

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

**ZEYTİN TAHMİNİ TİYOREDOKSİN GENİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülçin ÇETİN**

**Balıkesir, Temmuz - 2011**

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

**ZEYTİN TAHMİNİ TİYOREDOKSİN GENİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gülçin ÇETİN**

**Balıkesir, Temmuz - 2011**

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

ZEYTİN TAHMİNİ TİYOREDOKSİN GENİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin ÇETİN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 15 / 07 / 2011

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (Danışman - BAÜ)



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

Balıkesir, Temmuz - 2011

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 106O616 ve 110O108 nolu projeler ile ve Balıkesir Üniversitesi tarafından 2011 – 14 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### ZEYTİN TAHMİNİ TİYOREDOKSİN GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Gülçin ÇETİN  
Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada Ayvalık zeytin çeşidine (*Olea europaea* L. cv. Ayvalık) ait meyvesiz yapraklardan elde edilen cDNA kütüphanesine ait tahmini tiyoredoksin geninin moleküler analizi yapıldı. Tiyoredoksinler hücre redoks düzenlemesinde rol oynayan küçük proteinlerdir. Gelişmiş ökaryotlardan prokaryotlara kadar tüm organizmalarda mevcuttur. Tiyoredoksin disülfid oksidoredüktaz olarak hizmet eder. Çeşitli biyoinformatik araçlarla analiz edilen tiyoredoksin geninin 706 nükleotit uzunluğundaki mRNA' sının 188 aminoasit kodlayan bir açık okuma çerçevesi (ORF) bulundurduğu, moleküler ağırlığının 20944.94 Dalton olduğu tespit edildi. Genin kodladığı proteinin yüksek oranda serin aminoasidi bulundurmasına ilaveten diğer bitkilerin tiyoredoksinlerinin hiç birinde rastlanmayan 6 adet serin aminoasit tekrarı (SSSSS) içerdiği tespit edildi. Tahmini tiyoredoksin geninin iki ekzon ve bir introndan oluşmakta olduğu bulundu. Zeytinde ilk defa uygulanan TAIL - PCR ile yaklaşık 650 nükleotitlik promotör bölgesi tespit edildi. Proteinin dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesini belirlemek için 12 ay boyunca toplanan zeytin örneklerinden elde edilen RNA örnekleri ile anlık gösterimli (real - time) PCR yapıldı. Genin en çok meyvede sentezlendiği, aylara göre bakıldığında ise Kasım ayında oluşan olgun meyvede ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu saptandı. Tahmini tiyoredoksin geninin zeytindeki temel görevini öğrenmek için yapılacak protein ekspresyon deneylerinin ilk basamağı olan ekspresyon vektörüne klonlama işlemi gerçekleştirildi. Sonraki çalışmalarda ekspresyon vektöründen proteinin üretilmesi ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılmasının yanında, promotör bölgesinin tamamının tespit edilerek fonksiyonel promotör karakterizasyonunun yapılması planlanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin, *Olea europaea* L., tiyoredoksin, intron, promotör, polimorfizm analizi, SNP

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE THIOREDOXIN FROM OLIVE**

**Gülçin ÇETİN**  
**Balıkesir University, Institute of Science,**  
**Department of Biology**

**(MSc Thesis / Supervisor: Assistant Prof. Dr. Ekrem DÜNDAR)**

**Balıkesir - Turkey, 2011**

In this study, molecular analysis of a putative thioredoxin isolated from a cDNA library generated from olive (*Olea europaea* L. cv. Ayvalık) leaves in July, was performed. Thioredoxin is a small protein that functions in cellular redox regulations as a disulfide oxidoreductase in many organisms from higher eukaryotes to prokaryotes. Bioinformatics analysis of the putative gene revealed about 706 nucleotides long mRNA that encodes a 188 amino acid long open reading frame (ORF) and a 20944.94 Dalton protein. The putative protein contains a high percentage of serine. Moreover the protein contains 6 amino acid repeat (SSSSSS) that was not detected in its homologs in other plants. The putative thioredoxin gene was found to be composed of two exons and one intron. TAIL – PCR in olive is applied for the first time and a putative promoter region of approximately 650 nucleotides was detected. Spatial and temporal expression of mRNA levels from olive tissue samples collected along 12 months were detected with the real - time PCR. According to the results the putative gene has the highest expression level in mature fruits. To explore the biochemical properties of the encoded protein, the cDNA was cloned into an expression vector. Studies to express the putative protein, and to obtain a more comprehensive promoter region are underway.

**KEYWORDS:** Olive, *Olea europaea* L., thioredoxin, intron, promoter, polymorphism analysis, SNP

## İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER LİSTESİ</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Tioredoksin Nedir	1
1.2. Tioredoksinin İşlevi	1
1.3 Tioredoksinin Çeşitleri	2
1.4 Fotosentetik Tioredoksinler	6
1.5 Tioredoksin Protein Ailesi	8
1.5.1 Tioredoksin Protein Dizileri ve Benzerlik Oranları	8
1.5.2 Sekonder Yapıları	9
1.5.3 Tioredoksin Katlanması	10
1.5.3.1 Tioredoksin Katlanmalarının Yapıları	11
1.5.3.2 Tioredoksinin 3 - Boyutlu Yapısı	14
<b>2. MATERYAL – METOD</b>	<b>15</b>
2.1 Biyoinformatik Analiz	15
2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	16
2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama	17
2.4 DNA İzolasyonu	17
2.5 Primerlerin Dizayını ve Sulandırılması	18

2.6	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	20
2.7	Agaroz Jel Elektroforezi	21
2.8	Anlık Gösterimli PCR İçin Bitki Materyali Toplama	22
2.9	Toplam RNA İzolasyonu	24
2.10	DEPC' li Su Hazırlama	24
2.11	TAIL - PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)	26
2.12	Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PCR)	29
2.13	Anlık Gösterimli PCR (Real-time - PCR)	30
2.14	Standart Eğrinin Oluşturulması	31
2.15	Sıvı Lauria Bertani (LB) ve LB Agar Hazırlanması	32
2.16	Kompetan Hücre Hazırlanması	33
2.17	Tiyoredoksin Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	33
2.17.1	Tiyoredoksin Geninin Çoğaltılması	33
2.17.2	Genin ve pPICZ $\alpha$ C Ekspresyon Vektörünün Kesilmesi	34
2.17.3	Genin pPICZ $\alpha$ C Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu	35
2.17.4	Rekombinant Ekspresyon Vektörünün Transformasyonu	36
2.17.5	Rekombinant Kolonilerin Tespiti (Koloni PCR)	36
2.17.6	Rekombinant pPICZ $\alpha$ C Plazmit Vektörünün İzolasyonu	37
<b>BULGULAR</b>		<b>38</b>
3.1	Bioinformatik Analiz	38
3.1.1	BLAST Analizi	38
3.1.2	BioEdit Programı İle Yapılan Analizler	41
3.1.3	ExPASy Analizleri	43
3.2	Genomik DNA İzolasyonu ve PCR	45
3.3	İntron Analizi	46
3.4	Polimorfizm Analizi	47
3.5	TAIL-PCR	51
3.6	Ekspresyon Vektörüne Klonlama	52
3.7	Tiyoredoksin Geninin Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	56
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b>		<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>63</b>



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Ferrodoksin - tiyoredoksin redüktaz	6
Şekil 1.2	NADPH - tiyoredoksin redüktaz	6
Şekil 1.3	Tiyoredoksin katlanmaları çeşitleri ve yapıları [120]	12
Şekil 2.1	Var yılı olarak belirlenen 1.Ağaç	23
Şekil 2.2	Yok yılı olarak belirlenen 2.Ağaç	23
Şekil 2.3	TAIL-PCR' ın mekenizması	26
Şekil 2.4	Çoğaltma primerlerinin kesim bölgeleri	34
Şekil 3.1	cDNA dizisinin analizi	38
Şekil 3.2	cDNA' nın benzediği türler	39
Şekil 3.3	Protein dizisinin analizi	39
Şekil 3.4	ORF dizisinin benzediği türler	39
Şekil 3.5	bk96 cDNA dizisinin ailesi	40
Şekil 3.6	Tiyoredoksin proteinin 3 - boyutlu yapısı	40
Şekil 3.7	Tiyoredoksinin aktif bölgesi	41
Şekil 3.8	Tiyoredoksin proteinin domain yapılarının karşılaştırılması	41
Şekil 3.9	Tiyoredoksin cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu	42
Şekil 3.10	Tiyoredoksin geninin açık okuma çerçevesi	42
Şekil 3.11	Tiyoredoksin proteinin aminoasit kompozisyonu	43
Şekil 3.12	Tiyoredoksin proteinin lokalizasyonu	43
Şekil 3.13	Tiyoredoksin proteinin trasit peptit analizi	44
Şekil 3.14	Tiyoredoksin proteinin özelliği	44
Şekil 3.15	İzole edilen DNA örnekleri	45
Şekil 3.16	Çeşitlerle yapılan PCR ürünleri	46
Şekil 3.17	İntron için yapılan PCR ürünler: 1. cDNA 2. gDNA	46
Şekil 3.18	Zeytin tiyoredoksin geninin inton analizi	47
Şekil 3.19	Ekzon1 bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması	48
Şekil 3.20	Ekzon1 bölgesindeki farklı olan bölgeler	48
Şekil 3.21	İntron bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması	49
Şekil 3.22	Ekzon2 bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması	49
Şekil 3.23	Çeşitlerin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması	50
Şekil 3.24	Çeşitler arasındaki filogenetik ağaç	50
Şekil 3.25	TAIL - PCR sonuçları	51
Şekil 3.26	Gelen dizilerden bir ortak dizi oluşturma	51
Şekil 3.27	Promotör analizi	52
Şekil 3.28	pPICZα C ekspresyon vektörünün miktar tayini	52
Şekil 3.29	Çoğaltılan geninin PCR ürünü	53
Şekil 3.30	PCR ürününün miktar tayini	53

Şekil 3.31	Genin ve vektörün kesimi	54
Şekil 3.32	Ligasyon ürünleri	54
Şekil 3.33	Rekombinat bakterilerin petri görüntüsü	55
Şekil 3.34	Koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü	56
Şekil 3.35	Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 3.36	Yaprak örneklerindeki ekspresyon seviyesi	57
Şekil 3.37	Farklı dokulardaki ekspresyon seviyesi	58
Şekil 3.38	Meyvelerdeki tiyoredoksin ekspresyon seviyesi	59

## TABLULAR LİSTESİ

<b><u>Tablo Numarası</u></b>	<b><u>Adı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1.1	Çeşitli organizmalarda tiyoredoksinin görevi	5
Tablo 2.1	Polimorfizm için toplanan zeytin çeşitleri	18
Tablo 2.2	PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri	19
Tablo 2.3	Primerlerden çalışma solüsyonu hazırlanması	19
Tablo 2.4	PCR komponentleri, kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları	20
Tablo 2.5	PCR döngü koşulları	20
Tablo 2.6	Elektroforezde kullanılan çözeltiler ve komponentleri	22
Tablo 2.7	Agaroz jelde kullanılan malzemeler	22
Tablo 2.8	Örneklerin toplandığı andaki hava şartları	25
Tablo 2.9	TAIL - PCR programı	27
Tablo 2.10	TAIL - PCR için gerekli komponentler ve kullanılan miktarlar	28
Tablo 2.11	RT - PCR komponentleri ve uygulanma protokolü	29
Tablo 2.12	Anlık gösterimli - PCR döngü koşulları	30
Tablo 2.13	Anlık gösterimli - PCR' da kullanılan komponentler	31
Tablo 2.14	Tiyoredoksin genine ait seyreltme serileri	31
Tablo 2.15	LB çözeltisi bileşenleri ve miktarları	32
Tablo 2.16	Kesimde kullanılan komponentler, konsantrasyonları ve miktarları	35

## KISALTMALAR

### Kısaltma Adı

### Açıklaması

<b>cDNA</b>	Complementary DNA ( Komplementer DNA)
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosid trifosfat
<b>DEPC</b>	Dietilpirokarbonat
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>EDTA</b>	Etilendaimintetraasetik asit
<b>EtBr</b>	Etidyum bromid
<b>gDNA</b>	Genomik DNA
<b>NADPH</b>	Nikotiamit adenin dinükleotit fosfat
<b>Kb</b>	Kilo baz
<b>bp</b>	Base pair ( Baz çifti)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>RT - PCR</b>	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>Taq:</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE:</b>	Tris borat etilendiamintetraasetikasit
<b>UV:</b>	Ultraviyole
<b>TRX:</b>	Tiyoredoksin
<b>LB:</b>	Lauria Bertani
<b>Trp:</b>	Triptofan
<b>Cys (C):</b>	Sistein
<b>GSH:</b>	İndirgenmiş glutatyon
<b>SH:</b>	Sülfür hidroksit
<b>TRXP:</b>	Tiyoredoksin - peroksidaz enzimi
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen peroksit
<b>PAPS:</b>	3' - fosfoadenilsülfat redüktaz
<b>CNS:</b>	Merkezi Sinir Sistemi (Central Nervous System)
<b>FTR:</b>	Ferrodoksin-tiyoredoksin redükt az
<b>FBPase:</b>	Fruktoz - 1,6 - bisfosfataz
<b>NADP - MDH:</b>	NADP - malat dehidrogenaz
<b>NTRA:</b>	NADPH - bağlı tiyoredoksin redüktaz
<b>PSI:</b>	Foto (Photo) Sistem 1
<b>PSII:</b>	Foto (Photo) Sistem 2

<b>Fd:</b>	Ferrodoksin
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>O<sub>2</sub>:</b>	Oksijen molekülü
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit molekülü
<b>DCMU:</b>	3 - (3,4 - diklorofenil)-1,1 - dimetilüre
<b>NMR:</b>	Nükleer manyetik rezonans
<b>AD:</b>	Arbitrary (rastgele bağlanan) primer
<b>TAIL:</b>	Thermal Asymmetric Interlaced
<b>VY:</b>	Var yılı
<b>YY:</b>	Yok yılı
<b>Real – time PCR:</b>	Anlık gösterimli PCR
<b>SNP:</b>	Single - nucleotide polymorphism (tek nükleotit değişikliği)

## ÖNSÖZ

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, deneyimleriyle beni yönlendiren, değerli zamanını ayıran, her türlü konuda sabırla dinleyerek, destekleyen danışman hocam Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli, laboratuvar imkânlarını sağlayan BÜTAM Müdürüğü' ne ve bu merkezde görev alan diğer çalışanlara teşekkür ederim.

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Yard. Doç. Dr. Fatih ÇOŞKUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı yürütürken deneyimlerinden yararlandığım Araş. Gör. Görkem Deniz SÖNMEZ, Araş. Gör. Meltem ALPER ve Araş. Gör. Sümeyye AYDOĞAN hocalarıma, birçok anıyı paylaştığımız ve deneylerimde yardımları olan hem laboratuvar ekibimdeki Öznur SUAKAR ve Şakir AKGÜN' e hem de moleküler biyoloji bölümündeki sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Materyal toplamada yardımlarını esirgemeyen Mehmet YILMAZ, Şenay SÜNGÜ, Zeynep KARABAŞ, Gamze YENER ve Müslime YAVUZ' a teşekkür ederim.

Toplanan zeytin örneklerinin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde nükleazlardan korumak için kullanılan sıvı azotun temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği müdürü Hasan DERTLİ' ye teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2011**

**Gülçin ÇETİN**

## 1. GİRİŞ

### 1.1 Tiyoredoksin Nedir

Tiyoredoksin (TRX) geni, ilk olarak *Escherichia coli*' de bulunmuştur. Tiyoredoksinler tüm prokaryot ve ökaryot canlılarda karakterize edilmiş [1] ve proteinin ısıya dayanıklı, asidik ve küçük molekül ağırlığına (yaklaşık 12kD) sahip olduğu bulunmuştur [2]. *E.coli* tiyoredoksininin 108 aminoasitten oluşan bir polipeptit zincirini kodladığı ve proteinin karakteristik özelliği Trp - Cys – Gly (Ala / Pro) - Pro - Cys - (Lys / Arg) motifine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır [2, 3].

### 1.2. Tiyoredoksinin İşlevi

Tiyoredoksinler, genellikle hedef proteinlerin disülfid köprülerini kırabilen disülfid redüktazlar olarak çalışmaktadırlar. Fakat in vitro koşullarda disülfid köprü oluşumunun teşvikinde de görev alabildiği görülmüştür [1]. Redoks aktif disülfidler, tiyol - disülfid değişim reaksiyonları üzerinde elektron taşınması için gereklidir [4]. Başlangıçta tiyoredoksinlerin hücrede, DNA' nın iskeletine bağlanan deoksiribonükleotitleri ribonükleotitlere çeviren temel enzim olan ribonükleotit redüktaz için hidrojen verici olarak görev aldığına inanılmıştır [2, 5]. *E.coli*' de tiyoredoksin geni eksik olan hücreler geliştirilerek, tiyoredoksinin gerçek işlevlerinin sadece ribonükleotit redüktaz için hidrojen verici olmadığı, ayrıca glutaredoksinin ribonükleotit için alternatif elektron vericisi işlevi ortaya çıkarılmıştır [6]. Disülfidlerin indirgenmesi durumunda proteinlerin korunmasından sorumlu temel disülfid redüktaz, tiyoredoksin redüktaz yardımıyla NADPH' dan alınan elektronlar ile indirgenen tiyoredoksindir [7]. Genellikle hücre içerisinde yüksek seviyede

serbest SH seviyesinden ve düşük redoks potansiyelinden sorumlu diğer temel faktör glutatyon redüktaz ise NADPH tarafından indirgenen glutatyondur (GSH) [8, 9]. GSH - bağımlı disülfid redüktazlar tiyoredoksinlerin işlevleriyle örtüşen glutaredoksinler tarafından uyarılırlar. Hızlı ve tersinir olan tiyol - disülfid değişim reaksiyonları, katalitik SH gruplarını kontrol etmekte ve glutoredoksin yapısının redoks özelliği vasıtasıyla proteinlerin işlevlerini kontrol edebilmektedir [10]. *E.coli*' de tiyoredoksinin diğer görevleri sülfat özümleme, faj oluşumu ve disülfid oksidoredüktaz olarak bulunmuştur [7].

Bakteri, hayvan ve bitki hücrelerinde tiyoredoksin ve tiyoredoksin sistemlerinin yapısı ve fonksiyonları ile ilgili çalışmalar mevcuttur [7, 10-23]. Hayvanlar elektron kaynağı olarak NADPH kullanarak bir flavin enzim tiyoredoksin redüktaz tarafından indirgenen ve tek bir tiyoredoksin sınıfından oluşan tiyoredoksin sistemi içermektedir [24]. Hayvan hücreleri içerisinde tiyoredoksinlerin, hücrel proteinlerinin antioksidan koruması ve transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlenmesi gibi çeşitli süreçlerde [25] gerekli olduğu gösterilmiştir. Tiyoredoksinlerin NF - kB transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivitesini yükselttiği rapor edilmiştir [26]. Ek olarak başka bir transkripsiyon faktörünün (AP - 1) DNA bağlama aktivitesi, tiyoredoksinin değiştirilmiş formu olan bir redoks faktörü (ref - 1) tarafından düzenlenmektedir [27]. Tiyoredoksin - peroksidaz enzimi (TRXP) bileşimindeki tiyoredoksin, pek çok organik ve inorganik oksidantlar ile oksidasyonda hücrel bileşenleri koruduğu gösterilmiştir [28, 29]. Tiyoredoksin - peroksidazlar disülfid bağları boyunca dimerler oluşturur. Tiyoredoksin proteinleri, antioksidanlardan arındırılmış monomerik formda olan dimerik tiyoredoksin - peroksidazları indirgemektedir [30].

### **1.3 Tiyoredoksinin Çeşitleri**

Son yıllarda tiyoredoksin ailesi üyelerinin sayısı önemli ölçüde artmıştır. Tiyoredoksinler, aminoasit dizilerine dayanarak iki aileye ayrılmıştır. Aile I, belirgin bir tiyoredoksin domaini barındıran proteinleri içerirken Aile II ise bir veya daha



fazla tiyoredoksin domainin birleşimi olan ilave domainler ile füzyon proteinlerinin karışımını içerir. Örneğin *Arabidopsis thaliana*'nın genomunda en az 20 gen belirlenmesi sebebiyle tiyoredoksin aile I, diğer organizmalarla kıyasla özellikle bitkiler alemi için önemlidir [31]. Bunun aksine memelilerde 2 mayada 3 ve *Escherichia coli*'de 2 adet tiyoredoksin proteini rapor edilmiştir [32-36].

Yüksek yapılı bitkilerde primer yapıları analizine dayanarak tiyoredoksin aile I, 6 temel gruba ayrılmıştır. Bunlar, Tiyoredoksin f, m, h, o, x ve y'dir. Tiyoredoksin m, x ve y, prokaryotik tiyoredoksinler ile ilişkilendirilmişken tiyoredoksin f, h ve o ökaryotik organizmalara özgüdür. Tiyoredoksin f, m, x ve y kloroplastta yerleşim gösterirken tiyoredoksin o ise mitokondride bulunmuştur [37]. Bitkiler en az 3 tiyoredoksin sınıfı içermektedir. Bunların tümü çekirdek genomu tarafından kodlanmaktadır [38]. Tiyoredoksin m ve f sınıfları, kloroplastta yerleşmiş ve ışığa bağımlı CO<sub>2</sub> fiksasyonda gerekli olan enzimlerin redoks özelliğini düzenlemektedirler [13, 19]. Tiyoredoksin m ve f'nin indirgenmesinde aracı olan ferrodoksin, ferrodoksin - tiyoredoksin redüktaz (FTR) enzimi tarafından uyarılır [7]. Tiyoredoksinin iki tipi seçilen hedef enzimleri aktifleştirme kapasitelerine göre belirlenmiştir [39]. Tiyoredoksin f, fruktoz - 1,6 - bisfosfatazı (FBPase) aktifleştirirken tiyoredoksin m ise NADP - malat dehidrogenaz (NADP - MDH) aktifleştirilmektedir. Ayrıca kloroplastta tiyoredoksin x [40] ve tiyoredoksin y [41] olarak isimlendirilen iki farklı tiyoredoksin belirlenmiştir. 2 - sistein peroksiredoksinleri indirme yetenekleri ile bu tiyoredoksinlerin oksidatif zarara karşı plastidi koruduğu görülmüştür [42]. Tiyoredoksin m'ye benzer olan tiyoredoksin x ise ferrodoksin - tiyoredoksin redüktaz tarafından aktifleştirilir ve 2 - Cys peroksiredoksinin indirgenmesinde etkilidir [43]. Bitki hücrelerinin sitoplâzmasında tiyoredoksin h (heterotropik olduğu için) olarak isimlendirilen tiyoredoksin formu [44, 45] ve bitki mitokondrisinde tiyoredoksin o formu bulunmuştur [46]. Tiyoredoksin o *Arabidopsis*'te karakterize edilmiştir [47] ve NADPH - bağımlı tiyoredoksin redüktaz (NTRA) ve tiyoredoksin o'nun birleşmesiyle tam bir tiyoredoksin sistemi oluşturmaktadır. H sınıfı tiyoredoksinler en yaygın ve en fazla sayıda olan gruptur. Hayvan tiyoredoksinleri gibi bitki h tipi tiyoredoksinler de NADPH - bağımlı tiyoredoksin redüktaz tarafından indirgenir. H sınıfı tiyoredoksinler geniş bir hücre içi dağılıma sahiptir. Genellikle sitoplazmikdir [48].

