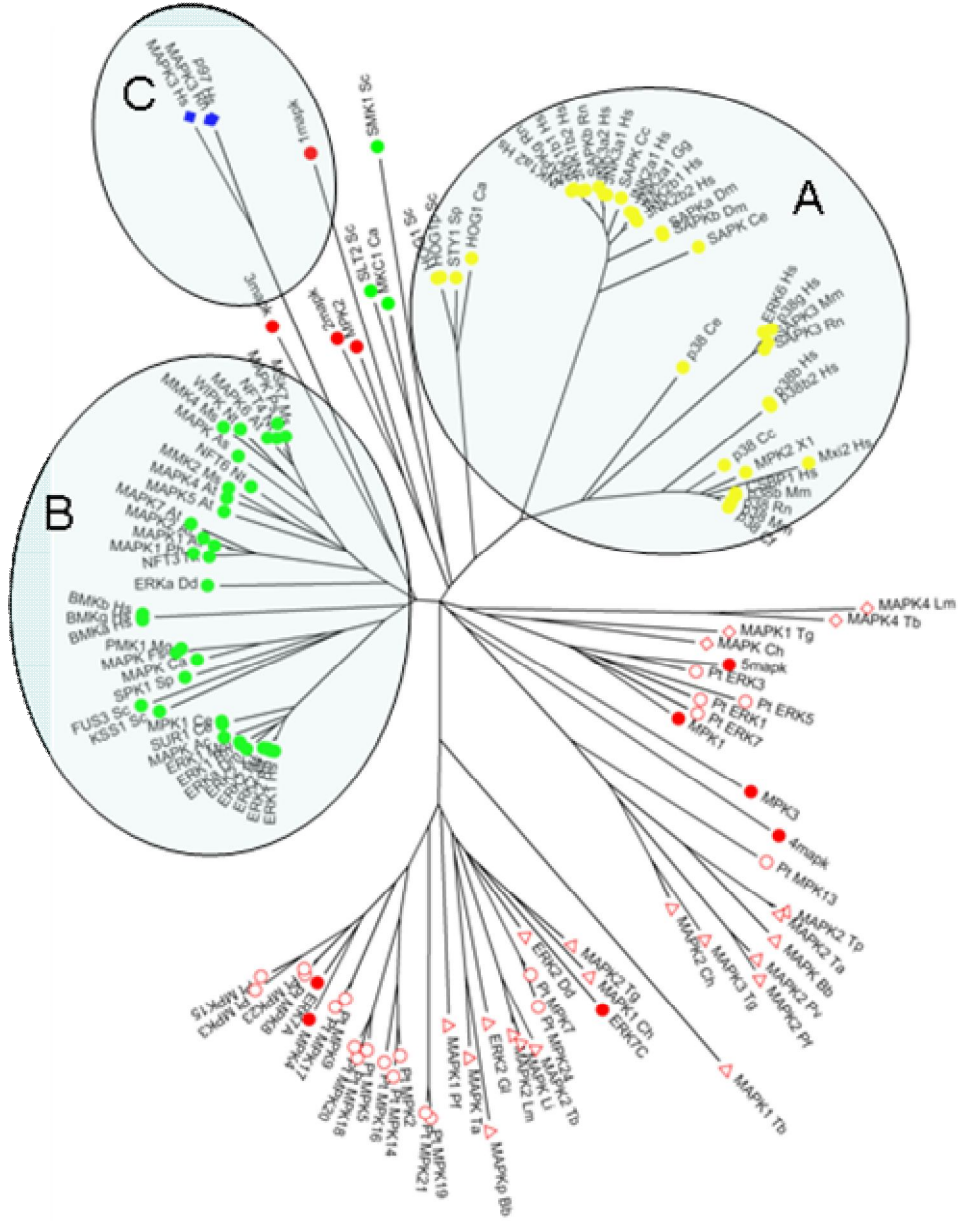
Protista MAPK üyelerinin genel MAPK sınıflandırması içindeki yeri, Kültz'ün sınıflandırmada kullandığı MAPK'lerle birlikte toplam 133 (**Ek-3**) dizi kullanılarak; Maksimum Sıklık (Maximum Parsimony, MP), Komşuların Birleşmesi (Neighbor-Joining, NJ) ve Minimum Evrim (Minimum Evolution, ME) algoritmaları temelinde filogenetik ağaç analiziyle araştırılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulmadan önce *Tetrahymena* ve *Paramecium*'a ait MAPK dizilerinin hem tümü hem de katalitik bölgeleri Clustal W ile dikey hizalanarak, BioEdit Ver.7.0.9 yardımıyla “**dizi benzerlik matrisi**” (Sequence Identity Matrix) oluşturulmuştur. Birbirlerine benzerlikleri %90'ın üzerinde olan diziler filogenetik analize dâhil edilmemiştir. *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinden herhangi bir çıkarma yapılamazken, *Paramecium* MAPK'lerini oluşturan 31 MAPK'den 8 tanesi birbirine %90'ın üzerinde benzerlik gösterdiği için filogenetik analize dahil edilmemiştir (**Ek-4**).

Filogenetik analiz için öncelikle MAPK'lerin “**kinaz bölgeleri**” ClustalW programı (EBI web server) kullanılarak dikey hizalanmıştır. Elde edilen hizalama

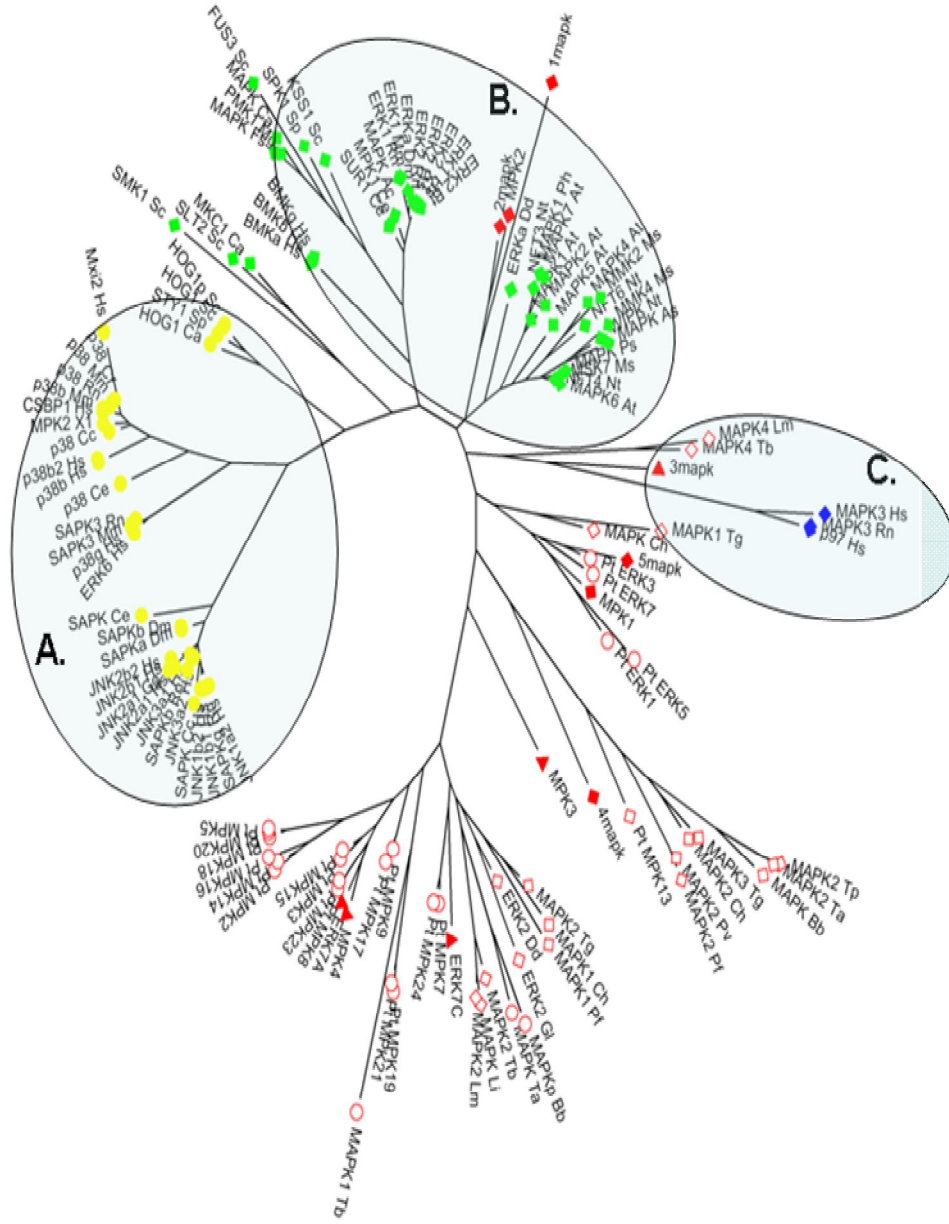
içinde eksilme ve eklenmelerden ötürü iyi hizalanmamış bölgeleri belirlemek ve silerek ayıklamak için internet tabanlı Gblocks Version 0.91b programı [69] ile tekrar düzenlenmiştir (**Ek.5**). Elde edilen son dikey hizalama kullanılarak MEGA4 programı [70] yardımıyla yukarıda belirtilen üç algoritmaya dayalı olarak filogenetik ağaç analizleri yapılmış ve görüntülenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulmasında 1000 tekrarlı Seç Bağla (Bootstrap) testi MP, NJ ve ME algoritmaları ile oluşturulan konsensüs ağaçlarının güvenilirliklerinin sınanmasında kullanılmıştır [73].

Test edilen veri seti içindeki üyelerin birbirlerine olan benzerliklerine göre oluşturulan toplam dallanma uzunlukları ortalaması en düşük olan ağacı seçen minimum evolution kriterine dayalı olarak NJ metodu [72] ile oluşturulan ağaç (**Şekil 3.43**) verilerin yorumlanmasında temel alınmıştır. Bunun sebebi NJ metodunun, evrimsel uzaklıkların mesele olmadığı soruların cevaplandırılmasında; minimum evolution, maximum parsimony ve maximum likelihood gibi diğer metotlara kıyasla daha anlamlı bir ağaç oluşturmasıdır [74]. Ayrıca istatistikî olarak tutarlılığı da kanıtlanmış bir metot olan NJ ile oluşturulan ağaca göre; Kültz'ün tüm MAPK'lar için oluşturduğu filogenetik ağactaki A, B ve C gruplarına ilave olarak, protista MAPK'lerinin en az iki büyük ilave grup oluşturabileceği görülmektedir (**Şekil 3.44**). Bu da tüm MAPK'lerin toplamda beş grup oluşturabileceği anlamına gelmektedir. NJ metodu her ne kadar “minimum evolution” kriterine dayalı bir algoritma ile çalışıyor olsa da adım adım ilerleme prensibi bakımından dallanma mesafeleri toplamı en küçük olan ağacı tam bir kesinlikle oluşturabilme olasılığı nispeten düşüktür [75]. Bu yüzden ilave olarak ME metodu kullanılarak da bir ağaç oluşturulmuştur (**Şekil 3.45**). Sonuç olarak meydana gelen ağaç; NJ metodu ile oluşturulan ağaçla (**Şekil 3.43**) çok büyük bir yüzde ile örtüşmektedir. Bu durum yukarıda önerilen beş grup varlığını daha da güçlendirmiştir. Üç farklı algoritma ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda genel topoloji büyük oranda değişmeden kalmış ve toplamda beş belirgin grup olduğu belirlenmiştir. Kültz'ün belirlediği MAPK3 grubu her üç ağaçta da belirgin bir grup oluşturmamış ancak diğer dört grupdan ayrılarak dağınık bir kümeleşme oluşturmuştur. Seç-Bağla değerleri dikkate alındığında P1 isimli protist grubu haricinde ana dallanmalardaki seç-bağla değerlerinin genellikle %50'nin altında olduğu gözlenirken (NJ ağacına (**Şekil 3.43**) göre P1 protist grubunda bu oran

%96'dır), grup içi dallanmalarda seç bağla değerleri genellikle %50'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir.

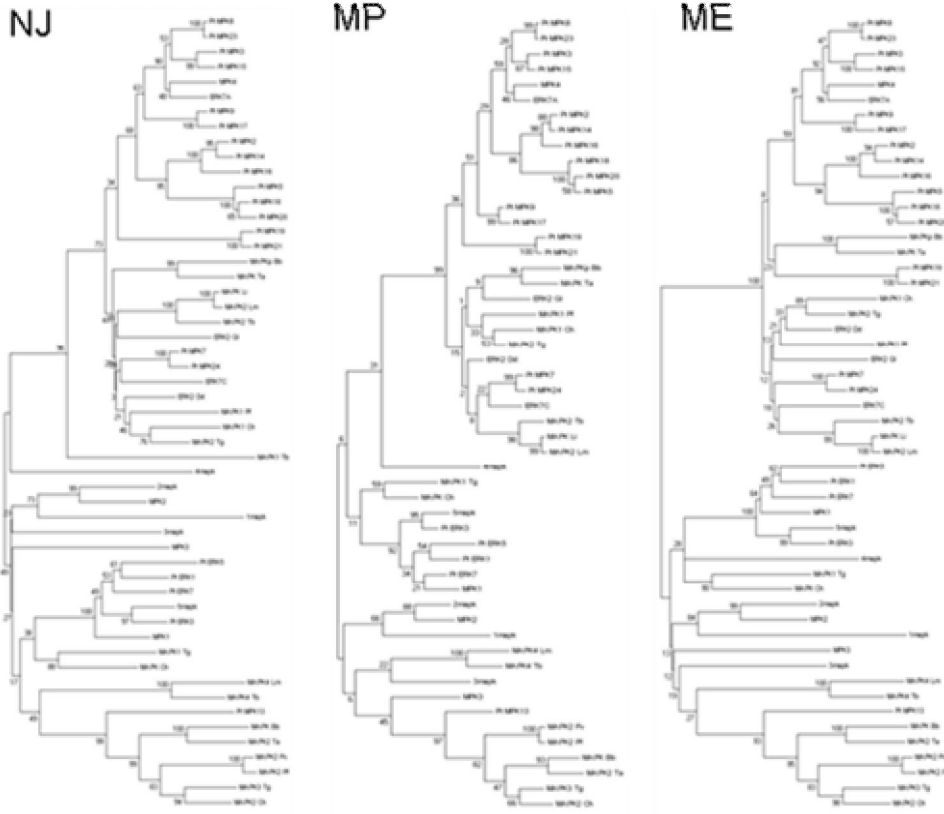


Şekil 3.43: MAPK ailesi üyeleri için NJ metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç: Evrimsel ağaç Neighbor-Joining metodu kullanılarak yapılmıştır. Analiz edilen taksonların ağaçtaki konumları 1000 tekrarlı Bootsep konsensüs ağacından hareketle oluşturulmuştur. Ağacın oluşturulmasında ClustalW server, Gblocks Server ve MEGA4 programından yararlanılmıştır. Ağaç üzerinde bulunan elemanlar Kültz'un sınıflandırmasına uygun bir biçimde renklendirilmiştir. **Sarı :** SAPK, **Yeşil:** ERK, **Mavi:** MAPK3 **Kırmızı Daire :** *T.thermophila* MAPK 'leri ve **Kırmızı Çember ve Üçgenler:** Protist MAPK'leri. **Kırmızı Çember:** *Paramecium* MAPK'leri. Filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılan MAPK'lara ait erişim numaraları EK3'dedir.



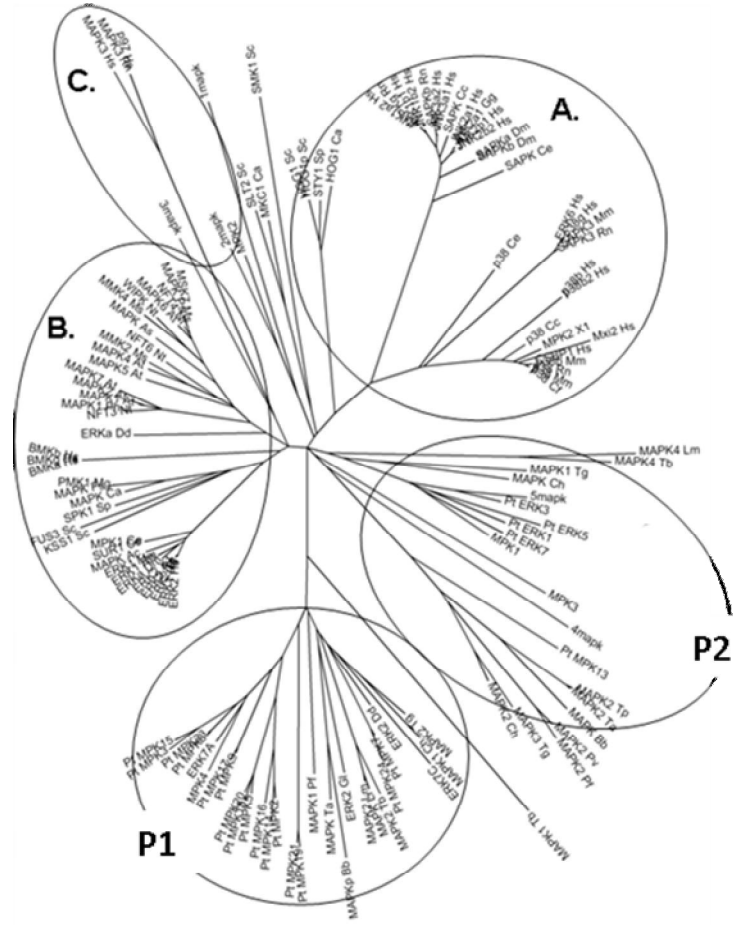
Şekil 3.45: MAPK ailesi üyeleri için MP metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç: Evrimsel ağaç Maximum Parsimony (MP) metodu kullanılarak yapılmıştır. Analiz edilen taksonların ağaçtaki konumları 1000 tekrarlı Bootstrep konsensüs ağacından hareketle oluşturulmuştur. MP ağacı Close-Neighbor-Interchange algoritması kullanılarak elde edilmiştir. Ağacın oluşturulmasında ClustalW server, Gblocks Server ve MEGA4 programından yararlanılmıştır. **Sarı :** SAPK, **Yeşil:** ERK, **Mavi:** MAPK3 ve **Kırmızı Üçgen:** *T.thermophila* MAPK 'leri, **Kırmızı Çember:** Protist MAPK 'leri. Filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılan MAPK'lara ait erişim numaraları EK3'dedir.

gibi her üç metotla oluşturulan ağaçlar topolojik olarak benzerlik göstermekte her üçünde de iki ana grup oluşmaktadır.



Şekil 3.46: NJ, MP ve ME metotları ile oluşturulan protista MAPK ailesi üyeleri filogenetik ağaçlarının kıyaslaması: Her üç metotla da oluşturulan ağaçlar 1000 tekrarlı bağla-bırak değerlendirmesine dayalı olarak oluşturulmuştur. **NJ:** Neighbourhood Joining – Komşuların Birleştirilmesi, **MP:** Maximum Parsimony- Maksimum Sıklık, **ME:** Minimal Evolution- Minimum Evrim. Ağaçların detaylı büyük formu EK 6’dadır.

Ayrıca bu grupların iki ile üç arasında değişen alt gruplaşmalar içerdiğini de söylemek mümkündür. Lacey ve arkadaşlarının protist grupları MAPK’leri için yaptıkları çalışmada protist MAPK’leri kendi aralarında sınıflandırıldığında en az iki grup oluştuğunu ancak üçüncü bir gruptan da bahsedilebileceğini belirtmişlerdir. Lacey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oluşturulan ağaçların istatistikî olarak mümkün olabilecek en yüksek güvenilirliği taşıması istendiği için, birbirlerine benzerliği yüksek olan az sayıda protein dizisi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak protista gruplarından gelen MAPK dizileri büyük oranda apicomplexa’dan geliyor olması sebebiyle çalışmadan elde edilen sonuçların tüm protistler için geçerli olmayabileceği ayrıca bildirilmiştir. Protistaya ait MAPK’lerin kendi aralarında oluşturduğu ana gruplaşmalar dikkate alındığında bütünsel MAPK sınıflandırmasında 5 grup olabileceğini öne sürmek mümkün görülmektedir (Şekil 3.47).



Şekil 3.47: MAPK aile üyelerinin dağılımı: Filogenetik ağaç, 1000 tekrarlı seç-bırak uygulanarak NJ metoduyla oluşturulmuştur. Kültz'ün belirlediği MAPK grupları literatürdeki sınıflandırmaya uygun olarak **A,B** ve **C** olarak işaret edilmiştir. Protist MAPK'lerinin oluşturduğu iki büyük grup ise **P1** ve **P2** olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılan MAPK'lara ait erişim numaraları EK3'dedir.

T.thermophila MAPK ailesi üyelerinin olası biyolojik fonksiyonları hakkında bir öngöründe bulunabilmek açısından biyolojik fonksiyonları bilinen bir grup MAPK kullanılarak, *T.thermophila* MAPK ailesi üyeleri ile birlikte filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaca ERK7 ve ERK8 üyeleri de dâhil edilerek ağacın güvenilirliği artırılmıştır.



Şekil 3.48: *T.thermophila* MAPK ailesi üyeleri ile biyolojik fonksiyonları bilinen MAPK'lerin birlikte değerlendirildiği NJ filogenetik ağacı: Filogenetik ağaç, 1000 tekrarlı bağla-bırak uygulanarak NJ metoduyla oluşturulmuştur. **Kırmızı**; *T.thermophila* MAPK üyelerini temsil etmektedir. **Yeşil**; feremona cevapta etkin olan MAPK çiftleşme-eşleşme homologlarını işaret etmektedir. **Açık Mavi** üyeler soğuk, tuz ve kuruluk gibi birden fazla strese cevapta etkin olan MAPK'leri işaret ederken **Mavi** üyeler soğukta etkin olan MAPK üyelerini işaret etmektedir. **Sarı** renkle işaretlenen üyeler ise Osmotik Stres, Sporulasyon ve Hücre duvarı oluşumunda etkin olan MAPK üyelerini işaret etmektedir. ERK7 ve ERK8 üyeleri ise **Renksiz Üçgenler** olarak gösterilmiştir.

Şekil 3.48'de görüleceği gibi *T.thermophila* MAPK ailesi üyeleri ağaç içinde farklı stres homologları ile gruplaşmalar oluşturmuşlardır. Sadece Tetrahymena ERK7a, ERK7c ve MPK4; ERK7-8 grubu ile seç bağla değerleri ve topolojik olarak desteklenerek dallanmıştır. Bunun dışında; MPK1 ve 5mapk çiftleşme; 3mapk, tuz ve kuruluğa karşı direnç; 1mapk, 2mapk ve MPK2 ozmatik stres ve sporulasyonda aktif olan MAPK üyeleri ile topolojik olarak gruplaşma göstermelerine rağmen seç bağla değerleri ile desteklenmemektedir. MPK3 ve 4 mapk ise birlikte dallanma yaparak herhangi bir gruba katılmamıştır.

Elde edilen filogenetik bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Kltz'n A grubuna (SAPK), *T.thermophila* MAPK'leri dâhil hiçbir protist MAPK'sı dâhil olmamıştır. Bu durum oluşturulan her üç filogenetik ağaç ile de doğrulanmaktadır
- Kltz'n önerdiği B grubuna (ERK) *T.thermophila* 'ya ait üç MAPK ailesi yesi hariç hiçbir protist MAPK'sı dâhil olmamıştır. Bu guruba giren MAPK yeleri ise MPK2, 1mapk ve 2mpk her üç filogenetik ağaç topolojisinde de yerini korumuştur.
- Genel filogenetik ağaca dâhil edilen protist MAPK'lerinden sadece bir tanesi -*T.thermophila* 3mapk- düşük bağla-bırak değeri (%20-%30) ile de olsa Kltz'n önerdiği C grubuna (MAPK3) katılmıştır. Bununla birlikte Kltz'n, C grubu için tespit ettiği belirsizlik, filogenetik ağaca katılan yeni protist dizilerine rağmen devam etmiştir.

4. TARTIŞMA

MAPK ailesi üyelerinin fonksiyonelliği ve çeşitliliği hakkındaki bilgi genellikle hayvan, bitki ve mayalardan gelmektedir. Yapılan çalışmalar bu açıdan sınırlı kalmıştır. Evrimsel açıdan birbirinden oldukça farklılaşmış üyelere sahip olan Protistaya ait MAPK bilgilerinin artıyor olması, literatürde bilinen MAPK ailesi hakkındaki bilginin güncelleştirilmesini gerekli kılmaktadır. Makronükleer genom projesi 2006 yılında tamamlanmış olan *T.thermophila*, strese karşı oluşan cevapta önemli bir rol alan MAPK ailesi üyelerinin “tek-hücreli organizma seviyesinde” araştırılmasına olanak sağlayabilecek önemli bir model organizmadır.

Mevcut MAPK literatürüne, elde edilen ön verilerle genel bir katkı sağlamak amacıyla yapılan bu çalışma, temelde aşağıdaki sorulara cevap vermek üzere tasarlanmıştır;

- i. Protista ve *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin MAPK ailesi içindeki konumu nedir?
- ii. Protista MAPK ailesi üyelerinin diğer organizma guruplarına ait yapısal farklılık ya da benzerlikleri var mıdır?
- iii. *T.thermophila* MAPK ailesi üyeleri farklı stres koşulları altında oluşturulan cevapta mRNA düzeyinde temsil edilirler mi?

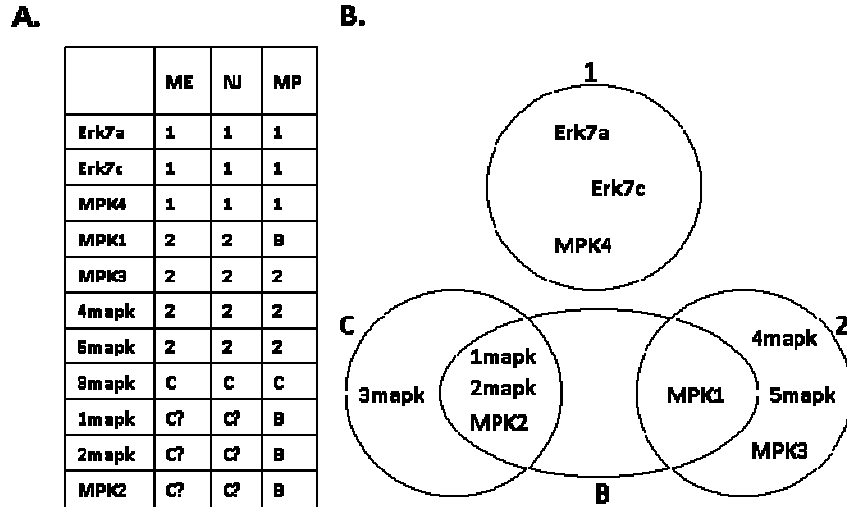
4.1. Protista ve *T.thermophila* MAPK Ailesi Üyelerinin MAPK Ailesi İçindeki Konumu Nedir?

MAPK ailesi üyelerini sınıflandırmak üzere yapılan ilk çalışmalar; üyelerin fonksiyonel karakterleri ile ilgili verilerin doyurucu düzeyde olmaması nedeniyle aminoasit dizilerinin kıyaslamasına dayandırılmıştır. Sınıflandırmaya katılan protista MAPK dizileri sayıca az olmasına rağmen ana MAPK gurupları yanında yeni bir grup oluşturma eğilimi Kültz tarafından belirlenmiştir [23]. Kültz’ün bu öngörüsü, yeni protista MAPK dizilerinin de içine dâhil edildiği bir çalışma ile tekrar araştırılmış, ancak sınıflandırmanın henüz tam olarak nasıl yapılması gerektiği netlik kazanmamıştır [79].

Literatüre göre üç sınıfa (A, B ve C) ayrılmış olan MAPK ailesi üyelerine 42 yeni protista MAPK aile üyesi eklenmesiyle filogenetik analizler bu çalışmada tekrarlanmış ve MAPK ana ailesinin beş alt gruba bölüldüğü görülmüştür. Elde edilen filogenetik ağaçların ortak olarak sergilediği profile göre Kültz'ün belirlemiş olduğu A, B ve C gurupları iyi bir şekilde korunmuştur. Bununla birlikte Kültz'ün sınıflandırmasında belirli bir sınıf oluşturmayan az sayıdaki protista MAPK üyeleri, sınıflandırmaya kazandırılan yeni üyelerle birlikte A,B ve C sınıflarından ayrı iki gurup oluşturacak şekilde kümelemiştir. Sadece protistaya ait MAPK'lerin kullanıldığı filogenetik ağaçlar da bu veriyle uyumlu sonuçlar vermiştir. Nitekim Lacey ve arkadaşlarının protist gurupları MAPK'leri için yaptıkları çalışmada da [79] protist MAPK'leri kendi aralarında sınıflandırıldığında en az iki gurup oluşturmuşlardır. Ayrıca protist ve metazoan MAPK lerinin topluca da sınıflandırıldığı bu çalışma; tüm MAPK'lerin toplamda en az dört büyük gurup olabileceğini teklif etmektedir. Yapılan bu çalışma bu yönüyle de bu tezde elde edilen verileri desteklemektedir. Lacey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oluşturulan ağaçların istatistikî olarak mümkün olabilecek en yüksek güvenilirliği taşıması istendiği için, birbirlerine benzerliği yüksek olan az sayıda protein dizisi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak protista guruplarından alınan MAPK dizileri büyük oranda apicomplexa'dan geldiği için yayında da belirtildiği gibi elde edinilen sonuçlar tüm protistler için geçerli olmayabilir. Bununla birlikte bu tezde mümkün olduğunca çok protista gurubunu temsil edebilecek ölçüde dizi, filogenetik ağaç analizine alınmıştır ve elde edilen sonuçlar yukarıda da değinildiği gibi Lacey ve arkadaşlarının verileri ile uyum içindedir.

Tetrahymena thermophila MAPK ailesi üyeleri için farklı algoritmalar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar birlikte değerlendirildiğinde (**Şekil 4.1**) 11 üyeden hiç birisi önceden tanımlanan A grubuna (SAPK) dâhil olmadığı görülmektedir. Erk7a, Erk7c ve MPK4 her üç ağaç modelinde Protistlerin oluşturduğu iki gruptan 1 numaralı gruba girmektedir. Aynı şekilde 3mapk de, her üç ağaçta da Kültz'ün tanımladığı C grubuna katılırken; 4mapk, 5mapk ve MPK3 de 2 numaralı protist grubuna girmektedir. Bununla birlikte 1mapk, 2mapk ve MPK2 ise, tıpkı Kültz'ün sınıflandırmasında belirgin bir yer bulamayan bazı

protist MAPK'leri gibi, iki ağaçta C grubuna yakın lokalitelerde dallanma yaparken MP ağacında B grubunda yer almaktadır.



Şekil 4.1: Tetrahymena MAPK ailesi üyelerinin üç farklı algoritma ile oluşturulan filogenetik ağaçtaki konsensüs konumları: A: Bir çizelge içinde üç farklı algoritmaya göre (Minimum Evrim-ME, Komşuların Birleşmesi-NJ, Maksimum Sıklık-MP) oluşturulan ağaçta MAPK ailesi üyelerinin aldığı konumlar gösterilmektedir. Soru işareti olan gruplar belirsizliği ifade etmektedir. **B:** A'daki çizelgenin venn diyagramı olarak gösterimi.

Şekil 4.1'de görülen gruplaşmalar, *T.thermophila* MAPK ailesi üyeleri ile biyolojik fonksiyonları bilinen MAPK'lerin birlikte değerlendirildiği NJ filogenetik ağacında (**Şekil 3.51**) konumlanan MAPK'lerle birlikte değerlendirildiğinde benzer gruplaşmalar olduğu göze çarpmaktadır. Örneğin; **Şekil 3.51'**de Osmatik Stres / Sporulasyon biyolojik fonksiyonu gösteren MAPK'ler grubuna dahil olan MPK2, 1mapk ve 2mapk **Şekil 4.1'**de de görüldüğü gibi her üç ağaçta da aynı şekilde dallanma yapmışlardır. Benzer şekilde Çiftleşme/Soğuk/Tuz grubuna giren MPK3, 4MAPK ve MPK3 yine her üç ağaçta da birlikte dallanma yapmışlar; ERK7/8 grubuna giren MAPK'ler de 1 numaralı Protist grubuna birlikte katılmışlardır. Bu veriler elde edilen filogenetik ağaçların doğruluğunu güçlendirmektedir. Dolayısıyla protist MAPK'lerinin kendi içinde 2 grup oluştururken tüm MAPK'ler birlikte değerlendirildiğinde 5 grup oluştuğunu söylemek mümkün görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışma ile literatürde henüz cevap bulmayan protist MAPK'lerinin genel MAPK ailesi içindeki konumu, kaç grup oluşturdukları ve genelde MAPK ailesini oluşturan grupların sayısı hakkındaki bazı soruların cevaplanmasına katkı sağlamıştır.

4.2. Tetrahymena MAPK Ailesi Üyelerinin Diğer Organizma MAPK Ailesi Üyeleri ile Yapısal Benzerlik ya da Farklılıkları Var mıdır?

Kültz'ün oluşturduğu sınıflandırma sisteminin başlıca amaçlarından birisi de yeni tanımlanan MAPK üyelerinin A,B,C guruplarından hangisine dahil olduğunu belirlemek suretiyle işlevsel olduğu biyolojik proses hakkında olası bir ön tahminde bulunmaktır. Bunun için her aileyi ve alt aileleri belirleyen temel imza dizileri tanımlanmıştır. Aminoasit dizileri üzerindeki kısa spesifik bölgeleri tanımlayan bu imza dizileri *Tetrahymena* MAPK ailesi üyelerinin üzerinde tarandığında benzerliğin diğer guruplara nazaran en yüksek olduğu gurubun ERK gurubu (Gurup B) olduğu saptanmıştır. ERK alt gurupları içinde en büyük yığılmanın ise sırasıyla maya ERK ve bitkisel ERK alt guruplarında olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak MAPK genlerinin on tanesi Küntz'ün B gurubu olarak tanıladığı ERK gurubunda toplanırken sadece bir tanesi (4mapk) SAPK gurubuna yakınlık göstermiştir. Filogenetik ağaç analizi ile de desteklenen bu durum fonksiyonu bilinen MAPK üyelerinin C terminal uçları ile protista üyeleri C terminal uçları arasındaki kıyaslamada da çok net bir şekilde belirlenmiştir. C terminal uçlarının taşıdığı asidik aminoasitlerin dağılımı bakımından referans gurubunu oluşturan KSS, FUS, HOG1 gibi üyelerden klasik CD bölgesi motifini taşımayan olmasıyla da ayrılan SMK1, protist MAPK üyelerinde CD bölgesi olarak görev yapıyor olması muhtemel bölge olarak tespit edilen [DE][DE]E motifine uygun pozisyonda taşıdığı DDE motifi ile benzerlik göstermektedir. Kültz'ün oluşturduğu filogenetik ağaçta uygun bir yerleşim bulamayan SMK1 bu çalışmada oluşturulan ağaçlarda sadece protista MAPK'lerinin oluşturduğu guruplardan birisine dahil olmuştur. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde SMK1 ile çoğu protist MAPK'lerinin arasında ortoloji ilişkisi olabileceği düşüncesi doğurmaktadır.

CD bölgesinin sıçan ERK7 ve insan ERK8'inde olmaması bu motifi taşımayan MAPK'lerin fonksiyonel olarak ERK7/8 gurubuna yakın olabileceğini de düşündürmektedir. Ayrıca MAPK'lerin şimdiye kadar tespit edilen üst ve alt gurup etkileşim elemanlarından farklı birtakım proteinlerle de etkileşiyor olabileceği düşünülebilir [80]. ERK7 otonom olarak aktive olan bir MAPK'dir ve MAPKK'lere ihtiyaç duymadan normalden daha uzun olan C terminal ucunda bulunan birçok bölge ile kendi kinaz aktivitesini regüle etmektedir. Dolayısıyla

ERK7 kendi kinaz aktivitesini C terminal kısmında yaygın dağılışı gösteren asidik bölgelerle gerçekleştirmektedir. Protista'ya ait MAPK'lerin çoğundaki C terminal bölgesinin bu şekilde bir asidik bölge dağılımı benzerliğe sahip olması, ve diğer organizmalara ait klasik MAPK'lerden bu özellikleriyle belirgin bir şekilde ayrılıyor olmaları, kendi kendini fosforile eden ERK gurupları ile atasal bir ortaklık taşıyor olabileceklerini de düşündürmektedir.

4.3. *T.thermophila* MAPK ailesi Üyeleri Farklı Stres Koşulları Altında Oluşturulan Cevapta mRNA Düzeyinde Temsil Edilirler mi?

Farklı koşullara maruz bırakılan *Tetrahymena* hücreleri MAPK üyeleri için gerçekleştirilen mRNA ifadesi varlık analizlerinde; 1mapk ve 2mapk hiçbir koşul altında varlık göstermemiştir. Ancak aynı genlerin genomik DNA'dan da çoğaltılamamış olması iki olasılığı akla getirmektedir;

- i. 1mapk ve 2mapk için tasarlanan primerler ya da oluşturulan PZR koşulları bu genlerin ürün olarak çoğaltılabilmesi için uygun değildir.
- ii. 1mapk ve 2 mapk organizmanın hayat döngüsü içinde kısa bir zaman dilimi için gerekli olup, makronükleer gelişim esnasında genomdan elemine edilmektedir [146, 147].

4.3.1.Sıcaklık ve Soğuk Şoku Koşullarında *Tetrahymena* MAPK Üyelerinin mRNA İfadeleri:

Doğal ortamındaki optimum ortam sıcaklığı üzerinde ya da altındaki sıcaklıklarda *Tetrahymena*'nın protein sentezinde değişiklikler olduğu, yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. 30°C→37°C ve 30°C→42°C yapılan sıcaklık değişikliklerine karşı bant yoğunlukları görsel olarak analiz edilen *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinin davranışları birlikte değerlendirildiğinde, yükselen sıcaklıklara geçişte genel anlamda bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu durum *thermophila pyriformis*'in 28°C' den 34°C' dereceye ve 39°C'den 41°C'ye sıcaklık şoklarında yapılan sıcaklık değişimine normal hücresel proteinlerinin sentezinde şiddetli bir şekilde düşüşle cevap vermesi ile benzeşmektedir. *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerinde görülen bu düşüşün özellikle de ikinci 15 dakikalık dilim içinde gerçekleşiyor olması *T.thermophila*'da yüksek sıcaklık

düzeylerine yapılan sıcaklık değişikliğine karşı kodlanan mRNA 'ların kısa bir ömre sahip oldukları bilgisini de akla getirmektedir. Buna ilave olarak 4mapk, Erk7a ve MPK3'de soğuk geçiş streslerinde artış göstermişlerdir.