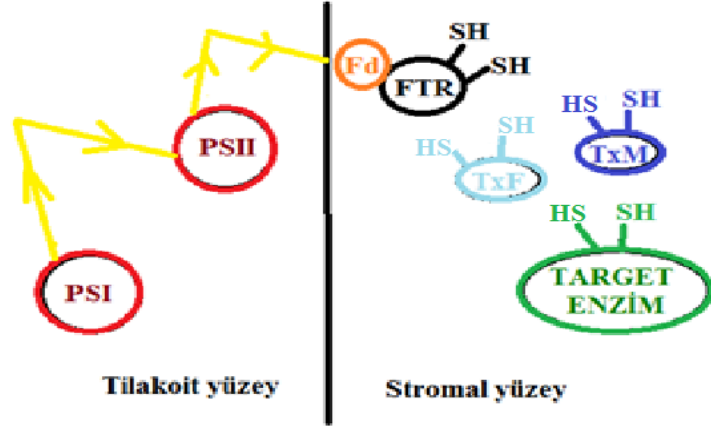
Ancak diğerk hücresele bölümlerde de belirlenmiştir. Marcus ve arkadaşları [49] fasülye endosperminin endoplazmik retikulum hücre bölümlerinden ve mitokondriden tiyoredoksin izole etmiştir. Ek olarak Ishiwatari ve arkadaşları [50] pirincin kalbur tüplerinde temel proteinlerden birinin tiyoredoksin h olduğunu belirlemiştir. Yapılan son çalışmalarda ise Schobert ve arkadaşları [51] bazı dikotiledon ve monokotiledon bitkilerin kalbur tüplerinden izole edilen tiyoredoksinlerin kalbur tüp proteinlerini oksidatif zarardan koruduğunu belirlemiştir. Birçok organizmada bulunan tiyoredoksinlerin temel görevlerinin yanında farklı özgül işlevlere de sahip olduğu bilinmektedir (Tablo 1.1).

Yukarıda görüldüğü gibi, yüksek bitkilerin kloroplastları en az 2 tip tiyoredoksin (fruktoz - 1,6 - bisfosfataz ile etkili bir şekilde aktive edilen f tipi ve NADP - malat dehidrojenaz ile aktive edilen m tipi) içermektedir [52]. Bu iki tiyoredoksinin tiyol disülfid değişim mekanizmaları ile kloroplastik enzimlerin aktivitesini düzenlemek için ışık indirgeyici ferrodoksinin varlığında ferrodoksin - tiyoredoksin redüktazın indirgenmiş olması gerektiği görülmüştür (Şekil 1.1).

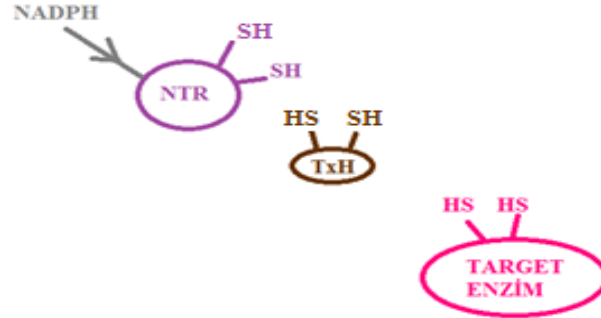
Bitki hücrelerindeki tiyoredoksin sistemine ek olarak, fotosentetik olmayan bakteri ve hayvan hücrelerindeki tiyoredoksin sistemine benzer olan ekstra tiyoredoksin sistemi bulunmuştur. Bu sistemi elektron verici NADPH ve NADPH' yı indirgeyen bir flavoprotein olan NADPH - tiyoredoksin redüktaz oluşturmaktadır (Şekil 1.2) [53].

**Tablo 1.1** Çeşitli organizmalarda tiyoredoksinin görevi

Organizma	Tiyoredoksinin görevi	Açıklamalar
Tüm organizmalar	DNA sentezi Protein disülfid indirgeme	Ribonükleotit redüktaz için hidrojen verici [10]. İndirgenen hücre içi protein disülfidlerin korunmasında anahtar rol oynar [54, 55].
Çoğu organizmalar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin indirgenmesi Metiyonin sülfoksit indirgenmesi ile protein tamiri	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'yi indirgememesini katalizleyen ve böylece oksidatif stresi engelleyen ve apoptozisi tetikleyen çoğu peroksidazları TRX ile indiregenir [56-58]. Metiyonin sülfoksit redüktazlar için hidrojen verici [59, 60].
<i>E. coli</i> fajları	T7 DNA polimerazın alt ünitesi Faj iplikçiklerin oluşumuna katılmak	İşlevliğin artmasıyla oksidoredüktaz aktivitesi gerekmeden tiyoredoksin - SH <sub>2</sub> için spesifik [61]. Faj yapımı ve dışa atımı için gereken <i>E. coli</i> proteinin tek konakçısı [62, 63].
Bakteri ve maya	3' - fosfoadenilsülfat (PAPS) redüktaz için hidrojen verici	Sülfür indirgenmesi için sülfat tarafından Sülfür sentezi [64, 65].
Bitkiler	Kloroplast fotosentetik enzimleri indirgenme	Ferredoksin yoluyla fotosentezin düzenlenmesi [66]
Memeliler	Transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemeleri Apoptosis düzenlenmesi Bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma Gebelik Doğum Merkezi Sinir Sistemi (CNS)	Farklı transkripsiyon faktörleri çekirdek ve sitoplazma karşılaştırmada [67] farklı aktiviteler uygulayan tiyoredoksin tarafından aktive ya da inaktive edilir [68]. Thioredoxin - (SH) <sub>2</sub> apoptozis için aşağı sinyali engelleyici ASK1 ile bir karmaşım yapar [69] Hücre dışı tiyoredoksin hem bir ko - sitokin [70] ve bir kemokin [71] hem de uyarılmış eozinofillerden kesilmiştir [72]. Sitotrofoblastlarda tiyoredoksinin hücre içi ve hücre dışı sentezi gebelik tespitine yardım eder [73-75] Tiyoredoksinin uyarılmasıyla doğumda hiperoksiyandan korur [76]. Sinir hücrelerinden salınan tiyoredoksin iskemiya / reperfüzyona teşvik eder [77].



Şekil 1.1 Ferrodoksin - tiyoredoksin redüktaz [53]



Şekil 1.2 NADPH - tiyoredoksin redüktaz [53]

#### 1.4 Fotosentetik Tiyoredoksinler

Geleneksel olarak, fotosentetik süreç iki faza ayrılmıştır. Işık fazında tilokoitlere yerleşmiş olan ve su oksidasyonuna eşlik eden membrana bağlı elektron transfer sistemi beslenir.  $O_2$  salınımı ile birlikte ATP ve NADPH kofaktörleri üretilir. Bu iki kofaktör kloroplast stromasındaki enzimler tarafından katalizlenen

CO<sub>2</sub> karbon bileşiklerine dönüşüm reaksiyonlarında substrat olarak kullanılır. İkinci faz ışığın sadece ATP ve NADPH' nin sağlanmasında gerekli olması ve ikinci faza doğrudan dahil olamadığına inanılması sebebi ile fotosentezin karanlık reaksiyonları olarak isimlendirilmiştir. Ancak aktivitesi ışık tarafından düzenlenen yani ışıkta aktif karanlıkta inaktif olan fruktoz - 1,6 - bisfosfataz gibi Calvin döngüsü enzimlerinden bazıları 1960 – 70' lerde tanımlanmıştır. Bu sistemin moleküler temelini anlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Diklorofenildimetilüre (DCMU) elektron transfer inhibitörünün kullanımı ile elektron vericisi olan Ditiyoltreitol (DTT) ve biyokimyasal ayırma deneyleri, kloroplastik ferrodoksin - tiyoredoksin sisteminin keşfine neden olmuştur. İlk olarak DCMU ve diğer elektron verici inhibitörlerin kullanımı, fotosentetik elektron transferinin, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu sistem sonradan fruktoz - 1, 6 - bisfosfatazın aktivasyonu için sinyal aktarımında gerekli iki protein fraksiyonu ve ışık indirgeyici ferrodoksin sağlanmasıyla tekrardan kurulmuştur [78]. Sistemdeki proteinlerden biri, memeli tiyoredoksininin homoloğu [79] ve diğeri de tiyoredoksin redüktaza bağlı ferrodoksin redüktaz [80] olarak tanımlanmıştır. Benzer mekanizmayla aktive olmuş bir diğer ışık uyarımlı kloroplastik enzimin (NADP - malat dehidrogenaz) keşfi, ışık uyarımlı kloroplastik enzim sisteminin çok daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Tiyoredoksin m olarak isimlendirilen farklı bir tiyoredoksin tipini fruktoz - 1, 6 – bisfosfataza özgü f tipinden ayırmaktadır [81-83]. Benzer bulgular; ilk olarak sitoplazmik oluşundan dolayı c, daha sonra heterotrofik oluşundan dolayı h olarak isimlendirilen üçüncü tip tiyoredoksini çalışan Wolosiuk ve arkadaşları [48] tarafından elde edilmiştir.

Bitki hücrelerinde tiyoredoksin h proteinlerinin birkaç fonksiyonu belirlenmiştir. Bunların çoğunun da tohum çimlenmesinde rol aldığı görülmüştür. Buğday tohumlarında tiyoredoksinlerin çimlenme sırasında madde taşınmasında gerekli olduğu düşünülmektedir [25]. Özellikle buğday gluteninlerini ve gliyadinlerini indirgediği [84], kalsiyuma bağlı proteaz olan tiyokalsini aktive ettiği [85], dekstrinazı sınırladığı ve alfa - amilazın inhibitörlerini indirgediği gösterilmiştir [86]. Tütün ve *Arabidopsis*' te hızla gelişen dokularda tiyoredoksin h mRNA' ları yüksek seviyede sentezlenmektedir [87, 88]. Mouaheb ve arkadaşları [89], spesifik

*Arabidopsis* h tipi tiyoredoksinlerin sülfat asimilasyon yenilenmesinde ve hidrojen peroksida tolerans sağlamada görevli olduğu bulunmuştur.

Bitkilerde tiyoredoksinlerin tüm sınıflarının çoklu gen ailesi olarak görüldüğü ileri sürülmektedir [90]. *Arabidopsis* genomunda 5 tiyoredoksin h, 4 tiyoredoksin m, 2 tiyoredoksin f ve 1 tane prokaryot kökenli olan başka bir tiyoredoksin formu (tiyoredoksin x) kodlandığı gösterilmiştir [88-91].

## **1.5 Tiyoredoksin Protein Ailesi**

### **1.5.1 Tiyoredoksin Protein Dizileri ve Benzerlik Oranları**

Tiyoredoksinlerin keşfinden kısa bir süre sonra, saflaştırılmış proteinlerden aminoasit dizileri Edman parçalama ve kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir [2]. Moleküler biyolojinin gelişmesiyle prokaryot ve ökaryot organizmaların çoğu cDNA ve gen dizileri erişilebilir olmuştur. Tamamen dizilenmiş olan arkeobakterilerin ilk üyesi olan *Methanococcus jannaschii*' nin tüm genomunun açığa çıkarılması [92] arkeobakterilerin tiyoredoksinlerinin farklı olduğunu göstermiştir. Ancak birinin açık okuma çerçevesi tiyoredoksinler ile yakından ilişkili iken diğerinin tipik bir NADPH - bağlı tiyoredoksin redüktazı kodlamakta olduğu bulunmuştur. Bu yüzden geniş anlamda tiyoredoksin / tiyoredoksin redüktaz sistemi her yaşayan organizmada muhtemelen görülmektedir. Fotosentetik organizmalara ait tiyoredoksin aminoasit dizileri karşılaştırılmıştır [2]. Şimdiye kadar fotosentetik bakterilerde ya protein ya da gen seviyesinde tiyoredoksinin sadece bir formu bulunmuştur [52, 93]. Diğer yandan *Synochocystis* sp. (bu organizmada 4 farklı gen [94]) sistematik dizilenmesiyle kanıtlandığı gibi siyanobakteriler çoklu genlere sahiptir. Çekirdekte kodlanan çoklu tiyoredoksin dizileri yüksek yapılı bitkilerde de belirlenmiştir.

Kloroplastik tiyoredoksinler (f ve m tipi) çeşitli uzunluklarda transit dizisi (30 - 60 aminoasit) ile öncü protein olarak sentezlenmektedirler [95-100].

Genomik dizilerin elde edilmesiyle ökaryotik genlerde intron pozisyonlarının karşılaştırılması farklı bitki tiyoredoksinlerin kökeni hakkında yeni bilgiler vermiştir [101]. Bezelye ve *Chlamydomonas reinhardtii* tiyoredoksin m' de sadece bir tane intron vardır. *C. reinhardtii*' de Met77 ve Val78 aminoasitleri arasında iken bezelyede transit peptit ve ana peptit arasında bulunur. Üç tane intron içeren *C. reinhardtii* [102] haricinde tüm tiyoredoksin h' ler iki introna sahiptir. *Pisum sativum*' da tiyoredoksin f, tiyoredoksin h ve omurgalı tiyoredoksinler ile aynı konumda olan iki introna sahiptir. Böylece dizilerin karşılaştırılmasıyla proteinlerin primer yapısı ortaya çıkarılmıştır. Ökaryotik genlerde genetik belirteç (marker) olarak intronların kullanılmasıyla belirlenen tüm sonuçlar tiyoredoksin m' nin prokaryotik kökenli, tiyoredoksin f ve h' nin de ökaryotik orjinli olduğunu göstermiştir [103].

### 1.5.2 Sekonder Yapıları

*E. coli* tiyoredoksini yapısal biyolojide model olarak çok fazla kullanılmış ve dolayısıyla sekonder ve 3 - boyutlu yapıları şu an çok iyi bilinmektedir [104]. 4 tane bitkinin sekonder yapıları belirlenmiş ve bazen düşük derecede homoloji göstermelerine rağmen tiyoredoksin m, f ve h tipleri tüm bitkilerde *E.coli* modeline benzer bulunmuştur [105-108]. Tüm tiyoredoksin sekonder yapılarının elementleri şunlardır:  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ .  $\alpha 4$ .  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  ve  $\beta 5$  elementleri paralel konumda iken  $\beta 4$  antiparalel konumdadır. *E. coli*' de olduğu gibi beş  $\beta$  plakası  $\alpha$  sarmalları tarafından çevrelenmiştir. Aktif bölgesi  $\beta 2$  ve  $\alpha 2$  arasına yerleşmiştir [2].

Tiyoredoksin proteininin  $\alpha$  sarmalları tarafında çevrilen beş ipliğin birleşimi ile oluşan  $\beta$  plakanın kıvrılan bir merkezi ve yüksek derecede korunmuş ikincil yapısı ile basit bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Bu tip yerleşim, sonraları tiyoredoksinin tipik katlanması olarak kabul edilmiştir. Bu molekülde aktif bölge molekül üzerinde çıkıntı yapan hidrofobik bölgede yer almaktadır [2].

### 1.5.3 Tiyoredoksin Katlanması

Tiyoredoksinin yapısı ilk olarak *E.coli*' nin okside olmuş formunda çözülmüş [109, 110] ve üç boyutlu yapısı X ışını kristallografisi ile açıklanmıştır [111, 112]. Bu proteinlerin önemli dizilerindeki farklılıklara rağmen genel yapılarında büyük benzerlikler görülmektedir [39].

Tiyoredoksin katlanmasında, sistein içeren substratlar ile etkileşime girme özelliğine sahip olan ve 5 belirgin sınıf hepsinde bulunan karakteristik bir yapısal protein motifi bulunur (Şekil 1.3). Tiyoredoksin [109, 111], glutaredoksin [113-116], glutatyon S-transferaz [117-120], canlı hücrede disülfid oluşumunu katalizleyen protein DsbA [121] ve glutatyon peroksidazdan [122, 123] oluşan bu 5 sınıfın 3 boyutlu motif yapısı belirlenmiştir [124].

Bu 5 protein sınıfının dizilerinin belirlenmesi birbirleri arasında yakın bir yapısal benzerlik olmadığını göstermiştir. Dahası 5 proteinin tümünde ortak olan katalitik ve biyolojik fonksiyon bulunmamıştır. Ancak tiyoredoksin, glutaredoksin ve DsbA'nın üçü de redoks proteinlerdir (DsbA diğer iki indirgeyiciden daha disülfid oksidan olmasına rağmen). Ayrıca bu üç protein Cys - X - X - Cys (X olarak gösterilen herhangi bir aminoasit) aktif bölge motifi içermektedir. Aktif bölgedeki



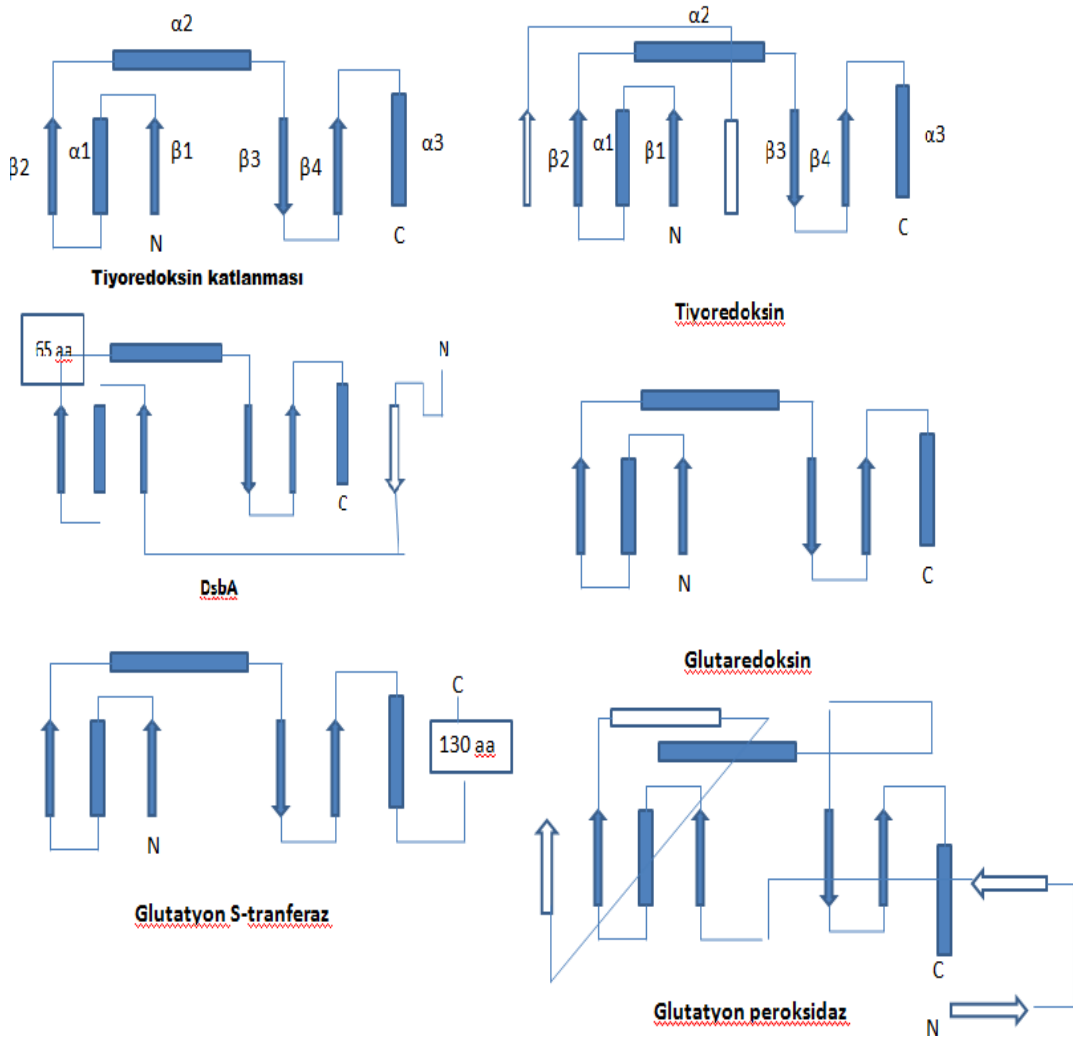
iki sistein arasındaki aminoasitler tiyoredoksin (Cys - Gly - Pro - Cys), glutaredoksin (Cys - Pro - Tyr - Cys) ve DsbA (Cys - Pro - His - Cys) protein sınıflarında oldukça belirgindir [125].

Diğer iki protein tiyoredoksin katlanmasında redoks proteinlerinin Cys - X - X - Cys motifini sergilemez. Ancak bu iki protein sistein içeren glutatyon substratı ile birbirlerini etkilemektedir. Glutatyon peroksidaz hidrojenperokside indirgenme katalizi için elektron verici olarak bu substratı kullanarak selenosistein aminoasiti yoluyla glutatyon ile etkileşir. Glutatyonun sülfidril grubu ve glutatyon S - transferaz arasındaki etkileşimine sitotoksik bileşiklerin elektrofilik grupları için glutatyon taşımalarını katalizleme durumunda korunmuş tirozin aminoasiti ile aracılık edilir. Yapısal olarak tiyoredoksin katlanması ile ilişkilendirilseler de 5 proteinin her biri ayrı ve farklı bir aileye aittir. Bu proteinleri birleştiren tek faktör sistein kimyasıdır: tiyol veya disülfid gruplarına sahip olan substratlar ile tüm etkileşimler [125].

### **1.5.3.1 Tiyoredoksin Katlanmalarının Yapıları**

Tiyoredoksin katlanmasının yapısı öncelikle Eklund ve arkadaşları [126] tarafından tiyoredoksin ve glutaredoksinin yapılarını karşılaştıran makalesinde açıklanmıştır.  $\beta$  plakası ve  $\alpha$  sarmalı katlanmaları N - terminal  $\beta\alpha\beta$  motifi ve 3 sarmalı birleştiren aminoasitlerin ilmekler ile bağlanan C - terminal  $\beta\beta\alpha$  motifi içerisinde alt bölüme ayrılır (Şekil 1.3) [125]. Tiyoredoksin katlanması tiyoredoksinin alt yapısı olduğu için tiyoredoksin katlanmasının sarmalları ve plakaları için kullanılan isimlendirme tiyoredoksin proteinin yapısı için kullanılanlardan farklıdır.