Ancak, bant yoğunluklarında meydana gelen değişikliklerin gözle değerlendirilmesi ve de bant yoğunluklarında görüntümeden kaynaklanabilecek aşırı doygunluk probleminin bertaraf edilmemiş olması sebebiyle tüm bu yorumlar deneysel anlamda bir kesinlik taşımamakla birlikte, Real Time PCR gibi hassas yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

4.3.2.Açlık, Tokluk, 30°C ve 37°C'lerde Gelişim, Hidrojenperoksit ve Konjugasyon Evrelerinde MAPK Üyelerinin mRNA İfadeleri

Çeşitli organizma gruplarına ait MAPK ailesi üyeleri ve bu üyelerin biyolojik fonksiyonları ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur ancak *Tetrahymena* MAPK ailesi üyelerine ait literatür kayıtları sadece MPK1, MPK2 ve MPK3 ile sınırlı olup, bu genlerin biyolojik fonksiyonları hakkında herhangi bir kayıt da bulunmamaktadır. Bu çalışma ile literatüre ilave 8 *Tetrahymena* MAPK bilgisi sunulmakla birlikte toplamda 11 MAPK'in olası biyolojik fonksiyonları hakkında bir ön bilgi sunulmaktadır. Örneğin; hidrojen peroksit ve 20mM tuz stresinde karşı MPK3 dışında hiçbir MAPK geni gerçekleştirilen deneysel koşullar altında varlık göstermemiştir. MPK3 geni denenilen tüm stres koşulları altında mRNA seviyesinde ifade edilmektedir. Açlık ve açlık sonrası besleme durumlarında; 4mapk, Erk7a, MPK1, MPK2 ve MPK3 genlerinin her iki halde de bulunduğu belirlenmiştir. Konjugasyonun 1,5 ve 3'üncü saatlerinde olduğu belirlenen 3mapk, 4mapk, Erk7a, MPK1, MPK2 ve MPK3'e, 8'inci saatte MPK4, 9'uncu saatte ise 5mapk katılmıştır. Bununla beraber MPK4 ve 5mapk'in sıcaklık stresleri dışında varlık gösterdikleri tek durum konjugasyonunun bahsi geçen saatleri olmuştur. MAPK genlerinin test edilen deneysel koşullar altında mRNA ifadesi olarak varlık gösterdiği durumlar **Çizelge4.1**'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1: Tetrahymena MAPK'lerinin mRNA düzeyinde ifade bulduğu belirlenen stres koşulları

Hidrojen Peroksit	MPK3
20 mM Tuz Stresi	MPK3
100 mM Tuz Stresi	3mapk,4mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
Açlık	4mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
Doyurulma	4mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
Konjugasyon 1,5 saat	3mapk,4mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
Konjugasyon 3 saat	3mapk,4mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
Konjugasyon 8 saat	3mapk,4mapk,Erk7a,Erk7c,MPK1,MPK2,MPK3,MPK4
Konjugasyon 9 saat	4mapk,5mapk,Erk7a,MPK1,MPK2,MPK3
30C°	3mapk,4mapk,5mapk,Erk7a,Erk7c,MPK1,MPK2,MPK3,MPK4
37C°	3mapk,4mapk,Erk7a,Erk7c,MPK1,MPK2,MPK3

Ancak unutulmamalıdır ki bir genin mRNA seviyesinde ifade ediliyor olması her zaman aynı koşullar altında protein olarak ifade edildiği anlamına gelmeyebilmektedir.

4.3.3. *Tetrahymena thermophila* MAPK sinyal yollarına bütünsel bakış

T.thermophila'da MAPK sinyal yolunu oluşturan MAPK ailesi üyelerinin bütünsel olarak analizi için incelenen 11 MAPK dışında, yolağın üst basamaklarında bulunduğu düşünülen MAPKK ve MAPKKK ailesi üyeleri de bu çalışmada taranmıştır. Bunun için öncelikli olarak bilinen klasik MAPKK ve MAPKKK domainlerin içeren proteinler *T.thermophila* makronükleer genom veri tabanı BLAST programı ile taranmıştır. Elde edilen yüksek benzerlik gösteren diziler seçilerek KEGG veritabanında *T.thermophila* veritabanı kullanılarak paralog gen taraması yapılmıştır. Tespit edilen paralog genler içerdikleri domainler bakımından tek tek incelenmiş ve MAPKK ya da MAPKKK'lere yüksek benzerlik gösteren diziler ayıklanarak aynı veritabanında ortolog taramasına sokulmuş ve MAPKK ya da MAPKKK'lerle yüksek benzerlik gösteren diziler seçilmiştir. Bu aşamalar sonucunda toplam 8 MAPKKK ve 4 MAPKK tespit edilmiştir. Şimdiye kadar insanda tespit edilen MAPKKK, MAPKK ve MAPK sayısı sırasıyla 14, 7 ve 12 iken, mayada 7,4 ve 6'dır. *T.thermophila*'da ise bu sayı bu tezde yapılan analizlere göre 10, 4 ve 12'dir. Yapılan analizlerde ayrıca üçlü MAPK sinyal yolağını aktive ettiği bilinen ve ilk kez mayada tespit edilmiş olan Ste20 kinaz'lara [148] homoloji gösteren dört adet

protein belirlenmiştir. Tespit edilen MAPKKK, MAPKK ve Ste20 homologları (MAPK4K'ler) Çizelge 4.2.'de görülmektedir

Çizelge 4.2: *T.thermophila* MAPKK, MAPKKK ve MAPK4K üyeleri: KEGG ve NCBI Genom veri tabanlarının taranması sonucuna belirlenen 4 MAPKK ve 12 MAPKKK ailesi üyesi ve 4 Ste20 homoloğu görülmektedir. Tabloda yukarıdan aşağıya sırasıyla MAP4K, MAPKKK ve MAPKK'ler sıralanmıştır.

	<i>Erişim Numarası</i>	<i>Genom Projesi Kodlaması</i>	<i>aa büyüklüğü</i>	<i>Önerilen Gen İsmi</i>
1	XP_001026112	TTHERM_00971920	1330	<i>MAP4K 1</i>
2	XP_001021866	TTHERM_00933100	947	<i>MAP4K 2</i>
3	XP_001029922	TTHERM_01246760	1193	<i>MAP4K 3</i>
4	XP_001022946	TTHERM_00580440	1108	<i>MAP4K 4</i>
1	XP_001030096	TTHERM_01142670	1203	<i>MAPKKK 1</i>
2	XP_001017092	TTHERM_00193390	775	<i>MAPKKK 2</i>
3	XP_001029452	TTHERM_01502010	645	<i>MAPKKK 3</i>
4	XP_001012355	TTHERM_00107120	1235	<i>MAPKKK 4</i>
5	XP_001008712	TTHERM_00170550	1153	<i>MAPKKK 5</i>
6	XP_001014875	TTHERM_00051780	945	<i>MAPKKK 6</i>
7	XP_001013206	TTHERM_00295740	794	<i>MAPKKK 7</i>
8	XP_001033277	TTHERM_00420220	854	<i>MAPKKK 8</i>
1	XP_001012851	TTHERM_00093970	381	<i>MAPKK 1</i>
2	XP_001025937	TTHERM_01111050	2001	<i>MAPKK 2</i>
3	XP_001011119	TTHERM_00143800	422	<i>MAPKK 3</i>
4	XP_001025620	TTHERM_00697080	381	<i>MAPKK 4</i>

5. SONUÇ

Yapılan araştırma bütünsel olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür;

1. Protist MAPK'leri en az iki grup oluşturmaktadır. Bir üçüncü grup Kültz'ün de bildirdiği gibi A ve B grupları arasında belirgin olmayan bir kümeleşme oluşturan az sayıda üyeden oluşmaktadır.
2. Genel MAPK ailesi en az 5 gruptan oluşmaktadır. Ancak; oluşacak aile sayısının tam olarak belirlenmesi için daha fazla sayıda ve çeşitlilikte MAPK üyesinin filogenetik ağaç oluşumuna katılması gerekmektedir. Paralog ve Ortologların tayin edilmesi; gen duplikasyonları ve MAPK ailesi üyesi proteinlerin evrimsel orijini hakkında bir takım çıkarımlar yapılmasına yardımcı olacaktır
3. Tetrahymena MAPK'leri üç grupta toplanmaktadır.

4. Protista MAPK'leri en az iki gurup oluşturmaktadır. Protist MAPK ailesi üyelerini diğer organizmalardan ayıran önemli özelliklerden birisi de karboksil terminal uçlarındaki ortak farklılıklarıdır. Bu bölgede protistaya özel bir motif olma olasılığı olan [DE][DE]E dizisi tespit edilmiştir.
5. *T.thermophila*'ya ait 11 MAPK ailesi üyesinin en az 9 adedi bu çalışmada denenilen koşullar altında ekspres edilmektedir.

Tez öncesinde yapılan araştırmalar ve bilimsel makalelere paralellik sağlayabilmek amacıyla MAPK ailesi üyelerinin gen ve protein seviyesinde isimlendirilmesi, biyolojik fonksiyona bağlı olmaksızın "***Tetrahymena* ve *Paramecium* gen isimlendirme kuralına**" bağlı olarak aşağıdaki tabloda verildiği şekilde önerilmektedir [149]. MPK'nın açılımı Mitojenlerle Aktive Edilen Protein Kinaz olup farklı türlerin MAP Kinazları da MPK ve takip eden bir numara ile isimlendirildiğinden, diğer türlerden ayırabilmek için *Tetrahymena thermophila*'nın kısaltması olan "**Tt**"nin MPK kısaltmasından önce kullanılması tavsiye edilir.

Çizelge 5.1: *T.thermophila* Makronükleer Genom MAPK Enzim Ailesi Üyeleri İçin İsimlendirme Önerisi: Genlere ait erişim numarası, tezde kullanılan isimlendirme çizelgede görülmektedir..

	<i>Erişim Numarası</i>	<i>Genom Projesi Kodlaması</i>	<i>Tezde Kullanılan İsimlendirme</i>	<i>Önerilen Gen İsmi</i>	<i>Önerilen Protein İsmi</i>
1	XP_001025119	TTHERM_00469230	MPK1	<i>MPK1</i>	Mpk1p
2	XP_001031635	TTHERM_00760190	MPK2	<i>MPK2</i>	Mpk2p
3	XP_001020076	TTHERM_00660130	MPK3	<i>MPK3</i>	Mpk3p
4	XP_001009345	TTHERM_00575520	MPK4	<i>MPK4</i>	Mpk4p
5	XP_001010007	TTHERM_01332120	1mapk	<i>MPK5</i>	Mpk5p
6	XP_001031643	TTHERM_00760270	2mapk	<i>MPK6</i>	Mpk6p
7	XP_001026993	TTHERM_00689900	3mapk	<i>MPK7</i>	Mpk7p
8	XP_001023129	TTHERM_00492370	4mapk	<i>MPK8</i>	Mpk8p
9	XP_001017253	TTHERM_00195990	5mapk	<i>MPK9</i>	Mpk9p
10	XP_001010453	TTHERM_00355550	ERK7A	<i>MPK10</i>	Mpk10p
11	XP_001023534	TTHERM_00537240	ERK7C	<i>MPK11</i>	Mpk11p

KAYNAKLAR

- [1] Gomperts, B.D., Kramer, I.M, Tatham,P.E.R., *Signal Transduction*. 2003, Elsevier Science & Technology
- [2] Helmreich, E.J.M., *The Biochemistry of Cell Signaling*. 2001, New York, Oxford Uni.Press.
- [3] Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Vol. 2nd edition. 2001, Wiley-Vch.
- [4] Manning, G., ve ark.,*Evolution of protein kinase signaling from yeast to man*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**, p. 514-520.
- [5] Adams, J.A., *Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases*. Chemical Reviews, 2001. **101**(8), p. 2271-2290.
- [6] Hanks, S. ve T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily, kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J., 1995. **9**(8), p. 576-596.
- [7] Schenk, P.W. ve B.E. Snaar-Jagalska, *Signal perception and transduction, the role of protein kinases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Cell Research, 1999. **1449**, p. 1-24.
- [8] Johnson, S.A. ve T. Hunter, *Kinomics, methods for deciphering the kinome*. Nat Methods, 2005. **2**(1), p. 17-25.
- [9] Huse, M. ve J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. Cell, 2002. **109**(3), p. 275-82.
- [10] Krupa, A. ve N. Srinivasan, *Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes*. BMC Genomics, 2005. **6**, p. 129.
- [11] Kultz, D., *Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases*. J Mol Evol, 1998. **46**(5), p. 571-88.
- [12] Cheek, S., ve ark.,*A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases*. BMC Struct Biol, 2005. **5**, p. 6.
- [13] Cheek, S., H. Zhang, ve N.V. Grishin, *Sequence and structure classification of kinases*. J Mol Biol, 2002. **320**(4), p. 855-81.
- [14] Johnson, G.L., Lapadat, Razvan, *Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases*. Science 2002. **298**.
- [15] Kyriakis, J.M. ve J. Avruch, *Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation*. Physiol. Rev., 2001. **81**(2), p. 807-869.
- [16] Pearson, G., ve ark.,*Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways, Regulation and Physiological Functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2), p. 153-183.
- [17] Hoch, J.A., *Two-component and phosphorelay signal transduction*. Current Opinion in Microbiology, 2000. **3**(2), p. 165-170.
- [18] Stock, A.M., V.L. Robinson, ve P.N. Goudreau, *Two-Component Signal Transduction*. Annual Review of Biochemistry, 2000. **69**(1), p. 183-215.
- [19] Li, D., L. Rogers, ve P.E. Kolattukudy, *Cloning and expression of cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase from a phytopathogenic filamentous fungus*. Gene, 1997. **195**(2), p. 161-6.

- [20] Liu, Q. ve Q. Xue, *Computational identification and phylogenetic analysis of the MAPK gene family in Oryza sativa*. Plant Physiol Biochem, 2007. **45**(1), p. 6-14.
- [21] Liu, Y., S. Zhang, ve D.F. Klessig, *Molecular Cloning and Characterization of a Tobacco MAP Kinase Kinase That Interacts with SIPK*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000. **13**(1), p. 118-124.
- [22] Wiese, M., *Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10), p. 1053-62.
- [23] Asai, D.J., Forney, J.D., *Tetrahymena thermophila*. Illustrated ed. 1999, Academic Press.
- [24] Collins, K. ve M.A. Gorovsky, *Tetrahymena thermophila*. Current Biology, 2005. **15**(9), p. R317-R318.
- [25] Karrer, K., *Tetrahymena genetics, two nuclei are better than one*. Methods in cell biology, 2000. **62**, p. 127-86
- [26] Orias E., H.E.P., Orias, J. D., *Tetrahymena as a laboratory organism, useful strains, cell culture, and cell line maintenance*. Methods in cell biology 2000. **62**, p. 189-211.
- [27] Stover, N.A., ve ark., *Tetrahymena Genome Database (TGD), a new genomic resource for Tetrahymena thermophila research*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue), p. D500-3.
- [28] Eisen, J.A., ve ark., *Macronuclear genome sequence of the ciliate Tetrahymena thermophila, a model eukaryote*. PLoS Biol, 2006. **4**(9), p. e286.
- [29] Manning, G., Whyte, DB, Martinez, R, Hunter, T, Sudarsanam, S, *The Protein Kinase Complement of the Human Genome*. Science 2002. **298**,1912-34.
- [30] Hunter, T. ve G.D. Plowman, *The protein kinases of budding yeast, six score and more*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(1), p. 18-22.
- [31] Plowman, G.D., ve ark., *The protein kinases of Caenorhabditis elegans, a model for signal transduction in multicellular organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24), p. 13603-10.
- [32] Hardie, G., Hanks, S., *The Protein Kinase FactsBook*. 1995, Elsevier Inc.
- [33] Diego Miranda-Saavedra, G.J.B., *Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases*. Proteins, Structure, Function, and Bioinformatics, 2007. **68**(4), p. 893-914.
- [34] Robin, Y., ve Viala, B., , *On the presence of ATP, arginine phosphotransferase in the Tetrahymena pyriformis* Comparative Biochemistry and Physiology, 1966 **18**(405).
- [35] Watts, D.C. ve L.H. Bannister, *Location of arginine kinase in the cilia of Tetrahymena pyriformis*. Nature, 1970. **226**(5244), p. 450-1.
- [36] Plunkett, W. ve J.G. Moner, *The role of uridine-cytidine kinase in the regulation of pyrimidine ribonucleotide synthesis in Tetrahymena pyriformis GL*. Biochim Biophys Acta, 1971. **250**(1), p. 92-102.
- [37] Otokawa, M., *Adenylate kinase activity. In ciliary axonemes isolated from Tetrahymena pyriformis*. J Biochem, 1974. **76**(2), p. 335-40.
- [38] Stoffel, W., E. Bauer, ve J. Stahl, *The metabolism of sphingosine bases in Tetrahymena pyriformis. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate lyase*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1974. **355**(1), p. 61-74.

- [39] Young, P.G., S. Corff, ve S. Yuyama, *Activity of thymidine kinase during the cell cycle in Tetrahymena pyriformis*. Cytobios, 1977. **20**(79-80), p. 191-8.
- [40] Yuyama, S., S. Corff, ve P.G. Young, *Identification of true thymidine kinase in Tetrahymena pyriformis ST*. Arch Biochem Biophys, 1978. **188**(1), p. 64-9.
- [41] Anderson, E.P., *UMP-CMP kinase from Tetrahymena pyriformis*. Methods Enzymol, 1978. **51**, p. 331-7.
- [42] Cornish, K.V. ve R.E. Pearlman, *Mutant strains of Tetrahymena thermophila defective in thymidine kinase activity, biochemical and genetic characterization*. Mol Cell Biol, 1982. **2**(8), p. 930-8.
- [43] Kinyanjui, P.W. ve R.E. Pearlman, *Thymidine kinase from Tetrahymena thermophila. Purification and immunological analysis*. Eur J Biochem, 1991. **195**(1), p. 55-63.
- [44] Tsirka, S.A. ve D.A. Kyriakidis, *A model for the regulation of the activity of L-asparaginase/ kinase enzyme of Tetrahymena pyriformis*. Biochem Int, 1989. **19**(1), p. 9-17.
- [45] Tsirka, S.A. ve D.A. Kyriakidis, *L-asparaginase of Tetrahymena pyriformis is associated with a kinase activity*. Mol Cell Biochem, 1990. **95**(1), p. 77-87.
- [46] Roth, S.Y., ve ark., *A cdc2-like kinase phosphorylates histone H1 in the amitotic macronucleus of Tetrahymena*. EMBO J, 1991. **10**(8), p. 2069-75.
- [47] Wang, S., Y. Banno, ve Y. Nozawa, *Two forms of membrane-bound sphingosine kinase in Tetrahymena and activity changes during growth and the cell cycle*. J Eukaryot Microbiol, 2002. **49**(4), p. 305-11.
- [48] Sweet, M.T. ve C.D. Allis, *Phosphorylation of linker histones by cAMP-dependent protein kinase in mitotic micronuclei of Tetrahymena*. Chromosoma, 1993. **102**(9), p. 637-47.
- [49] Kovacs, P. ve G. Csaba, *Effect of inhibitors and activators of tyrosine kinase on insulin imprinting in Tetrahymena*. Cell Biochem Funct, 1992. **10**(4), p. 267-71.
- [50] Bartholomew, J., ve ark., *GTP avoidance in Tetrahymena thermophila requires tyrosine kinase activity, intracellular calcium, NOS, and guanylyl cyclase*. Purinergic Signal, 2008. **4**(2), p. 171-81.
- [51] McMillan, P.J., J.S. Stanley, ve G.A. Bannon, *Evidence for the requirement of protein synthesis and protein kinase activity in the temperature regulated stability of a Tetrahymena surface protein mRNA*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(6), p. 942-8.
- [52] Nakashima, S., ve ark., *Molecular cloning and expression of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase-related kinase from Tetrahymena cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(15), p. 9976-83.
- [53] Hegyesi, H. ve G. Csaba, *A calcium-dependent protein kinase is present in tetrahymena*. Cell Biochem Funct, 1994. **12**(3), p. 221-6.
- [54] Wang, S., ve ark., *Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of a novel NIMA (never-in-mitosis in Aspergillus nidulans)-related protein kinase (TpNrk) in Tetrahymena cells*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 1), p. 197-203.
- [55] Kannan, N. ve A.F. Neuwald, *Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha*. Protein Sci, 2004. **13**(8), p. 2059-77.

- [56] Ubersax, J.A. ve J.E. Ferrell, Jr., *Mechanisms of specificity in protein phosphorylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7), p. 530-41.
- [57] Hanks, S., A. Quinn, ve T. Hunter, *The protein kinase family, conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861), p. 42-52.
- [58] Johnson, L.N., M.E. Noble, ve D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases, structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2), p. 149-58.
- [59] Karin, M. ve T. Hunter, *Transcriptional control by protein phosphorylation, signal transmission from the cell surface to the nucleus*. Curr Biol, 1995. **5**(7), p. 747-57.
- [60] Marks, F., *Protein Phosphorylation*. 1996, VCH.
- [61] Ray, L. ve T. Sturgill, *Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells*. J. Biol. Chem., 1988. **263**(25), p. 12721-12727.
- [62] Robinson, M.J. ve M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(2), p. 180-186.
- [63] Avruch, J., *MAP kinase pathways, the first twenty years*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8), p. 1150-60.
- [64] Bardwell, L., *Mechanisms of MAPK signalling specificity*. Biochemical Society Transactions, 2006. **34**(Pt 5), p. 837-841.
- [65] Gutkind, J.S., *Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors*. Sci STKE, 2000. **2000**(40), p. RE1.
- [66] Widmann, C., ve ark., *Mitogen-activated protein kinase, conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1), p. 143-80.
- [67] Gustin, M.C., ve ark., *MAP Kinase Pathways in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998. **62**(4), p. 1264-1300.
- [68] Fanger, G.R., ve ark., *MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls, upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?* Current Opinion in Genetics & Development, 1997. **7**(1), p. 67-74.
- [69] Chang, L. ve M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824), p. 37-40.
- [70] David W. Powell, W.M.P., Kenneth R. McLeish,, *Defining mitogen-activated protein kinase pathways with mass spectrometry-based approaches*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(6), p. 847-864.
- [71] Zheng, C.F. ve K.L. Guan, *Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases*. J Biol Chem, 1993. **268**(32), p. 23933-9.
- [72] Whitmarsh, A.J., *Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8), p. 1285-98.
- [73] Yoshioka, K., *Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades*. J Biochem, 2004. **135**(6), p. 657-61.
- [74] Dhanasekaran, D.N., ve ark., *Scaffold proteins of MAP-kinase modules*. Oncogene, 2007. **26**(22), p. 3185-202.
- [75] Martin, H., ve ark., *Protein phosphatases in MAPK signalling, we keep learning from yeast*. Mol Microbiol, 2005. **58**(1), p. 6-16.

- [76] Sharrocks, A.D., S.-H. Yang, ve A. Galanis, *Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases*. Trends in Biochemical Sciences, 2000. **25**(9), p. 448-453.
- [77] Tanoue, T. ve E. Nishida, *Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades*. Pharmacology & Therapeutics, 2002. **93**(2-3), p. 193-202.
- [78] Reményi, A., ve ark., *The Role of Docking Interactions in Mediating Signaling Input, Output, and Discrimination in the Yeast MAPK Network*. Molecular Cell, 2005. **20**(6), p. 951-962.
- [79] Chang, C.-I., ve ark., *Crystal Structures of MAP Kinase p38 Complexed to the Docking Sites on Its Nuclear Substrate MEF2A and Activator MKK3b*. Molecular Cell, 2002. **9**(6), p. 1241-1249.
- [80] Jacobs, D., ve ark., *Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase*. Genes & Development, 1999. **13**(2), p. 163-175.
- [81] Smith, J.A., ve ark., *Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo*. J Biol Chem, 1999. **274**(5), p. 2893-8.
- [82] Grewal, S., D.M. Molina, ve L. Bardwell, *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo*. Cellular Signalling, 2006. **18**(1), p. 123-134.
- [83] Bogoyevitch, M.A. ve N.W. Court, *Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8*. Cellular Signalling, 2004. **16**(12), p. 1345-1354.
- [84] Orias, E., *Sequencing the Tetrahymena thermophila Genome-A White Paper*. 2002, The Whitehead Institute Center for Genome Research.
- [85] Coyne, R., Orias, E., *Tetrahymena Comparative Genomics Sequencing Project-A Revised White Paper Submitted to the NHGRI*. 2007, Comparative Genome Evolution Working Group.
- [86] Nanney, D.L. ve J.W. McCoy, *Characterization of the species of the Tetrahymena pyriformis complex*. Trans Am Microsc Soc, 1976. **95**(4), p. 664-82.
- [87] Nanney, D.L., ve ark., *Comparison of sequence differences in a variable 23S rRNA domain among sets of cryptic species of ciliated protozoa*. J Eukaryot Microbiol, 1998. **45**(1), p. 91-100.
- [88] Chantangsi, C. ve D.H. Lynn, *Phylogenetic relationships within the genus Tetrahymena inferred from the cytochrome c oxidase subunit I and the small subunit ribosomal RNA genes*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008. **49**(3), p. 979-987.
- [89] Adl, S.M., ve ark., *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. J Eukaryot Microbiol, 2005. **52**(5), p. 399-451.
- [90] Baldauf, S.L., *The deep roots of eukaryotes*. Science, 2003. **300**(5626), p. 1703-6.
- [91] Peterson, D.S., ve ark., *The circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate Tetrahymena thermophila*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2002. **122**(2), p. 119-126.

- [92] Weide, T., ve ark., *Secretion of functional human enzymes by Tetrahymena thermophila*. BMC Biotechnology, 2006. **6**(1), p. 19.
- [93] Miao, W., ve ark., *Microarray Analyses of Gene Expression during the <italic>Tetrahymena thermophila</italic> Life Cycle*. PLoS ONE, 2009. **4**(2), p. e4429.
- [94] Ashburner, M., *Heat Shock, From Bacteria to Man*. 1982.
- [95] Zhu, J.-K., *Cell signaling under salt, water and cold stresses*. Current Opinion in Plant Biology, 2001. **4**, p. 401-406.
- [96] Amaral, M.D., L. Galego, ve C. Rodrigues-Pousada, *Stress response of Tetrahymena pyriformis to arsenite and heat shock, differences and similarities*. Eur J Biochem, 1988. **171**(3), p. 463-70.
- [97] Galego, L., I. Barahona, ve C. Rodrigues-Pousada, *Response of Tetrahymena pyriformis to stress induced by starvation*. Eur J Biochem, 1984. **139**(1), p. 163-71.
- [98] Dunham, P.B., *The Adaptation of Tetrahymena to a High NaCl Environment*. Biol Bull, 1964. **126**(3), p. 373-390.
- [99] Guttman, S.D., ve ark., *Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptides in starved T. pyriformis*. Cell, 1980. **22**(1 Pt 1), p. 299-307.
- [100] Latifa Fourrat, A.I., Federico Valverde, Aurelio Serrano, Abdelaziz Soukri, *Effects of Oxidative and Nitrosative Stress on Tetrahymena pyriformis Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*. J. Eukaryot. Microbiol., 2007. **54**(4), p. 338-346.
- [101] Robert Shiurba, T.H., Masaru Masuda, Akinori Kawamura, Yuta Komoike, William Klitz, Keiichi Kinowaki, Takashi Funatsu, Shunzo Kondo, Shin Kiyokawa, Toshiro Sugai, Kosuke Kawamura, Hideo Namikiband Toru Higashinakagawa, *Cellular responses of the ciliate, Tetrahymena thermophila, to far infrared irradiation*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2006. **5**, p. 799–807.
- [102] Tondravi, M.M., ve ark., *Molecular characterization of SerH3, a Tetrahymena thermophila gene encoding a temperature-regulated surface antigen*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11), p. 6091-6.
- [103] Asai, D.J., Forney, J.D., *Tetrahymena thermophila*. Illustrated ed. 1999, Academic Press.
- [104] Diaz, S., ve ark., *Tetrahymena Metallothioneins Fall into Two Discrete Subfamilies*. PLoS ONE, 2007. **2**(3), p. e291.
- [105] Amaro, F., ve ark., *Two new members of the Tetrahymena multi-stress-inducible metallothionein family, Characterization and expression analysis of T. rostrata Cd/Cu metallothionein genes*. Gene, 2008. **423**(1), p. 85-91.
- [106] Csaba, G., P. Kovacs, ve E. Pallinger, *Effect of starvation on insulin production and insulin binding in Tetrahymena*. Cell Biochem Funct, 2007. **25**(4), p. 473-7.
- [107] Hegyesi, H. ve G. Csaba, *Effect of permanent starvation on the insulin receptors of the nuclear envelope of Tetrahymena*. Acta Microbiol Immunol Hung, 1994. **41**(3), p. 241-5.
- [108] DiDomenico, B.J., G.E. Bugaisky, ve S. Lindquist, *Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(20), p. 6181-5.

- [109] Horrell, A., J. Shuttleworth, ve A. Colman, *Transcript levels and translational control of hsp70 synthesis in Xenopus oocytes*. *Genes Dev*, 1987. **1**(5), p. 433-44.
- [110] Love, H.D., Jr, ve ark., *mRNA stability plays a major role in regulating the temperature-specific expression of a Tetrahymena thermophila surface protein*. *Mol. Cell. Biol.*, 1988. **8**(1), p. 427-432.
- [111] Tondravi, M.M., ve ark., *Molecular characterization of SerH3, a Tetrahymena thermophila gene encoding a temperature-regulated surface antigen*. *Mol. Cell. Biol.*, 1990. **10**(11), p. 6091-6096.
- [112] Arslanyolu, M., *Characterization of putative mitogen activated protein kinases from Tetrahymena thermophila*, in *Department of BGES 2001*, Cleveland State University, USA.
- [113] Arslanyolu, M., *Molecular cloning and partial characterization of Tetrahymena thermophila Mitogen activated protein kinase 1 (TtMPK1) gene*. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, , 2006.
- [114] Stratagene. *XLI-Blue Competent Cells*. 2009, <http://www.stratagene.com/manuals/200249.pdf>.
- [115] Promega. *Technical Manual - pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. 2009, <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>.
- [116] AddGene. *Vectorpedia*. 2009, <http://www.addgene.org/pgvec1>.
- [117] Sambrook, J. ve D. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour Laboratory.
- [118] Qiagen. *Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol*. 2009, http://molecool.wustl.edu/krolllab/Kroll_Lab_Protocols/Molecular%20Biology%20protocols/Cloning%20protocols%20folder/Gel%20extraction-Qiagen.pdf.
- [119] Promega. *Abstract for pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. 2009 ; <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>.
- [120] Kobs, G., *Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM-T Vector systems*, in *Promega Notes Magazine* 1997, Promega. p. 15-19.
- [121] Sugino, A., ve ark., *Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends*. *J. Biol. Chem.*, 1977. **252**(11), p. 3987-3994.
- [122] Guerry, P., D.J. LeBlanc, ve S. Falkow, *General Method for the Isolation of Plasmid Deoxyribonucleic Acid*. *J. Bacteriol.*, 1973. **116**(2), p. 1064-1066.
- [123] Mertz, J.E. ve R.W. Davis, *Cleavage of DNA by R1 Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972. **69**(11), p. 3370-3374.
- [124] Turkewitz, A.P., E. Orias, ve G. Kapler, *Functional genomics, the coming of age for Tetrahymena thermophila*. *Trends in Genetics*, 2002. **18**(1), p. 35-40.
- [125] Horowitz, S. ve M.A. Gorovsky, *An unusual genetic code in nuclear genes of Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985. **82**(8), p. 2452-2455.
- [126] Asai, D.J. ve J.D. Forney, *Tetrahymena thermophila*. *Methods in Cell Biology*, ed. L. Wilson ve P. Matsudaira. Vol. 62. 2000, Academic Press.

- [127] Hemsley, A., ve ark., *A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction*. Nucl. Acids Res., 1989. **17**(16), p. 6545-6551.
- [128] Ho, S.N., ve ark., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 1989. **77**(1), p. 51-59.
- [129] Ge, L. ve P. Rudolph, *Simultaneous Introduction of Multiple Mutations Using Overlap Extension PCR*. BioTechniques, 1997. **22**(1), p. 28-30.
- [130] National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [131] *Genomics, evolution and function of protein kinases*, <http://kinase.com/>.
- [132] Hauser, L. ve B. Levy-Wilson, *Kinetic changes in protein synthesis in response to a sublethal heat shock in starved Tetrahymena thermophila*. J. Biol. Chem., 1981. **256**(8), p. 3612-3614.
- [133] Giulietti, A., ve ark., *An overview of real-time quantitative PCR, applications to quantify cytokine gene expression*. Methods, 2001. **25**(4), p. 386-401.
- [134] Platek, A., J. Wiejak, ve E. Wyroba, *RT-PCR and Northern blot analysis in search for a putative Paramecium beta-adrenergic receptor*. Acta Biochim Pol, 1999. **46**(3), p. 813-21.
- [135] Richtand, N.M., *Analysis of gene expression in striatal tissue by multiprobe RNase protection assay*. Methods Mol Med, 2003. **79**, p. 181-92.
- [136] Freeman, W.M., S.J. Walker, ve K.E. Vrana, *Quantitative RT-PCR, pitfalls and potential*. Biotechniques, 1999. **26**(1), p. 112-22, 124-5.
- [137] Krumlauf, R., *Analysis of gene expression by northern blot*. Mol Biotechnol, 1994. **2**(3), p. 227-42.
- [138] Maria Marone, S.M., Daniela De Ritis, Luca Pierelli, Giovanni Scambia, *Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample*. Biol. Proced. Online, 2001. **3**, p. 19-25.
- [139] Chen, D. ve R.J. Klebe, *Controls for validation of relative reverse transcription--polymerase chain reaction assays*. PCR Methods Appl, 1993. **3**(2), p. 127-9.
- [140] Barber, R.D., ve ark., *GAPDH as a housekeeping gene, analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. Physiol. Genomics, 2005. **21**(3), p. 389-395.
- [141] Silver, N., ve ark., *Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR*. BMC Molecular Biology, 2006. **7**(1), p. 33.
- [142] Barchetta, S., ve ark., *Combination of two regulatory elements in the Tetrahymena thermophila HSP70-1 gene controls heat shock activation*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(2), p. 379-86.
- [143] Singh, K., ve ark., *26S rRNA-based internal control gene primer pair for reverse transcription-polymerase chain reaction-based quantitative expression studies in diverse plant species*. Anal Biochem, 2004. **335**(2), p. 330-3.
- [144] Abramoff, M.D., P.J. Magelhaes, ve S.J. Ram, *Image processing with ImageJ*. Biophotonics Int, 2004. **11**(7), p. 36-42.

- [145] Laura Jaakola, A.M.P., Anja Hohtola, *cDNA Blotting Offers an Alternative Method for Gene Expression Studies*. Plant Molecular Biology Reporter 2001. **19**, p. 125-128.
- [146] Cleffmann, G., *Chromatin elimination and the genetic organisation of the macronucleus in Tetrahymena thermophila*. Chromosoma, 1980. **78**(3), p. 313-25.
- [147] F. P. Doerder, *Regulation of Macronuclear DNA Content in Tetrahymena thermophila*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1979. **26**(1), p. 28-35.
- [148] Dan, I., N.M. Watanabe ve A. Kusumi, *The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(5), p. 220-230.
- [149] Allen, S.L., ve ark., *Proposed Genetic Nomenclature Rules for Tetrahymena thermophila, Paramecium primaurelia and Paramecium tetraurelia*. Genetics, 1998. **149**(1), p. 459-462.

EK 1. *T.thermophila* MAPK ailesi üyelerine ait gen, erişim numarası, primer seti, aminoasit dizisi bilgileri.

UYARI: Aşağıda bilgileri bulunan TTHERM_00204120 kodlu gen, gerçek bir MAPK değildir. Tez’de yapılan deneysel çalışmalarda bu gen için tasarlanan primerler kullanılmıştır. Kinaz veritabanındaki bir hatadan dolayı gerçek bir MAPK olan ancak “unclassified” olarak tanımlanan bir MAPK geni (TTHERM_01332120) daha sonra belirlenmiş ve biyoinformatik analizlerde “1mapk” adı altında bu gen kullanılmıştır. Sonradan belirlenen bu gene ait bilgiler sayfa 147’de bulunabilir.

Geçici Gen İsmi: 1mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00204120

NCBI Erişim Numarası: XP_001007098

Genomik Lokalizasyonu (5’-3’): Tümüleşke 8254815, 613007 – 614269 bç.leri arası.

İntron Sayısı: 0

Genomik Dizi Büyüklüğü: 1263 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1263 bç.

Protein Büyüklüğü: 420 Aa.

Geri PZR realsiyonları ile Çoğaltılan Bölge Büyüklüğü: 1291 bç.

İleri Primer Dizisi : 5’-atgtagaacctttctaattttgattcattatctc-3’ (1-35)

Geri Primer Dizisi: 5’-cctaaattaattttataatttatattcataaatcttc-3’ (1252-1291)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M Q N L S N F D S L S Q S Q L Q A F S Q
1 atgtagaacctttctaattttgattcattatctcaatctcaattataggcttttagttaa 60
  TACATCTTGGAAAGATTAAAAC TAAGTAATAGAG tagagtttaatatccgaaaaatcaatt
Q N P L R F L S F Q Y T E N D L H S F N
61 taaaatcctttaagattttgtcattttaatacactgaaaacgatttacattcctttaat 120
  attttaggaaattctaaaaacagtaaaattatgtgacttttgctaaatgtaagaaaatta
Y Y T S V Y K I E K R Y R I L K Q I G F
121 tattatactagtgtttataagatagagaaaagatatcgaattttaaaataaaggcttt 180
  ataatatgatcacaatatctatctcttttctatagcttaaaattttatttatccgaaa
G F N P T F T A I D Q E Y G Q K V I I E
181 ggttttaatcctactttcactgcgattgatcaagaatatggataaaaagtaataattgaa 240
  ccaaaattaggatgaaagtgcgactaactagttcttatacctatttttcattattaactt
V I K I E N D D L I Y M N Q L I R Q I K
241 gtaataaaaattgaaaatgatgatttgatttatgaattaactaattagataaataaaa 300
  cattatttttaacttttactactaaactaaatatacttaattgattaatctattttattt
I E N H F K H E N I S S N L H I M M E S
301 atagaaaaccattttaagcatgaaaatattttcttctaactctacatataatgatggaatct 360
  tatcttttggtaaaattcgtacttttataaagaagattagatgtatattactaccttaga
K N L Y I V R E F I D T D L H R V N F S
361 aaaaatctctacatagtaagagagttcattgatacagatttgcatagagtttaatttctct 420
  ttttagagatgtatcattctctcaagtaactatgtctaaacgtatctcaattaaagaga
K Q E L T D D H I Q Y F T Y Q I L S A L
```

421 aaataagaattaactgatgatcatatctaataatctttactttattaataattaagcgctctt 480
 tttattcttaattgactactagtagattataaaaatgaataatttataattcgcgagaa

F F L H S Q N V Y H T Q L R L S N I L L
 481 ttttttttgcattcctaaaatgtttaccacacttaattgagactttctaataatattatta 540
 aaaaaaacgtaaggattttacaaatggtgtgaattaactctgaaagattatataataat

N K N C D L K I S R F I G T N F P N E I
 541 aataaaaattgcgatttgaaaataagccgttttataggtactaatttccctaataaatt 600
 ttatttttaacgctaaactttttattcggcaaaaatattccatgattaaagggattactttaa

Y S Q Y I T S D Y F L S P Q Q I L N L P
 601 tattcataatatataacgagtgactatttcttatctccataataaatttttaatttacct 660
 ataagtattatattgctcactgataaagaatagaggattattttaaaatttaaatgga

K N L S K T D I W H V G V I I L G L I N
 661 aaaaatttatctaaaactgatataatggcatgttgaggaattatttttagggctaattaat 720
 tttttaaatagattttgactatataccgtacaacctcattaataaaaatcccgattaatta

R D T F F S N L S N Q L G G G Y L G L I
 721 agagatactttcttttccaatctttctaattagcttggtggaggctattttgggacttata 780
 tctctatgaaagaaaagggttagaaagattaatcgaaccacctccgataaaacctgaatat

N A I F S Y I G T P S G E E L L Q Y Q D
 781 aatgctattttttcttacataggaactccttcaggagaggaacttttataatattaagat 840
 ttacgataaaaaagaatgtatccttgaggaagtcctctccttgaaaatattataattcta

Y K G L Y Q Y I I K Y S K K S W Q D V F
 841 tataaagggtttgtattaatataatcattaaatatagtaaaaaatcttggtaggatgtattt 900
 atatttccaaacataattatataagtaatttatatcattttttagaacctcctacataaa

P D A N P L L C D L L D K M L V F N E D
 901 ccagatgcaaatcctttattatgtgatctattagataaaatgctcgttttcaatgaagat 960
 ggtctacgtttaggaaataatacactagataatctatttttacgagcaaaagttacttcta

K R Y T V K E C L Q H P Y F E D L Y D L
 961 aagcgctatactgtgaaagaatgcttacaacatccatactttgaagatttatacgatttg 1020
 ttgcgcatatgacacttttcttacgaatggtgttaggtatgaaacttctaaatagctaaac

D D I D E C D V K F D H S Q F Q I G L N
 1021 gatgatattgatgagtgatgtaaaagtttgatcactcttaatttttaattggcctaaat 1080
 ctactataactactcacactacatttcaaactagtgagaattaaaatttaaccggattta

E D E I M K E I Y F E V E K S Y Q K Q Q
 1081 gaagatgaaataatgaaggagattttattttgaagttgaaaaaagttattaaaaatagtaa 1140
 cttctacttttattacttctcctaaataaaaacttcaacttttttcaataatttttatcatt

K Q K L K R Y Q I Q I I Q N I A F Q K H
 1141 aagtagaagctaaaaagatattaaatataaataatttaaaatattgcttttttaaagcac 1200
 ttcatcttcgatttttctataatttatattttataaattttataacgaaaaattttcgtg

L A D Q I P L N P K L I F Y N L Y E D L
 1201 ttagctgattaaattcctccttaatcctaaattaatattttataattttatat **GAAGATTTA** 1260
 aatcgactaatttaaggagaattaggatttaattataaaaatattaaatataacttctaaat

Q
 1261 **TGAAATATAAATTATAAAATATTAATTTAGG** 1291
 actttatatttaaatattttataaattaaatcc

Geçici Gen İsmi: 1mapk

DİKKAT: Bkz. Uyarı. sf.145.

TGD Erişim Numarası: TTHERM_01332120

NCBI Erişim Numarası: XP_001010007.1

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254766, Bölge: 31968 – 34095 bç.

İntron Sayısı: 6

Genomik Dizi Büyüklüğü: 2128 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1266 bç.

Protein Büyüklüğü: 421 aa.

Primer Setinin PZR ile Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü:

Primer Setinin Geri PZR ile Çoğaltılan Bölge Büyüklüğü: 638 bç

İleri Primer Dizisi : 5' ggagatttaaaatgatgactttgg 3' (26 bç)

Geri Primer Dizisi: 5' gtgggaataaacgctttaacc 3' (22 bç)

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M D I K R N M E T T K I D Y S K Y I N E
1 atggatattaaaaagaatatggaaacaactaaaaatagattatagcaagtatataaaatgag 60
  tacctataaatttctttatacctttggtgatttatcctaataatcgttcatatattactc

K P F T K W K L N D I E F Y M E S S I Q
61 aagcattcacaaaatggaaattaaatgacatagagttttacatggaatctagcatcaa 120
  ttccgtaagtgttttacctttaatttactgtatctcaaaatgtaccttagatcgtaggtt

N L Q I K A G Q G T F G V V V A C Q D K
121 aatttataaattaaagcgggataaggtacctttggtgtagttggtgcatgtaggataaa 180
  ttaaatatttaatttgcgcctattccatggaaaccacatcaacaacgtacaatcctattt

E K E F F D E D S D F V A I K K I E R A
181 gaaaaagagttttttgatgaggatagtgattttgtagcaattaaaaaaatagaaagagca 240
  ctttttctcaaaaaactactcctatcactaaaacatcgttaatttttttatctttctcgt

F E H T Q Y A I R T I R E I K L Q R M L
241 tttgagcacacataatacgcgaattagaacaattagagagattaattacaaagaatgtta 300
  aaactcgtgtgtattatgcgtaaatcttgtaatctctctaatttaagtgttcttacaat

A H E N L L L P K S R E Q M N D I Y L V
301 gctcacgaaaatctattgctacaaaatctagagaataaatgaatgacatatatttagtt 360
  cgagtgccttttagataacgatggttttagatctcttatttacttactgtatataaatcaa

E P L M T S D L R A I I N S Q N E I N E
361 gaacctctcatgacgagtgatctaagagcaatcatcaattccttaaaatgaaatgaatgaa 420
  cttggagagtactgctcactagattctcgtagtagttaagaattttactttaattactt

E H I Q F L M Y Q I I R G L K Y M H S A
421 gaacatatatttaatttttaattgatacaaaattataagaggtcttaaatatataatgcatctgca 480
  cttgtataaattaaaaattacatagtttaatttctccagaatttatatacgttaagacgt

Q I V H R D L K P K N V L S N E Q G D L
481 cagatagtcctagagatttgaaacctaagaatgttcttttcaaatgaataaGCAGATTTA 540
  gtctatcaggtatctctaaactttgattcttacaagaaagtttacttattcctctaatt
```

K I C D F G F A R H I Q K N R V N D L S
 541 **AAAATATGTGACTTTGG**atttgctagacatattttaaagaatagagtaaagatgatctaaagt 600
 ttttatacactgaaacctaacgatctgtataaattttcttatctcatttactagattca

 E Y V T A R W Y R A P E I L L S Y K K Y
 601 gagtatgtaacagctagatggtatagagctcctgaaatattggtgcatataaaaaatat 620
 ctcatacattgtcgatctaccatatctcgaggactttataacaacagtatattttttata

 D I A V D M W S C G I I M A E L L K R Q
 661 gacatagcagttgacatgtggtccttgtggaattataatggctgaacttttgaaaagatag 720
 ctgtatcgtcaactgtacaccagaacaccttaattaccgacttgaaaacttttctatc

 P I I R G A S T D D Q M R Q I L Q L I G
 721 ccaattattagagtgcttcaacagatgattaatgagacaaattctacaattaattgga 780
 ggtaataatctccacgaagttgtctactaatttactctgtttaagatgtaattaacct

 S P D E E Y Q V K D P E Y K K L L S Y F P
 781 agtccagatgaatatcaagtaaaggacctgaatataaaaagctgctttcttatttccca 840
 tcaggtctacttatagttcatttctgaggacttatatttttcgacgaaagaataaaagggt

 Y C P G K N F K L I F P N A S S Q C L D
 841 tactgtcctggaaaaatttttaacttatatttccaaatgcttcatcgtagtgtttagat 900
 atgacaggaccttttttaaaatttgaatataaaaggtttacgaagtagcatcacaactca

 L L K K L L Q I D P S Q R I T A E Q A L
 901 ctacttaaaaagcttttgtaattgatccttcataaagaataactgcggaataagcgcta 960
 gatgaatttttcgaaaacatttaactaggaagtatttcttattgacgccttattcgcgat

 A H P F F E M L H D P S D E P D C E P I
 961 gctcatccggttttttgaaatgcttcaacgatccctctgatgaacctgattgtgagccaatt 1020
 cgagtaggcaaaaaacttttacgaagtgctagggagactacttggactaacactcggttaa

 N Q A E F E Y E N Y D L N D Q Q L K D I
 1021 aattaagccgagtttgagtacgaaaattatgactttaaattgattaataactaaaagacata 1080
 ttaattcggctcaaactcatgcttttaataactgaatttactaattattgattttctgtat

 L Y E E I L L Y N S P E F R E Q Y Y E K
 1081 ttatatgaagagatattgctatacaactctcctgaattcagagaataatattatgagaag 1140
 aatatacttctctataacgatatggttgagaggacttaagtctcttattataataactcttc

 L K K G Q S V Y S H I I G D V E D N D N
 1141 ctcaaaaa**GGTTAAAGCGTTTATTCCAC**ataataggtgatgtagaagacaatgacaac 1200
 gagtttttcccaatttcgcaataagggtgtattatccactacatcttctgttactgttg

 D Y D D D D E E D E E E D D D E T K K T
 1201 gactatgacgatgatgatgaagaagatgaagaagaggacgatgatgaaactaaaaagaca 1260
 ctgatactgctactactacttcttctacttcttctcctgctactacttttgatttttctgt

 N *
 1261 aattga 1266
 ttaact

Geçici Gen İsmi: 2mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00760270

NCBI Erişim Numarası: XP_001031643

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümlüşke: 8254370, Bölge: 41152 – 37636 bç.

İntron Sayısı: 10

Genomik Dizi Büyüklüğü: 3517 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1620 bç.

Protein Büyüklüğü: 540 Aa.

Primer Setinin PZR ile Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1620 bç.

Primer Setinin Geri PZR ile Çoğaltılan Bölge Büyüklüğü: 1620 bç

İleri Primer Dizisi : 5'- atggatacagctaatttagttgc-3' (1-24)

Gerri Primer Dizisi: 5'- tcattttaagttaattgacatgagcc-3' (1594-1620)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M D T A N L V A K E V V E Y Y Q P Y R H
1 atggatacagctaatttagttgcaaaagaagttgtagaataactactagccatacagacat 60
  TACCTATGTCGATTAAATCAACGttttcttcaacatcttatgatgatcggtatgtctgta
K N E R Y R I L E K I G Q G A Y G V V S
61 aaaaatgaacgctatagaattctagagaaaattggacaaggagcctatggagttgtttca 120
  tttttacttgcgatatcttaagatctcttttaacctgttctcctcgatacctcaacaagt
A A I D Q V K R K S V A I K K I E K A F
121 gctgcaattgattaagtaaaaagaaaagtggtgcaattaagaaaattgaaaaggccttt 180
  cgacggttaactaattcatttttctttttcacacggttaattcttttaacttttccggaaa
D Q R I Y T K R T L R E L K L L R L L T
181 gattaaagaatttataccaagcgtactcttctgtaacttaagcttcttctcctcact 240
  ctaatttcttaaatatggttcgcgatgagaagcacttgaattcgaagaagcagaggagtga
H E N V I G L E S I L L P K S R E E F D
241 cacgaaaatgtgataggtctagaaagtattctccttcttaagtcaagagaagagttcgat 300
  gtgcttttacactatccagatctttcataagaggaaggattcagttctcttctcaagcta
D I Y C V S E L M E T D L Q Q I I K S D
301 gatatctactgcgtttcagagttaatggaacagatctttaataaattattaagtcagac 360
  ctatagatgacgcaaagtctcaattaccttctgtagaaattatttaataattcagtcgtg
Q Q L T Q D H C K F F I Y Q I L R G L K
361 taataattgacttaagatcattgcaaattctttatctactaaattcttctggtggttaaaa 420
  attattaactgaattctagtaacgtttaagaaatagatgatttaagaagcacccaatttt
Y I H S A N V I H R D L K P R N L L V N
421 tacattcattcagctaattgttattcatagagatctgaaaccaagaaaccttttggttaac 480
  atgtaagtaagtcgattacaataagtatctctagactttgggttctttggaaaaccaattg
S N C D L K I C D F G L A R S V A N T K
481 tctaattgcgatttaaagatttgcgatttctggtcttctgtagatctgtagctaacacaaa 540
  agattaacgctaatttctaaacgctaaagccagaacgatctagacatcgattgtgtggtt
N D L T D Y V T T R W Y R P P E L L L S
541 aatgatttaactgattatgtcacaactcggttggtatagacctcctgagctttttattgtca 600
  ttactaaattgactaatacagtggtgagcaaccatctgtaggagctcgaaaataacagt
```

W T D Y T C A M D V W S V G I I F A E L
 601 tggacagattacacatgCGcaatggatggttggctggttggattatttttgcagagcta 660
 acctgtctaattgtgtacgcggttacctacaaaccagacaaccataataaaaacgtctcgat

 I K R K P L L P G S S S S D Q L L R I F
 661 ataaaaagaaagcccttttaccaggtcaagctcatcagattagcttctaagaatattt 720
 tatttttctttcggggaaaatgggtccgagttcgagtagtctaatacgaagattcttataaa

 D L I G T P L E N E I Q M I P Y D E Y R
 721 gatttaaataggactccattagaaaatgaaatataaatgataccatattgatgaatattcgt 780
 ctaaattatccatgaggttaattcttttactttatatttactatggtataactactttatagca

 K F I R E L P K R E P K Q F E K I F S K
 781 aaattttattagagaattaccaaagagagagcctaaatagtttgaaaaaatcttttctaag 840
 tttaaataatctctaattggtttctctctcgatttatcaaacttttttagaaaagattc

 A P K E A L D L L K K M L T F D F N K R
 841 gcacaaaagaggcttttagatttacttaaaaaatgttaacatttgattttaataaacgt 900
 cgtggttttctccgaaatctaataatgaattttttacaattgtaaaactaaaattattgca

 I T V E E A L K H P Y L S D L H L P E D
 901 attactggtgaagaagctctcaagcacccttacttgagtgatcttcattttacctgaagat 960
 taatgacaacttcttcgagagttcgtgggaatgaactcactagaagtaaatggacttcta

 E P S R S E V P F Y E F E F E M H S N L
 961 gaaccttctagaagtgaagttcctttctatgaatttgaattcgaatgcactccaactta 1020
 cttggaagatcttcacttcaaggaaagataacttaaaacttaagctttacgtgaggttgaat

 T R Q Q Y K D L V Y E E I L L Y H Y P D
 1021 acaagataataatacaaaagatcttgtgtatgaagaaatcctcctttatcactaccctgat 1080
 tgttctattattatgtttctagaacacatacttcttttaggaggaaatagtgtatgggacta

 F K K K Y L D K I Q N N Q S V M Q H I F
 1081 ttcaaaaagaagtatttagataagattttaaataaccaatctgttatgtagcacatattt 1140
 aagtttttcttcataaatctattctaaattttatgggttagacaatacatcgtgtataaa

 D N A N K N I I I D S E C I F S Q I G N
 1141 gataatgctaataaaaaatataattattgatagtgaaatgcatttttagttaaattggaaat 1200
 ctattacgattatttttatattaataactatcacttacgtaaaaaatcaatttaaccttta

 K S Y N Q N Y F K N C Q S S N N C G I G
 1201 aagtcttataattaaaattttttaaattgttaaagttcaaacattgtgggataggt 1260
 ttcagaatattaatttttaataaaaatttttaacaatttcaagtttgttaacaccctatcca

 C Q F C A V D S N S N S Y K C N L C F E
 1261 tgctaattttgtgcagtagacttaacagcaattcttacaatgcaacctttgttttgag 1320
 acgattaaaacacgtcatctgagattgtcgttaagaatgtttacgttggaaacaaaactc

 G Y Q F D S S N N V C V Y Q K C L D N F
 1321 ggttactaatttgatagctcaaataatggttgcgtttactaaaaatgcttagataacttc 1380
 ccaatgattaaaactatcgagtttattacaaacgcaaatgatttttacgaatctattgaag

 Y F Q I N E N S N N D S N G S C V S I C
 1381 tacttctaataatgaaaattctaataacgattcaaatggaagttgtgtatctatttgt 1440
 atgaagatttaattacttttaagattattgctaagtttaccttcaacacatagataaaca

 N P L Y I G D L I Q K V C K K L I Q C S
 1441 aatccactctatataggcgatctcattttaaagatgcaaaaagcttatctaattgttca 1500
 ttagggtgagatatatccgctagagtaaatttttcatacgtttttcgaatagattacaagt

 S S F A T Q P N F I G I D I A Q D F F V
 1501 tctcatttgcacttaaccaaattttattggtattgacatagcttaagacttttttggt 1560
 aggagtaaacgatgaattggttttaaaaataaccataactgtatcgaattctgaaaaaaca

 Y Q K D Y Y V A I Q Q G S C Q L N L K Q
 1561 tattagaaagattattatgtagcaatatagtaa**CGCTCATGTCAATTAACTTAAATGA** 1620
 ataacttttctaataatacatcgttatatcattccgagtagtaattttgaattttact

Geçici Gen İsmi: 3mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00689900

NCBI Erişim Numarası: XP_001026993

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8253915, Bölge: bç. 260220 – 257154

İntron Sayısı: 9

Genomik Dizi Büyüklüğü: 3067 bç.

cDNA Büyüklüğü: 2388 bç.

Protein Büyüklüğü: 795 Aa.

Primer Setinin PZR ile Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1368 bç.

Primer Setinin Geri PZR ile Çoğaltılan Bölge Büyüklüğü: 1003 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'-gggaatccaaactattagtcagcc-3' (571-595)

Gerri Primer Dizisi: 5'-agggtgaggcatttgg -3' (1558-1574)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M H P N Q E Q E K Y G M Q A N R M N P T
1 atgcatccaaattaagagcaagaaaagtggaatgcaagcaaatcgcatgaacccaact 60
  tacgtaggtttaattctcgttcttttcataccttacgttcgttttagcgtacttgggttga

A G N M V D Q S K Q D I M Y Q N N F N G
61 gctggaaacatggttagactaaagcaaacaggatattatgtatcagaataattttaatgga 120
  cgacctttgtaccatctgatttctgtttgtcctataatacatagctttattaaaattacct

G N N P N E M N Y Y R N N Q L Q Q Q N F
121 ggaaataatcctaataatgaaatgaactattataggaataattagcttcaatagcagaatttt 180
  cctttattaggattactttacttgataatatccttattaatcgaagttatcgtcttaaaa

I E N N N N M Y A A N N I N M V M P P Q
181 attgaaaataataataacatgtatgctgcaaataacataaaataggtaatgccgccttag 240
  taacttttattattattgtacatacgacgtttattgtatttataaccattacggcggaatc

G Q Y I Q D P N A Q V I H Q Q Q Q Y D D
241 ggttaatatatctaagacccaacgcttaggttattcattagtagtaataatatgatgat 300
  ccaattatagattctgggtttgcgaatccaataagtaaatcatcattattataactacta

Q N Y Y P M N G V N T Q Q N Q Q H Q F V
301 taaaattattatcctatgaatggagtgaataacttaacaaaactagtagcatcagtttgg 360
  attttaataataggatacttacctcacttatgaattgttttgatcatcgtagtcaaacac

N M Q G D M Q N Q Q I L K Q G N D F Q Q
361 aatatgcaagtgatgatgcaaaatcaataaatattgaaatagggaaatgacttttaataa 420
  ttatacgttccactatacgttttagttatttataactttatccctttactgaaaattatt

I Q Y M M G G G E G V Q I D H Q Y T M Y
421 atttaatatatgatgggtgggtggagaaggtgtataaatagatcatcaatatactatgtac 480
  taaattatatactaccaccacctcttccacatatttatctagtagttatgatgatacatg

N Q L Q N H Q F D Q N Y G M N N D L K P
481 aattaactctaaaatcattagtttgactaaaattatggatgaacaacgattttaaagcct 540
  ttaattgagatttttagtaatcaaactgattttaaaccatacttggctaaatttcgga

A T V N S Q Y P Q I G N P N Y Q S A Q F
541 gctactgtcaattcttaatatccttaaatagggaaatccaaactattagtcagcctagttt 600
  cgatgacagttaagaattataggaatttatCCCTTAGGTTTGATAATCAGTCGGatcaaa
```

Y Q K Q Q H L N T L Q E Q N Q K Q N N Q
 601 tactagaagcagtagcatttaaatactttataggaataaaaacaaaaatagaataattaa 660
 atgatcttcgcatcgtaaatttatgaaatatccttattttggtttttatcttattaatt

E V K L K Q Q P N S D T E D P Y F N S I
 661 gaagtaaaactcaacaacaaccaaatagcgacaccgaagatccctatttttaactctata 720
 cttcattttgagtttggttggtttatcgctgtggcttctagggataaaaattgagatat

F I F Q N R F D V P K K Y Q L L V P I G
 721 ttcatattctagaataggtttgatggtcccaagaaatattagcttcttgtccctataggc 780
 aagataagatcttatccaaactacaagggttctttataatcgaagaacagggatattccg

I G G Y G V V A K A F D Q E K Q D F V A
 781 ataggaggttatggagttggtgctaaagcatttgattaagagaaataagattttgttgct 840
 tatcctccaatacctcaacaacgatttcgtaaactaattctctttattctaaaacaacga

I K K I F K P F L N P L E T K R I L R E
 841 ataaaaaaaaatatttaagcctttcttgaaatccattagagacaaaaagaattttgagagaa 900
 tattttttttataaaattcggaagaacttaggtaactctctgtttttcttaaaactctctt

I K I L K A L E H D N I I S I R D V L S
 901 attaaaatattaaaagcttttagagcatgataacattattagtagtagatggtttatca 960
 taattttataattttcgaaatctcgtaactattgtaataatcataatctctacaaaatagt

P V P K E K L E D I Y I I S Q L M D T D
 961 cctggtcctaaagaaaaattagaagatatttatattttcttaacttatggatactgat 1020
 ggacaaggatttcttttaactctctataaatataataaagaattgaatacctatgacta

L H Q I I A S D Q I L S E D H I Q F F I
 1021 ttacattaatatttgcttcagactaaattcttagtgaagatcacatataattttttatt 1080
 aatgtaatttaataacgaagtctgatttaagaatcacttctagtgatatataaaaaataa

Y Q L L C G L K Y V N Q I Y Y F L K Y I
 1081 tattaattgctatgcggtcttaaatatgtaactaaatttattattttcttaagtagcatt 1140
 ataattaacgatacgcagaatttatacaattgatttaataataaagaatttcatgtaa

H S A G V F H R D L K P G N L L V N S D
 1141 cattcagcaggagtattccatagagatttaaaaccaggcaatctattagtaaactcagac 1200
 gtaagtcgctcctcataaggtatctctaaattttggtcgttagataatcatttgagctg

C V L K I C D F G L A R T V D T K V N V
 1201 tgtggttggaagatagtgtattttggtccttgcaagaactggtgatacaaagggttaatgct 1260
 acacacaacttctatacactaaaaccagaacgttcttgacaactatggtttccaattacag

L V L M T E Y V A T R W Y R A P E L L L
 1261 ttggttctaatacagaatattgtagctacgagatggtagagcgcctgaattgctttta 1320
 aaccaagattactgtcttatacatcgatgctctaccatattctcgggacttaacgaaaat

S W N K Y T T A I D M W A V G C I F S E
 1321 tcttggaataagtagacaactgctatagatattggtggtggttgctatttttagcgaa 1380
 agaacttattcatgtgttgacgatattctatacaccgcacaaccaacgtaaaaaatcgctt

L Y M R K P L L P G E S Y L N Q L I L T
 1381 ttatacatgagaaagcctttggtgaccaggagaaagttacttaattagctcattttaact 1440
 aatattgtagcttttcggaacaacaggtcctctttcaatgaatttaacgagtagaaattga

L N L T G T P S K E D L E N I Q S D R A
 1441 cttaatttaacaggtactccatctaaagaagatttagaaaaatatacaaagtgatagagcc 1500
 gaattaaattgtccatgaggttagatttcttctaaatcttttatatggtttcactatctcgg

K Q F I I S L G N K A P K D L S K L I P
 1501 aaataattcattataagtttaggaataaagctccaaaagatctttctaaattaata**CCA** 1560
 tttattaagtaataattcaaatctttatcttcgaggttttctagaaagatttaattatggt

N A S P Q A I D L I S K M I V F N P D K
 1561 **AATGCCTCACCT**aggcaattgatcttattagcaaaatgatagcttttaattccagataaa 1620
 ttacggagtggtatccggttaactagaataatcgttttactatcagaaaattaggtctattt

R I S A E E A L K H P F F E G I R E S E

1621 agaataagtgacagaagaagctcttaaacatcccttctttgaaggtattcgtgaatcagaa 1680
tcttattcacgtcttcttcgagaatttgtagggaagaaacttccataagcacttagtctt

F E V E A K V K F D F D F E R E D I T L
1681 tttgaagtagaagcaaaagttaaatttgatgtttgattttgaaagagaagatattacatta 1740
aaacttcatcttcgttttcaatttaactaaaactaaaacttttcttctataatgtaat

D E L K D A I Y Q E M L K F H P T F D E
1741 gatgaattgaaagatgcaattttatcaagaaatgttaaagttccaccaacttttgatgaa 1800
ctacttaactttctacgttaaatagttctttacaatttcaaggtgggttgaaaactactt

N N K E T Y H I P I K R D S D L F T L D
1801 aataacaaggaacataccacatccctattaaaagagattccgatttatttacacttgat 1860
ttattgttcctttgatgggtgtagggataattttctctaaggctaaataaatgtgaacta

Y D G S K I Y I D Y K L G Q N D Q P Q Q
1861 tatgatggttctaaaatatatatagattataagctaggatagaatgattagccataatag 1920
atactaccaagattttatatataatattcgtatcctatcttactaatcggattatc

V V Q N I Q Q I N E K M V K D I I G V D
1921 gtagttaaaatatctaataaattaatgaaaagatgggttaaagatataataggagtagat 1980
catcaaattttatagattattttaacttttctaccaatttctatattatcctcatcta

G N G K M I Q D Q Q F I Q M P Y Y N N T
1981 ggaaatggtaaaatgatgttaggactagcaattcatatagatgccttattataataaacact 2040
cctttaccattttactaaatcctgatcgttaagtataatctacggaataatattattgtga

I F S P S Q V E Q Q N Y Q H Y Q Q Q Q Q
2041 attttttcaccttcataagtggaaatagcaaaattattagcactattaacaatagtagcaa 2100
taaaaaagtggaagtattcaccttatcgttttaataatcgtgataaattgttatcgtt

Q L Y Q Q N Y N V Q Q Q Q H Q T D T Q N
2101 tagctatattagtagaattataacgtataataacagtagcactaaaccgatacataaaat 2160
atcgatataatcatcttaattgtcatattattgtcatcgtgatttggtatgtatttta

I E Y Q Q Q Q Q P H L Q H Q A V F N H
2161 attgaatactagcaacaatagtaataaccacatttacagcactaggctgtgtttaaccat 2220
taacttatgatcgttggttatcattattgggtgtaaagtgcgtgatccgacacaaattggtg

E G G N Q Y M D I Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
2221 gaaggtggtaattaatatatggatatttagcagtaataataataataatagtaatagtag 2280
cttccaccattaattatatacctataaaatcgtcattattattattattatcattatcatc

Q Y M M N Q H Y V D Y N N N N Q V F I N
2281 taatatatgatgaatcaacattatgtagattataataacaataatcaagtttttatcaat 2340
attatatactacttagttgtaatacatctaataattattggttatttagttcaaaaatagtta

Q Q Q E I D Q N D T Q M R E E Q
2341 cagcaataagaaattgatcaaaatgatacataaatgagagaagaatga 2388
gtcgttattctttaaactagttttactatgtatttactctcttctact

Geçici Gen İsmi: 4mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00492370

NCBI Erişim Numarası: XP_001023129

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254446, Bölge: 34922 – 22425

Intron Sayısı: 18

Genomik Dizi Büyüklüğü: 12498 bç.

cDNA Büyüklüğü: 9132 bç.

Protein Büyüklüğü: 3043 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1327 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltılacağı Bölge Büyüklüğü: 811 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- gggtcattttattaaaaaggc -3' (6987-7009)

Geri Primer Dizisi: 5'- cgacaatttatcaaaatctgg -3' (7777-7798)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M N L Q A Q Q K T R K Q S K G Q I L E I
1 atgaatctctaagcatagtaaaaaacaagaaaatagtcgaaaggctaaattttagagata 60
  tacttagagattcgtatcattttttgttcttttatcagctttccgatttaaaatctctat

F E Q I K P T H Y I Q D T A N G V S T K
61 tttgagtaataaaagcctactcattatatttaagacactgcaaattgggtgtttcaaccaa 120
  aaactcattttatcggatgagtaataataaattctgtgacgtttaccacaaagtgtgttt

S F T K Q I R Y Q S Q N P K M S N Q K E
121 tcattttacaaagtaataagatacacaagtcagaatcctaaaaatgagcaattaaaaagaa 180
  agtaaatgtttcatttattctatggtttcagtccttaggattttactcgtttaatttttctt

K R N Q E Y L F H I G N H A R T V S D I
181 aaaaggaatcaagagtatctctttcatattggaaatcatgcaagaactgtcagtgatatt 240
  ttttccttagttctcatagagaaagtataaccttttagtacgttcttgacagtcactataa

L K F R Y D Q Y K Q T L G Q Q E Q Q S E
241 ttgaagtttagatatgattaatataaacaacttttagggtaacaagagtagtagtcagaa 300
  aacttcaaatctataactaattataattgtttgaaatcccattgttctcatcatcagttctt

E Q Q R M Q Y Q N Q Q S I W Q N S T T M
301 gagtaataaagaatgtagtattaaaaatcaataatctatatggtaaaactctacaactatg 360
  ctcattattttcttacatcataatttttagttattagatataaccattttgagatggtgatac

I Q Q Y Q Q Y H Q A Q E S N I K R S N T
361 atataataataactaataataaccactaagcataagaatcaaataatcaagagatctaataca 420
  tatattattatgattattatgggtgattcgtattcttagtttatagttctctagattatgt

L S N L Q S Q K S G V K I C N S A S K Q
421 ctcagcaattttatagagttaaaaatcaggagttaaaatttgtaattctgctagcaataaa 480
  gagtcggttaaatatctcaatttttagtcctcaatttttaacattaagacgatcgtttatt

S E K N Q N T Q K L L Y K P A Q I Q S Q
481 agcgaaaaaaattaaaatacataaaagctttttatataagccagctcaaatacagtcctaa 540
  tcgctttttttaattttatgtattttcgaaaaatataatcggtcgagtttatgtcagaatt

K A I S S I L G S A E S N I S P I K K S
541 aaagctatctcttctatttttaggaagcgtgaatcaaataatttcaccaataaaaaaatct 600
  tttcgatagagaagataaaatccttcgcgacttagttttataaagtggttattttttttaga