N – terminal motifinden  $\beta 1$  ve  $\beta 2$  paralel çalışırken C - terminal motifindeki  $\beta 3$  ve  $\beta 4$  plakaları antiparaleldir (Şekil 1.3) [125]. Paralel ve antiparalel  $\beta$  - plaka çiftleri tiyoredoksin katlanmalarında karakteristiktir. Ayrıca merkez  $\beta$  - plakası çevresindeki  $\alpha$  - sarmallarının düzenlenmesi de karakteristiktir. N - terminal ve C - terminal motiflerinden  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  sarmalları plakanın bir yanına paralel şekilde düzenlenir. İki motif ile de bağlantılı olan  $\alpha 2$  sarmalı  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  sarmallarına  $\beta$ -plakalarının karşı bölgesinde ve onlara dikey olarak yerleşmiştir (Şekil 1.3) [125].



Şekil 1.3 Tiyoredoksin katlanmaları çeşitleri ve yapıları [125]

Protein yapıları içeren tiyoredoksin katlanma yapılarının karşılaştırılmasıyla yüzeyde aynı yerde konumlanmış sistein / sistein substratı ile etkileşen bölge her protein atomunda görülmüştür. Bu tiyoredoksin katlanmasının  $\alpha 1$  sarmalının N - terminalinde yerleşen ve bir redoks - aktif disülfit / ditiyol grubu paylaşan 3 redoks proteini (tiyoredoksin, glutaredoksin ve DsbA) vardır. Ancak diğer iki proteinin eşdeğer substrat - interaktif aminoasitleri sisteinler değildir ve tiyoredoksin katlanmasının diğer noktalarına yerleşirler. Glutatyon peroksidazın selenosisteini tiyoredoksin katlanmasının  $\alpha 1$  sarmalından önceki döngüde bulunurken glutatyon S-transferazın tirozini ise katalitik  $\beta 1$  plakasındadır.

Tiyoredoksin katlanması yaklaşık 80 aminoasit (aa) içerir. Fakat proteinlerin her biri yapılarında ilave aminoasitlere sahiptir (Şekil 1.3). Glutaredoksin (87 aa) ve tiyoredoksin (108 aa) tek domainli monomerik proteinlerdir. Glutaredoksin tiyoredoksin katlanmasına ilaveleri küçük bir yapıya sahipken tiyoredoksin N - terminalde ekstra  $\alpha$  - sarmal ve  $\beta$  - plakasına sahiptir. DsbA (189 aa) bir monomerdır ama  $\beta 2$  ve  $\alpha 2$  arasındaki bölge içerisine yerleşen ilave bir aminoasit sarmalı ve  $\alpha$  - sarmal domaini olmak üzere iki belirgin domain içermektedir. Son olarak glutatyon peroksidazın 198 aa uzunluğundaki tek domainli alt ünitesi bir homotetramer oluşturur. Onun ilave aminoasitlerinin çoğu DsbA' dakilerle aynı noktaya yani  $\beta 2$  ve  $\alpha 2$  arasına eklenmiştir. DsbA' da olduğu gibi ayrı bir domain oluşturmak yerine glutatyon peroksidazın ilave aminoasitleri  $\beta$  - plaka tiyoredoksin katlanmasında 5 iplikden oluşan tetramer iç yüzeyi üretimi için tiyoredoksin katlanmasının çevresini sarar (Şekil 1.3). Tiyoredoksin, DsbA ve glutatyon peroksidaz tiyoredoksin katlanmasının N - terminalinde ilave aminoasitlere sahiptirler: Tiyoredoksin ve DsbA 5.  $\beta$  - plakasını oluşturur.. Fakat DsbA' da bu plaka tiyoredoksin ve glutatyon peroksidazda olan plakanın karşı tarafının sonundadır (Şekil 1.3).

### 1.5.3.2 Tiyoredoksinin 3 - Boyutlu Yapısı

*E. coli* ve insan lenfositlerinde tiyoredoksinlerin 3 - boyutlu yapıları nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kristalografi ile çok iyi belirlenmiştir [127-129]. Ökaryotik fotosentetik organizmalarla ilgili olan tüm h, m ve f tipi tiyoredoksin yapıları çözümlenmiştir [130]. Tiyoredoksin m *E. coli* tiyoredoksinine benzer olmasına rağmen tiyoredoksin h memelilerin protein tipine daha yakındır. F tipi tipik bir yapıya sahip olmasının yanında kendine has aktiviteleri ile ilişkili olan spesifik özelliklere sahiptir. Tüm bu sonuçlar aminoasit dizilerinin karşılaştırmaları ile de doğrulanmıştır. *C. reinhardtii* tiyoredoksinlerinde 3 - boyutlu yapılar karşılaştırılmıştır. Tiyoredoksin h tiyoredoksin m ile karşılaştırıldığında daha çok sıcaklığı sabitleme aktivitesine sahiptir [102]. Özellikle hidrofobik alanlarda önemli farklılıklar görülmüştür.  $\alpha 1$  sarmalı tiyoredoksin h' de tiyoredoksin m' ye göre daha uzundur.

## **2. MATERYAL – METOD**

### **2.1 Biyoinformatik Analiz**

Tiyoredoksin geninin ve proteinin özellikleri hakkında bilgi edinmek için çeşitli veri tabanlarındaki programlar kullanıldı.

Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü' nde önceden oluşturulan cDNA kütüphanesinden aldığımız bk96 adlı dizinin ne olduğunu bulmak için NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [131] programının nBLAST (Nükleotid Basic Local Alignment Search Tool) veritabanı yardımıyla nükleotid dizisine benzerlik gösterenler farklı türlere ait kayıtlar elde edildi. Daha sonra bu cDNA dizisinin BioEdit programındaki [132] Sorted Six-Frame Translation fonksiyonu ile açık okuma çerçevesi (ORF) bulundu. Bulunan aminoasit dizine göre de NCBI' daki BLAST [131] programının pBLAST (Protein Basic Local Alignment Search Tool) veritabanı yardımıyla hem protein dizisine benzerlik gösteren türlerin kayıtları hem de hangi gen ailesine ait olduğu bulundu.

Tiyoredoksin aktif bölgesini ve özelliğini belirlemek için NCBI veri tabanındaki CDD (Conserved Domain Database) programı [133] kullanıldı.

Tiyoredoksin proteinin 3-boyutlu yapısını ve domainlerinin dizilerini belirlemek için ise Cn3D programı [134-136] kullanıldı.

Tiyoredoksin geninin BioEdit programı [132] yardımıyla zeytin tiyoredoksin cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu ve aminoasit dizisinin ise aminoasit kompozisyonu belirlendi. Tiyoredoksinin hem nükleotit dizisi hem de aminoasit dizisine göre zeytin çeşitleri arasında farklılık gösterip göstermediği belirlendi. Bunun için DNA izolasyonu yapılan örneklerin REFGEN (Ankara) ticari firmasından gelen dizileme sonuçları BioEdit programında [132] işlenerek hizalandı, karşılaştırıldı ve farklılıklar analiz edildi. Zeytin çeşitleri arasındaki akrabalık derecelerine bakmak için BioEdit programı [132] ile hizalanan örnekelerin PAUP programı [137] yardımı ile filogenik ağacı oluşturuldu.

Zeytin tahmini tiyoredoksin proteininin translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ExPASy web sayfasındaki (<http://www.expasy.org>) programlar kullanıldı. Predotar programı [138] ile tiyoredoksin geninin lokalizasyonu tahmin edildi. Tiyoredoksin proteininin transit peptidinin olup olmadığını belirlemek için TARGET-P programı [139] kullanıldı. Tiyoredoksin proteininin hidrofob / filik mi yoksa membran / sitoplazmik özellikte mi olduğu ise SOSUI programı [140] ile belirlendi.

## **2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C' de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edildi.

### 2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama

Polimorfizm için toplanan zeytin (*Olea europaea* L.) eşitlerinin yaprak örnekleri toplandı (Tablo 2.1). Bu rneler Edremit Zeytincilik Fidan retim İstasyonu' nun zeytin bahçesinden temin edildi. Toplanan rneler sıvı azot içerisinde laboratuara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 C dolabına aktarıldı.

### 2.4 DNA İzolasyonu

Tiyoredoksin geni için zeytin (*Olea europaea* L.) eşitleri arasında farklılık olup olmadığını anlamak için zeytin çeşitlerinden (Tablo 2.1) gDNA izolasyonu yapıldı. Bunun içinde Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kiti (Katalog No: G2N70-1KT) kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı.

Elde edilen gDNA rnelerini kalıp olarak kullanarak gen spesifik primerler (oğaltma TRX - R ve oğaltma TRX - F) ile PCR gerçekleştirildi. PCR rnleri jelde yürütüldü ve görüntülendi. Tek bant elde edilen PCR rnleri REFGEN (Ankara) isimli ticari firmaya gönderilerek dizilendi.

**Tablo 2.1** Polimorfizm için toplanan zeytin çeşitleri

1)	Ayvalık	2)	Gordales
3)	Memeli	4)	Memecik
5)	Domat	6)	Manzanilla
7)	UB1	8)	Hojiblanca
9)	Picual	10)	İzmir Sofralık
11)	Koroneiki	12)	Hermandos
13)	Uslu	14)	Kiraz
15)	Çakır	16)	Verdial
17)	Samanlı	18)	0308
19)	UB10	20)	Negral
21)	UB3	22)	Erkence
23)	Ascolana	24)	Leccino

## 2.5 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması

PCR deneylerimizde kullandığımız genlere özel primerler (Tablo 2.2) Primer3 programı [141] ile dizayn edildi. Dizayn edilen primerler yerli aracı şirketler yoluyla Integrated DNA Technologies (Leuvene, Belçika) firmasından temin edildi. Liyofilize haldeki primerler laboratuara geldikten sonra yaklaşık 15 saniye 12000 rpm' de santrifüj yapıldı. Primerlere nükleazlardan arındırılmış sudan 1 mL eklenerek 2 dakika alt üst edildikten sonra 15 saniye vorteks yapıldı. Sulandırılmış primerlerden kullanıma hazır hale getirmek için AD primerleri hariç kullanılan primerlerin çalışma solüsyonlarının son konsantrasyonu 5 $\mu$ M iken AD primerler için son konsantrasyon 10  $\mu$ M olarak ayarlandı. 200  $\mu$ L' lik çalışma solüsyonları uygun konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı (Tablo 2.3).



**Tablo 2.2** PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri

Primerler	Nükleotit dizileri (5' - 3')	Tm
Çoğaltma Trx F	CAG CAA <u>GAT CGA TCC</u> CTA	54.5 °C
Çoğaltma Trx R	AAA AAT <u>TCT AGA TCG</u> AAT AAT	51 °C
RT-TRX R	TCT AAG TAA CAG ACA CAG ACC	56.7 °C
RT-TRX F	TTG AAA AAT ACA AGG TAT ATG	52.4 °C
TRX-TAIL1	TAC TTT ATT AAC GAT GAC TTT	53.6 °C
TRX-TAIL2	AGT TTA TAG TTA TTA ACG AAA	53.7 °C
TRX-TAIL3	ACT ATT CAC TGT ACG AAC CGA	55.7 °C
AD 1	NTC GAS TWT SGW GTT	43.7 °C
AD 2	NGT CGA SWG ANA WGA A	45.6 °C
AD 2a	STT GNT AST NCT NTG C	45.2 °C
AD 3	WGT GNA GWA NCA NAG A	44.6 °C
AD 5	WCA GNT GWT NGT NCT G	46.7 °C

(Altı çizili nükleotitler klonlama amaçlı primer dizilerine eklenen restriksiyon enzimi tanıma nükleotitlerini göstermektedir.)

**Tablo 2.3** Primerlerden çalışma solüsyonu hazırlanması

Primerler	Molaritesi	Çalışma solüsyonu
Çoğaltma Trx F	5 µM	39.8 µL primer + 160.2 µL distile su
Çoğaltma Trx R	5 µM	33.3 µL primer + 166.7 µL distile su
RT-TRX R	5 µM	35.4 µL primer + 164.6 µL distile su
RT-TRX F	5 µM	29.8 µL primer + 170.2 µL distile su
TRX-TAIL1	5 µM	38 µL primer + 162 µL distile su
TRX-TAIL2	5 µM	34.4 µL primer + 165.6 µL distile su
TRX-TAIL3	5 µM	32.9 µL primer + 171.9 µL distile su
AD1	10 µM	24.7 µL primer + 175.3 µL distile su
AD2	10 µM	22.2 µL primer + 177.8 µL distile su
AD2a	10 µM	24.1 µL primer + 175.1 µL distile su
AD3	10 µM	22.7 µL primer + 177.3 µL distile su
AD5	10 µM	27.3 µL primer + 172.7 µL distile su

## 2.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR reaksiyonları 50 µL' lik toplam hacimde Tablo 2.4' de gösterilen gerekli komponentler belirtilen miktarlarda eklenerek primerlerin ortak çalıştığı sıcaklıklarda Tablo 2.5' deki PCR programında gerçekleştirildi. Özellikle gDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı deneylerde uygulanan PCR reaksiyonlarına standart komponentlere ilaveten DMSO (dimetil sülfoksit) eklenmesinin verimi arttırdığını gözlemlendi.

**Tablo 2.4** PCR komponentleri, kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları

<b>Komponent</b>	<b>Miktar</b>	<b>Konsantrasyon</b>
Tampon	5 µL	10 X
MgCl <sub>2</sub>	3 µL	25 mM
Primer F	5 µL	5 µM
Primer R	5 µL	5 µM
dNTP (2 mM)	5 µL	2.5 mM (her biri için)
DMSO	2 µL	
gDNA (kalıp genomik DNA)	1 µL	
Taq Polimeraz	0.5 µL	5 ünite
Distile su	23.5 µL	
Toplam	50 µL	

**Tablo 2.5** PCR döngü koşulları

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü</b>
Ön ısıtma	95 °C	1 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35
Eşleşme	53 °C	45 saniye	
Sentez	72 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	5 dakika	1

## 2.7 Agaroz Jel Elektrofözezi

Agaroz jel elektrofözezi için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen Atto marka (Tokyo, Japonya) elektroföze sistemi kullanıldı. Elektroföze de kullanılan Agaroz (Katalog No: A9539-100G) Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasından temin edilirken, TBE tampon çözeltisi için gerekli olan trizma bazı (Katalog No: 0826-500G) Amresco (Solon, Ohio) firmasından, borik asit (Katalog No: A0768,1000) ve EDTA (Katalog No: A5097,0250) ise Appllichem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. TBE (5 X) tampon çözeltisi oluşturmak için kullanılan bileşenler belirli miktarlarda eklendi (Tablo 2.6). Bu tampon çözeltisinden de elektroföze de kullanmak için TBE (0.5 X) tampon çözeltisi hazırlandı (Tablo 2.6). Zeytinden izole edilen gDNA (Tablo 2.1) ve RNA örneklerini gözlemek için %0.8' lik agaroz jeli hazırlandı. Bunun için 0.4 g agaroz 50 mL TBE (0.5 X) tampon çözeltisi içerisine eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Karışımın yaklaşık 60 °C' ye kadar soğuması için beklenen sürede elektroföze tankı ve taraklar özellikle RNA örnekleri için DEPC' li su ile yıkanarak steril edildi. Soğuyan karışımın içerisine 0.5 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek, önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkartıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektroföze tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar TBE (0.5 X) tampon çözeltisi ile dolduruldu. İlk kuyucuğa Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilen belirteç (Katalog No: SM1333) yüklendi (Şekil 2.7). gDNA örnekleri için 5 µL gDNA ve 1 µL (6 X) yükleme boyası (Şekil 2.7) karıştırılırken RNA örnekleri için 3 µL RNA kalıbı, 2 µL distile su ve 1 µL yükleme boyası eklenerek jeldeki kuyucuklara pipet yardımıyla yükleme yapıldı. Örnekler 100 volt elektrik akımı verilerek yaklaşık 35 dakika yürütüldü. Yürütülen DNA ve RNA örnekleri UV görüntüleme cihazında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

**Tablo 2.6** Elektroforezde kullanılan çözeltiler ve komponentleri

<b>Çözeltiler</b>	<b>Kompozisyonu (1L için)</b>
TBE (5 X)	54 g Trizma - baz (Tris - base)
	27.5 g Borik Asit
	20 mL 0.5 M EDTA ( pH:8)
TBE (0.5 X)	100 mL TBE (5 X)
	900 mL distile su

**Tablo 2.7** Agaroz jelde kullanılan malzemeler

<b>Yükleme boyası</b>	Fermentas GeneRuler™ DNA Ladders (Katalog No: SM0313)
<b>Markır</b>	Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333)

## 2.8 Anlık Gösterimli PCR İçin Bitki Materyali Toplama

Balıkesir merkezde yetişen “var yılı” (Şekil 2.1) ve “yok yılı” (Şekil 2.2) olarak tespit edilen zeytin ağaçlarından genin ekspresyon seviyesini belirlemek için çeşitli dokularadan örnekler toplandı. “Var yılı” ve “yok yılı” ifadeleri zeytin bitkisinin sırasıyla çok meyveli ve az meyveli durumunu ifade etmektedir. Bu ağaçlardan 12 ay boyunca her ay çeşitli dokularından örnekler toplandı. Her toplamada tarih, hava durumu, hangi örneklerden ve hangi ağaçtan toplandığı hakkındaki bilgiler not edildi (Tablo 2.8). Toplanan örnekler sıvı azot içerisinde laboratuara getirildi ve -80 °C’ de muhafaza edildi.



**Şekil 2.1** “Var yılı” olarak belirlenen 1. ağaç



**Şekil 2.2** “Yok yılı” olarak belirlenen 2. Ağaç

## 2.9 Toplam RNA İzolasyonu

Tiyoredoksin mRNA' sının zamansal ve dokusal ekspresyon seviyelerini belirlemek için 12 ay boyunca toplanan “var yılı” ve “yok yılı” zeytin ağaçları örneklerinden (Tablo 2.8) RNA izolasyonu yapıldı. Bunun için de -80 °C dolabında saklanan örneklerden izolasyon yapmak için Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait Spectrum Plant Total RNA Kiti (Katalog No: STRN50-1KT) kullanıldı. İzolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. Bu kitin zeytin yaprak örneklerinde oldukça başarılı iken meyve örnekleri ile yapılan izolasyonlarda başarısız olduğu gözlemlendi. Bu nedenle meyve örnekleri için Qiagen (Hilden, Almanya) firmasına ait RNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 74904) kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı.

Toplam RNA örneklerindeki DNA moleküllerini ortadan kaldırıp daha saf RNA örneği elde etmek için DNaz enzimi kullanıldı. Sigma (Taufkirchen, Almanya) kiti ile yapılan örnekler aynı firmaya ait On - Column DNase I Digestion kiti (Katalog No: DNASE70-1SET) ile, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile izole edilen meyve RNA örnekleri ise Qiagen (Hilden, Almanya) firmasına ait On-Column DNase Digestion with the RNase-Free DNase Enzyme kiti (Katalog No: 79254) ile muamele edildi. İşlemler üretici firma protokollerine uygun şekilde gerçekleştirildi.

## 2.10 DEPC' li Su Hazırlama

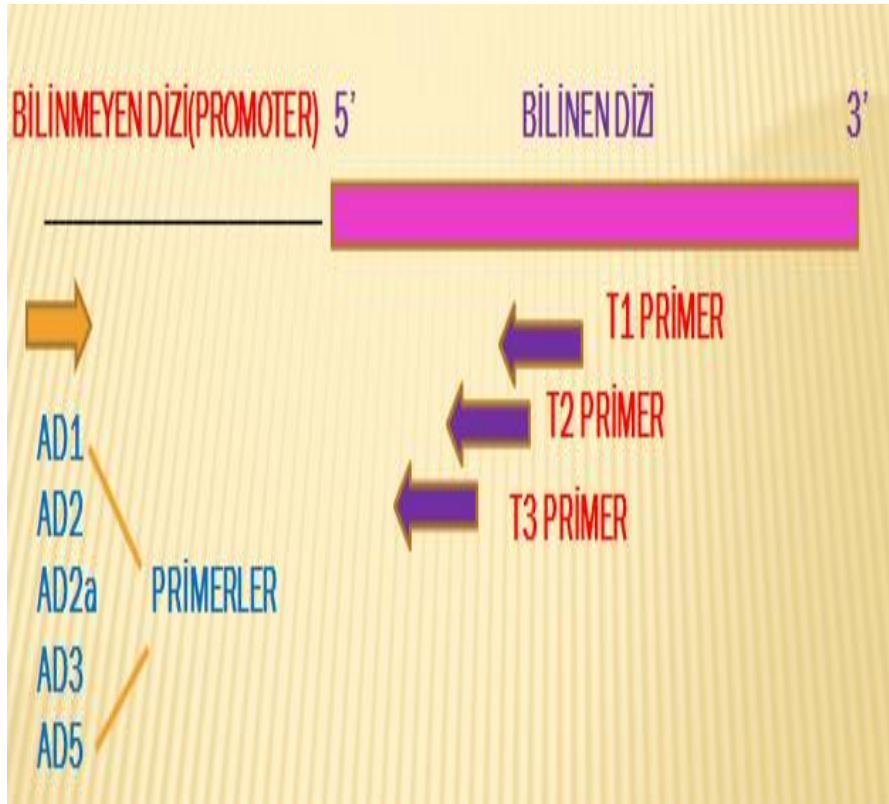
RNA örneklerini nükleazlardan korumak için steril ortam sağlamak için DEPC' li su kullanıldı. DEPC' li suyun hazırlanmasında Sigma firmasına (Taufkirchen, Almanya) ait DEPC (Katalog No: D5758) kullanıldı. 0.1 mL DEPC 100 mL suya eklendi ve alt üst edildi. 37 °C' de 12 saat bekletildikten sonra 15 dakika otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

**Tablo 2.8** Örneklerin toplandığı andaki hava şartları

Tarih	Sıcaklık Ortalama	Nem Ortalama	Örnekler
15.04.2010	15 °C	%61	Tomurcuklu yaprak (1.Ağaç)
			Tomurcuksuz yaprak (2.Ağaç)
			Sürgün (3.Ağaç)
14.05.2010	21 °C	%47	Yaprak (1.Ağaç)
			Tomurcuk (1.Ağaç)
			Çiçek (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Tomurcuk (2.Ağaç)
			Tomurcuk+çiçek (2.Ağaç)
			Sürgün (3.Ağaç)
17.06.2010	26 °C	%60	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Sürgün
15.07.2010	26 °C	%61	Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Meyve (2.Ağaç)
19.08.2010	27 °C	%55	Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
22.09.2010	20 °C	%61	Olgunlaşmamış meyve (1.Ağaç)
			Olgunlaşmış meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Olgunlaşmamış meyve (2.Ağaç)
19.10.2010	20 °C	%71	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Pedisel (1.Ağaç)
			Meyve
22.11.2010	7 °C	%84	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
20.12.2011	11 °C	%72	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
19.01.2011	2 °C	%81	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Yaprak (3.Ağaç)
21.02.2011	6 °C	%63	Yaprak (3.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
16.03.2011	12 °C	%41	Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Sürgün (3.Ağaç)

## 2.11 TAIL - PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)

Tiyoredoksin geninin promotörünü bulmak için ilk olarak 5' ucuna ters yönde cDNA dizimizden kademeli olarak TAIL1, TAIL2 ve TAIL3 primerleri (bkz. Tablo 2.2) Primer3 programı [141] yardımıyla tasarlandı. Bu primerlere karşılık olarak rastgele bağlanan primerler (AD1, AD2, AD2a, AD3 ve AD5) (bkz. Tablo 2.2) Liu Y.G. ve arkadaşlarının [142, 143] detaylı olarak analiz ettiği TAIL-PCR protokolü modifiye edilerek kullanıldı. Optimize edilen PCR reaksiyonları kademeli olarak gerçekleştirildi (Tablo 2.9). Bu PCR' ların her biri için farklı komponentler kullanıldı (Tablo 2.10). Şekil 2.3' de TAIL - PCR' ın mekanizması şematize edilmiştir.



Şekil 2.3 TAIL - PCR' ın mekanizması



**Tablo 2.9 TAIL - PCR programı**

	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü</b>
<b>TAIL1 - PCR</b>			
1. Basamak	92 °C	3 dakika	1
2. Basamak	95 °C	1 dakika	
3. Basamak	94 °C	30 saniye	5
4. Basamak	60 °C	1 dakika	
5. Basamak	72 °C	2 dakika	
6. Basamak	94 °C	30 saniye	1
7. Basamak	25 °C	2 dakika	
8. Basamak	72 °C	2 dakika	
9. Basamak	94 °C	30 saniye	30
10. Basamak	60 °C	1 dakika	
11. Basamak	72 °C	2 dakika	
12. Basamak	72 °C	5 dakika	1
<b>TAIL2 - PCR</b>			
1) Basamak	94 °C	30 saniye	12
2) Basamak	60 °C	1 dakika	
3) Basamak	72 °C	2 dakika	
4) Basamak	94 °C	30 saniye	
5) Basamak	60 °C	1 dakika	
6) Basamak	72 °C	2 dakika	
7) Basamak	94 °C	30 saniye	
8) Basamak	45 °C	1 dakika	
9) Basamak	72 °C	2 dakika	
10) Basamak	72 °C	5 dakika	1
<b>TAIL3 - PCR</b>			
1) Basamak	94 °C	30 saniye	20
2) Basamak	45 °C	1 dakika	
3) Basamak	72 °C	2 dakika	
4) Basamak	72 °C	5 dakika	1

**Tablo 2.10** TAIL - PCR için gerekli komponentler ve kullanılan miktarlar

<b>TAIL1</b>	<b>Miktar</b>
Tampon (10 X)	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.2 µL
Primer TAIL1 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.4 µL
DMSO	0.4 µL
gDNA (kalıp)	2 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	6.5 µL
AD Primer (10 µM)	5 µL
<b>TAIL2</b>	
Tampon (10 X)	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
Primer TAIL2 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.4 µL
DMSO	0.5 µL
1 / 40 TAIL1 PCR ürünü (kalıp)	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	12.6 µL
AD Primer (10 µM)	5 µL
<b>TAIL3</b>	
Tampon (10 X)	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 µL
Primer TAIL3 (5 µM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.8 µL
DMSO	1 µL
1 / 10 TAIL2 PCR ürünü (kalıp)	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
Distile su	26.7 µL
AD Primer (10 µM)	10 µL

## 2.12 Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PCR)

Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından yerli firmalar aracılığıyla temin edilen RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti (Katalog No: K1622) kullanılarak ters transkripsiyon (RT - PCR) ile RNA' dan cDNA elde edildi ve bunun için kit protokolü takip edildi. PCR reaksiyonları 20 µL' lik toplam hacim içerisinde Tablo 2.11' deki komponentlerden belirtilen miktarlarda eklenerek gerçekleştirildi.

**Tablo 2.11** RT - PCR komponentleri ve uygulanma protokolü

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Konsantrasyon</b>
Kalıp RNA	5 µL	-
Oligo (dT)18 primer	1 µL	-
DEPC' li su	6 µL	-
5 dakika 65 °C' de inkübasyon		
Tampon	4 µL	5 X
RNaz inhibitörü	1 µL	20 U / µL
dNTP Mix	2 µL	10 mM
Revers Transkriptaz	1 µL	200 U / µL
60 dakika 42 °C' de inkübasyon		
5 dakika 70 °C' de inkübasyon		

### 2.13 Anlık Gösterimli PCR (Real-time - PCR)

Zeytin bitkilerinin çeşitli dokularından 12 ay boyunca toplanan örneklerden (Tablo 2.8) ters transkripsiyon PCR ile elde edilen cDNA örnekleri anlık gösterimli PCR için kalıp olarak kullanıldı. Anlık gösterimli PCR, Bioneer (Seoul, Kore) firmasına ait GreenStar qPCR PreMix (Katalog No: K-6210) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Anlık gösterimli PCR için gerekli malzemeler kitin kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde ilave edilerek Bioneer (Seoul, Kore) markalı anlık gösterimli PCR cihazı ile Tablo 2.12’ de gösterilen programda gerçekleştirildi. PCR için kullanılan komponentler ve miktarları Şekil 2.13’ de gösterildi. Anlık gösterimli PCR reaksiyonları, her bir cDNA örneği için, hem zeytin tahmini tiyoredoksin genine hem de normalizör gen olan *GAPDH*’ e (GenBank erişim no: 154260889) ait özgül primerler kullanılarak 3’ er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

**Tablo 2.12** Anlık gösterimli PCR döngü koşulları

Basamak	Fonksiyon	Sıcaklık	Zaman	Döngü
1. Basamak	İnkübasyon	95 °C	5 dakika	-
2. Basamak	İnkübasyon	94 °C	15 saniye	-
3. Basamak	İnkübasyon	55 °C	15 saniye	-
4. Basamak	Tarama	-	-	-
5. Basamak	İnkübasyon	72 °C	15 saniye	-
6. Basamak	Basamak 2’ ye dön	-	-	35
7. Basamak	İnkübasyon	72 °C	1 dakika	-
8. Basamak	Erime (Melting)	70 °C – 94 °C	Her 1 saniyede 1 °C	-

**Tablo 2.13** Anlık gösterimli PCR’ da kullanılan komponentler ve konsantrasyonları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Konsantrasyon</b>
cDNA Kalıp	1 µL	-
Primer L	1 µL	5 µM
Primer R	1 µL	5 µM
DEPC’ li su	17 µL	-
GreenStar qPCR PreMix	-	-

#### **2.14 Standart Eğrinin Oluşturulması**

Standart PCR yöntemi ile çoğaltılmış tiyoredoksin cDNA’ sının konsantrasyonu, spektrofotometrik ölçümler sonucunda 100 ng / µL olarak belirlendi. Standart eğri elde etmek için tiyoredoksin PCR ürününe ait seyreltme serilerini (Tablo 2.14) kullanarak 3’ er tekrarlı olacak şekilde anlık gösterimli PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 2.12). Standart eğriden elde edilen;

$$Y = - 0,3544 * X + 12,9982 \quad (2.1)$$

formülünden yola çıkarak *GAPDH* ve tiyoredoksin genlerinin konsantrasyonları tespit edildi.

**Tablo 2.14** Tiyoredoksin genine ait seyreltme serileri

Dilasyon	ng / µL	g / µL	Baz Çifti	Kopya sayısı / µL
1.00E+00	100	1.E-7	600	3.E+10
1.00E+01	10	1.E-8	600	3.E+09
1.00E+02	1	1.E-9	600	3.E+08
1.00E+03	0.1	1.E-10	600	3.E+07
1.00E+04	0.01	1.E-11	600	3.E+06
1.00E+05	0.001	1.E-12	600	3.E+05
1.00E+06	0.0001	1.E-13	600	3.E+04
1.00E+07	0.00001	1.E-14	600	30000
1.00E+08	0.000001	1.E-15	600	300
1.00E+09	0.0000001	1.E-16	600	30
1.00E+10	0.00000001	1.E-17	600	3

### 2.15 Sıvı Lauria Bertani (LB) ve LB Agar Hazırlanması

500 mL Lauria Bertani (LB) veya LB agar hazırlamak için Tablo 2.16' da gösterilen gerekli bileşenler belirli miktarlarda ilave edilerek 500 mL saf su ile çözüldü. 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. 55 °C' ye kadar soğutulan besi yerine Invitrogen (Carlsbad, Kanifornya) firmasından temin edilen zeozin (Katalog No: R25001) son konsantrasyon 25 µg / mL olacak şekilde eklenerek sıvı veya 25 mL' lik hacimlerde katı besi yerleri hazırlandı.

**Tablo 2.15** LB çözeltisi bileşenleri ve miktarları

LB Çözeltisi	Miktar (500 mL için)
Tripton	2.5 g
Hefe Ekstraktı	1.25 g
Sodyum Klorid	2.5 g
Agar Agar (Katı besiyeri için)	3.75 g
Zeozin	125 µL

## 2.16 Kompetan Hücre Hazırlanması

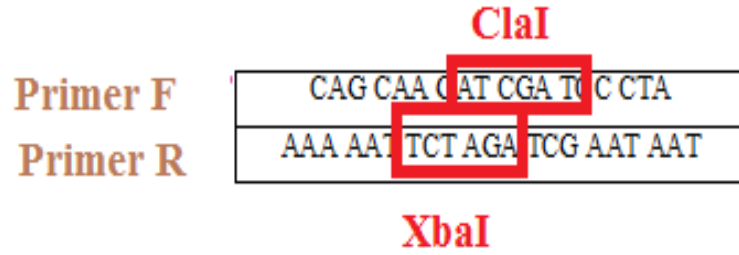
Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* DH10B ve DH5 $\alpha$  suşlarına ait kompetan hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı [144]. Bir gece önceden öze ile 5 mL LB besiyerine tek koloni inoküle edildi. Sıvı kültür gece boyunca 210 rpm'de çalkalanarak büyütüldü. Hazırlanan kültür spektrofotometre' de 600 nm' de ölçülerek yoğunluğu belirlendi ve optik yoğunluk 600 nm' de (OD<sub>600</sub>) 0.2 olacak şekilde tekrar 40 mL taze LB besiyerine ekim yapıldı. OD<sub>600</sub> 0.4 - 0.6 arasına ulaşınca hücreler 4 °C' de 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti (çökeltisi) 20 mL soğuk 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek çözüldü ve 30 dakika buzda bekletildi. Sonrasında 4 °C' de 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti 5 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ile çözülerek 1 - 4 saat arasında buzda bekletildi. 5 mL %40' lık soğuk gliserol ilave edildikten sonra buz üzerinde soğutulmuş ependorflara 50  $\mu$ L olacak şekilde dağıtıldı ve -80 °C' de muhafaza edildi.

## 2.17 Tioredoksin Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

### 2.17.1 Tioredoksin Geninin Çoğaltılması

Zeytin TRX geni restriksiyon endonükleazlar açısından incelendiğinde *ClaI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içermediği gözlemlendi. Bu nedenle genin pPICZ $\alpha$ C vektörünün *ClaI* ve *XbaI* bölgesine klonlanması kararlaştırıldı. Tüm genin PCR' da amplifikasyonu için primer3 programı [141] yardımıyla dizayn edilen uygun primerlerin (Çoğaltma TRX - R ve Çoğaltma TRX - F) 5' uçlarına ilgili restriksiyon endonükleazlar için kesim bölgeleri ilave edildi (Şekil 2.4). Zeytin cDNA kütüphanesinde bulunan Fermentas (Vilnius, Litvanya)

firmasından temin edilen pJET1.2 / blunt vektörüne (Katalog No: K1231) klonlu tiyoredoksin genini tam uzunlukta çoğaltmak için gen spesifik primerlerini (Çoğaltma TRX - R ve Çoğaltma TRX - F) içeren standart PCR komponentleriyle (Tablo 2.4) PCR (Tablo 2.5) gerçekleştirildi.



**Şekil 2.4** Çoğaltma primerlerinin kesim bölgeleri

PCR ürünü, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait GenElute Gel Extraction Kit (Katalog No: NA1111-1KT) ile kullanma kılavuzu takip edilerek saflaştırıldı. Saflaştırılmış PCR ürünü, %0.8' lik agaroz jelde yürütülerek miktarı tespit edildi.

### **2.17.2 Genin ve pPICZ $\alpha$ C Ekspresyon Vektörünün Kesilmesi**

Zeytin tiyoredoksin gen ürününün, Invitrogen (Carlsbad, CA) firmasından temin edilmiş EasySelect *Pichia* Expression Kit (Katalog No: K1740-01) içinde mevcut pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörüne uygun çerçevede klonlanabilmesi için gen



ürünü ve klonlama vektörü Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilen FastDigest® *ClaI* (Katalog No: FD0144) ve FastDigest® *XbaI* (Katalog No: FD0684) restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonları gerçekleştirildi.

Komponentler Tablo 2.16' da gösterildiği gibi belirli miktarlarda eklenerek 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi. Hem gen ürünü hem de ekspresyon vektörü için reaksiyonlar 30 µL' lik toplam hacimlerde 5 ayrı mikrosantrifüj tüplerinde uygulandı.

**Tablo 2.16** Kesimde kullanılan komponentler, konsantrasyonları ve miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Miktar</b>
10X FastDigest Tampon	-	3 µL
TRX PCR ürünü / pPICZαC ekspresyon vektörü	150 ng / µL	5 µL
FastDigest <i>ClaI</i>	1 U / µL	1.5 µL
FastDigest <i>XbaI</i>	1 U / µL	1.5 µL
Nükleaz içermeyen su	-	19 µL
<b>TOPLAM</b>	-	<b>30 µL</b>

### 2.17.3 Genin pPICZαC Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu

*ClaI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş zeytin tiyoredoksin geni pPICZαC ekspresyon vektörünün aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş klonlama bölgesine ligasyonu yapıldı. Ligasyon, toplam 20 µL hacimde Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilen T4 DNA Ligaz(Katalog No: EL001) enzimi kullanılarak

yapıldı. Ligasyon reaksiyonu 2 µL T4 DNA Ligaz tampon çözeltisi (10 X' den), 1 µL T4 DNA ligaz (5 U / µL), 3 µL *ClaI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş ekspresyon vektörü ve 14 µL *ClaI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş gen ürünü kullanılarak 22 °C' de 45 dakika olarak gerçekleştirildi.

#### **2.17.4 Rekombinant Ekspresyon Vektörünün Transformasyonu**

Zeytin tiyoredoksin genini taşıyan pPICZαC vektörü *E. coli* DH5a suşu kompetan hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi [144]. Transformasyon için, 3 µL ligasyon ürünü, -80 °C dolabında muhafaza edilen 50 µL alıcı hücre içerisine ilave edildikten sonra 30 dakika buzda bekletildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 42 °C' de hazırlanan su banyosunda 1.5 dakika bekletilerek plazmitin hücre içerisine alınması sağlandı. Isı şokunun ardından tüp içerisine 200 µL LB besi yeri (25 µg / mL zeozin içeren sıvı besi yeri) eklendi. Alıcı hücreler 2 saat çalkalayıcı inkübatörde bekletildikten sonra 250 µL LB agar katı besine ekimi yapıldı. Transformasyon ürünlerinin ekildiği petripler 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

#### **2.17.5 Rekombinant Kolonilerin Tespiti (Koloni PCR)**

İnokülasyon sonrası petride büyüyen kolonilerden rastgele seçilerek koloni PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Seçilen 50 koloniden her biri 20 µL distile su içerisinde seyreltildi. Bu seyreltik hücrelerden 3 µL zeozin' li katı besine (kısa süreli stok için) ekilerek 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. 2 µL' si ise koloni PCR' da kalıp olarak kullanıldı. Bu koloniler, AOX primerleri kullanılarak yapılan

standart PCR reaksiyonu (Tablo 2.5) ile genin varlığı açısından tarandı. PCR ürünleri %0.8 agaroz jelde yürütüldü ve UV jel görüntüleme cihazında görüntüledi.

### **2.17.6 Rekombinant pPICZ $\alpha$ C Plazmit Vektörünün İzolasyonu**

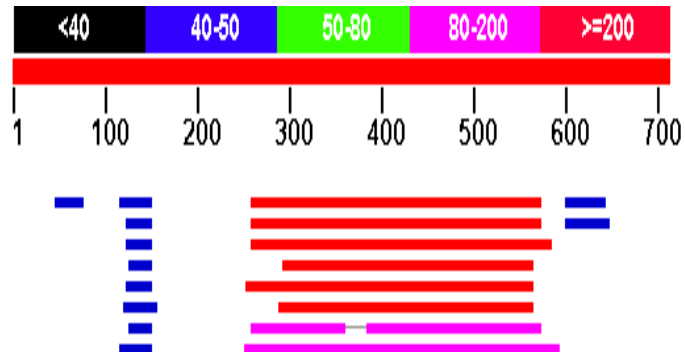
Koloni PCR sonucunda rekombinant olduğu düşünülen kolonilerden plazmit DNA' sını izole etmek amacıyla zeozinli (25  $\mu$ g / mL) LB' ye ekimler yapılarak 37 °C' de bir gece inkübe edildi. Plazmit DNA' sı Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait GenElute HP Plazmit Miniprep Kiti (Katalog No: NA0150-1KT) kullanılarak izole edildi. İzole edilen plazmit DNA' ları REFGEN (Ankara) aracılığıyla dizilendi. Dizileme sonucunda pozitif sonuç veren klonlardan gliserol stoklar hazırlandı ve -80 °C dolabında muhafaza edildi.

## BULGULAR

### 3.1 Bioinformatik Analiz

#### 3.1.1 BLAST Analizi

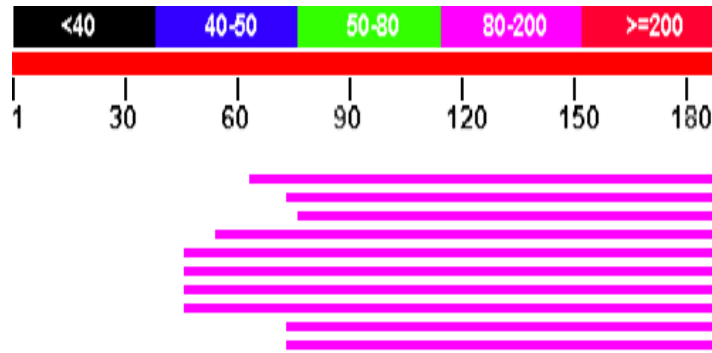
Elimizde var olan ve başlangıçta ne olduğunu bilmediğimiz bk96 adlı cDNA dizisini NCBI' daki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programının [131] nBLAST veritabanında yapılan analizde bulunanlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2' de gösterilmektedir. pBLAST veritabanı kullanılarak aminoasit dizisi analiz edildi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Kütüphaneden alınan bk96 cDNA dizisinin hangi aileye ait olduğu bulundu (Şekil 3.5).



Şekil 3.1 cDNA dizisinin BLAST analizi sonucu

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gi 225462577 XR_077571.1</a>	PREDICTED: Vitis vinifera misc_RNA (LOC100258388), miscRNA	248	248	44%	4e-62	77%
<a href="#">gi 225462567 XM_002268226.1</a>	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100242924 (LOC100242924), protein_coding	248	248	44%	4e-62	77%
<a href="#">gi 225313556 AK327501.1</a>	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL2031F10, HTC in fruit	237	237	45%	6e-59	76%
<a href="#">gi 255630680 BT091523.1</a>	Soybean clone JCVI-FLGm-805 unknown mRNA	221	221	38%	6e-54	78%
<a href="#">gi 224094046 XM_002310030.1</a>	Populus trichocarpa thioredoxin x (PtrcTrxx), mRNA	212	212	43%	3e-51	75%
<a href="#">gi 255629032 BT090791.1</a>	Soybean clone JCVI-FLGm-514 unknown mRNA	206	206	38%	1e-49	76%
<a href="#">gi 147855893 AM445766.2</a>	Vitis vinifera contig VV78X249574.6, whole genome shotgun sequence	165	246	41%	4e-37	79%
<a href="#">gi 297852731 XM_002894201.1</a>	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	163	163	48%	1e-36	70%

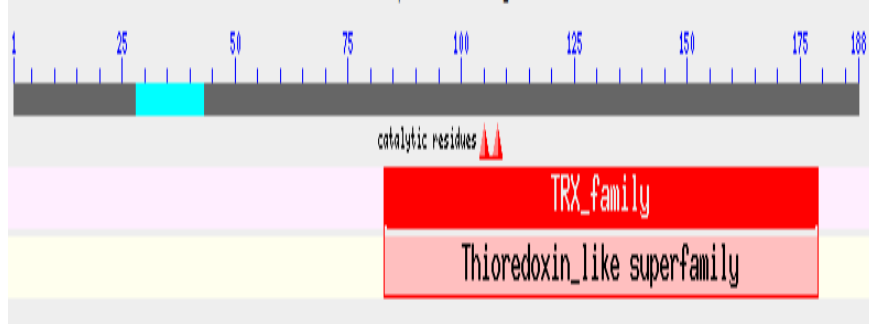
Şekil 3.2 cDNA dizisine benzeyen nükleotit kayıtları



Şekil 3.3 Protein dizisinin BLAST analizi

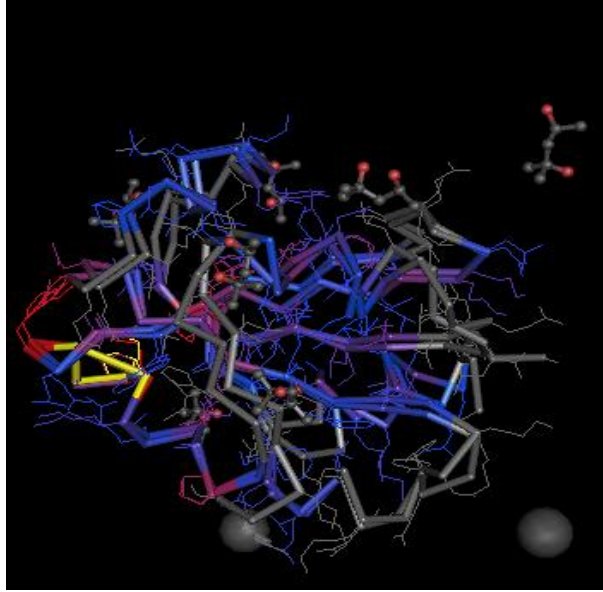
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
<a href="#">gi 255630681 ACU15700.1</a>	unknown [Glycine max]	189	189	66%	1e-46
<a href="#">gi 255629033 ACU14861.1</a>	unknown [Glycine max]	185	185	61%	3e-45
<a href="#">gi 224094047 XP_002310066.1</a>	thioredoxin x [Populus trichocarpa] >gi 222852969 gb EEE90516.1	182	182	59%	1e-44
<a href="#">gi 225462568 XP_002268262.1</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	179	179	70%	2e-43
<a href="#">gi 6539616 AAF15952.1</a>	thioredoxin x [Arabidopsis thaliana]	177	177	75%	8e-43
<a href="#">gi 18403021 NP_564566.1</a>	thioredoxin X [Arabidopsis thaliana] >gi 51701888 sp Q8LD49.2 TRX	177	177	75%	8e-43
<a href="#">gi 297852732 XP_002894247.1</a>	hypothetical protein ARALYDRAFT_891962 [Arabidopsis lyrata subsp.]	173	173	75%	9e-42
<a href="#">gi 21592332 AAM64283.1</a>	thioredoxin, putative [Arabidopsis thaliana]	173	173	75%	1e-41
<a href="#">gi 115461306 NP_001054253.1</a>	Os04g0676100 [Oryza sativa Japonica Group] >gi 75142931 sp Q7X	155	155	60%	3e-36
<a href="#">gi 85815626 CAJ66078.1</a>	thioredoxin x [Oryza sativa Japonica Group]	155	155	60%	3e-36

Şekil 3.4 ORF dizisine benzeyen protein kayıtları



**Şekil 3.5** bk96 cDNA dizisinin ait olduğu protein ailesi

Tiyoredoksin geninin üç boyutlu yapısı için yapılan Cn3D [134-136] analizinin sonucu ve genin aktif bölgesi ve özelliği Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’ de görülmektedir. Genin domainlerinin diğer türlerdeki domain yapıları ile karşılaştırılması ise Şekil 3.8’ de görülmektedir.