Y N E D L A T A G D T R D N F A S L S G
```

601 tataatgaagatttggcaactgcaggagacacaagagataactttgcatctttaagtgga 660
 atattacttctaaccggttgacgtcctctgtgttctctattgaaacgtagaaattcacct

 G S L K S N P N N F S F Q D R K Y V S E
 661 ggatctttaaaatcaaaccctaataatTTTTTCTTCTAAGATAGAAAATATGTTAGTGAA 720
 cctagaaaTTTTAGTTTGGGATTATTA AAAAGAAAGATTCTATCTTTTATACAATCACTT

 K D Y L S I Q R N L F D S I D T Q K N S
 721 aaagactatTTTatccattttaaaggaacctTTTTGATTCTATAGACACACAAAAGAATAGT 780
 TTTCTGATAAATAGGTA AATTTCTTGGA AAAACTAAGATATCTGTGTGTTTTCTTATCA

 S I Q N Q Q C S S I V Q S K K E S D E I
 781 tctattttaaataaacaatgttcttcaattgttcaatcaaaaaaagaatcagacgaaata 840
 agataaattTTAATTGTTACAAGAAGTTAACAAGTTAGTTTTTTTCTTAGTCTGCTTTAT

 D F N K Q S K L E K Q N N Q T F N K E D
 841 gatttcaataaaataatctaaattagaaaagtaaaataatcaaactTTTaaacaaagaagat 900
 ctaaagttatTTTattagattttaaTCTTTTcattttattagtttggaaaattgtttcttcta

 R L L Q S P A S L H L N Q K S Q S Q D Y
 901 agattattataatctccagcatctttacattttaaattagaaatcataatcataagattac 960
 tctaataatattagaggTCGTAGAAATGTA AATTTAATCTTTAGTATTAGTATTCTAATG

 L A Q K N P T Q Q Q Q M S P H L I Q P S
 961 ttggcataaaaaaatcctacataataacaataaatgagcccacatcttatttTaaacctagc 1020
 aaccgtatTTTTTTAGGATGTATTATTGTTATTACTCGGGGTGAGAATAAATTGGATCG

 H L L F V D S Q Q N Q N Q I N Y P N Q F
 1021 catttgctcttctgTCGACAGTCAATAAAATTA AAATTAGATAAATTATCCAACCAATTT 1080
 gtaaacgagaagcagctgtcagttatTTTaaTTTaaTCTATTTAATAGGTTTGGTAAA

 I S S I S Q T S G Q Q N Q T Q E Q F K I
 1081 atatcaagcatttcataaacctctggTTAATAAAATTAACATAGGAATAATTCAA AATT 1140
 tatagttcgtaaagTATTTGGAGACCAATTTTAAATTTGTATCCTTATTAAGTTTTAA

 D Q F K N N Q I N N N Q K F L N Q I N Y
 1141 gattaattcaaaaaaatcaataaaataataattaaaagTTTTTgaaactaaataaattat 1200
 ctaattaagTTTTTgTTAGTTTATTATTATTAATTTTcaaaaacttgatttatttaata

 S Q Y N S I P S L D I S Q A Q N K E G I
 1201 tcttaataataattcaattccttctgctagatataagctaagcttAAAATAAGGAAGGTATC 1260
 agaattatattaagTTAAGGAAGCGATCTATATTCGATTGCAATTTTATCTCTCCATAG

 I N T D I K P I Q K Y Q E N L Q S T S T
 1261 ataaatacagatattaagcctattcaaaaatattaagaaaatctgtagtcaacctcaaca 1320
 tatttatgtctataattcggataagTTTTTATAATCTTTTtagacatcagttggagttgt

 I E T N Q L A Q A N K I T E S K F T N F
 1321 atagaaactaattaattagcttaagcaataaaattactgaatcaaaatttacaattttt 1380
 tatctttgattaattaatcgaattcgtttatTTTaatgacttagtttTaaatgtttAAAA

 A K S N D Q S Q M Q S A S D I Y S F N Q
 1381 gctaaaagtaatgattagtcataaatgcaatcagcctctgatataatTcatttTaaattag 1440
 cgatTTTcattactaatcagTATTTacgttagtcggagactatataataagTaaattaatc

 P Y S T S Q I S S Q I L S T E R Q F K I
 1441 ccatatagtactagctagataagttcccaaattctctctactgaaaggtaattcaaaata 1500
 ggtatcatgatcgcgatctattcaagggTTTaaagagagatgactttccattaagttttat

 K L T K I T K D S Q I S E E Y Q I N K S
 1501 aagctgactaaaattacaaaggattcttagatttctggaagaatatcagataaataaatct 1560
 ttcgactgatttTaatgTTTctTaaagaatctaaagccttcttatagtctatttatttaga

 P S S F T Q L E N K Q D L L I K F A E A
 1561 ccttcatctTTTacttTaaattagaaaataagtaagacctTTTaatcaaattcgcTgaagca 1620
 ggaagtagaaaatgaattaatctTTTattcattctggaaaattagTTTaaagcgactctgt

 R K Q E H L N N L Y D D A Q S D F S K T
 1621 agaaaataagagcattTaaataatttatatgatgatgcttaatcagattTTTctaaaact 1680

tcttttattctcgtaaattttatataactactactacgaattagtctaaaaagattttga

1681 P Q T N K S E V I K R F K A S Q I F D Q ccttagacaaacaaatctgaggttaataaaaggtttaaagcttctcaaatTTTTGATTAA 1740
 ggaatctgTTTgTTtagactccattaatTTTccaaatTTTcgaagagTTTaaaaactaatt

1741 N Q S Q A N S K P S Q N K S S Q I Y Y N aattaatcataagcaaatagtaagccaagttagaataagtcttcataaatatattacaat 1800
 ttaattagttatcgtttatcattcggttcaatcttattcagaagtatttatataatgTTA

1801 N N S Q Y D F A N S V K E I N N E H K Y aataatagctagtatgattttgcaaagtgtcaaagaaataaataatgaacacaagtac 1860
 ttattatcgatcactactaaaacgtttatcacagtttctttatttattacttTgTgttcagT

1861 T N L M S S A Q Q Q N L S H Q I P T L S acaaatTTtaatgTcatccgcttaacaataaaaacttatcacactaaataccaccttaagt 1920
 TgTTTaaattacagtaggcgaattgTTatTTTgaaatgTgatttatgggTggaattca

1921 G M G R I N N F I R K S Q E G N K Q S N ggaatgggaagaattaacaattttattagaaaatcttaagaaggaaacaaataaagcaac 1980
 ccttacccttcttaattgTTTaaataatctTTTtagaattcttcccttTgTTTatttctgTg

1981 Y F T Q I S D S Q I Q N A G N V T K Q S tatttttactcaaatTTcagattcataaatTTtagaatgccggaatgTTacaaagtaatca 2040
 ataaaatgagTTTaaagtctaagtattTaaatcttacggcctttacaatgTTTcattagT

2041 A S F N P N Y H L L E S Y T N S L V K Q gcatctTTTtaatccaaactatcacttactagaaagctataactaatagTTTtagTTaaacaa 2100
 cgtagaaaattaggtTTgatagTgaatgatctTTcgatagattatcaaatcaattTgTT

2101 N N N E T L N P L N T Q N Q I K N L I D aataataatgaaactTTTaaacccttTtaataactTaaattaaataaagaatctgatcgat 2160
 ttattattactTTgaaattTgggagaattatgaattTTTaatTTTatttcttagactagcta

2161 Y N S P K Q N I Q N I Q A S G L Y N Q S tataatagccccaaatagaatattTaaatatctaagcatctggactTTTataatcagagt 2220
 atattatcgggTttatctTataaatTTTatagattcgttagacctgaaatattagTctca

2221 S F Q Q E T K S S L S M I K N I F E S T tcattctaataagaaacaaaatctagtcttagtatgataaaaaatattTTTgagagcacc 2280
 agtaagattattctTTgTTTtagatcagaatcactattTTTtataaaaactctcgtgg

2281 L N N Q E N P S N Q N L I S S S P K N L ctaaacactaagaaaatccatcaaattagaattTaatTTTcttcatctcccaagaattTta 2340
 gattTgTgattctTTTtaggtagTTaatctTaaattaaagaagtagaggTtctTaaat

2341 E L N I I L S K Y Q S N K E K Q N L R Q gaattaaatattattctgagtaagtattaatccaacaaagaaaaataaaattTaaagataa 2400
 ctTaatTTTataaagactcattcataattaggtTgTTTctTTTattTTTaaattctatt

2401 S S Q F Q Q Q T P S I Q L E T K N S F A agttcataattctagtaataaacaccttctatatagTTggaacaaagaactctTTcggc 2460
 tcaagtattaagatcattattTgTggaagatatcaacctTgTTTctTgagaaaagcgg

2461 K S I D Q H F S Q Q N T R L S N T L A E aaaagcattgactaacactTTTcataacagaatacacgTTTatcaaatcattagctgaa 2520
 TTTTcgtaaactgattgTgaaaagtattgTcttatgTgcaaatagTTTatgTaatcgactt

2521 L N Q S S Q V K N S L T V L E N Q K I Q tTaaactaaagtagttaggtgaaaaatagcctcacagttctTgaaaactaaaaattTtag 2580
 aattTgattTcatcaatccactTTTtatcggagTgTcaagaactTTTgattTTTtaaatc

2581 Q I M D D I Q A K I S L K K S Q S L E Q caaattatggatgatattTaaagccaaaatctTtaaaaaaatcataatctTTtagaataa 2640
 gTTTaaactactataaaattcggTTTTatagaaaattTTTtagtattagaaatcttatt

2641 S G I A M Q S S S N K F S Q Y F E K K T tctggTatcgctatgTaatcatctTcaataaattTTcataaactTcgaagaaaact 2700
 agaccatagcgatacattagtagaagTTTattTaaagTattatgaagctTTTctTTTg

S N S Q V I D N G M N E Q N G L I V S F
 2701 tcaaaactcataagttattgataacggcatgaatgagtaaaatggtttaaatagttagtttt 2760
 agtttgagattcaataactattgccgacttactcattttaccaaattatcaatcaaaa

A N N S L V G Q S T I E S S K N I A N Q
 2761 gcaaaataattctctagtaggttaactctacaattgaaatcctcaaaaaatattgcaaattaa 2820
 cgtttattaagagatcatccaattagatgttaacttaggagttttttataacgtttaatt

M N Y Y I N S A S Q I V I D E A Y N K Q
 2821 atgaattactatataaaattcagcaagttaaattgtgattgatgaagcatacaataaataa 2880
 tacttaatgatataatthaagtcgttcaatttaacactaactacttctgatgttattttat

K I E K N P V S A Q F I L Q D N Q T A T
 2881 aaaatagaaaaaaatcctgtatctgcttagtttttttgtaagataatcaaactgcgaca 2940
 ttttatcttttttaggacatagacgaatcaataaaacattctattagtttgacgctgt

S Q T D S K K D I E N P T S Q N N Y N L
 2941 tcgtaaactgactcaaaaaagatatagaaaatccaacttcataaaacaattataattta 3000
 agcatttgactgagttttttctatatcttttaggttgaagtattttgtaaatattaat

T L E G E Q N Q S D N P P S E R K K M H
 3001 actttagaaggtgaataaaattaaagcgataaccctccatctgaaagaaaaaaatgcat 3060
 tgaaatcttccacttatttttaatttcgctattgggaggtagactttcttttttttaacgta

A D F S S D K S Q K G E Q D K T F D S E
 3061 gcagacttctcttcagataaatcctaaaaaggtgagcaagataaaaacttttcgactcagaa 3120
 cgtctgaagagaagtctatthtaggatttttccactcgttctatthtgaaagctgagtctt

N R D E M S I K Q T T Q F E K K A E T L
 3121 aatagagatgaaatgagatataaaataaacaacttagttcgaaaagaaggcagaaacttta 3180
 ttatctctactttactcatatthtattgttggaatcaagcttttcttccgtctttgaaat

S N T Y D M S Q L L C Q T P L Q Q H G Q
 3181 tcaaaacttacgatatgtcttagttgttatgctaaactcctttataatagcatggatag 3240
 agtttatgaatgctatacagaatcaacaatacagatttgaggaaatattatcgtacctatc

H I R L M S G G N M E H L T L N N S I Q
 3241 catattagattaatgagtgaggcaacatggaacatcttacattaataactcaatataa 3300
 gtataatctaattactcacctccgttgtagctttagaatgtaattttattgagttatatt

S T F P F E Q I Q S N Q T T S Y N N Y S
 3301 tctactttcccatttgaaataattcaaagtaatacaacaagaattataataattacagt 3360
 agatgaaaggttaaacttatttaagtttcattagtttggttcaatattattaatgtca

N F T T S N N L Q S A N N H Q S K N Q E
 3361 aatthtacaacttcaaaacttacaaagtgttaacaatcactaatctaaaaattaagaa 3420
 ttaaaatgttgaagtttggtgaatgtttcacgattgttagtgattagattthtaattctt

V G L N L Q N S F D N G E Q N I Q I Q V
 3421 gttggtttaattttataaaattcttttgataatgggtgagcagaatatttaaatthtaagta 3480
 caaccaaatttaaatattthtaagaaaactattaccactcgtcttataaaatttaattcat

K S S Q I T R Q S Q E K R E Q Q N P E L
 3481 aaaagctcttaattaccagacaatctcaagaaaaagagaataataaaatccagaatta 3540
 ttttcgagaatttaatgggtctgttagagttctttttctcttattattthtaggtcttaat

E L E K K S S K E I G R S Q D S N L N T
 3541 gaattagagaagaagagttctaaagagattggaagatcataagattcaaattthgaacaca 3600
 cttaatctctctctcaagatttctctaacttctagatttctaagtttaacttgtgt

P Q K C S E N L Q Q L L N D N Q Q S K Y
 3601 cctcaaaaggttcagaaaatctataaataattattgaaatgataattaataatctaaatat 3660
 ggagttttcacaagtcttttagatattattaataacttactattaattattagatttata

N T P Q T I V S A Q P N E L E N Q N I Y
 3661 aatactccttaactattgtatcagcttaacctaagagtttagaaaaccaaataattttat 3720
 ttatgaggaatttgataacatagtcgaattggattactcaatcttttggtttttataaata

E D Q E V Q Y V Q T A T H N Q E R E L Q
 3721 gaagaccaagaggtcctaataatgtttaactgctactcataatcaagaaagagaattgtaa 3780
 cttctggttctccagattatacaaaatttgacgatgagtagtattgcttttctcttaacatt

E Y D K Q N F T N P E L L N Q S K Q L Q
 3781 gaatatgataagtagaacttcactaatccagagttattaaattaaagcaaataattataa 3840
 cttatactattcatcttgaagtgattaggtctcaataatttaatttcgtttattaatatt

E S Q N R D L Q V Q A A H H N K E K E L
 3841 gaatcataaaatagagatctataagtttaagctgctcatcataacaaagaaaaagagttg 3900
 cttagtagttttatctcttagatattcaaattcgacgagtagtattgtttctttttctcaac

Q E Y N N Q N I A N I E Q L N K S K Q L
 3901 taagaatataataattaaacattgctaataatagagtagcttaataaaagcaaataatta 3960
 attccttatattattaattttgtaacgattatctcatcgaattattttcgtttattaat

Q E S Q K G D Q N Q Q E N S M L Q G Q I
 3961 taagaatcataaaaaggtgattaaaattaataagaaaatagcatgcttttagggataaata 4020
 attccttagtagttttccactaattttaattattctttttatcgtacgaaatccctatttat

G E N E N E K Q K N I Q K N I N H V R F
 4021 ggcgaaaatgaaaatgagaaataaaaaaatattttaaagaacattaatcatggttagattt 4080
 ccgcttttacttttactctttattttttataaaattttcttgtaattagtagacaatctaaa

N N L V K Q M Q E N S P C H N L G Y Y H
 4081 aataaccttgtaaagtagatgtaagaaaattcccatgccataacttaggatattatcat 4140
 ttattggaacatttcatctacattcttttaagtggtacggtattgaaatcctataatagta

Y E T I N I D G K I L K D V Y Q Q T D N
 4141 tatgaacaataaatattgatggaaaaatcttaaagatgtttatttagcaaacagataac 4200
 atactttgttattttataactacctttttagaattttctacaataaatcgtttgctattg

I E K K E I S V Q T I E Q S K R N S I F
 4201 atagaaaagaaagagatatctgtgtaaaccaatcgaatagtctaaaagaaattctattttt 4260
 tatcttttctttctctatagacacatttgtagcttatcagattttctttaagataaaaa

D E C T K L F S P K M K F I E P E F K D
 4261 gatgaatgcacaaaactattttctcctaaaatgaaatatttgaacccgagtttaagat 4320
 ctacttacgtgttttgataaaaagaggattttactttaaataacttgggctcaaatttcta

N E C M M L N M S N N S S Q Y D H K D S
 4321 aatgaatgcatgatgcttaatatgtcaaataattcttcttaatatgatcataaagattca 4380
 ttacttacgtactacgaattatacagttttattaagaagaattatactagtagttttctaagt

I K E Q H E G G F N Y D Q N Q Q K N L R
 4381 ataaaagaatagcatgaaggtggttttaattatgattaaaactagtaaaaaatttaaga 4440
 tattttcttatcgtacttccacaaaattaactaattttgatcatttttttaattct

K S D F F K Q Q P N Q Q Q Q Q Q T S S N
 4441 aaatcagattttctcaaatagtaacctaattagtaaatagcaacaataaacttcttcaaac 4500
 ttttagtctaaagaagtttatcattggattaatcattatcggttggtattttgaagaagttg

G N H E T G I I N S S L Y N S Q K L A S
 4501 ggaaaatcacgaaacaggtataattaattcttctcattgtataactcacaaaagttggctagc 4560
 cctttagtgctttgtccatattaattaagaagtaacatattgagtggttttcaaccgatcg

D N E E V I K R Q Y Q I Y D K I F D A G
 4561 gataatgaagaagtcattaaaaggtaatattaaatattatgataagatattttgatgctgga 4620
 ctattacttcttcagtaattttccattataatttaataactattctataaactacgacct

E L P V V D C T E Q D N I F K E W Y Q S
 4621 gaactccctgtttagactgcacagagtaagataaacatttttaagagtggtattagtct 4680
 cttgagggacaacatctgacgtgtctcattctattgtaaaaatttctcaccataatcaga

D Q S N F K N R R Y S N Q I S D S E K K
 4681 gatcaaagtaatttttaaaaacagaagatactctaactaaattagtgactctgagaaaaa 4740
 ctagtttctataaaaatttttgtcttctatgagattgatttaactactgagactctttttt

N I Q Q Q I D N I V N K R A Y K N Q Q A

4741 aatatacaacaataaatagataacatagttaataagagagcttataaaaaattaataagcc 4800
ttatatgttggttattttatctattgtatcaattattctctcgaatatttttaattattcgg
L M N Q Q K N S Q S N Q P Q I G K N K S
4801 ttgatgaaccaacaaaaaattctcagagcaattaaccttaaattggtaaaaaataagagc 4860
aactacttggttggttttttaagagtcctcgtaattggaatttaaccatttttattctcg
K Q Q T K V P N K Q N Q K S I K F N N K
4861 aaatagtaaacacaaagtccccataataaaaatcaaaagtctataaaattcaacaataaa 4920
tttatcatttggttttcaggggttatttttttagttttcagatattttaagttgttattt
I E T R N I P K N S K Q K N S A I P G N
4921 atagagacaagaacataccaaaaaattctaacagaaaaactcagctattccaggaaat 4980
tatctctgttctttgtatgggtttttaagatttctctttttgagtcgataaggctcttta
N T E R V F E R L Y P K Q V K Q Q Q E Q
4981 aacacagaaagagtttttgagagattatacccaaagcaagtaaaatagtaacaagaataa 5040
ttgtgtctttctcaaaaactctctaataatgggtttcgttcattttatcattgttcttatt
I F E I K K D T S K S K S K G R A T S Q
5041 atttttgaaataaagaaagatacctcaaagagtaaaagtaaaaggaagagcaacttcataa 5100
taaaaacttttatttctttctatggagtttctcattttcatttctctcgttgaagtatt
F K T Q E E M D F I K I N K Q K V P Y M
5101 tttaaaactcaagaagaaatggatttcataaaaaattaataagtaaaaagtaccatataatg 5160
aaattttgagttcttctttacctaagatttttaattattcatttttcattggtatatac
M R K K V E D K F Q L F K K A V E V N L
5161 atgagaaaaaaagtggaggacaagttctaactatttaaaaaggcagtagaagtttaattta 5220
tactctttttttcacctcctgttcaagattgataaaattttccgcatcttcaattaaat
E N M I Q D Q K S H Q I K S I V L D D E
5221 gaaaacatgatttaagattagaatctcattagataaagagtatagtttttagatgatgaa 5280
cttttgactaaattctaattcttagagtaattctatttctcatatcaaaatctactactt
I K D Q D N L Q E I Y Q R S L S N R T Q
5281 atcaaagactaagacaatctataagagatatattaaagaagtctttccaacagaacttaa 5340
tagtttctgattctgtagatattctctatataatttcttcagaaaggttgtcttgaatt
K N L V S Y D S Q T M T N L A R M D I Q
5341 aaaaatttagtttcttacgactcttaaaactatgaccaatctagcaagaatggacatccaa 5400
tttttaaatcaagaatgctgagaatttgatactggtagatcgttcttacctgtagggtt
K D T S R V Y K N N L S S Y K Q N P E S
5401 aaagatacatcaagagtttataagaataacttaagcagttataataaaaatccagagtc 5460
tttctatgtagttctcaaatattcttattgaattcgtcaatatttatttttaggtctcagt
G A K F L I K R N L K E L V Q K V L K D
5461 ggagccaaatttttaattaaaagaaacctaaggaattagtttagaagggttttaaaagat 5520
cctcgggttaaaaaattaattttctttggatttcttaatacaaatcttccaaaattttcta
A N E F T H T N Y I K L K A L C S L Q N
5521 gcaaatgagttcactcactaactacatcaaataaaagctttgtgctcccttcaaaat 5580
cgtttactcaagtgagtagtattgatgtagtttaattttcgaacacaggggaagtttta
I I V L A E H H I Q E Y L K D I M K V L
5581 attatagttttagcagaacatcatatttaggagtagtcttaagatatcatgaaagtttta 5640
taatatcaaaatcgtctttagtagtataaatcctcatagaatttctatagtactttcaaaat
V K F L D Y D D P E I P N T C K R I S E
5641 gttaaatttttggattatgatgatcctgaaattccaaatacatgcaaaaggattagcgaa 5700
caatttaaaaacctaataactactaggactttaaaggtttatgtacgttttcttaacgctt
L L G I Y V S S E V Y I P L A I S L I H
5701 ttgcttggcatttatgtttcttcagaagtttatattcctctagcaattagttctaatccat 5760
aacgaaccgtaaatacaagaagctttcaaatataaggagatcgttaatcagattaggta
D E E H K T A P K S L T K L L T I F S I
5761 gatgaagaacataaaaacagcccctaaaagtttaactaagcttttaacaatatttagcata 5820

ctacttcttgtatTTTTgtcggggatTTTcaaattgattcgaaaattgTTataaatcgtat
M I R G E T P K T I E G Y L D T I M K T
5821 atgataagaggtgaaactccaaagaccatcgaaagttatTTTggataccattatgaaaaaca 5880
tactattctccactTTTgaggtTTTctggtagcttccaataaacctatggtaataactTTTgt
V T S V E K T F D N K I F M Q I R E S E
5881 gttacaagcgttggaaaagactTTTgataataaaaatTTTatgtaaattagagaaagtgaa 5940
caatgTTcgcgaactTTTctgaaaactattTTTataaatacatttaactctTTTcactt
E V L S G L Y Y I A K E L I N I S G E N
5941 gaagTTctctctggtTTTatattatattgcaaaaagaattaataaatatcaggagaaaaat 6000
cttcaagagagaccaaataataataaacgTTTtcttaattTTTatataagtcctctTTTa
I S I Y C R P I F S L L L T V Q A T N T
6001 attagTatTTTatgCCgTcctatTTTtctTTTattacttactgTTtaagcaacaaataca 6060
taatcataaataacggcaggataaaaaagaaataatgaatgacaaattcgtTgtTTatgt
A G K D N Q N E I Q K T M L T L A T Y C
6061 gcaggaaaagataaTTaaaatgaaatataaaaagaccatgctaactTTtagcaacttactgt 6120
cgTcctTTTctattaatTTTactTTTatattTTTctggtacgattgaaatcgtTgaatgaca
G Y S S I A E L H A N E V S M L L N E F
6121 ggTtactcaagtatagcagagcttcatgctaacgaagtatccatgctctTaaatgaattc 6180
ccaatgagTTcatatcgtTctcgaagtacgattgcttcataggtacgagaatttactTaaag
T T N K S Y K T W Q K Y S K D R L K F E
6181 actacaaataaatcttataaaaactTggcaaaaatattcaaaagatagactTaaattTgaa 6240
tgatgTTTatTTtagaatTTTtgaaccgTTTtataagTTTctatctgaattTaaactt
I I V R N C G E G L S K F I D I I L E I
6241 attattgTTagaattgTggagaaggTctTTTctaaattcatagatatcattctTgaaatc 6300
taataacaatctTtaacacctctccagaaagattTaaagtatctatagTaaagaactTtag
L Q S C V E L N Q D I E V R M D A L V L
6301 cTTtagagTTgtgtagaattaataagatatcgaagtaaggatggatgcattggtTTTg 6360
gaaatctcaacacatctTaaTTtaattctatagTtcatctcctacctaagTaaacaaaac
V E F I I C L Q F K D V Q E K L K E N A
6361 gtagaattTataaTTTgcttacaattTaaaggatgTTTaaagaaaaattgaaagaaaaatgcc 6420
catctTaaatattTaaacgaatgTaaattcctacaaaattctTTTtaactTTTctTTTtacgg
Q L I L T K I L I P S I V W K I G K P Q
6421 taactTatTTTgactaaaattTgatccatcaattgTTTggaagattggaacccataa 6480
attgaataaaaactgattTtaaaaactagggtagTtaacaaaccttcaacctTTTggtatt
I K I R K A G I I N I Y K L I E N G L V
6481 attaaaatcagaaaggctggtatcattaatTTTataaattaattgagaatggattggtc 6540
taattTTtagTctTTccgaccatagTaaTTataaatTTTaaTTaactctTtaacctaaccag
T G D V L M K C F K E L M P P I K S C L
6541 actggtgatgTTTaatgaagtgctTTTaaagagTTaatgcctcctattaatcatgTTta 6600
tgaccactacaaaattactTcacgaaattTctcaattacggaggataattTtagTacaat
S D D W A P D L R L A A C K L A E K L F
6601 tcagatgattgggctcctgatctcgtTTTggctgctTgcaaattggcagaaaaactctTt 6660
agtctactaaccggaggactagaagcaaacggacgaacgTTTaaaccgtctTTTtgagaaa
L E V R D H L E H I H I S E N Y Q L L L
6661 ttagaagtaagagatcacctagaacacattcacatatctgaaaactattaactctTTTta 6720
aatctTcattctctagtggatctTgtgtaagtgtatagactTTTgataattgagaaaaat
E R L D D S Q D V I R V E I F K T F T V
6721 gaaagactagatgactcataagatgTTatcagagTTgaaatattcaaaaactTTcactgTT 6780
ctTTctgatctactgagTattctacaatagTctcaactTTTataagTTTgaaagTgacaa
I F G A P A L K E S P S I F E Y M V K A
6781 atTTTcggagctcctgctctTaaagaaagtccatcaatTTTgaatacatggTcaaaagct 6840
taaaagcctcagagacgagaattTctTTcaggtagTTataaacttatgtaccagTTTcga

I F I H L D D Q N E D V Q M G A Y N T L
 6841 attttcatacatttagacgattagaatgaagatgtacaaatgggagcatacaacacatta 6900
 taaagtatgtaaatctgctaacttacttctacatgtttaccctcgtatggtgtgtaat

K F A A R I N P A K I K E E P Q Q Q L A
 6901 aaattcgctgcaagaattaatcctgctaataatcaagaagaaccataacagcaattggct 6960
 ttttaagcgacgttcttaattaggacgatttttagtttcttcttggattgtcgttaaccga

A Q N Q L K P K Q G H F Y Q K G K P F V
 6961 gcttaaaactaattaaagccaaaacagggtcatttttattaaaaaggcaaaccttttgtc 7020
 cgaattttgattaatctcgggtttgt **CCAGTAAAAATAATTTTCGG**tttggaacag

K K G R Q L S D I S G T Y L V V Y D H Y
 7021 aaaaaaggaagataattatctgatatttcagggacatatttagttgtttatgatcactat 7080
 ttttttcttctattaatagactataaagtcctcgtataaatcaacaaatactagtata

Q I V K R I G D G A Y G V V F K A I D K
 7081 tagatcgttaaaagaataggagatggagcctatgggtgtagtatttaaagcaattgataag 7140
 atctagcaattttcttctcctcctacctcggataccacatcataaatttcggttaactattc

S K N N E I V A I K K V S D A F L D P R
 7141 tctaagaataatgaaatcgtagctattaagaaagtttctgatgcatttttagaccaaga 7200
 agattcttattacttttagcatcgataattctttcaaagactacgtaaaaatctgggttct

D A K R I L R E I K L L K F C N H P N I
 7201 gatgccaaaagaatttttaagagaaataaagttattaaaattttgtaatcatcctaaccatc 7260
 ctacggttttcttaaaattctctttatttcaataatttttaaacattagtaggattgtag

I K L K D I I K P E M P T G Y K D I Y L
 7261 atcaagctaaaggatatcattaagccagaaatgccaacaggttacaaggatattttatcta 7320
 tagttcgtatttctatagtaattcgggtctttacggttgtccaatgttctataaaatagat

V L E Y M E I D L D K T I N S E Q A L S
 7321 gttttagaatatatggaaattgatttagataaaaactataaaactcagagcaagccttatcg 7380
 caaatcttatatacctttaactaaatctattttgatatttgagtctcgttcggaatagc

P K I I K N L M W Q L L N G I F Y M H S
 7381 ccaaaaataataaagaacttgatgtggcaattattgaatggatattttacatgcattca 7440
 ggtttttattatttcttgaactacaccggttaataacttaccatataaaatgtacgtaagt

A D I I H R D I K P S N I L L N K N C T
 7441 gctgatattattcacagagacatcaagcctagcaatattcttttaaaataaaaactgtaca 7500
 cgactataataaagtgctctctgtagttcggatcgttataagaaaatttatttttgacatgt

L K L A D M N L A R K F D V E Q S S I T
 7501 ttaaaaactagcggatataatcttgacgtaattttgatgtggagcaaagcagataaact 7560
 aattttgatcgcctataacttagaacgtgcatttaaaactacacctcgtttcgtcatattga

E Q Q I S L N L Y F T T Y V V T R P Y R
 7561 gagtaacaaatttcttttaatttatacttcacgacgtatggtgtaacaagaccgtacaga 7620
 ctcattgtttaaaagaatttaaatatgaagtgctgcatacaacattgttctggcatgtct

A P E I L L S T E N Y S K P I D I W S A
 7621 gcacctgaaattttgcttttctacagaaaattattcaaacctatagatattttggtcagca 7680
 cgtggacttttaaacgaaagatgcttttaataagttttggatatactataaaccagtcgt

G C I F A E M M G R K T I F K G N S Y V
 7681 ggggtcatattttgccgaaatgatgggaagaaaaaacaattttcaaaggaaactcatatgtg 7740
 cccacgtataaacggccttactacccttctttttgttaaaagtttcttttgagtatacac

N Q L D R I I A I M G K P D F D K L S Y
 7741 aattagtttagatagaattattgctattatgggcaaa **CCAGATTTTGATAAATTGTCG**tat 7800
 ttaatcaatctatcttaataacgataataaccgtttgggtctaaaactattttaacagcata

K V D E N L K E Y I K Q L Q E K Q P E N
 7801 aaagttgatgaaaattttaaagaatatattaagtaattataggaaaagcaaccagaaaat 7860
 tttcaactacttttaattttcttatataattcattaatatccttttctgttggctttta

F Y E I Y K S H D P L A I D L L Y K M L
 7861 ttttatgaaatttataaatctcatgaccacttgccatagattttattatataaaatgcta 7920
 aaaatacttttaaatatttagagtagctgggtgaacggtatctaaataatattttttagat

A F D P K E R W T V E Q C L Y H E Y F K
 7921 gcttttgatccgaaagagagatggactgtcgaatagtgcttgatcatgaatacttttaa 7980
 cgaaaactaggctttctctctacctgacagcttatcacgaacatagtagtacttatgaaattt

D F D K S Q I K A C N H K F D W T F D E
 7981 gattttgataaatcttaaaataaaagcttgtaatcataaatttgattggacatttgatgaa 8040
 ctaaaaactattttagaatttttttgcgaacatttagtattttaaactaacctgtaaactactt

I Q E R N D L I Q R A I Y N E S C Q F H
 8041 atttaagaaagaacgattttaatttaagagctatttacaatgaaagttgttaattccat 8100
 taaattctttctttgctaaattaaatttctcgataaatgttactttcaacaattaaggta

Q D E P D A T I E E V E Q H Y K Q Q Q Q
 8101 taagatgaacctgatgctacaatagaagaagtagagcaacattataaaatagcaatagcaa 8160
 attctacttggactacgatgttatcttcttcatctcgttgtaaatatttatcgttatcggt

I I Q Q K I A Q Q H A A N A N S Q Q F L
 8161 attatttagcaaaaaatagcataatagcatgccgcaaatgcaaatcttagtagttttta 8220
 taataaatcgttttttatcgattatcgtagcggcgtttacgtttaagaatcatcaaaaat

K T N Q Q F Q M N L E K L A A S Q P L I
 8221 aaaacaaactaataatttttaaatgaatttagaaaaactagcagcttcttagccactaatt 8280
 ttttgtttgattattaaaatttacttaaatctttttgatcgtcgaaggatcggtgattaa

N P I N F N P N M Q V P F F P M G R Q P
 8281 aatcctattaatttttaaatcctaataatgtaagttcccttttttctatgggaagatagcca 8340
 ttaggataattaaaattaggattatacattcaagggaaaaaaggataacccttctatcggt

Q V P P E A I L L Q M Q N M Q K N P M L
 8341 caagtaccacctgaagctattttattgtaaatgcaaaacatgtaaaaaatccgatgtta 8400
 gttcatgggtggacttgcataaaaataacattttagcttttgtagatttttttaggctacaat

Q K Q F Q M M Q G Q Q Q T Q M P L Q K D
 8401 taaaaataatttttaaatgatgtaaggatagtaataaaacgcaaatgcctcttttaaaaagat 8460
 atttttattaaaatttactacattcctatcattattttgcggtttacggagaaatttttcta

F R N P F N S H P L A N L S Q D K M K A
 8461 tttagaaatccttttaactcacatcccctagcaaatttatcttaagataaaaatgaaagca 8520
 aaatcttttaggaaaattgagtgtaggggatcgtttaaatagaattctatttttactttcgt

D S L P I N P I Q A S A V Q Q N P L F V
 8521 gatagtttaccaaattaatcccatacaagcttctgcagtcctaataaaaatcctctttttggt 8580
 ctatcaaatgggttaattagggtatgttcgaagacgtaggttatttttaggagaaaaacaa

P G L H N F P P G F H P I K I G M Q E Q
 8581 ccaggtttacataatcttccacctggatttcatccaattaaaattgggatgcaagaataa 8640
 ggtccaaatgtattaaaagggtggacctaaagtaggttaatttttaaccatacgttcttatt

F K K P N I N N N T N G N T N Q Q K P N
 8641 tttaaaaaacctaataatcaataataatacaaatggaaataactaattaacaaaaaccaa 8700
 aaattttttggattatagttattattatgtttacctttatgattaattgttttttggtta

Q N D Q S P P K T D S E S K A S D T N K
 8701 taaaatgactaatctcctcctcaaaaactgattctgaaagcaagcatcagataactaataaa 8760
 attttactgattagaggagggttttgactaagactttcgttttcgtagtctatgattattt

N N H N G Q N N G D E N G K Q E K N D K
 8761 aataaccataatggataaaaataatggagatgagaatggtaataagaaaaaaatgataaa 8820
 ttattggattacctattttattacctctactcttaccatttattcttttttactattt

K F N K D N D Q D Q E K Q N N N N G E K
 8821 aaatttaataaagataatgattaggattaagaaaaatagaataataataatggcgaaaaa 8880
 tttaaattatttctattactaactcctaattctttttatcttattattattaccgcttttt

D R K N S N N G L N Q M S N Q T T E E K

8881 gatagaaaaaatagtaataatggtttaaattaaatgagcaattagactacagaagaaaa 8940
 ctatcttttttatcattattaccaaatttaatttactcgttaatctgatgtcttcttttt

 E N P E S K S K M Q N K E S E M N R S Q
 8941 gagaatcctgaatctaaaagtaaaatgcaaaataaagaaagtgagatgaacagatcttaa 9000
 ctcttaggacttagatctttcattttacgttttatttctttcactctacttgtctagaatt

 D F L K G S I L S N S E E I E E L P N I
 9001 gatttttttaaaggcagttattctcagtaattcagaagagattgaagagttgcctaacatc 9060
 ctaaaaaattttccgtcataagagtcattaagtcttctctaacttctcaacggattgtag

 P E M R Y K T L T F G P E Q F N N N Q K
 9061 cctgaaatgaggtataaaacattaacatttggacctgaataatttaacaataatcaaaaa 9120
 ggactttactccatattttgtaattgtaaacctggacttattaaattggtattagttttt

 S A E Q
 9121 tcagcagagtga 9132
 agtcgtctcact

Geçici Gen İsmi: 5mapk

TGD Erişim Numarası: THERM_00195990

NCBI Erişim Numarası: XP_001017253

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254617, Bölge: 699947 - 697336

İntron Sayısı: 4

Genomik Dizi Büyüklüğü: 2612 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1827 bç.

Protein Büyüklüğü: 608 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 2612 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1827 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atgaaaggatagagtatg -3' (-)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcaacattaatttcataag -3' (-)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```
1 atgaaaggatagagtatgtattaaaatagtaataatacaagtggttaataacttttagctat 60
  TACTTTCCTATCTCATACataattttatcattattatgttcaccattattgaaatcgata
61 atgaattataactaaaatcaaagcattccatcttcgtattattaatagcaatagaattag 120
  tacttaatatgatttttagtttcgtaaggtagaagcataataattatcgttatcttaatc
121 caatcttcctaataacctttacagcagtaaaatcaaaatattacttcttattctcgttct 180
  gttagaaggattattggaaatgctcatttttagttttataatgaagaataagagcaaga
181 tagagtcgccactctcatcactaaagcgaaaatgtaaacatttctgctacaaacaatacc 240
  atctcagcggtagagtagtgatttcgcttttacaattgtaaaagcagatggttgattatgg
241 aataacatgcaatcttaaaattaaaatatgttaaataatctacttcttctatgtctcac 300
  ttattgtacgttagaatttttaatttttatacaatttatttagatgaagaagatacagagtg
301 acataatcaaaccaagtgattaaaattcttagctaagggaaaactataataatcttagt 360
  tgtattagtttggttcacataattttaagaatcgattcccttttgatattattagaatca
361 aataatagtaatgccaaatcaagttaaatttaacatctcaaactggaaatatacgccct 420
  ttattatcattacggttagttcaatttaattagtagagtttgacctttatagcggga
421 tcaaccggttgctaacattttgaataacaactccacaaataaaataagttaaaataccatt 480
  agttggcaacgattgtaaaacttattggtgaggtgtttattttattcaattttatggtaa
481 taaaatttaagcaaacaaactaagtaattcccaacaactccaaggttaacaatgaaaat 540
  attttaaatctcgtttggttgattcattaaggtgttgaggtccaattgttactttta
541 agagttcagaataatacaataacaagcaattaaaataactttgacaaacaataactaataat 600
  tctcaagtcttattatgattattgttcgtaattttatgaaactggttgattatgattatta
601 gttatatctagttctattaatgctaacaacaataattagtaatacaataaccagtaaat 660
  caatatagatcaagataattacgattggttatttaacattagtttattggtcatttaa
661 tcttcgatctctgcctcactaaaagctagcactacaaacacccaaaaatcaaatttaaaaa 720
  agaagctagagacggagtgattttcgatcgtgatgtttgtggtttttagtttaattttt
721 aagagaaagacttttgaatgtggaggtactgcatttagtggtgatgatcattacgagttc 780
  ttctctttctgaaaacttacacctccatgacgtaaatcacaactactagtaatgctcaag
```

781 cacaaataaataggacacggcgccctatggtggtggttggctctggagttgacacaaaatgc 840
gtgtttatctctctgtgcccggataccacaacaaacgagacctcaactgtgttttacg
841 aataaaaaaattgctataaaaaaaataacaaatgcttttgaagatttagttgatgcaaaa 900
ttatTTTTTTTaaacgatTTTTTTTTattgTTTtacgaaaacttctaatacaactacgtttt
901 agaatcgttagagagattaaaatgttaaaatTTTTtgacctgagaatattattgctctt 960
tcttagcaatctctctaattttacaatTTTaaaaaactggactcttataataacgagaa
961 catgacattatagtagcagaatagagaactgactataatgatatttatattgtcaccgag 1020
gtactgtaatatcatggctcttctcttgactgatattactataaaatataacagtggtc
1021 cttatggaacagatctccatagagttatatactcccgccaagagttaactgatgatcac 1080
gaatacctttgtctagaggtatctcaatatatgagggcggttctcaattgactactagt
1081 attcaatactTTTTtatcaaaactctacgtggtatgctttacatccattctgcaaatggt 1140
taagttatgaaaaatatagtttgagatgcaccatacgaatgtaggtaagacgtttacaa
1141 atgcatagagatttgaaaccttctaataattcttgtaataaaaaattgtgacctcaaagtt 1200
tacgtatctctaaactttggaagattataagaacaattTTTTTaaactggagttcaa
1201 tgtgatttaggtcttgcaagaggtttcgaatttgatgaagaagatggaaaaacagagtat 1260
acactaaatccagaacgttctccaaagcttaactacttcttctacctTTTTgtctcata
1261 gttgttacaagatggtatagagccccagaagttatcttgaaggcttctaatacacaaaa 1320
caacaatgttctaccatatctcggggtcttcaatagaacttccgaagatttatgtgtttt
1321 tctattgatgtgtggtctattgggtgtatatttgcagaattactaggtagaactccactc 1380
agataactacacaccagataaccacatataaacgtcttaatgatccatcttgaggtgag
1381 ttcccaggaaaggattaccttgaataaatataaagaattattgcaatTTTtaggtactcct 1440
aagggtccttctcaatggaacttatttatatttcttaataacgttaaaaatccatgagga
1441 actcctgaagagttaagctatataactaatgaaggagcattaaaaatTTTgaaaagtctt 1500
tgaggacttctcaatcgcataatgattacttctcgtaatTTTataaaactTTTcagaa
1501 cctaaaagaactaagcaaaagttgggaaaatctttatcctaagctaatTTTtagtaggttta 1560
ggatTTTcttgattcgtTTTcaaccctTTTgaaaataggattacgattaaatcatccaaat
1561 gatctTTTatctaaaatgctaacatttaaatcccaatgatcgttacacaattgaagaatgt 1620
ctagaaaatagatTTTtacgattgtaaaatagggttactagcaatgtgtaacttcttaca
1621 ctcgctcatccttactTTTgaaggtcttcataatcctgaagacgagcctacttgtctgaa 1680
gagcgagtaggaatgaaacttccagaagtattaggacttctgctcggatgaacaggactt
1681 gtatttgattgggcatgggatgatttgcagctaaccaaaagaaaggttgcaaggtatggtt 1740
cataaactaaccgtaccctactaaagctcgattggtttctttccaacgttccataccaa
1741 tatgatgaagctatagactatcaaaaagtaaaagcaacttaataataataatattaataa 1800
atactacttgcatactgatagtttttcatttctggtgaattattattattataattatt
1801 taacaat**CTTATGAAAATTAATGTGA** 1827
attgttagaatactTTTtaattacaact

Gen İsmi: Erk7a

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00355550

NCBI Erişim Numarası: XP_001010453

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254756, Bölge: 376894 - 375014

İntron Sayısı: 0

Genomik Dizi Büyüklüğü: 2163 bç.

cDNA Büyüklüğü: 2163 bç.