**Şekil 3.6** TRX proteinin Cn3D’ den elde edilen 3-boyutlu yapısı

## catalytic

**Feature 1:** catalytic residues [active site]

**Evidence:**

- **Comment:** CXXC motif
- **Comment:** Disulfide bond reduction by thioredoxin is initiated by deprotonation of the solvent-exposed N-terminal cysteine in the CXXC motif to form a thiolate. The pKa of this thiol must be near physiological pH to achieve maximal catalysis.

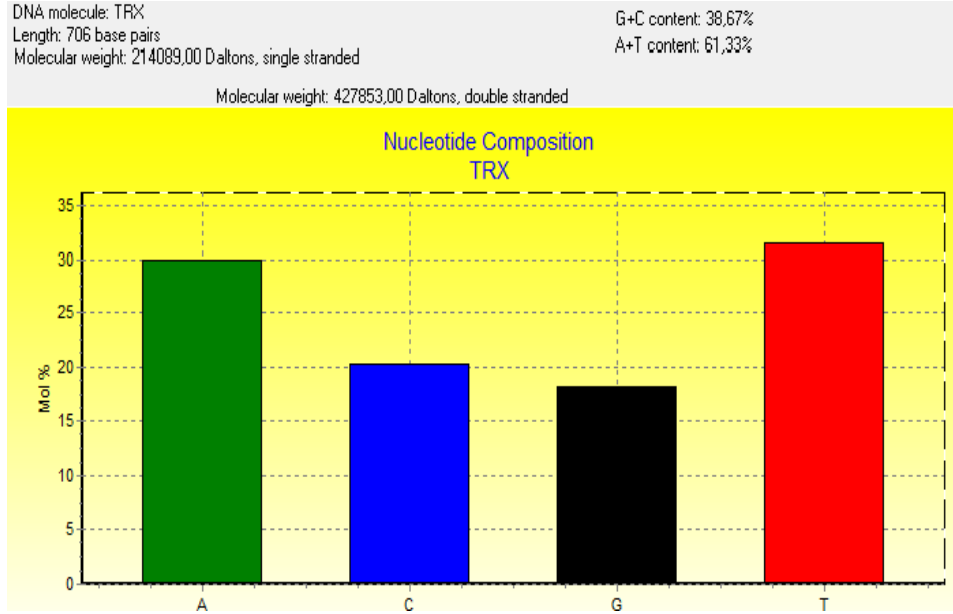
**Şekil 3.7** Tiyoredoksinin aktif bölgesi [133]

View	Edit	Mouse Mode	Unaligned	Justification	Imports																																																																																																							
TRX_A	l	t	d	DS	F	T	D	V	l	k	a	~	~	~	g	a	l	V	D	F	W	A	E	W	G	P	C	K	M	I	A	P	I	L	D	E	I	a	d	e	y	q	g	k	L	V	A	K	L	N	I	D	q	~	~	n	P	G	T	A	P	K	Y	g	i	r	g	I	P	T	L	L	F	K	N	g	e	~	~	v	a	A	T	K	V	G	A	L	s	k	~	~	~	g	Q	L	K	E	F	L	D	a	n	l				
query	t	n	e	S	E	F	A	D	V	l	k	s	~	~	~	e	r	p	V	L	V	F	V	A	T	W	G	P	C	R	L	I	A	S	S	I	Q	S	V	a	q	e	y	e	d	k	L	T	V	K	I	D	H	D	s	~	~	n	P	K	L	E	K	Y	k	v	y	g	L	P	T	L	L	F	K	D	g	k	e	v	p	n	S	R	R	E	G	A	I	t	k	~	~	~	i	K	L	K	E	Y	V	D	e	l	l			
ISZR_L	t	s	q	A	E	F	D	S	I	l	s	q	n	~	~	~	e	l	V	I	D	F	T	A	S	W	G	P	C	R	I	A	P	F	Y	E	E	C	s	k	t	~	~	y	t	e	M	V	F	K	V	D	V	e	~	~	S	E	V	E	T	E	K	E	n	i	t	s	M	P	T	F	K	V	K	N	g	s	~	~	v	D	T	L	L	G	A	n	~	~	~	s	A	L	K	Q	L	E	k	y	a							
gi:992960	v	w	t	V	Q	L	D	K	A	k	e	s	n	~	~	~	e	l	V	I	D	F	T	A	S	W	G	P	C	R	M	I	A	P	I	F	N	D	L	a	k	f	m	s	s	A	I	F	K	V	D	V	e	~	~	I	Q	S	V	A	K	E	F	g	v	e	a	M	P	T	F	V	F	I	K	A	g	e	~	~	v	D	K	L	V	G	A	N	k	~	~	~	e	D	L	Q	A	K	I	V	k	h	t					
gi:15608608	l	t	a	A	Y	F	Q	T	I	s	a	n	~	~	~	s	n	V	L	V	F	G	A	P	W	C	A	P	O	D	L	F	T	P	T	Y	E	A	S	r	k	~	~	h	f	d	V	V	H	G	K	V	N	I	E	t	~	~	e	K	D	L	A	S	I	A	g	v	t	I	P	T	L	M	A	F	K	K	g	k	~	~	l	v	F	K	Q	A	G	I	A	n	p	a	i	m	d	N	L	V	Q	L	R	a	y	t		
gi:16329237	v	n	e	D	N	F	D	N	L	V	l	q	c	~	~	~	p	t	p	I	L	V	F	G	A	P	W	C	L	C	H	F	V	K	P	L	N	H	L	h	g	e	w	q	e	q	L	V	C	V	E	V	N	A	D	v	~	~	n	L	H	L	A	N	A	r	l	k	n	L	P	T	L	L	F	N	R	g	g	~	~	v	i	Q	R	L	E	D	F	R	v	r	e	d	h	r	I	R	E	Q	I	A	v	s	l			
gi:21674040	r	i	p	F	D	F	Q	N	D	V	i	e	r	s	~	~	k	t	p	I	L	V	F	G	A	P	W	C	L	C	H	F	V	K	P	L	N	H	L	a	e	r	h	a	g	k	W	L	V	K	V	N	T	E	e	~	~	f	P	E	I	S	A	Q	Y	g	i	r	s	I	P	N	V	K	L	F	S	N	g	v	~	~	v	i	D	E	F	T	G	A	L	p	e	~	~	~	y	Q	I	E	Q	W	L	A	k	a	l	
gi:27763683	t	s	d	Q	D	F	S	A	K	L	a	d	v	a	g	s	g	s	I	M	I	C	D	F	T	A	K	W	G	P	C	R	M	I	A	P	V	F	S	S	L	s	n	k	~	~	y	t	d	V	T	F	V	K	I	D	I	D	n	t	a	l	G	N	T	V	N	D	H	s	i	t	g	V	P	T	F	V	Y	Y	K	G	r	~	~	v	e	S	F	S	G	A	R	a	~	~	~	d	M	L	E	S	L	I	Q	k	h	a
gi:32477354	f	n	d	D	N	F	D	S	E	V	l	k	s	~	~	~	d	s	p	V	L	V	F	G	A	P	W	C	L	C	H	F	V	K	P	L	N	H	L	a	s	e	~	~	n	p	g	V	K	I	G	K	V	N	I	D	~	~	n	P	G	A	A	Q	K	F	g	i	n	s	I	P	T	L	L	F	K	N	g	e	~	~	i	a	D	T	F	V	G	V	R	p	k	~	~	~	a	A	L	Q	D	A	L	T	s	v	s	
gi:33860219	t	n	k	A	E	L	D	Q	L	L	s	t	n	~	~	~	k	k	V	V	D	F	Y	A	N	W	C	G	P	C	K	I	L	G	P	I	F	E	E	V	a	q	d	~	~	k	k	d	W	T	F	K	V	D	V	q	~	~	a	N	E	I	S	S	E	Y	e	i	r	s	I	P	T	V	I	F	F	Q	D	g	k	~	~	m	a	D	K	R	I	G	F	i	p	k	~	~	~	n	E	L	K	E	L	K	~	~		

**Şekil 3.8** Tiyoredoksin proteininin domain yapılarının karşılaştırılması [133]

### 3.1.2 BioEdit Programı İle Yapılan Analizler

Zeytin tahmini tiyoredoksin geninin cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçları Şekil 3.9’ da görülmektedir. Bu sonuçlara göre 706 nükleotit uzunluğundaki tiyoredoksin geninin %38.67 G - C ve %61.33 A - T içerdiği belirlendi.



Şekil 3.9 Tiyoredoksin cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu

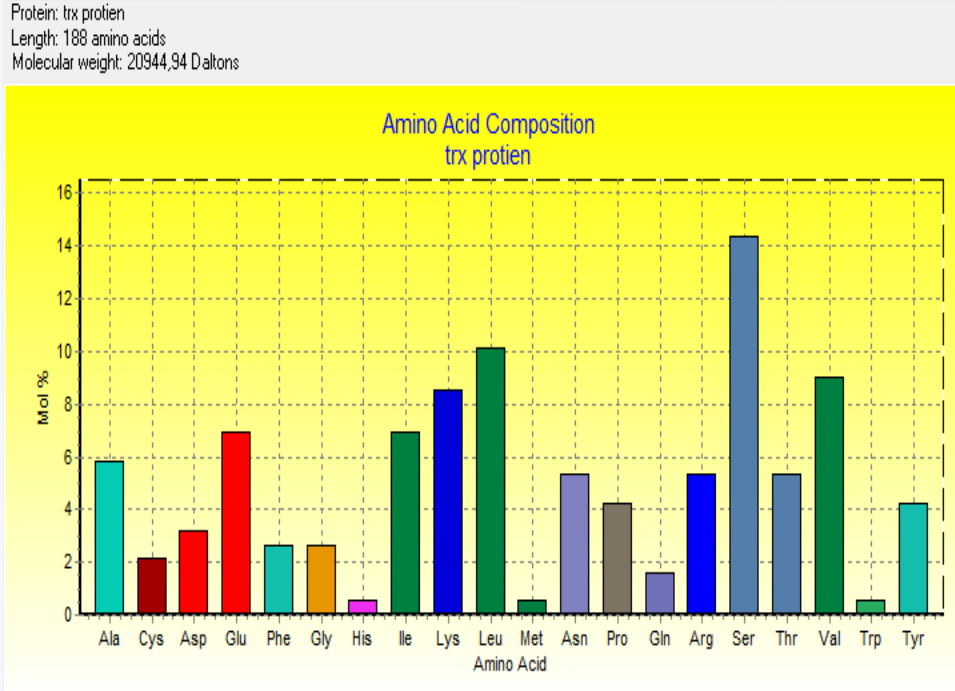
Tiyoredoksin cDNA dizisinin açık okuma çerçevesinin (ORF) 188 aminoasit uzunluğunda olduğu Şekil 3.10’ da görülmektedir. Tiyoredoksin geninin açık okuma çerçevesinin aminoasit kompozisyonu Şekil 3.11’ de görülmektedir.

```

>TRX: 24 to 587: Frame 3 188 aa
METIPIAFASNSKIPYCSQLYSVRTVMYERSALPLSSSSSSAFTVWNYKLRINSMSLIATKSSLNKVTKAGSITREINSEFADVWKSER
PVLVEFVATWCGPCRLIASSIQSVAQEYEDKLTVMKIDHDSNPKLEKVKYGLPTLILEKQKEVPSRREGATKTKLKEYVDELIRSVSTI
  
```

Şekil 3.10 Tiyoredoksin geninin açık okuma çerçevesi





**Şekil 3.11** Tiyoredoksin proteinin aminoasit kompozisyonu

### 3.1.3 ExPASy Analizleri

Zeytin tiyoredoksin proteinin translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ilk olarak tiyoredoksin proteininin lokalizasyonu tahmin edildi (Şekil 3.12)

Mitochondrial	Plastid	ER	Elsewhere	Prediction
0,01	0,90	0,01	0,10	plastid

**Şekil 3.12** Tiyoredoksinin hücre içi lokalizasyon tahmini

Tiyoredoksin proteininin transit peptidinin olup olmadığı anlamak için yapılan analizin sonucu Şekil 3.13’ de görülmektedir. RC ile ifade edilen kısım analizin güvenilirliğini ölçmektedir. 1’ den 5’ e kadar derecelendirilmiş ölçekte değer düştükçe güvenilirlik artmaktadır. Ayrıca bu sonuçlar ExPASy web sayfasında mevcut farklı programlar ile desteklenmiştir (Şekil 3.12).

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
trx	188	0.930	0.037	0.003	0.076	C	1

**Şekil 3.13** Tiyoredoksin proteininin transit peptid analizi

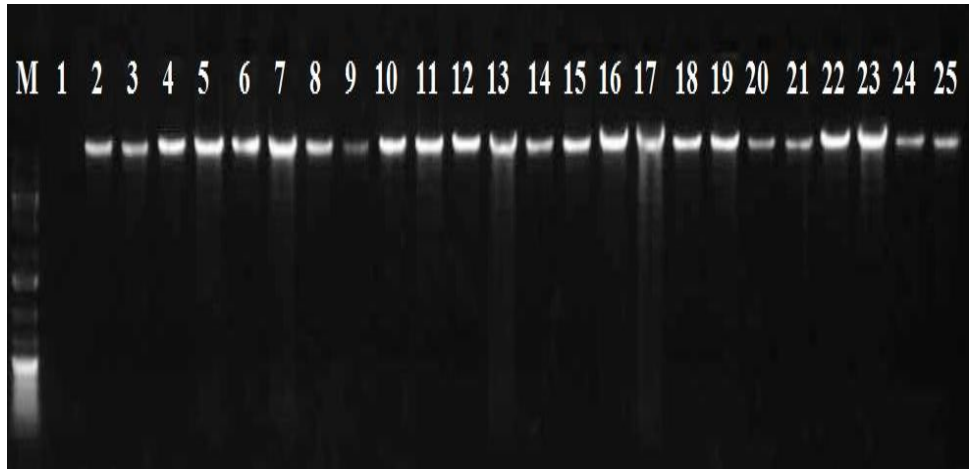
Tiyoredoksinin nasıl bir protein özelliği gösterdiğini bulmak için yapılan analiz sonucu Şekil 3.14’ deki gibidir.

This amino acid sequence is of a SOLUBLE PROTEIN.

**Şekil 3.14** Tiyoredoksin protein özelliği

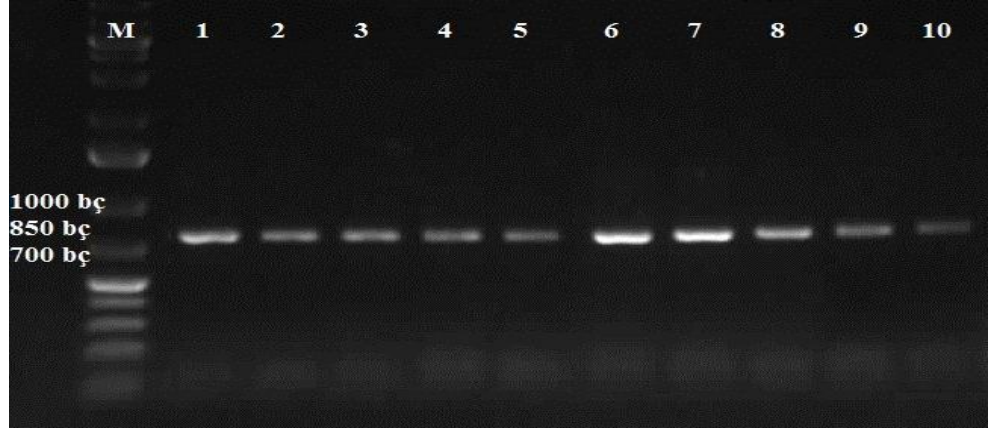
### 3.2 Genomik DNA İzolasyonu ve PCR

Zeytin çeşitlerinden (Tablo 2.1) toplanan örneklerden elde edilen genomik DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 3.15’ te görülmektedir.



Şekil 3.15 İzole edilen genomik DNA örnekleri

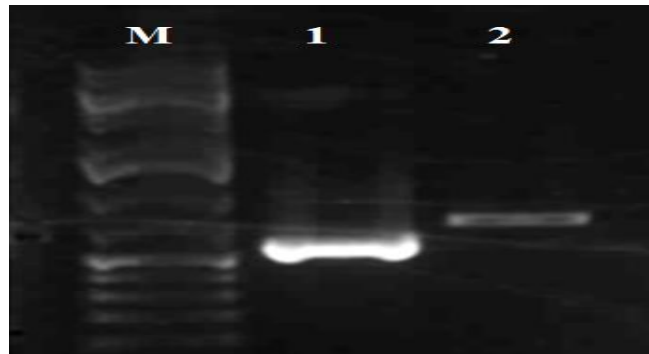
Polimorfizm olup olmadığını anlamak için toplanan örneklerden (Tablo 2.1) tiyoredoksin genini tam uzunlukta çoğaltabilecek primerler (Çoğaltma TRX - R ve Çoğaltma TRX - F) ile PCR yapıldı (Şekil 3.16).



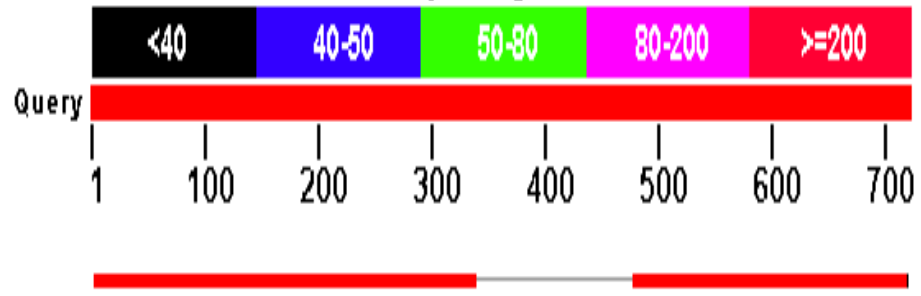
Şekil 3.16 Zeytin çeşitleriyle yapılan PCR ürünleri

### 3.3 İntron Analizi

Tiyoredoksin geninde intron olup olmadığını belirlemek için hem gDNA hem de cDNA örneklerinden ayrı ayrı geni tam uzunlukta çoğaltan primerler (Çoğaltma TRX - R ve Çoğaltma TRX - F) ile PCR yapıldı (Şekil 3.17)ve PCR ürünleri dizilemeye gönderildi. Daha sonra gelen gDNA ve cDNA dizileri karşılaştırıldı. Böylelikle intronun varlığı, yeri ve büyüklüğü tespit edildi (Şekil 3.18).



Şekil 3.17 İntron için yapılan PCR ürünleri: 1. cDNA kalıbıyla yapılan PCR ürünü  
2.gDNA kalıbıyla yapılan PCR ürünü



**Şekil 3.18** Zeytin tiyoredoksin geninin intron analizi

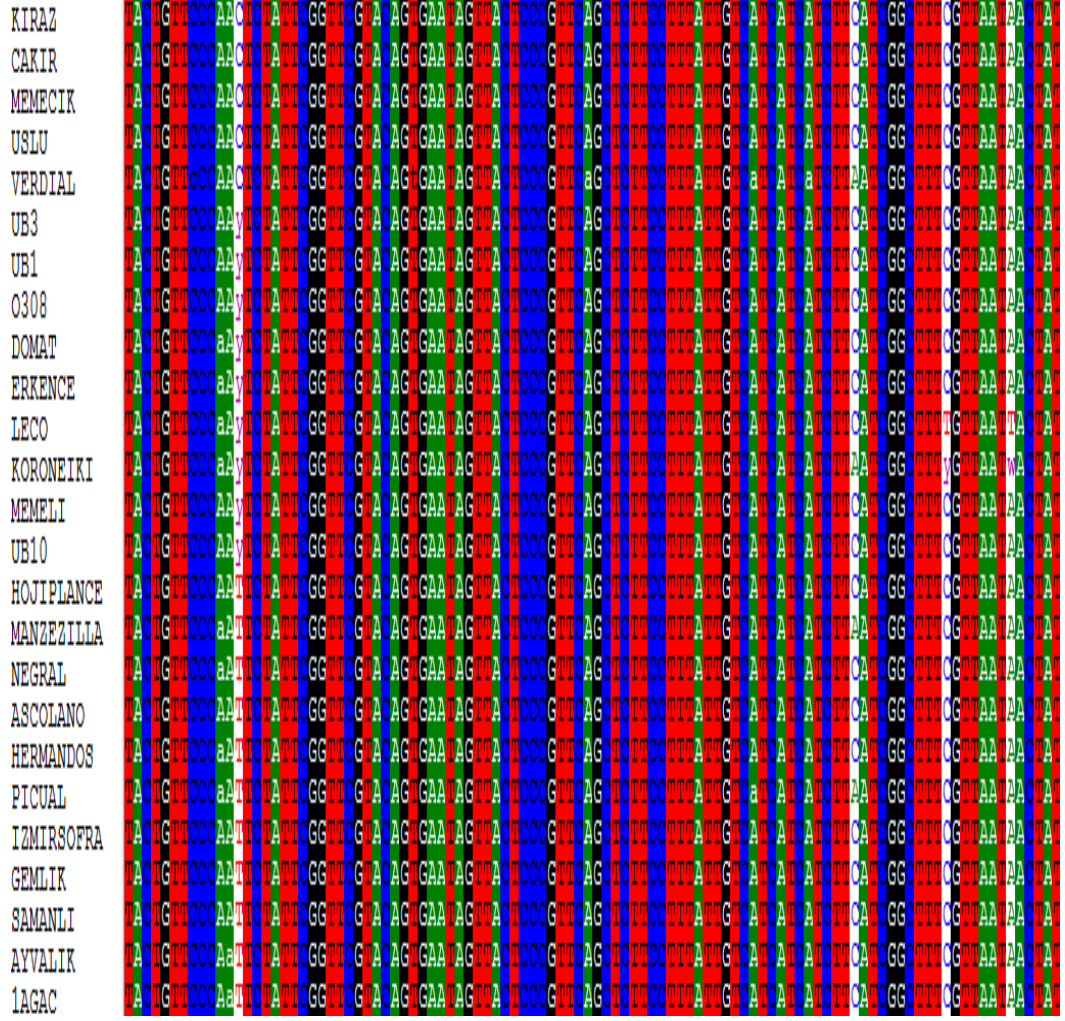
### 3.4 Polimorfizm Analizi

Tiyoredoksin geni ekzon1, intron ve ekzon2 bölümlerinden oluşur (Şekil 3.18). Bu bölümlerde tiyoredoksin geninin zeytin çeşitleri arasındaki farklılıkları ayrı ayrı incelendi. Zeytin çeşitlerinden yapılan PCR ürünlerinin dizileme sonucu elde edilen nükleotit dizileri BioEdit programı [132] ile hizalandı.

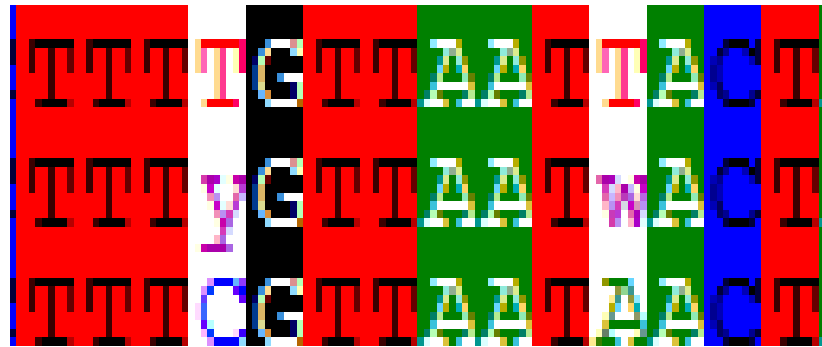
Ekzon1 bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması sonucu birçok farklılık olduğu görüldü (Şekil 3.19) ve bu farklılıklar analiz edildi (Şekil 3.20). İtron (Şekil 3.21) ve Ekzon2 (Şekil 3.22) bölgelerinin çeşitler arasında karşılaştırılması sonucu farklılığın olup olmadığı gözlemlendi.

Çeşitler arasında çok fazla çeşitlilik gösteren ekzon1 bölgeleri aminoasit dizisi esas alınarak çeşitler arasında karşılaştırıldı ve farklılıklar analiz edildi (Şekil 3.23).

Çeşitler arasında akrabalık ilişkilerini gözlemlemek için PAUP ağaç oluşturma programı [137] yardımıyla filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 3.32).



Şekil 3.19 Ekzon1 bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması



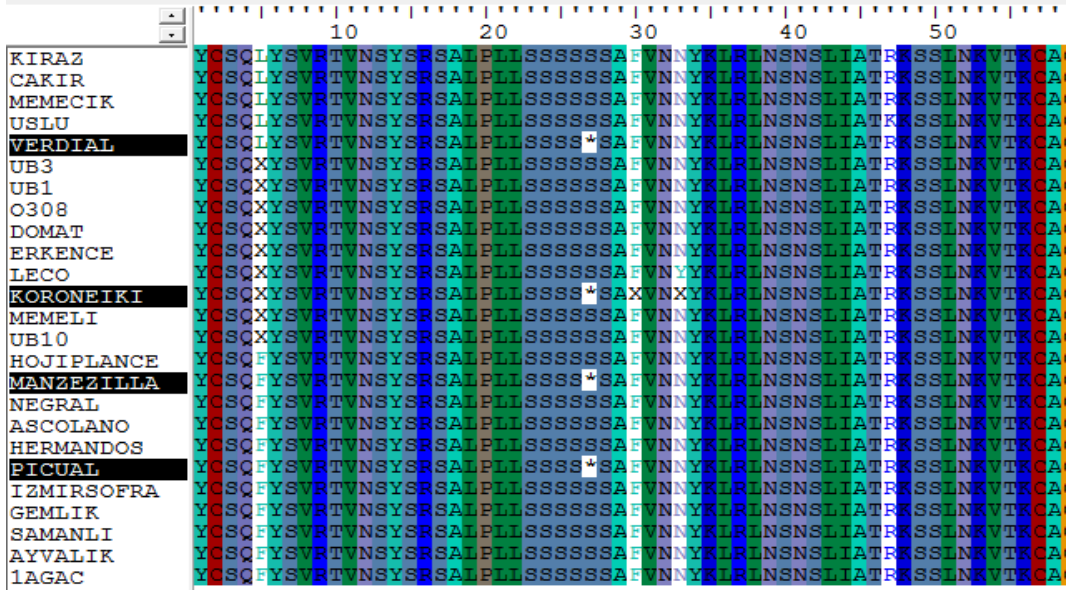
Şekil 3.20 Ekzon1 bölgesindeki farklı olan bölgeler

UB3	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
ASCOLANO	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
HERMANDOS	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
UB1	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
PICUAL	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
O308	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
DOMAT	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
LECO	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
HOJIPLANCE	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
MANZEZILLA	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
NEGRAL	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
KORONEIKI	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
MEMELI	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
UB10	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
IZMIRSOFR	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
GEMLIK	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
SAMANLI	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
ERKENCE	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
KIRAZ	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
VERDIAL	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
CAKIR	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
MEMECIK	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
USLU	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
AYVALIK	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT
LAGAC	ATTTAATTGATAAATTTA CCTCTCCAA TTTATWATTTTCACTTA TTGGAAAG TTATTAG AATAAT CA AAAGATAAGTTTATGAAAT

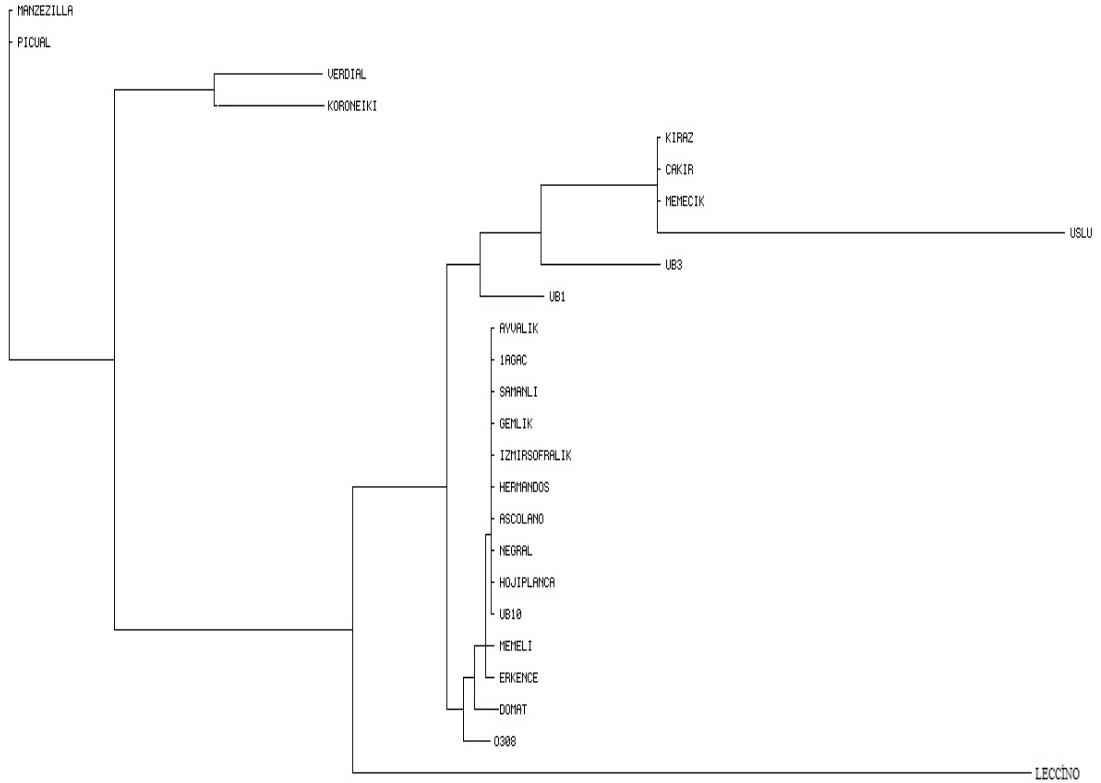
Şekil 3.21 İtron bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması

KIRAZ	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
UB3	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
ASCOLANO	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
HERMANDOS	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
UB1	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
PICUAL	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
O308	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
DOMAT	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
ERKENCE	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
VERDIAL	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
LECO	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
HOJIPLANCE	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
MANZEZILLA	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
NEGRAL	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
KORONEIKI	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
MEMELI	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
UB10	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
CAKIR	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
MEMECIK	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
USLU	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
IZMIRSOFR	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
GEMLIK	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
SAMANLI	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
AYVALIK	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA
LAGAC	TAGGAAATGGAAGA AAAATGGA AGTCG GAAAAATGATCA GATTAAAATCGAAGATGAAAAATA AAGGATAAGGATTGCCAA TA

Şekil 3.22 Ekzon2 bölgesinin çeşitler arasında karşılaştırılması



Şekil 3.23 Çeşitlerin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması

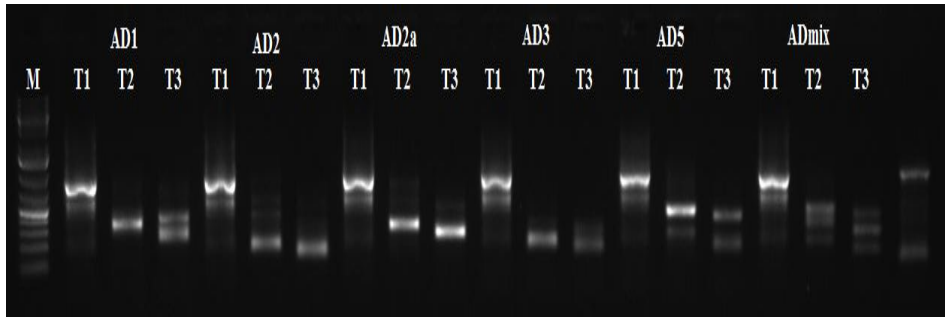


Şekil 3.24 Tioredoksin dizileriyle oluşturulan filogenetik ağaç



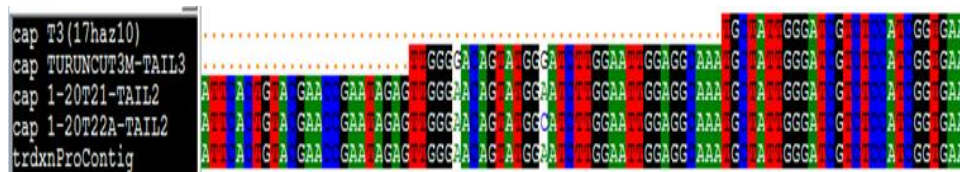
### 3.5 TAIL-PCR

Tiyoredoksin promotörünü bulmak için yapılan PCR ürünlerinin jeldeki görüntüsü Şekil 3.25’ deki gibi fotoğraflandı.

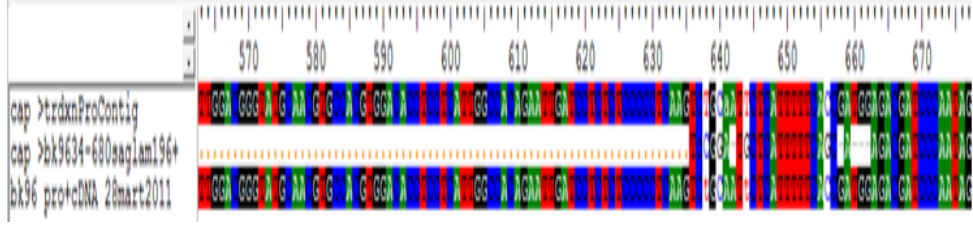


Şekil 3.25 TAIL - PCR sonuçları

TAIL-PCR sonucunda oluşan hedef PCR ürünleri dizilenmeye gönderildi. Gelen dizileme sonuçları Şekil3.26’ da görüldüğü gibi kendi içerlerinde karşılaştırılarak ortak doğru dizi oluşturuldu. Daha sonra oluşan bu dizi ile cDNA dizisi BioEdit programı yardımı ile karşılaştırılarak promotör bölgesine ait nükleotit dizisi tespit edildi (Şekil 3.27).



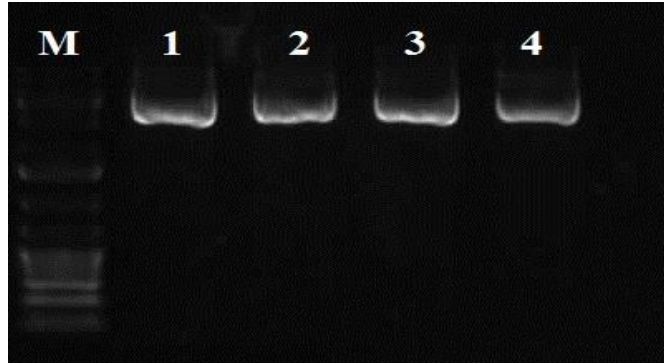
Şekil 3.26 Farklı dizilerden ortak dizi oluşturma



Şekil 3.27 Promotör bölge tespiti

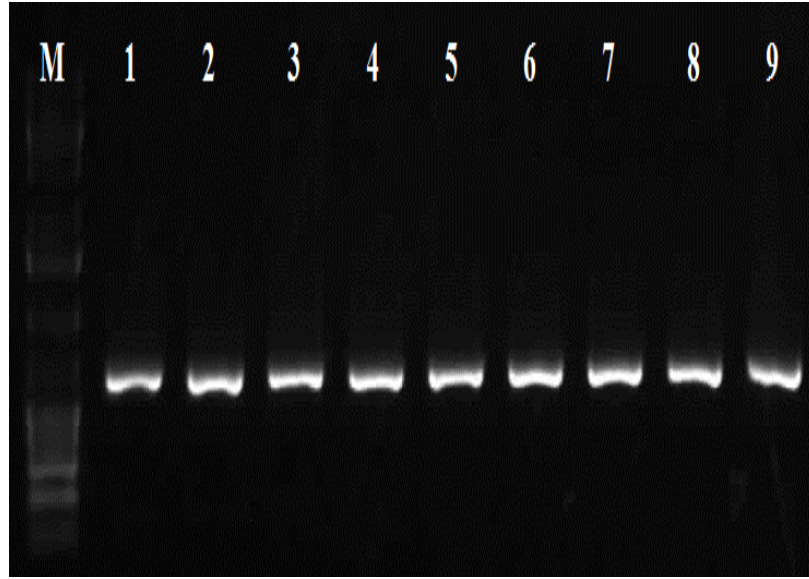
### 3.6 Ekspresyon Vektörüne Klonlama

Tiyoredosin genini ekspresyon vektörüne klonlamak amacıyla ilk olarak yapılan boş pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörünün miktar tayini Şekil 3.28’ de görülmektedir.

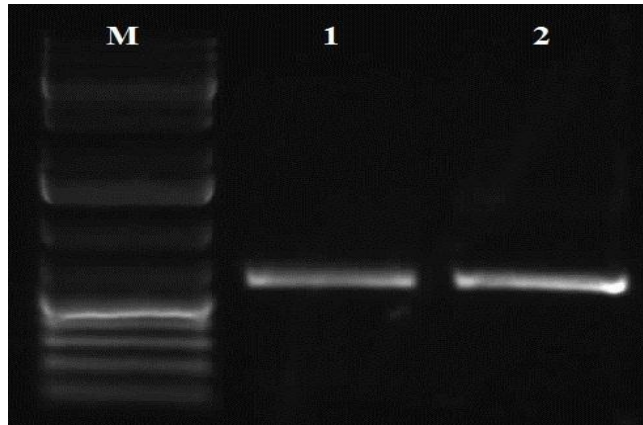


Şekil 3.28 pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörünün miktar tayini

Klonlanacak olan tiyoredoksin geni için PCR reaksiyonu (Tablo 2.5) ile aracı vektörden spesifik primerler ile çoğaltılan PCR ürünleri (Şekil 3.29) ve bu PCR ürünlerinin saflaştırıldıktan sonraki miktar tayinleri Şekil 3.30' da görülmektedir.

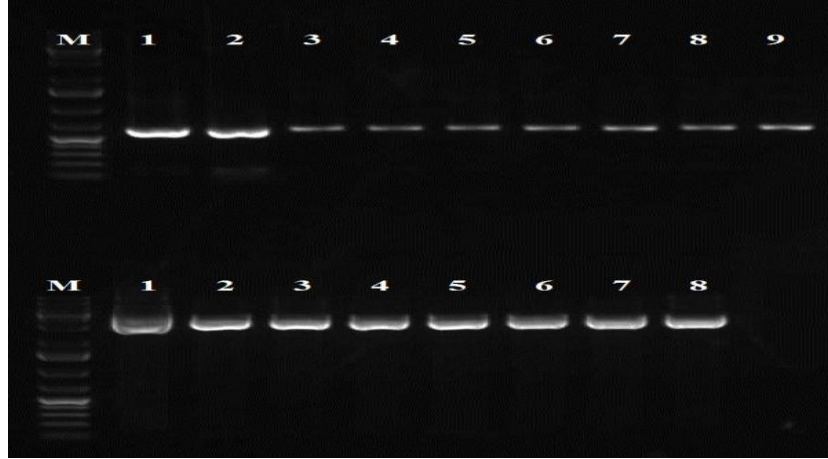


Şekil 3.29 cDNA' dan çoğaltılan PCR ürününe ait jel görüntüsü



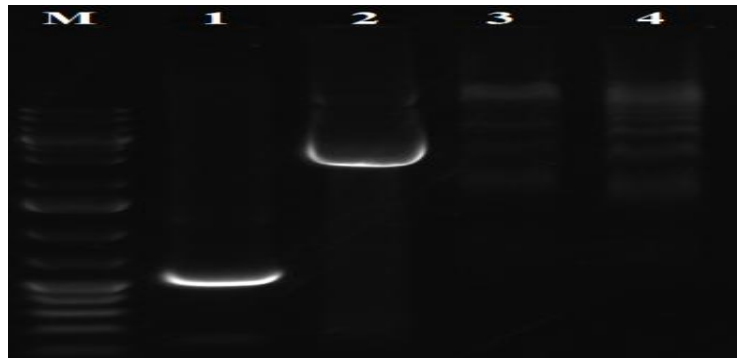
Şekil 3.30 PCR ürününün miktar tayini

Tiyoredoksin geninin ve pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörünün uygun restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim sonuçları Şekil 3.31’ de görülmektedir.



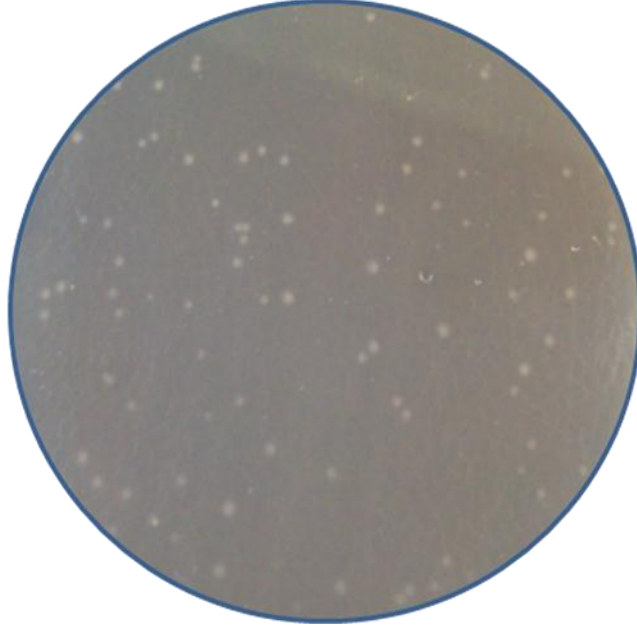
Şekil 3.31 Genin ve vektörün kesim sonucunu gösteren jel görüntüsü

Kesik tiyoredoksin geni, kesik vektörün ve bunların ligasyonu sonucunda oluşan ligasyon ürünlerinin jeldeki görüntüsü Şekil 3.32’ deki gibidir.



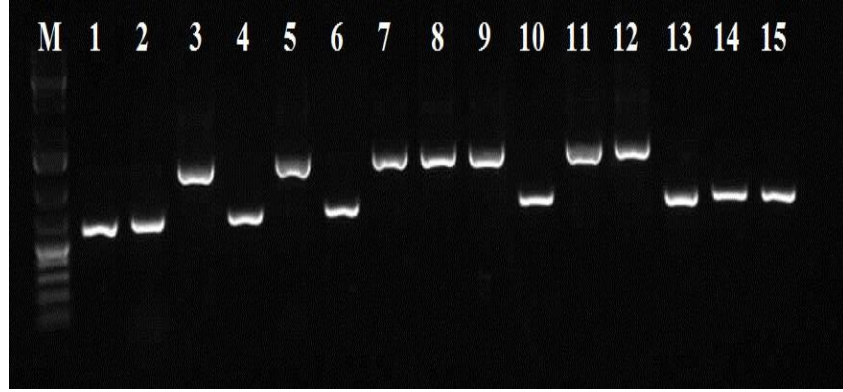
Şekil 3.32 Ligasyon ürünleri

Transforme edilen ligasyon ürünlerinden yapılan ekim sonucu Şekil 3.33’deki gibi petride üremeler görüldü.



**Şekil 3.33** Rekombinat bakterilerin petrideki görüntüsü

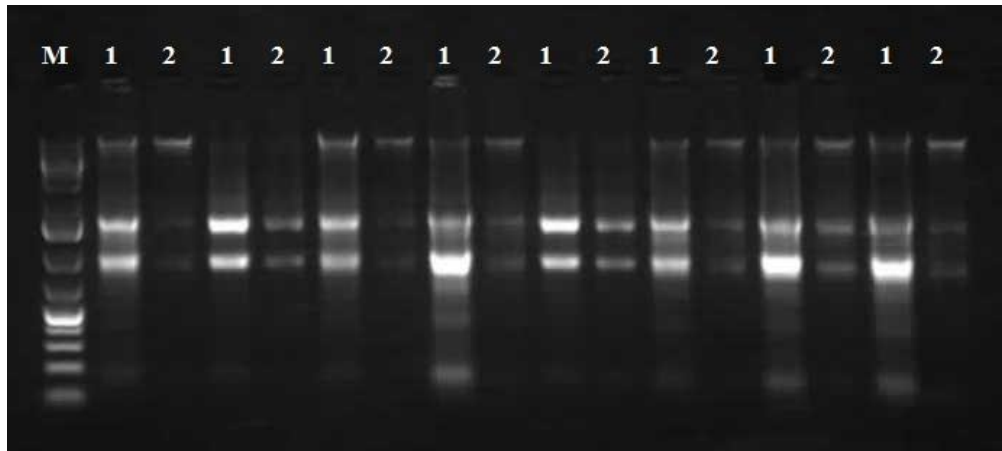
Petride üreyen geni taşıyan rekombinant kolonileri belirlemek amacıyla rastgele seçilen kolonilerden AOX primerleri ile PCR yapıldı. Şekil 3.34’de 15 farklı koloniden elde edilen PCR sonuçları verilmiştir. Boş olan vektörde 600 bç’lik AOX bölgesinin çoğaldığı ve pPICZ $\alpha$ C klonlama bölgesinde bulunan alkol oksidaz (AOX) içerisine klonlandığı düşünülen gene ait bantların ise yaklaşık 1200 bç büyüklüğünde olduğu görülmektedir.