Protein Büyüklüğü: 720 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 603 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü : 603 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atggagacagatttacacgc -3' (1-20)

Geri Primer Dizisi: 5'- gcttggtctgcatccaaacgc -3' (582-602)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M S E E I E P H I M R K F E I I Q K I G
1 atgagtgaagaaatagaacctcatattatgagaaaatttgagatcatataaaaaatagga 60
tactcacttctttatcttggagtataaactcttttaaactctagtatattttttatcct

K G A Y G I V W K A I D R K L R Q V V A
61 aaggggtgcatatggtatagtttgaaagctattgatagaaaattgaggtaagttgtggct 120
ttcccacgtataccatatcaaacctttcgataactatcttttaactccattcaacaccga

V K K V F D A F H N P T D A Q R T F R E
121 gtcaagaaagtttttgacgctttccataatcctactgatgcttagcgtacttttagagag 180
cagttctttcaaaaactgcaaaggtattaggatgactacgaatcgcatgaaaaatctctc

V M F L Q E L N G H E N I V K L L N I I
181 gttatgttttataagagctgaatgggcatgagaacatagtaaaactactgaatattatc
caatacaaaaatattctcgacttaccggtactcttgatcattttgatgacttataatag

K A E N N K D L Y L V F D F M E T D L H
241 aaagcagaaaaataaaagacttatacttagtttttgatttcatggagacagatttacac 300
tttcgcttttattatttctgaaatgaatcaaaaactaaagTACCTCTGTCTAAATGTG

A V I R A D I L E E I H K K Y V M Y Q I
301 gctgtcattcgtgcagatatattagaagaaattcacaagaaatcgttatgtattagatt 360
CGacagtaagcacgtctatataatcttctttaaggttctttatgcaatacataatctaa

L K A L K Y M H S G D L I H R D L K P S
361 ttaaaagcacttaaatatataatgcattcaggcgatttaattcacctgacttaaaaccatcc 420
aattttctgtaatttatatacgttaagtccgctaaattaagtggcactgaattttggtagg

N I L L N S E C H V K L A D F G L A R S
421 aatattcttttaaatagtgatgccacgttaacttgctgatttcggtttagctcgttcg 480
ttataagaaaatttatcacttacggtgcaatttgaacgactaaagccaaatcgagcaagc

V A Q K E D D A P P V L T E Y V A T R W
481 gtagcctaaaaagaagatgatgctccacctgttttaactgaatacgtactactcgttgg 540
catcggatttttcttactacgaggtggacaaaattgacttatgcatcgatgagcaacc

Y R A P E I L L G S T K Y T K A V D M W
541 tatcgtgctccgaaattcttttaggtagcactaaatataactaaggctgtcgatattgtgg 600
atagcagcaggcctttaagaaaatccatcgtgatttatatgattccgacagctatacacc
```

S V G C I L G E L I I G K S I F P G V S
 601 agtgtcggatgtatTTTTAGGTGAacttattatagggaaatctatTTTTccctgggtgtaagt 660
 tcacagcctacataaaatccacttgaataatcctTTTTagataaaagggaccacattca

 T L N Q I E R V L E L T G K P K N E D I
 661 actcttaattaaattgagcgtgtcctcgaattaaacaggcaaacctaaaaatgaagatatt 720
 tgagaattaaattaaactcgcacaggagcttaattgtcggTTTTgattTTTTacttctataa

 E A I E S S L A W N I L N S I N I T K Q
 721 gaagctattgaaagttccttagcctggaatattTTaaattctattaacattactaagcaa 780
 cttcgataactttcaagaaatcggaccttataaaatttaagataattgtaatgattcgtt

 K K F E Q F F Q G A S P D A L D L L K K
 781 aagaagttcgagcaatTTTTccaaggcgcttctcccgatgcttttagatttattgaagaaa 840
 ttcttcaagctcgttaaaaaggttccggaagagggtctacgaaatctaataacttcttt

 L L V F N P K L R L D A E Q A L Q H R Y
 841 cttctcgtgttcaatcctaaatt**CCGTTTGGATGCAGAACAA**agctctctagcatcgttat 900
 gaagagcacaagttaggatttaacgcaaacctacgtcttTtgcgagagatcgtagcaata

 V A E F H N P A E E H V C S K P I Q I P
 901 gtgactgaattccacaatcctgctgaagagcatgtatgttccaagcctatctagattcct 960
 catcgacttaaggtggttaggacgacttctcgtacatacaaggttcggatagatctaagga

 L N D H E K F S I R K Y R E S L Y A D I
 961 ctaaattgaccacgaaaaattctccataagaaaatcgtgagctcttttacgctgacata 1020
 gatttactggtgctTTTTaagaggtattctTTTTatagcactcagagaaatgcgactgtat

 N E R K K K Q R I E W R N K Y L R Q L G
 1021 aatgagcgtaaagaaaagcaaaagattgagtggaagaaataaatatttaagataattaggt 1080
 ttactcgcattctTTTTcgttcttaactcacctctttatttataaaattctattaatcca

 L S I G D E G Q Q A A V Q N G Q Q I A E
 1081 ttatcaataggagatgaaggttagtaagctgcagtgtaaaacggttaataaatagcagaa 1140
 aatagttatcctctacttccaatcattcgcagctcacattttgccaattatttatcgtctt

 G Q Q Q Q P Q Q Q V Q Q Q Q Q Q I Q Y S
 1141 ggTtaataatagcaaccctaacagcaagtagtagtaataatagtaataataataactct 1200
 ccaattattatcgttgggattgtcgttcatgcatcattattatcatttatattatgaga

 Q Y Q Q Q S S T V K N N S A Q Q P E K R
 1201 cagtattagcaacaatcttctacagttaaaaataactctgctcaataacctgaaaagcgt 1260
 gtcataatcgttgttagaagatgtcaatTTTTattgagacgagttattggacttttcgca

 N A R Q V S Q E N I E Q V S Q Q Q Q Q Q
 1261 aatgctcgttaagctctcttaagaaaatagaaacaagtttcttagtaatagcaatagtag 1320
 ttacgagcaattcagagaattcttttatatcttTtcaaagaatcattatcgttatcatc

 Q Q S S N Q Q Q Y Q Q Q Q V R Q Q N N R
 1321 taataatcatcaaatataatagtaataaccagcaataataagtttagataacaaaacaatcgt 1380
 attattagtagtttaattatcattatggtcgttattattcaatctattgTTTTgtagca

 E Q A Q Q G S V Q Q S Q Q L Q Q Q N S S
 1381 gaacaagctcaacaaggatctgtgtagtaagctaaataattacaataataaaacagtagt 1440
 cttgttcgagttgttcttagacacatcatttcgattattaatgattattttttgcatca

 V Q S S T Q Q Q P S K Y Q P Y Q A N Q Y
 1441 gtgtaatcctccacacaacaatagccaagcaaaactagccctactaggcaaatataat 1500
 cacattaggaggtgtgttTtattcggttcgtttatgatcgggatgatccgTTtaattata

 G A K Y Q P Q A N Q Q V Q Q P Q Q Q S L
 1501 ggagctaagtattagccacaagccaactaataagttcaatagcctcaacagtaagctta 1560
 cctcgattcataatcgggtgttcggttgattattcaagttatcggagttgtcatttcgaat

 T Q S Q N N T Q A N G T T Q Q T S Q L K
 1561 acctaatcaciaaaacaatacacaaagcaaatggtacaacctagtagacatctcaactaaa 1620
 tggattagtgTTTTgttatgtgttcgtttaccatggtggatcatctgtagagttgaattt

 S Q N A P M Y Q T Q S Q F Q N Q N N V T

1621 tcataaaatgcacctatgtattagacttaatctcagttttaaaatcaaaataatgttact 1680
 agtatttttacgtggatacataatctgaattagagtcaaaattttagttttattacaatga

 A A N N N G T G P N K A M Y Q T N Y N N
 1681 gctgcaaataataatggcactggacctaacaaggccatgtactaaacaaactataataac 1740
 cgacgtttattattaccgtgacctggattgttccggtacatgatttgtttgatattattg

 Y I P A K N N Y G Q V P N S Q N V A A N
 1741 tacattccagctaagaataactacggacaagtaccaaacagttaaaatggttgctgctaac 1800
 atgtaaggctcgattccttattgatgcctgttcatggtttgtcaattttacaacgcgattg

 G N A G A V S N N S S G V Y K S D A Q N
 1801 ggaaatgctggtgcagtttcaaataacagctctggtgtttacaaatctgatgcttaaac 1860
 cctttacgaccagtcxaaagtttattgtcgcagaccacaaatgtttagactacgaatttg

 Q P V Q Y G S Y V P Q Q K Q Y K Y Q P G
 1861 tagcctgtgtaatacggcagctatgttccacaataaaagtaataataatattagccaggt 1920
 atcggacacattatgccgtcgatacaagggtgttattttcattatattataatcggtcca

 S N A T A S Q S Q Q N Q P Q G A S G A T
 1921 agcaatgctactgcttcttaaagtcaacaaaaccaaccttaaggagcaagcgggtgctaca 1980
 tcgttacgatgacgaagaatttcagttgttttggttggaattcctcgttcgccacgatgt

 Y A N Y V Q R Q Q Q Q Q Q G S N P S Q
 1981 tatgcaaattatgttcaaagataatagtagtaataatagtagggaagtaacctatcttaa 2040
 atacgtttaatacaagtttctattatcatcattattatcatcccttcattgggtagaatt

 T Q A Q Q Y Y Q M K N Q Q Q Q Q Q I Q Q
 2041 acctaggcacagtagtactattaaatgaaaaactaataacaataacaataaatttagcag 2100
 tggatccgtgtcatcatgataatttactttttgattattgttattgttatttaaatcgtc

 Q Q Q P S Q V T K Q M Q Y A Q Q Y K Q Q
 2101 caacaacagccatcacaagttactaaatagatgcaatcgcatagcaatacaacaataa 2160
 gttgttgcgtagtgttcaatgatttatctacgttatgcgtatcgttatgtttgttatt

 Q
 2161 tga 2163
 act

Gen İsmi: Erk7c

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00537240

NCBI Erişim Numarası: XP_001023534

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254428, Bölge: 403286 – 399312

İntron Sayısı: 1

Genomik Dizi Büyüklüğü: 3975 bç.

cDNA Büyüklüğü: 3360 bç.

Protein Büyüklüğü: 1119 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1715 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1100 bç.

İleri Primer Dizisi: 5'- atgagtgaagacatagaacc-3' (1–21)

Geri Primer Dizisi: 5'- ctgcataattaagaatcc -3' (1083–1100)

Primer Seti Optimum Tm Değeri:

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M S E D I E P H V L R R Y E I L S K L G
1 atgagtgaagacatagaaccacatgttcctaagaagatatgaaatattgagcaagctaggt 60
FACTCACTTCTGTATCTTGGgttacaagattcttctataactttataaactcgttcogatcca

R G A Y G I V W K V Y D K R T K Q V L A
61 agaggagcatatggaatagtttgaaagtatatgacaaaaggactaagcaagtttttagct 120
tctcctcgtataccttatcaaacctttcatatactgttttcctgattcgtttcaaaatcga

L K K I F D A F Q N S T D A Q R T F R E
121 ctaaagaaaatatttgatgctgtttcagaattcaactgatgcatagcgtaccttttagagag 180
gatttcttttataaaactacgcaaagtcttaagttgactacgtatcgcgatggaaaatctctc

I M F L Q E L D H E N I I K V I N V I R
181 attatgtttctcctaagaattagatcatgaaaatataaattaaagtgattaatgtaattcgt 240
taatacaaagagattcttaatctagtacttttataattaatttcactaattacattaagca

A K N D R D I Y V V F E Y M D T D L H A
241 gcaaagaatgaccgtgatattttatgtagtttttgaatatatggacactgatttgacgcg 300
cgtttcttactggcactataaatacatcaaaaacttatatacctgtgactaaacgtgcg

V I R V N I L E D I H K Q Y I M Y Q I F
301 gttattaggggtaaacattccttgaagatattcataaataatataatgtactaaatattt 360
caataatcccaattgtaagaacttctataagtagttttattatataattacatgatttataaa

R A I K Y I H S G E L I H R D L K A S N
361 agagcaataaagtacatacactctggtgagtttaattcatagagacttaaaagcatcaaat 420
tctcgttatttcatgtatgtgagaccactcaattaagtagtctctgaattttcgtagttta

I L V N S D C M V K V A D F G L V R S I
421 atccttgtaaattcagattgtatggtgaaagtagcagatttcggattagtaagatcgatt 480
taggaacatttaagtctaatacaccactttcctcgtctaaagcctaatacattctagctaa

A N Q E N G S T P I L T E Y I A T R W Y
481 gcgaactaagaaaacgggtcaactccaatactcacagagtatatagccacaagatggat 540
cgcttgattccttttgccgagttgaggttatgagtgctcatatacgggtgttctaccata

R A P E I L L G I I E L S Q C S H T Y T
541 agggcaccagaaatattattaggtattattgagttatcacaatgttcacatacgtatacc 600
tcccgtggtctttataataatccataaataactcaatagtgttacaagtgatgcatatgg

K G V D M W S I G C I L G Q L L L G K P
```

601 aagggagtagatatgtggagtattggctgtattttgggatagctttttattaggaagcct 660
ttccctcatctatacacctcataaccgacataaaaacctatcgaaaataatcctttcggg

I F A G T S T L N Q L E L I L Q V T G K
661 atcctttgcaggaacaagcactctcaattaacttgaattaatattataagttactggtaaa 720
tagaaacgctccttgttcgtgagagtttaattgaacttaattataatattcaatgaccattt

P T Y E D I E A I Q S D L A I T M L E A
721 ccaacgtacgaagatattgaagctatttagagcgatttagcaataactatgctagaagct 780
ggttgcagcttctataacttcgataaatctcgctaaatcgttattgatacgcattctcga

V Q N N P T Q N T K T L Q Q M I P M A S
781 gtataaaataatccaactttaaataccaaaactctccagtaaatgataccaatggccagt 840
catattttattaggttgaattttatggttttgagaggctatttactatggttaccgggtca

D D A L D L L Q N L L Q F N P K K R I T
841 gatgatgctttagatctattataaaaatttacttttagtttaatccaaaaagcgtataact 900
ctactacgaaatctagataatattttaaatgaaatcaaattaggttttttcgcatattga

A E Q A L S H P Y V R Q F H N P N D E P
901 gcagaataggctttaagtcacatacgttaggtaattccataatcctaagatgagcct 960
cgtcttatccgaaattcagtaggtatgcaatccattaaggtattaggattactactcggg

V C G R I I Q I P L D D N K K Y S M R F
961 gtttgtggaagaatcattttaaattccggttagatgataataaaaaatagatgagattt 1020
caaacaccttcttagtaaatttaaggcaatctactattatttttatatacactctaaa

Y R D K L Y Y E I S P R K N V Q Q N G K
1021 tatagagataaattatactatgaaatctccaagaaaaatgtttagcagaatggtaag 1080
atatctctatttaaatatgatactttatagaggttcttttttacaatcgtcttaccattc

Q D S Q L C S N F S E S Q D Q I Q Q P Q
1081 taGGATTCTTAATTATGCAGtaatttttcagaatcataagattagatttaatagccgcag 1140
atcctaagaattaatacgtcattaaaaagtcttagtattctaattcctaattatcgcgctc

Q I Q H Q Q Q T V N E Q Q V L Q Q R T N
1141 taaatatagcattaataataaacagtaaatgagtaataagtccttcagtaagaacaaat 1200
atttatatcgttaattattatgttcatttactcattattcaggaagtcatttcttgttta

N Q Q F Q S K D N S I Q N A R N N S N S
1201 aattaacaatttttagtcaaaagataattcaattcaaatgctagaacaactcaaacagt 1260
ttaattgttaaaatcagttttctattaagtttaagttttacgatctttggtgagtttgtca

S N S S Q V K T N Q S T Y N N I Q S T L
1261 tctaattcaagctaagtgaaaacaaattaatctacttacaataatatttaattctacactt 1320
agattaagttcagattcacttttgtttaattagatgaatggttattataaattagatgtgaa

L R Q K S N G I I Q K Q E N G N M Q Q N
1321 ttaagataaaaatcaaatgggataatttaaaagtaagaaaatggaatatgtaataaaaat 1380
aattctattttttagtttaccctattaaattttattctttttacctttatacattatttta

Q N I Q S S D Q Q Q N L A K E V I Q Q T
1381 tagaatatttaagttcagattaacaatagaatttagcaaaggaagttatttaataaaca 1440
atcttataaatttcaagtcataattgttatcttaaatcgttttcttcaataaattattgt

S A V V A A Q Q A V L A R K T Q K Q N S
1441 tcagctgtagttgctgtagtaagcagtagtagctcgaaagacatagaaaataaataagtagt 1500
agtcgacatcaacgacgcatcattcgtcataatcgagcttttctgtatctttattttatca

I Q F Q Q N I Y N E V Q E S I Y Q Q V K
1501 atataattttagcaaaaatatttacaacgaagtgtgaagaaagcataatcaataagtaaaa 1560
tatataaaatcgtttttataaatgttgcttcacattctttcgtatagttattcatttt

T Q K Q Q L Y Q Q Q L M Q Q Q Q Q Q Q Q
1561 acataaaagcaatagcttttatcagtaaatagctgatgcaataatagtaacagtaataataa 1620
tgtattttctgtatcgaaatagtcattatcgactacggttattatcattgtcattattatt

K M Q Q Q S Q N Q V I S S K N Q I Q Y Q
1621 aaaatgtaataacaatcctaataaattagttatcagtagtaaaaattaaattcaatatcaa 1680

ttttacattattgttaggattttaattcaatagtcacatcttttaatttaagttatagtt
 S S N I N K K Q N E E N E I R D P S E N
 1681 tcaagtaataataaaaaagtaaaatgaagaaaatgaaattagagatccttcagaaaaac 1740
 agttcattatattttatttttcttttacttcttttacttttaactctctaggaagtccttttg
 S I K Q Q Q K L Y A S P K A P S S N Q I
 1741 agtatcaagcaataatagaaactctatgcatcccaaaaagctccaagttcaaattaaatt 1800
 tcatagttcgttattatctttgagatacgttaggggttttcgaggttcaagtttaatttaa
 L S N N Q N L Q Q T L T N N I M S T N N
 1801 ttatcaaataaattaaatttgaataaaccttaacaaataatcatgaggtacaaataat 1860
 aatagtttattaattttaaacattatttgggaattgtttattatagttactcatggttatta
 T N G I H N T I S N G F A K R P T P F L
 1861 acaaatggaattcacaatacaattagtaatggtttcgctaaaagaccaactcctttctta 1920
 tgtttaccttaagtgttatgttaacattaccaaagcgattttctggttgaggaaagaat
 Q S K N S S Q Q T S N S T A L N Q K S S
 1921 tagagtaagaatagcagtttaataaaacttcaaattctactgcactaaacaaaaaagttcc 1980
 atctcattcttatcgtcaattatttgaagtttaagatgacgtgatttgggttttttcaagg
 S N Q N S Q Q I L Q Q Q Q V K Q M L N S
 1981 tcaaatataaatttcttaataaattctataataacagtaagtaaaataaatgcttaaatag 2040
 agtttaattttaagaattattttaagatattattgtcattcattttattttacgaattatca
 P N T Q Q M I Q Q Q K S K E I N Q N I F
 2041 cctaacacttaacagatgatataacaatagaaaagtaaggaaataaattaaatatttttc 2100
 ggattgtgaattgtctactatattgttatcttttcattcctttattttaattttataaaag
 S Q Q N I Q N P H L L N G N Q Y I S S N
 2101 agttaacaaaaatatttaaaatcctcatttgcctaatggaaatcaatatattagcagcaac 2160
 tcaattgttttataaatttttaggagtaaacgagttaccttttagttatataaatcgctcgttg
 N T I N N N N D G Q I D N V D E G I T S
 2161 aatacaattaacaacaataatgatggataaattgataatggttgatgaaggaattacatct 2220
 ttatgttaattgttattactacctattttaactattacaactacttccttaattgtaga
 P V S Q N I L K Q S N S N R L I K P N N
 2221 ccagtaagttaaaataatataaaagtaaatcgaaatagtaaatagattgattaagcctaataat 2280
 ggtcattcaattttatataatttcattagcttatcattatctaactaattcggattatta
 L K S N S S K A L Q S P T S N I V S P Q
 2281 ctgaaatctaattcaagtaaaagctctgtaatcgccaacctcaaatatagttatctccatag 2340
 gacttttagattaagttcatttcgagacatttagcgggttgagtttatatcatagaggatc
 H Q Q Q S S V S S Q S T Q Q S H P S S A
 2341 cattaatagtaatcttctgtaagctcctaatacacttaatagtcgcacccctcttcagca 2400
 gtaattatcattagaagacattcgaggattaggtgaattatcagcgtggggagaagtcgt
 I Q N Q N S Q V Q Q K P A S I N T S Q K
 2401 atttaaaattaaactcttaagtataacaaaaaccagcttcaataaacacttcttaaaaa 2460
 taaattttaatttggagaattcatattgtttttggcgaagttatttgtgaagaattttt
 Y L Q R I I Q G A T P S T Q Q E N N L K
 2461 tatttgtaagaatttatatagggagcaacaccttctacatagcaagagaataatttaaaa 2520
 ataaacatttcttaatatatccctcgttgtggaagatgtatcgttctcttatttaaat
 Q A I S H Q N Q N N I I Q Q Q Y Q N Y I
 2521 taagccatttcacattaaaatcaaaataatataacaataataatattagaattatattc 2580
 attcggtaaaagtgaatttttagttttattatattatgattattattataatcttaatatag
 N S N L S T N N N N S N P S H Q M N N Q
 2581 aacagcaatttaagtacaaataacaacaacagtaacccaagtcattaaatgaataattag 2640
 ttgtcgttaaatcatgtttattgttgttgcattgggttcagtaatttacttattaatc
 N V Q N T N V Q S Q S N G Y S Q N N N G
 2641 aatgttttaaaatacaaatgttccagtcataaagcaatggatactcctaaaacaataacggg 2700
 ttacaaattttatgtttacaagtcagttttcgttacctatgaggattttgttattgccc

Y P T Q S N S G Y Q Q L N N G Y P Q H T
 2701 taccctacttaaagtaatagtgatattagcaattaaacaatggatattccataacatacc 2760
 atgggatgaatttcattatcacctataatcgtaatttggttacctataggtattgtatgg

N I Y S Q N S S N N I Y T Q Q Q Q Q Q L
 2761 aatatatattcatagaatagtagcaataatatataacttaacaatagcaacagcaatta 2820
 ttatatataagtatcttatcatcggttattatataatgaattggtatcggttgcgttaat

S G Q L K K G S T S I N Q Y L T T T Y K
 2821 tctggacaattaaagaaaggatctacttctattaattaatattcttacaacaacttataaa 2880
 agacctgttaatttctttcctagatgaagataattaattatagaatggttggtgaatattt

N P T Q T M Q Q Q M Y K G N Q I D F Y S
 2881 aacctacctaacaatgtaataataaatgtataaaggaaatcaaataagattttttattct 2940
 ttgggatggatttggttacattattttacatatttcttttagtttatctaaaaataaga

P N K S K V N T A N Y F G N R A S V T K
 2941 ccgaacaaatcgaaagttaacactgcaaattattttggtaatagggttcggttaacaaaa 3000
 ggcttggttagctttcaattgtgacgtttaataaaaaccattatcccgaagccattgtttt

T M A Q L N Q K N N S N S A I I P N S N
 3001 actatggcctaattaaaccaaagaataatagcaatagtgctataattccaaactctaac 3060
 tgataccggattaattttggttttcttattatcgttatcacgatattaaggtttgagattg

T S N Q I Q N N N Q L N T N N N N N S N
 3061 acaagcaattaaattttaaataataattaattaaatacaataataacaataatagcaat 3120
 tgttcggttaatttaaattttattattaattaatttatggtttattattggttattatcggtta

K N Y Q T G Q N G H I I L N G N Q S V S
 3121 aaaaactattaacagggttaaaatgggcatattattttgaaatggtaaatcaatctgtttct 3180
 tttttgataatttgcgattttaccctataataaaaacttaccattagttagacaaaga

H N I H A Q N S V S A G N M A N N N L N
 3181 cataatattcatgcatagaatagcgtatctgcaggaatattggctaacaacaatttaaat 3240
 gtattataagtacgtatcttatcgcgatagacgtcccttataccgattggttgtaaattta

S L N G Q S S T K N K Y S Y S N L L Q N
 3241 tctcttaatggctagtcttctacaaaaataaatatagctattctaatcttttataaaat 3300
 agagaattaccgatcagaagatgttttttatttatatcgataagattagaaaatatttta

A Q K L K A N T P S Y H Q L N S P K Y Q
 3301 gcttaaaaattaaaggcaataactccttcctatcattaacttaattctcctaagtattga 3360
 cgaatttttaatttccggtttatgaggaaggatagtaattgaattaaagaggattcataact

Gen İsmi: MPK1

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00469230

NCBI Erişim Numarası: AY426249

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254371, Bölge: 464158 - 465342

İntron Sayısı: 0

Genomik Dizi Büyüklüğü: 1185 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1185 bç.

Protein Büyüklüğü: 394 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1001 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü : 1001 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atgaatatataaaatagatcgga -3' (185-208)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcagtgaataggatggaaagatttagcttc -3' (1156-1185)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

      M Q Q Q Q N Q Q Q Q A Q Q Q Q L Q Q Q Q
1  atgtagtaataataaaaattagcaataacaagcacaatagtaatagctgtaacaacaatag 60
   tacatcattattattttaatcgttattggttcggttatcattatcgacattggtgttatc

      Q Q Q Q Q H Q Q A Q Q H Q E K P Q K P I
61 tagcaatagtagtagcattagtaggcacaacagcaccaagaaaagcctcaaaaaccaatt 120
   atcgttatcatcatcgtaatcatccggtgtgtcgtgggttcttttcggagtttttggttaa

      Q V P P G K H K F D C G Q T I F V V D E
121 caagtacctcctggtaagcacaatttgattgtgggcagactatttttggtgtcagatgag 180
   gttcatggaggaccattcgtgtttaactaacaccgctctgataaaaaacaacagctactc

      K Y E Y I K Q I G Y G A Y G V V C S A V
181 aaatatgaatatataaaatagatcggatatggagcttacgggtgtggtttgctcagcagta 240
   tttatTACTTATATATTTTATCTAGCCTatacctcgaatgccacaccaaacgagtcgtcat

      N K E N G S K V A I K K V Q N A Y D D L
241 aataaagaaaatggttcaaaaagttgcaattaaaaaggtttaaaatgcttatgatgatttg 300
   tttttcttttccaagttttcaacgtaatttttccaaattttacgaataactactaaac

      I D A K R I V R E I K L L K F F E H D N
301 atcgatgcaaagcgtattgtcagagaaatcaaaccttttaaaattctttgaaacacgataat 360
   tagctacgtttcgcataacagtccttttagtttgaaaattttaagaacttggtgctatta

      I I S L L D V I K P N A P V G D E D I Y
361 attatttcacttttagatggttattaagcctaacgcgccagtaggtgacgaagatatctac 420
   taataaagtgaaaatctacaataattcggattgcggggtcatccactgcttctatagatg

      M V F D L M E T D L H R V I Y S R Q E L
421 atggatatttgatttgatggaaactgatttgcaccggtgttattttctcgttaagaactc 480
   taccataaactaaactacctttgactaaacgtggcacaataaataagagcaattcttgag

      S D E H I Q Y F V Y Q I L R G L L Y I H
481 agcgatgagcataatcctaattttgtctattaaattcttcggtgtctcttatacattcat 540
   tcgctactcgtatagattataaaacagataatttaagaagcaccagagaatatgtaagta

      S A N V I H R D L K P S N I L L N K N C
541 tctgcaaattgatttcatcgtgatctaaagcccagcaatattttgcttaataagaactgt 600
   agacgtttacaataagtagcactagatttcgggtcgtttataaaacgaattattcttgaca
```

D L K I C D F G L A R G F E E P G E S L
 601 gatcttaaaatgtcgatgttggctggtgcccgtggattcgaagagcctgggtgaaagcttg 660
 ctagaatthtaaacgctaaaaccagaccgggacctaagcttctcggaccactttcgaac

T E Y V I T R W Y R A P E V I L N A S E
 661 actgaatacgttaactactcggttgaccgtgctcctgaagttatgttgatgtagtgag 720
 tgacttatgcatatgatgagcaaccatggcagcaggacttcaataaaacttacgatcactc

Y N Q A V D I W S V G C I T A E L L G R
 721 tacaatcaagctggtgatatttggcagttggttgcatcactgctgaattattaggaaga 780
 atggttagttcgacaactataaacagtcaccaacgtagtgacgacttaataatccttct

T P L F P G E N Y L D Q V Q R V I A V L
 781 acacccttttcccaggagaaaattatctagattaagtttagcgtgcatagcagtttta 840
 tgtggggaaaagggtcctccttttaatatagatctaattcaaatcgcacagtatcgtcaaaat

G T P T Q E D M A Y I G N Q D A I K Y I
 841 ggaaccctactcaagaagatatggccttatattggcaattaagatgctattaaatatata 900
 ccttggggatgagttccttctataaccgaatataaccgttaattctacgataatthtatata

K S Q P K R T K Q S W Q S L Y P K A N P
 901 aaatctcaacaaaaagaactaaataatcatggtagagtcctttatccgaaagcaaatcca 960
 ttttagagttggtttttccttgatttattagtagtaccatctcagaaataggcctttcgtttagg

L A L D L L S K M L T F N P E K R Y T V
 961 ctagctcttgaccttttaagtaaaatgctcactttcaatccagaaaaacgctataactggt 1020
 gatcgagaactggaaaattcattttacgagtgaaagttaggcttttttgcgatatgacaa

K E C I E H P Y F E G L H Y P D E E P E
 1021 aaagaatgcatcgaacatccttacttccaaggttccattaccctgatgaagaacctgag 1080
 tttcttacgtagctttaggaatgaagcttccctgaagtaatgggactacttcttggactc

C E Q V F D W S W D K F T P T K E I L Q
 1081 tgtgagtaagtttttgattggtccttgggataaattcacacactactaaagaaatattgtag 1140
 acactcattcaaaaactaaccagaaccctatttaagtggtgatgatttctttataaacatc

K M I Y Q E A K S F H P I H Q
 1141 aagatgatctactaa **GAAGCTAAATCTTCCATCCTATTCACTGA** 1185
 ttctactagatgattccttcgatttagaaaggtaggataagtgact

Gen İsmi: MPK2

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00760190

NCBI Erişim Numarası: AY426250

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254370, Bölge: 2367 - 132

İntron Sayısı: 7

Genomik Dizi Büyüklüğü: 2236 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1212 bç.

Protein Büyüklüğü: 403 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 2236bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü : 1212 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atggagcattaggtgcctaaag -3' (1-22)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcaataaaatattttagaacaaatttac -3' (1184-1212)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```
      M E H Q V P K E I I E Y Y K P Y E N
1  atggagcattaggtgcctaaagaaattatagaataactacaaaccatatgaaaac 54
   TACCTCGTAATCCACGGATTTCtttaatatcttatgatggtttggtataacttttg

      K K S N I R V Q N V L S A S K F E M
55  aagaaatcaaatattagagtttaaaatgtattgagtgcctctaaatttgaaatg 108
   ttcttttagtttataatctcaaattttacataactcacggagattttaaactttac

      D D N Y S I I D S I G Q G A Y G I V
109 gacgataattatagtatcatagactcaattgggtcagggagcttatggtattggt 162
   ctgctattaatcatagtatctgagtttaaccagtcctcgaataaccataacaa

      V A A R D L N C Q D E E N N L V A I
163 gtagcagctagagacttgaattgtaggacgaagagaataatttgtagcaatc 216
   catcgctgatctctgaacttaacaatctgcttctcttattaaccatcgttag

      K K I E K A F E H K I F T K R T L R
217 aaaaaatagaaaaagcatttgaacataaaatatttacaaaaagacattgaga 270
   tttttttatctttttcgtaaacttgtatttttataaatgtttttcttgaactct

      E L R L L R L L K H E N I I G I N T
271 gaactgctttacttagattgcttaagcacgaaaatattatcggcatcaataca 324
   cttgacgcaaatgaatctaacgaattcgtgcttttataatagccgtagttatgt

      L L L P R S R E K F E D I Y V V S E
325 ttattattacctagatcaagagaaaaatttgaagatatatatgtagtttctgag 378
   aataataatggatctagttctctttttaaacttctatatatacatcaaagactc

      L M E T D L A S I I K S E Q P L T D
379 ttgatggagacagatttagcatcaattataaaaagtgaacaaccacttactgat 432
   aactacctctgtctaaatcgtagttaatatttttcacttggtggtgaatgacta

      E H C Q F F L Y Q I L R G L K Y I H
433 gagcattgtcaattcttcctataactaaatccttcgtgggtttaaataatatacat 486
   ctcgtaacagtttaagaaggatagatttaggaagcaccaaattttatatatgta

      S A K V V H R D L K P R N L L V N S
487 tcagcaaaggtcgttcatcgtagcttaaacctagaaatttgcttgtaaattct 540
   agtcgtttccagcaagtagcactgaattttgatctttaaacgaacatttaaga
```

N C D L K I C D F G L A R T I I P G
 541 aactgtgatttaaaaatttgatgtttggttttagctagaacaattattcctggg 594
 ttgacactaaatttttaacactaaaaccaaactcgatcttgtaataaggaccc

L K C R A G M L T D Y V A T R W Y R
 595 ctaaagtgtagagctggatgctaacagattatggtgcaaccaggtggtataga 648
 gatttcacatctcgaccatacgattgtcctaatacaacggttggtccaccatatct

A P E L L L S W R D Y D E K V D V W
 649 gccccagaacttcttttatcttggagagactatgatgaaaaagttgatgtctgg 702
 cggggtcttgaagaaaatagaacctctctgataactctttttcaactacagacc

S V G C I F A E L L R R K P F L P G
 703 tcggtaggttgatttttgacagaactattgagaagaaaaccatttttaccagga 756
 agccatccaacataaaaacgctcttgataactcttcttttggtaaaaatggtcct

I D T R N Q I E L I F E Y L G T P S
 757 atagatacaagaaatcaaatagagcttatttttgagtatctgggtactcctagt 810
 tatctatggtcttttagtttatctcgaataaaaactcatagaccatgaggatca

E Q E I N N I P R E K F R K M V K N
 811 gaataagaaataaataatattccaagagaaaagtttagaaaaatggttaaaaac 864
 cttattctttatttattataaggttctcttttcaaatctttttaccaattttg

M P K R Q P K Q F E K L F S K A S K
 865 atgcctaagagatagccaaagcagtttgaaaaattattcagcaaagcctcaaaa 918
 tacggattctctatcggtttcgtcaaaactttttaataagtcgtttcggagtttt

E G K T R Y Q I F K L S T Q I K L N
 919 gaaggtaaaaccagatattaaatatttaaattatctacttaaatacaatataat 972
 cttccatttttggtctataatttataaatttaataagatgaatttagtttaattta

C I K K A I D L L R K L L T F D F T
 973 tgtataaaaaaagcaattgatttacttagaaaacttttgacttttgatttcaca 1026
 acatattttttcgttaactaaatgaatcttttgaaaactgaaaactaaagtgt

K R I T V D E A L S H P Y L S E L H
 1027 aaaagaattaccgtagatgaagctttaagccatccttatttatctgaattgcat 1080
 ttttcttaatggcatctacttcgaaattcggtaggaataaatagacttaacgta

F P E D E P T C E P V S K L D F E F
 1081 ttccctgaagatgaaccaacatgtgagcctggttctaagcttgattttgaattt 1134
 aagggacttctacttggtgtacactcggacaaaagattcgaactaaaacttaaa

E E H N L T L Q Q L K G K I I T S K
 1135 gaagagcataatcttactttacagtaattaaaaggtaaaaataataacaa **GTA** 1188
 cttctcgtattagaatgaaatgtcattaattttccattttattattgttcattt

F V S K I F Y Q
 1189 **TTTGTTC**TAAAtatattttattga 1212
 aaacaaagattttataaaaact

Gen İsmi: MPK3

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00660130

NCBI Erişim Numarası: AY426251

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümleşke: 8254577, Bölge: 3845 - 1132

İntron Sayısı: 2

Genomik Dizi Büyüklüğü: 2714 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1449 bç.

Protein Büyüklüğü: 482 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 2439 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1392 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atgtctaatacataactaacaacggg -3' (57-85)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcatttttatggaggtttgcttttc-3' (1423-1449)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M V K A A T K L S L Q L Q R I N Q L
1 atgggttaaagcagcaacaaagctcagcctatagctttaagaatcaatcagctg 54
taccaatctcgtcgttgtttcgagtcggatatacgaaatcttagttagtcgac

K M S K S Y Q Q N G I T F T T G E R
55 aaaatgtctaaatcataactaacaacgggattacctttacaacaggagaaaga 108
tttTACAGATTAGTATGATTGTTTGCCCtaatggaaatggtgtcctctttct

Y E V D K L L G S G A Y G Q V V R A
109 tatgaagttgataagttattaggctcaggagcatatggccaagtagtgagagcc 162
atattcaactattcaataatccgagtcctcgtataaccggttcatcactctcgg

K D K K N Q N Q Y V A I K K L H K I
163 aaagataagaaaattagaatcagtagtagcaataaagaaattacacaaaatc 216
tttctattcttttaattcttagtcatacatcgttatttctttaatggtgttttag

E D V I D A K R V L R E I R I L R Y
217 gaagatggttatagatgcaaaaagagttcttagagaaataagaatcttacgttat 270
cttctacaatatctacgttttttctcaagaatctctttattcttagaatgcaata

L V H E N I L Q L S D I L Y D D E D
271 ttatgtcatgaaaatatcttgtaattgagtgatattctttatgatgacgaagat 324
aatcaagtagctttatagaacattaactcactataagaaataactactgcttcta

E N Q E F G T I Y L V T N Y M E I D
325 gaaaattaagaattcggcacaatctatcttagtaaccaattacatggaaatcgat 378
cttttaattcttaagccgtgtagataaatcattggttaatgtaccttttagcta

L Y Q V I K S D Q K L S D Q H I Q Y
379 ttgtatcaagttattaagtctgatcaaaagctcagcgattagcacatccaatat 432
aacatagttcaataattcagactagtttttcgagtcgctaatacgtgtaggttata

I I Y Q I L K G L K Y L H S A N I I
433 attatctattaaatccttaagggtttgaagtatctccactctgcaaatattatc 486
taatagataatcttaggaattccaaacttcatagaggtgagacggtttataatag

H R D L K P S N L L A T E K C A I R
487 cacagagatctcaaaccatcaaactcttttagccacagaaaaatgtgctattcgt 540
gtgtctctagagtttggtagtttagaaaatcgggtgtctttttacacgataagca

M C D F G L S R S I E D E Q K Q E Q
```

541 atgtgtgattttggtttatcaagaagtattgaagatgagcagaagcaagaacaa 594
tacacactaaaaccaaatagttcttcataacttctactcgtcttcggtcttggtt
Q L V R N L I L F F S F I I L M H N
595 caactagtaagaaatcttattttatctttcagcttcattattctgatgcataat 648
gttgatcattctttagaataaaaaataaaagtcgaagtaataagactacgtatta
L H K Q T N K Q I N K K T N K P N Q
649 ttacacaaacaaacaaacaaataaataaaaaactaacaacccaaccaa 702
aatgtggttggttggttggtttatttattttttttgattggttgggttggtt
Y L F Q T L L S Y S L K Q F I H N C
703 tatttatttttaactctattaagttattccctcaataaattcattcataattgc 756
ataaataaaatttgagataaattcaataagggagtttattaagtaagtattaacg
N Q F S L Y E F Y T V N K K Q A S K
757 aactaattttctctctatgatgttttatacagtcacaaaaagcaagcaagcaaa 810
ttgattaaaagagagataactcaaaaatgtcagttggtttttcgttcggtcgttt
Q I N T C Q L T E Y V V T R Y Y R A
811 caaataaataacttgtaattaacccaatacgttgcactagatactatagagct 864
gtttattttatgaacaattaattggcttatgcaacagtgatctatgatctcga
P E I M L S S H V Y S K A V D I W S
865 cctgaaatcatgcttagctctcatgtttactcaaaggctgtcgcataatttgggtct 918
ggacttttagtacgaatcgagagtagcaaatgagtttccgacagctataaacaga
L G C T F A E L I S H Q I L F K A D
919 cttgggttgacatttgccgaactgattagccattaaatcctctttaaagcagat 972
gaaccaacgtgtaaacggcttgactaatcggttaatttaggagaaaatttcgtcta
N Y I K Q I K L I F D K L G M P P E
973 aattatattaaataaattaagttaattttcgataagcgttggtagcctcctgag 1026
ttaatataattttatttaattcaattaaaagctattcgaaccatacggaggactc
E D L Q F I G N S N A K Q F V N T L
1027 gaagatttgcaattttattggaacagtaatgctaaataattcgtaaataactctc 1080
cttctaaacgttaataaacctttgtcattacgattttattaagcattttatgagag
A K K N S V K V S S F I N Y E N P L
1081 gctaaaaagaattctgtcaaggtagcagcttttattaattatgaaaatccatta 1134
cgatttttcttaagacagttccaatcgctcgaataaattaatacttttaggtaat
A L D L I D K M L A I N P S K R I T
1135 gcccttgacttaatagacaagatgcttgctataaacccagcaaacgtataaact 1188
cgggaactgaattatctgttctacgaacgatatttggggcgtttgcatattga
A D E A L E H P Y F Q S I R D V Q E
1189 gctgatgaagcccttgaacacccttacttctaattctattcgtgatgtctaagaa 1242
cgactacttcgggaacttgtgggaatgaagattagataagcactacagattctt
E I K F T G T I N F D F E T D S E I
1243 gaaatcaaattcactggaactatcaactttgatttcgaaactgactctgaaata 1296
cttttagtttaagtgaccttgatagttgaaactaaagctttgactgagactttat
T I E S L R K Q I L E E V N H F R Q
1297 acaattgaaagcttgagaaaatagatcttggagaagtcaaccacttttagataa 1350
tgtaaactttcgaactcttttctagAACCTCCATAAAAAATGA
V N K V P P L K I P D L L A L C E K
1351 gttaataaggtacctcccttgaaaatacctgatttacttgctctttgtgaaaag 1404
caattattccatggagggaacttttatggactaaatgaacgagaaacacttttc
R T K A I Q E K A N L H K K Q
1405 cgtacaaaagctatacaagaaaaagcAAACCTCCATAAAAAATGA 1449
gcatgttttcgatagttctttttcgtttggaggtattttttact

Gen İsmi: MPK4

TGD Erişim Numarası: THERM_00575520

NCBI Erişim Numarası: AY560586

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümlüşke: 8254370, Bölge: 2367 – 132

İntron Sayısı: 0

Genomik Dizi Büyüklüğü: 1195 bç.

cDNA Büyüklüğü: 1195 bç.

Protein Büyüklüğü: 397 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 1194 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü : 1194 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atgagcagcaacgaagaattgaacca -3' (1-28)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcacagatgattaagtagattaagaagagg -3' (1166-1196)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M S S N E E I E P H I L R K F E I I Q K
1 atgagcagcaacgaagaattgaaccacatattttaagaaagtttgaaatcattcaaaaa 60
  TACTCGTCGTTGCTTCTTTAACTTGGTgtataaaaattctttcaaacttttagtaagttttt

L G K G A Y G I V W K A F C K K S K Q I
61 ttgggtaaaggagccttatggtattgtttggaaagcattttgcaagaagtcaaagcaata 120
  aaccatttctcgaataaccataacaaacctttcgtaaaacggttcttcagtttctgttat

V A L K K V F D A F H N A T D A Q R T F
121 gttgctttaaaaaagtattcgaatgcattccataacgctactgatgctcaaagaacattc 180
  caacgaaattttttcataagctacgtaaggtattgcgatgactacgagtttcttctaag

R E V M F L Q E L N G H E N I I R L I N
181 cgtgaagtaatgttcttgcaagagcttaattggacacgagaatatcattaggctaatcaac 240
  gcacttcattacaagaacgttctcgaattacctgtgctcttatagtaatccgattaagtg

I I K A E N N K D L Y M V F D F M E T D
241 atcatcaaagcagaaaataataaagatttgatcatggtttttgacttcatggaaactgat 300
  tagtagtttctgctttttattatttctaaacatgtacaaaaactgaagtacctttgacta

L H A V I R A N I L E E I H K Q Y V V Y
301 ttacatgctgttattagagcaaatatattagaagaaatacacaaatagtatgttcttat 360
  aatgtacgacaataatctcgtttatataatcttctttatgtgtttatcatacaacagata

Q I L K A M K Y I H S G E L I H R D L K
361 taaattcttaaagctatgaaatacattcattcaggtgaactgatccatcgtgacttgaag 420
  atttaagaatttcgatactttatgtaagtaagtccacttgactaggtagcactgaacttc

P S N I L L N S E C L V K L A D F G L A
421 ccattcaatcctcctaaatagcgaatgcttggttaaattagctgattttggacttgcc 480
  ggtagattataggaggatttatcgttacgaaccaatttaacgactaaaacctgaacgg

R S V A V T D D D D N P V R T E Y V A T
481 cgttccggttgacttaccgatgatgatgacaatcctgtcagaacagagtatgttgctact 540
  gcaaggcaacgtcaatggctactactactgttaggacagctcttctcatacaacgatga
```

R W Y R A P E I L L G S T K Y A K A V D
 541 cgttgggtatcgtgcccctgaaatcttattaggtagtactaaatatgctaaggctgttgat 600
 gcaacatagcacgggactttagaataatccatcatgatttatacattccgacaacta

M W S I G C I V G E L I T N R A I F P G
 601 atgtggagcatcggctgcatagtaggagaacttataactaacagagctatcttcccaggt 660
 tacacctcgtagccgacgtatcatcctccttgaatattgattgtctcgatagaagggtcca

N S T L N Q I E K V L E L T G K P T Q E
 661 aattccactctcaatcaaattgaaaaagttttagaattgactggtaaaccacttaggaa 720
 ttaagggtgagagttagtttaactttttcaaaatcttaactgaccatttgggtgaaatcctt

D I E S L E S Q L A W N I I S S I N V Q
 721 gatattgagtcgttagaatcccaactagcatggaatatcataagttcaattaatgtttaa 780
 ctataactcagcaatcttagggtgatcgtaccttatagttattcaagttaattacaatt

K K K T F H Q M F P G A S E E A I D L I
 781 aagaaaaaacattccattaatgttcctcgtgcaagcgaagaagcaattgatctcatc 840
 ttctttttttgtaaggtaatttacaagggaccagttcgtcttctcgttaactagagtag

K K L L C F N P K N R L T V E Q A L E H
 841 aagaaactcctctgtttcaaccctaaaaatcgtcttacagttgaataagccttagagcat 900
 ttctttgaggagacaaagttgggatttttagcagaatgtcaacttattcggaaatctcgtta

P Y V K D F H C P E E E I V C G R V I P
 901 ccttacgttaaagacttccactgtcctgaagaagaattgtttgcggaagagtcaccccc 960
 ggaatgcaatttctgaagggtgacaggacttcttctttaacaaacgccttctcagtagggg

I S M N D N K K F S I K E Y R E A L Y N
 961 atcagcatgaacgacaataaaaaattctcaatcaaagaatacagagaagcactttataat 1020
 tagtcgtacttctgttatttttttaagagttagtttcttatgtctcttctcgtgaaatatta

Q I Y Q E K R I K R Q Q N R D I Y L K Q
 1021 taaatttactaagaaaagagaatcaaacgctaataaaacagagacattttaccttaagcaa 1080
 atttaaatgattcttttctcttagtttgcgattattttgtctctgtaaatggaattcgtt

Q Q Q I T T T G N G Q V S Q A G Q S S Q
 1081 taataataaattactacaactggaaatgggtaggtttcttaagctggataatcttcccaa 1140
 attatttttaaatgatgttgacctttacccatccaaagaattcgacctattagaagggtt

P V S S Q Q I P S S S Q S T Q S S V
 1141 ccagtttcatccaacaaatacctt**CCTCTTCTTAATCTACTTAATCATCTGTGA** 1195
 ggtcaaagtagggttgtttatggaaggagaagaattagatgaattagtagacact

Gen İsmi: TIGR-MPK4

TGD Erişim Numarası: THERM_00575520

NCBI Erişim Numarası: XP_001009345

Genomik Lokalizasyonu (5'-3'): Tümüleşke: 8254370, Bölge: 2367 – 132

İntron Sayısı: 4

Genomik Dizi Büyüklüğü: 3155 bç.

cDNA Büyüklüğü: 2835 bç.

Protein Büyüklüğü: 945 aa.

Primer Setinin PZR ile gDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 2355 bç.

Primer Setinin PZR ile cDNA'dan Çoğaltacağı Bölge Büyüklüğü: 2355 bç.

İleri Primer Dizisi : 5'- atgagcagcaacgaagaattgaacca -3' (-)

Geri Primer Dizisi: 5'- tcacattttattctactttgccaac -3' (-)

Primer Seti Optimum Tm Değeri :

cDNA Dizisi Üzerinde Primer Oturma Bölgeleri ve Translasyon Karşılığı:

```

M S E R T N M Q G K L R K Q K S E E K E
1 atgagtgaacgaacgaacatgcaaggaaaattaagaaagtaaaaaagtgaagaaaaagaa 60
  tactcacttgcttgcttgctgtacgttccttttaattcctttcattttttcacttctttttctt

R H L K T N Q Q N L Q E K L L E G E E K
61 agacatttgaaaaccaatcaacaaaatctataagaaagctattagaaggagaagaaaag 120
  tctgtaaacttttggttagttgttttagatattccttttcgataatcttcctctctcttttc

L T N Q S R S G T I K M T L S C V F Q Q
121 ctaactaatcaaagcagaagcgcacataaaaaatgacacttagttgtgtattttagcaa 180
  gattgattagtttctgctcttcgcggtgtatttttactgtgaatcaacacataaaatcgtt

S Y Q S F I K E I I L I E A L V A N H Q
181 tcttattaaagttttattaaagaaataacttattgaagctctttagtagtaaatcatcaa 240
  agaataatttcaaaataatttctttattatgaataacttcgagaacatcgattagtagtt

Q K L S L G Q Q F Q K Q Q R A A A K K T
241 taaaagctatcattaggacaataatttcaaaaatagtaaagagcagcagcgaagaagaca 300
  attttcgatagtaaatcctggttattaaagtttttatcattttctcgtcgtcgtcttctctgt

K I Q P T T N K I D Y K G R K Q K F Q Q
301 aaaatthaaccaacgaccaataagattgattataaaggaagaaaataaaaatthcaataa 360
  ttttaaattggtgctggttattcctaactaatatttccttcttttatttttaagttatt

Q T V I E K E T K N T K E E D H Q K F L
361 caaacagtaattgaaaaagagactaaaaatacaaaagaagaagatcattagaaatthta 420
  gtttgtcattaactttttctctgatttttatgttttcttcttctagtaatctthaaaaat

E A E K E F F Q L K F I Q T V K I I E R
421 gaagccgaaaaagaatthtttagctaaaatthtttaactgtaaaaatcatagaagaa 480
  cttcggctthttcttaaaaaaatcgattthtaataaatttgacattthtttagtatctttct

M S S N E E I E P H I L R K F E I I Q K
481 atgagcagcaacgaagaattgaaccacatattthtaagaaagtttgaaatcattcaaaaa 540
  FACTCGTCGTTGCTTCTTTAACTTGGTgtataaaaattcctttcaaacctttagtaagttttt
```

L G K G A Y G I V W K A F C K K S K Q I
 541 ttgggtaaaggagcttatggattgtttggaaagcattttgcaagaagtcaaagcaata 600
 aaccatttctcgaataaccataacaaacctttcgtaaaacgttcttcagtttcgttat

V A L K K V F D A F H N A T D A Q R T F
 601 gttgctttaaaaaagatttcgatgcattccataacgctactgatgctcaaagaacattc 660
 caacgaaatTTTTTcataagctacgtaaggatttgcgatgactacgagtttctgtaag

R E V M F L Q E L N G H E N I I R L I N
 661 cgtgaagtaatgttcttgcaagagcttaatggacacgagaatatcattaggctaatacaac 720
 gcacttcattacaagaacgttctcgaattacctgtgctcttatagtaatccgattagt

I I K A E N N K D L Y M V F D F M E T D
 721 atcatcaaagcagaaaaataaagatttgtacatggTTTTTgacttcatggaaactgat 780
 tagtagtttctgctttttattattttctaacatgtaccaaaaactgaagtacctttgacta

L H A V I R A N I L E E I H K Q Y V V Y
 781 ttacatgctgttatttagagcaaatatattagaagaaatacacaaatagtatgttctat 840
 aatgtacgacaataatctcgtttatataatcttctttatgtgtttatcatacaacagata

Q I L K A M K Y I H S G E L I H R D L K
 841 taaattcttaaagctatgaaatacattcattcaggtgaactgatccatcgtgacttgaag 900
 atttaagaatctcgatactttatgtaagtaagtcacttgactaggtagcactgaactc

P S N I L L N S E C L V K L A D F G L A
 901 ccactaataatcctcctaaatagcgaatgcttggttaaattagctgattttggacttggc 960
 ggtagattataggaggatttatcgcttacgaaccaatttaacgactaaaacctgaacgg

R S V A V T D D D D N P V R T E Y V A T
 961 cgttccgttgacgttacccgatgatgatgacaatcctgtcagaacagagtatgttctact 1020
 gcaaggcaacgtcaatggctactactactgtttaggacagtccttctcatacaacgatga

R W Y R A P E I L L G S T K Y A K A V D
 1021 cgttgggtatcgtgcccctgaaatcttattaggtagtactaaatagctaaggctgttgat 1080
 gcaaccatagcacggggactttagaataatccatcatgatttatacagattccgacaacta

M W S I G C I V G E L I T N R A I F P G
 1081 atgtggagcatcggctgcatagtaggagaacttataactaacagagctatcttcccaggt 1140
 tacacctcgtagccgacgtatcatcctcttgaatattgattgtctcogatagaagggtcca

N S T L N Q I E K V L E L T G K P T Q E
 1141 aattccactctcaatcaaattgaaaagttttagaattgactggtaaaccacttaggaa 1200
 ttaagggtgagagttagtttaactTTTTTcaaaatcttaactgaccatttgggtgaaatcctt

D I E S L E S Q L A W N I I S S I N V Q
 1201 gatattgagtcgttagaatcccactagcatggaatatcataagttcaattaatgtttaa 1260
 ctataactcagcaatcttagggtgatcgtaccttatagtattcaagttaattacaatt

K K K T F H Q M F P G A S E E A I D L I
 1261 aagaaaaaacattccattaatgttccctggtgcaagcgaagaagcaattgatctcatc 1320
 ttctTTTTTgtaaggtaatttacaagggaccacgttcttctcgttaactagagtag

K K L L C F N P K N R L T V E Q A L E H
 1321 aagaaactcctctgtttcaaccctaaaaatcgtcttacagttgaataagccttagagcat 1380
 ttctttgaggagacaaagttgggatttttagcagaatgtcaacttattcggaatctcgta

P Y V K D F H C P E E E I V C G R V I P
 1381 ccttacgttaaagacttccactgtcctgaagaagaattgtttgcggaagagtcaccccc 1440
 ggaatgcaatttctgaagggtacaggacttcttctttaacaaacgccttctcagtagggg

I S M N D N K K F S I K E Y R E A L Y N
 1441 atcagcatgaacgacaataaaaaattctcaatcaagaatacagagaagcattttataat 1500
 tagtctgacttctgttattttttaaagagttagtttcttatgtctcttctgtaaatatta

Q I Y Q E K R I K R Q Q N R D I Y L K Q
 1501 taaatttactaagaaaagagaatcaaacgctaataaaacagagacatttaccttaagcaa 1560
 atttaaatgattcttttctttagtttgcgattattttgtctctgtaaatggaattcgtt

Q Q Q I T T T G N G Q V S Q A G Q S S Q

1561 taataataaattactacaactggaaatgggtaggtttcttaagctggataatcttcccaa 1620
attattatthtaatgatgttgacctttacccatccaaagaattcgacctattagaagggtt
P V S S Q Q I P S S S Q S T Q S S V T Q
1621 ccagtttcatcccaacaaataccttctcttcttaaatctacttaatcatctgtgactcaa 1680
ggtcaaagtagggttgtttatggaaggagaagaattagatgaattagtagacactgagtt
Q Q Q Q Q Q Q Q E K S K N Q Y Q S S S S
1681 tagtaatagcaataatagcagtaagaaaaagcaagaaccaatatcaaagcagctcctct 1740
atcattatcgttattatcgtcattcttttttcgttcttggttatagtttcgctcgaggaga
Q Q Q Q A Q Q Y Q Q Q Q S L Q Q Q Q V P
1741 caatagtagtaagcttaacagtaccaatagtagcaatccctttaataacaataggtacct 1800
gttatcatcattcgaattgtcatggttatcatcgttagggaaattattgttatccatgga
Q R Q S S Q S S Q P Q S Q Q S I Q Q N Q
1801 tagcgccaatcgtctcaatcctcttagccttaatctcagtaaagcatataataaaaattaa 1860
atcgcggttagcagagttaggagaatcggaattagagtcatttcgtatattatthtaatt
Q K Y Q Q S Q Q Q Q Q R Y F D Q E K E Q
1861 cagaagtactaataatgcatagtaataataatagcgttactttgatcaggaaaaagaatag 1920
gtcttcatgattatcagtatcattattattatcgcaatgaaactagtcctttttcttacc
Y K P N A Q Q Q Y L Q Q Q Q Q L Q Q Q Q
1921 tacaagccaaatgctcaacaataataccttcaatagtaacaacaactccaataatagcaa 1980
atgttcggtttacgagttgttattatggaagttatcattgttgttgaggttattatcgtt
A L Q Q Q Q M Q K S Y Y N S Q N F N S S
1981 gctttacaacaataataaatgcaaaaatcttattacaactcacaaaactttaatagtagc 2040
cgaaatgttgttattatthtacgtttttagaataatggttagtggttttgaaattatcatcg
Q V Q V Q Q G N S Q S T S Q G N N Y S G
2041 taagtttaagtctaataaggtaactcataatcaacatctcaaggaaataattacagtggc 2100
attcaaattcagattattccattgagtagtagttctttattaatgtcaccg
Y K S G S Q A S T T N A S S S A Q Y A G
2101 tacaatcaggaagctaggccagcaccactaatgcatcatcttcagcttaatatgtctggc 2160
atgttttagtccttcgatccggtcgtggtgattacgtagtagaagtcgaattatacgaccg
Y D D K K V L M N S S N Q I Q N K N S S
2161 tatgatgacaaaaagtaactaatgaactcttctaattaaatttaaaaaaaattcctct 2220
atactactgtttttcatgattacttgagaagattaatttaaaattttatthtaaggaga
Q V Y T Q S Q G A N Q A S S S N T Q Q Q
2221 taagtctacactcaaagctaaggagcaactaagctagctcttcaaacacatagcaataa 2280
atcagatgtgagtttcgattcctcgtttgattcgatcgagaagtttgtgtatcgttatt
Y L P S S S N T I Y G Q G V T N S I A N
2281 tacttacctagttcttcaaatactatctatggatagggagtaacaaattctattgctaac 2340
atgaatggatcaagaagtttatgatagatacctatccctcattgtttaagataacgattg
S N N L Y N Q A Q L N G S K Q Q S S S L
2341 agcaataatctttacaattaagcttaattgaatggctccaagtagcaatcttcatcacta 2400
tcgttattagaaatgtaattcgaattaacttaccgaggttcatcgttagaagtagtgat
G H T Q N K Y S S T Q A Y Q Q A Q P S K
2401 ggtcacacataaaaatagttatccacttaagcttatcaataagcacagccctctaaa 2460
ccagtggtgattttattcataagtaggtgaattcgaatagttattctgtgctcgggagattt
Y M N Q T Q N A Q K Y V N N N N N S N G
2461 tatatgaattagacttaaaatgcttagaaatgtcaataataacaacaatagtaacggg 2520
atatacttaatctgaattttacgaatctttatacagttattattgttattatcattgccc
Q L G G S Q N N I G G S Q T N S Q N H Y
2521 tagttaggaggaagctagaataatattgggtggaagttaaacaaactcttaaaatcattac 2580
atcaatcctccttcgatcttattataaccacctcaatttgggttgagaatttttagtaagt

Q A A Q Q Y L Q Q H M Q Q Q Q Q Q Q V
 2581 taagctgcatagtaatatctctaacaacacatgtaatagcaatagtaataacaacaagtt 2640
 attcgacgtatcattatagagattggttggtacattatcgttatcattattggtgttcaa

Q Q P Q T K Y G V T Y H H G H S Q S S G
 2641 taataaccatagactaaatatggagttacttaccaccatggacattcacaagttctgga 2700
 attattggtatctgatttatacctcaatgaatggtggtacctgtaagtgtttcaagacct

S S N T F A Q Y Q Q H Y Q Q Q Q Q R T T
 2701 tcaagtaacacctttgcctagtattagcaacattaccaataatagcaacaagaacaaca 2760
 agttcattgtggaaacggatcataatcgttgtaatggttattatcgttggtttctgtgtt

G V T A N H Q R Q P S N N A Q K V R K V
 2761 ggagtaactgctaatacactagagatagccttcaataatgctcaaaaa **GTTGCAAGTA** 2820
 cctcattgacgattagtgatctctatcggaagtttattacgagtttttcaagcgtttcat


E Q K M Q
 2821 **GAATAAAAAATGTGA** 2835
 cttattttttacact

Ek-2 *T.thermophila* SB210 cDNA'sından Geri-PZR ile Elde Edilen MAPK Seti Genleri ve Kontrol Geni 17s rRNA İçin BLAST Analizi Sonuçları

Geçici Gen İsmi: 3mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00689900

NCBI Erişim Numarası: XP_001026993

>[ref|XM_001026993.1|](#)  Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00689900) partial mRNA
Length=2388

GENE ID: 4517911 TTHERM_00689900 | Protein kinase domain containing protein [Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 198 bits (107), Expect = 3e-48
Identities = 116/120 (96%), Gaps = 2/120 (1%)
Strand=Plus/Plus


```
Query 1 GAAGTAAAACCTCAAACAACAACCAAATAGCCGACACCGAAGATCCCTATTTTAACTCAA 60
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 661 GAAGTAAAACCTCAAACAACAACCAAATAG-CGACACCGAAGATCCCTATTTTAACTCTAT 719

Query 61 ATTCATATTCTAGAATAGGTTTGATGTTCCCAAGAAATATTAGCCTTCTTGTCCTATAG 120
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 720 ATTCATATTCTAGAATAGGTTTGATGTTCCCAAGAAATATTAGC-TTCTTGTCCTATAG 778
```

Geçici Gen İsmi: 4mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00492370

NCBI Erişim Numarası: XP_001023129

>[ref|XM_001023129.1|](#)  Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00492370) partial mRNA
Length=9132

GENE ID: 4514047 TTHERM_00492370 | Protein kinase domain containing protein [Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 643 bits (348), Expect = 0.0
Identities = 375/387 (96%), Gaps = 6/387 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 GAC-TATCTAGTTGTTTATGATCACTATTAGATCGTTAAAAAGAATAGGAGATGGAGCCTA 59
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7053 GACATATTTAGTTGTTTATGATCACTATTAGATCGTTAAAAAGAATAGGAGATGGAGCCTA 7112

Query 60 TGGTGTAGTATTTAAAGCAATTGATAAGTCTAAGAATAATGAAATCGTAGCTATTAAGAA 119
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7113 TGGTGTAGTATTTAAAGCAATTGATAAGTCTAAGAATAATGAAATCGTAGCTATTAAGAA 7172

Query 120 AGTTTCTGATGCATTTTTAGACCCAAGAGATGCCAAAAAGAATTTTAAGAGAAATAAAGTT 179
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7173 AGTTTCTGATGCATTTTTAGACCCAAGAGATGCCAAAAAGAATTTTAAGAGAAATAAAGTT 7232

Query 180 ATTAAAAATTTTGTAATCATCCTAACATCATCAAGCTAAAGGATATCATTAAAGCCAGAAAT 239
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7233 ATTAAAAATTTTGTAATCATCCTAACATCATCAAGCTAAAGGATATCATTAAAGCCAGAAAT 7292

Query 240 GCCAACAGGTTACAAGGATATTTATCTAGTTTTAGAAATATATGGAAATTTGATTTAGATAA 299
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7293 GCCAACAGGTTACAAGGATATTTATCTAGTTTTAGAAATATATGGAAATTTGATTTAGATAA 7352

Query 300 AACTATAAACCCGAGAGCTTTGCCCTTATCGCCAAAAATAATAGTAGAACCTGATGTGG 359
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7353 AACTATAAACT-CAGAGCAA-GCC-TTATCGCC-AAAAATAATAA-AGAACTTGATGTGG 7407

Query 360 CAATTATTGAATGGTATATTTTACATG 386
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7408 CAATTATTGAATGGTATATTTTACATG 7434
```

Geçici Gen İsmi: 5mapk

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00195990

NCBI Erişim Numarası: XP_001017253

> [ref|XM_001017253.1|](#) **G** Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00195990) partial mRNA
Length=1827

GENE ID: 4507943 TTHERM_00195990 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (**10 or fewer PubMed links**)

Score = 135 bits (73), Expect = 2e-29
Identities = 79/82 (96%), Gaps = 0/82 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GTTCTGAGAGTCGCCACTCTCATCACTAAAGCGAAAAATGTCAACATATCTGCTACAAAACA 60
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 176  GTTCTTAGAGTCGCCACTCTCATCACTAAAGCGAAAAATGTAAACATTCTGCTACAAAACA 235

Query 61   ATACCAATAACATGCAATCTTA 82
          ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 236  ATACCAATAACATGCAATCTTA 257
```

Geçici Gen İsmi: Erk7a

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00355550

NCBI Erişim Numarası: XP_001010453

> [ref|XM_001010453.1|](#) **UG** Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00355550) partial mRNA
Length=1881

GENE ID: 4500891 TTHERM_00355550 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (**10 or fewer PubMed links**)

Score = 322 bits (174), Expect = 4e-85
Identities = 194/203 (95%), Gaps = 3/203 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   TACGTTATGTATTAGATTTTAAAAGCACTTAAATATATGCATTTCAGGCGATTAAATTCAC 60
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 61   TACGTTATGTATTAGATTTTAAAAGCACTTAAATATATGCATTTCAGGCGATTAAATTCAC 120

Query 61   CGTGACTTAAAACCAATCCAAatttttttttAATGGTGAATGCCAGCGTTAAACTTGCTG 120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 121  CGTGACTTAAAACCAAT-CCAATATTCTTTTAAATAGTGAATGCCA-CGTTAAACTTGCTG 178


Query 121  ATTTCCCGTTTAGCTCGTTCGGTAGCCTAAAAACAAGATGATGCTCCACCTGTTTTAACT 180
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 179  ATTTTCG-GTTTAGCTCGTTCGGTAGCCTAAAAAGAAGATGATGCTCCACCTGTTTTAACT 237

Query 181  GAATACGTAGCTACTCGTTGGTA 203
          ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 238  GAATACGTAGCTACTCGTTGGTA 260
```

Geçici Gen İsmi: Erk7c

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00537240

NCBI Erişim Numarası: XP_001023534

>[ref|XM_001023534.1](#)  Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00537240) partial mRNA
Length=3360

GENE ID: 4514280 TTHERM 00537240 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 568 bits (307), Expect = 1e-158
Identities = 383/416 (92%), Gaps = 22/416 (5%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 41 GTATAA...TATCGCTACTATAGAAATAGCTACATACCTATATAGTTATGTGATTAGTCAT 100
|||||
Sbjct 1038 GTATAA...TAT--CT-CTATA-AAAT--CT-CATA-CTATAT--TT-T-TTATTA-TCAT 992

Query 101 ACTAGAGCGGAATTTGAAATGATTCTTCCACAAACAGGACTCATACTAGGATTATGGA 160
|||
Sbjct 991 -CTA-A-CGGAATTT-AAATGATTCTTCCACAAACAGG-CTCAT-CATTAGGATTATGGA 938

Query 161 ATTACCTAACGTATGGATGACTTAAAGCCTATTCTGCAGTTATACGCCTTTTGGATTAA 220
|||||
Sbjct 937 ATTACCTAACGTATGGATGACTTAAAGCCTATTCTGCAGTTATACGCCTTTTGGATTAA 878

Query 221 ACTAAAGTAAATTTTATAATAGATCTAAAGCATCATCACTGGCCATTGGTATCATTTACT 280
|||||
Sbjct 877 ACTAAAGTAAATTTTATAATAGATCTAAAGCATCATCACTGGCCATTGGTATCATTTACT 818

Query 281 GGAGAGTCC-GGTATAT-AAGTAGGATTATTT-ATACAGCTTCTAGCATAGTTATTGCTA 337
|||||
Sbjct 817 GGAGAGTTTTGGTATTTTAAAGTTGGATTATTTTATACAGCTTCTAGCATAGTTATTGCTA 758


Query 338 AATCGCTCTAAATAGCTTCAATATCTTCGTACGTTGGTTTACCAGTACCTCATAATATGA 397
|||||
Sbjct 757 AATCGCTCTAAATAGCTTCAATATCTTCGTACGTTGGTTTACCAGTAACTTATAATATTA 698

Query 398 ATCCAAGTTAATTGAGAGTGCTTGTTCCTGCAAAGATAGGCTTTTNTAATAAAAAGC 453
||
Sbjct 697 ATCCAAGTTAATTGAGAGTGCTTGTTCCTGCAAAGATAGGCTTTTCTAATAAAAAGC 642
```

Gen İsmi: MPK1

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00469230

NCBI Erişim Numarası: AY426249

>[ref|XM_001025119.2](#)  Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00469230) partial mRNA
Length=1765

GENE ID: 4515950 TTHERM 00469230 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 494 bits (267), Expect = 1e-136
Identities = 296/308 (96%), Gaps = 10/308 (3%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 ACTC-CACTCA-GTTCCTCATCA-GGT-ATGAAGT-CITCGAAGTAAGGATGTTTCGATGC 55
|||||
Sbjct 1087 ACTC-CACTCAGGTTCTTCATCAGGGTAATGAAGTCCCTTCGAAGTAAGGATGTTTCGATGC 1028

Query 56 -TTCITTAACAGTATAGCG-TTITCTGGATTGAAAGTGAGCA-TTTACTTAAAA-GTCAA 111
|||||
Sbjct 1027 ATTCTTTAACAGTATAGCGTTTTCTGGATTGAAAGTGAGCATTTTACTTAAAAGGTCAA 968

Query 112 GAGCTAGTGGATTTGCTTTCGGATAAAGACTCTACCATGATTATTTAGTTCTTTTGGTT 171
|||||
Sbjct 967 GAGCTAGTGGATTTGCTTTCGGATAAAGACTCTACCATGATTATTTAGTTCTTTTGGTT 908

Query 172 GAGATTTTATATATTTAATAGCATCTTAATTGCCAATATAAGCCATATCTTCTTGAGTAG 231
|||||
Sbjct 907 GAGATTTTATATATTTAATAGCATCTTAATTGCCAATATAAGCCATATCTTCTTGAGTAG 848

Query 232 GGGTTCCTAAAAGTCTATGACACGCTAAAAGTAACTTAACTTATATATTTTCTCCTGGAAAA 291
|||||
Sbjct 847 GGGTTCCTAAAAGTCTATGACACGCTAAAAGTAACTTAACTTATAGATAATTTTCTCCTGGAAAA 788
```

Geçici Gen İsmi: MPK2

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00760190

NCBI Erişim Numarası: AY426250

>[ref|XM_001031635.2|](#) **UG** Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00760190) partial mRNA
Length=1652

GENE ID: 4522672 TTHERM_00760190 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 398 bits (215), Expect = 7e-108
Identities = 227/232 (97%), Gaps = 4/232 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   ACAAACCATATGAAAACAAGAAATCAAATATCTAGAGTTTAAAATGTATTGAGTGCCTCT 60
          |||
Sbjct 129  ACAAACCATATGAAAACAAGAAATCAAATAT-TAGAGTTTAAAATGTATTGAGTGCCTCT 187

Query 61   AAATTTGAAATGGACGATAATTATAGTATCATAGACTCAATTGGTCAGGGAGCGTGTATG 120
          |||
Sbjct 188   AAATTTGAAATGGACGATAATTATAGTATCATAGACTCAATTGGTCAGGGAGC-T-TATG 245

Query 121  GTATTGTTGTAGCAGACTAGAGACTTGAATTGTTAGGACGAAGAGAATAATTTGGTAGCA 180
          |||
Sbjct 246  GTATTGTTGTAGCAG-CTAGAGACTTGAATTGTTAGGACGAAGAGAATAATTTGGTAGCA 304

Query 181  ATCaaaaaaaaTAGAAAAAGCATTGAAACATAAAAATATTTACAAGAAGAACAT 232
          |||
Sbjct 305  ATCAAAAAAAAAATAGAAAAAGCATTGAAACATAAAAATATTTACAAGAAGAACAT 356
```

Gen İsmi: MPK3

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00660130

NCBI Erişim Numarası: AY426251

>[ref|XM_001020076.2|](#) **UG** Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00660130) partial mRNA
Length=1676

GENE ID: 4510833 TTHERM_00660130 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 165 bits (89), Expect = 3e-38
Identities = 98/102 (96%), Gaps = 1/102 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GATAAGTCATTACGCTCAGGAGCATATGGCCAAGTAGTGAGAGCCAAAGATAAGAACAAA 60
          |||
Sbjct 194  GATAAGTTATTAGGCTCAGGAGCATATGGCCAAGTAGTGAGAGCCAAAGATAAGAA-AAA 252

Query 61  TCAGAAATCAGTATGTAGCAATAAAGAAAATTACACAAAATCGA 102
          |||
Sbjct 253  TTAGAAATCAGTATGTAGCAATAAAGAAAATTACACAAAATCGA 294
```

Geçici Gen İsmi: TIGR-MPK4

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00575520

NCBI Erişim Numarası: XP_001009345

>[\[ref|XM_001009345.1\]](#) **UG** Tetrahymena thermophila SB210 Protein kinase domain containing protein (TTHERM_00575520) partial mRNA
Length=2835

GENE ID: 4499883 TTHERM_00575520 | Protein kinase domain containing protein
[Tetrahymena thermophila SB210] (10 or fewer PubMed links)

Score = 501 bits (271), Expect = 6e-139
Identities = 271/271 (100%), Gaps = 0/271 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CCAACAAATACCTTCCTCTTCTTAATCTACTTAAATCATCTGTGACTCAATAGTAATAGCA 60
|||||
Sbjct 1632 CCAACAAATACCTTCCTCTTCTTAATCTACTTAAATCATCTGTGACTCAATAGTAATAGCA 1691

Query 61 ATAATAGCAGTAAGAAAAAGCAAGAACCAATATCAAAGCAGCTCCTCTCAATAGTAGTA 120
|||||
Sbjct 1692 ATAATAGCAGTAAGAAAAAGCAAGAACCAATATCAAAGCAGCTCCTCTCAATAGTAGTA 1751

Query 121 AGCTTAACAGTACCAATAGTAGCAATCCCTTTAATAACAATAGGTACCTTAGCGCCAATC 180
|||||
Sbjct 1752 AGCTTAACAGTACCAATAGTAGCAATCCCTTTAATAACAATAGGTACCTTAGCGCCAATC 1811
```

Gen İsmi: MPK4

TGD Erişim Numarası: TTHERM_00575520

NCBI Erişim Numarası: AY560586

>[\[gb|AY560586.1\]](#) Tetrahymena thermophila mitogen activated protein kinase 4 gene,
complete cds; macronuclear
Length=1899

Score = 176 bits (95), Expect = 1e-41
Identities = 95/95 (100%), Gaps = 0/95 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 4 ACAATACCTTCCTCTTCTTAATCTACTTAAATCATCTGTGACTCAATAGTAATAGCAATA 63
|||||
Sbjct 1553 ACAATACCTTCCTCTTCTTAATCTACTTAAATCATCTGTGACTCAATAGTAATAGCAATA 1612

Query 64 ATAGCAGTAAGAAAAAGCAAGAACCAATATCAAA 98
|||||
Sbjct 1613 ATAGCAGTAAGAAAAAGCAAGAACCAATATCAAA 1647
```

Gen İsmi: 17s rRNA

NCBI Erişim Numarası: M10932

```
>gb|M10932.1|TETRGSA T.thermophila 17S rRNA gene, complete cds
Length=2301

Score = 785 bits (425), Expect = 0.0
Identities = 432/435 (99%), Gaps = 2/435 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 45 GCTGTCGCA-TCCAGAAAAGTTCCACCAGACCATTTCGTTACTAC-AGCGACGGGCGGTGTGT 102
          |||
Sbjct 1825 GCTGTCGCAAGTCCAGAAGGTTCCACCAGACCATTTCGTTACTACAAGCGACGGGCGGTGTGT 1766

Query 103 ACAAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCACCTACTAGAAATTCCTCG 162
          |||
Sbjct 1765 ACAAACGGCAGGGACATAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCACCTACTAGAAATTCCTCG 1706

Query 163 TTCAAGATCCACAATTCCAAAGAACTATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCC 222
          |||
Sbjct 1705 TTCAAGATCCACAATTCCAAAGAACTATCCCTAACACGACTGGTATTAATAAGATTACCC 1646

Query 223 GTACCTTCCCAGGACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGGGCCGA 282
          |||
Sbjct 1645 GTACCTTCCCAGGACAGGAAATACTTTTTGCGCCAGTCATTGTAACGCGCGTGGGCCGA 1586

Query 283 GCACGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAACTTCCATTGGCTTATTGCACA 342
          |||
Sbjct 1585 GCACGTCTAGGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTTAAACTTCCATTGGCTTATTGCACA 1526

Query 343 ATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGT 402
          |||
Sbjct 1525 ATAGTCCCTCTAAGAAGTACAACCTGTTATTTACAAGCAGACTAGTTAGCAGGTTAAGGT 1466