**Şekil 3.34** Koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü

### 3.7 Tiyoredoksin Geninin Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

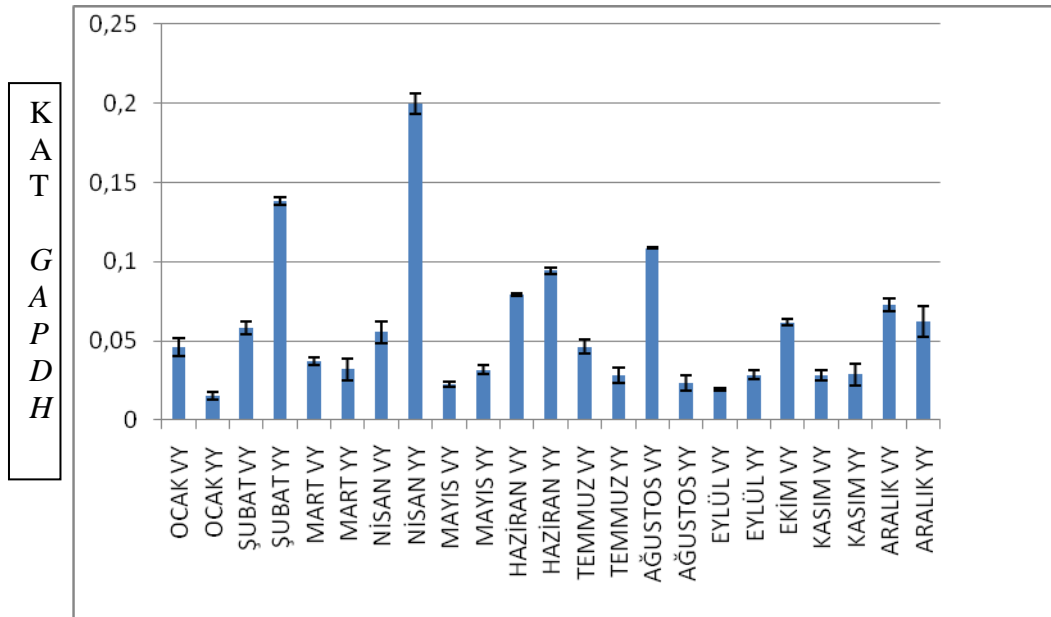
Tiyoredoksinin dokusal ve zamansal ekspresyonu için toplanan doku örneklerinden (Tablo 2.8) elde edilen toplam RNA örnekleri jelde yürütülerek fotoğraflandı (Şekil 3.35).



**Şekil 3.35** Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

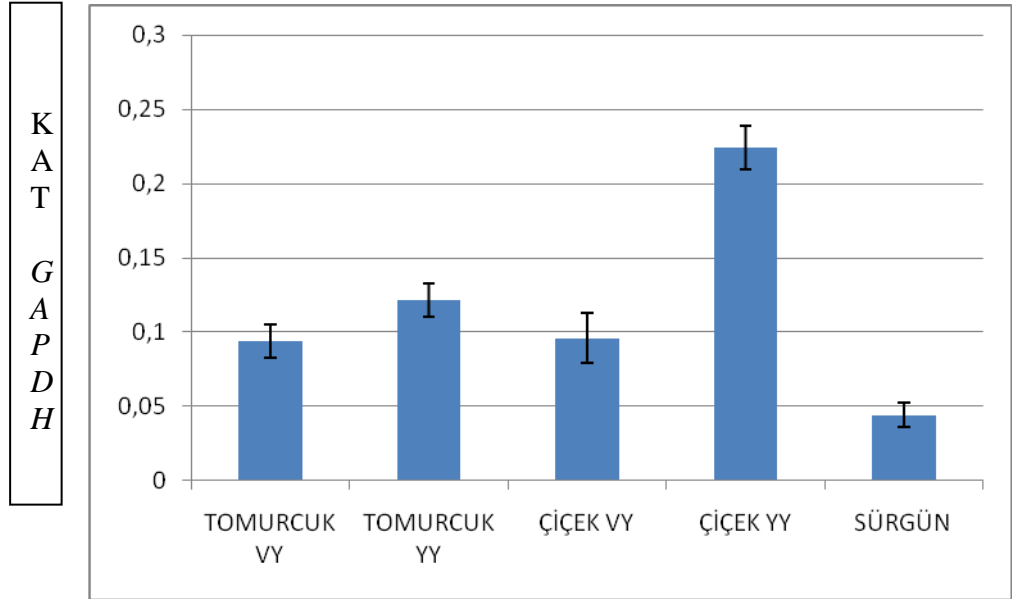
Standart eğri, konsantrasyonu bilinen seyreltme serileri kullanarak 3 tekrarlı çalışılan standartlara ait anlık gösterimli PCR sonucunda elde edilmiştir. 12 ayda “var yılı” ve “yok yılı” ağaçlarından örnekler toplanmış ve anlık gösterimli PCR sonucunda standart eğri baz alınarak normalizör gen *GAPDH* ile birlikte konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Aşağıdaki grafikler, zeytin bitkisinde konstitütif olarak ifade edilen normalizör gen *GAPDH*’ e göre farklı ay ve dokularda değişiklik göstermiş tiyoredoksin mRNA düzeylerini göstermektedir.

12 ay boyunca toplanan bitkilerin yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan anlık gösterimli PCR sonuçları analiz edildiğinde oluşan grafik Şekil 3.36’ da görülmektedir.



Şekil 3.36 Yaprak örneklerindeki ekspresyon seviyesi

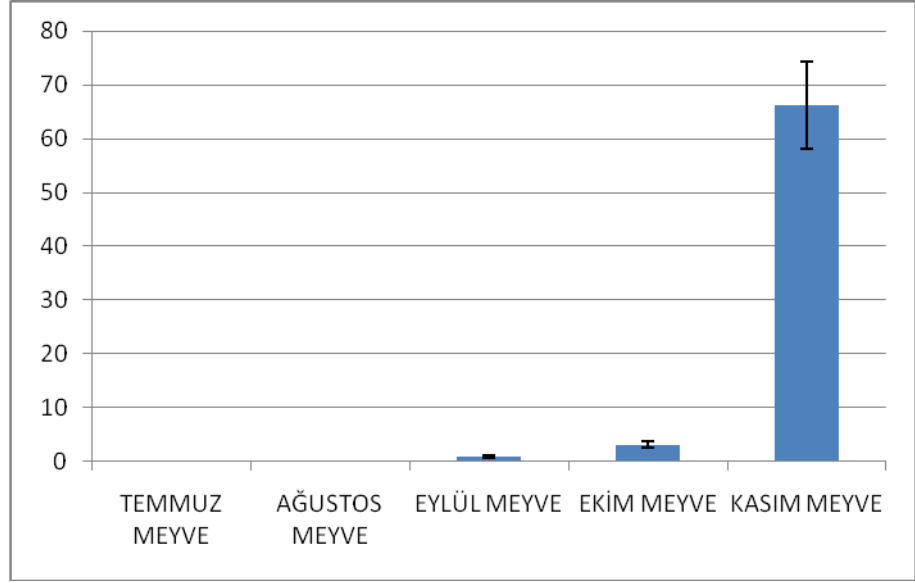
12 ay boyunca her ay toplanan zeytin dokularından izole edilen toplam RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan anlık gösterimli PCR sonuçları kullanılarak yapılan grafik Şekil 3.37’ de görülmektedir.



**Şekil 3.37** Farklı dokulardaki ekspresyon seviyesi

Farklı zamanlarda toplanan meyve örneklerinden izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak yapılan anlık gösterimli PCR sonuçları analiz edildiğinde oluşturulan grafik Şekil 3.38’ de görülmektedir.





Şekil 3.38 Meyvelerdeki tiyoredoksin ekspresyon seviyesi

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Elimizde bulunan daha önce laboratuvarımızda yapılmış olan temmuz “yok yılı” cDNA kütüphanesinden elde ettiğimiz bk96 olarak isimlendirilen genin biyoinformatik araçlarla analizi sonucunda tiyoredoksin gen ailesine benzediği ve en çok da *Populus trichocarpa* tiyoredoksini ile yakın benzerlik gösterdiği bulundu.

Tahmini tiyoredoksinin nükleotit kompozisyonuna bakıldığında 706 baz çifti uzunluğunda, %38.67 G+C oranına ve %61.33 A+T oranına sahip olduğu belirlendi. Programlar yardımıyla genin sentezlediği proteinin 188 aminoasit uzunluğunda olduğu görülmüştür. Genin aminoasit kompozisyonuna baktığımızda ise hidrofilik özellik gösteren serin aminoasitinin çokluğu ve ikinci olarak da hidrofobik özellik gösteren lösin ve valin aminoasitlerinin fazlalığı dikkat çekmektedir. Bu da bize bu proteinin ya membrana gömülü olduğu ya da globüler protein olduğu şüphesini uyandırdı. Ayrıca, bu tahmini proteinin serin bakımından (hidrofilik bir amino asit) zengin olması hücre zarı veya organel zarlarından ziyade sitoplazmik olduğu ihtimalini güçlendirmektedir.

Proteinin hücre içerisindeki lokalizasyonuna bakıldığında yüksek oranda plastide özgü olması (Şekil 3.12), kloroplast transit peptidinin bulunması (Şekil 3.13) ve çözünebilir protein olarak görünmesi (Şekil 3.14), zeytin tahmini tiyoredoksininin çekirdekte kodlanıp kloroplasta gönderildiğini ve kloroplast içerisinde de stromada görev aldığını düşündürdü.

Bütün tiyoredoksin proteinlerinin karakteristik özelliği olan CXXC motifinin varlığı ve domainlerinin diğer canlılarla benzerlik gösterdiği görüldü.

Gene özđü primerler ile yapılan gDNA ve cDNA PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda zeytin tiyoredoksin geninde 150 baz çifti uzunluğunda ve genin orta kısmında yer alan bir intronun varlığı tespit edildi.

Edremit' ten toplanan 24 adet zeytin çeşidinden yapılan PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda tahmini tiyoredoksin geninin ekzon1 bölgesinde çok fazla tek nükleotid değişiklikleri (SNP) tespit edilmiştir. Bu polimorfik bölgeler analiz edildiğinde ise çoğunun heterozigot olduğu gözlendi. 310 baz çifti olan ekzon1 bölgesinde toplam 5 tane polimorfik bölgeden 4' ünün heterozigot olduğu bulundu. İntron bölgesindeki sonuçlara bakıldığında ise sadece 1 adet heterozigot bölge bulunurken ekzon2 bölgesinde herhangi bir polimorfik bölgeye raslanmamıştır.

Ekzon1 bölgesinde çeşitlilik göstermesinden dolayı bu alanın çeşitler arasında aminoasit dizileri temel alınarak yapılan karşılaştırılma sonucunda yabancı kökenli olan Verdial, Koroneiki, Manzanilla ve Picual zeytin çeşitlerinde bu proteinin start kodonundan yaklaşık 50 amino asit sonra bir stop kodonu içerdiği ve dolayısıyla baskılandığı görüldü. Ayrıca GenBank' taki diğer homologlarıyla karşılaştırıldığında zeytin tahmini tiyoredoksininin hiçbir tiyoredoksinde görülmeyen 6 tane serin (SSSSSS) tekrarı içermekte olduğu tespit edildi.

Tek nükleotid polimorfizmlerinin fazla olduğu ekzon1' e göre yapılan filogenetik ağaçta ise yerli ve yabancı kökenli türlerin birbirinden belirgin şekilde ayrıldığı gözlenmiştir.

Tahmini tiyoredoksin geninin promotör bölgesinin tespit edilmesi için yapılan TAIL - PCR sonucunda 5' yönüne doğru 635 baz çifti tespit edilmiştir. Bu bölgenin bioinformatik araçlar ile analizinde ise henüz bir promotör yapısı gözlenmemesi bize bu bölgenin promotörün bir kısmı olduğunu düşündürmektedir.

Proteinin biyokimyasal karakterizasyonun belirlenmesinin ilk basamağı olan ekspresyon vektörüne klonlama işlemi zeytin tahmini tiyoredoksin için yapıldı. Bu klonlama ile ileride zeytindeki tahmini tiyoredoksinin işlevini anlamak için yapılacak biyokimyasal karakterizasyon için ilk adım gerçekleştirilmiş oldu.

Zeytin tahmini tiyoredoksin mRNA' sının dokusal ve zamansal ekspresyonlarını belirlemek için yapılan analizler yapraklar, dokular ve meyveler olmak üzere 3 grupta değerlendirildi. Aylara göre yaprak örnekleri analiz edildiğinde Temmuz ayındaki "yok yılı"na ait örneklerde en fazla sentezlendiği görüldü. Dokular karşılaştırıldığında ise en fazla "yok yılı"na ait çiçek örneklerinde sentezlendiği görüldü. Aylara göre meyveler karşılaştırıldığında ise belirgin bir şekilde Kasım ayında en fazla sentezlendiği görüldü. Bu gen elde ettiğimiz verilere göre tiyoredoksin x formuna benzemektedir. Fakat bu form henüz çok fazla çalışılmadığı için literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden diğer bitkilerde bu genin ekspresyon seviyesine etki eden faktörler hakkında bilgi edinilemedi. Zeytin tahmini tiyoredoksinin fonksiyonel özellikleri ekspresyon deneyleri ile aktif protein elde edildiği ve biyokimyasal karakterizasyonu yapıldığı zaman anlaşılacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y., "Intron Position as an Evolutionary Marker of Thioredoxins and Thioredoxin Domains", *J. Mol. Evol.*, **42**, (1996) 422-431.
- [2] Jacquoti, J.P., Lancelin, J.M., and Meyer, Y., "Thioredoxins: Structure and Function in Plant Cells", *New Phytologist*, **136**, (1997) 543-570.
- [3] Holmgren, A., "Thioredoxin. 6 . The Amino Acid Sequence of the Protein from *E.Coli* B", *European Journal of Biochemistry*, **6**, (1968) 475-484.
- [4] Elias S. J. Arne Å r and Holmgren., A., "Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase", *Eur. J. Biochem.*, **267**, (2000) 6102-6109
- [5] Torvard C. Laurent, E. Colleen Moore, and Reichard., P., "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides", *The Journal of Biological Chemistry*, **239**, (1964) 3436-3444.
- [6] Russel, M. and Model, P., "Thioredoxin Is Required for Filamentous Phage Assembly", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, (1985) 29-33.
- [7] Holmgren, A., "Thioredoxin", *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, (1985) 237-271.
- [8] Gilbert, H.F., "Molecular and Cellular Aspect of Thiol-Disulfide Exchange", *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, **63**, (1990) 69-172.
- [9] Williams, C.H.J., "Lipoamide Dehydrogenase, Glutathione Reductase, Thioredoxin Reductase and Mercuric Ion Reductase - a Family of Flavoenzyme Transhydrogenases.", *In Chemistry and Biochemistry of Flavor Enzymes (Mu Èller, Fed.)*, **3**, (1992) 121-211.
- [10] Holmgren, A., "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems", *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, (1989) 13963-13966.

- [11] Buchanan, B.B., "Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes", *Annual Review of Plant Physiology*, **31**, (1980) 341-374.
- [12] Buchanan., B.B., "Regulation of CO<sub>2</sub> Assimilation in Oxygenic Photosynthesis: The Ferredoxin/Thioredoxin System. Perspective on Lts Discovery, Present Status and Future Developments.", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **33**, (1981) 147-162.
- [13] Buchanan., B.B., "Regulation of the CO<sub>2</sub> Assimilation in Oxygenic Photosynthesis: The Ferredoxin/ Thioredoxin System.", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **288**, (1991) 1-9
- [14] H. Eklund, F. Gleason, and Holmgren., A., "Structural and Functional Relations among Thioredoxins of Different Species ", *Proteins*, **11**, (1991) 13-28.
- [15] Jacquot, J.P., "Post-Translational Modification of Proteins in Higher Plant Chloroplasts: Enzyme Regulation by Thiol-Disulfide Interchange", *Physiologie Végétale*, **22** (1984) 487-507.
- [16] Knaff, D.B., "The Regulatory Role of Thioredoxin in Chloroplasts", *Trends Biochemical Sciences*, **14**, (1989) 433-434.
- [17] Gleason, F.K. and Holmgren, A., "Thioredoxin and Related Proteins in Prokaryotes", *FEMS Microbiol. Rev.*, **4**, (1988) 271-297.
- [18] Schurmann, P., "Plant Thioredoxins. In: De Kok Lj, Stulen I, Renneberg H, Brunold C, Rauser W, Eds. Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants ; Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects", *The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing BV*, (1993) 153-162.
- [19] Scheibe, R., "Redox Modulation of Chloroplast Enzymes. A Common Principle for Individual Control", *Plant Physiology*, **96**, (1991) 1-3.
- [20] Scheibe, R., "Light Regulation of Chloroplast Enzymes", *Naturwissenschaften*, **81**, (1994) 443-448.
- [21] Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A., and Hagelin, K., "The Reductive Pentose Phosphate Cycle for Photosynthetic CO<sub>2</sub> Assimilation: Enzyme Modulation", *FASEB J.*, **7**, (1993) 622-637.
- [22] Buchanan, B.B., Schiirmann, P., Decottignies, P., and Lozano, R.M., "Thioredoxin: A Multifunctional Regulatory Protein with a Bright Future M Technology and Medicine", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **314**, (1994 (b)) 257-260.
- [23] Buchanan, B.B., Schiirmann, P., and Jacquot, J.P., "Thioredoxin and Metabolic Regulation", *Seminars in Cell Biology*, **5**, (1994 (a)) 285-293.

- [24] Buchanan, B.B., Schermann, P., Decottignies, P., and Lozano, R.M., "Thioredoxin: A Multifunctional Regulatory Protein with a Bright Future in Technology and Medicine", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **314**, (1994) 257-260.
- [25] I. Besse and Buchanan., B.B., "Thioredoxin-Linked Plant and Animal Processes: The New Generation", *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*, **38**, (1997) 1-11.
- [26] Mathews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.-L., Yodi, J., and Hay, R.T., "Thioredoxin Regulates the DNA Binding Activity of Nf-Kbby Reduction of a Disulfide Bond Involving Cysteine 62", *Nucleic Acids Res.*, **20**, (1992) 3821-3830.
- [27] Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J., "Ap-1 Transcriptional Activity Is Regulated by a Direct Association between Thioredoxin and Ref-1", *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)*, **94**, (1997) 3633-3638.
- [28] Shau, H., Huang, A.C.J., Faris, M., Nazarian, R., De Vellis, J., and Chen, W., "Thioredoxin Peroxidase (Natural Killer Enhancing Factor) Regulation of Activator Protein-1 Function in Endothelial Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **249**, (1998) 683-686.
- [29] Kim, A.T., Sarafin, T.A., and Shau, H., "Characterization of Antioxidant Properties of Natural Killer-Enhancing Factor-B and Induction of Its Expression by Hydrogen Peroxide", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, (1997) 135-142.
- [30] Chae, H.Z., Robinson, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S.G., "Cloning and Sequencing of Thiol-Specific Antioxidant from Mammalian Brain: Alkyl Hydroperoxide Reductase and Thiol-Specific Antioxidant Define a Large Family of Antioxidant Enzymes", *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)*, **91**, (1994) 7017-7021.
- [31] Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J.P., "Classification of Plant Thioredoxins by Sequence Similarity and Intron Position", *Methods in Enzymology*, **347**, (2002) 394-402.
- [32] Gan, Z.R., "Yeast Thioredoxin Gene", *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, (1991) 1692-1696.
- [33] Laurent, T.C., Moore, E.C., and Reichard, P., "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin Donor from *Escherichia Coli B*", *The Journal of Biological Chemistry*, **239**, (1964) 3436-3444.
- [34] Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P., and Spyrou, G., "Identification and Functional Characterization of a

Novel Mitochondrial Thioredoxin System in *Saccharomyces Cerevisiae*", *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, (1999) 6366-6373.

- [35] Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizueté, A., and Gustafsson, J., "Cloning and Expression of a Novel Mammalian Thioredoxin", *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, (1997) 2936-2941.
- [36] Wollman, E.E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J.P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P., and Galibert, F., "Cloning and Expression of a Cdna for Human Thioredoxin", **263**, (1988) 15506-15512.
- [37] Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J.P., "The Thioredoxin H System of Higher Plants", *Plant Physiology and Biochemistry*, (2004)
- [38] Schurmann, P. and Jacquot, J.P., "Plant Thioredoxin Systems Revisited", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**, (2000) 371-400.
- [39] Maeda, K., Tsugita, A., Dalzoppo, D., Vilbois, F., and Schurmann, P., "Further Characterization and Amino Acid Sequence of M-Type Thioredoxins from Spinach Chloroplasts", *Eur. J. Biochem.* , **154**, (1986) 197-203.
- [40] Mestres-Ortega D. and Y., M., "The *Arabidopsis Thaliana* Genome Encodes at Least Four Thioredoxins M and a New Prokaryotic-Like Thioredoxin", *Gene*, **240**, (1999) 307-316.
- [41] Lemaire, S.D., Collin, V., Keryer, A., Quesada, M., and Miginiac-Maslow, M., "Characterization of Thioredoxins Y, a New Type of Thioredoxins Identified in the Genoma of *Chlamydomonas Reinhardtii*", *FEBS Letters* **543**, (2003 (a)) 87-89.
- [42] Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., and Börnke, W.L., "Plastidial Thioredoxin Z Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in *Arabidopsis* and *Nicotiana Benthamiana*", *The Plant Cell* **22**, (2010) 1498-1515.
- [43] Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B., and Miginiac-Maslow, M., "The *Arabidopsis* Plastidial Thioredoxins: New Functions and New Insights into Specificity", *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, (2003) 23747-23752.
- [44] Johnson, T.C., Wada, K., Buchanan, B.B., and Holmgren, A., "Reduction of Purothionin by the Wheat Seed Thioredoxin System", *Plant Physiol.*, **85**, (1987) 446-451.
- [45] Florencio, F.J., Yee, B.C., Johnson, T.C., and Buchanan, B.B., "An NADP/Thioredoxin System in Leaves: Purification and Characterization of



- Nadp-Thioredoxin Reductase and Thioredoxin H from Spinach", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **266**, (1988 ) 496-507.
- [46] Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, and Y., M., " Identification and Characterization of a Mitochondrial Thioredoxin System in Plants", *Proc Natl Acad Sci USA*, **20**, (2001) 14144-14149.
- [47] Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.M., Bonnard, G., and Meyer, Y., "Identification and Characterization of a Mitochondrial Thioredoxin System in Plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **20**, (2001) 14144-14149.
- [48] Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., and Buchanan, B.B., "Isolation of Three Thioredoxins from Spinach Leaves", *J. Biol. Chem.*, **254**, (1979) 1627-1632.
- [49] Marcus, F., Chamberlain, S.H., Chu, C., Masiarz, F.R., Shin, S., Yee, B.C., and Buchanan, B.B., "Plant Thioredoxin H: An Animal-Like Thioredoxin Occurring in Multiple Cell Compartments ", *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, (1991) 195-198.
- [50] Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., and Chino, M., "Thioredoxin H Is One of the Major Proteins in Rice Phloem Sap", *Planta*, **195**, (1995) 456-463.
- [51] Schobert, C., Baker, L., Szederkenyi, J., Grossmann, P., Komor, E., Hayashi, H., Chino, M., and Lucas, W.J., "Identification of Immunologically Related Proteins in Sieve-Tube Exudate Collected from Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants", *Planta.*, **206**, (1998) 245-252.
- [52] Johnson, R.S. and Bieman, K., "The Primary Structure of Thioredoxin from *Chromatium Vinosum* Determined by High Performance Tandem Mass Spectrometry", *Biochemistry*, **26**, (1987) 1209-1214.
- [53] Tsugita, A., Maeda, K., and Schurmann, P., "Spinach Chloroplast Thioredoxins in Evolutionary Drift. ", *Biochemical Biophysical Research Communications*, **115**, (1983) 1-7.
- [54] Holmgren, A., "Enzymatic Reduction-Oxidation of Protein Disulfides by Thioredoxin", *Methods in Enzymology*, **107**, (1984) 295-300.
- [55] Stewart, E.J., A Ê slund, F., and Beckwith, J., "Disulfide Bond Formation in the *Escherichia Coli* Cytoplasm: An in Vivo Role Reversal for the Thioredoxins", *The EMBO Journal*, **17**, (1998) 5543-5550.
- [56] Chae, H.Z., Kang, S.W., and Rhee, S.G., "Isoforms of Mammalian Peroxiredoxin That Reduce Peroxides in Presence of Thioredoxin", *Methods Enzymol.*, **300**, (1999) 219-226.

- [57] Kang, S.W., Chae, H.Z., Seo, M.S., Kim, K., Baines, I.C., Rhee, S.G., and () .. , "Mammalian Peroxiredoxin Isoforms Can Reduce Hydrogen Peroxide Generated in Response to Growth Factors and Tumor Necrosis Factor-Alpha", *J. Biol. Chem.*, **273**, (1998) 6297-6302.
- [58] Zhang, P., Liu, B., Kang, S.W., Seo, M.S., Rhee, S.G., and Obeid, L.M., "Thioredoxin Peroxidase Is a Novel Inhibitor of Apoptosis with a Mechanism Distinct from That of Bcl-2", *J. Biol. Chem.*, **272**, (1997) 30615-30618
- [59] Hassouni, M.E., Chambost, J.P., Expert, D., Van Gijsegem, F., and Barras, F., "The Minimal Gene Set Member Msra, Encoding Peptide Methionine Sulfoxide Reductase, Is a Virulence Determinant of the Plant Pathogen *Erwinia Chrysanthemi*", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, (1999) 887-892.
- [60] Brot, N. and Weissbach, H., "Biochemistry of Methionine Sulfoxide Residues in Proteins", *Biofactors*, **3**, (1991) 91-96.
- [61] Huber, H.E., Tabor, S., and Richardson, C.C., "*Escherichia Coli* Thioredoxin Stabilizes Complexes of Bacteriophage T7 DNA Polymerase and Primed Templates", *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, (1987) 16224±16232.
- [62] Russel, M. and Model, P., "The Role of Thioredoxin in Filamentous Phage Assembly. Construction, Isolation and Characterization of Mutant Thioredoxins", *J. Biol. Chem.*, **261**, (1986) 14997-15005.
- [63] Feng, J.N., Model, P., and Russel, M., "A Trans-Envelope Protein Complex Needed for Filamentous Phage Assembly and Export", *Molecular Microbiology*, **34**, (1999) 745-755.
- [64] Lillig, C.H., Prior, A., Schwenn, J.D., A Ê slund, F., Ritz, D., Vlamis-Gardikas, A., and Holmgren, A., "New Thioredoxins and Glutaredoxins as Electron Donors of 3'-Phosphoadenylsulfate Reductase", *J. Biol. Chem.*, **274**, (1999) 7695-7698.
- [65] Schwenn, J.D., Krone, F.A., and Husmann, K., "Yeast Paps Reductase: Properties and Requirements of the Purified Enzyme", *Arch. Microbiol.*, **150**, (1988) 313-319.
- [66] Buchanan, B.B., "Regulation of Co<sub>2</sub> Assimilation in Oxygenic Photosynthesis: The Ferredoxin/Thioredoxin System. Perspective on Its Discovery, Present Status, and Future Development", *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, (1991) 1-9.
- [67] Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K., "Distinct Effects of Thioredoxin and Antioxidants on the Activation of Transcription Factors Nf-Kappa B and Ap-1", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, (1994) 1672-1676.

- [68] Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J.K.M., and Yodoi, J., "Distinct Roles of Thioredoxin in the Cytoplasm and in the Nucleus. A Two-Step Mechanism of Redox Regulation of Transcription Factor Nf-Kappab", *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, (1999) 27891-27897.
- [69] Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H., "Mammalian Thioredoxin Is a Direct Inhibitor of Apoptosis Signal-Regulating Kinase (Ask) 1", *The EMBO Journal*, **17**, (1998) 2596-2606.
- [70] Nakamura, H., Nakamura, K., and Yodoi, J., "Redox Regulation of Cellular Activation", *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, (1997) 351-369.
- [71] Bertini, R., Howard, O.M., Dong, H.F., Oppenheim, J.J., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Pagliei, S., Romines, B., Wilshire, J.A., Mengozzi, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Pekkari, K., Gurunath, R., Holmgren, A., Herzenberg, L.A., and Ghezzi, P., "Thioredoxin, a Redox Enzyme Released in Infection and Inflammation, Is a Unique Chemoattractant for Neutrophils, Monocytes and T Cells", *The Journal of Experimental Medicine*, **189**, (1999) 1783-1789.
- [72] Silberstein, D.S., McDonough, S., Minkoff, M.S., and Balcewicz-Sablinska, M.K., "Human Eosinophil Cytotoxicity-Enhancing Factor. Eosinophil-Stimulating and Dithiol Reductase Activities of Biosynthetic (Recombinant) Species with CooH-Terminal Deletions", *J. Biol. Chem.*, **268**, (1993) 9138-9142.
- [73] Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., and Taketo, M.M., "Early Embryonic Lethality Caused by Targeted Disruption of the Mouse Thioredoxin Gene", *Dev. Biol.*, **178**, (1996) 179-185.
- [74] Goto, Y., Noda, Y., Narimoto, K., Umaoka, Y., and Mori, T., "Oxidative Stress on Mouse Embryo Development in Vitro", *Free Radical Biology & Medicine - Elsevier*, **13**, (1992) 47-53.
- [75] Di Trapani, G., Perkins, A., and Clarke, F., "Production and Secretion of Thioredoxin from Transformed Human Trophoblast Cells", *Molecular Human Reproduction*, **4**, (1998) 369-375.
- [76] Das, K.C., Guo, X.L., and White, C.W., "Induction of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Gene Expression in Lungs of New Born Primates by Oxygen", *American Journal of Physiology*, **276**, (1999) L530-L539.
- [77] Hori, K., Katayama, M., Sato, N., Ishii, K., Waga, S., and Yodoi, J., "Neuroprotection by Glial Cells through Adult T Cell Leukemia-Derived Factor/Human Thioredoxin (Adf/Trx)", *Brain Research* **652**, (1994) 304-310.

- [78] Schurmann, P., Wolosiuk, R.A., Breazeale, V.D., and Buchanan, B.B., "Two Proteins Function in the Regulation of Photosynthetic CO<sub>2</sub> Assimilation in Chloroplasts", *Nature*, **263**, (1976) 257-258.
- [79] Holmgren, A., Buchanan, B.B., and Wolosiuk, R.A., "Photosynthetic Regulatory Protein from Rabbit Liver Is Identical with Thioredoxin", *FEBS Letters*, **82**, (1977) 351-354.
- [80] Wolosiuk, R.A. and Buchanan, B.B., "Thioredoxin and Glutathione Regulate Photosynthesis in Chloroplasts", *Nature*, **266**, (1977) 565-566.
- [81] Jacquot, J.P., Vidal, J., and Gadal, P., "Identification of a Protein Factor Involved in Dithiothreitol Activation of NADP-Malate Dehydrogenase from French Bean Leaves", *FEBS Letters*, **71**, (1976) 223-227.
- [82] Jacquot, J.P., Vidal, J., Gadal, P., and P., S., "Evidence for the Existence of Several Enzyme-Specific Thioredoxins in Plants", *FEBS Letters*, **96**, (1978) 243-246.
- [83] Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., and B.C., Y., "Evidence for Three Thioredoxins in Leaves", *Plant Physiology*, **61**, (1978) 38S.
- [84] Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C., and Buchanan, B.B., "Specific Reduction of Wheat Storage Proteins by Thioredoxin.", *H. Plant Physiol.*, **99**, (1992) 919-924.
- [85] Besse, I., Wong, J.H., Kobrehel, K., and Buchanan, B.B., "Thiocalsin: A Thioredoxin-Linked, Substrate-Specific Protease Dependent on Calcium", *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)*, **93**, (1996) 3169-3175.
- [86] Wong, J.H., Besse, I., Lozano, R.M., Jiao, J.A., Yee, B.C., Peters, A., Kobehel, K., and Buchanan, B.B., "New Evidence for a Role for Thioredoxin H in Germination and Seedling Development", *Plant Physiol.*, **111**, (1996) 103.
- [87] Marty, I., Brugidou, C., Chartier, Y., and Meyer, Y., "Growth-Related Gene Expression in *Nicotiana Tabacum* Mesophyll Protoplasts", *Plant J.*, **4**, (1993) 265-278.
- [88] Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.-P., Decotrignies, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y., "Evidence for Five Divergent Thioredoxin H Sequences in *Arabidopsis Thaliana*", *Plant Biology*, **92**, (1995) 5620-5624.
- [89] Mouaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P., and Meyer, Y., "In Vivo Functional Discrimination between Plant Thioredoxins by Heterologous Expression in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, (1998) 3312-3317.

- [90] Meyer, Y., Verdoucq, L., and Vignols, F., "Plant Thioredoxins and Glutaredoxins: Identity and Putative Roles", *Trends Plant Sci.*, **4**, (1999) 388-394.
- [91] Mestres-Ortega, D. and Meyer, Y., "The Arabidopsis Thaliana Genome Encodes at Least Four Thioredoxins M and a New Prokaryotic-Like Thioredoxin", *Gene*, **240**, (1999) 307-316.
- [92] Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Presley, E.A., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Hurst, M.A., Roberts, K.M., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H.P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., and Venter, J.C., "Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon *Methanococcus Jannaschii*", *Science* **273**, (1996) 1058-1073.
- [93] Johnson, T.C., Yee, B.C., Carlson, D.E., Buchanan, B.B., Johnson, R.S., Mathews, W.R., and Biemann, K., "Thioredoxin from *Rhodospirillum Rubrum*: Primary Structure and Relation to Thioredoxins from Other Photosynthetic Bacteria", *Journal of Bacteriology*, **170**, (1988) 2406-2408.
- [94] Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S., "Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. Strain Pcc6803. H. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-Coding Regions", *DNA Research* **3**, (1996) 109-136.
- [95] Lepiniec, L., Hodges, M., Gadat, P., and Cretin, C., "Isolation, Characterization and Nucleotide Sequence of a Full-Length Pea Cdna Encoding Thioredoxin F", *Plant Molecular Biology*, **18**, (1992) 1023-1025.
- [96] Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lazaro, J.J., Prado, F.E., and Lopez, G.J., "Cloning and Sequencing of a Pea Cdna Fragment Coding for Thioredoxin M", *Plant Physiol.*, **105**, (1994) 1021-1022.
- [97] Kamo, M., Tsugita, A., Wiessner, C., Wedel, N., Bartling, D., Herrmann, R.G., Aguilar, F., Gardet-Salvi, L., and Schurmann, P., "Primary Structure of Spinach-Chloroplast Thioredoxin F. Protein Sequencing and Analysis of Complete Cdna Clones for Spinach-Chloroplast Thioredoxin F", *Eur. J. Biochem.*, **182**, (1989) 315-322.

- [98] Stein M, Jacquot JP, Jeannette E, Decottignies P, Hodges M, Lancelin JM, Mittard V, Schmitter JM, and M., M.-M., "Chlamydomonas Reinhardtii Thioredoxins : Structure of the Genes Coding for the Chloroplastic M and Cytosolic H Isoforms; Expression in Escherichia Coli of the Recombinant Proteins, Purification and Biochemical Properties", *Plant Molecular Biology*, **28**, (1995) 487-503.
- [99] Trevanion, S.J. and Ashton, A.R., "Cloning of a Full-Length Cdna Clone for Thioredoxin-M from Maize", *Plant Physiol.*, **110**, (1995) 337.
- [100] Wedel, N., Clausmeyer, S., Herrmann, R.G., Gardet-Salvi, L., and Schurmann, P., "Nucleotide Sequence of Cdnas Encoding the Entire Precursor Polypeptide for Thioredoxin Rn from Spinach Chloroplasts", *Plant Molecular Biology*, **18**, (1992) 527-533.
- [101] Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y., "Intron Position as an Evolutionary Marker of Thioredoxins and Thioredoxin Domains", *Journal of Molecular Evolution*, **42**, (1996) 422-431.
- [102] Stein, M., Jacquot, J.P., Jeannette, E., Decottignies, P., Hodges, M., Lancelin, J.M., Mittard, V., Schmitter, J.M., and Miginiac-Maslow, M., "Chlamydomonas Reinhardtii Thioredoxins : Structure of the Genes Coding for the Chloroplastic M and Cytosolic H Isoforms; Expression in *Escherichia Coli* of the Recombinant Proteins, Purification and Biochemical Properties", *Plant Molecular Biology*, **28**, (1995) 487-503.
- [103] Hartman, H., Syvanen, M., and Buchanan, B.B., "Contrasting Evolutionary Histories of Chloroplast Thioredoxins F and M", *Molecular Biology and Evolution*, **7**, (1990) 247-254.
- [104] Eklund, H., Gleason, F., and A., H., "Structural and Functional Relations among Thioredoxins of Different Species", *Proteins*, **11**, (1991) 13-28.
- [105] Genovesio-Taverne, J.C., Jetzer, Y., Sauder, U., Hohenester, E., Huguet, C., and Jansonius, J.N., "Crystallization and Preliminary Diffraction Studies of Spinach Chloroplast Thioredoxin F", *Journal of Molecular Biology* **222**, (1991) 459-461.
- [106] Lancelin, J.M., Stein, M., and Jacquot, J.P., "Secondary Structure and Protein Folding of Recombinant Chloroplastic Thioredoxin Ch2 from the Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii as Determined by  $I_h$  Kmr", *Journal of Biochemistry*, **114**, (1993) 421-431.
- [107] Mittard, V., Morelle, N., Brutscher, B., Simorre, J.P., Marion, D., Stein, M., Jacquot, J.P., Lirsac, P.N., and Lancelin, J.M., " $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Nmr Resonance Assignments of Oxidized Thioredoxin H from the Eukaryotic Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* Using New Methods Based on Two-Dimensional Triple-Resonance Nmr Spectroscopy and Computer-Assisted

- Backbone Assignment", *European Journal of Biochemistry*, **229**, (1995) 473-485.
- [108] Saarinen, M., Gleason, F.K., and Eklund, H., "Crystal Structure of Thioredoxin-2 from *Anabaena*", *Structure*, **3**, (1995) 1097-1108.
- [109] Katti, S.K., LeMaster, D.M., and Eklund, H., "Crystal Structure of Thioredoxin from *Escherichia Coli* at 1.68 Å Resolution.", *Mol. Biol.*, **212**, (1990) 167-184.
- [110] Holmgren, A., Söderberg, B.-O., Eklund, H., and Brändén, C.-I., "Three-Dimensional Structure of *Escherichia Coli* Thioredoxin-S2 to 2.7 Å Resolution", *Proc Natl Acad Sci*, **72**, (1975) 2305-2309.
- [111] Holmgren, A., Söderberg, B.-O., Eklund, H., and Brändén, C.-I., "Three-Dimensional Structure of *Escherichia Coli* Thioredoxin-S2 to 2.7 Å Resolution", *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)* **72**, (1975) 2305-2309.
- [112] Soderberg, B.-O., Sjoberg, B.-M., Sonnerstam, U., and Branden, C.-I., "Three-Dimensional Structure of Thioredoxin Induced by Bacteriophage T4", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, (1978) 5837-5830.
- [113] Eklund, H., Ingelman, M., Söderberg, B.O., Uhlin, T., Nordlund, P., Nikkola, M., Sonnerstam, U., Joelson, T., and Petratos, K., "Structure of Oxidized Bacteriophage T4 Glutaredoxin (Thioredoxin): Refinement of Native and Mutant Proteins", *Journal of Molecular Biology*, **228**, (1992) 596-618.
- [114] Xia, T.H., Bushweller, J.H., Sodano, P., Billeter, M., Björnberg, O., Holmgren, A., and Wüthrich, K., "Nmr Structure of Oxidized *Escherichia Coli* Glutaredoxin: Comparison with Reduced *E. Coli* Glutaredoxin and Functionally Related Proteins", *Protein Sci.*, **1**, (1992) 310-321.
- [115] Sodano, P., Xia, T.H., Bushweller, J.H., Björnberg, O., Holmgren, A., Billeter, M., and Wüthrich, K., "Sequence Specific 1h N.M.R. Assignments and Determination of the Three-Dimensional Structure of Reduced *Escherichia Coli* Glutaredoxin", *J. Mol. Biol.*, **221**, (1991) 1311-1324.
- [116] Bushweller, J.H., Billeter, M., Holmgren, A., and Wuthrich, K., "The Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of the Mixed Disulfide between *Escherichia Coli* Glutaredoxin (C14s) and Glutathione", *Journal of Molecular Biology* **235**, (1994) 1585-1597.
- [117] Reinemer, P., et al., and Huber, R., "The Three-Dimensional Structure of Class R Glutathione S-Transferase in Complex with Glutathione Sulfonate at 2.3 Å Resolution", *The EMBO Journal*, **10**, (1991) 1997-2005.
- [118] Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R.N., and Gilliland, G.L., "The Three-Dimensional Structure of a Glutathione S-Transferase from the P. Gene

- Class. Structural Analysis of the Binary Complex of Isozyme 3-3 and Glutathione at 2.2 a Resolution", *Biochemistry* **31**, (1992) 10169-10184.
- [119] Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Huber, R., Lo Bello, M., Federici, G., and Parker, M.W., "Three-Dimensional Structure of Class Pi Glutathione S-Transferase from Human Placenta in Complex with S-Hexylglutathione at 2.8 a Resolution", *J. Mol. Biol.*, **227**, (1992) 214-226.
- [120] Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., H.W., D., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G., and al., e., "Structure Determination and Refinement of Human Class Glutathione Transferase A1-1, and a Comparison with the Pi and Rr Class Enzymes", *J. Mol. Biol.*, **232**, (1993) 192-212.
- [121] Martin, J.L., Bardwell, J.C.A., and Kuriyan, J., "Crystal Structure of the Dsba Protein Required for Disulphide Bond Formation in Vivo", *Nature*, **365**, (1993) 464-468.
- [122] Bardwell, J.C.A., McGovern, K., and Beckwith, J., "Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation in Vivo", *Cell*, **67**, (1991) 581-589.
- [123] Kamitani, S., Aiyama, Y., and Ito, K., "Identification and Characterisation of an *Escherichia Coli* Gene Required for the Formation of Correctly Folded Alkaline Phosphatase, a Periplasmic Enzyme.", *EMBO J.*, **11**, (1992) 57-62.
- [124] Epp, O., Ladenstein, R., and Wendel, A., "The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2 Nm Resolution", *European Journal of Biochemistry (JournalSeek)*, **133**, (1983) 51-69.
- [125] Martin, J.L., "Thioredoxin - a Fold for All Reasons", *Structure*, **3**, (1995) 245-250.
- [126] Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B.M., Holmgren, A., Jörnvall, H., Höög, J.O., and C.I., B., "Conformational and Functional Similarities between Glutaredoxin and Thioredoxins", *EMBO J.*, **3**, (1984) 1443-1449.
- [127] Katti, S.K., Le Master, D.M., and H., E., "Crystal Structure of Thioredoxin from *Escherichia Coli* at 1 -68 a Resolution", *Journal of Molecular Biology and Evolution*, **212**, (1990) 167-184.
- [128] Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., and Dyson, H.J., "High-Resolution Solution Structures of Oxidized and Reduced *Esclierichia Coli* Thioredoxin", *Structure*, **2**, (1994) 853-868.
- [129] Qin, J., Clore, G.M., and Gronenborn, A.M., "The High-Resolution Three-Dimensional Solution Structures of the Oxidized and Reduced States of Human Thioredoxin", *Structure*, **2**, (1994) 503-522.



- [130] Mittard, V., Blackledge, M., Stein, M., Jacquot, J.P., Marion, D., and Lancelin, J.M., "Nmr Solution Structure of Oxidized Thioredoxin H from the Eukayotic Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*", *European Journal of Biochemistry*, **243**, (1997) 374-383.
- [131] Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., and DJ., L., "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol. Biol.*, **215**, (1990) 403-410.
- [132] Hall, T.A., "Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt", *In Nucl. Acids Symp Ser*, **41**, (1999) 95-98.
- [133] Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., and Bryant, S.H., "Cdd: A Conserved Domain Database for Protein Classification", *Nucleic Acids Res.*, **33**, (2005) D192-D196.
- [134] Cristofano, A.D. and Pandolfi, P.P., "The Multiple Roles of Pten in Tumor Suppression", *Cell*, **100**, (2000) 387-90.
- [135] Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P., "Crystal Structure of the Pten Tumor Suppressor: Implications for Its Phosphoinositide Phosphatase Activity and Membrane Association", *Cell* **99**, (1999) 323-34.
- [136] Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C., and Parsons, R., "Germline Mutations of the Pten Gene in Cowden Disease, an Inherited Breast and Thyroid Cancer Syndrome", *Nat Genet.*, **16**, (1997) 64-7.
- [137] SwoVord, D.L., "Paup 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)", *In Sinauer Associates, Sunderland*, (2001)
- [138] Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C., "Predotar: A Tool for Rapidly Screening Proteomes for N-Terminal Targeting Sequences", *Proteomics*, **4**, (2004) 1581-1590.
- [139] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G., "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence", *J. Mol. Biol*, **300**, (2000) 1005-1016.
- [140] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., "Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins", *Bioinformatics*, **14**, (1998) 378-379.
- [141] Rozen, S. and Skaletsky, H.J., "Primer3", (1998)

- [142] Liu, Y.G. and Whittier, R.F., "Thermal Asymmetric Interlaced Pcr: Automatable Amplification and Sequencing of Insert End Fragments from P1 and Yac Clones for Chromosome Walking", *Genomics* **25**, (1995) 674-681.
- [143] Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F., "Efficient Isolation and Mapping of *Arabidopsis Thaliana* T-DNA Insert Junctions by Thermal Asymmetric Interlaced Pcr", *Plant J* **8**, (1995) 457-463.
- [144] Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., "**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**", New York. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).