Query 403 CTCGTTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCAC 462
          |||
Sbjct 1465 CTCGTTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCAC 1406
```

Ek.3 Tezde Kullanılan MAPK Ailesi Üyeleri Kısaltmaları, Erişim Numaraları ve Dikey Hizalamaları

SEK-1 (Ce) :

gi|25146880|ref|NP_509322.2| SAPK/ERK kinase family member (sek-1)
[Caenorhabditis elegans]

JNK2a1 (Hs) :

gi|21237739|ref|NP_620707.1| mitogen-activated protein kinase 9 isoform
JNK2 alpha1 [Homo sapiens]

JNK2a1 (Gg) :

gi|1816448|dbj|BAA19188.1| c-JUN amino-terminal kinase-2 alpha1 [Gallus
gallus]

JNK2b1 (Hs) :gi|1463133|gb|AAC50608.1| JNK2 beta1 protein kinase, [Homo
sapiens]

JNK2b2 (Hs) :

gi|1463135|gb|AAC50609.1| JNK2 beta2 protein kinase

SAPK (Cc) :

gi|27151624|sp|Q90327.1|MK08A_CYPKA Mitogen-activated protein kinase
8A(Stress-activated protein kinase JNKa) (c-Jun N-terminal kinase A)

JNK3a1 (Hs) :

gi|1463127|gb|AAC50605.1| JNK3 alpha1 protein kinase

JNK3a2 (Hs) :

gi|1463125|gb|AAC50604.1| JNK3 alpha2 protein kinase

SAPKb (Rn) :

sp|P49187|MK10_RAT Mitogen-activated protein kinase 10 OS=Rattus norvegicus
GN=Mapk10 PE=2 SV=2

JNK1a2 (Hs) :

gi|1463131|gb|AAC50607.1| JNK1 alpha2 protein kinase

SAPKg (Rn)

sp|P49185|MK08_RAT Mitogen-activated protein kinase 8 OS=Rattus norvegicus
GN=Mapk8 PE=1 SV=1

JNK1b1 (Hs) :

gi|1463137|gb|AAC50610.1| JNK1 beta1 protein kinase

JNK1b2 (Hs) :

gi|1463139|gb|AAC50611.1| JNK1 beta2 protein kinase

SAPKa (Dm) :

gi|1656058|gb|AAC47325.1| Jun-N-terminal kinase [Drosophila melanogaster]

SAPKb (Dm) :

gi|1857041|gb|AAB97094.1| JNK protein kinase [Drosophila melanogaster]

p38 (Ce) :

Caenorhabditis elegans cosmid B0218, complete sequence. WP:CE06686

p38 (Cc) :

gi|1199747|dbj|BAA11881.1| mitogen-activated protein kinase (p38) [Cyprinus
carpio]

MPK2 (Xl) :

gi|147905033:1-361 Mitogen-activated protein kinase 2 [Xenopus laevis]

Mxi2 (Hs) :

gi|1136798|gb|AAC50329.1| Mxi2

p38 (Cf) :

gi|2196780|gb|AAC36131.1| p38 mitogen activated protein kinase [Canis
familiaris]

p38 (Mm) :

gi|531125|gb|AAA20888.1| MAP kinase [Mus musculus]

p38 (Rn) :

gi|1621647|gb|AAC71059.1| p38 mitogen activated protein kinase [Rattus
norvegicus]

CSBP1 (Hs) :

pir||S52419:1-360 protein kinase (EC 2.7.1.-) CSBP1 - human

p38b (Mm) :
 p38b Mus musculus D83073 (DDBJ)
p38b_(Hs) : gi|1469306|gb|AAB05036.1| p38B MAP kinase
p38b2_(Hs) :
 gi|2072361|gb|AAC51250.1| p38Beta2 MAP Kinase [Homo sapiens]
ERK6_(Hs) :
 gi|48255970:1-367 mitogen-activated protein kinase 12 [Homo sapiens]
p38g_(Hs) :
 gi|1772646|gb|AAB40118.1| p38gamma MAP Kinase [Homo sapiens]
SAPK3_(Mm) :
 gi|2181950|emb|CAA73850.1| stress-activated protein kinase-3 [Mus musculus]
SAPK3_(Rn) :
 gi|1262403|emb|CAA65342.1| SAP kinase-3 [Rattus norvegicus]
SAPK*(Ce) :
 gi|71981436:1-372 Jun N-terminal Kinase family member(jnk-1) [Caenorhabditis elegans]
STY1_(Sp) : gi|897810|emb|CAA61537.1| MAP kinase [Schizosaccharomyces pombe]
HOG1_(Ca) : sp|Q92207|HOG1_CANAL Mitogen-activated protein kinase HOG1
 OS=Candida albicans GN=HOG1 PE=1 SV=2
HOG1_(Sc) : gi|295611|gb|AAA34680.1| HOG1 protein, [Saccharomyces cerevisiae]
HOG1p_(Sc) : gi|1256876|gb|AAB67558.1| Hog1p: Mitogen-activated and osmosensing protein kinase
MAPK_(As) : tr|Q43379|Q43379_AVESA MAP KINASE OS=Avena sativa GN=Asmap1 PE=2 SV=1
MAPK6_(At) :
 gi|457404|dbj|BAA04869.1| MAP kinase [Arabidopsis thaliana]
NFT4_(Nt) : gi|634070|emb|CAA58761.1| p45Nft4 serine/threonine protein kinase [Nicotiana tabacum]
MAPK_(Ps) : MAPK(Ps): gi|20808|emb|CAA50036.1| MAP kinase homologue [Pisum sativum]
MSK7_(Ms) :
 MSK7_(Ms) gi|298019|emb|CAA47099.1| MAP Kinase [Medicago sativa]
MMK4_(Ms) :
 MMK4_(Ms) gi|1667373|emb|CAA57721.1| protein kinase [Medicago sativa]
WIPK_(Nt) :
 WIPK_(Nt) gi|1136298|dbj|BAA09600.1| WIPK [Nicotiana tabacum]
NFT6_(Nt) :
 gi|634068|emb|CAA58760.1| p43Nft6 serine/threonine protein kinase [Nicotiana tabacum]
MAPK5_(At) :
 gi|457402|dbj|BAA04868.1| MAP kinase [Arabidopsis thaliana]
MAPK4_(At) :
 gi|457400|dbj|BAA04867.1| MAP kinase [Arabidopsis thaliana]
MMK2_(Ms) :
 gi|1204129|emb|CAA57719.1| protein kinase [Medicago sativa]
MAPK7_(At) :
 gi|457406|dbj|BAA04870.1| MAP kinase [Arabidopsis thaliana]
NFT3_(Nt) :
 gi|406751|emb|CAA49592.1| NTF3, gi|406751|emb|CAA49592.1| NTF3 [Nicotiana tabacum]
MAPK1_(Ph) :
 gi|603871|emb|CAA58466.1| MAP/ERK kinase 1 [Petunia x hybrida]
MAPK1_(At) :
 gi|533280|dbj|BAA03535.1| ATMPK1 [Arabidopsis thaliana]
MAPK2_(At) :
 gi|533281|dbj|BAA03536.1| ATMPK2 [Arabidopsis thaliana]

ERKa_(Dd) :
 gi|537288|gb|AAA59387.1| extracellular signal-regulated protein kinase
FUS3_(Sc) :

gi|171533|gb|AAA34613.1| FUS3 protein

SPK1 (Sp) :
gi|5092|emb|CAA40610.1| protein kinase [Schizosaccharomyces pombe]

KSS1 (Sc) :
gi|6321477|ref|NP_011554.1| Mitogen-activated protein kinase (MAPK) involved in signal transduction pathways that control filamentous growth and pheromone response; the KSS1 gene is nonfunctional in S288C strains and functional in W303 strains; Ksslp [Saccharomyces cerevisiae]

MAPK (Ca) :
gi|7547261|gb|AAA34343.2| protein kinase [Candida albicans]

MAPK (Fs) :
gi|1279911|gb|AAB72017.1| mitogen-activated protein kinase [Nectria haematococca]

PMK1 (Mg) :
gi|4321114|gb|AAC49521.2| pathogenicity MAP kinase 1; Pmk1; MAP kinase homolog [Magnaporthe grisea]

ERKa (Dm) :
sp|P40417|ERKA_DROME Mitogen-activated protein kinase ERK-A OS=Drosophila melanogaster GN=rl PE=1 SV=2

MAPK (Ac) :
gi|1110512:1-351 MAP kinase

ERK2 (Xl) :
sp|P26696|MK01_XENLA Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Xenopus laevis GN=mapk1 PE=1 SV=3

ERK2 (Rn) :
sp|P63086|MK01_RAT Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Mapk1 PE=1 SV=3

ERK2 (Bt) :
ERK2_(Bt) gi|337:1-360 extracellular signal-regulated kinase (ERK2) [Bos taurus]

ERK2 (Hs) :
sp|P28482|MK01_HUMAN Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=MAPK1 PE=1 SV=3

ERK1 (Hs) :
ERK1_(Hs) sp|P28482|MK01_HUMAN Mitogen-activated protein kinase 1 OS=Homo sapiens GN=MAPK1 PE=1 SV=3

ERK1 (Rn) :
gi|8393331|ref|NP_059043.1| mitogen activated protein kinase 3 [Rattus norvegicus]

ERK1 (Mm) :
sp|Q63844|MK03_MOUSE Mitogen-activated protein kinase 3 OS=Mus musculus GN=Mapk3 PE=1 SV=5

SUR1 (Ce) :
sp|P39745|SUR1_CAEEL Mitogen-activated protein kinase mpk-1 OS=Caenorhabditis elegans GN=mpk-1 PE=1 SV=2

MPK1 (Ce) :
gi|71985935|ref|NP_001022583.1| MAP Kinase family member (mpk-1) [Caenorhabditis elegans]

BMKb (Hs) :
gi|837261|gb|AAA81381.1| ERK5

BMKa (Hs) :
gi|973309:1-816 BMK1 beta kinase

BMKg (Hs) :
gi|973307|gb|AAA82931.1| BMK1 alpha kinase

SMK1 (Sc) :
gi|973311|gb|AAA82933.1| BMK1 gamma kinase

SLT2 (Sc) :gi|6325311:1-388 Middle sporulation-specific mitogen-activated protein kinase (MAPK) required for production of the outer spore wall layers; negatively regulates activity of the glucan synthase subunit Gsc2p; Smk1p [Saccharomyces cerevisiae]

MKC1_(Ca) :

gi|619450|emb|CAA54129.1| MAP kinase Mkc1 [Candida albicans]

MAPK3_(Hs) :

sp|P31152|MK04_HUMAN Mitogen-activated protein kinase 4 OS=Homo sapiens
GN=MAPK4 PE=2 SV=1

MAPK3_(Rn) :

sp|P27704|MK06_RAT Mitogen-activated protein kinase 6 OS=Rattus norvegicus
GN=Mapk6 PE=2 SV=2

p97_(Hs) :

gi|763113|emb|CAA56709.1| p97mapk [Homo sapiens]
2mpk_(Tth)

Nt_MAPK:

gi|78096654|dbj|BAE46985.1| mitogen-activated protein kinase [Nicotiana
tabacum]

St_MAPK:

gi|21165529|dbj|BAB93532.1| mitogen-activated protein kinase [Solanum
tuberosum]

Tg_MAPK1:

gi|51094326|gb|AAT95334.1| mitogen-activated protein kinase 1 [Toxoplasma
gondii]

Ch_MAPK:

gi|67599463|ref|XP_666288.1| MAPK [Cryptosporidium hominis TU502]

Lm_MAPK4:

gi|157868358|ref|XP_001682732.1| map kinase; mitogen-activated protein
kinase [Leishmania major]

Tb_MAPK4

gi|71749466|ref|XP_828072.1| mitogen-activated protein kinase [Trypanosoma
brucei TREU927]

Ch_MAPK1:

gi|67594677|ref|XP_665828.1| mitogen-activated protein kinase 1,
serine/threonine protein kinase [Cryptosporidium hominis TU50]

Tg_MAPK2:

gi|71897470|gb|AAZ52559.1| mitogen-activated protein kinase 2 [Toxoplasma
gondii]

Ta_MAPK:

gi|84998766|ref|XP_954104.1| protein kinase, putative [Theileria annulata
strain Ankara]

Lm_MAPK2:

gi|157876596|ref|XP_001686644.1| mitogen-activated protein kinase,
putative; protein kinase, putative [Leishmania major]

Tb_MAPK2:

gi|71747410|ref|XP_822760.1| protein kinase [Trypanosoma brucei TREU927]

Tg_MAPK3:

gi|95007294|emb|CAJ20514.1| mitogen-activated protein kinase, putative
[Toxoplasma gondii RH]

Ch_MAPK2:

gi|67603708|ref|XP_666571.1| mitogen-activated protein kinase 2
[Cryptosporidium hominis TU502]

Pf_MAPK2:

gi|124803797|ref|XP_001347818.1| mitogen-activated protein kinase 2
[Plasmodium falciparum 3D7]

Ta_MAPK2:

gi|84999310|ref|XP_954376.1| Map2 kinase, putative [Theileria annulata
strain Ankara]

Tp_MAPK2:

gi|71032489|ref|XP_765886.1| mitogen-activated protein kinase 2 [Theileria
parva strain Muguga]

Bb_MAPK :

gi|156086144|ref|XP_001610481.1| mitogen-activated protein kinase, putative
[Babesia bovis T2Bo]

Pv_MAPK2:

gi|156098454|ref|XP_001615259.1| mitogen-activated protein kinase 2,
putative [Plasmodium vivax SaI-1]

G1_ERK2:

gi|159109796|ref|XP_001705161.1| Kinase, CMGC MAPK [Giardia lamblia ATCC
50803]

Li_MAPK:

gi|146103309|ref|XP_001469531.1| mitogen-activated protein kinase; protein
kinase [Leishmania infantum]

Bb_MAPKp:

gi|156087124|ref|XP_001610969.1| mitogen activated protein kinase, putative
[Babesia bovis T2Bo]

Pc_MAPK4:

gi|25052804|gb|AAN65180.1| mitogen-activated protein kinase 4 [Petroselinum
crispum]

Pt_ERK2:

GSPATT00002839001, hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt_ERK3:

GSPATT00001183001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt_ERK4:

GSPATT00004681001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt_ERK5:

GSPATT00020357001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt_ERK6:

GSPATT00006379001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt_ERK7:

GSPATT00009693001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK2:

GSPATT00032619001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK1:

GSPATT00022240001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK3:

GSPATT00035162001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK4:

GSPATT00032029001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK5:

GSPATT00004298001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK6:

GSPATT00001369001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK7:

GSPATT00019885001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK8:

GSPATT00020292001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK9:

GSPATT00035055001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK10:

GSPATT00004874001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK11:

GSPATT00021275001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK12:

GSPATT00003200001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK13:

GSPATT00002670001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK14:

GSPATT00028307001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK15:

GSPATT00036133001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK16:

GSPATT00037398001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK17:

GSPATT00038217001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK18:

GSPATT00006852001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK19:

GSPATT00002593001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK20:

GSPATT00002396001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK21:

GSPATT00001463001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK22:

GSPATT00020006001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK23:

GSPATT00023531001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Pt MPK24:

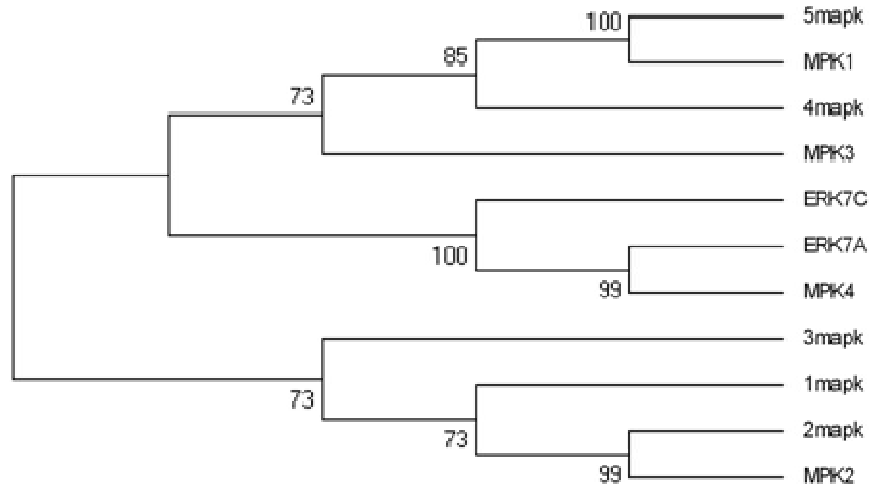
GSPATT00009411001 hypothetical mitogen-activated protein kinase
[Paramecium tetraurelia strain]

Ek-4

1.*T.thermophila* ve *P.tetraurelia*'ya ait MAPK dizilerinin Benzerlik Matrisleri ve Kendi İçlerinde Oluşturdukları Filogenetik Ağaçlar

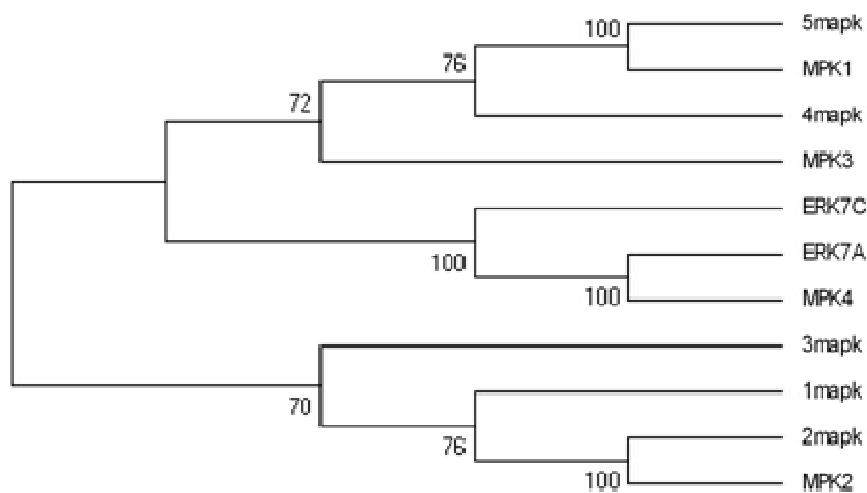
T.thermophila MAPK'lerinin Bütünsel Dizlerine ait Benzerlik Matrisi ve Filogenetik Ağacı

Seq->	1mapk	2mapk	MPK2	MPK3	3mapk	4mapk	5mapk	MPK1	ERK7A	ERK7C	MPK4
1mapk	ID	0,324	0,365	0,225	0,159	0,039	0,187	0,258	0,261	0,116	0,123
2mapk	0,324	ID	0,394	0,242	0,181	0,047	0,198	0,255	0,238	0,128	0,124
MPK2	0,365	0,394	ID	0,278	0,190	0,043	0,239	0,336	0,303	0,114	0,127
MPK3	0,225	0,242	0,278	ID	0,159	0,044	0,188	0,280	0,251	0,103	0,114
3mapk	0,159	0,181	0,190	0,159	ID	0,078	0,185	0,196	0,164	0,121	0,148
4mapk	0,039	0,047	0,043	0,044	0,078	ID	0,069	0,056	0,042	0,045	0,056
5mapk	0,187	0,198	0,239	0,188	0,185	0,069	ID	0,406	0,202	0,102	0,132
MPK1	0,258	0,255	0,336	0,280	0,196	0,056	0,406	ID	0,323	0,115	0,153
ERK7A	0,261	0,238	0,303	0,251	0,164	0,042	0,202	0,323	ID	0,166	0,243
ERK7C	0,116	0,128	0,114	0,103	0,121	0,045	0,102	0,115	0,166	ID	0,257
MPK4	0,123	0,124	0,127	0,114	0,148	0,056	0,132	0,153	0,243	0,257	ID

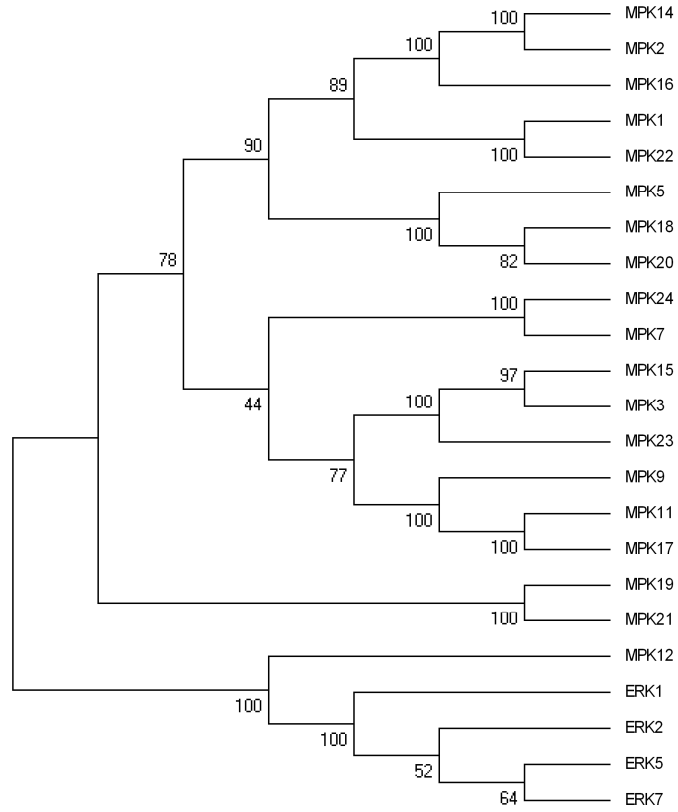


2. *T.thermophila* MAPK'lerinin Katalitik Bölgelerine Ait Benzerlik Matrisi ve Filogenetik Ağaç

Seq->	ERK7A	ERK7C	MPK4	MPK3	1mapk	2mapk	MPK2	3mapk	4mapk	5mapk	MPK1
ERK7A	ID	0,622	0,795	0,330	0,376	0,437	0,385	0,426	0,419	0,409	0,432
ERK7C	0,622	ID	0,625	0,314	0,372	0,398	0,386	0,414	0,352	0,410	0,410
MPK4	0,795	0,625	ID	0,314	0,363	0,414	0,381	0,413	0,405	0,412	0,453
MPK3	0,330	0,314	0,314	ID	0,292	0,355	0,331	0,343	0,337	0,357	0,376
1mapk	0,376	0,372	0,363	0,292	ID	0,476	0,438	0,400	0,350	0,385	0,382
2mapk	0,437	0,398	0,414	0,355	0,476	ID	0,624	0,526	0,411	0,503	0,494
MPK2	0,385	0,386	0,381	0,331	0,438	0,624	ID	0,461	0,367	0,457	0,451
3mapk	0,426	0,414	0,413	0,343	0,400	0,526	0,461	ID	0,398	0,458	0,475
4mapk	0,419	0,352	0,405	0,337	0,350	0,411	0,367	0,398	ID	0,483	0,480
5mapk	0,409	0,410	0,412	0,357	0,385	0,503	0,457	0,458	0,483	ID	0,702
MPK1	0,432	0,410	0,453	0,376	0,382	0,494	0,451	0,475	0,480	0,702	ID



3. *P.tetraurelia* MAPK'lerinin Katalitik Bölgelerine Ait Benzerlik Matrisi ve Filogenetik Ağaç



Ek 5. Filogenetik analizlerde kullanılan MAPK ailesi üyelerine ait katalitik bölgelerin dikey hizalaması

Uyarı: Filogenetik ağaç oluşturulmadan önce hizalamayı oluşturan diziler manuel olarak kontrol edilmiş ve SEK1_Ce ve MAPK_Lm gibi uygun olmayan hizalama sergileyen diziler filogenetik analizlere dâhil edilmemiştir. Aşağıdaki hizalama ham veri olarak değerlendirilmelidir.

SLT2__Sc__	1	NGIYLYEELMECDMHQIIHYQSFTYQIILCGLKYIHSALHRDLKPGNLLVNCQLKICDFGL
MKC1__Ca__	1	NEIYLYEELMECDMHQIIHYQSFTYQVLCGLNFIHSALHRDLKPGNLLVNCQELKICDFGL
SMK1__Sc__	1	DGLYCYQELIDYDLAKVIHIKQYFLYQIILCGLKYIHSALHRDLKPGNLLCTGCLKICDFGL
MAPK__Ps__	1	NDVYIAYELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MSK7__Ms__	1	NDVYIAYELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
NFT4__Nt__	1	NDVYIAYELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MAPK6__At__	1	NDVYIAYELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MMK4__Ms__	1	NDVYITTELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLRYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKIIDFGL
WIPK__Nt__	1	SDVYIATELMDTDLHQIHCQYFMYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLVNCQDLKICDFGL
MAPK__As__	1	NDVYIATELMDTDLHIIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MAPK4__At__	1	NDVYIVYELMDTDLHQIHCRCFFLYQILRGLKYVHSALHRDLKPSNLLINCDLKIIGDFGL
MMK2__Ms__	1	NHVYIVSELMDTDLHQIHCRCYFVYQILRGLKYVHSALHRDLKPSNLLINCDLKIIGDFGL
MAPK5__At__	1	VDVYIVFELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKITDFGL
NFT6__Nt__	1	NDVYIVYELMDTDLHQIHCQYFLYQILRGLKYVHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
NFT3__Nt__	1	KDVYLVYELMDTDLHQIHCQYFLFQILRGLKYIHSALHRDLKPGNLLINCDLKICDFGL
MAPK1__Ph__	1	KDVYLVYELMDTDLHQIHCQYFLFQILRGLKYIHSALHRDLKPGNLLINCDLKICDFGL
MAPK1__At__	1	KDVYLVYELMDTDLHQIHCQYFLFQILRGLKYIHSALHRDLKPGNLLVNCQDLKICDFGL
MAPK2__At__	1	KDVYLVYELMDTDLHQIHCQYFLFQILRGLKYIHSALHRDLKPGNLLVNCQDLKICDFGL
MAPK7__At__	1	KDVYLVYELMDTDLHQIHCQYFLFQILRGLKYIHSALHRDLKPGNLLVNCQDLKICDFGL
ERKa__Dd__	1	EDVYIVSELMDTDLHQIHCQYFVYQMLRGLKHIHSALHRDLKPSNLLINCLLKICDILGL
3mpk__Tth__	1	EDIYIISQLMDTDLHQIHIHQFFTYQIILCGLKYIHSALHRDLKPGNLLVNCVVKICDFGL
2mpk__Tth__	1	DDIYCVSELMETDLQQIHCCKFFTYQILRGLKYIHSALHRDLKERNLLVNCQDLKICDFGL
MPK2__Tth__	1	EDIYVSELMETDLASIIHCQFFLYQILRGLKYIHSALHRDLKERNLLVNCQDLKICDFGL
MAPK__Fs__	1	NEVYLIQELMETDMHRAIHCQYFTYQTLRALKAMHSALHRDLKPSNLLINCDLKVCDDFGL
PMK1__Mg__	1	NEVYLIQELMETDMHRVHIHCQYFTYQTLRALKAMHSALHRDLKPSNLLINCDLKVCDDFGL
MAPK__Ca__	1	NEIYLIQELMETDLHRVHIHCQYFTYQTLRALKAMHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
SPK1__Sp__	1	EDVYIVQELMETDLYRVIHCQYFTYQTLRALKAMHSALHRDLKPSNLLINCDLKVADDFGL
KSS1__Sc__	1	NAVYLVEELMETDLQKVIHVQYFTYQTLRALKSIHSALHRDLKPSNLLINCDLKVCDDFGL
FUS3__Sc__	1	NEVYIIQELMETDLHRVHIHCQYFTYQTLRAVKVLEHGSIIHRDLKPSNLLINCDLKVCDDFGL
BMKa__Hs__	1	KSVYVVLDMESDLHQIHCQYFVYQILRGLKYMHSALHRDLKPSNLLVNCQELKIGDFGM
BMKg__Hs__	1	KSVYVVLDMESDLHQIHCQYFVYQILRGLKYMHSALHRDLKPSNLLVNCQELKIGDFGM
BMKb__Hs__	1	KSVYVVLDMESDLHQIHCQYFVYQILRGLKYMHSALHRDLKPSNLLVNCQELKIGDFGM
ERKa__Dm__	1	RDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MAPK__Ac__	1	KDVYIVQCLMETDMYKLLHVCYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK2__Hs__	1	KDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK1__Hs__	1	KDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK2__Bt__	1	KDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK2__Rn__	1	KDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK2__Xl__	1	KDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK1__Rn__	1	RDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
ERK1__Mm__	1	RDVYIVQCLMETDLYKLLHICQYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
SUR1__Ce__	1	KDIYIVQCLMETDLYKLLHVCYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
MPK1__Ce__	1	KDIYIVQCLMETDLYKLLHVCYFLYQILRGLKYIHSALHRDLKPSNLLINCDLKICDFGL
JNK2a1__Hs__	1	QDVYLVMEELMDANLQCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSALHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK2a1__Gg__	1	QDVYLVMEELMDANLQCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSALHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK2b1__Hs__	1	QDVYLVMEELMDANLQCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSALHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK2b2__Hs__	1	QDVYLVMEELMDANLQCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSALHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK3a2__Hs__	1	QDVYLVMEELMDANLQCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSALHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL

SAPKb_Rn	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLSAIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK3a1_Hs	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK1a2_Hs	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
SAPKg_Rn	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK1b1_Hs	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
JNK1b2_Hs	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
SAPK_Cc	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
SAPKa_Dm	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
SAPKb_Dm	1	QDVYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIKHLHSAIHRDLKPSNIVVKCTLKILDFGL
SAPK	1	NDLYLVMEELMDANLCQVIRMSYLLYQMLCGIRHLHSAIHRDLKPSNIVVRCTLKILDFGL
p38_Mm	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38_Rn	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38_Cf	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
CSBP1_Hs	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38b_Mm	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
Mxi2_Hs	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
MPK2_Xl	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38_Cc	1	NDVYLVTHLMGADLNNIVHVQFLIYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38b_Hs	1	SEVYLVTTLMGADLNNIVHVQFLVYQLRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELRIIDFGL
p38b2_Hs	1	SEVYLVTTLMGADLNNIVHVQFLVYQLRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELRIIDFGL
ERK6_Hs	1	TDFYLVMPFMGTDLGKLMRIQFLVYQMLKGLRYIHAAIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38g_Hs	1	TDFYLVMPFMGTDLGKLMRIQFLVYQMLKGLRYIHAAIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
SAPK3_Mm	1	TDFYLVMPFMGTDLGKLMRIQFLVYQMLKGLRYIHAAIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
SAPK3_Rn	1	TDFYLVMPFMGTDLGKLMRIQFLVYQMLKGLRYIHAAIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
p38_Ce	1	EDVYFVSMMLMGADLSNIIHQFLVYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIAVNCCELKILDFGL
HOG1_Sc	1	EDIYFVTELGQTDLHRLLFVQYFLYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
HOG1p_Sc	1	EDIYFVTELGQTDLHRLLFVQYFLYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
HOG1_Ca	1	EDIYFVTELGQTDLHRLLFVQYFQYFTYQILRGLKYIHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
STY1_Sp	1	EDIYFVTELLGTDLHRLLFIQYFLYQILRGLKFIHSAIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
ERK2_Pt	1	NDIYIITELMETDLHRVIHIQYFMYQTLRGLLYIHSAMHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
ERK3_Pt	1	NDIYIITELMETDLHRVIHIQYFMYQTLRGLLYIHSAMHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
ERK4_Pt	1	NDIYIVTELMETDLHRVIHIQYFMYQTLRGLLYIHSAMHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
5mpk_Tth	1	NDIYIVTELMETDLHRVIHIQYFMYQTLRGLLYIHSAMHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
ERK6_Pt	1	NDIYIVTEFMETDLHRVIHIQYFVYQILRGLLYMHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
ERK7_Pt	1	NDIYIVTEFMETDLHRVIHIQYFVYQILRGLLYMHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDLGL
ERK5_Pt	1	NDIYIITDLMGTDLHKVIHIQYFAYQMLRGLLYIHTAIHRDLKPSNIIINCDLKIICDLGL
MPK1_Tth	1	EDIYVVFEDLMETDLHRVIHIQYFVYQILRGLLYIHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
ERK1_Pt	1	KDIYIITDLMETDLHRVIHIQYFVYQALRGLLYIHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
4mpk_Tth	1	KDIYLVLEIMEIDLDKTIITIKNLMWQLLNGIFYMHSIHRDLKPSNIIINCDLKIICDFGL
1mpk_Tth	1	KNLYIVREFIDTDLHRVNIHQYFTYQILSALFELHSQYHTQLRISNIIINCDLKIISRF--
MAPK_Ch	1	EDIYIVTQLMETDLHRVIHIQYFMYQILRGLSYLHKVIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK4_Lm	1	EDIYLVMDLYDLDLNRITIHLYQYFMIAFRGLHYLHSAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK4_Tb	1	SDIYIVMDLYDLDLHRIIHYQYLMIAFRGLFYLHTAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK1_Tg	1	EDIYLVSDLMETDLHRVIHHQYFLYQILGLSFLHQAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK6_Pt	1	DTIYVVMMEYAQSDLKKLFHIQTIIVYNICVGLKYLHSAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK13_Pt	1	DTIYVVMMEYAQSDLKKLFHIQTIIVYNICVGLKYLHSAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK10_Pt	1	DTIYVVMMEYAQSDLKKLFHIQTIIVYNICVGLKYLHSAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK12_Pt	1	DTIYVVMMEYAQSDLKKLFHIQTIIVYNICVGLKYLHSAIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK2_Tp	1	DVLYVVLEIAASDIKQLVHIRLLVFNLLSGVHYLHSVYHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK2-Ta	1	DVLYVVLEIAASDIKQLVHIRLLVFNLLSGVHYLHSVYHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK_Bb	1	NVLYVVLEIAASDIKLLIHIKLIIMYNLLCGVYLYHARYHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK2_Pv	1	DELYIVLEIADSDIKKLFHVKTILYNLLGKFIHESIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK2_Pf	1	DELYIVLEIADSDIKKLFHVKTILYNLLGKFIHESIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK3_Tg	1	DELYVVLEIADSDFKKLFHIKTLIYNLLVGVKYIHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MAPK2_Ch	1	DELYIVLEIADSDFKKLFHVKTILYNLLVGLKYIHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK3_Tth	1	GTIYLVVTNMEIDLQYVHIQYIITVYQILKGLKYIHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL
MPK8_Pt	1	KDIYLVFDYMETDLHVAIHKKYVVYQILKSLKYIHSIHRDLKPSNIIIVNCDLKIICDFGL

MPK23_Pt	1	KDIYLVFDYMETDLHAVIHKKYVYQILKALKYIHSGLHRDLKPSNILLNCHMKLADFG
ERK7A_Tth	1	KDLYLVFDFMETDLHAVIHKKYVMYQILKALKYMHSGIHRDLKPSNILLNCHVKLADFG
MPK3_Pt	1	KDLYLVFDYMETDLHAVIHKKYIVYQTLKALKFIHSGIHRDLKPSNILLDCLIKVADFG
MPK4_Pt	1	KDLYLVFDYMETDLHAVIHKKYIVYQTLKALKFIHSGIHRDLKPSNILLDCLIKVADFG
MPK15_Pt	1	KDLYLVFDYMETDLHAVIHKKYIVYQILKALKFIHSGIHRDLKPSNVLLNCLVKVADFG
MPK4_Tth	1	KDLYMVDFMETDLHAVIHKQYVYQILKAMKYIHSGLHRDLKPSNILLNCLVKLADFG
MPK11_Pt	1	KDLYIVFDFMETDLHAVIHQRYIIYQILKALKYIHSALHRDLKPSNVLLDCNVKADFG
MPK17_Pt	1	KDLYIVFDFMETDLHAVIHQRYIIYQILKALKYIHSALHRDLKPSNVLLDCNVKADFG
MPK9_Pt	1	KDLYIVFDFMETDLHAVIHQRYIIYQILKALKYIHSALHRDLKPSNVLLDCNVKADFG
MPK7_Pt	1	KDIYLVFEHMETDLHGVIHKQYIIYQILKSIKYMHSALHRDLKPSNILLNGSVKADFG
MPK24_Pt	1	KDIYLVFEHMETDLHGVIHKQYIIYQILKSIKYMHSALHRDLKPSNILLDCSVKADFG
ERK7C_Tth	1	RDIYVVFYEMDTDLHAVIHKQYIMYQIFRAIKYIHSGLHRDLKPSNILLVNCMVKADFG
MAPK2_Tg	1	KDIYLVFDYMETDLHAVIHKQYIVYQLLRAIKYMHSGIHRDMKPSNVLLNCQVKADFG
ERK2_Dd	1	RDIYLVFEHMETDLHAVIHKQYITTYQLKALKYMHSAALHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
ERK2_Gl	1	KDIYLVFEFLDSDLHQVIHKRYIIYQCVKALKYLHSAALHRDLKPSNILLNCHMKMADFG
MAPK1_Ch	1	RDIYLVFDYMETDLHAVIHKQYVYQILKVIKYLHSGIHRDMKPSNILLNCHMKMADFG
MAPK_Li	1	RDIYLVFEYMETDLHVVIHKQFIYQILKTMKYLHSAALHRDMKPSNILLVNCMTKADFG
MAPK2_Lm	1	RDIYLVFEYMETDLHVVIHKQFIYQILKTMKYLHSAALHRDMKPSNILLVNCMTKADFG
MAPK2_Tb	1	KDIYLVFEYMETDLHVVIHKQFIYQILKTMKYLHSAALHRDMKPSNILLVNCMTKADFG
MPK1_Pt	1	KDLYMVFEYMETDLHKAHKKFVYQILKAIKFLHSGIHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MPK22_Pt	1	RDIYMVFEYMETDLHKVIHKKYVYQILKAIKFLHSGIHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MPK2_Pt	1	KDLYMVFEFMETDLHKVIHKKYIIYQILKGLKYLHSGIHRDLKPSNILLNCKVKADFG
MPK14_Pt	1	KDLYMVDFMETDLHKVIHKKYIIYQILKGLKYLHTGIHRDLKPSNILLNCKVKADFG
MPK16_Pt	1	KDLYMVFDYMETDLHKVIHKRYIVYQVLKGLKYLHTGIHRDLKPSNILLNCKVKADFG
MPK18_Pt	1	KDLYMVFEYMETDLHKVIHMQYIIYQLLCKLFIHSGIHRDLKPSNILLIDCKVKADFG
MPK20_Pt	1	KDLYMVFEYMETDLHKVIHMQYIIYQLLCKLFIHSGIHRDLKPSNILLIDCKVKADFG
MPK5_Pt	1	KDLYMVFEYMETDLHKVIHMQYIIYQLLCKLFIHSGIHRDLKPSNILLIDCKVKADFG
MPK19_Pt	1	NDIYLIFEYMETDLHVAIHRRYIIYQLFKALKYIHSALHRDLKPSNILLIDCKIKLADFG
MPK21_Pt	1	NDIYLIFEYMETDLHVAIHRRYIIYQLFKALKYIHSALHRDLKPSNILLIDCKIKLADFG
MAPK1_Pf	1	NDIYLIFDFMETDLHEVIHKKYIIYQLLRALKYIHSGLHRDLKPSNILLNCHIKVADFG
MAPKp_Bb	1	RDIYLVFEYMETDLHVAIHKKYIIYQLLKAIFHSGIHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MAPK_Ta	1	RDIYLVFEYVETDLHAVIHKRYIIYQLLKAIFHSGIHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MAPK1_Tb	1	TDLYLVFELAEETDLSVLQRYVAYQIVYAVAGLHARLHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MAPK3_Rn	1	NSVYIVQYMETDLANVLHARLFMYQLLRGLKYIHSALHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
p97_Hs	1	NSVYIVQYMETDLANVLHARLFMYQLLRGLKYIHSALHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
MAPK3_Hs	1	SVAYIVQYMETDLARLLHAKLFMYQLLRGLKYIHSALHRDLKPSNILLNCLVKVADFG
SEK-1_Ce	1	GDVVICMEVMDTSLDKFYFIGKMAHSVTEGLNFMKECHRDVPSNILLNCLVKVADFG
MAPK_Lm	1	AKLNATQRQRDRQLRRQSVSOLTSPIVFSGLRAVSAARLTAVRGEHVPFTPTSPPCSSRR

SLT2__Sc__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKA	IDVWSAGCI	LAELFLG	GKGDYV	NQINQI	LGTPPE	VDYTH
MKC1__Ca__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKA	IDVWSVGC	LAELLG	GKGDYV	VDQINQ	ILGTPPE	SAQNYVR
SMK1__Sc__	61	ARTNYVATR	WYRAPEYSK	SVDIWAV	GCI	LAEFYAR	KGRDSM	HOIFEL	LGTPDKDA
MAPK__Ps__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELMD	RKGRD	VHQIRL	LLIGTP	PSEAAKRYIR
MSK7__Ms__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELMD	RKGRD	VHQIRL	LLIGTP	PSEAAKRYIR
NFT4__Nt__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELMD	RKGRD	VHQIRL	LLIGTP	PSEAAKRYIR
MAPK6__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELMD	RKGRD	VHQIRL	LLIGTP	PSEAAKRYIR
MMK4__Ms__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTS	AIDVWSVGC	IFMELMN	KKGKD	HVHQMR	LLIGTP	TDAAARRYIR
WIPK__Nt__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELMN	RKKGK	DVHQIR	LLIGTP	TEAAKRYIR
MAPK__As__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYS	AAIDVWSVGC	IFMELIN	RAGRD	HVHQMR	LLIGTP	TDAAARRYMR
MAPK4__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	ILGETMT	REGKD	VHQIRL	LLIGSP	DDSAARRYVR
MMK2__Ms__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	ILGEIVT	ROGRD	VHQIRL	LVIGSP	DDAAARRYVR
MAPK5__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTS	AIDVWSVGC	IFAEIMT	REGKD	VHQIKLI	IGSP	DGAGGKYVK
NFT6__Nt__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYTA	AIDVWSVGC	IFMELIK	REGDYA	QOIGL	ILGSP	EDSARKYVK
NFT3__Nt__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYGT	SIDVWSVGC	IFAEILL	GRKGT	ECINQIK	LLIGS	QREARKYIK
MAPK1__Ph__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYGT	SIDVWSVGC	IFADVL	GRKGT	ECINQIK	LLIGS	QREARKYIK
MAPK1__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYGT	SIDVWSVGC	IFAEILL	GRKGT	ECINQIK	LLIGS	QREARKYIR
MAPK2__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYGT	SIDVWSVGC	IFAEILL	GRKGT	ECINQIK	LLIGS	QREARKYIE
MAPK7__At__	61	ARTEYVVTR	WYRAPEYGT	SIDVWSVGC	IFAEILL	GRKGT	ECINQIK	LLIGS	QOESARRFIK
ERKa__Dd__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKA	IDVWSVGC	IFAEILL	GRKGD	YHQIT	LLIGSP	SEEARQFIR
3mpk__Tth__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTTA	IDMVA	VGCI	IFSELY	MRKGE	SYNQIL	LLTGT
2mpk__Tth__	61	ARTDYVTR	WYRPPPEY	TAMDV	WSVGI	IFAEILL	KRKG	SSSDQ	LLRIG
MPK2-Tth	61	ARTDYVATR	WYRAPEYDE	KVDV	WSVGC	IFAEILL	RKGI	DTRNQ	IELLIG
MAPK__Fs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKA	IDVWSVGC	IFAEML	SGKGD	YHHQIT	LLIGTP	IMEAREYIR
PMK1__Mg__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKA	IDVWSVGC	IFAEML	SGKGD	YHHQIT	LLIGTP	IMEAREYIR
MAPK__Ca__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTTA	IDVWSVGC	IFAEML	SGRGR	DYHNQI	WLILG	TNMEAREYIR
SPK1__Sp__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYSKA	IDLWST	GCI	IFAEML	SARG	KDYHSQ	ITLILG
KSS1__Sc__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTTA	MDIWS	VGC	IFAEML	SVGK	GRDYHHQ	ITLILG
FUS3__Sc__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYS	RAMDV	WSVGC	IFAEFL	RGRD	YHQIT	LLIGTP
BMKa__Hs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTA	QIDLWS	VGC	IFGEM	LARR	GKNYVHQ	IQILG
BMKg__Hs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTA	QIDLWS	VGC	IFGEM	LARR	GKNYVHQ	IQILG
BMKb__Hs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTA	QIDLWS	VGC	IFGEM	LARR	GKNYVHQ	IQILG
ERKa__Dm__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
MAPK__Ac__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDVWS	VGC	IFAEML	ANR	GKHYLDQ	INHLG
ERK2__Hs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK1__Hs__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK2__Bt__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK2__Rn__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK2__Xl__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK1__Rn__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
ERK1__Mm__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDIWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INHLG
SUR1__Ce__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDVWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INLIVG
MPK1__Ce__	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKS	IDVWS	VGC	IFAEML	SNR	GKHYLDQ	INLIVG
JNK2a1__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGELV	KGC	TDHID	QWNK
JNK2a1__Gg__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGELV	KGC	TDHID	QWNK
JNK2b1__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMAEMV	LHK	GRDYID	QWNK
JNK2b2__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMAEMV	LHK	GRDYID	QWNK
JNK3a2__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGEMV	RHK	GRDYID	QWNK
SAPKb__Rn__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGEMV	RHK	GRDYID	QWNK
JNK3a1__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGEMV	RHK	GRDYID	QWNK
JNK1a2__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDLWS	VGC	IMGEMV	CHK	GRDYID	QWNK
SAPKg__Rn__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDLWS	VGC	IMGEMV	CHK	GRDYID	QWNK
JNK1b1__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGEMI	KGG	TDHID	QWNK
JNK1b2__Hs__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYKEN	VDIWS	VGC	IMGEMI	KGG	TDHID	QWNK
SAPK__Cc__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYQAN	VDIWS	VGC	IFAEML	RHK	GRDYID	QWNK
SAPKa__Dm__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYTEN	VDIWS	VGC	IMGEMI	RGG	TDHID	QWNK
SAPKb__Dm__	61	ARTPYVVTR	YRAPEYTEN	VDIWS	VGC	IMGEMI	RGG	TDHID	QWNK

SAPK	61	ARTPYVVT	RYRAPEYKENVDVWSIGCIFGELLRGRGGDHDQWTRILGTPDRSVRNYVE
p38_Mm	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHIDQIKLIVGTFGAEARNYIQ
p38_Rn	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHIDQIKLIVGTFGAEARNYIQ
p38_Cf	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHIDQIKLIVGTFGADARNYIQ
CSBP1_Hs	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHINQIQQTGTTPPAYARNYIQ
p38b_Mm	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHINQIQQTGTTPPAYARNYIQ
Mxi2_Hs	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHIDQIKLIVGTFGAEARNYIQ
MPK2_Xl	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHIDQIKLIVGTFPEARNYIQ
p38_Cc	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNMTVDIWSVGCIMAEELLTGRGTDHINQIQQTGTTPASARTYIN
p38b_Hs	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLQKGSYDIDQIKRIVGTPSPEARTYIQ
p38b2_Hs	61	ARTGYVATR	WYRAPEYNQTVDIWSVGCIMAEELLQKGSYDIDQIKRIVGTPSPEARTYIQ
ERK6_Hs	61	ARTGYVVT	RWYRAPEYQTVDIWSVGCIMAEEMITGKGSYDIDQIKRIVGTPSPEAKNYMK
p38g_Hs	61	ARTGYVVT	RWYRAPEYQTVDIWSVGCIMAEEMITGKGSYDIDQIKRIVGTPSPEAKNNMK
SAPK3_Mm	61	ARTGYVVT	RWYRAPEYQTVDIWSVGCIMAEEMITGKGNDDIDQIKRIVGTPSPEAKNYME
SAPK3_Rn	61	ARTGYVVT	RWYRAPEYQTVDIWSVGCIMAEEMITGKGNDDIDQIKRIVGTPSPEAKNYME
p38_Ce	61	ARTGYVATR	WYRAPEYQTVDVWSVGCILAELITGKGSYDIDQITRITGTTPDEEARNYIR
HOG1_Sc	61	ARTGYVSTR	RYRAPEYDVEVDIWSAGCIFAEMIEGKGDHVDHQSIFLILGSPPKDILKQVVT
HOG1p_Sc	61	ARTGYVSTR	RYRAPEYDVEVDIWSAGCIFAEMIEGKGDHVDHQSIFLILGSPPKDILKQVVT
HOG1_Ca	61	ARTGYVSTR	RYRAPEYDTEVDLWSVGCILAEMIEGKGDHVDHQSIFLILGSPPADTLRFVQ
STY1_Sp	61	ARTGYVSTR	RYRAPEYNVEVDIWSAGCIFAEMIEGKGRDHDVNFQSFILGTPPMEILRFVQ
ERK2_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYTKAIDIVSVCIFAELLGRTGKDYLEQIQRILGTPSNDAIKYYIK
ERK3_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYTKAIDIVSVCIFAELLGRTGKDYLEQIQRILGTPSNDAIKYYIK
ERK4_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYTKAIDIVSVCIFAELLGRTGKDYLEQIQRILGTPSNEAIKYYIK
5mpk_Tth	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYTKSIDVWSIGCIFAELLGRTGKDYLEQIQRILGTPPEALKYIK
ERK6_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYSKAVDIYSVGCILAELLGRTGENYLDQVQRILGTPITADAIKYYIK
ERK7_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYSKAVDIYSVGCILAELLGRTGENYLDQVQRILGTPITADAIKYYIK
ERK5_Pt	61	ARTEYVIT	RWYRAPEYTKAVDIYAAGCILAELLGRTGEDYLDQVQRILGTPITPDAINYIK
MPK1_Tth	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYTKAVDIYSVGCIFAELLGRTGENYLDQVQRILGTPITQEAIKYYIK
ERK1_Pt	61	ARTEYVVT	RWYRAPEYNKSVDIYALGCIIMAEELLGRTGEDYLDQVQRILGTPITNEALTYIK
4mpk_Tth	61	ARTTYVVT	TRPYRAPEYSKPIDIWSAGCIFAEMMGRKGNYSYVQIDRIMCKPDEFDLKEYIK
1mpk_Tth	59	IGTQYIT	TSDFLSPQNLKSDIWHVGVIIILGLINRDGGGYLGLINAILGTPSGEYKGLYQ
MAPK_Ch	61	ARTDYVVT	RWYRAPEYDKAVDIWSAGCIFAELIKRSGHDHIDQIKAILGTPSRDARKYLD
MAPK4_Lm	61	ARTQYVVT	RWYRPPEYTSAVDVWSLGLIFAELMVGRTDYIGQIVMLGSPSIDAKAFIL
MAPK4_Tb	61	ARTEYVVT	RWYRPPEYTNADVWSLGLIFAELMVGKGSYDIDHQLIMILGTPASEAKNFIL
MAPK1_Tg	61	ARTDYVVT	RWYRPPEYSKPVDLWSVGCIFAELLGRTGKDHFDQIRRLILGRPSTAAARFIE
MPK6_Pt	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTAVIDVWSVGCIFAELLNMMPYSNTDQITVILGTPGEKAIIEYLK
MPK13_Pt	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTAVIDVWSVGCIFAELLNMMPYSNTDQITVILGTPGEKAIIEYLK
MPK10_Pt	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTAVIDVWSVGCIFAELLNMMPYSNTDQITVILGTPGDKAIIEYLK
MPK12_Pt	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTAVIDVWSVGCIFAELLNMMPYSNTDQITVILGTPGEKAIIEYLK
MAPK2_Tp	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYSFAVDIWSVGCIFAELLNMMTTRENDQINLILGTPSEEVRRYVK
MAPK2_Ta	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYSFAVDIWSVGCIFAELLNMMTTRENDQINLILGTPSEEVRRYVK
MAPK_Bb	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTAVIDVWSVGCIFAELLNMVA-KEHDQINIIIGTPCEEVRRYIR
MAPK2_Pv	61	ARTSHVVT	RWYRAPEYTNISIDIVSVCIFAELLNMLEKSNRDQINIIIGTPSEEVRRYIK
MAPK2_Pf	61	ARTSHVVT	RWYRAPEYTNISIDIVSVCIFAELLNMMEKSNRDQINIIIGTPPEEVIKYYIK
MAPK3_Tg	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTEAIDVWSIGCIFAELLNMITRGNRDQINVLGTPSEEAKRYIR
MAPK2_Ch	61	ARTGHVVT	RWYRAPEYTEAIDMWSVGCIFAELLNMLIRGNRDQINMLILGSPLEAKRYIR
MPK3_Tth	61	SRTEYVVT	RYRAPEYSKAVDIWSIGCTFAELI---SHQYIKQIKLILGMPPEEAKQFVN
MPK8_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGELIIGKGTSTINQIERILGKPNDAAVNILA
MPK23_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGELIIGKGTSTINQIERILGKPNDAAVNILA
ERK7A_Tth	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGELIIGKGVSTINQIERVTGKPKNEAWNILN
MPK3_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYSKAVDMWSVGCIVGELIVGKGTSTINQIERILGKPRGDAANILA
MPK4_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYSKAVDMWSVGCIVGELIVGKGTSTINQIERILGKPRGDAANILA
MPK15_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYSKAVDMWSVGCIVGELILGRGTSSINQIERILGKPKADAANILA
MPK4_Tth	61	ARTEYVATR	WYRAPEYAKAVDMWSIGCIVGELITNRGNSTINQIEKVTGKPTQEAWNIIIS
MPK11_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGEMINGKGSSTINQIERVIGRPTTSASQIVN
MPK17_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGEMINGKGSSTINQIERVIGRPTTSASQIVN
MPK9_Pt	61	ARTEYVATR	WYRAPEYTKAVDMWSVGCILGEMINGKGSSTINQIERIIGRPTTSASQIVN

MPK7_Pt	61	VRTEYVATRWRAPPEYTKGVDMWSVGCILGELLTGKGNSTINQIDRITGKPSSTEASTMLE
MPK24_Pt	61	VRTEYVATRWRAPPEYTKGVDMWSIGCILGELLTGKGNSTINQIDRITGWPSLEASTMLG
ERK7C_Tth	61	VRTEYIATRWRAPPEYTKGVDMWSIGCILGQLLGGKGTSTINQELITGKPTYEAITMLE
MAPK2_Tg	61	ARTDYVATRWRAPPEYTKGVDMWSIGCILGELLSGRGTSTINQERITGRPSPEAATMME
ERK2_Dd	61	ARTEYVATRWRAPPEYTKGVDMWSIGCILGELLGKGNSTINQIDLITGRPSAEAGTMLE
ERK2_Gl	61	ARTDYVATRWRYSPEYTKGVDMWAIIGCILGEMLGGSSTINQDKIWERPTPEASMLLD
MAPK1_Ch	61	SRTDYVATRWRAPPEYTKGIDMWSIGCILGELLGKGSSTINQERIIDFPSNEAKTMIE
MAPK_Li	61	ARTDYIATRWRYPPEYTKGVDMWSVGCILGELMLGKGRSTTNQELITGMPSSAAAHAMLR
MAPK2_Lm	61	ARTDYIATRWRYPPEYTKGVDMWSVGCILAEMLGKGRSTTNQELITGMPSSAAAHAMLR
MAPK2_Tb	61	ARTDYIMTRWRYPPEYTKGVDMWAIIGCILAEELLGGRRTTKQELILGEPTEAEAMIK
MPK1_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKAVDMWSIGCILGEMIMGKGTSTINQVEMILGTPTEEAKHVLID
MPK22_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKAVDMWSIGCILGEMILGKGTSTINQVEMILGTPTEEAKHILD
MPK2_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKAVDMWSIGCILGEMILGKGTSTTNQTERIIDGKPKQDAEEVIQ
MPK14_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKAVDMWSIGCILGEMILGKGTSTINQTERIIDGRPRQDAEQVIS
MPK16_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKAVDMWSIGCIVGEMIVGKGTSTINQTERIIDRPRKPEAERVLD
MPK18_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKSVDMWSVGCILGEMLLGKGSSTINQEKIIDGRPKIEALQVLD
MPK20_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKSVDMWSVGCILGEMILGKGSSTINQEKIIDGRPKQDAQQVLD
MPK5_Pt	61	ARTEYVATRWRAPPEYSKSVDMWSVGCILGEMILGKGSSTINQEKIIDGRPKQEQASQVLD
MPK19_Pt	61	ARTDYVATRWRAPPEYSFGVDMWSIGCMIGEMILGKGIISTINQEKIIDGIPTEQNLQFD
MPK21_Pt	61	ARTDYVATRWRAPPEYSFGVDMWSIGCMIGEMILGKGTSTINQEKIIDGMPTPEQNLQFD
MAPK1_Pf	61	ARTDYVATRWRAPPEYTEDVDMWSIGCILGELLGKGNSTINQEKIIDGKPNKKAEKIIS
MAPKp_Bb	61	SRTDYVATRWRAPPEYTKGVDMWAIIGCILAEELLNKGSSSTINQISKVTCMPSSDETTLMMG
MAPK_Ta	61	ARTDYVATRWRAPPEYTKGVDMWAIIGCIFAEMLTGKGSSTINQIAKVTGMPSEETKVMIS
MAPK1_Tb	61	ARTEYIATRWRYSPEYTTAMDMMWAVGCILGELFTGSGNSTINQIGLILGEPTEAETWPLID
MAPK3_Rn	61	ARSEGLVTKWYRSPRYTKAIDMWAAGCIFAEMLTGKGAHELEQQLIPVVHEEDVY----
p97_Hs	61	ARSEGLVTKWYRSPRYTKAIDMWAAGCIFAEMLTGKGAHELEQQLIPVVHEEDVY----
MAPK3_Hs	61	ARSEGLVTKWYRSPRYTKAIDMWAAGCILAEMLTGRGAHELEQQLIPVIREEDSF----
SEK-1_Ce	61	SGTVQAGCKPYMPPEYDVRADVSLGITIIETAVGTWKTPEQLKQVEPPPK-----
MAPK_Lm	61	ASAPHVRKVVQLEARNLTAPLNERSDFTISGAGSDGSDDDQEVSATASTTSQPSSSSTVALIQ

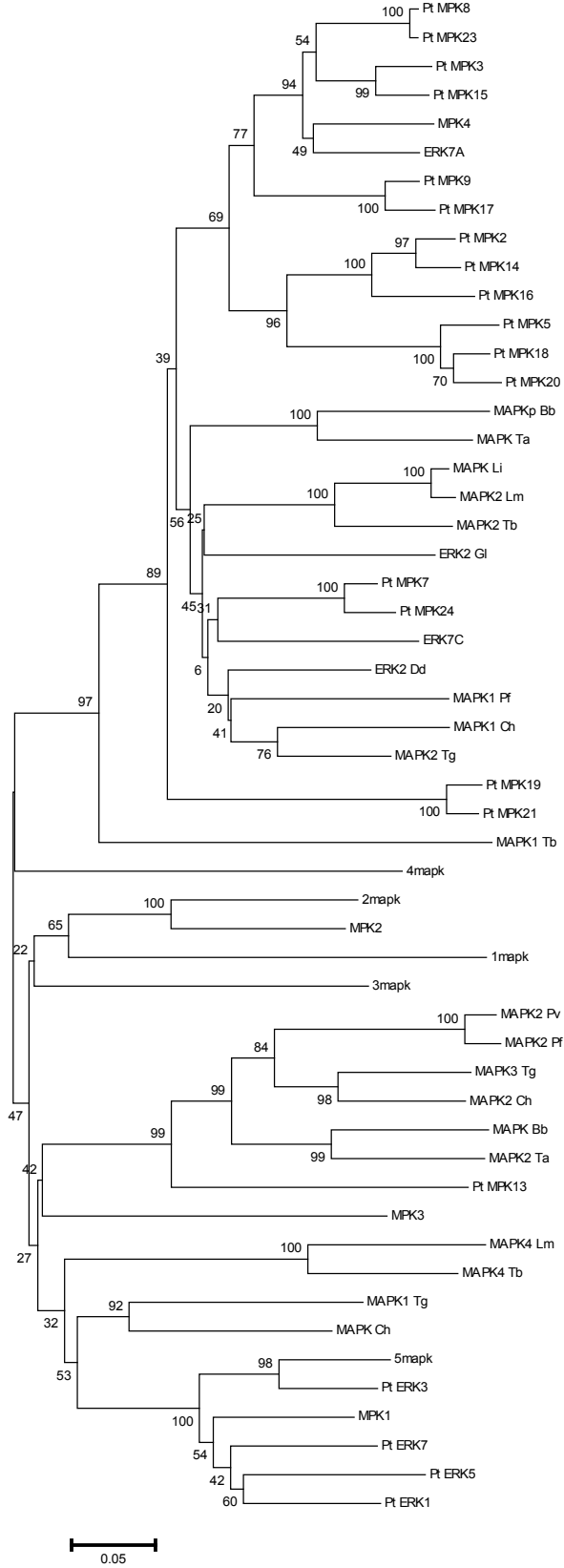
SLT2	Sc	121	Q--FVNLYPAL-----	DLLEQMLAFDPOK	RITVDEALEHPYLS	IWHDP
MKC1	Ca	121	S--YEELFPAL-----	DLLEKMLTLDPR	ERITVRDALNHKYL	EIWHDP
SMK1	Sc	121	NSNWSNIFPAI-----	NLTESLIHWDS	THRINVEQALSH	PFINEVRKP
MAPK	Ps	121	QLPFQEKFPAL-----	DLVEKMLTFDPR	RQRITVENALAH	PYLTSLHDI
MSK7	Ms	121	QLPFQEKFPAL-----	DLVEKMLTFDPR	KRITVEDALAH	PYLTSLHDI
NFT4	Nt	121	QLPFVEKFPAL-----	DLVEKMLTFDPR	RRITVEDALAH	PYLTSLHDI
MAPK6	At	121	QLPITDKFPAL-----	DLIEKMLTFDPR	RRITVLDALAH	PYLSLHDI
MMK4	Ms	121	QLPLNRVFPAL-----	DLVDKMLTIDP	TRRITVEEALAH	PYLEKLHDV
WIPK	Nt	121	QLPLAEVFPAL-----	DLVDKMLTFDP	TRRITVEEALAH	PYLAKLHDA
MAPK	As	121	HLPFPGQFPAL-----	DLIERMLTFNPL	QRITVEEALAH	PYLERLHDV
MAPK4	At	121	QLPFAARFPAV-----	DLLEKMLVFEP	SRITVDEALCH	PYLAPLHDI
MMK2	Ms	121	QLPFSARFPAV-----	DLLEKMLIFDP	SKRIKVEALCH	PYMAPLHDI
MAPK5	At	121	ELPFSARFPAL-----	DLLEKMLVFD	PVKRITVEEAL	CYPYLSALHDL
NFT6	Nt	121	HLPFSQKFPAL-----	DLAERMLVFD	PAKRITVEDAL	NHPFIISLHEI
NFT3	Nt	121	SLPFSRLYPAL-----	DLLQRMVFD	PSKRISVIEAL	QHPYMSPLYDP
MAPK1	Ph	121	SLPFSRLYPAL-----	DLLQRMVFD	PSKRISVMEAL	QHPYMSPLYDP
MAPK1	At	121	SLPFSRLYPAL-----	DLLQKMLVFD	PSKRISASEAL	QHPYMAPLYDP
MAPK2	At	121	SLPFSRLYPAL-----	DLLQKMLVFD	PSKRISVTEAL	QHPYMAPLYDP
MAPK7	At	121	SLPFSRLYPAL-----	DLLQRMVFE	PTKRISVTDAL	LHPYAGLFEF
ERKa	Dd	121	SLNFANMFPAL-----	DLLEKMLVFD	PSKRITVEEAL	AHFYFQSLHDP
3mpk	Tth	121	SLLSKLIIPAL-----	DLISKMLVFN	PKRISAEAL	KHPYFEGIRBS
2mpk	Tth	121	ELPFEKIFSAI-----	DLLEKMLTFD	FNKRITVEEAL	KHPYSDLHLP
MPK2	Tth	121	NMPFEKIFSAI-----	DLLEKMLTFD	FTKRITVEEAL	SHPYLSELHFP
MAPK	Fs	121	SLPFRTLFPAL-----	DLLEKMLAF	NPVKRITVEEAL	KHPYLEPYHDP
PMK1	Mg	121	SLPFRTLFPAL-----	DLLEKMLAF	NPVKRITVEEAL	KHPYLEPYHDP
MAPK	Ca	121	SLPFSELFAAL-----	DLLEKMLIF	NPAKRITVEDAL	KHPYQLYHDP
SPK1	Sp	121	SLPFKALFPAL-----	DLLEKMLIF	NPKRITAEAL	KHPYVAAYHDA
KSS1	Sc	121	NLPWETVWSMI-----	DLLEKMLVFN	PKRISAAEAL	RHPYLAHYHDP
FUS3	Sc	121	SLPLEKMFPGI-----	DLLEKMLVFD	PAKRITAKEAL	EHPLYQTYHDP
BMKa	Hs	121	SLPWETVYPAL-----	SLLGRMLRF	EPSARISAAAAL	RHPFLAKYHDP
BMKg	Hs	121	SLPWETVYPAL-----	SLLGRMLRF	EPSARISAAAAL	RHPFLAKYHDP
BMKb	Hs	121	SLPWETVYPAL-----	SLLGRMLRF	EPSARISAAAAL	RHPFLAKYHDP
ERKa	Dm	121	SLPWAKLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRIPVEEAL	AHPYLEQYYDP
MAPK	Ac	121	SLPWNKLYPAL-----	DLLEKMLTFN	PNKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK2	Hs	121	SLPWNRLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK1	Hs	121	SLPWNRLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK2	Bt	121	SLPWNRLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK2	Rn	121	SLPWNRLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK2	Xl	121	SLPWNRLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PHKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK1	Rn	121	SLPWAKLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PNKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
ERK1	Mm	121	SLPWAKLFPAL-----	DLLEKMLTFN	PNKRITVEEAL	AHPYLEQYYDP
SUR1	Ce	121	SLPWARLYPAL-----	DLLEKMLTFN	PHNRIDIEEAL	AHPYLEQYYDP
MPK1	Ce	121	SLPWARLYPAL-----	DLLEKMLTFN	PHNRIDIEEAL	AHPYLEQYYDP
JNK2a1	Hs	121	NRPFEELFPAR-----	DLLEKMLVID	PKRISVDEAL	RHPYITVWYDP
JNK2a1	Gg	121	NRPFEELFPAR-----	DLLEKMLVID	PKRISVDEAL	RHPYITVWYDP
JNK2b1	Hs	121	NRPFEELFPAR-----	DLLEKMLVID	PKRISVDEAL	RHPYITVWYDP
JNK2b2	Hs	121	NRPFEELFPAR-----	DLLEKMLVID	PKRISVDEAL	RHPYITVWYDP
JNK3a2	Hs	121	NRPFPKLFPAR-----	DLLEKMLVID	PAKRISVDDAL	QHPYINWYDP
SAPKb	Rn	121	NRPFPKLFPAR-----	DLLEKMLVID	PAKRISVDDAL	QHPYINWYDP
JNK3a1	Hs	121	NRPFPKLFPAR-----	DLLEKMLVID	PAKRISVDDAL	QHPYINWYDP
JNK1a2	Hs	121	NRPFEKLFPAR-----	DLLEKMLVID	ASKRISVDEAL	QHPYINWYDP
SAPKg	Rn	121	NRPFEKLFPAR-----	DLLEKMLVID	ASKRISVDEAL	QHPYINWYDP
JNK1b1	Hs	121	NRPFEKLFPAR-----	DLLEKMLVID	ASKRISVDEAL	QHPYINWYDP
JNK1b2	Hs	121	NRPFEKLFPAR-----	DLLEKMLVID	ASKRISVDEAL	QHPYINWYDP
SAPK	Cc	121	NRPFEKLFPAR-----	DLLEKMLVID	ASKRISVEEAL	QHPYINWYDP
SAPKa	Dm	121	NRPFDRLFAPAR-----	NLLEKMLVID	PEQRISVDEAL	KHEYINWYDA
SAPKb	Dm	121	NRPFDRLFAPAR-----	NLLEKMLVID	PEQRISVDEAL	KHEYINWYDA

SAPK	121	NRPFVFLFSAR-----DLLSRMLVIDPERRISVDDALRHPYVNVWFDE
p38_Mm	121	SLAFANVFIAV-----DLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDP
p38_Rn	121	SLAFANVFIAV-----DLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDP
p38_Cf	121	SLTFANVFIAV-----DLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDP
CSBP1_Hs	121	SLTFANVFIAV-----DLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDP
p38b_Mm	121	SLAFANVFIAV-----DLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDP
Mxi2_Hs	121	SLTFANVFI GKLTIYPHLMDIELVMI-----
MPK2_Xl	121	SLPFEDVFLAV-----DLLEKMLVLDTDKRITAAEALAHSYFAQYHDP
p38_Cc	121	SLPFSEVFI AV-----DLLEKMLVLDTDKRITAAEALAHPYFAQYHDP
p38b_Hs	121	SLPLSSIFRAI-----DLIGRMLVLDS DQVSAAEALAHAYFSQYHDP
p38b2_Hs	121	SLPLSSIFRAI-----DLIGRMLVLDS DQVSAAEALAHAYFSQYHDP
ERK6_Hs	121	GLPFASILTAV-----NLLEKMLVLDAEQRV TAGEALAHPYFESLHDT
p38g_Hs	121	GLPFASILTAV-----NLLEKMLVLDAEQRV TAGEALAHPYFESLHDT
SAPK3_Mm	121	GLPFASVLTAV-----NLLEKMLVLDAEQRV TAAEALAHPYFESLRDT
SAPK3_Rn	121	GLPFASVLTAV-----NLLEKMLVLDAEQRV TAAEALAHPYFESLRDT
p38_Ce	121	NLPFKRIFA AI-----DLLEKMLHLDPDRRPTAKEAMEHEYLAAVHDE
HOG1_Sc	121	SLPFSERFKAV-----DLLEKMLVFDPKKRITAA DALAHPY SAPYHDP
HOG1p_Sc	121	SLPFSERFKAV-----DLLEKMLVFDPKKRITAA DALAHPY SAPYHDP
HOG1_Ca	121	SLPFSERFAAI-----DLLAKLLVFDPKKRISAVEGLTHPYMEAYHDP
STY1_Sp	121	SLPFAEKFKAI-----DLLEKMLVFDPKKRISAADALAHNYLAPYHDP
ERK2_Pt	121	SLPFSTLFQCL-----DLLSKMLTFSPFORYTVEQCLNHPYFDGL---
ERK3_Pt	121	SLPFSTLFQCL-----DLLSKMLTFSPFORYTVEQCLNHPYFDGL---
ERK4_Pt	121	SLPFNQLFQCL-----DLLSKMLTFSPFORYTVEQCL SHPYFEGL---
5mpk_Tth	121	SLPWENLYPGL-----DLLSKMLTFNPNDRYTIEECLAHPYFEGL---
ERK6_Pt	121	SLPWEALFPAL-----DLLGKMITFNPEQRYTVEQCLQHPYFDEL---
ERK7_Pt	121	SLPWEALFPAL-----DLLGKMITFNPEQRYTVEQCLQHPYFDEL---
ERK5_Pt	121	SLPFAQLYPVC-----ELLTKMITFNPKRYTVEQCLEHDPYFDGL---
MPK1_Tth	121	SQPWQSLYPAL-----DLLSKMLTFNPEKRYTVKECEHPYFEGL---
ERK1_Pt	121	SLPWKNLYPAL-----DLLDKMLTFNPKRITVQECCLAHPYFEGL---
4mpk_Tth	121	QLQFYEIYKAI-----DLLYKMLAFDPKERWTVQCLYHEHYFKD---
1mpk_Tth	119	YIIWQDVFPLC-----DLLDKMLVFNE DKRYTVKECLOHPYFEDL---
MAPK_Ch	121	TLPISTLFP AI-----DLIEKMLSFNPKKRITAE EALSHPYFNGININ
MAPK4_Lm	121	SQPFRLFSAT-----DLLSKLLVFHPARRITAKQVMEHPYFSKY---
MAPK4_Tb	121	AQPFTELFPAA-----DLLSKLLVFHPDKRITAKEVTEHAYFAKE---
MAPK1_Tg	121	SLPLEDLFPAL-----DLLSNLLTFDPAKRITVQEALRHEHYFEGL---
MPK6_Pt	121	SFPFADIFPAL-----DFLDKCLQFSPKLRITLDQALEHPMLQKVRDK
MPK13_Pt	121	SFPFADIFPAL-----DFLDKCLQFSPKLRITLDQALEHPMLQKVRDK
MPK10_Pt	121	SFPFVEIFPAL-----DFLDKCLQLSPKIRITLDQALEHPMLQKVRDK
MPK12_Pt	121	SFPFVEIFPAL-----DFLDKCLQFSPKIRITLDQALEHPMLQKVRDK
MAPK2_Tp	121	FFALRTKFKSI-----DLLKKMLTFNPKRISVFDALNHPYFKSISKP
MAPK2_Ta	121	FFALRTKFKSI-----DLLKKMLTFNPEKRISVFEALNHPYFKSISKP
MAPK_Bb	120	MFHLYKRFKAV-----NLLQOMLTFNPKRITVAEALKHEHYFREHYKP
MAPK2_Pv	121	LFPFKKKFPGI-----DLLQSMLEFRNAKNRITIDSALSHPYLKDVRKT
MAPK2_Pf	121	LFPLSKKYSGI-----DLLESMLRFNAOKRITIDKALSHPYLKDVRKE
MAPK3_Tg	121	IFPLAERFP AI-----HLLKRMLVFNPNKRITINECLAHPEFKEVRIA
MAPK2_Ch	121	IFSLQTRFPSI-----DLLKKMLVFNPNKRITVDEALSHSLFKNIRNE
MPK3_Tth	118	TIIVSSFINAL-----DLIDKMLAINPSKRITADEALEHPYFQSIRDV
MPK8_Pt	121	SVSFQQFFSCL-----DLLRRLIQFNPKLRITVNCALKHKYKKEFSSP
MPK23_Pt	121	SVSFQQFFSCL-----DLLRRLIQFNPKQRLTVHQA LKHKYKKEFSSP
ERK7A_Tth	121	SINFEQFFQAL-----DLLKLLVFNPKLRIDAEQALQHRVVAEFHNP
MPK3_Pt	121	SINFQSFQAL-----DLIRRLCYNPNQRLTAEQALKHKYVRDFSSP
MPK4_Pt	121	SINFNTFFQAL-----DLIRRLCYNPNQRLTAEQALKHKYVRDFSSP
MPK15_Pt	121	SINFAQFFTAL-----DLIRRLCYNPKTRITAEQALKHKYVIEFSQP
MPK4_Tth	121	SINFHQMFPAI-----DLIKKLLCFNPKNRTVQCAL EHPYVKDFHCP
MPK11_Pt	121	NIPFTNYFPAL-----DLIRRLLSFNPSQRISVEEALRHPYVGAFFHN
MPK17_Pt	121	NIPFTNYFPAL-----DLIRRLLSFNPSQRISVEEALRHPYVGAFFHD
MPK9_Pt	121	NIPFTNYFPAL-----DLIRKLLSFNPHTRITVEEALRHPYVNAFHNE

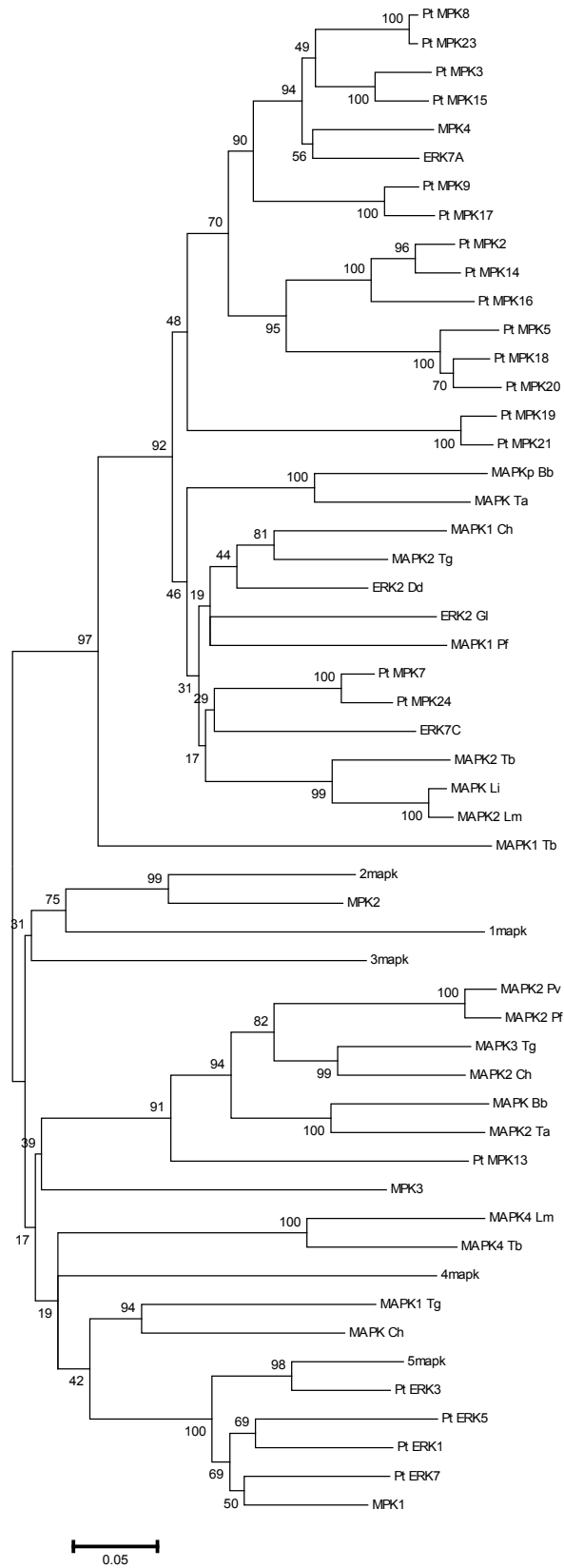
MPK7_Pt	121	ATNIHQIFPAL	-----	DLIYRLLKFNPNKRLTAEKALSHPYFSKFFHNE
MPK24_Pt	121	ATSIHQIFPAL	-----	DLIFSLKFNPNNSRLTAEKALAHPYFSNFHNV
ERK7C_Tth	121	AVQLQQMIPAL	-----	DLLQNLLQFNPKKRITAEQALSHPYVROFHNP
MAPK2_Tg	121	SLPEKDAFPAL	-----	DLKQLLQFNPNKRISAEKGLEHPYVROFHSP
ERK2_Dd	121	SLELSDMYPAL	-----	DLIKKLLQFNPNKRLTAEEALAHPEVTOFHNP
ERK2_Gl	121	SIQLSEIYPAL	-----	DLLKLLQFNPNKRLTAEQALEHPYLSKFFHDP
MAPK1_Ch	121	SLKKRDI FSAL	-----	DLIDKLLQFNPNKRISANDALKHPEVSIFFHNP
MAPK_Li	121	DIHF AE L L PAL	-----	DLIERLMCFNPNRRMTAAEALEHPYVAAFHRP
MAPK2_Lm	121	DIHF AE L L PAL	-----	DLIERFMRFNPNRRISAAEALEHPYVAAFHRP
MAPK2_Tb	121	DTRF AE L L PAL	-----	DLVQKLMRFNPNNERLTAEQALEHPYVAAFHKP
MPK1_Pt	121	SFQFKTVFSTL	-----	SFLKHLVFNPNQKRLTVEQALAHPYMAEFAGS
MPK22_Pt	121	NFQFKTVFSTL	-----	SFLKNLLVFNPNQKRLTVEQALAHPYIAEFAGS
MPK2_Pt	121	NIAIKQLFAAI	-----	DFIRKTLLYNPNYKRMTVEQALNHPYVKDFKGT
MPK14_Pt	121	SISITQLFAAI	-----	DFIRQTLIYNPNYKRMTVEQALNHPYVKEFKGT
MPK16_Pt	121	DIKFAQYFSAI	-----	DFLRKTLVYNPNKRMVTEQAFERHYVKEFKNC
MPK18_Pt	121	GIQYAGFFPFI	-----	DFIRQCLNWNPNQKRMTIDEALKHQLMKEFANT
MPK20_Pt	121	GISEFAAFFPFI	-----	DFIRQCLDWNPNLKRMIKEEALKHQIMMEFANT
MPK5_Pt	121	GISEFAGFFPFI	-----	DFIRQCLDWNPNLKRMIKEEALKHQIMMEFANT
MPK19_Pt	121	KYPLKVILN-L	-----	DLIKKLLVYDPNKRICVQDALKHPYLKEFYNP
MPK21_Pt	121	KYPLK SILN-L	-----	DLIKKLLVFDPNKRICVQDALRHPYLKEFYNP
MAPK1_Pf	121	SFVLKDI CYSL	-----	DLLEKLLQFNPNKRSISAENALKHKYVEEFHSI
MAPKp_Bb	121	SLAVKEYFPAV	-----	DLVVRLLQFNPNKKRITLLEALNHPYVRSFHKKS
MAPK_Ta	121	SINIKEYFPCL	-----	DLISKLLQFNPNPKRINTVEALSHPYLSNFFHK-
MAPK1_Tb	121	SLELPERLSAV	-----	DLICKCIIVFDPNKRPTAREALQHPYFAPFTS-
MAPK3_Rn	117	-IRLTQLLPAL	-----	DFLEQILTFSPMDRLTAEEALSHPYMSIYSFP
p97_Hs	117	-IRLTQLLPAL	-----	DFLEQILTFSPMDRLTAEEALSHPYMSIYSFP
MAPK3_Hs	117	-VSLRKLLPAI	-----	DFLEKILTFNPNMDRLTAEMGLOHPYMSPYSCP
SEK-1_Ce	113	-LEMESGFSCQ	-----	YFVKRCLEKDYNERPKYPEILLAMPFMEQARNE
MAPK_Lm	121	HTVPRSVA PQT	-----	SHRRSSTNSDATREDRADDQGNAPSFFASTVDP

EK 6. Protist MAPK ailesi üyeleri ile yapılan NJ, ME ve MP filogenetik ağaçları.

- 1000 tekrarlı seç bağla ile yapılan Protist NJ Filogenetik Ağacı:



- 1000 tekrarlı seç bağla ile yapılan Protist **ME** Filogenetik Ağacı:



- 1000 tekrarlı seç bağla ile yapılan Protist **MP** Filogenetik Ağacı:

