

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**SÜS BİTKİLERİNDEN FLAVONOİD 3'-HİDROKSİLAZ VE
FLAVONOİD 3'5'-HİDROKSİLAZ ENZİMLERİNİN
KLONLANMALARI, KARAKTERİZASYONLARI VE SUBSTRAT
SPESİFİTELERİNİN ÇALIŞILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Fuat TOPUZ

**AĞUSTOS 2007
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**SÜS BİTKİLERİNDEN FLAVONOİD 3'-HİDROKSİLİZ VE
FLAVONOİD 3'5'-HİDROKSİLİZ ENZİMLERİNİN
KLONLANMALARI, KARAKTERİZASYONLARI VE SUBSTRAT
SPESİFİTELERİNİN ÇALIŞILMASI**

Kimyager Fuat TOPUZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi için Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.08.07
Tezin Savunma Tarihi : 27.08.07**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER**

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2007

ÖNSÖZ

“Süs bitkilerinden elde edilen Flavonoid 3'-Hidroksilaz (F3'H) ve Flavonoid 3'5'-Hidroksilaz (F3'5'H) enzimlerinin klonlanmaları, karakterizasyonları ve substrat spesifitelerinin çalışılması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle değerli danışman hocam Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e, bu çalışmamda bana yardımcı ve yol gösterici olduğundan dolayı minnettarım.

Bu tezimde, Viyana Teknoloji Üniversitesinde beni öğrenci olarak kabul edip, laboratuvarında çalışma fırsatı tanıyan, Sayın Dip. Ing. Dr. Heidrun HALBWIRTH'e teşekkürler ederim. Ayrıca flavonoidlerle ilgili bilgi ve deneyiminden çalışmam sırasında yararlanmamı sağladığı için ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmanın moleküler kısmında, benden yardımlarını esirgemeyen ve değerli zamanını bana ayırarak DNA ve gen çalışmalarını öğrenmemi sağlayan, Sayın Dip. Ing. Dr. Karin SCHLANGEN'e minnettarım.

Pek değerli dostum tekniker Jurgen GROYER'a, klon hazırlanması ve kişisel problemlerimin çözümünde göstermiş olduğu yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmamda bana kısmi olarak yardımda bulunan Tu-Wien, Kimya Mühendisliği Enstitüsü çalışanlarından sırasıyla Ao. Prof. Karl STICH, Silviya MIOSIC, Reneta PALTRAM, Christian GOSH ve sohbet arkadaşım Hannes'e teşekkür ederim.

Ayrıca benim yurt dışında yüksek lisans tezimi yapmamda tavsiyeleri için başta Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölüm öğretim üyelerinden değerli hocam Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI olmak üzere tüm grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Benim Viyana'ya gitmemde maddi destek sağlayan is adamı Sayın Sinan AYDIN'a minnettarım. Bu çalışmamda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta kardeşlerimden Feride CIMEN, Aytekin TOPUZ, Doç. Dr. Gültekin Topuz ve yeğenim Merve CIMEN olmak üzere bütün aileme teşekkür ediyor ve bu çalışmamı onlara adıyorum.

Fuat TOPUZ

Trabzon 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Flavonoidler.....	1
1.1.1. Flavonoidlerin Fizyolojik Özellikleri.....	3
1.1.2. Flavonoidlerin Biyosentezi.....	8
1.1.2.1. Flavonoid Öncü Sentezler.....	8
1.1.2.1.1. Asetil CoA Karboksilaz.....	8
1.1.2.1.2. Shikimat – Arogenat Yolu.....	8
1.1.2.1.3. Fenilalanin Amonyumliyz.....	9
1.1.2.1.4. Sinamat 4-Hidroksilaz.....	9
1.1.2.2. Flavonoid Metabolizmasındaki Enzimler.....	11
1.1.2.2.1. Kalkon Sentaz.....	11
1.1.2.2.2. 6’Deoksikalkon Oluşumu.....	11
1.1.2.2.3. Kalkon İsomerez.....	11
1.1.2.2.4. Flavon Sentaz.....	12
1.1.2.2.5. Flavonon 4-Redüktaz.....	12
1.1.2.2.6. Dihidroflavonol 4’-Hidroksilaz.....	12
1.1.2.2.7. Antosiyanidin Sentaz.....	13
1.1.2.2.8. Antosiyanidin 3-O-Glikozit Oluşumu.....	13
1.2. Sitokrom p450.....	15
1.2.1. F3’H ve F3’5’H Enzimlerinin Fonksiyonları.....	17
2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER.....	20
2.1. Materyaller.....	20

2.1.1.	Bitki Materyali.....	20
2.1.1.1.	Asteracacea Ailesi.....	20
2.1.1.1.1.	<i>Gerbera Hybrida</i>	21
2.1.1.1.2.	<i>Rudbeckia Hirta</i>	22
2.1.1.1.3.	<i>Tagetes Erecta</i>	23
2.1.1.1.4.	<i>Osteospermum Hybrida</i> (Bamba).....	23
2.1.1.1.5.	<i>Centaurea Cyanus</i>	24
2.1.1.1.6.	<i>Cichorium İntybus</i>	24
2.1.1.1.7.	<i>Dahlia Variables</i> (Chat Noir).....	25
2.1.1.1.8.	<i>Echinops Bannaticus</i>	25
2.1.1.2.	Pittosporaceae Ailesi.....	26
2.1.1.2.1.	<i>Sollya Heterophylla</i>	26
2.1.1.3.	Brassicaceae Ailesi.....	26
2.1.1.3.1.	<i>Arabidopsis Thaliana</i>	27
2.1.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	31
2.1.3.	Kullanılan Cihazlar.....	32
2.1.4.	Kullanılan Enzimler.....	33
2.1.5.	Kullanılan Programlar.....	33
2.1.6.	Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	33
2.1.7.	Kullanılan Kültürler.....	35
2.1.8.	Plazmitler.....	36
2.1.8.1.	pYes2.1.....	37
2.1.9.	Bakteri ve Maya Soyları.....	38
2.1.9.1.	<i>Escherichia Coli</i> TOP 10.....	38
2.1.9.2.	<i>Escherichia Coli</i> TOP 10F ⁻	38
2.1.9.3.	Maya Soyları.....	39
2.2.	Yöntemler.....	39
2.2.1.	Sterilizasyon.....	39
2.2.2.	Moleküler Çalışmalar.....	39
2.2.2.1.	Nükleik Asitlerin Çöktürülmesi.....	39
2.2.2.1.1.	Etanol (EtOH) Yardımıyla Çöktürülmesi.....	39
2.2.2.2.	Nükleik Asitlerin Ölçümü.....	40

2.2.2.3.	RNA'nın İzolasyonu.....	40
2.2.2.4.	Ters Transkripsiyon.....	40
2.2.2.5.	Tek-Kol cDNA Sentezi.....	41
2.2.2.6.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	41
2.2.2.7.	Proof-Reading PCR (PR-PCR).....	42
2.2.2.8.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	42
2.2.2.9.	Flavonoid 3'-Hidroksilaz (F3'H) Enziminin Klonlaması.....	43
2.2.2.10.	pYES2.1/V5-His-TOPO İçine Ligasyonu.....	43
2.2.2.11.	<i>E. Coli</i> İçindeki Plazmitlerin Transformasyonları.....	43
2.2.2.12.	Plazmit İzolasyonu.....	44
2.2.2.13.	Kaynama Hazırlığı.....	44
2.2.2.14.	E.N.Z.A. Plazmit Miniprep I Kiti.....	44
2.2.2.15.	Plazmit Analizi	45
2.2.2.16.	Koloni PCR.....	45
2.2.2.17.	Sınırlı Sindirme.....	46
2.2.2.18.	<i>S. Cerevisiae</i> 'nin Transformasyonu.....	47
2.2.2.19.	Hücre Kültürlerinin Optik Yoğunluğu.....	47
2.2.2.20.	Maya'da Heterolojik Enzim İfadesi.....	47
2.2.3.	İnce Tabaka Kromatografisi.....	49
2.2.4.	Enzimatik Sentez İçin Enzimlerin Hazırlanması.....	50
2.2.4.1.	Naringenin Sentezi İçin Enzimlerin Hazırlanması.....	50
2.2.4.1.1.	Kalkon Sentaz (CHS) Enziminin Hazırlanması.....	50
2.2.4.1.2.	Kalkon İzomeraz (CHI) Enziminin Hazırlanması.....	51
2.2.4.2.	Dihidrokaemferol Sentezi İçin Enzim Hazırlanması.....	51
2.2.4.2.1.	Flavonon 3-Hidroksilaz (FHT) Enziminin Hazırlanması.....	51
2.2.5.	Enzimatik Sentezler.....	51
2.2.5.1.	(¹⁴ C) İle İzotoplanmış Naringenin'in Enzimatik Sentezi.....	51
2.2.5.2.	(¹⁴ C) İle İzotoplanmış Dihidrokaemferol'un Enzimatik Sentezi.....	52
2.2.5.3.	(¹⁴ C) İle İzotoplanmış Apigenin'in Enzimatik Sentezi.....	52
2.2.5.4.	(¹⁴ C) İle İzotoplanmış Kaemferol'un Enzimatik Sentezi.....	53
2.2.6.	Organik Sentez.....	54
2.2.6.1.	(¹⁴ C) İle İzotoplanmış İsolikuiritigenin'in Sentezi.....	54

2.2.7.	Deneyler.....	55
2.2.7.1.	F3'H ve F3'5'H Testi.....	55
2.2.7.2.	Optimum pH Deneyi.....	55
2.2.7.3.	Optimum Sıcaklık Deneyi.....	56
2.2.7.4.	Protein Duyarlılık Deneyi.....	56
2.2.7.5.	Sıcaklık Duyarlılık Deneyi.....	57
2.2.7.6.	Zaman Kararlılık Deneyi.....	57
2.2.7.7.	Kinetik Deney.....	58
2.2.7.8.	Protein Tayin Deneyi.....	58
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	59
3.1.	Kinetik Bulgular.....	59
3.1.1.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H).....	59
3.1.1.1.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H) Optimum pH Deneyi.....	59
3.1.1.2.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H) Optimum Sıcaklığı.....	59
3.1.1.3.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H) Zaman Kararlığı.....	60
3.1.1.4.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H) Sıcaklık Duyarlığı.....	61
3.1.1.5.	<i>Tagetes Erecta</i> (F3'H) Protein Duyarlığı.....	61
3.1.2.	<i>Arabidopsis thaliana</i> (F3'H).....	62
3.1.2.1.	<i>Arabidopsis Thaliana</i> (F3'H) Optimum pH.....	62
3.1.2.2.	<i>Arabidopsis Thaliana</i> (F3'H) Optimum Sıcaklığı.....	63
3.1.2.3.	<i>Arabidopsis Thaliana</i> (F3'H) Zaman Kararlığı.....	63
3.1.2.4.	<i>Arabidopsis Thaliana</i> (F3'H) Sıcaklık Duyarlığı.....	64
3.1.3.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)).....	65
3.1.3.1.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)) Optimum pH.....	65
3.1.3.2.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)) Optimum Sıcaklığı.....	65
3.1.3.3.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)) Zaman Kararlığı.....	66
3.1.3.4.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)) Sıcaklık Duyarlığı.....	67
3.1.3.5.	<i>Echinops Bannaticus</i> (F3'5'H (1)) Protein Duyarlığı.....	67
3.1.4.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)).....	68
3.1.4.1.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) Optimum pH.....	68
3.1.4.2.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) Optimum Sıcaklığı.....	68
3.1.4.3.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) Zaman Kararlığı.....	69

3.1.4.4.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) Sıcaklık Duyarlılığı.....	70
3.1.4.5.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) Protein Duyarlılığı.....	71
3.1.4.6.	<i>Sollya Heterophylla</i> (F3'5'H (3)) İçin Kinetik Deney.....	71
3.1.4.6.1.	İsolikuiritigenin Substrat Olarak Enzim Kinetiği.....	71
3.1.4.6.2.	Kaemferol Substrat Olarak Enzim Kinetiği.....	72
3.1.5.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H).....	73
3.1.5.1.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) Optimum pH.....	73
3.1.5.2.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) Optimum Sıcaklığı.....	73
3.1.5.3.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) Zaman Kararlılığı.....	74
3.1.5.4.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) Sıcaklık Duyarlılığı.....	75
3.1.5.5.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) Protein Duyarlılığı.....	75
3.1.5.6.	<i>Rudbeckia Hirta</i> (F3'H) İçin Kinetik Deney.....	76
3.1.5.6.1.	İsolikuiritigenin Substrat Olarak Enzim Kinetiği.....	76
3.1.5.6.2.	Kaemferol Substrat Olarak Enzim Kinetiği.....	77
3.2.	Substrat İlgileri.....	78
3.3.	Optimum pH'lar.....	79
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	87
5.	KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bu çalışmanın öncelikli amacı, çeşitli süs bitkilerinden flavonoid 3'-hidroksilaz (F3'H) ve flavonoid 3'5'-hidroksilaz (F3'5'H) enzimlerini izole etmek ve onları, pYes2.1 vektörü yardımıyla tamamlayıcı DNA (cDNA)'larını oluşturmak ve onları maya içinde heterolojik olarak ifade etmektir.

Çeşitli süs bitki kültürlerinin yaprak kısmındaki mRNA'lar, µMACS mRNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmişlerdir. Ters transkripsiyon, SuperScript II ters transkriptaz ve oligo(-dT) öncü primer kullanılarak gerçekleştirildi. RT-PCR için, primerler bitkilerin mevcut olan F3'H gen dizilerinden, henüz tercüme yapılmamış 5' ve 3' bölgeleri için satın alındı. Çeşitli F3'H genler, birçok primerler kullanılarak test edildi ve çoğaltma için ileri ve ters olmak üzere uygun diziler seçildi. Çoğaltma üretici tarafından belirtilen uygun koşullarda, Taq/Pwo-polimeraz kullanılarak yapıldı.

Enzim ifadeleri heterolojik olarak gerçekleştirilen F3'H ve F3'5'H enzimlerinin naringenin (flavonon), kaemferol (flavonol), dihidrokaemferol (dihidroflavonol) ve apigenin (flavon) olmak üzere 4 farklı flavonoid türü ve bir adet fizyolojik önem taşıyan isolikuiritigenin (ISL) adlı kalkon ile reaksiyona sokarak substrat sipesifiteleri belirlendi. Ayrıca, bu substratların çeşitli bitkilerden klonlanan F3'H ve F3'5'H enzimleri için optimum pH'ları bulundu. Bu optimum pH'ların incelenmesiyle apigeninin diğer substratlara göre daha bazik ortamı sevdiği bulundu.

Enzimlerin substrat ilgileri bulunduktan sonra, gen dizi karşılaştırmaları gerçekleştirildi. Bilindiği gibi aktif bölgede bulunan sadece 1 amino asit değişikliği bile enzimin aktivitesini değiştirebilmektedir. Gen dizi karşılaştırılmasıyla bulunan benzer ve farklılıklar belirlenerek, aktivitenin gen dizisinin aktif bölgesinde hangi amino asitten kaynaklandığı bulundu. Ger. Hyb. (8) enzimin apigeninle reaksiyon vermemesinin ve bazı enzimlerin ISL ile reaksiyon vermelerinin nedenleri gen dizi karşılaştırılmasıyla bulundu.

Anahtar Kelimeler: Flavonoid 3'-hidroksilaz, Flavonoid 3'5'-hidroksilaz, RT-PCR Taq/Pwo-polimeraz, Oligo(-dT), SuperScript II ters transkriptaz, Transkripsiyon.

SUMMARY

Cloning and Characterization of Flavonoid 3'-Hydroxylase ve Flavonoid 3'5'-Hydroxylase from Ornemantal Plants and Studies on Their Substrate Specificities

The primary aim of this work is to isolate flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) and flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H) and to compose cDNA of them with the aid of pYes2.1 vector and ultimately to express them in yeast heterogeneously.

The mRNAs which are found at the leaf part of cultures from various ornemantal plants were isolated by means of μ MACS mRNA kit. Inverse transcription was actualized using Superscript II inverse transcriptase and oligo(-dT) primer. Primers that are present in plants from F3'H gene sequences for 5' and 3' zones in RT-PCR were composed. Distinct F3'H genes were tested using numbers of primers and convenient sequences as a reverse and inverse, selected for amplification. Amplification was carried out using Taq/Pwo-polimerase under right convenient conditions that were described by producer firm.

These enzymes which were expressed heterogeneously were tested with four different flavonoids pertaining to each various class as naringenin (flavonone), kaempferol (flavonol), dihydrokaempferol (dihydroflavonol), apigenin (flavone) and physiological chalcone named isoliquiritigenin and substrate specificities of them were found. Subsequently, optimum pHs for these enzmes with same substrates were determined, and substrates specificities were determined. According to outcomes of opt. pH determinations, It was defined that apigenin is basic-lover substrate.

After having reached substrate affinities, gene sequences of enzymes were compared with each others. As it is known, one amino acid can bring out changes in enzyme activity. By comparing gene sequences, similarities and differences were determined and the amino acid responsible for enzyme activity in gene sequence has been found. Reason of inactivity of Ger. hyb. (8) enzyme was determined with comparing gene sequences. It was also determined th reason of why the some enzymes that reacted with ISL with same tecnique.

Keywords: Flavonoid 3'-hydroxylase, Flavonoid 3'5'-hydroxylase, RT-PCR, Taq/Pwo-polymerase, Oligo(-dT), SuperScript II reverse transcriptase, Transcription.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Genel flavan yapısı.....	1
Şekil 2. Flavonoid sınıfları.....	2
Şekil 3. PAL enzimi yardımıyla sinnamik asitin oluşumu.....	9
Şekil 4. Flavonoid biyosentez şeması.....	10
Şekil 5. Kalkon izomeraz enzimin yardımıyla naringenin oluşumu.....	12
Şekil 6. Antosiyaninlerin renk oluşumuna katkısı.....	14
Şekil 7. Naringenin, apigenin, kaemferol, dihidrokaemferol ve isolikuiritigenin'in F3'H ve F3'5'H enzimleri ile verdikleri reaksiyonlar.....	19
Şekil 8. Genel <i>Asteraceae</i> ailesinin çiçek başı.....	20
Şekil 9. <i>Gerbera hybrida</i> çiçeği (Gerbera çiçeği).....	29
Şekil 10. <i>Rudbeckia hirta</i> çiçeği (Güneş şapkası).....	29
Şekil 11. <i>Osteospermum hyb. (bamba)</i> çiçeği (Bodrum papatyası).....	29
Şekil 12. <i>Tagetes erecta</i> çiçeği (Kadife çiçeği).....	29
Şekil 13. <i>Centaurea cyanus</i> çiçeği (Peygamber çiçeği).....	29
Şekil 14. <i>Cichorium intybus</i> çiçeği (Hindiba).....	30
Şekil 15. <i>Arabidopsis thaliana</i> çiçeği (Tere otu).....	30
Şekil 16. <i>Sollya heterophylla</i> (Çan çiçeği).....	30
Şekil 17. <i>Echinops bannaticus</i> çiçeği (Topuz çiçeği).....	30
Şekil 18. <i>Dahlia variables (chat noir)</i> çiçeği (Yıldız çiçeği).....	30
Şekil 19. pYes2.1 /V5-His-TOPO yapısı.....	37
Şekil 20. Genel TLC çalışma işleyişi.....	49
Şekil 21. <i>Tagetes erecta</i> F3'H enziminin ISL ile pH'ya bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	58
Şekil 22. <i>Tagetes erecta</i> F3'H enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	59
Şekil 23. <i>Tagetes erecta</i> F3'H enziminin zamana bağlı olarak ISL ile oluşan ürün miktarları.....	59
Şekil 24. <i>Tagetes erecta</i> F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite.....	60
Şekil 25. <i>Tagetes erecta</i> F3'H enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	60

Şekil 26.	<i>Arabidopsis thaliana</i> F3'H enziminin ISL ile pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	61
Şekil 27.	<i>Arabidopsis thailana</i> F3'H enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	61
Şekil 28.	<i>Arabidopsis thailana</i> F3'H enziminin zamana bağlı olarak ISL ile oluşan ürün miktarları.....	62
Şekil 29.	<i>Arabidopsis thailana</i> F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite.....	63
Şekil 30.	<i>Echinops bannaticus</i> F3'5'H (1) enziminin ISL ile pH'a bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	64
Şekil 31.	<i>Echinops bannaticus</i> F3'5'H (1) enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı oluşan ürün miktarları.....	64
Şekil 32.	<i>Echinops bannaticus</i> F3'5'H (1) enziminin zamana bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	65
Şekil 33.	<i>Echinops bannaticus</i> F3'5'H (1) enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite.....	66
Şekil 34.	<i>Echinops bannaticus</i> F3'5'H (1) enziminin ISL ile protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	66
Şekil 35.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H (3) enziminin ISL ile pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	67
Şekil 36.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H (3) enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	68
Şekil 37.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H(3) enziminin zamana bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	68
Şekil 38.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H(3) enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktiviteleri.....	69
Şekil 39.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H(3) enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	70
Şekil 40.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H(3) enziminin isolikuitigenin substrat olarak kinetiği.....	70
Şekil 41.	<i>Sollya heterophylla</i> F3'5'H(3) enziminin kaemferol substrat olarak kinetiği.....	71
Şekil 42.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	72
Şekil 43.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	72
Şekil 44.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin zamana bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	73
Şekil 45.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktiviteleri.....	74

Şekil 46.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları.....	74
Şekil 47.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin ISL substrat olarak kinetiği.....	75
Şekil 48.	<i>Rudbeckia hirta</i> F3'H enziminin kaemferol substrat olarak kinetiği.....	75
Şekil 49.	Rud. F3'H(K) – ISL Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 50.	Rud. F3'H – NAR Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 51.	Rud. F3'H – DHK Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 52.	Rud. F3'H(K) – APİ Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 53.	Rud. F3'H(K) – KAEM Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 54.	Sol. F3'5'H(3) – APİ Opt. pH grafiği.....	79
Şekil 55.	Sol. F3'5'H(3) – DHK Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 56.	Sol. F3'5'H(3) – KAEM Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 57.	Sol. F3'5'H(3) – NAR Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 58.	Sol. F3'5'H(3) – ISL Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 59.	Ger. F3'H – NAR Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 60.	Ger. F3'H – DHK Opt. pH grafiği.....	80
Şekil 61.	Ger. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 62.	Ger. F3'H – APİ Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 63.	Arab. F3'H – DHK Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 64.	Arab. F3'H – APİ Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 65.	Arab. F3'H – ISL Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 66.	Arab. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği.....	81
Şekil 67.	Ech. F3'5'H(1) – ISL Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 68.	Ech. F3'5'H(1) – KAEM Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 69.	Ech. F3'5'H(1) – APİ Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 70.	Ech. F3'5'H(6) – DHK Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 71.	Ech. F3'5'H(6) – KAEM Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 72.	Ech. F3'H(1) – APİ Opt. pH grafiği.....	82
Şekil 73.	Ech. F3'H(1) – KAEM Opt. pH grafiği.....	83
Şekil 74.	Ech. F3'H(1) – DHK Opt. pH grafiği.....	83
Şekil 75.	Ech. F3'H(1) – NAR Opt. pH grafiği.....	83

Şekil 76.	Ech. F3'H(1) – DHK Opt. pH grafiği.....	83
Şekil 77.	Ech. F3'H(6) – KAEM Opt. pH grafiği.....	83
Şekil 78.	Ech. F3'H(6) – APİ Opt. pH grafiği.....	83
Şekil 79.	Ech. F3'H(6) – APİ Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 80.	Ger. F3'H(8) – NAR Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 81.	Ger. F3'H(8) – KAEM Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 82.	Ger. F3'H(8) – DHK Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 83.	Ger. F3'H(9) – NAR Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 84.	Ger. F3'H(9) – DHK Opt. pH grafiği.....	84
Şekil 85.	Ger. F3'H(9) – KAEM Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 86.	Ger. F3'H(9) – APİ Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 87.	Korn. F3'H – NAR Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 88.	Korn. F3'H(27) – DHK Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 89.	Korn. F3'H(27) – KAEM Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 90.	NAR. F3'H(27) – DHK Opt. pH grafiği.....	85
Şekil 91.	Korn. F3'H(27) – APİ Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 92.	Ost. F3'H(11) – KAEM Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 93.	Ost. F3'H(11) – DHK Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 94.	Ost. F3'H(11) – NAR Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 95.	Ost. F3'H(11) – APİ Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 96.	Ost. F3'5'H – DHK Opt. pH grafiği.....	86
Şekil 97.	Ost. F3'5'H – KAEM Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 98.	Ost. F3'5'H – NAR Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 99.	Weg. F3'H – NAR Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 100.	Weg. F3'5'H(4) – DHK Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 101.	Weg. F3'5'H(4) – KAEM Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 102.	Tag. F3'H – İSL Opt. pH grafiği.....	87
Şekil 103.	Tag. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği.....	88
Şekil 104.	Tag. F3'H – DHK Opt. pH grafiği.....	88
Şekil 105.	Dah. F3'H – NAR Opt. pH grafiği.....	88
Şekil 106.	Dah. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği	88
Şekil 107.	Dah. F3'H – DHK Opt. pH grafiği.....	88
Şekil 108.	Rud. F3'H(nK) – DHK Opt. pH grafiği.....	88

- Şekil 109. Gerbera hybrida, Gerbera hybrida (8) ve Gerbera hybrida (9)
enzimlerinin protein dizisine göre karşılaştırılması.....91
- Şekil 110. Ger. Hyb. F3'H(9), Ost. F3'H (11), Weg. F3'H, Rud. F3'H (Koz),
Taget. F3'H, Dahlia CN F3'H, Korn. F3'H (24), Korn. F3'H (27),
Sol. F3'5'H (3) enzimlerinin protein dizisine göre karşılaştırılması.....92

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Ülkelere göre tüketilen çay ile çarpıntı arasındaki ilişki.....	5
Tablo 2. P450 enzimlerini inhibe eden maddeler.....	16
Tablo 3. P450 enzimlerini indükleyen maddeler.....	17
Tablo 4. Süspansiyonlardaki optiksel yoğunluğa bağlı olarak eklenecek hacim.....	48
Tablo 5. Flavonoid türlerinin TLC bölmesinde kalma süreleri.....	49
Tablo 6. F3'H ve F3'5'H aktivite testinin bileşenleri.....	54
Tablo 7. Çeşitli süs bitkilerinden klonlanan F3'H ve F3'5'H enzimlerinin substratlara karşı olan ilgileri.....	78

SEMBOLLER DİZİNİ

*Standart amino asitlerin tek harfli kodları listelenmeyecektir.

A	: Adenin
ANS	: Anthocyanidin sentaz
API	: Apigenin
BAW	: Butanol, asetik asit ve sudan oluşan çözücü sistemi
bc	: Baz çifti
C	: Sitozin
CAW	: Kloroform, asetik asit ve sudan oluşan çözücü sistemi
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CHI	: Kalkon izomeraz
CHS	: Kalkon sentaz
CoA	: Koenzim A
Cy	: Siyanidin
dk	: Dakika
dNTPs	: Deoksinükleozit trifosfat(lar)
DFR	: Dihidroflavonol 4-redüktaz
DHK	: Dihidrokaemferol
DHM	: Dihidromirisetin
DHQ	: Dihidrokuersetin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dpm	: Dakikadaki ayrışma sayısı
DTT	: 1,4-ditiyo-DL-tireitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ER	: Endoplazmik retikulum
ERI	: Erodiktiyol
EtBr	: Etidyum bromür
EtOAc	: Etil asetat
EtOH	: Etanol

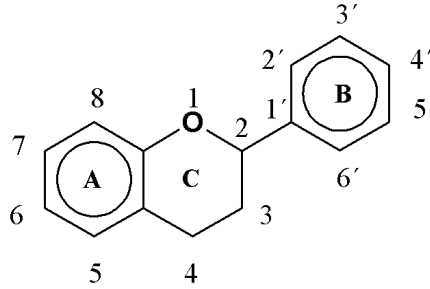
FGT	: Flavonoid 3-O-glikozil transferaz
FHT	: Flavonoid 3-hidroksilaz
FLS	: Flavonol sentaz
FNR	: Flavanon 4-redüktaz
FNS I , FNS II	: Flavon sentaz I, II
G	: Guanin
g	: Gram
GDO	: Genetiksel değiştirilmiş organizmalar
GSP	: Gen spesifik primer
HCl	: Hidroklorik asit
HEPES	: N-(2-hidroksietil) piperazin –N-(2-etansülfonik asit)
ISL (İso)	: İsolikuiritigenin
KCl	: Potasyum klorür
KAEM	: Kaemferol
LCY	: Lekosiyanidin
LPG	: Lekopelargonidin
Lu	: Luteolin
mA	: Miliamper
mCi	: Milikür
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mRNA	: Elçi ribonükleik asit
NaAc	: Sodyum asetat
NaCl	: Sodyum klorür
NAR	: Naringenin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyon
PEG	: Polietilen glikol
Pg	: Pelargonidin
PHC	: Pentahidrokkalkon
Qu	: Kuersetin
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz

rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
s	: Saniye
<i>S. cerevisasae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisasae</i>
SGI	: Seçici maya medyumunu
SOC	: Antibakteriyolojik yok, seçici bakteri medyası olmayan
T	: Timin
TAE	: Tris, asetat ve EDTA'lı tampon
TEG*	: Tris, gliserol ve EDTA'lı tampon
TEK	: Tris, KCl ve EDTA'lı tampon
THP	: Tris (hidroksipropil) fosfin
Tm	: Erime sıcaklığı
TES-B*	: Tris, sorbitol, EDTA ve disülfid indirgenme ajanlı tampon
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
U	: Ünite
U	: Urasil
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
Vol	: Hacim
W	: Watt
YPGE	: Etanol, glikoz, pepton, maya ekstraktlı kültür
3'RACE	: (3'-) cDNA ucunun hızlı çoğaltılması
β -NADPH-Na ₄	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat indirgenmiş tetra sodyum tuzu
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
F3'H	: Flavonoid 3'-hidroksilaz
F3'5'H	: Flavonoid 3'5'-hidroksilaz
LB _{Amp}	: Ampisilinli Lurya-Bertani kültür medyumunu
LB _{Exp}	: <i>E. coli</i> 'deki heterolojik ifade için Lurya-Bertani kültür medyumunu
μ L	: Mikrolitre
<i>p</i> -Koumaroyil CoA	: Para-koumaroyil koenzim-A
p450	: Sitokrom p450 enzim ailesi
S 1	: Biyolojik güvenlik kategori numarası 1
w/v	: Ağırlık bölü hacim

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Flavonoidler

Genel yapı itibari ile C₆-C₃-C₆ yapı biçiminde gösterilmekte olan flavonoidler, C₁₅ karbon yapısında düşük molekül ağırlıklı polifenolik maddelerdir. Flavonoidler insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturan meyvelerde, sebzelerde, kabuklu yiyeceklerde, tohumlarda, çayda, viskide yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Bütün vasküler bitkilerde bulunan flavonoidler, ikincil metabolitler grubuna dahil edilmişlerdir. İki benzen halkası ve ortada üçüncü bir aromatik halkayla oluşmuş olan bu birleşikler canlılarda gösterdikleri birçok fizyolojik özellikleri ile ön plandadırlar. Aşağıdaki genel flavan yapısından (Şekil 1) görüleceği gibi A, B ve C harfleriyle gösterilen halkalı yapılardan meydana gelen flavonoidlerin sayısı, Harborne'nun "The Handbook of Flavonoids" adlı kitabında, 6400'ün üzerinde belgelenmiştir (Halborne ve Baxter, 1999).

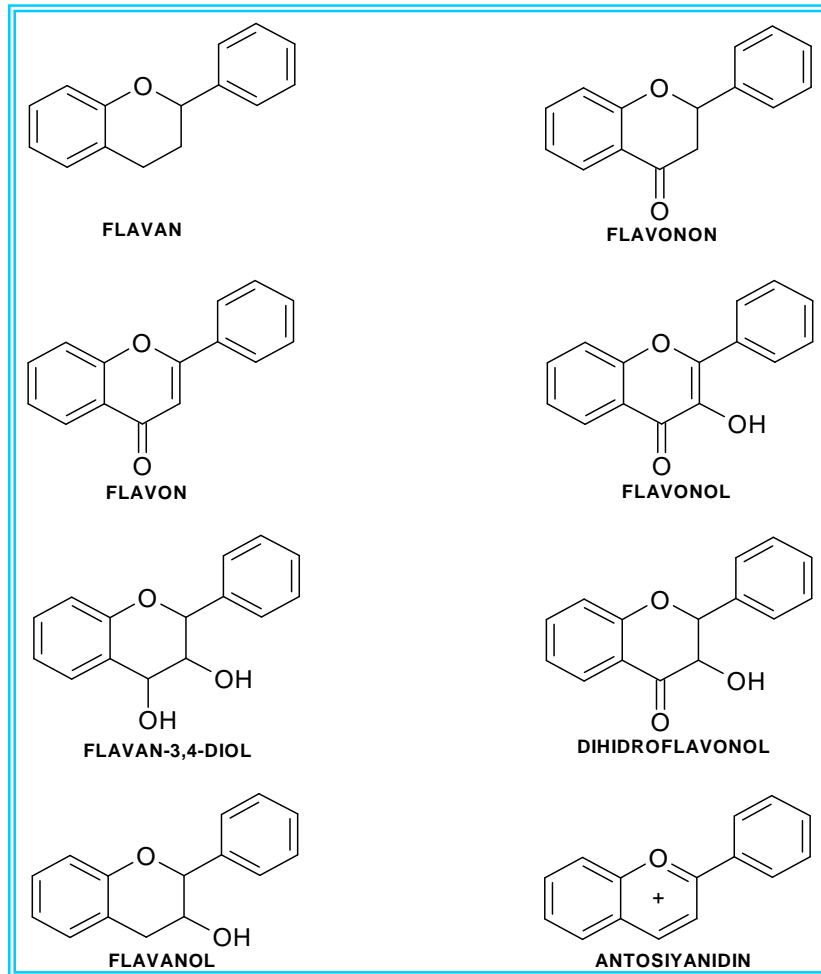


Şekil 1. Genel flavan yapısı

Grup sınıflandırılması C halkası üzerinde olan yapı değişiklikleri ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 2). Farklı flavonoidler ana yapı üzerinde meydana gelen glikozilasyon, hidrogenasyon, malonilasyon, metilasyon ve sülfatasyon gibi yer değiştirme reaksiyonları ile oluşturulmaktadır. Genel olarak, flavonoidler shikimat yoluyla meydana gelen *p*-kumaroyil-CoA ile sitrik asit çevriminden meydana gelen malonil-CoA'nın birleşmesi ile oluşan kalkon yapısının kalkon izomerasyon enzimi ile izomerleşmesinden meydana gelir. Flavonoidler hücre sitoplazmasında endoplazmik retikulum ile bağlı olarak sentezlenirler ve daha sonra bu membran yoluyla taşınırlar. Önceleri, bitki rengi kimyasında, hücre vakuol

sulu çevresinde flavonoid pigmentlerinin bir birbiriyle karışmış halde buldukları tahmin ediliyordu. Fakat hücresel seviyede yapılan çalışmalar ile flavonoid pigment çeşitlerinin, taç yaprak hücrelerinde seçici olarak özel bölmelerde bulduklarını gösterilmiştir. Flavonoidler bitkilerde, şekersiz formu “aglikon” ve şeker eklenmiş formu “glikozit” olmak üzere iki farklı halde bulunmaktadır. Genellikle kateşin dışında flavonoidler aglikon yapısında olmazlar, aksine bitkilerde glikozit türevleri şeklinde bulunmaktadır. Flavonoidlerin adlandırılmasında; glikozit türevleri halinde bulunan flavonoidlere “in” ya da “idin” eklenirken, aglikon halinde bulunanlara da “etin” eklenmektedir.

Bağırsaklardan flavonoid glikozitlerinin absorpsiyonlarını belirleyen en önemli faktör şeker kısmıdır. Hollman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalara göre soğandan elde edilen kuersetin glikozitlerinin (52%), saf aglikonlara (24%) göre daha etkin bir oranda emildiklerini ortaya koymaktadır (Hollman ve Katan, 1997; Hollman vd, 1999).



Şekil 2. Flavonoid sınıfları

1.1.1. Flavonoidlerin Fizyolojik Özellikleri

Mantarlarda da görülen, bütün yüksek bitkilerde bulunan flavonoidler, heterojenik ikincil metabolitlerin en geniş ve en bol olan gruplarından biridir. Flavonoidler, genellikle epidermal hücrelerin vakuollerinde suda çözünebilen glikozit formda bulunmakla birlikte, epikutikular mum yaprağının üst kısmında da glikozitsiz formda da bulunabilmektedirler. Bu kısımdaki flavonoidler *o*-metillenmiş haliyle olup, suda çözünür haldedirler. Bu *o*-metillenmiş formunun bitkiyi uv ışığından korumasında etkin rol oynadığı bilinmektedir. Yeşil bitkilerde yaygınca bulunan flavonoidler, uv ışığına maruz bırakıldıklarında parlak renkleri emerler. İlk yıllarda, gereksiz besin maddeleri olarak düşünülürken, daha sonra yapılan araştırmalarla flavonoidlerin antioksidan, anti-alerjik, anti-inflamasyon, antiviral, antiproliferatif ve anti kanserojen etkilere sahip oldukları kanıtlanmıştır. Flavonoidlerin ayrıca bitkinin, böcek ve patojenlerden korunmasında, polenlerde, nektar rehberlerinde, hormon regülasyonunda ve uv ışığından korunması gibi birçok fizyolojik olayda da rol oynadıkları ispatlanmıştır. Flavonoidler bilim adamları tarafından taksonomik sınıflandırma için de kullanılmaktadırlar. Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri, onların metabolitlerinin kimyasal yapısına ve molekülerdeki çeşitli yakın yönelmelerine bağlıdır. Flavonoidler sahip oldukları biyolojik özelliklerden dolayı, biyoflavonoidler olarak ta isimlendirilmektedirler. Yakın tarihlerde yapılan çalışmalarda zengin flavonoid diyetlerinin kalp hastalıklarının azalmasında rol oynadığı yönünde bulgular mevcuttur.

Süper oksitler, vücuda giren yabancı hücre ve virüslerin işgaline karşı savunmak amacıyla üretilirler. Bu reaksiyon istenilebilir bir reaksiyon olup, fakat fazla süperoksit anyonu vücuttan biran önce uzaklaştırılması gerekmektedir. Çünkü bu maddeler memranlarda bulunan ve gerekli olan doymamış yağ asitlerine ve enzimlerin aktif bölgesinde bulunan sülfhidril gruplarına zarar verebilmektedirler. Flavonoidlerin memranda bulunan doymamış yağ asitlerini askorbat gibi koruma kabiliyetine sahip oldukları için, onların yükseltgenme ve indirme potansiyelleri tahmin edilmiş olup (Zloch ve Ginter, 1979; Zloch ve Sidlova, 1977; Bors vd, 1997) flavonoidlerin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) üzerinde antioksidan gibi rol oynayarak bu proteinleri hasarlardan korudukları lipid-peroksidasyon deneyi ile kanıtlanmıştır. Zengin flavonoid içerikli besinlerin tüketilmesinin protein karbonilasyon, fosfatidil kolin, hidroperoksit seviyesini düşürdüğü ve plazmanın oksitlenmesini ve strese karşı koruduğu ispatlanmıştır. Bir diğer çalışma, bir izoflavonoid olan genisteinin, östrojenik aktivite gösterdiğini ortaya

koymaktadır. Flavonoidler ayrıca doğum kontrolü etkisine sahiptirler (Jain vd, 1993; Singh vd, 1992). Bir araştırmaya göre, rahimde bulunan döllenmiş fare yumurtasının aşılmasında, flavonoidlerin inhibisyon etki göstermektedir (Singh vd, 1992). Bazı flavonoidler, spermde mevcut olup, oosit içine spermatosit girişini kolaylaştırdığı bulunmuş (Li vd, 1997) ve hiyaluronidazıda inhibe ettiği ispatlanmıştır. Buna örnek olarak; ortaçağ döneminde köylerdeki popülasyonu kontrol altına almak için benzer flavonoidler var olabileceğidir. Flavonoidler baş ağrısı gibi geçici alerjik cevaplar dışında nörolojik yan etkileri olmadığı için, bu bileşiklerin doğum kontrolü için uygun olup olmayacağı araştırılabilir.

Çiçek renginin flavonoidler, karitenoidler ve betalaninler ve bazı diğer pigmentlerden dolayı çiçek oluştuğu bilinmektedir (Tanaka vd, 2005). Flavonoidler bu renk oluşumunun en önemli bileşenleridir. Her bitki kendine has flavonoidleri biriktirir ve bu yüzden kendine has sınırlı bir renk aralığı gösterir. Flavonoid türü olan antosiyanidinlerin, bitki renginde önemli rol oynadıkları; delhinidin ve türevlerinin mavi çiçeklerde bulunduğu ve malvidinin ve türevlerinin ise çiçeğin pembemsi renklerinden sorumlu oldukları bilinmektedir. Kırmızı ve kırmızımsı flavonoidlerin birikmesinin bitki stresinin bir işareti olduğu yapılan araştırmalarla ispatlanmıştır. pH değerindeki azalma, karşıt renklerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle yapılan bir çalışmada, *fuchsia* bitkisinin genç mavi taç yapraklarındaki renk, pH değerinin 4.8'den 4.2'ye düşürülmesi ile pembe renge dönüştüğü gözlenmiştir (Yazaki, 1976).

Bazı flavonoidlerin, bağışıklık sistemini ve anti-inflamasyon hücrelerini önemli miktarda etkilediği, immün cevapta inflamasyon ilerlemesini ve enzim sistemini doğrudan etkilediği bilinmektedir. Flavonoidlerin çarpıntı üzerinde önleyici etkisi yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Michelle vd, 2007). Bununla ilintili olarak çay üzerinde yapılan bir çalışmada, yeşil çayın siyah çaya nazaran çarpıntı üzerinde daha koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuş olup, nedeni yeşil çayın siyah çaya nazaran daha fazla flavonoid içermesine bağlanmıştır. Ülkelere göre tüketilen çayın miktarına bağlı olarak, çarpıntı miktarları Tablo 1'den görünebilir.

Tablo 1. Ülkelere göre tüketilen çay ile çarpıntı arasındaki ilişki

Ülke	Ç. şekli	İ. sayısı	Çay tük. miktarı ve sev.	Sonuçlar: RR ya da OR (%95 CI)
Japonya	Ka.	5190 K.	Günlük içmeyenlere karşı > 5 fincan çay tüketenler	Yeşil çay içmeyenlere karşı 5.51 misli çarpıntı
Çin	Bö.	14212 E.& K.	Çay tüketimine karşı çay tüketilmemesi Tüketim: aylık içmeyenlere karşı >150 g çay tüketimi: İçmeyenlere karşı yeşil çay İçenler: İçmeyenlere karşı siyah çay içenler	OR=0,60 (0,42-0,85)* ; OR=0,56 (0,36-0,89)* ; OR=0,35c (0,18-0,72)* ; OR= 0,24 (0,06-1,01)
Hollanda	Ka.	512 E.	Günlük < 2.6 fincan içenlere karşı > 4.7 fincan çay tüketimi (çoğunluğu siyah çay)	RR=0,31 (0,12-0,84)*
A.B.D	Ka.	17228 E.& K.	İçmeyenlere karşı > 4 fincan çay tüketimi 15 yaş üstü çay içmeye devam edenler	RR=0,83 (0,57-1,2); RR= 0,67 (0,44-1,02)
Finlandiya	Ka.	26593 E.& K.	Günde <1 fincan çay tüketenlere karşı, >1 çay tüketimi (günlük). (çay cinsi belli değil)	Beyinsel infarktüs RR=0,9 (0,74-1,09) Subaraknoid kanama RR=0,71 (0,38-1,35) Beyinde infarktüs kanaması RR=0,98 (0,58-1,65)
Avustralya	Bö.	331 D.& 331 Ko.	Çay içmeyenlere karşı çay içenler Çay cinsi belirtilmemiş	Beyinde kanama OR=1,35 (0,93- 1,96)

*İstatiksel olarak önemli bulgular; E.; Erkek, K.; Kadın, Ko.; Kontrol, Ka., Kalabalık, Bö., Bölgesel D., Deney, İ., İnsan, Ç, Çalışma, Tük., Tüketim, Sev., Seviyesi

Propolis başta olmak üzere, arı ürünlerinin insan üzerinde ilaç olarak kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir (Petersen, 1977). Yapılan araştırmalarda, propolis ve benzeri arı ürünlerinin yüksek miktarda flavonoid içerdikleri belirlenmiştir. Tipik bir propolis örneği önemli miktarlarda, yaklaşık 25 farklı flavonoid içermektedir. Bu yüzden, propolis özütü, genelde flavonoid ile ilişkili olan biyokimyasal özelliklerin çoğunu barındırmaktadır. Antioksidan, radikal temizlenmesi gibi etkiler bu yararlı etkiler arasında sayılabilir.

Flavonoidlerin bir diğer çarpıcı özelliği ise, onların floresans özelliğine sahip olmalarıdır. Fizyolojik olarak kullanılan bu özelliğin kanıtlanması henüz yapılamamıştır. Fakat inanılabilir bir fonksiyon olarak, ışık hassasiyet geniyle ilgili olan pigmentleri aktif etmek için, floresans özelliği ile küçük bir miktar enerji yayabilmeleridir.

Flavonoidlerin sağlık açısından önemli toksik özellikleri olmamakla birlikte yapılan çalışmalarda bazı flavonoidlerin vücutta fazla miktarda bulunmasının bazı hasarlara yol

açabildikleri görülmüştür. Yapılan bir çalışmada yaptığı çalışmalarda, yüksek kuersetin'in kanıtlanan mutagenik aktivitesi zamanla tümör oluşumuna yol açabileceği incelemelerle bulunmuştur. Kuersetinin topoizomerazlar II (Duthie ve Dabson, 1999) ve IV (Bernard vd, 1997)'ü inhibe ettiği biliniyor olup, flavonoidlerin DNA üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Bu topoizomeraz enzimler, DNA zincirinden ayrılması ile DNA'nın süperheliks formunda ek dönmelere neden olurlar ve bazı DNA zincirlerini açarlar. Daha sonra tekrar DNA'ya bağlanırlar. Bu son aşamada yani tekrar bağlanma aşamasında bir flavonoid olan kuersetin ile yarışmalı olarak inhibe edilirler. Bunun sonucu olarak ta DNA'daki kollar açılır ve genetik bilginin kaybolmasına sebep olur. Flavonoidlerin genel olarak gıdaların toksik olmayan bileşenleri gibi düşünülmesine rağmen, bazı ilaçların farmakolojik potansiyelini önemli miktarda etkileyebilirler. Flavonoid aglikonlarının sudaki düşük çözünürlükleri ve bağırsaklarda flavonoidlerin kısa kalma sürelerinden dolayı flavonoidlerin tüketilmesinin akut toksik etkilerinden dolayı insanlara acı (birkaç alerjik etkiler dışında) verebilmektedirler (Petersen, 1977). Bununla ilintili olarak yapılan bir çalışmada, özellikle böbrek hastalarının, kan dolaşımını artıran ilaçların alımında bu olay gözlemlenmiştir. Yiyecekleri ile birlikte greyfruit tüketen hastaların bazılarında flavonoidlerin, ilaçların potansiyelini artırıp hastalara acı verdikleri gözlemlenmiştir.

Flavonoidlerin bitki fizyolojisine bir diğer etkisi, fotofosforilasyon sırasında enerji transferinin kuersetin tarafından inhibe edilmesidir (Mukohata, 1978). Bazı flavonoidlerin, ksantin ve hipoksantin'in ürik aside yükseltgenmesini sağlayan ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Apigenin ve kuersetin gibi bazı basit flavonoidlerin anti-inflamasyon etki gösterdikleri ve özellikle 0,01-100 mg/ml konsantrasyon aralığında fibroblast büyümesini önemli miktarda inhibe ettiği gösterilmiştir (Cantley ve Hammes, 1976).

Bütün yeşil bitki hücreleri, flavonoid sentezleyebilme yeteneğine sahip olup, insanların %3-5 arasındaki oranının bu maddelere karşı alerjik olduğu bulunmuştur. Flavonoidler zayıf antijenler olup, flavonoidlere karşı antikorlar insan vücudunda bulunmaktadır. Besin bilimciler göre, günlük flavonoid alım miktarı yaklaşık olarak günlük 1-2 g arasındadır .

Birçok yapı-aktivite incelemelerinde, flavonoidlerin mitokondriyal solunumda anahtar enzimleri inhibe etme yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir. Flavonoidlerin C2-C3 çifte bağının, C4 keto grubunun ve 3',4',5' trihidroksi B-halkasının, NADPH oksidaz'ı inhibe ettiği gözlenmiştir. Flavonoidlerin bitki büyümesindeki etkisi biliniyor olup auksin hareketi ile kısmi olarak bağlanmaktadır. Flavonoidler, auksin asetik asidin ekzositozunu inhibe

ederek, gen ifadesini ayarlar. Flavonoidlerin birçok bakteri soyunu öldürdüğü ya da inhibe ettiği, ters transkriptaz, proteaz gibi önemli enzimleri inhibe ettiği ve bazı patojenik protozoanları yok ettiği bilinmektedir. Flavonoidlerin yeşil bitkilerde bulunmaları (özellikle plastid içeren hücrelerde), onların fotosentezde rol oynadıkları düşüncesini doğurmuşsa da, şimdiye kadar yapılan araştırmalarda flavonoidlerin direk olarak fotosentezde rol aldıklarına dair herhangi bir kanıtı varılamamıştır. Flavonoidler ışığı enerji kaynağı olarak değil gen regülasyonu için kullandıkları bilinmektedir ve bu özellik flavonoidlerle fotosentez arasındaki bir ilişki olmadığını göstermektedir.

Flavonoidlerin bir diğer özelliği onların böceklerin, kuşların ilgisini çekerek tohumların yayılmasına fırsat vermesidir. Flavonoidler, protein translasyonunun düzenlenmesinde ve gen ifadesinin ayarlamasında rol alan protein fosfatazlarının aktivitesini etkilediği biliniyor olup, onların ana etkilerinin, makrofajları uyarmak olduğu söylenebilir.

Hidrolazlar, oksijenazlar, aminoasit oksidazlar, fosfatazlar, protein fosfokinazlar, DNA sentetazlar, RNA polimerazlar, oksidoredüktazlar ve amino asit oksidazlar gibi bazı enzimler, flavonoidler tarafından inhibe edilirler. İnhibisyon bazı durumlarda yarışmalı olabilmektedir. Fakat daha sıklıkla allosteriktir. Flavonoidler ayrıca bitki ve hayvanlarda hormon olarak rol almaktadırlar (Sonen ve Pohl, 1980; Sonen vd, 1980; Baker, 1988). Flavonoidler ayrıca, fosfodiesteraz (PDE) tarafından cAMP'nin hidrolizini inhibe edebilmektedirler (Pene vd, 1988; Bradley ve Cazort, 1970; Conti ve Setnikar, 1975; Herbst, 1970; Saponara ve Bosisio, 1988).

Flavonoidler azot fikse edici bitkilerin metabolizmalarında önemli bir rol oynamaktadırlar. Çünkü onların köklerinin nodülasyonlarına sebep olabilmektedirler. Bu nodüller diazot fikse edici bakterikler içermekte olup flavonoidlerin ana etkisinin, nodüllerde, hücreler tarafından ihtiyaç duyulan gen ifade edilmiş proteinlerin oluşumunu sağlamalarıdır. Ayrıca antioksidan oldukları için, dioksijen eliminasyonuna iştirakleri uygundur.

Hirosima Uyama tarafından yapılan bir araştırmada, flavonoidlerin, özellikle de kateşinin asit-katalizi ile polimerleştirilebildiği gözlenmiştir. Polimerleşmiş flavonoidler de doğal olarak sahip olduğu yüksek sayıda hidroksil grubu nedeniyle, monomerlerinden daha fazla antioksidan özellik gösterecektir. Bu özellik hastalar için ilaç yapımında etkin olarak kullanılabilir.

1.1.2. Flavonoidlerin Biyosentezi

p-Koumaroyil-Coa ile malonil-Coa'nın birleşimi ile oluşan 2',4,4',6' tetrahidroksi kalkonun (naringenin kalkonu) kalkon izomeraz (CHI) enzimi yardımıyla B halkasının kapanarak bir flavanon olan naringenin'e dönüşümü ile öncü flavonoid sentezlenmiş olur. Flavonoid biyosentezinin temeli, bir gerekli aminoasit ve shikimat yolunun son ürünü olan fenilalanin'e bağlıdır. Flavonoidlerin sentezi organik ve enzimatik olmak üzere iki değişik yöntemle gerçekleştirilir. Daha önceleri kalkonlar da bu grubun içine dahil edilmiş olup, son çeyrek yüzyılda flavonoidler konusunda olan bilimsel ilerlemeler onların farklı bir sınıfta değerlendirilmelerini sağlamıştır. Flavonoid biyosentezindeki enzimler, genellikle başlangıç maddelerinin sentezinde rol oynayan ve ana flavonoid metabolizmasında rol alan enzimler olarak iki grupta incelenecektir.

1.1.2.1. Flavonoid Öncü Sentezler

1.1.2.1.1. Asetil CoA Karboksilaz (ACC)

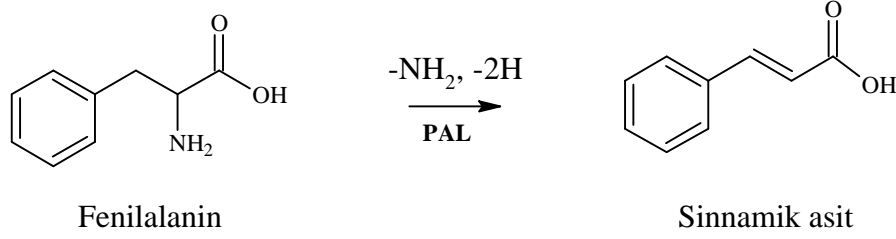
Kalkon sentaz enziminin iki substratından biri olan malonil-CoA, asetil-CoA ve CO₂'den asetil-CoA karboksilaz enziminin yardımıyla sentezlenir. Molekül ağırlığı 200.000 olan iki alt birimden oluşan bu enzim kofaktör olarak ATP ve Mg⁺²,a ihtiyaç duymaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yağ üreten endosperm dokulardan izole edilen bu enzimin, yağ biyosentezinde görev aldığı düşünülmektedir.

1.1.2.1.2. Shikimat/Arogenat Yolu

Kalkon sentaz enziminin ikinci substratı olan *p*-koumaroyil'in sentezinde gerekli fenilalaninin sentezlenebilmesi için gerekli olan yoldur. Mikroorganizmalarda ve bitkilerde oluşan fenilalanin amino asiti shikimat/arogenat yolu ile sentezlenir. Bu yol karbohidrat metabolizmasının iki metaboliti olan eritroz 4-fosfat ve fosfoenol prüvat'dan başlar.

1.1.2.1.3 Fenilalanin Amonyumliyaz (PAL)

Kofaktöre ihtiyaç duymayan fenil alanin amonyum liyaz (PAL), fenilpranoid yolunda sinnamik asitin oluşumunu katalizler. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 340.000 olan bu enzim, tetramer bir yapı sergiler. *Fabaceae* ve *Pibaceae* türlerinden saflaştırılan bu enzim, substratın üçüncü pozisyonunda bulunan amonyak grubunun transferi için gereklidir.

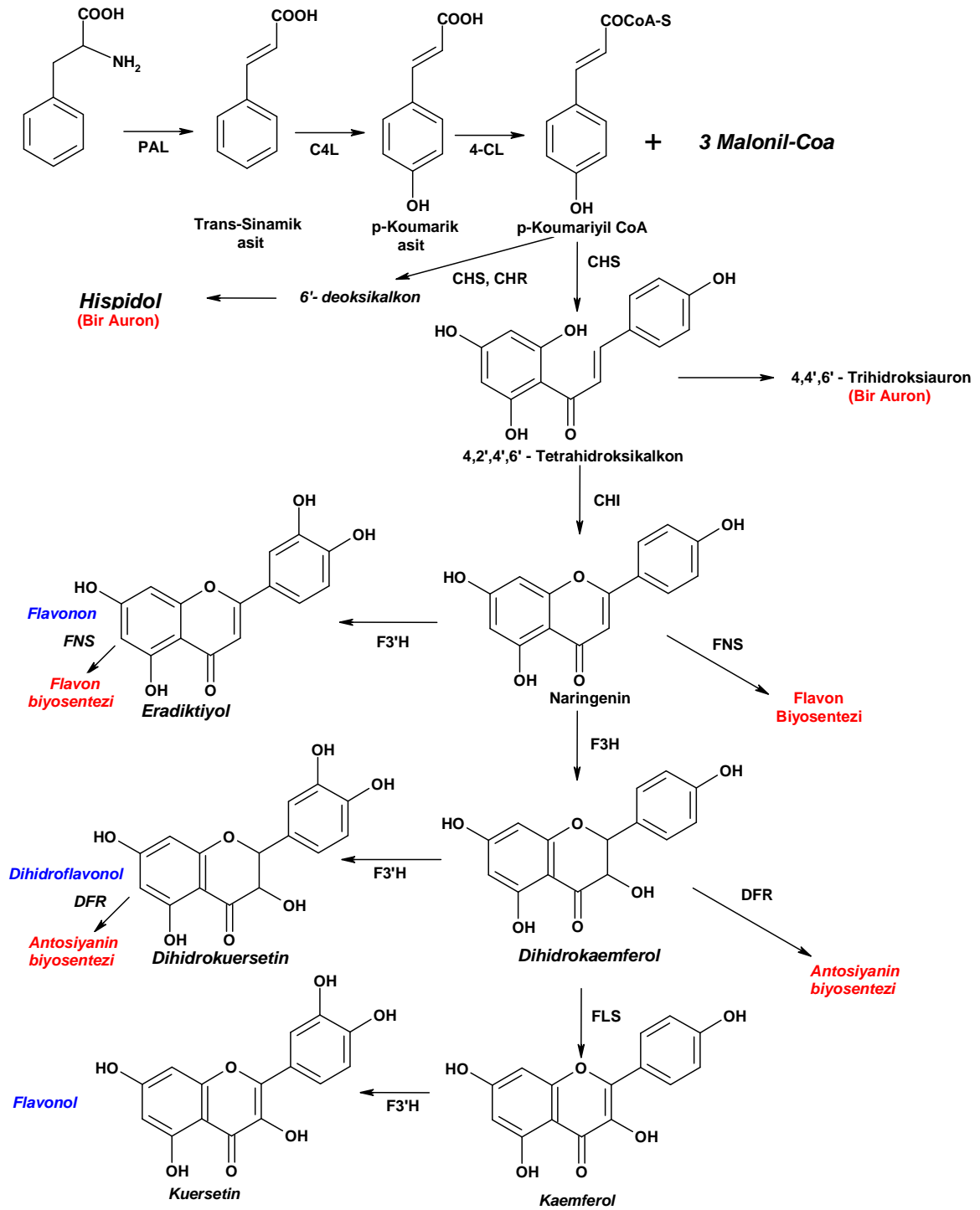


Şekil 3. PAL enzimi yardımıyla sinnamik asitin oluşumu

Bu aşama birincil ve ikincil metabolizmanın kesişme noktası olup, fenilalanin aynı zamanda birincil metabolizma olan protein sentezi için de gerekli bir maddedir. PAL'ın aktivitesi ışık, sıcaklık, etilen ve karbohidrat sentezi ile direk olarak etkilenir.

1.1.2.1.4 Sinnamat 4-Hidroksilaz (C4H)

Bu yol, bir P450 türü enzim olan ve kofaktör olarak NADPH ve moleküler oksijene ihtiyaç duyan sinnamat 4-hidroksilaz (C4H) katalizi ile sinnamik asitin dördüncü pozisyonunun hidroksillenmesinden sorumludur. Endoplazmik retikulumun membranına bağlı bulunan enzim 450 nm'de azaltılmış CO kompleksin ışık adsorbsiyonundan sorumludur.



Şekil 4. Flavonoid biyosentez şeması

CHS	Kalkon sentaz	F3'H	Flavonoid 3'-hidroksilaz
CHI	Kalkon isomeraz	PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
FNS	Flavonol sentaz	4-CL	4-Koumarat 4-hidroksilaz
DFR	Dihidroflavonol 4-redüktaz	C4L	Sinamat 4-hidroksilaz

1.1.2.2. Flavonoid Metabolizmasındaki Enzimler

1.1.2.2.1. Kalkon Sentaz (CHS)

C15 yapısının oluşmasından sorumlu olan bu enzim, malonil-CoA ile lignin ve stilbenzen için de birer substrat olan *p*-kumoroyil-CoA'nın birleşmesini sağlar. CHS enzimi bazen substrat olarak kafeoyil-CoA ve feruloyil-CoA'yı kabul etmektedir [84]. Kondensasyon yoluyla sağladığı birleşmede kofaktöre ihtiyaç duymamak ta olup, anahtar enzim olarak bilinmektedir.

Geçen yıllarda, bitki ve çiçek gelişiminde CHS'nin aktivitesinin ifadesi ve regülasyonu moleküler ve biyokimyasal seviyede incelendi. İkincil metabolizmada en çok üzerinde çalışılan bu enzimin ifade edilmesine olan ilgi devam etmektedir. CHS homodimer olup, 40 ve 44 kDa olan alt birimlerinden oluşmuştur. Bu enzim poliketit sentaz (PKS) enzim grubuna ait olup, bakteri, mantar ve bitkilerde bulunur. Bütün katalitik etkisini tek bir aktif bölgeden, kofaktöre ihtiyaç duymaksızın gerçekleştirir.

Yapılan bir araştırmada CHS enzimin inhibisyonu çalışmasında, inhibitör olarak apigenin, luteolin, flavononlar ve CoA denendi. Apigenin ve luteolin güçlü bir inhibisyon gösterirken, flavononlar ve CoA'nin düşük inhibisyon etki gösterdiği belirlendi. CHS'nin bitki dokularından kolayca homojenize edilmesi onun bir sitolojik enzim olduğu yönünde bir izlenim sergiledi.

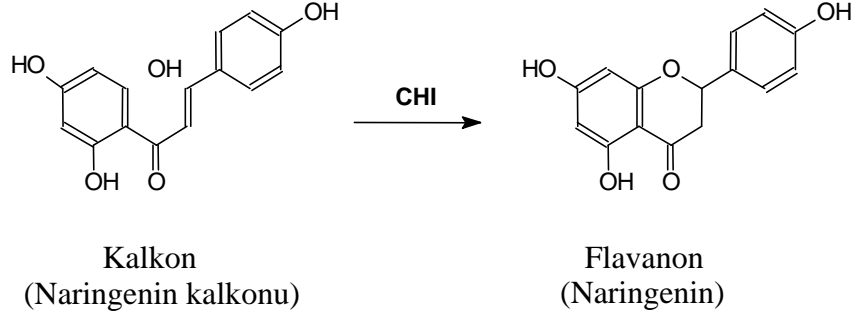
1.1.2.2.2. 6'-Deoksikalkonun Oluşumu

5-hidroksi flavonoid serisi için merkez enzimin orta reaktantı olan 2'4'6'4-tetrahidroksikalkonun sentezi iyi anlaşılmıştır. Birçok fitoaleksin içeren 5 deoksiflavonoidler için öncü substrat olan 6'-deoksikalkonun oluşumu halen tam olarak bilinmemektedir. 6'-Deoksikalkon sentezi ve izomerik 5'-deoksiflavonon varlığı ilk olarak *Glycyrrhiza echinata* hücrelerinin ham özütlerinde kanıtlanmıştır.

1.1.2.2.3. Kalkon İzomeraz (CHI)

Kalkon sentaz genel olarak kalkon yapısının 2S-flavonon yapısına dönmesini katalizler. 2S flavononlar daha sonraki substratların sentezinde kullanılırlar. Bu enzimin

yokluğunda 2S ve 2R flavononlarının rasemik bir karışımı elde edilir. Diğer taraftan CHI enzimi fizyolojik şartlar altında çok kararlı olup, izomerasyon için CHI enzimine ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 5. Kalkon izomeraz enzimin yardımıyla naringenin oluşumu

1.1.2.2.4. Flavon Sentaz (FNS)

Flavononların flavonlara dönüşümü, iki enzim tarafından katalizlenir. Birincisi, 2-oksoglutarat bağımlı dioksigenaz olan FNS I, ilk olarak *petroselinum crispum*'un hücre süspansiyonlarında gözlenmiştir. Bu enzim flavonon yapısındaki C2- C3 arasındaki çift bağın oluşumunu katalizler. Birçok çiçek üreten bitkilerde bu reaksiyon FNS II tarafından katalizlenir. FNS II, FNS I'e göre bitkilerde daha yaygın bulunmaktadır. FNS II görevini yapabilmesi için mutlak NADPH ve moleküler oksijene ihtiyaç duymaktadır.

1.1.2.2.5. Flavonon 4-Redüktaz (FNR)

Flavononun 4. pozisyonundaki karbonil grubunun NADPH bağımlı olarak indirgenmesinden sorumlu olan bu enzim, 4-flavonol oluşumunu katalizler. FNR aktivitesine ilk olarak *Sinninga cardinalis* çiçeklerinin enzim süspansiyonlarında rastlanıldı.

1.1.2.2.6. Dihidroflavonol 4-Redüktaz (DFR)

Dihidroflavonol 4-redüktaz (2R, 3R) trans-dihidroflavonolların lekoantosyanidinlere dönüşümünü katalizler. DFR'nin DNA dizileri ilk olarak *A. majus* ve *Z. mays*'da

belirlenmiştir. Çeşitli türlerden klonlanan DNA dizilerinden proteinin yaklaşık 38 kDa olduğu tahmin edilmektedir. DFR enzim olarak tek-bölge-redüktaz/epimeraz/dihidrogenaz (RED) protein ailesine aittir.

1.1.2.2.7. Antosiyanidin Sentaz (ANS)

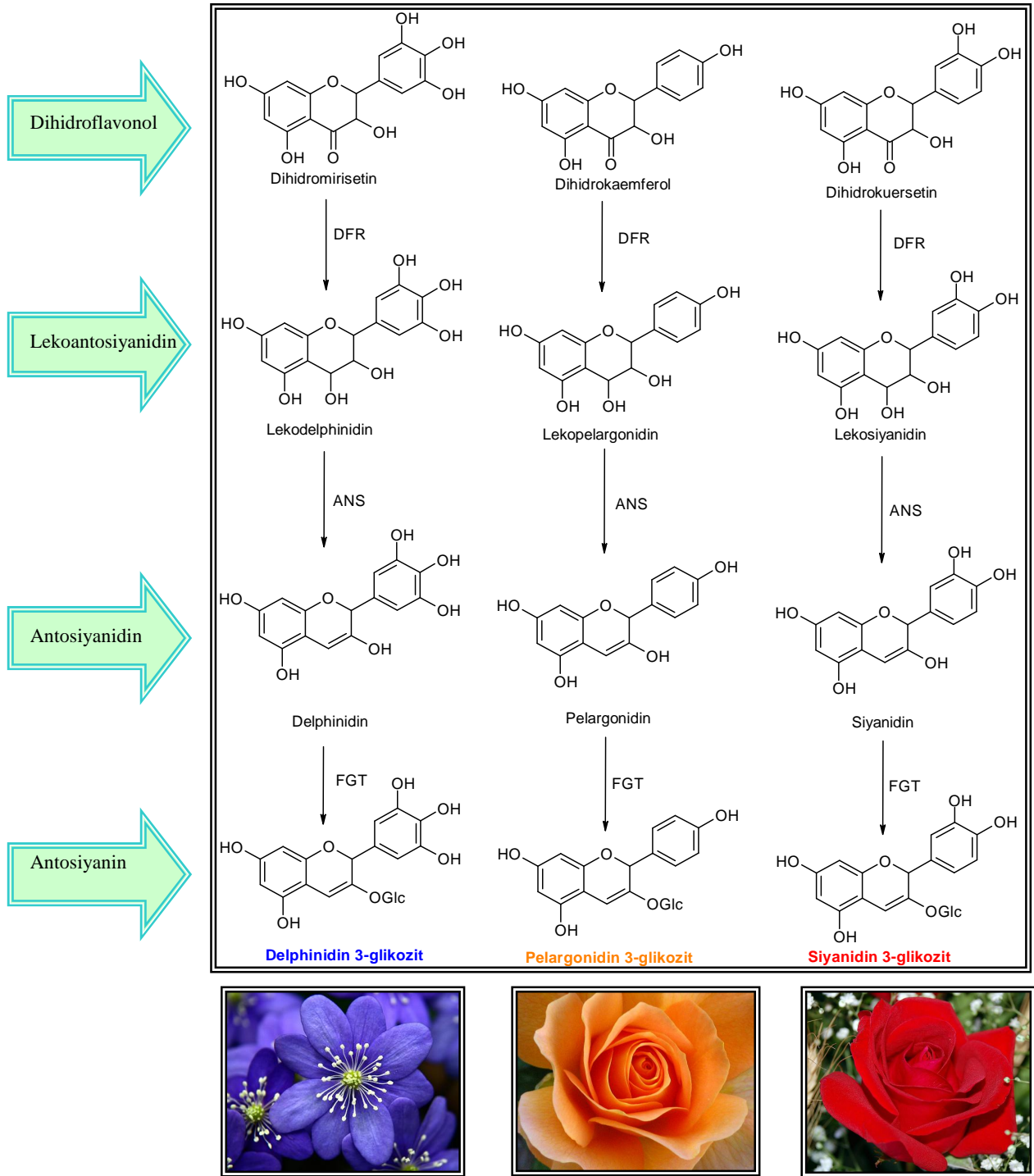
Antosiyanidin sentaz lekosiyandinlerin indirgenmesini katalizleyerek antosiyanidinlere dönüşümünü katalizler. Genel olarak ANS ismi yaygın olarak kullanılmakla birlikte literatürde lekoantosiyanidin dioksigenaz ismine de rastlamak mümkündür. İlk olarak ANS dizileri *A. majus* ve *Z. mays*'da belirlenmiştir.

Dizi karşılaştırılmalarıyla ANS'nin 2-OGD enzim grubunda F3H'den çok flavonol sentaz (FLS) enzimine yakın olduğu saptanmıştır.

1.1.2.2.8. Antosiyanidin 3-O-Glikozit Oluşumu

Antosiyanidinler çok kararsız oldukları için hücrede birikmesi çok zordur. Bu yüzden kararlı formları olan *o*-glikozillenmiş formlarına çevrilirler. Bitkilerin büyük bir kısmında başlangıç reaksiyonunda enerjice zengin nükleotid şekeri olan UDP-Glukoz bileşiğinden glukoz molekülü ile F3GT enzimi yardımıyla katalizlenir. Glukoz transferi yerine galaktoz'unda transfer edildiği bazı araştırmalarla ispatlanmıştır.

Bu enzim delphinidin'e glukoz aktararak bitkinin mavi görünmesini sağlayan delphinidin-O-glikoziti oluşturur. Aynı enzim pelargonidin ve siyanidine de glukoz transfer ederek sırasıyla turuncu renkten sorumlu olan pelargonidin 3-O-glikozit ile kırmızı renkten sorumlu olan siyanidin 3-O-glikozit oluşturur.



Şekil 6. Antosiyaninlerin renk oluşumuna katkısı

DFR: Dihidroflavonol 4-redüktaz

ANS: Antosiyanidin sentaz

FGT: Flavonoid 5-O-glikozil transferaz

1.2. Sitokrom p450

CYP olarak ta adlandırılan p450 enzim ailesi, vücuda alınan potansiyel olarak zararlı olabilecek maddeleri hidroksilleyerek suda çözünür hale getirip, kısa zaman içinde vücuttan atılmalarını sağlarlar. Bu enzimler, kofaktör olarak demire ihtiyaç duymaktadırlar (URL-1, 2007). 450 rakamı bu proteinlerin karbon monoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği dalga boyunun en yüksek değerini göstermektedir (URL-2, 2007). Vücuda alınan yabancı maddelere –OH grubu ekleyerek, maddelerin çözünürlüğünün artırılmasını sağlamaktadırlar. Yapılan bir araştırmaya göre, 315 ilacın %56'lık kısmını suda çözünür hale getirdikleri saptanmıştır. CYP enzimlerinin görevi sadece hidroksilasyon reaksiyonları olmayıp ayrıca, epoksidasyon, N-alkilasyon, O-dealkilasyon ve S-oksidasyon gibi oksidasyon reaksiyonlarında görev almaktadırlar. CYP'nin katalizlediği reaksiyon genel olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Genellikle p450 grubu enzimlerin büyük bir oranı, ilaç ve toksinlerin vücuttan uzaklaştırılmasından sorumlu olan karaciğerde, küçük bir oranı da bağırsaklarda bulunmaktadır. Bu enzimler genellikle hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunmaktadır. Toksik maddelerin uzaklaştırılması, p450 grubu enzimlerinin tek görevi olmayıp, son yıllarda yapılan çalışmalarda, vasküler otoregulasyonda bu enzimlerin rol aldıkları (özellikle beyinde) ve kolesterol, steroid and araşidonik asit metabolitlerinin oluşumunda etkin olarak rol oynadıkları kanıtlanmıştır. p450 ailesi, binlerce enzim içermesine rağmen, insanda yaklaşık 12 p450 gen ailesi içinde toplam 50 tanesinin gen dizilişi belirlenmiştir (URL-3, 2007). Gen aileleri oluşturulurken, enzimlerin gen dizi benzerliklerinden yararlanılmıştır. Bütün p450 gen aileleri ilaçların vücuttan uzaklaştırılmasında rol almayıp sadece 3 ailenin bu mekanizmada rol aldıkları belirlenmiştir. Bunlar; p450 1 (CYP 1), p450 2 (CYP 2) ve p450 3 (CYP 3) enzimlerdir. Bir CYP enzimi birçok ilacın uzaklaştırılmasında rol alırken tersi durumda gerçekleşebilir. Yani, bir ilacın vücuttan uzaklaştırılması için birden fazla sayıda p450 enzimine de ihtiyaç duyulabilir. Greyfurt suyu, bazı mustard aile üyeleri ve kırmızı şarap gibi bazı gıda maddeleri bu enzimleri inhibe edebilmektedir. Bu enzim ailesini inhibe eden maddeler

Tablo 1’de belirtilmiştir. Tablo 2’de belirtilen nikotin ve sildenafil sitrat (viagra) gibi bazı maddeler ise bu enzimleri indüklerler.

Uzun bir süre demir alınımının önlenmesi, p450’nin eksikliğinden dolayı anemi, Wilson sendromu ve porphyria hastalıklarına yol açabilmektedir (URL-4, 2007).

İsmlendirme aşağıdaki gibi gerçekleştirilmektedir.

Kök : YP
Aile : CYP2
Alt-aile : CYP2D
Gen : CYP2D6

CYP’deki bütün izoenzimler, en az %40’a yakın yapı benzerliği göstermektedirler. Aynı alt aile içindeki benzerlik %60’a kadar yükselmektedir [34]. Farklı bir dizi ye sahip olan izoformları farklı bir numarayla gösterilir (URL-5, 2007).

Tablo 2. P450 enzimlerini inhibe eden maddeler

Madde	Etkilenen p450 Yolu
Greyfrut suyu	3A4 INH, (bağırsak duvarında), 1A2
TMP/SMX (Baktrim, Septra)	2C9 INH
erithromisin	1A2 INH, 3A4 INH
karithromisin	1A2, 3A4 INH
ketokonazol	Kuvvetli 3A4, INH, 3A5-7, INH, 2C19, 1A2
itrakonazol	Kuvvetli 3A4 INH
flukanazol	2C9 INH, 3A4 INH
simetidin	Kuvvetli 1A2 INH, 3A4 INH, 2C
lovastatin	2C9
vinblastin	2D6, INH, 3A4, 3A5-7

Tablo 3. P450 enzimlerini indükleyen maddeler.

Madde	Etkilenen p450 Yolu
sildenafil sitrat (viagra)	Zayıf inhibitör, p450 indükleyici
nikotin	1A2 IND
progesteron	2C19 IND, 3A4
rifabutin	Kuvvetli 3A4 IND
rifampin	Kuvvetli 3A4 IND, 1A2 IND, 2C9 IND, 2C19 IND, 3A5-7 IND
insulin	1A2
prednison	2C19
dilantin	İlımlı indükleyici, 3A4, 2D6, 1A2, 2C
tegretil	İlımlı 3A4, 2D6, 2C
isoniazid	2E1 IND, 2C

F3'H (Flavonoid 3'-hidroksilaz) ve F3'5'H (Flavonoid 3'5'-hidroksilaz) Enzimleri

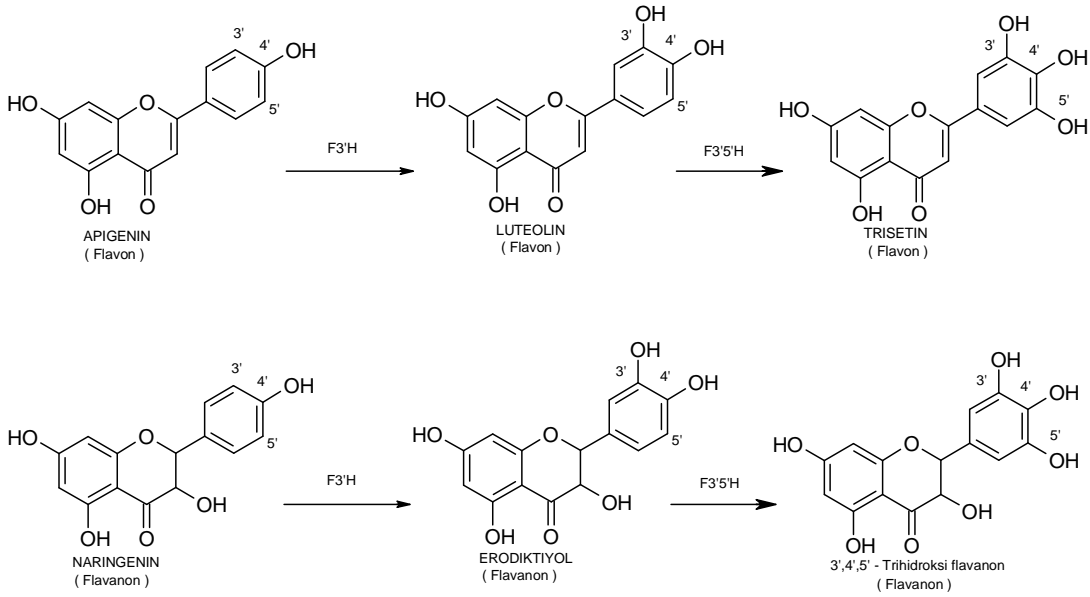
Flavonoid 3'-hidroksilaz (F3'H) ve Flavonoid 3'5'-hidroksilaz (F3'5'H), sitokrom p450 türü enzimler olup, F3'H enziminin dihidrokaemferol ile reaksiyonunda dihidrokuersetin oluşurken, aynı enzim naringenin'i eradiktyol'a dönüştürmektedir. Dihidrokuarsetin ve dihidrokaemferol'un glikozitleşmesi ya da indirgenmesi ile gül, karanfil ve kasımpatı gibi birçok bitkilerde yoğunca bulunan siyanidin-glikozit ve pelargonidin-glikozit pigmentleri üretilir. Bu maddeler, bitkiye kırmızımsı renkler verirler. Bu enzimler sitokrom p450 mono-oksijenaz türü enzimler olup, kofaktör olarak NADPH ve O₂ gerektirirler. B-halkasının 3. pozisyonunu hidroksilleyen F3'H, flavonon dışında flavon, dihidroflavonol ve flavonolu da hidroksiller.

Doğal olarak F3'5'H enzim eksikliği olan gül, karanfil, lale, kasımpatı gibi ticari olarak önemi olan bu bitkiler delphinidin ve türevlerine sahip olmadıkları için bu bitkilerin doğal türlerinde mavimsi renkler görmek mümkün değildir. B-halkasının hidroksillenmesiyle oluşan antosiyanidinler, flavonoid 5-O-glikozil transferaz ile

katalizlenmesiyle bir antosiyanin olan delphinidin'i oluşturup, çiçeğin mavimsi görünümünden sorumluyken, bu enzimlerin eksikliğinde kırmızımsı renkten sorumlu olan pelargonidin tabanlı antosiyanidinler üretilir. Sitokrom p450 ailesinin üyeleri olarak bu enzimlerin aktiviteleri sitokrom p450 redüktaz ve sitokrom b5 gibi onların prostetik hem grubuna elektron transferini katalizleyen proteinlere bağlıdır (URL-6, 2007).

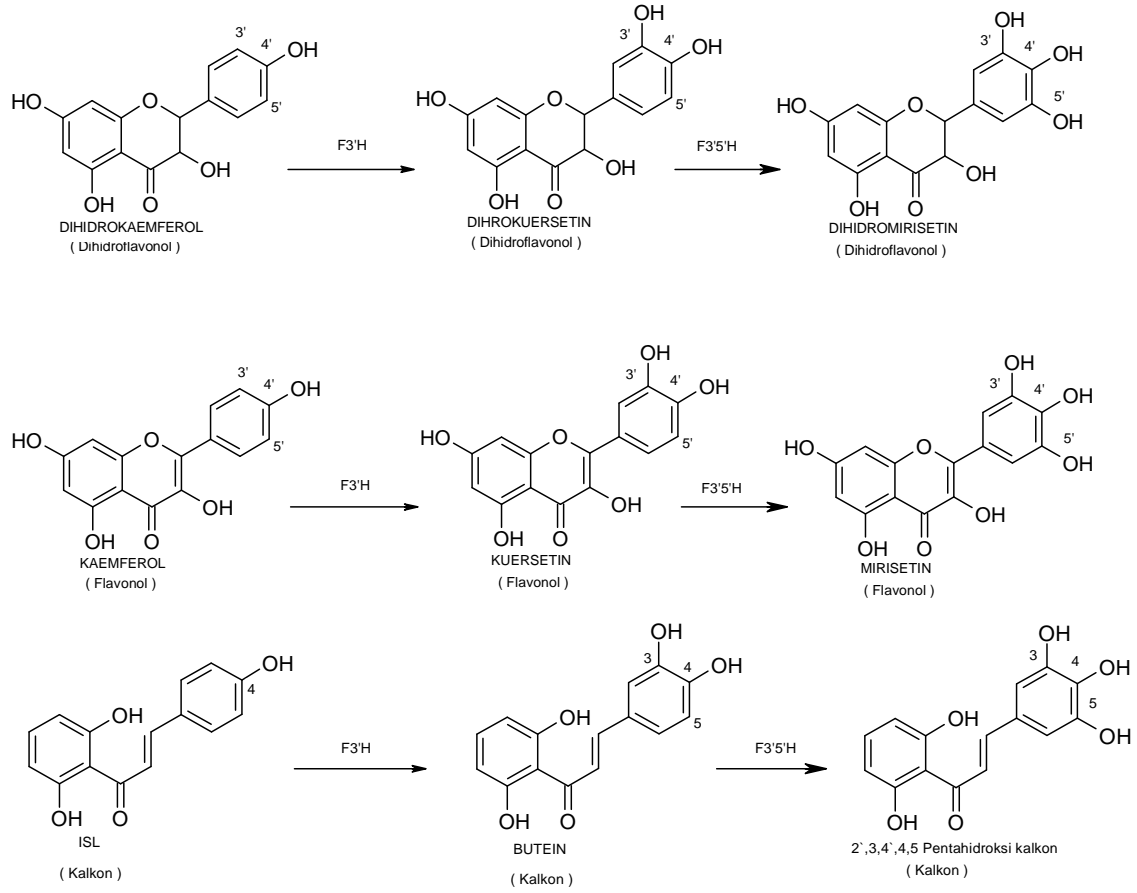
F3'H aktivitesi ilk olarak *Happlopappus* hücre kültürlerinin mikrozomal fraksiyonlarında tespit edilmiş olup daha sonraları sırasıyla *Matthiola incana*, *Antirrhinum majus*, *Dianthus caryophyllus*, *Petunia hybrida* ve diğer bitki türlerinde belirlenmiştir. F3'5'H aktivitesi ise ilk olarak *Verbena hybrida*'nın çiçeklerinin mikrozomal fraksiyonlarında belirlenmiştir. Yapılan bir araştırmada, Bnaup adlı bir bitkide, iki farklı F3'H geninin varlığı ortaya çıkartılmıştır. Bitkide yapılan yarı-nicel ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PCR) ve RNA jel blot analizine göre bitkinin çiçek kısmı en yüksek F3'H enzim aktivitesine sahipken, onu meyvesi ve tohumu izlemektedir.

Sadece F3'5'H geninin fazla olması, delphinidin tarzı antosiyaninlerin oluşması için yeterli değildir. Çünkü DFR, F3'H ve FLS enzimleri F3'5'H enzimine karşı yarışır. Bu yarışmadan kaçınmak için, bu yarışan genlerin doğal mutantlarını elde etmek gerekir. Çünkü çiçek rengi sadece P450 enzimleri ile değil antosiyaninlerin modifikasyonları, pH ve metal alımıyla da ilişkilidir.



Şekil 7. Naringenin, apigenin, kaemferol, dihidrokaemferol ve isolikuiritigenin'in F3'H ve F3'5'H enzimleri ile verdikleri reaksiyonlar.

Şekil 7'nin devamı



2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER

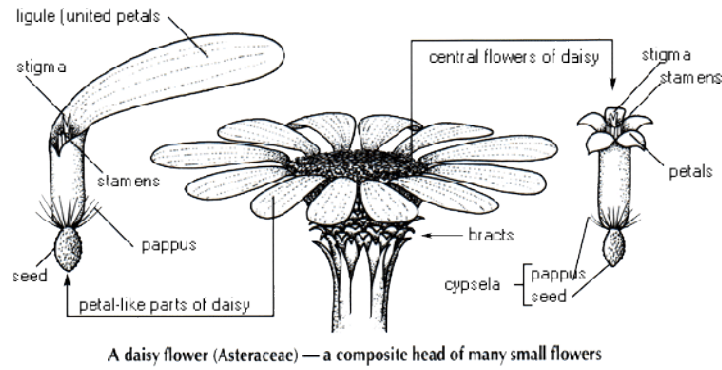
2.1. Materyaller

2.1.1. Bitki Materyali

Bitki materyali 3 farklı aileden 10 farklı türden toplam 19 klonundan oluşmaktadır. Bu 19 klonun 5'i flavonoid 3'5'-hidroksilaz diğerleri ise flavonoid 3'-hidroksilaz türü enzimlerdir.

2.1.1.1. Asteraceae Ailesi

1100 cins ve 25.000 türe sahip olan bu aile, dört büyük aileden biri olup, en büyük çiçek ailesini oluşturmaktadır (URL-7, 2007). Bu aile, yıllık ve çift-yıllık türleri içerirken, çanaklı çiçekleri de barındırmaktadır. Antartika kıtası hariç dünyanın hemen hemen bütün bölgelerinde, özellikle de yarı-kurak tropik alanlarda yoğunca bulunan aile, latince “küçük parçalardan oluşmuş bütün anlamı”nı taşıyan “*Compositae*” olarak ta bilinmektedir. *Aster* adı ise yıldız şeklindeki çiçek başına sahip olmasından gelmektedir. *Magnoliophyta* bölümünün orkide ailesinden sonra ikinci büyük ailesini oluşturmaktadır (URL-8, 2007). Sadece G. Afrika bu ailenin 250 türüne ev sahipliği yapmakta olup, ailenin büyük bir kısmı yabani, çalı ve yarı-çalı bitkilerden oluşmaktadır.



Şekil 8. Genel *Asteraceae* ailesinin çiçek başı (URL-9, 2007).

Bu ailenin içinde birkaç ağaç türüne rastlamak ta mümkündür. Aile genellikle asalak olmayan ve suda yaşayan türlere de sahiptir. Ekonomik bir öneme sahip olan bu ailenin bahçe grubu, diğer grubuna göre daha ağır basmaktadır.

Bu grubu diğer ailelerden farklı kılan en belirgin özelliği, top halinde çiçek açma özelliğine sahip olmasıdır. Kömeç adında sapsız bir kalabalık halinde bulunan birçok küçük çiçekten oluşmuş olmasına rağmen, dışarıdan bakıldığında tek bir çiçekmiş gibi görünen çiçek başına sahiptir.

Bitki dikkatli incelendiğinde her biri farklı tohum üretmek üzere, yüzlerce küçük çiçeğin varlığı görünebilir. Her disk çiçeği, 5 küçük taç yaprağın bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Kabileye bağlı olarak, toplu çiçek açması (infloresens), farklı disk çiçeklerden ya da her ikisinin birleşmesinden oluşabilir. Asteraceae ailesinde bulunan çiçekler tipik olarak bir ya da iki çeşit küçük çiçeklere sahiptirler. Çiçeğin dış kısmı güneş çiçeğine benzer biçimde dilcik adında uzun taç yapraklardan oluşmuş bir yapıya sahip olup, bunlar küçük **dizi çiçekler** olarak adlandırılırlar. Çiçeğin iç kısmı ise boru şeklindeki taç yapraklar ile küçük çiçeklerden oluşan ve **disk çiçeği** olarak isimlendirilen kısımdan oluşmuştur. Marul, Frenk salatası, enginar, ayçiçeği, yakon, yalancı safran ve Kudüs enginarı bu ailenin ekim bitki grubuna giren cins ve türler olarak ticari olarak kullanılmakta iken, guayule adlı bitki ise hipoalerjik lateks kaynağı olarak kullanılmaktadır (URL-10, 2007).

2.1.1.1.1. *Gerbera Hybrida*

Asteraceae ailesinin süs bitki cinslerinden biri olan Gerbera, ismini onu keşfeden, Alman doğa bilimci Traugott Gerber'den almıştır. Geniş bir coğrafyaya yayılmış olan Gerbera'nın 40 kadar türü mevcut olup Afrika kıyılarından tropik Asya ve Güney Amerika'ya kadar uzanmaktadır. İlk bilimsel tanımlanması 1889'da Curtis Botanical dergisinde J.D. Hooker tarafından yapılmış olan ve Güney Afrika'ya has bir Gerbera türü olan *Gerbera jamesonii* olmuştur.

Gerbera bitkisi 45 ile 60 cm uzunluğuna erişebilen ve yaklaşık 4 cm çapında çiçek başına sahip olabilen bir cinstir. Gerbera türlerinin çiçek başının merkezi turuncu, beyaz, pembe ya da kırmızı renklere olan küçük çiçekçiklerden oluşmuş olup tek bir çiçekmiş gibi görünüm sergiler. Gerbera güzel görünümünden dolayı süs bitkisi olarak ticari anlam taşımaktadır. *Gerbera jamesonii* ve bir diğer Güney Afrika türü olan *Gerbera viridifolia*

arasındaki çaprazlaştırılmasıyla evcil kültürler oluşturulmuştur. Bu çapraz *Gerbera hybrida* olarak isimlendirilmiştir. Binlerce karşıları mevcut olup, renkleri beyaz, sarı, turuncu ve pembe olabilmektedir. Gerbera ticari olarak gül, karanfil, kasımpatı ve lale'den sonra dünyada ticari olarak kullanılan 5. çiçektir (URL-11, 2007). Gerbera bitkisi 1991'de Hollanda'da ihraç edilen 5. büyük ihraç ürünü olması onun ne kadar önemli bir ticari ürün olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu bitkinin çoğaltılması; tohumlamayla, temel kesimle ve bölerek başarılabilir. Hibridleşmeyle geniş bir dizi renk oluşturulabilir. Uzun bir vazo hayatına sahip olması ve güzel görünümü onu kesilen çiçek sanayisinde önemli bir yere getirmiştir. Doğal yöresi olarak Güney Afrika'ya has bu bitkinin vazo hayatı 14 gün olup, hayatı her 4-5 günde suyu değiştirilerek ve yeniden gövdeleri kesilerek iki katına kadar uzatılabilir.

2.1.1.1.2. Rudbeckia Hirta

Siyah-gözlü suzan ve siyahikafa gibi isimlerle de isimlendirilen coneflower (Lat: *Rudbeckia hirta*), *Asteracea* ailesinin bir çiçekli bitkisidir. Kökeninin Kuzey Amerika olduğu yönünde bulgular mevcut olan *Rudbeckia*'nın 25 civarında türü vardır. İsmi onu bulan İsveçli botanist Olaus Rudbeck (1660-1740)'den almıştır (URL-12, 2007).

Çiçeğin bulunduğu ortama bağlı olarak bazen tek yıllık bazen de iki veya çok yıllık olabilmektedir. *Rudbeckia hirta*, çiçek açmasının ikinci yılını takiben kurur. Genel olarak büyük papatya gibi çiçek başına sahip olup, bitkinin çiçek başı dış yüzeyinde sahip olduğu ışın küçük çiçekleri ile merkezde de dizi çiçeklerin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Coneflower tipik olarak onların ilk yılında çiçek açmayıp daha sonra bitkiler, ikinci yılında, gövdenin üzerinde çiçek açarlar. Sert yüzeyli temel yapraklar elmas şeklinde olup, 10 ile 18 cm uzunluğu arasında değişmektedir.

Rudbeckia Kuzey Amerika'nın büyük bir kısmında bulunup, daha çok rocky dağlarının doğusunda yoğunlaşmıştır. Bu bitki Avrupa'da süs amacıyla üretilmektedir. Sıcaklığı tolere edebilen bitki, kurak ortamlarda da büyüebilmektedir. Bitki 1 ile 2 m'ye kadar uzayabilmektedir.

2.1.1.1.3. *Tagetes Erecta*

Asteraceae ailesine ait olan bu bitki yıllık ve çift yıllık bir tür olup, kuzeybatı Afrika'dan Meksika'nın içlerine kadar uzanmaktadır. *Tagetes*, *Asteraceae* ailesinin bir üyesi olarak 60'a yakın türü olan yıllık ve iki yıllık otsul bitkilerden biridir. Meksika ve Güney Amerika'ya has olan bu süs yıllıkları papatya ailesinin bir üyesidir. Kuzey Amerika'da marigold (Lat: *Tagetes*) olarak bilinen bu cinsin boyu 0,05 m'den 2,2 m'ye kadar uzanabilmektedir. Yaprakları tüylü olup, beyaz, altın rengi, sarı renklerde çiçeklere sahiptirler. Türleri genelde kokusuz olmalarına rağmen, yaprakları sert kokulara sahiptirler. Bu kokunun böcekleri caydırıcı olduğu söylenilebilir.

Tagetes genellikle dost ekimi olarak yaygın kullanılmaktadır. Güney Amerika'ya has bir bitki olan *T. minuta* (Khakibush), genellikle tagette adında gerekli yağ kaynağı olarak parfüm ve tütün endüstrisinde kullanılmaktadır.

Bu bitki, Fransız, Afrika ve triploid olarak üç grupta kategorize edilmiştir. Marigoldlar çoğu bahçe toprağına uygun olup, tam güneşe ihtiyaç duymaktadır. Hızlı büyümesi, renkliğinin sürekliliği ve hastalıklara karşı olan direnci onları bahçelerin göze batan çiçekleri haline getirmiştir.

Tagetes erecta, Afrika marigold'u olarak ta adlandırılan bu bitki 0,6–1,2 m'ye kadar büyüyebilir. Çiçeği geniş olup turuncu ve sarı rengin karışımı ile oluşmuştur. *Tagetes patula* (Fransız marigold) ise 23 cm'den 60 cm'e kadar büyüyebilen bu bitki olup, kırmızımsı-kahverengi ile işaretlenmiş sarı çiçekten oluşmuştur.

2.1.1.1.4. *Osteospermum Hybrida* (Bamba)

Bilimsel adı, Yunanca osteon (kemik) ve Latince spermum (= tohum)'dan gelmiştir. Afrika papatyası, Güney Afrika papatyası, pelerin papatyası ve mavi-gözlü papatya gibi birçok adlara sahiptir. *Osteospermum*, *Calenduleae*'e ait olan bir cins olup, güneş çiçeği ailesinin küçük kabilelerinden biridir. 35 türü Güney Afrika ve Güney Batı Arabistan'a has olan 50 civarında türü vardır (URL-13, 2007). Kışın dışarıda yaşamayan bu türün birçok rengi mevcuttur. Yaprak biçimi mızraksıdır. Çiçek kısmı, güneş çiçeği ailesi gibi küçük çiçekçiklerden oluşmuştur. Küçük çiçekler, yalancı çift çiçekler olup pembe, sarı ve mavi'dirler. Dayanıklı çeşitleri, çiçek merkezinin koyu mavi renkli olanlarıdır. Bu çeşitler

bahar mevsiminde çiçek açmalarına rağmen, ikinci kez çiçek vermezler. Bu bitki sıcak, güneşli pozisyonu ve verimli toprağı tercih eder. Ama fakir, tuzlu toprakta da büyüyebilir.

-13 °C'de ve aynı zamanda ağır kile rağmen, hayatta kalabilen bir bitki olup, dayanıklılığı ona RHS tarafından AGM (bahçe değer ödülü) almasını sağlamıştır. Üretilmesi de çok kolay olup, küçük bir parça alınarak yapılabilir. *Osteospermum*'un tam olarak çiçeğini açabilmesi için güneşe ihtiyaç duymaktadır.

2.1.1.1.5. *Centaurea Cyanus*

Bekar kutu ve Boutonniere çiçeği olarak ta bilinen cornflower (lat: *Centaurea cyanus*) *Asteraceae* ailesinin Avrupa'ya has, yıllık çiçek veren bir bitkisidir. Bitki boyutu 40 ile 90 cm arasında olup, gri-yeşil dallanmış gövdeleri vardır (URL-14, 2007). Yaprakları mızraksı görünümünde olup 1–4 cm aralığında boyutlara sahiptirler. Bu bitki genellikle, 1,5–3 cm aralığında, koyu mavi çiçek başına sahiptir. Mavi renk, çiçeğin kafa kısmında yoğun miktarda bulunan ve bir antosiyanidin birleşimi olan delphinidin ve türevlerinden kaynaklanmaktadır. Geçmişte tarım alanlarında yabancı ot olarak büyütülmüştür. Tarımsal yoğunlaştırma yüzünden tür, tehlike altındadır. İngiltere'de geçmişte 250'ye yakın bölgede bulunurken, bu sayı günümüzde 3'e kadar düşmüştür. Bitki güzel görünümü sayesinde bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Bu bitki çayda bileşen olarak ta kullanılmaktadır. Kökenini Amerika olan bu bitki, koloni sıralarında Avrupa'ya taşınmıştır. Cornflower, dışarıda ve içeride, tohumdan kolayca büyütülebilir.

Cornflower parlak mavi çiçek şekli ile en çok ilgi çeken vahşi çiçeklerden biridir. Vahşi ortam koşullarında ve yol kenarlarında rastlanılan bu türün gövdesi 0,3 ile 0,9 m uzunluğa kadar büyüyebilir. Çiçekleri modern bitki ilaç sanayisinde, tonik uyarıcı ve tıbbi özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Orjinal rengi mavi olmasına rağmen, yaprakları mavi-gri görünümünden sorumlu küçük beyaz kıllarla çevrilidir. Günümüzde beyaz, kırmızı ve pembe çiçeklerine rastlamak mümkündür. Çeşitli topraklarda büyüyen bu tür, tam güneşe ihtiyaç duyar.

2.1.1.1.6. *Cichorium Intybus*

Asteraceae ailesinin bir türü olan chicory (lat: *Cichorium intybus*)' in gövde kısmı 1,5 m uzunluğundadır. İki kültürü mevcut olan bu cinsin, 6 tane de vahşi türü olduğu

bilinmektedir. Hoş kokulu ve iki yıllık mavi renkli bir bitkidir. Kökeni Avrupa'ya ait olup, Amerika'ya götürüldüğüne inanılmaktadır. Kahvelere eklenmesiyle, Güney Amerika'da yaygınca kullanılır. Chicory, bu bölgede kahve çiçeği olarak ta bilinmektedir. Yapraklarının soluk ve yumuşak büyütülmesi için tamamen karanlıkta büyütülmelidir.

Chicory'nin kökü, Avrupa'da uzun süredir kahve yer değiştirici olarak kullanılmaktadır. 1970'lerde kökünün yaklaşık olarak %20'sinin inulin içerdiği bulunmuş olup, bu madde, yiyecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. İnulin hidrolizle, glukoz ve fruktoz'a dönüştürülmektedir.

2.1.1.1.7. *Dahlia Variables (Chat Noir)*

Kökenin, Guatemala ve Meksika dağları olduğu yapılan araştırmalarla belirlenmiş olan Dahlia bitkisi, ismini onu keşfeden İsveçli botanist, Anders Dahl'dan almıştır (URL-15, 2007). İlk kültürü Aztek kıızılderileri tarafından yapılmış olup, cocoxochitl olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları istilacı olarak gelen İspanyolularla bu bitki, bütün dünya'ya dağılmıştır. Fakat Dahlia hiçbir zaman lale, papatya, karafil gibi bir önem kazanamamıştır. Küçük türleri bahçede ekmek için uygun olup, çiçeği fincan tabağı büyüklüğüne erişebilmektedir.

Tam güneşlenmeyi seçen Dahlia, ancak yeterli güneşlenmeyle iyi çiçek açabilir. Aksi halde bitki cılız olup, çiçeğide solgun olmaktadır. Bu bitki toz gibi küflenmeye de eğilimlidir (URL-16, 2007). Dahlia bitkisinin boyutları 30 cm ile 240 cm arasında değişmekte olup, çiçekleride 5 ile 30 cm arasında olmaktadır. Dahlia bitkisinin büyük bir çeşitlilik sergilemesi, çoğu bitkinin aksine, onun oktahiploid olup, 8 set kromozoma sahip olmasından kaynaklanmaktadır (normal bitkiler 2 set kromozoma sahiptirler).

2.1.1.1.8. *Echinops Bannaticus*

Asteraceae ailesinin bir cinsi olan Globe Thistles (Lat: Echinops)'in 130 civarında türü mevcut olup, dünya muslukları olarak isimlendirilmektedirler. Bitkinin Avrupa'da, merkez ve doğu Asya'da ve tropik Afrika'nın güney dağlarında bulunduğu bilinmektedir (URL-17, 2007).

Gövdesi 60 cm'e kadar uzayabilen bu bitki sahip olduğu yuvarlak çiçek başı ile dikkat çekmektedir. Büyütülmesi kolay olan bu bitki, özellikle arı ve kelebekler için önem taşımaktadır.

2.1.1.2. Pittosporaceae Ailesi

Çiçek bitkileri ailesi olarak bilinen *Pittosporaceae*, yaklaşık olarak 10 cins içinde 200 tür ağaç, funda ve sarmaşık içermektedir. *Pittosporaceae* türleri ılımlı bölgelerde yetişirler (URL-18, 2007). 9 cins içinde 200'e yakın türü tropik Afrika'dan Pasifik kıyılarına kadar uzanmaktadır. 8 cinsi Avustralya'da bulunur. Yaprakları değişken olup genellikle zıt duran ve derince bölünmüş kısmi olarak beyaz ile lekelenmiş bir görüntü sergilerler. Çiçekler solgun sarı renkli olup, genelde baharda açarlar.

2.1.1.2.1. *Sollya heterophylla*

Latince adı, *Sollya heterophylla* olan bu bitki, Türkçe'de çan çiçeği sarmaşığı olarak bilinmektedir. Bu bitki, ismini çiçeğinin aşağıya yönelmesi ile çan'ı hatırlatması dolayısıyla almıştır. *Sollya* bitkisi, batı Avusturalya'da doğal olarak sınırlanmış yaklaşık 3 türlü bir cinstir. *Sollya heterophylla* ise bu cinsin en önemli bitkisidir (URL-19, 2007). Bu bitki, çiçeklerini haziran ayından eylül ayına kadar açarken, bunu izleyen aylarda yenilebilir yumuşak meyve vermektedir (URL-20, 2007). Yeşil-mavi karışımı bir renkte olan meyve, 2 cm uzunluğunda olup, silindirik ve çok çekirdekli. Belirli bir alanda gölgelik yapmak için kullanılan bu bitkiler, en iyi büyümesini cam altında, sezonu boyunca sulanarak yaparlar. Yaprakları beyaz sarı olup, 5 cm uzunluğundadır. Çiçeleri çan şeklinde ve 1 cm uzunluğunda olup yazları görünürler. Avusturya'da kültür edilen ve yetiştirilen bitki, genel olarak mavi rengi ile tanınsada, beyaz ve pembe formlarınada rastlamak mümkündür.

2.1.1.3. Brassicaceae Ailesi

Bir çiçek ailesi olarak bilinen *Brassicaceae*, *Cruciferae* olarak ta isimlendirilmektedir. 350 cins ve 3500 tür içeren aile, ekonomik önem taşıyan 10. önemli bitki ailesidir (URL-21, 2007). Halk dilinde hardalgiller olarak bilinen bu aile, ekonomik önemi

olan dünya kış sebzelerinin önemli bir kısmını kapsamaktadır. Bu aile, çaprazlığı andıran dört taç yaprağın olmasından dolayı önceleri *Cruciferae* (karşıt dayanma) olarak isimlendirilmiştir. Ilımlı bölgelerde yoğunlaşan ailenin, en çok çeşitliliği Akdeniz bölgesinde görülmektedir. Aile, yıllık, çift yıllık ve çok yıllık hayat ömürlü otsul bitkilerden oluşmaktadır. Ailenin genel özelliği olarak yapraklarının karşıt olmaları söylenebilir ve ailenin çoğu üyesi lahana kokusuyla özdeşleşmiş olan glikosilolat maddelerini paylaşmaktadırlar. İki ailenin de glikosinolat adlı birleşik ürettiklerinden dolayı, *Brassicaceae* ailesi ve *Caper* ailesi arasında özel bir yakınlık olduğuna inanılmaktadır.

Küzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yaygınca bulunan ailenin, sadece Avustralya'da 54 türü olup, bunların 40'ı doğallaştırılmıştır. Birçoğu açık-sarı renkli çiçeklere sahip olduklarından dolayı meyve oluşumu gözlenmeden türlerinin ayırt edilmesi zordur. Bunun sonucu olarak ta tepeden çiçeğe bakıldığında daha fazla benzer türün varlığı düşünülmektedir. Tanımlama, meyvenin gözlenmesiyle ayırt edilir (URL-22, 2007).

2.1.1.3.1. Arabidopsis Thaliana

Brassicaceae ailesinin bir üyesi olan thale cress (Lat: *Arabidopsis thaliana*) 16 yy'da Almanya'nın Halz sıra dağlarında, Johannes thal tarafından keşfedilmiş olup, genom haritası çözünen ilk bitki özelliğine sahiptir (URL-23, 2007). Genomun çözülmesi onun model bir organizma olmasının yolunu açmış ve küçük bir bitki olup genomunun da küçük olması ve değişimlerin kolayca gözlenebilmesi onun bilim dünyasında ön plana çıkartmıştır. 30 cm'e kadar büyüeyebilen bitki, yıllık kısa otsul bir bitkidir. Bir rozet bitkisi olup, boğumu yuvarlaktır. Çiçek dikkatli incelendiğinde dip yapraklarının tırtıllı fakat boğum yapraklarının düz olduğu görülebilir. Çiçekleri 4 mm'ye kadar büyüeyebilen bitki, çiçeklerini mayıs-haziran aylarında açar (URL-24, 2007). 20 cm'e kadar boyu uzayabilen bezelye kabuğu şeklinde meyveleri vardır. Dünya etrafında ılıman bölgelerde yoğunca bulunan bu bitkinin tarımsal anlamda bir önemi yoktur. Küçük boyutu ve hayat çarkının hızlı olması onu laboratuvarlarda yoğunca kullanılan bir bitki haline getirtmiştir. Filizlenmeden olgun bir tohum halini alması yaklaşık 6 haftayı bulur ve kolayca kültür edilebilir. Avrupa'ya has olan bu bitki, taşımalarla Amerika ve Afrika'ya getirtirilmişdir. Arabidopsis kapalı bir bitki olup, bitki krallığı içinde en küçük genoma sahip olan bir

bitkidir. DNA'nın 115,409,949 baz çifti 5 kromozom da yayılmıştır. (2n:10)DNA'sı 25,498 gen kodlayabilir (URL-25, 2007).

Bu bitki binlerce sayıda tohum oluşturabilmektedir. Arabidopsis'deki bitki transformasyonu rutin olup, *Agrobacterium tumefaciens*'ni kullanarak DNA'yı bitki genomuna transfer eder. Arabidopsis'deki ilk mutant Alexander Braun tarafından 1873'de belgelenmiştir. Fakat model organizma olarak Arabidopsis'in potansiyeli 1943'e kadar belgelenememiştir. Bu mutant şimdilerde agamous olarak bilinen ve 1990'da klonlanarak izole edilen mutant genidir (URL-26, 2007).



Şekil 9. *Gerbera hybrida* çiçeği (Gerbera)



Şekil 10. *Rudbeckia hirta* çiçeği (Güneş şapkası)



Şekil 11. *Osteospermum hyb. bamba* çiçeği (Bodrum papatyası)



Şekil 12. *Tagetes erecta* çiçeği (Kadife çiçeği)



Şekil 13. *Centaurea cyanus* çiçeği (Peygamber çiçeği)



Şekil 14. *Cichorium intybus* çiçeği (Hindiba)



Şekil 15. *Arabidopsis thal.* çiçeği (Tere otu)



Şekil 16. *Sollya heterophylla* (Çan çiçeği)



Şekil 17. *Echinops bannaticus* çiçeği (Topuz ç.)



Şekil 18. *Dahlia var. c. n.* çiçeği (Yıldız ç.)

Not: Bütün bitki resimleri (URL-27, 2007) kaynağından alınmıştır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

[¹⁴ C]-Malonil-CoA	Amersham Biosciences
α-Ketoglutarat	Synergie
3-Metoksi flavon	Extrasynthese
Asetik asit	VWR International
Aseton	VWR International
Askorbik asit	Sigma
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Selit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kloroform	VWR International
Kromotografi kağıdı (S & S Nr. 2043)	Schleicher und Schüll
Pamuk yünü	Rauscher & Co
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	VWR International
D-glikoz 6-fosfat dehidrogenaz	Roche Diagnostics GmbH
D-glikoz 6-fosfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMACA	VWR International
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Etil asetat	VWR International
Demir (II) sülfat heptahidrat	VWR International
Folin-Ciocalteu reaktantı	VWR International
Formik asit	VWR International
H ₃ BO ₄	VWR International
HCl	VWR International
HEW-lizozim	Boehringer Mannheim GmbH
KH ₂ PO ₄	VWR International
[U- ¹⁴ C]-fenilalanin	Amersham Biosciences
Sıvı nitrojen	TEGA
Metanol	VWR International
Na ₂ CO ₃	VWR International
Na ₂ HPO ₄	VWR International
NADP ⁺	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NADPH	Boehringer Mannheim GmbH
n-Bütanol	VWR International
p-Koumaroyil-CoA	K. Stich, TU Vienna
Policlar® AT	Serva Electrophoresis GmbH
Kuersetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CHI (<i>Dahlia variabilis</i> , cv. Eurostar)	K. Stich, TU Vienna
Rekombinant CHS (<i>E. coli</i> 'den)	J. Schroeder, University Freiburg

Rekombinant FHT (<i>E. coli</i> 'den)	R. Lukacin, University Marburg
Scintillation kokteyl (OptiPhase Hi Safe1 3)	Perkin Elmer Inc.
Sephadeks™ G-25 (Medyum)	Amersham Biosciences
Silika kum	VWR International
Sodyum deoksikolat	VWR International
Katı potasyum hidroksit	VWR International
Katı sodyum hidroksit	VWR International
TLC- selüloz tabaka (20*20cm) (floresent birleşiksiz)	VWR International
Triklorik asit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris (hidroksimetil)-metilamin	VWR International
Tri-sodyum sitrat dihidrat	VWR International
Üridin difosfo-d-U-[¹⁴ C]glikoz	Amersham Biosciences

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Analitiksel denge "Feinwaage R200 D"	Sartorius GmbH
Analitiksel denge "PJ 3600 Delta Range®"	Mettler
Analitiksel denge "SBC 22"	Scaltec
TLC-Linear Analyzer LB 2842	Berthold
Biofuge 22 R	Heraeus Instruments GmbH
Biofuge A	Heraeus Instruments GmbH
Santrifirüç "Microfuge® Lite"	Beckman Instruments Inc.
Mikser "HL3260"	Philips
Eksikator	Glaswerk Wertheim
Donduran kurutucu "Flexi Dry™ MP"	FTS® Systems Inc.
Isıtma cihazı "Heizblock QBT 2"	Grant Instruments Ltd.
Sıvı scintillation counter WinSpectral™ 1414	Wallac
Mikroişlemci pH-meter pmX 3000	Wissenschaftlich- technische Werkstätten
Overhead mikser "REAX 2"	Heidolph
Soğutucu santrifirüç "Allegra™ 21R"	Beckman Instruments Inc.
Soğutucu santrifirüç "J2-21"	Beckman Instruments Inc.
Dönen buharlaştırıcı	Büchi
Spektrofotometre DU®-800	Beckman Instruments Inc.
Univapo 150H	Uniquip
Unicryo MC 2L	Uniquip
Vakum santrifirüç VR-mini	Heto-Holten A/S
Vakum santrifirüç NSE 800	Neuberger

2.1.4. Kullanılan Enzimler

BamHI, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
EcoRI, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
HindIII, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
Knpl, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
MunL, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
Rnaz A, 100U/mg	Sigma
RNaz İnhibitor Endofree, 40 U/ μ L	Ambion
Sacl, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
Smal, 10 U/ μ L	MBI Fermentas
Superscript II Rnaz HTers	Invitrogen
Transkriptaz, 200 U/ μ L	
Taq DNA Polimeraz, 1 U/ μ L	MBI Fermentas
Taq/Pwo, 3.5 U/ μ L	Roche
XBaI. 10 U/ μ L	MBI Fermentas
XHol, 10 U/ μ L	MBI Fermentas

2.1.5. Kullanılan Programlar

Chemsketch 4.04
 Chroma (1-dimensional) Version 7.28
 Geminix Version: 1.91
 System application software for DU-800 Version 2.0
 Winspectral 2.00.02

2.1.6. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Amfisilin (stok çözelti)	100 mg/ml amfisilin
Askorbik asit	(100 mM) 2 mg sodyum askorbat
	100 μ L Tris-HCl (enzime göre pH)
β -NADPH-Na ₄ (20 mM)	1.7 mg/100 μ L β -NADPH- Na ₄
BAW	butanol : asetik asit : su = 6 : 2 : 1
Kaynama tamponu	8 g/100 ml sukroz (%8 son)
	1,86 g/100 mL EDTA (50 mM son)
	0,12 g/100 mL Tis-HCl (10 mM)

	karışım kaynatıldı 0,5 ml/100 ml Triton X100 (0.5% son) pH 8'e ayarlandı.
Tampon 1	27,6 g/l HEPES (0,2 M) pH KOH ile 7'ye tamamlandı.
CAW	Klorofom : Asteik asit : Su = 10: 9: 1
Siyanidin standart	1 mg siyanidin klorit tuzu 1 ml MeOH/HCl (1%)
Delphinidin standart	1 mg delphinidin klorit tuzu 1 ml MeOH/HCl (1%)
DNA ladder (50 ng/μL)	100 μL "λ DNA/Eco471 (AvaII) Marker, (500 ng/μL) 200 μL yükleme tamponu 700 μL su
dNTPs (10 mM)	10 μL 100 mM dATP 10 μL 100 mM dCTP 10 μL 100 mM dGTP 10 μL 100 mM dTTP 60 μL su
Etanol (%70)	70 ml etanol (100%) 30 ml su
FeSO ₄	0,18 mg/ml FeSO ₄ · 7H ₂ O
Galaktoz (%20)	200 g/l Galaktoz Çözetli steril edilir.
HEPES (0,1 M, pH: 7,5)	23,8 g/l HEPES pH 7'e ayarlanır
Kaemferol standart	M _a mg kaemferol tozu 1 ml MeOH
Kanamisin (stok çözelti)	50 mg/ml kanamisin
KPi tampon (pH:6.0)	13,2 ml 1 M K ₂ HPO ₄ 86,8 ml 1 M K ₂ HPO ₄
Yükleme boya tamponu	15 g Ficoll 400 0,25 g bromofenol mavisi tampon ile hacim 100 ml'e tamamlanır
Malonil-CoA, "Sıcak/Soğuk"	166 μL ¹⁴ C-Malonil-CoA 334 μL 0,24 mM Malonil-CoA 500 μL su
2-Oksoglutarik asit	7,5 mg 2-oksoglutarat 1 ml 0,1 M Tris-HCl (pH enzime göre ayarlanır)
Pelargonidin standart	1 mg pelargonidin klorit tuzu

Pelargonidin standart	1 ml MeOH/HCl (1%) 1 mg peonidinklorit tuzu
Primerler	1 ml MeOH/HCl (1%) dejenere edilmiş: 25 µM
RNaz A	1 mg/ml RNaz A
TAE	50X 242 g/l Tris 57,1 ml/l asetik asit 18,61 g/l EDTA pH 8'e ayarlanır
Tris-HCl (0,1 M, pH: 7,5)	1X 2 ml 50 x TAE 98 ml su 12,11 g/l Tris pH 7,5'a ayarlanır
Tris-HCl (0,1 M, pH: 6,8)	12,11 g/l Tris pH 6,8'e ayarlanır

2.1.7. Kullanılan Kùltürler

LB _{norm}	10 g/l pepton 5 g/l maya ekstraktı 10 g/l NaCl pH 7'ye ayarlanır LB agar tabakaları için, 15 g/l agoroz eklendi. Çözelti otoklevlendi ve 55 °C'ye soğutuldu 1 ml amifisilin (100 mg/ml stok çözelti)
LB _{select}	10 g/l pepton 5 g/l maya ekstraktı 1 ml 1 M MgCl ₂ 16 ml gliserol (100%) pH 7,5'a ayarlanır Çözelti otoklevlendi ve 55 °C'ye soğutuldu 1 ml amifisilin (100 mg/ml stok çözelti) 0,5 ml kanamisin (50 mg/ml stok çözelti)
MS	
SGI	1 g/l pepton 6,7 g/l amino asitsiz maya nitrojen bazı

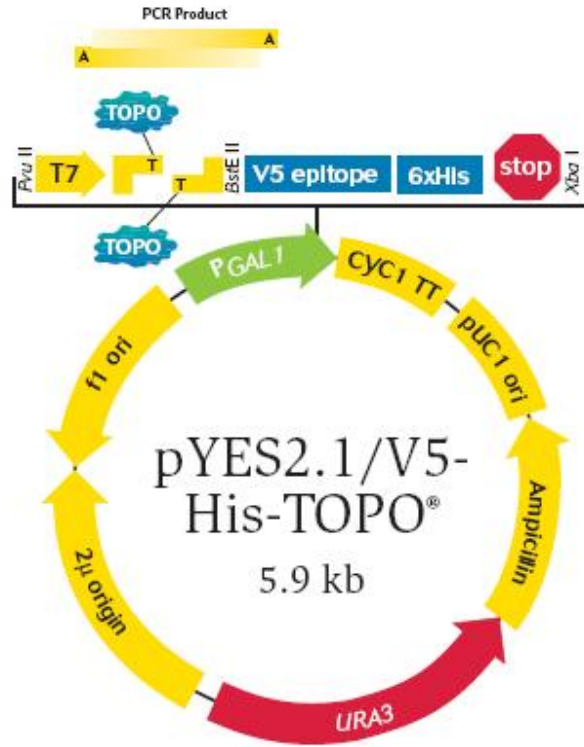
	20 mg/ml L-Triptofan
	suyla hacim 900 ml'e tamamlanır
	SGI agar tabakaları için, 15 g agaroz eklendi
	çözelti otoklevlendi
	20 g glikoz 100 ml suda çözündü ve sterilendi
SOC	SOC medyası yetkili <i>E. coli</i> hücreleri ile
	sağlandı
YEB	1 g maya ekstraktı
	5 g pepton
	0,5 g MgSO ₄
	5 g sığır ekstraktı
	5 g glikoz
	1 litreye suyla tamamlanır
	pH' a 7,2'e ayarlandı.
YPGE	5 g/l glikoz
	10 g/l pepton
	10 g/l maya ekstraktı
	10 g/l maya ekstraktı
	970 ml suyla tamamlanır
	Çözelti otoklevlendi
	30 mg 100 % etanol

2.1.8. Plazmitler

Plazmitler DNA parçası olarak kromozomlardan farklı bir yerde bulunup, kendi kendini eşleme özelliğine sahiptirler. Genel olarak bakterilerde olan bu parçalar, bazı ökaryotik canlılarda da bulunmaktadır. Boyutları, kromozomların %3 ile %20 arasında olup, 1 ile 200 kb arasında değişmektedirler. Bazı plazmitler, başka bakterilere taşınabilen doğurganlık genine sahip olup bu yolla genetik bilgiyi başka bakteri soylarına taşırlar. Plazmit genleri antibiyotiklere karşı direnç ve toksin üretilmesini sağlamaktadırlar. Bakteri için gerekli olmayan bu kısımlar farklı fonksiyonlar taşımaktadırlar (URL-28, 2007). Plazmitlerin bir diğer kullanılış alanı ise dizileştirme, protein ifadesi, transfeksiyon ve gen terapisi alanlarında kullanılmaktadırlar (URL-29, 2007).

2.1.8.1. pYes2.1

pYes2.1/V5-His-TOPO, 5886 bc ile dairesel pYes2'nin aksine klonlama bölgesine sahip değildir. Kopyalama *E. coli* ve *S. cerevisiae* adında iki değişik canlıda olmaktadır. Pyes2.1, ilk vektör modelinin aksine prensipte pYes2'ye benzemesine rağmen aşağıda değinilen bazı farklılıklara sahiptir. Klonlama, glikoz tarafından bastırılan (URL-30, 2007) ve galaktoz neden olabilen promoterdan oluşmuştur. GAL1 polimeraz zincir reaksiyonunun yerleştirileceği TOPO klonlama bölgesini kontrol eder. TA klonlama stratejisi için gerekli olan Tekil 3-T asılı ile 5886 baz çiftinin düzleştirilmiş yüksek kopyalama plazmiti ile oluşur



Şekil 19. pYes2.1 /V5-His-TOPO yapısı (URL-31, 2007)

Ek olarak Pyes2'nin aksine, heterolojik olarak ifade edilmiş genlerin saflaştırılması ve tercihi belirlenmesi için V5 epitop ve 6*his tag mevcuttur. TOPO klonmasını sunan pYes vektörler, vektör içinde çoğaltılacak genin en hızlı biçimde yapılmasını sağlayan bir sistemdir. İfade, *S. cerevisiae* içinde gerçekleştirilir. pYes2.1/V5 –His TOPO vektörü ile 5 dakika inkübe ile %85'e yakın yeniden oluşturma ile taq-çoğaltılmış PCR ürünlerini klonlanabilir. pYes Vektörün genel olarak özellikler olarak;

1. *S. cerevisiae* içinde yüksek kopyalama plazmiti için replikasyonun 2 µL orijini
2. *S. cerevisiae* içinde, seçim için URA3 geni
3. Yeniden oluşturulan proteinlerin saflaştırılması ve kolay teşhis için polihistidin taq'ı ve C-sonlandırıcı V5 epitopu

pYes Vektörünün avantajları olarak;

- Kolay sonuç için Gal-1 promotor'undan düzenli ifadesi
- *Saccaromyces cerevisiae* içinde elde edilebilecek ifadelerin çeşitli seviyeleri için replikasyonun iki orijinden seçimi
- TOPO[®] klonlanmasının hızı ve etkinliği
- Gateway teknolojisinin kullanışlılığı ve esnekliği sayılabilir.

2.1.9. Bakteri ve Maya Soyları

Klonlama ve Maya ifade vektörlerindeki PCR ürünlerinin klonlanmaları için, pYes2.1 TOPO ile birlikte gelen Invitrogen'in yarışmalı TOP 10 ve TOP 10F (TOPO TA klonlama[®] kiti) kullanıldı. Kanamisin ve amfisiline karşı dirençleri olmayan bakteri soyları seçildi.

2.1.9.1. *Escherichia Coli* TOP 10

(Invitrogen, C4040-03)

genotipi: F⁺ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/acZΔM15 Δ/acX74 deoR
recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.9.2. *Escherichia Coli* TOP 10F⁺

(Invitrogen, C4040-03)

genotipi: F⁺ {lacI^q, Tn10(Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/acZΔM15
ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (Str^R)
endA1 nupG

2.1.9.3. Maya Soyları

Maya'da heterolojik ifade için, *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 soyu kullanıldı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Sterilizasyon

Hücre kültürlerinde meydana gelebilecek kirlenmelerden ve DNaz'lar gibi enzimlerin parçalamalarından sakınmak için üretici tarafından sterillenmeyen materyallerin sterillenmesi gerekmektedir. Materyaller 120 °C'de ve basınç altında en az 30 dk olmak üzere sterillenmelidirler. RNaz'lar kararlı oldukları ve sterillenme aşamasında bozunmadıkları için, deri ile temas etmesini önlemek amacıyla mutlaka moleküler çalışmalarda plastik eldiven giyilmesi zorunludur. Genellikle cam malzemeleri kullanmadan önce sterillenmelerini artırmak için 1–2 sn alevde kızdırılmalıdırlar. Bütün moleküler deneyler, özel olarak hazırlanmış ve sterillenmiş özel bir bölmede yapılmalıdır.

2.2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.2.1. Nükleik Asitlerin Çöktürülmesi

Dizileştirme için DNA örneklerinin hazırlanması ve nükleik asitlerin saflaştırılması gibi çeşitli amaçlar için nükleik asitlerin çöktürülmesi gerekmektedir. Nükleik asitlerin çöktürmelerinin birçok yöntemi mevcuttur. Çöktürülen DNA'lar -20 °C'de saklanırken, RNA'lar ise -80 °C'de saklandılar.

2.2.2.1.1. Etanol ile Çöktürme

DNA örneğine 0,1 volüm 3 M sodyum asetat (pH: 5,2) ve 2,5 volüm konsantre soğuk etanol eklendi ve eppiler -20 °C'de en az 20 dk olmak üzere soğukta bekletildi. Ardından, 13.000 rpm ve 4 °C'de 15 dk santifirüç edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pelet, 200 µL etanol (%70)'lik yardımıyla yıkandı. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra,

etanolun uçurulması için peletler 10 dk oda sıcaklığında kurutuldu. Nükleik asitler uygun miktarda suyla tekrar çözüldüler ve donduruldular.

2.2.2.2. Nükleik Asitlerin Ölçülmesi

Spektrofotometrik ölçümlerin temeli, birleşik içeren sıvıların ölçülmesidir. Spektrofotometre türü olarak hızlı ölçmeyi sağlayan uv-spektrofotometre kullanılmıştır. Ölçüm dalga boyu olarak, nükleik asitlerin maksimum absorbans gösterdikleri 260 nm seçilmiştir. Saf nükleik asitlerin için ise bu dalga boyu 1,8 ile 2 arasında seçilmelidir.

2.2.2.3. RNA İzolasyonu

Farklı bitkilerden toplam RNA'lar Quiagen'in RNeasy bitki kiti kullanılarak ve bu kitin yöntemi izlenerek izole edilmişlerdir. İzole edilen RNA'lar -20 °C de saklanmışlardır. Bitki materyalleri RNA'ların aktivite ve kirlenmelerinden sakınmak için sıvı azot içinde sterillemiş havanda dövüldüler. Eppide 50 mg bitki tozu tartılıp üzerine 450 µL RLT tamponu eklendi ve hemen bütün tozlar çözünene kadar vortekslendi. Çözelti koleksiyon tüpünde olan QIA-shredder spin kolonuna transfer edildi. 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pelet sarsılmadan sıvı kısmı yeni bir reaksiyon tüpüne transfer edildi. 0,5 volüm derişik etanol eklenerek, reaksiyon tüpleri dikkatlice karıştırıldı. Örnek reaksiyon tüpü değiştirilerek RNeasy tüpüne transfer edildi ve 13.000 rpm'de 15 s santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kolona 500 µL RPE tamponu eklendi 13.000 rpm'de 15 s santrifüj edildi. Sıvı kısım tekrar uzaklaştırıldı. 500 µL RLT tamponu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Karışım yeni bir reaksiyon kabına aktarıldı. 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek RLT tamponun kirlenmesi önendi. RNA elüsyonu hemen buza konuldu. RNA saflığının tespit ve analizi için, 1:50 oranı seyreltilmiş örnek uv-spektrofotometre ile 230, 260 ve 280 nm'de ölçüldü. RNA sıvı azot içinde dondurularak -80 °C'de saklandı.

2.2.2.4. Ters Transkripsiyon

Promega M-MLV ters transkriptaz (katalog M1701) kataloğunun değiştirilmiş biçimi uygulanmıştır. 5 µg toplam RNA yada 50 ng mRNA ve 1 µL primer (25 pmol) karıştırıldı ve hacim steril su ile 17,75 µL'e ayarlandı. Karışım 5 dk 70 °C'de inkübe edilir. Daha

sonra, 5x M-MLV reaksiyon tamponu (Promega) ve 1,25 µL 10 mM dNTPs eklenir. Çözelti 2 dk inkübe edildikten sonra, 1 µL M-MLV ters transkriptaz 200 U/µL) (Promega) eklenir ve 42 °C’de 1 saat inkübe edildi. Daha sonrada buzda soğutulup, -4 °C’de saklandı.

2.2.2.5. Tek-Kol cDNA Sentezi

Tek kol cDNA sentezi 1,5 ml’lik eppendorf reaksiyon tüpünde Superscript II RNaz H⁻ ters transkriptaz (invitrogen) kullanılarak ve protokolü izlenerek gerçekleştirildi. cDNA sentezi için her izole edilen RNA’dan 16 µL kullanıldı. 1 ml 25 µL oligo(dT) öncü primer ve 1 µL 10 mM dNTPs eklenildi. Karışım 70 °C’de 5 dk ısıtıldı. Ardından buzda soğutuldu ve yoğunluğu toplamak için döndürüldü. 5 µL 5x ilk kol tamponu, 2 µL 0,1 M DTT ve 1 µL 40 U/µL RNaz endo free inhibitör eklendi. Karışım 42 °C’de 2 dk inkübe edildikten sonra, 1 µL 200 U/µL Superscript II RNaz H⁻ ters transkriptaz ilave edildi. Karışım 30 dk boyunca 42 °C’de, 10 dk 48 °C’de ve 10 dk 70 °C’de inkübe edildi. Ardından, karışım buzda bekletilerek soğutulup, döndürüldü ve -40 °C’de depo edildi.

2.2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir DNA uzatıcı enzim olan polimeraz enzimi yardımıyla istenilen DNA gen dizisinin çoğaltılarak birçok kopyasının oluşturulmasını sağlayan sistemdir. PCR genel olarak yaklaşık 40 devir tekrar yapan üç temel aşamadan oluşur. Bu işlem, 1983’de Kary Mullis tarafından bulunan ve ona nobel ödülünü kazanmasını sağlayan termo-döndürücü yardımıyla başarılıdır. Bu termo-döndürücü kısa zaman içinde ısıtmayı ve soğutmayı sağlar. İlk aşama olan denatüre aşamasında DNA’daki çifte kollar yaklaşık 95 °C’de açılır ve tekli kollar ortaya çıkar. İkinci basamak “annealing” olup, bu basamakta cihaz 37 °C ile 67 °C’ye soğur. Bu aşamada tekli bantlar, kızıl denizin sıcak bölgelerinde yaşayan mikroorganizmalardan elde edilmiş polimeraz enzimi yardımıyla bazlar arasında hidrojen bağları oluşturularak eşlenik diziler oluşturulur. Bu aşamada küçük DNA gen dizi parçaları (primerler) kullanılır. Bu aşamanın ardından sıcaklık polimeraz enziminin aktif optimum sıcaklık değeri olan 72 °C’ye yükselir. Polimeraz enzimi yardımıyla bağlar oluşturulan DNA tekli bandın tamamlayıcı dizisi oluşturulur. Bazlar primere 3’ kısımdan bağlanırlar. Polimeraz dNTP’leri 5’den 3’e bağlar okuma ise 3’den 5’e doğrudur. İyi çoğaltma, sadece ileri primere bağlıdır. Her bir bitki

türü için PCR 0,2 ml PCR tüpü (MBI Fermentas) içinde aşağıdaki bileşenler ile başarılıdır. 16.75 µL su, 2.5 µL 10x PCR tamponu (MgCl₂'siz), 0.5 µL 10 nM dNTPs, 1,25 µL 10 µM gen spesifik ileri primer, 1,25 µL 10 µM gen spesifik ters primer, 1 µL taslak (ilk-kol cDNA) ve 0.25 U/µL *Taq* DNA polimeraz birleştirilip, karıştırılır ve genel olarak aşağıdaki sıcaklık ve zaman aralıkları uygulanır.

Aşama 1: 94 °C'de 1,5 dk

Aşama 2 (40 devir): 94 °C'de 0,5 dk (denatürasyon)

45-55 °C'de 1 dk (çoğaltma)

72 °C'de 2 dk (uzatma)

Aşama 3: 72 °C'de 10 dk

(Not: Primerlerin yanlış karşılaşarak, yanlış çoğaltmaları önlemek amacıyla PCR düzeneği önceden 94 °C'ye ısıtılması gerekir).

2.2.2.7. Proof-Reading PCR

Primer kombinasyonları ve annealing koşulları bir *Taq/Pwo*-polimeraz sistemli (PR-PCR) için istenilen dizilerin oluşturulmasını sağlar. Deney aşağıdaki gibi uygulanır. 35.25 µL su, 5 µL 10xPCR tamponu (MgCl₂ 'siz), 3 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM dNTPs, 1.5 µL 10µM gen spesifik ileri primer, 1,5 µL 10 µM gen spesifik ters primer, 2 µL taslak (tek-kol cDNA), ve 3.5 U/µL *Taq/Pwo* 0,2 ml'lik PCR tüp de birleştirilir ve PCR yoğun termal döndürücü ve aşağıdaki döndürme şartları göz önüne alınarak uygulanır.

Aşama 1: 94 °C'de 1,5 dk

Aşama 2 (30 dönüş) 94 °C'de 0,5 dk (denatürasyon)

1 dk için spesifik annealing sıcaklık (annealing)

72 °C'de 2 dk (uzatma)

Aşama 3: 72 °C'de 7 dk

Örnekler jel elektroforezi ile hızlı değerlendirme için buza konulurlar ya da -20 °C'de depolanırlar.

2.2.2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda DNA, RNA ve proteinlerin uzunluklarına bağlı olarak onları ayırmada kullanılan bir tekniktir. Jel nükleik asit parçalarının saflaştırılmasında da kullanılır. Bu elektforez de jel, tamamen agaroz adında maddeden oluşmuştur. Bu teknikte küçük moleküler düşük molekül ağırlıkları nedeniyle büyük moleküle göre daha hızlı taşınırlar. Agaroz, 100 bp ile 20 kb uzunluklarındaki DNA parçacıkların ayrılmasında kullanılabilir. Poli-akrilamid jeller ise daha kısa DNA parçacıkları için kullanılır. Tampon, agaroz konsantrasyonu ve kalitesine bağlı olarak, jelin por sayısı ve büyüklüğü çeşitlendirilebilir.

Bu çalışmada, 1 % (a/h) agaroz jel kullanıldı. Agaroz tozu TAE tamponunda çözüldü ve ısıtıldı. Elektroforetiksel ayrılmadan sonra DNA, yaklaşık 60 °C'de boyamak için, her çözünen 100 ml başına 10 µL EtBr eklendi. Eriyen jel tarak yardımıyla kap içine aktarıldı (Sırada 15 boşluk oluşturmak için). Uzunluk işaretleyicisi olarak 10 µL (500 ng) DNA ladder λ DNA/Eco471 kullanıldı. Örnek başına 0,2 volüm yükleme tamponu eklendi ve bu karışımın 20 µL jel boşlukları için kullanıldı. Suyla batırılan elektforez TAE tamponu ile 90 V. 70 mA ve 10 W'da yaklaşık olarak 32 ile 45 dk için tank içinde gerçekleştirildi

2.2.2.9. F3'H Enziminin Klonlanması

2.2.2.10. pYES2.1/V5-His-TOPO'ya Bağlama (Ligasyon)

0,5 ile 2 µL PCR ürünü başına 2 ile 3,5 µL steril su ve 1 µL vektör eklendi. Örnek 5 ile 15 dk arasında oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, karışım buzda bekletildi ve -20 °C'de tekrar kullanılmaya kadar depo edildi.

2.2.2.11. *E. Coli* İçinde Plazmitlerin Transformasyonları

Transformasyon, DNA'nın hücreye transferidir. Kimyasal olarak yetenekli *E. coli* TOP10 (*Fragaria* ve *Vaccinium* için) ve TOP10F⁻ (*Camellia*, *Crataegus*, *Rosa* ve *Vitis* için) soyları kullanıldı. pCR[®] 2,1-TOPO[®] ve pYes2.1 TOPO TA klonlama kitlerinin el kitabında yazan prosedür izlenerek deney gerçekleştirildi. Küçük şişedeki yetenekli bakteriler buzda eritildi. Ligasyon reaksiyonunun 2 µL'si eklendi ve pipetlemeden

yumuşakça karıştırıldıktan sonra buz içinde 5 dk inkübe edildi. Daha sonra, 42 °C'deki su banyosu yardımıyla 30 s'lik ısı şokuna tabi tutuldu. 250 µL SOC medyumunu eklendikten sonra küçük şişe aniden buzda soğutuldu. 250 µL SOC medyumunu eklendikten sonra küçük şişe yatay olarak 200 rpm'de 37 °C sıcaklıkta 1 saat sallandı. Daha sonra, bakteri çözeltisi 30 ile 270 µL arasında hacimlere bölündü ve iki LB_{Amp} agar tabakasına döküldü. 12 ile 24 saat arasında 37 °C'de inkübe edildi. En azından bir tabakanın koloni için yeterli miktarda alanın olduğundan emin olmak için iki farklı hacim tavsiye edilir. Transformasyonlanmış kolonilerin secimi için pCR[®] 2,1-TOPO[®] kanamisinli vektör seçici tabaka ile ve X-Gal kullanıldı. Transformasyonlanmış *E. coli* büyümesi amfisilin tarafından bastırıldı. Amfisilin seçici ajan olarak kullanıldığı için, uydu kolonilerin varlığı umulmuyordu.

2.2.2.12. Plazmit İzolasyonu

Aşağıdaki metotların her ikisi PCR, sınırlama, sindirme, transformasyon ve dizi çalışmaları gibi ileri kullanılışlar için gerekli plazmitlerin ele edilmesinde kullanılırlar.

2.2.2.13. Kaynama Hazırlığı

Metodun temeli, DNA denatürasyonu izleyerek bakteri hücrelerinin lizin tarafından çözünmesidir ve plazmit DNA'ların seçici yeniden oluşumudur. Öncelikle steril kürdanlarla ile *E. coli* kolonileri LB_{Amp} agar tabakalarından toplanmıştır ve 20 ml'lik cam inkübe tüplerine 3,5 ml sıvı LB_{Amp} medyumunu yardımıyla aktarılmıştır. 37 °C ve 220 rpm'de inkübe edilmiştir. Her 1 ml inkübe edilmiş kültür reaksiyon kabına transfer edilmiş ve 5000 rpm ve 4 °C'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelet 350 µL kaynama tamponu ve 25 µL lizozim (10 mg/ml) ile vorteksleyerek süspanse edilir. Karışım 40 saniye için 95 °C'ye kadar ısıtılır ve buzda aniden soğutulur. Soğutma sırasında, kromozol DNA'nın aksine denatüre edilmiş fakat birbirine bağlanmış plazmit soyları yeniden oluşturulabilir ve bu nedenle çözünür ve pıhtılaşmaz. 14.000 rpm ve 4 °C'de 5 dk santrifüj edildikten sonra koloidal pıhtı kürdan yardımıyla silinir. Plazmitler isopropanol yardımıyla çöktürülür ve 50 µL TE/Rnaz çözeltisi (1 µL RNaz A (1 mg/ml) + 50 µL TE tamponu) ile yeniden çözünür daha sonrada RNA azaltımı için 37 °C'de 15 dk inkübe edilir. Plazmitler -20 °C'de depolanır.

2.2.2.14. E.N.Z.A Plazmit Miniprep Kiti 1

Plazmit DNA transformasyon, sindirme, sınırlama ya da sonraki PCR'lar tarafından sürdürüldü. 3,5 ml'lik sıvı LB_{Amp} ya da LB Kan medyumuna içinde gece inkübe edilmiş *E. coli* kültürün 1–1.5 ml miktarı reaksiyon tüpüne aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelet 250 µL Lözünge I/RNAz içinde vorteksenerek süspanse edildi. 250 µL Lözünge II eklendi ve kap 4 ile 6 kez ters çevrilerek temiz bir lysesate geliştirmeye kadar dikkatlice karıştırıldı. Daha sonra lysesate 350 µL Lözünge III ile nötralize edildi ve çökelti oluşuncaya dek karışım 13.000 rpm'de 10 dk'lığına santrifüj edildi. Üst kısım 2 ml'lik koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş HiBind–Miniprep santrifüj kolonuna zedelemeyen aktarıldı. Ardından, Lysesate'ın membranı geçmesi için 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama için, 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilen kolona 500 µL HB-tamponu pipetlendi. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, 750 µL DNA-yıkama tamponu ile iki kez yıkandı. Kolonu kurutmak için reaksiyon kabına yerleştirildi ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Elüsyon için, kolon reaksiyon kabına konuldu ve 50 µL su (önceden 65 °C'ye ısıtılmış) matrikse direkt olarak pipetlendi ve kolon 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Plazmit çözeltisi buza konuldu ve -20 °C'de saklandı.

2.2.2.15. Plazmit Analizi

Plazmitlerdeki yerleştirilen yönelimi anlamının iki olanağı vardır. Duyu yönelimi yerleştirme ile koloniler antisense yönelimde fonksiyonel enzim yapamadıkları için ileri enzimatik çalışmalar için önemlidir. Plazmitleri sindirmenin tek yolu sınırlama enzimleri ile ve bir diğer yol ise koloni PCR'dır.

2.2.2.16. Koloni PCR

Bu yol, primerler PCR için mevcut olduğu takdirde dizi bilindiğinde, hızlı belirleme ve yerleştirilenlerin belirlenmesinde kullanılır. Plazmit kolonilerine DNA'nın yerleştirme başarısını ispatlamak için, bu PCR prosedürü için taslak olarak kullanılan ve seçici tabakadan plazmit kolonilerin toplanmamıştır. PCR bileşenleri aşağıdaki belirtildiği gibidir. Yerleştirilen yönelim kontrol edilmelidir (özellikle ileriki çalışmalar için) ve daha sonra bir vektör yandan saldıran primer ve bir gen primer kullanıldı. Aşağıdaki protokol

steril kürdan kullanılarak öncelikle PCR tüplerine batırılıp daha sonra yeni bir eşleme agar tabakasına dokunuldu. Aşağıdaki karışım, PCR tüplerine pipetlendi. PCR termal döndürücü ile gerçekleştirildi. Dönme programı olarak aşağıdaki belirtilen sistem uygulandı. Daha sonra örnekler buza konuldu ve jel elektroforezin tekrar kullanılana dek -4°C 'de depolandı.

Aşama 1: 95 °C 1,5 dk
Aşama 2 (30 dönüm) : 94 °C 0,5 dk (denatürasyon)
 45-63 °C (PR-PCR sırasındaki koşullara göre) 1 dk (annealing)
 72 °C 2 dk (uzatma)
Aşama 3 : 72 °C 10 dk

2.2.2.17. Sınırlı Sindirme

Sınırlı sindirme DNA moleküllerinin sınırlayıcı endonükleaz enzimleri yardımıyla daha küçük DNA parçalarına kesilmesi işlemidir. Bu özel enzimler DNA molekülündeki özel dizileri tanırlar. Sınırlı enzim sindirmeleri, üretici tarafından tavsiye edilen Onun tamponunun içinde optimum koşullar altında sınırlama enzimlerinin uygun miktarı ile DNA moleküllerinin çiftli kolların inkübe edilmesi ile gerçekleşir. Optimum NaCl ve KCl konsantrasyonu ve pH değişik enzimler için farklıdır. Tipik sindirme enzim aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklıkta, tipik olarak 37°C 'de bir saatte enzim mikrogram DNA başına bir enzim ünitesini içerir. $10\ \mu\text{L}$ plazmit DNA, $2,5\ \mu\text{L}$ 10-x reaksiyon tamponunda ve $1\ \mu\text{L}$ her bir enzim karıştırıldı ve steril su ile hacmi $20\ \mu\text{L}$ 'e tamamlandı. Reaksiyon karışımı tavsiye edilen sıcaklıkta (genellikle 37°C 'dir) 1 saatliğine inkübe edildi ve jel elektroforezi ile değerlendirildi. Eğer istenildiği takdirde birden fazla enzim sindirmede rol alabilirler. İki enziminin de aynı tampon ve aynı sıcaklıkta aktif olma koşulu ile izole edilmiş plazmitler için plazmit dizisini kesebilecek bir sınırlama enzimi seçildi. Bunun için yerleştirilen dizi yeni bilinmeyen dizilerin klonlanması için bu metodu yararsız yapacağı bilinmelidir. Yerleştirilen yönelime bağlı olarak farklı boyutlarda parçaları keserek elde edilmelidir.

2.2.2.18. *S. Cerevisiae*'nin Transformasyonu

Pozitif *E. coli* klonlarından plazmitler *S. cerevisiae*'nin transformasyonu ve klonlanmış cDNA'ların heterolojik ifadesi için kullanılırlar. Bu S.c. EasyComp transformasyon kiti ve aşağıdaki yol izlenerek başarılabilir. Reaksiyon kabında bir miktar olan 25 µL yetenekli maya hücre soyu IncSc1, buzda eritilir. 0,5 µg plazmit DNA ve 250 µL önceden ısıtılmış (oda sıcaklığına) çözelti III kaba eklenir ve 1 dk'lığına vortekslenir. Hücreler 1 saat boyunca her 15 dk'da 1 dk vorteklenmek üzere 30 °C'de inkübe edilirler. Bu nedenle bütün hücreler bir SGI agar tabakasına konur. pYes2.1 plazmiti URA3 genini taşıdığı için sadece transforme edilmiş hücreler bu seçici SGI medyası içinde büyüebilirler. 2 ile 4 gün sonra transforme edilen koloniler büyüdüğünde tabakalar heterolojik ifade için tekrar kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanırlar. Tabakaları buzdolabında saklamak maya metabolizmasının düşük regülasyonuna neden olabilir. Bu durumda maya hücreleri yeniden hayata gelebilmesi için 28 °C'de birkaç günlüğüne inkübe edilmeye ihtiyaç duyarlar.

2.2.2.19. Hücre Kültürlerinin Optik Yoğunluğu

Bazı mikrobiyal uygulamalar için hücre kültürlerinin yoğunluğunu belirlemek gerekir (büyüme fazının belirlenmesi gibi). Ölçüm uv-spektrofotometre ile 600 nm'de gerçekleştirilir. Seyreltmek için uygun çözeltiler kullanılır.

2.2.2.20. Maya'da Heterolojik Enzim İfadesi

Bu deney Pompon vd, 1996'nın değiştirilmiş haliyle uygulanmıştır. Öncelikle, 5 ml SGI medyası kullanılarak enzim aşılır ve 28 °C, 200 rpm'de en az 3 gün olmak üzere inkübe edilir. Bu sürenin ardından, 5 ml'lik enzim süspansiyonu içeren çözelti, 50 ml'lik SGI medya içinde tekrar aşılarak 28 °C, 200 rpm'de 1 gün inkübe edilir. Optiksel yoğunluğu uv-spektrometre kullanılarak 600 nm'de ölçüldükten sonra tabloda karşılık değerindeki miktar, 250 ml YPGE çözeltilisine eklenir. Optik yoğunluğu 0,8 olana kadar aynı şartlarda inkübe edilen süspansiyon, optik yoğunluğu bu değere yükseldikten sonra 27 ml sterillenmiş galaktoz çözeltisi (20% galaktoz(w/w)) ile protein oluşumu sağlanır. 12 ile

15 saat aralığında aynı şartlarda inkübe edilen süspansiyon, enzim ifadesi yapılacak hale getirilmiş olur.

(Uyarı: Buraya kadar yapılan bütün aşamalarda kullanılan kimyasallar ve materyaller 120°C’de ve basınç altında en az 30 dk olmak üzere sterillemeli ve çalışma özel olarak sterillemiş bir bölmede gerçekleştirilmelidir).

Tablo 4. Süspansiyonlardaki optiksel yoğunluğa bağlı olarak eklenecek hacim

<i>OD₆₀₀</i>	<i>V(maya süspansiyonu)/ml</i>
2.00	25
1.70	30
1.40	35
1.25	40
1.10	45
≤ 1.00	50 (Bütün maya süspansiyonları için)

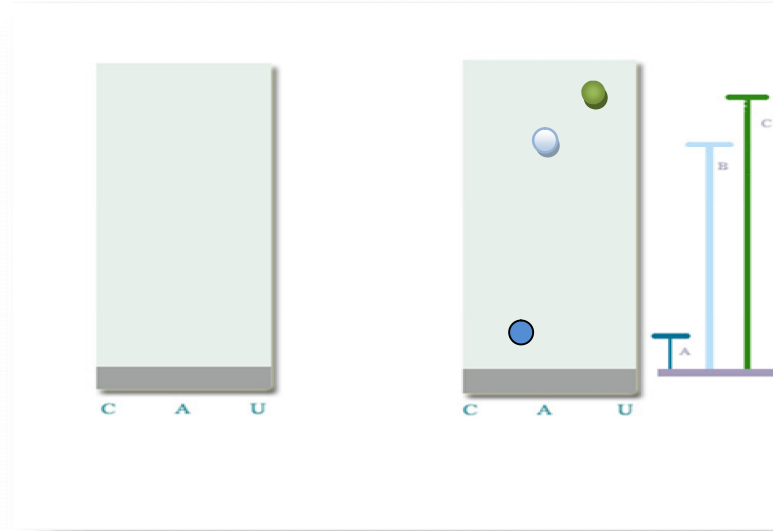
Maya süspansiyonu 50 ml’lik plastik kaplara aktarılır ve buz içinde bekletilir. 4 °C, 5000 g’ de 10 dk santrifüj edildikten sonra, TEK tamponu ile süspanse edilir ve hacmi 27 ml’e TEK tamponu ile tamamlanır. 5 dk oda sıcaklığında dinlendirildikten sonra, 4 °C, 4000 rpm’e 5 dk santrifüj edilir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra, çöken kısım 2,5 ml TES-B* tamponu yardımıyla süspanse edilir ve 7,5 g asit ile yıkanmış cam boncuklar eklenir. 20 dk boyunca, 30 sn’si buzda dinlendirilip ve 30 s’si ise elde çalkalanarak tamamlanır. Bu sürenin ardından 5 ml TES-B* tamponu eklenerek 4 °C 1000 rpm’e kadar santrifüj edilen maya süspansiyonları, plastik santrifüç kaplarına transfer edilir. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra, plastik kaplar 4 °C 16.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilir. Üst kısım mezura alındıktan sonra hacmi TES-B* ile 25ml’e tamamlanır. 940 µL NaCl eklendikten sonra, 2,5 g PEG 4,000 içeren plastik tüplere transfer edilip, çalkalanarak süspanse edilir. 15 dk buz içinde inkübe edilen süspansiyonlar bu sürenin ardından 4 °C 10.500 rpm’de 10 dk santrifüj edilir. Çöken kısım 1 ml’lik TES-B* tamponu ile 2 kez yıkandıktan sonra 1,5 ml TEG ile süspanse edilir. Karışım eppilere transfer edilir ve sıvı nitrojen ile dondurulup -80 °C’de saklanır.

2.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi gerek basit uygulanışı, gerekse de ucuz olması yönünden tercih edilen bir kromatografi türü olduğundan dolayı, fazla kullanılan bir yöntemdir. Genellikle karışımın kaç farklı maddeden oluştuğunu anlamak için, HPLC ve kapiler elektroforez gibi ileri düzey kromatografik yöntemlerden önce kullanılır. Bu teknikte maddelerin ayrışımı, maddenin polaritesine bağlı olup, maddenin son ve ilk hali arasındaki mesafe farkını gösteren “Rf” değerine bağlıdır.

Her bir madde farklı bir Rf değerine sahiptir. TLC sisteminin bileşenleri durgun faz olarak, silika jel, alümina ve selüloz absorbanlar ve hareketli faz olarak ta, çözücüden oluşur. Çalışma şekli şu şekilde gerçekleşir. Öncelikle madde çizgi doğrultusunda belirlenen konuma uygulanır ve daha sonra madde sahip olduğu polariteye bağlı olarak çözücüyle birlikte, belli bir mesafeye kadar yürür. Çözücü ile belli bir mesafeye yürüdüktan sonra, tabaka TLC bölmesinden alınarak çözücü uçurulur. Rf değeri aşağıdaki şekil yardımıyla bulunur.

Madde ayrımının nicel olarak belirlemek için UV gibi çeşitli detektörler kullanılabilir.



Şekil 20. Genel TLC çalışma işleyişi

Bu çalışmada kullanılan maddeler ^{14}C ile izotoptanmış maddeler olduklarından radyoaktiviteye hassas olan Berthold marka otomatik TLC linear analyzer kullanılmıştır. TLC sisteminde, çözücü buharlaşmasını önlemek için TLC bölmesi kapalı tutulmak zorundadır. Çözücü seçimi maddenin polaritesine bağlı olarak seçilir.

Tablo 5. Flavonoid türlerinin TLC bölmesinde kalma süreleri

Flavonoid türü	Deney türü	Çözücü sistemi	Kromotografi zamanı
Flavononlar Dihidroflavonollar 3-deoksiflavonoidler Lekoantosiyadinler	Enzim testi	C.A.W (Kloroform, Asetik asit, Su= 10 : 9 : 1)	~ 6 saat
Flavonollar	Bitki ekstraktları	C.A.W (Kloroform, Asetik asit, Su= 10 : 9 : 1)	~ 6 saat
Antosiyanidinler	Bitki ekstraktları	B.A.W (Butanol, Asetik asit, Su= 10 : 9 : 1)	~ 8 saat

2.2.4. Enzimatik Sentez İçin Enzim Hazırlanması

^{14}C ile etiketlenmiş naringenin ve dihidrokaemferolun sentezlenebilmesi için gerekli olan enzim süspansiyonları aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

2.2.4.1. Naringenin Sentezi İçin Enzim Hazırlanması

2.2.4.1.1. Kalkon Sentaz Enziminin Hazırlanması

Naringenin sentezinde *E. coli* içinde heterolojik olarak ifade edilmiş kalkon sentaz (CHS) kullanıldı. İlgili klonlar Dr. Schroeder (Freiburg üniversitesi) tarafından sağlanmıştır. 90 μL 1 OD kalacak şekilde gerekli *E. coli* peleti dondurucudan alınır. 80 μL 1 OD olmak üzere ekstraksiyon 0.2 M Tris/HCl (+ 1 mM EDTA, pH: 6.5) tampon çözeltisi ile süspanse edilir. 10 μL 1 OD olmak üzere gereken miktarda tampon eklenip vortekslenir ve her 5 dk'da vortekslenmek şartıyla 30 dk buzda bekletilir. 10.000 rpm ve 4 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 10 dk santrifüj edilip üst kısım alınır. Naringenin sentezi için gerekli olan CHS enzim ekstraktı gerçekleştirilmiş olur.

2.2.4.1.2. Kalkon İzomeraz Enziminin Hazırlanması

Gerekli sayıda kolon hazırlanır. Sephadex G-25 ile 1 cm'e kadar doldurulur. Su yardımıyla hız kontrolü yapıldıktan sonra, 0,05 M Tris/HCl 0,4% Askorbat pH:7,4 tamponu ile 5 kez yıkanarak kolon hazırlama aşaması tamamlanır. Bir Dahlia türü olan 5 gr Eurostar dondurucudan alınır ve üzerine 2,5 kuartz ve 2,5 gr poliklar eklenir. 25 ml tampon eklenir ve bitki parçaları öğütülerek süspansiyon haline getirilir. Plastik kapa aktarılan bu süspansiyon 10.000 rpm, 4 °C'de 10 dk santrifüj edilir ve üst kısım alınır.

2.2.4.2. Dihidrokaemferol Sentezi İçin Enzim Hazırlanması

2.2.4.2.1. Flavonon 3-Hidroksilaz Enziminin Hazırlanması

FHT *E. coli* peletleri, 80 µL 1 OD (1 OD 1.000.000.000 adsorbsiyon gösteren 1 ml medyum için bakteri miktarını gösterir) olmak üzere, 0,2 M Tris/HCl (pH: 7) tampon yardımıyla süspanse edilir. Bu aşamanın ardı sıra, 1 OD/10 µL lizozim'e karşı gelecek şekilde, lizozim çözeltisi (1 mg lizozim/1 ml ekstraksiyon tamponu) eklenir. Vortekslenerek ve her 5 dk'da vortekslenmek şartıyla 30 dk buzda bekletilir. Bu sürenin sonunda eppiler 10 dk 4 °C, 10.000 rpm'de santrifüjlenerek, faz ayrımı sağlanmış olur ve üst kısım alınır.

2.2.5. Enzimatik Sentezler

2.2.5.1. (¹⁴C) ile İzotoplanmış Naringenin'in Enzimatik Sentezi

*¹⁴C –Nar, Britisch ve Grisebach, 1985'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1.000 µL'lik karışım içinde;

400 µL Kalkon sentaz ekstraktı (*E. coli*'den)

5 µL Ham özüt (*Dahlia variabilis*, cv. Eurostar)

50 µL (¹⁴C)-malonil-CoA (15 nmol, 13 000 Bq)

50 µL p-koumaroyil-CoA (10 nmol)

450 µL 0,05 M Tris/HCl pH= 6,5

*Ham özüt *Dahlia* bitkisinin taç yapraklarından elde edilmiştir.

Öncelikle, hazırlanan eppilere ekleme şu sırayla gerçekleştirilir. İlk olarak tampon çözeltisi, ardı sıra CHS, *p*-koumaroyil-CoA ve ham özüt transfer edilir. En son olarak ta (¹⁴C) ile İzotoplanmış malonil-CoA eldiven yardımıyla eklenerek, reaksiyon başlatılır. Eppiler her 10 dk'da bir vortekslenmek şartıyla 37 °C'de 45 dk inkübe edilir. 50 µL HAc yardımıyla reaksiyon durdurulur. 400 µL EtOAc eklenip vortekslenir. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir ve üst fazlar bir balona alınarak, dönen buharlaştırıcı yardımıyla hacmi azaltılır. Bu son işlem 3 kez daha tekrarlanarak eppilerde bulunan bütün organik maddelerin organik kısma geçmesi sağlanır. En son buharlaştırma işlemi sonunda balon alınarak metanol yardımıyla organik kalıntılar 1,5 ml'lik eppendorf plastik tüpüne aktarılır. 5 µL'lik kısmı scintillation counter yardımıyla sahip olduğu radyoaktivitesi ölçülür ve 6500 dpm'lik kısmı TLC selüloz tabakaya uygulanarak saflık kontrolü yapılır. TLC çözücüsü olarak C.A.W kullanılır.

2.2.5.2. (¹⁴C) ile İzotoplanmış Dihidrokaemferol'un Enzimatik Sentezi

¹⁴C-DHK sentezi, ¹⁴C-NAR'ın C halkasının 3. pozisyonun, FHT enzimi yardımıyla hidroksillenmesi ile yapılır. Bu deney Britsch vd, 1992'nin değiştirilmiş haliyle gerçekleştirilir.

1.000 µL'lik karışım içinde:

2,19 nmol (¹⁴C) – Naringenin (5 030 Bq=300.000 dpm)

200 µL üst kısım (FHT ekstraktı)

50 µL 2-oksaglutarat (1 mg/ml H₂O)

50 µL 0,56 mg FeSO₄*7H₂O (0,56 mg/ml H₂O)

700 µL 0,1 M Tris / HCl + 0,4% Askorbat, pH: 7,5

¹⁴C ile izotoplanmış naringenin eppilerine, yukarıda belirtilen miktarlarda bileşenler konur ve reaksiyon, FeSO₄*7H₂O eklenmesiyle başlatılır. Her 5 dk'da bir vortekslenmek şartıyla 45 dk 30 °C'de inkübe edilen bu eppilere, reaksiyonları durdurmak için 50 µL HAc eklenir. 400 µL EtOAc eklenip vortekslenir ve 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Üst faz bir balona alınarak, dönen buharlaştırıcı yardımıyla hacmi azaltılır. Bu son işlem 3 kez daha tekrarlanarak eppilerde bulunan bütün organik maddelerin organik kısma geçmesi sağlanır. En son buharlaştırma işlemi sonunda balon alınarak metanol yardımıyla organik kalıntılar 1,5 ml'lik eppendorf plastik tüpüne aktarılır. 5 µL'lik kısmı scintillation counter

yardımıyla radyoaktivitesi ölçülür ve 6500 dpm'lik kısmı TLC selüloz tabakaya uygulanarak saflık kontrolü yapılır. TLC çözücüsü olarak C.A.W kullanılır.

2.2.5.3. (¹⁴C) ile İzotoplanmış Apigenin'in Enzimatik Sentezi

Her bir eppiye 100.000 dpm'lik naringenin transfer edilir. Üzerine sırasıyla 690 µL 0,1 M KPi-Tampon + %0.4 Askorbat (pH: 7,5) ve NADP⁺ çözeltisi eklenir. 50 µL Glukoz-6-fosfat çözeltisi eklendikten sonra 1:10 oranında seyretilmiş 10 µL Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eklenerek, NADPH oluşumu sağlanmış olunur. Reaksiyon bir Dahlia türü olan 200 µL'lik katzeldorf mikrozomlarıyla başlatılır.

(Not; NADP⁺, Glikoz-6-fosfat ve Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz, kullanmamızın sebebi NADPH'yi ucuz hale getirmektir. NADPH direk olarak kullanılabilir)

Eppiler dönen makinede 1 saat boyunca inkübe edilir. Bu süre sonunda, 50 µL HAc ile reaksiyon durdurulur. 400 µL EtOAc eklenir ve 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir ve üst fazlar bir balona alınarak, dönen buharlaştırıcı yardımıyla hacim azaltılır. Bu son işlem 3 kez daha tekrarlanarak eppilerde bulunan bütün organik maddelerin organik kısma geçmesi sağlanır. En son buharlaştırma işlemi sonunda balon alınarak metanol yardımıyla organik kalıntılar 1,5 ml'lik eppendorf plastik tüpüne aktarılır. 5 µL'lik kısmı scintillation counter yardımıyla sahip olduğu radyoaktivitesi ölçülür ve 6500 dpm'lik kısmı TLC selüloz tabakaya uygulanarak saflık kontrolü yapılır. TLC çözücüsü olarak C.A.W kullanılır.

2.2.5.4. (¹⁴C) ile İzotoplanmış Kaemferol'un Enzimatik Sentezi

100.000 dpm DHK her bir eppiye transfer edilir ve çözücü vakum desikatör yardımıyla uzaklaştırılır. 90 µL'lik üst kısım 1 OD'den kalmak üzere hesaplanan miktarda FLS *E. coli* pelletleri dondurucudan alınır ve 0,2 M KPi, pH:7 (80 µL / 1 OD) ile süspanse edilir. 10 µL/1 OD olmak üzere lizozim çözeltisi eklendikten sonra her 5 dk'da vortekslenmek şartıyla 30 dk buzda bekletilir. Bu sürenin bitimini takiben eppiler 4 °C, 10,000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir ve üst kısım alınır.

1.000 µL'lik karışım içinde;

(¹⁴C) –DHK (5 030 Bq 100.000 dpm)

200 µL Üst kısım

50 µL 2-oksaglutarat (1 mg /ml H₂O)

50 µL 0,56 mg FeSO₄*7H₂O (0,56 mg/ml H₂O)

700 µL 0,1 M KPi +0,4% Askorbat, pH:7,6

¹⁴C ile izotoplanmış DHK eppilerine, belirtilen miktarlarda ki bileşenler konur ve reaksiyon, FeSO₄*7H₂O ile başlatılır. Her 5 dk'da bir vortekslenmek şartıyla 30 °C'de 45 dk inkübe edilen bu eppilerdeki reaksiyonlar, 50 µL'lik HAc ile durdurulur. 400 µL EtOAc eklenip vortekslenir. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir ve üst fazlar balona alınarak, dönen buharlaştırıcı yardımıyla hacmi azaltılır. Bu son işlem 3 kez daha tekrarlanarak eppilerde bulunan bütün organik maddelerin organik kısma geçmesi sağlanır. En son buharlaştırma işlemi sonunda balon alınarak metanol yardımıyla organik kalıntılar, 1,5 ml'lik eppendorf plastik tüpüne aktarılır. 5 µL'lik kısmı scintillation counter yardımıyla sahip olduğu radyoaktivitesi ölçülür ve 6500 dpm'lik kısmı TLC selüloz tabakaya uygulanarak saflık kontrolü yapılır. TLC çözücüsü olarak C.A.W kullanılır.

2.2.5. Organik Sentez

2.2.5.1. (¹⁴C) ile İzotoplanmış İsolikuiritigenin'in Sentezi

¹⁴C –ISL sentezi, Nabaei ve Bannerjee,1990'da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1.03 µmol 4-hidroksi(halka-U-¹⁴C) benzaldehit (284 MBq/mmol) ve 4.11 µmol 2,4-dihidroksi asetofenon eppiye transfer edilir, hacim vakum desikatör yardımıyla azaltılır. Daha sonra 12 µL EtOH eklenir. 70 µL 60% KOH (60 g/100 g çözelti) karışımı eklendikten sonra, eppiler 5 gün, günde iki kez sallanmak şartıyla oda sıcaklığında bekletilirler. 5. gün sonunda 4 N HCl (pH:2) eklenerek renk değişimi gözlenir. ISL 4 kez 200 µL'lik EtOAc kullanılarak ayrılır. Daha sonra dönen buharlaştırıcı yardımıyla hacmi azaltılır ve TLC selüloz tabakaya aktarılır. Madde ayrımı %30 HAc'lik TLC çözeltisi ile ayrıldıktan sonra, spatül yardımıyla ISL toplanarak kolon kromatografisi ile saf hale getirilir ve en son olarak 5 µL'lik kısmı scintillation counter ile ölçülür.

2.2.6. Deneyler

2.2.6.1. F3'H Testi

Bu test Stotz vd, 1985'in değiştirilmiş şekliyle uygulanmıştır. Toplam hacim 100µL olmak üzere bileşenler;

Tablo 6. F3'H ve F3'5'H aktivite testinin bileşenleri

F3'H test bileşenleri

Substrat	6500 dpm (¹⁴ C) - Dihidrokaempferol
Protein ekstraktı	20 µL mikrozomal çözelti
Tampon	75 µL KPi + %4 Askorbat (pH:7,5)
Kofaktör	5 µL NADPH 10 mM; 0,83 mg / 100 µL s. su
Çözücü	CAW ya da % 15 HAc

Öncelikle substrat eppiye transfer edildikten sonra, çözücü vakum desikatör yardımıyla uzaklaştırılır. Ardından diğer bileşenler belirtilen miktarlarda eklenir. Reaksiyon NADPH eklenmesiyle başlatılır. Eppiler 30 °C'de 15 dk inkübe edildikten sonra, reaksiyon HAc eklenmesiyle durdurulur ve EtOAc ile organik faz ayrımı sağlanır. TLC selüloz tabakaya uygulanan organik fazlar, CAW ya da %15'lik HAc yardımıyla yürütülür. TLC tabakasındaki çözücü belli bir süre bekletilerek uçurulduktan sonra, Berthold marka otomatik TLC linear analyzer verim okutulur.

2.2.6.2. Optimum pH Deneyi

Her enzim aynı koşullar altında farklı substratlarla, belli bir pH değerinde, maksimum verim gösterir ve bu pH, o enzimin optimum pH'i olarak adlandırılır. Her substrat aynı enzimle olsa bile farklı bir optimum pH gösterebilir. Bazı enzimler pH'a karşı çok duyarlı olmadıklarından dolayı geniş bir pH aralığı gösterirken bazıları da, pH'a karşı aşırı duyarlı oldukları için küçük bir pH aralığı göstermektedirler. F3'H ve F3'5'H için optimum pH deneyi aşağıdaki gibi gerçekleştirilir.

Her bir tüpe, 6500 dpm'lık ^{14}C ile izotoplanmış substrat transfer edilir ve hacim vakum desikatör yardımıyla azaltılır. Bu aşamada, farklı pH'lardan oluşan tampon çözeltileri hazırlanır. Daha sonra sırasıyla, enzim, farklı pH'larda hazırlanmış tampon çözeltileri ve en son olarak da reaksiyonu başlatmak için NADPH eklenir. Karışım, 15 dk 30 °C'de inkübe edilir. Reaksiyon 10 μL HAc ile durdurulur ve 70 μL EtOAc eklenir. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst faz alınır ve TLC selüloz tabakasına uygulanır. En son aşama olarakta C.A.W çözücüsü yardımıyla maddeler ayrılır.

2.2.6.3. Optimum Sıcaklık Deneyi

Her enzim, aynı koşullar altında belli bir sıcaklıkta maksimum verim gösterir. Bu sıcaklık o enzimin optimum sıcaklığı olup, substratın cinsine değil enzime bağlıdır. Her enzim sadece bir optimum sıcaklık değerine sahiptir. F3'H ve F3'5'H için optimum sıcaklık deneyi aşağıdaki gibi gerçekleştirilir.

Her bir tüpe, 6500 dpm'lık ^{14}C ile izotoplanmış substrat transfer edilir ve vakum desikatör yardımıyla çözücü kısım uzaklaştırılır. Bu aşamada çeşitli sıcaklık değerlerindeki su banyoları hazırlanır ve daha sonrada sırasıyla önce enzim sonra tampon eklenir. Son olarak ta enzim katalizörü olarak NADPH eklenir ve farklı değerlerde ısıtılmış su banyolarına konur. 15 dk inkübe edildikten sonra, 10 μL HAc yardımıyla reaksiyonlar durdurulup, 70 μL 'lik EtOAc eklenir. Vorteksenerek 13.000 rpm'de santrifüj edilir. Üst kısım alınarak TLC selüloz tabaka üzerine uygulanır. C.A.W çözücüsü yardımıyla madde ayrımı sağlanmış olur ve otomatik TLC linear analyzer ile verim ölçülür.

2.2.6.4. Protein Duyarlılık Deneyi

Enzimler, belli bir miktardan sonra substratla reaksiyona girme eğilimlerini kaybederler. Enzimler belli bir miktara kadar substratlarla doğrusal olarak reaksiyona girer ve bu özellik enzim grafiklerine düz bir çizgiymiş gibi yansır. Belli bir noktadan sonra enzim miktarı ne kadar artılacak olursa olsun dönüşüm görülmez. F3'H ve F3'5'H için protein duyarlılık deneyi aşağıdaki gibi gerçekleştirilir.

Her eppiye 6500 dpm ^{14}C ile etiketlenmiş substrat transfer edilir ve vakum desikatör yardımıyla çözücü kısım uzaklaştırılır. Daha sonra, sırasıyla farklı miktarlarda enzim eklenir. Ardından, aynı pH değerindeki tampon eklenir ve son olarak da NADPH ilave

edilir. 15 dk aynı sıcaklıkta inkübe edildikten sonra, 10 µL HAc yardımıyla reaksiyon durdurup, 70 µL'lik EtOAc yardımıyla ekstrakte edilir. Üst kısım alınarak TLC selüloz tabakaya uygulanır. C.A.W çözücüsü yardımıyla madde ayrımı sağlanmış olur.

2.2.6.5. Sıcaklık Duyarlılık Deneyi

Enzimlerin sıcaklığa bağlı olarak enzim aktivitesinin nasıl değiştiğini görmek için sıcaklık duyarlılığı deneyi yapılır. Bütün enzimler belli bir sıcaklık değerinden (bu değer genellikle 40 °C'dir) sonra 3d yapılarını kaybettikleri için enzimler reaksiyon verme yeteneğini kaybederler. F3'H ve F3'5'H için sıcaklık duyarlılığı deneyi aşağıdaki gibi gerçekleştirilir (Not; ortam koşulları optimum olmak zorundadır).

Her eppiye 6500 dpm ¹⁴C ile etiketlenmiş substrat transfer edilir ve vakum desikatör yardımıyla çözücü kısım uzaklaştırılır. Bu aşamada değişik sıcaklık aralıklarında su banyoları hazırlanır. Eppilere, enzim ve tampon eklenir ve 15 dk için değişik sıcaklık aralıklarına konur. Bu süre sonunda eppiler su banyolarından alınarak 3 dk için buzda bekletilir ve ardından NADPH eklenerek reaksiyon başlatılır. 15 dk optimum sıcaklıkta bekletilir. Bu süreyi takiben 10 µL HAc yardımıyla reaksiyon durdurup, 70 µL'lik EtOAc yardımıyla ekstrakte edilir. Üst kısım alınarak TLC selüloz tabakaya uygulanır. C.A.W çözücüsü yardımıyla madde ayrımı sağlanmış olur.

2.2.6.6. Zaman Kararlılık Deneyi

Bu deney zamanla, reaktantın ürüne dönüşümü göstermek için yapılır. Bu deney optimum koşullar altında gerçekleştirilir.

Her eppiye 6500 dpm ¹⁴C ile etiketlenmiş substrat transfer edilir ve vakum desikatör yardımıyla çözücü kısım uzaklaştırılır. Daha sonra enzim, tampon ve NADPH eklenir ve değişik zaman aralıklarında su banyosuna konur. Her bir süre sonunda eppiler banyolardan alınarak 10 µL HAc yardımıyla reaksiyon durdurup, 70 µL'lik EtOAc eklenir ve vortekslenir. 3 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanmış olur. Üst kısım alınarak TLC selüloz tabakaya uygulanır. C.A.W çözücüsü yardımıyla madde ayrımı sağlanmış olur.

2.2.6.7. Kinetik Deney

Bu deneyin yapılmasının amacı, bir enzimin substrat üzerindeki aktivitesinin incelenmesi için gerekli olan ve enzimin substrata karşı ilgisini gösteren K_m ve V_{max} değerlerini bulmak içindir. Gerekli sonuçlar bulunduktan sonra ilgili Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri bulunur. F3'H ve F3'5'H için bu deney aşağıdaki gibi gerçekleştirilir.

Her bir eppiye, 6500 dpm'lik ^{14}C ile isotoplamaş substuratu ile belli miktarlarda soğuk substrat eklenir ve hacim vakum desikatör yardımıyla azaltılır. Daha sonra sırasıyla, enzim, tampon ve reaksiyonu başlatmak için NADPH eklenir. 15 dk 30 °C'de inkübe edilir ve reaksiyon, 10 µL HAc ile durdurulur ve 70 µL EtOAc eklenir. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Üst faz alınarak ve TLC selüloz tabakaya uygulanır ve en son aşama olarak C.A.W çözücüsü yardımıyla madde ayırımı sağlanmış olunur.

2.2.6.8. Protein Tayin Deney

Bu deney Lowry vd, 1951 testinin Sandermann, 1972 tarafından yeniden düzenlenmiş haliyle gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli miktarlardaki enzimler, eppilere transfer edilir ve hacim saf su ile 600 µL'e tamamlanır. Ardından, 5 µL 2% sodyum deoksikolat eklendikten sonra vortekslenip 15 dk bekletilir. 200 µL 24% triklor asetik asit eklenir ve tekrar 15 dk bekletildikten sonra, oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Üst kısmı uzaklaştırılan eppilere 1 ml çözelti-1'den eklenir ve 15 dk oda sıcaklığında bekletilir. Bu sürenin bitimini takiben 100 µL Folin Ciocalteus reagens (1:1 oranında su) eklenir. Eppiler, rengin sarıdan maviye dönmesi için 45 dk karanlıkta bekletilir. Son aşama olarak uv spektrofotometre yardımıyla adsorbsiyon ölçülür ve 10 µL enzim çözeltisindeki µg protein miktarı bulunur.

Not. Standart doğru için BSA kullanılır. BSA için deney, yukarıdaki prosedürün aynısı uygulanarak gerçekleştirilir. (0 µL (a), 10 µL (b), 20 µL (c), 30 µL (d), 40 µL (e) ve 50 µL (f) * 3 kez)

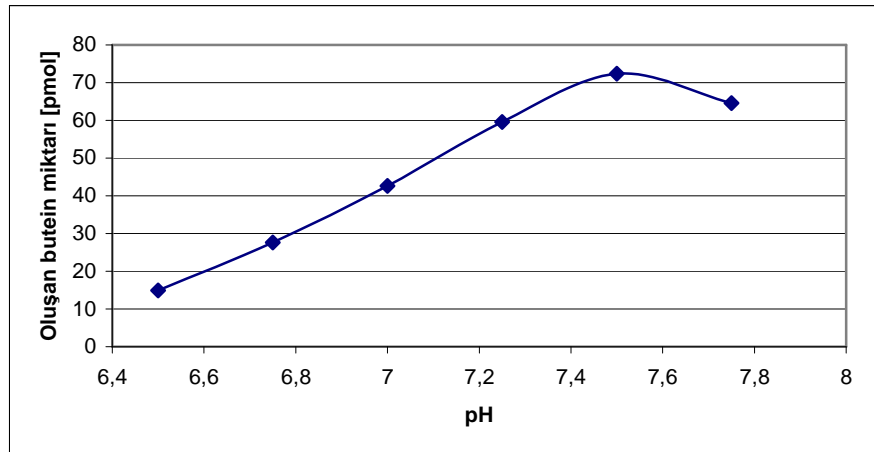
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Kinetik Bulgular

3.1.1. *Tagetes Erecta* (F3'H)

3.1.1.1. Optimum pH

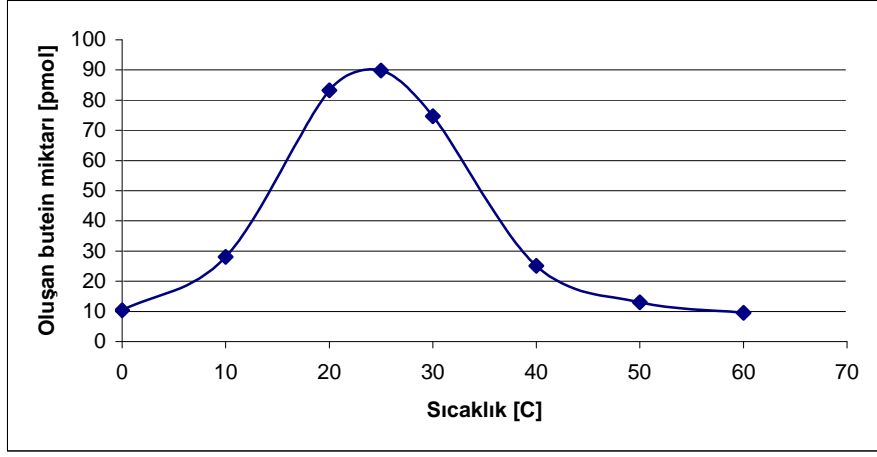
Bu deney normal F3'H testinden farklı olarak değişik pH'larda tampon kullanılarak yapılmıştır. pH'sı 6,5 ile 8 aralığındaki tamponlar hazırlanarak uygulanmıştır. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak, *Tagetes erecta*'nın optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 21. *Tagetes erecta* F3'H enziminin ISL ile pH'ya bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.1.2. *Tagetes Erecta* (F3'H) Optimum Sıcaklık

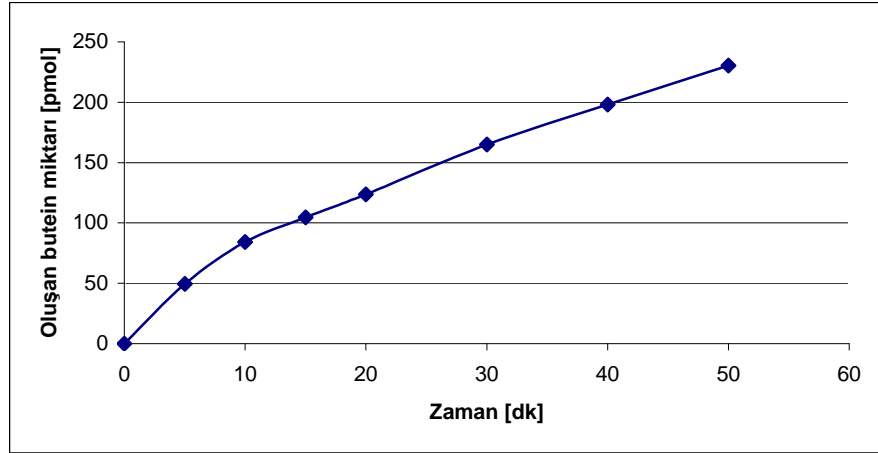
F3'H testinin bekletme işleminin farklı sıcaklık değerleri kullanılarak uygulanmıştır. Sıcaklığı 0 ile 60 °C aralığındaki su banyoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Tagetes erecta* F3'H için optimum sıcaklık değeri 25 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 22. *Tagetes erecta* F3'H enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.1.3. *Tagetes Erecta* (F3'H) Zaman Duyarlığı

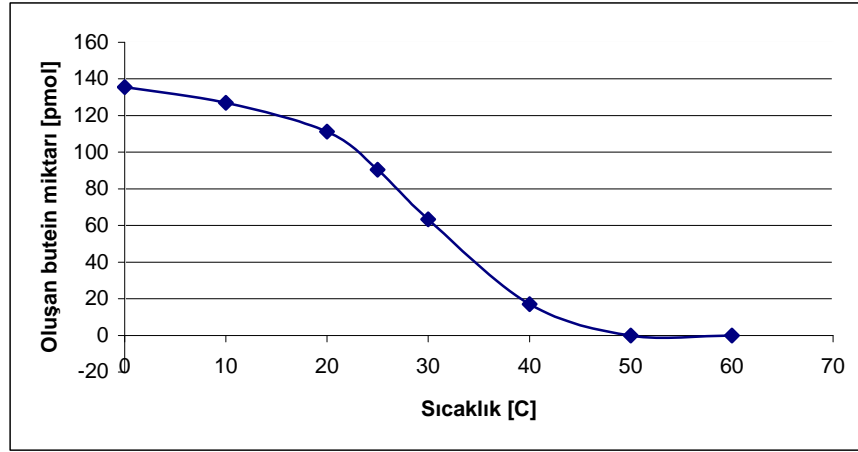
F3'H aktivite testinin bekleme aşamasının farklı zaman aralıkları seçilerek uygulanmıştır. Bekleme için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 dk süreleri seçilmiştir. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Tagetes erecta* F3'H için 50 dk'ya kadar oluşan ürünün zamanla ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 23. *Tagetes erecta* F3'H enziminin zamana bağlı olarak ISL ile oluşan ürün miktarları

3.1.1.4. *Tagetes Erecta* (F3'H) Sıcaklık Duyarlılığı

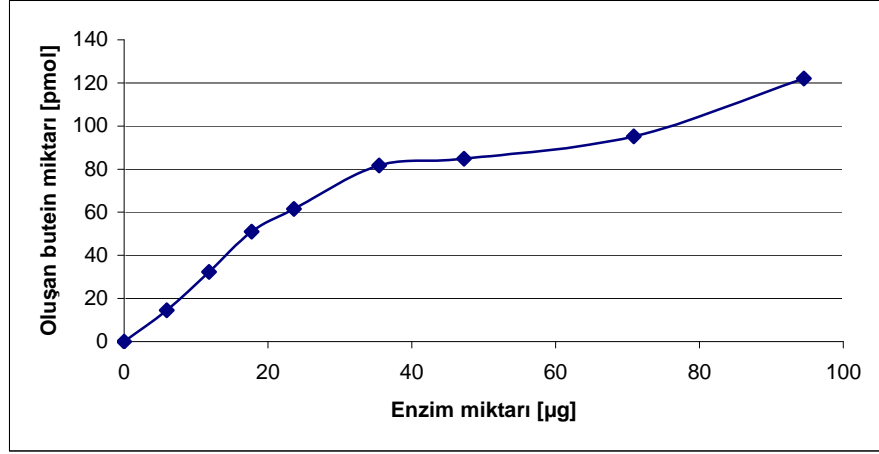
F3'H aktivite deneyinden farkı, enzimin önceden çeşitli sıcaklık değerlerinde bekletilmesidir. Sıcaklık değerleri olarak 0, 10, 20, 25, 30, 40, 50 ve 60 °C seçilmiş ve 15 dk bu sıcaklıklarda bekletilmişlerdir. Bu sürenin ardından, eppiler aynı sıcaklık değerinde olmaları için 3 dk buzda bekletilmiş ve normal test uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak ölçülmüş ve 40 °C ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde protein denatürasyonuna dolayı verimin gittikçe düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 24. *Tagetes erecta* F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite

3.1.1.5. *Tagetes Erecta* (F3'H) Protein Duyarlılığı

0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 µL değerlerinde enzim kullanarak ve normal F3'H testin aynısı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. otomatik TLC linear analyzer kullanılarak verim ölçülmüş ve 35 µg'a kadar substratla enzim arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

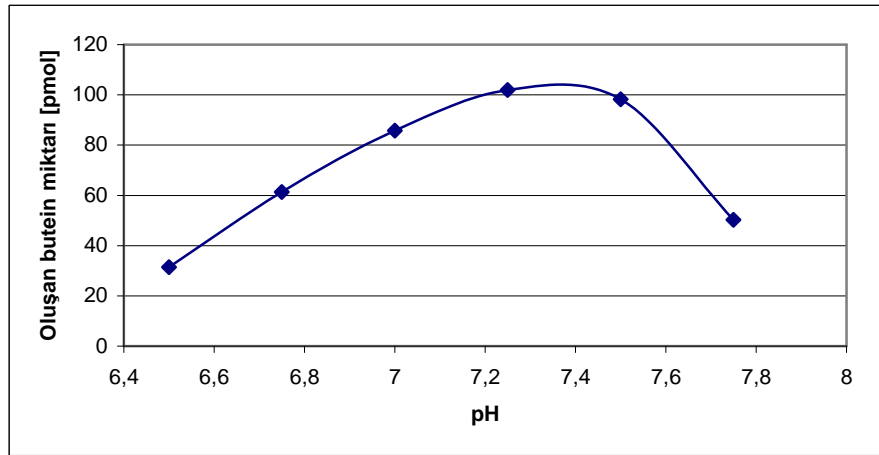


Şekil 25. *Tagetes erecta* F3'H enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.2. *Arabidopsis Thaliana* (F3'H)

3.1.2.1. *Arabidopsis Thaliana* (F3'H) Optimum pH

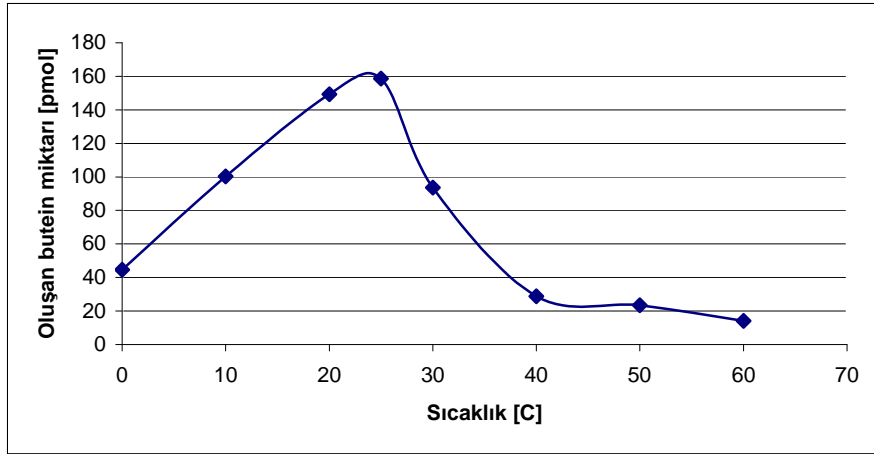
Bu deney normal F3'H testinden farklı olarak değişik pH'larda tampon kullanılarak yapılmıştır. pH'sı 6,5 ile 8 aralığındaki tamponlar hazırlanarak uygulanmıştır. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak, *Arabidopsis thaliana*'nın optimum pH'sı 7,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 26. *Arabidopsis thaliana* F3'H enziminin İSL ile pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.2.2. *Arabidopsis Thaliana* (F3'H) Optimum Sıcaklık

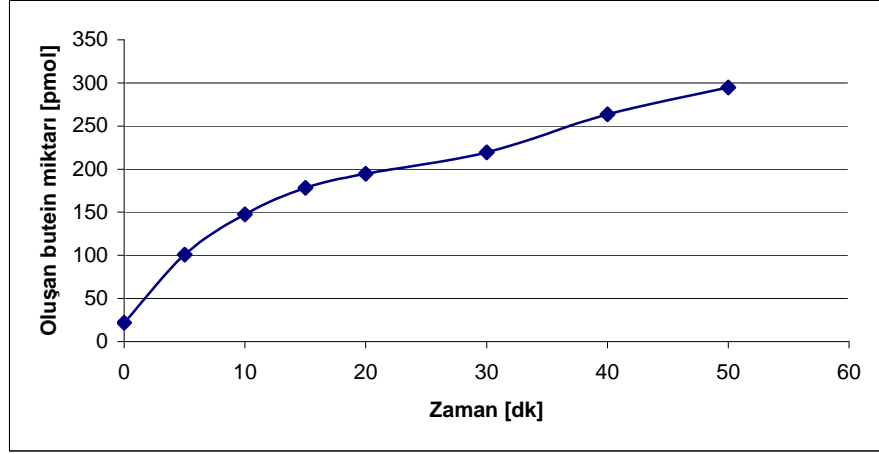
F3'H testinin dinlendirilmesinin farklı sıcaklık değerleri kullanılarak uygulanmıştır. Sıcaklık aralığı 0 ile 60 °C aralığındaki su banyoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Arabidopsis thailana* için optimum sıcaklık değeri 25 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 27. *Arabidopsis thailana* F3'H enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.2.3. *Arabidopsis Thaliana* (F3'H) Zaman Kararlığı

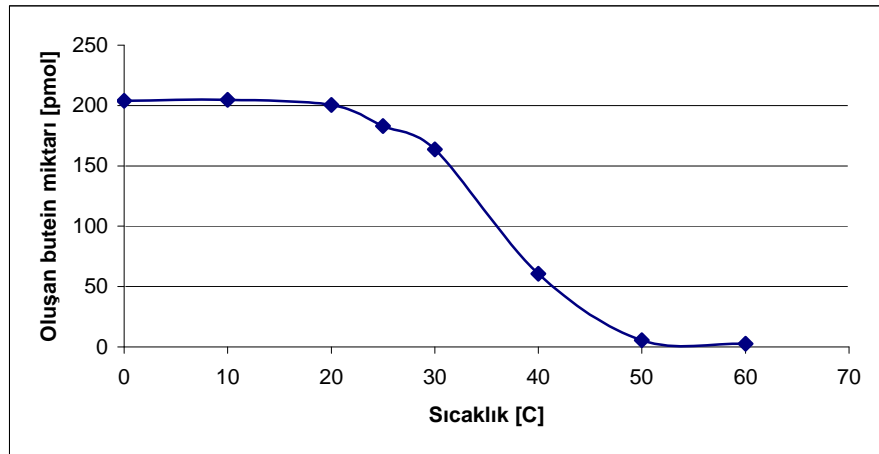
F3'H aktivite tayin testinin bekletme aşamasının farklı zaman aralıkları seçilerek uygulanmıştır. Bekletme için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 dk süreleri seçilmiştir. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Arabidopsis thailana* F3'H için 50 dk'ya kadar oluşan ürünün zamanla ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 28. *Arabidopsis thailana* F3'H enziminin zamana bağlı olarak İSL ile oluşan ürün miktarları

3.1.2.4. *Arabidopsis Thaliana* (F3'H) Sıcaklık Duyarlılığı

F3'H aktivite deneyinden farkı, enzimin önceden farklı sıcaklık değerlerinde bekletilmesidir. Sıcaklık değerleri olarak 0, 10, 20, 25, 30, 40, 50 ve 60 °C seçilmiş ve 15 dk bu sıcaklıklarda bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, eppiler aynı sıcaklık değerinde olmaları için 3 dk buzda bekletilmiş ve normal test uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak ölçülmüş ve 40 °C ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde protein denatürasyondan dolayı verimin gittikçe düştüğü belirlenmiştir.

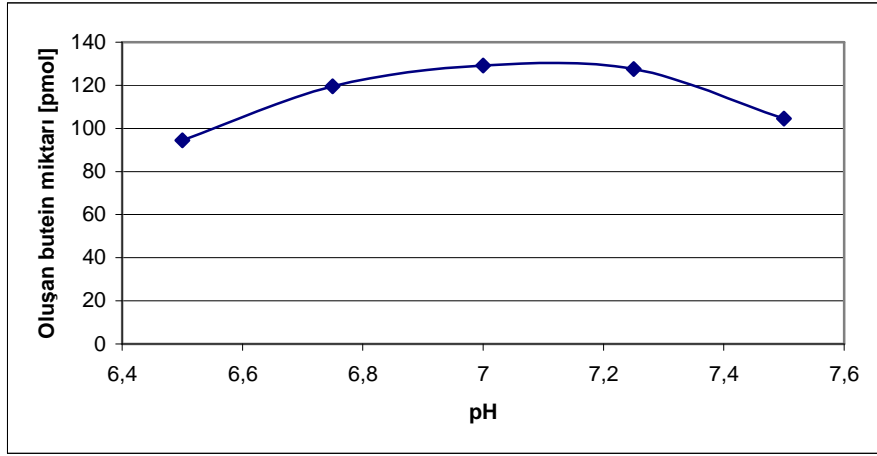


Şekil 29. *Arabidopsis thailana* F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite

3.1.3. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1))

3.1.3.1. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1)) Optimum pH

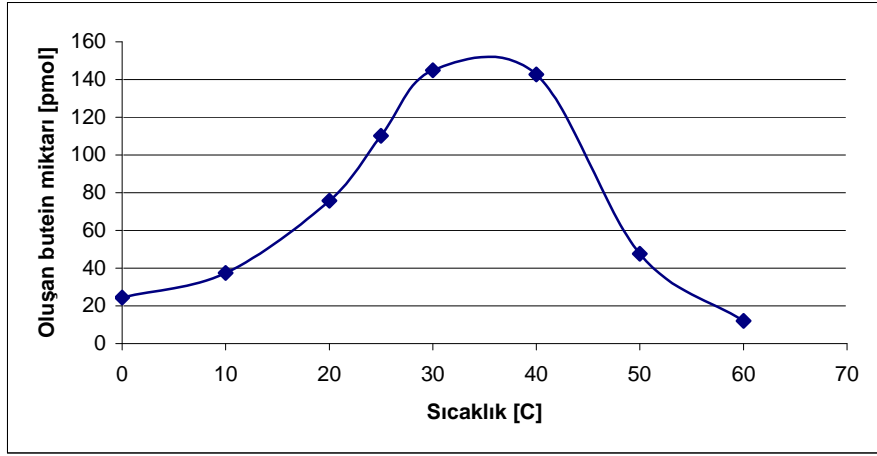
Bu deney normal F3'H testinden farklı olarak değişik pH'larda tampon kullanılarak yapılmıştır. pH'sı 6,5 ile 7,5 aralığındaki tamponlar hazırlanarak uygulanmıştır. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak, *Echinops bannaticus* F3'5'H (1)'nin optimum pH'sı 7,1 olarak bulunmuştur.



Şekil 30. *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) enziminin ISL ile pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.3.2. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1)) Optimum Sıcaklık

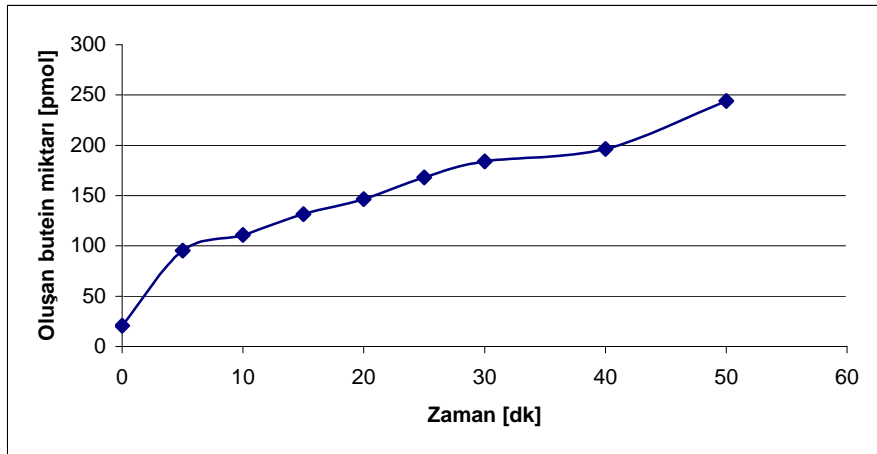
F3'H testinin bekletme aşamasının farklı sıcaklık değerleri kullanılarak uygulanmıştır. Sıcaklığı 0 ile 60 °C aralığındaki su banyoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) için optimum sıcaklık değerinin 34 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 31. *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.3.3. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1)) Zaman Kararlığı

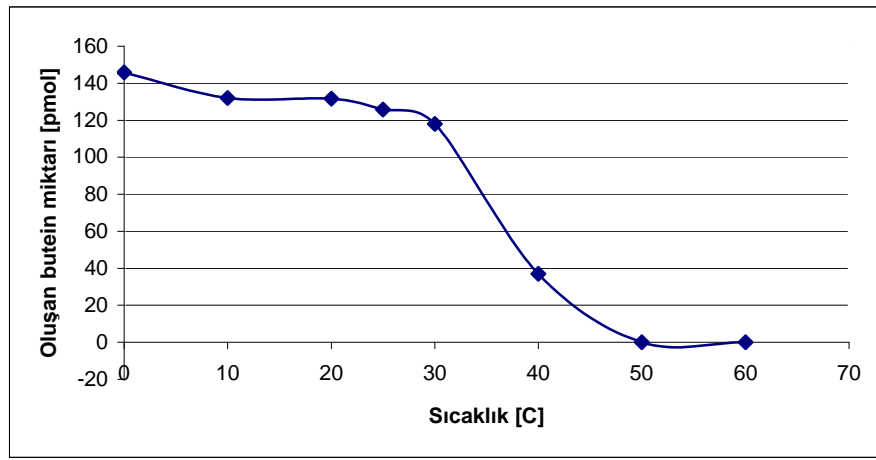
F3'H aktivite tayin testinin bekleme aşamasının farklı zaman aralıkları seçilerek uygulanmıştır. Bekleme için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 dk süreleri seçilmiştir. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) için 50 dk'ya kadar oluşan ürünün zamanla ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 32. *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) enziminin zamana bağlı olarak ISL ile oluşan ürün miktarları

3.1.3.4. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1)) Sıcaklık Duyarlılığı

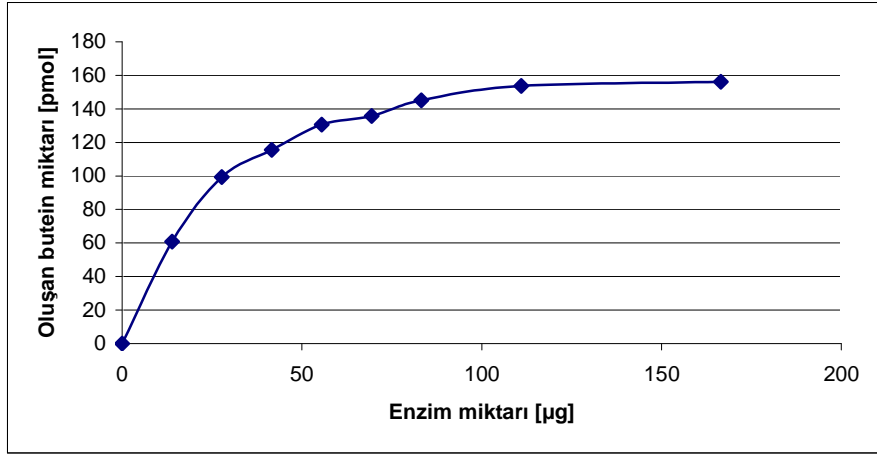
F3'H aktivite deneyinden farkı, enzimin önceden çeşitli sıcaklık değerlerinde bekletilmesidir. Sıcaklık değerleri olarak 0, 10, 20, 25, 30, 40, 50 ve 60 °C seçilmiş ve 15 dk bu sıcaklıklarda bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, eppiler aynı sıcaklık değerinde olmaları için 3 dk buzda bekletilmiş ve normal test uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak ölçülmüş ve 40 °C ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde protein denatürasyonuna bağlı olarak verimin gittikçe düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 33. *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktivite

3.1.3.5. *Echinops Bannaticus* (F3'5'H(1)) Protein Duyarlılığı

0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 µL değerlerinde enzim kullanılarak ve normal F3'H testin aynısı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. otomatik TLC linear analyzer kullanılarak verim ölçülmüş ve 40 µg'a kadar substrat arasında bir ilişkinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

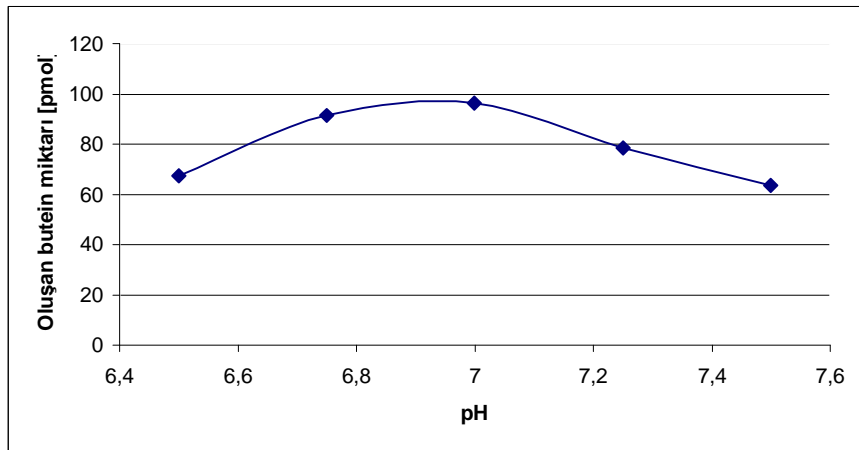


Şekil 34. *Echinops bannaticus* F3'5'H (1) enziminin İSL ile protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.4. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3))

3.1.4.1. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3)) Optimum pH

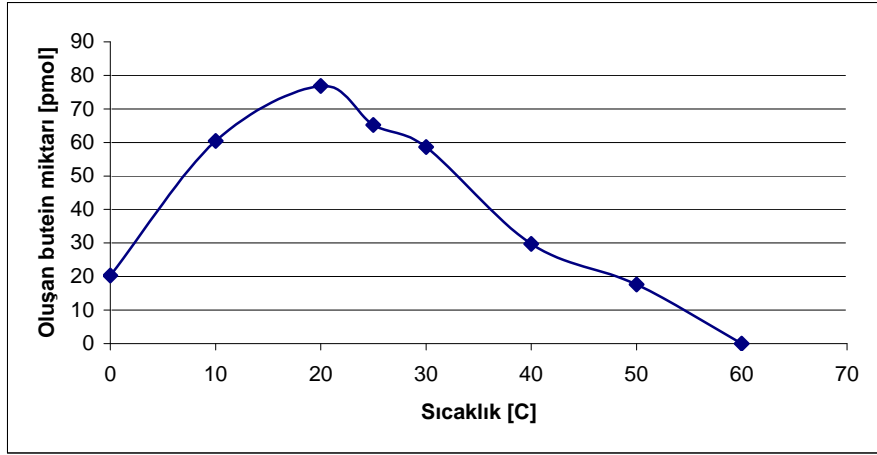
Bu deney normal F3'H testinden farklı olarak değişik pH'larda tampon kullanılarak yapılmıştır. pH'sı 6,5 ile 7,5 aralığındaki tamponlar hazırlanarak uygulanmıştır. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) için optimum pH'in 7 olduğu bulunmuştur.



Şekil 35. *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) enziminin İSL ile pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.4.2. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3)) Optimum Sıcaklık

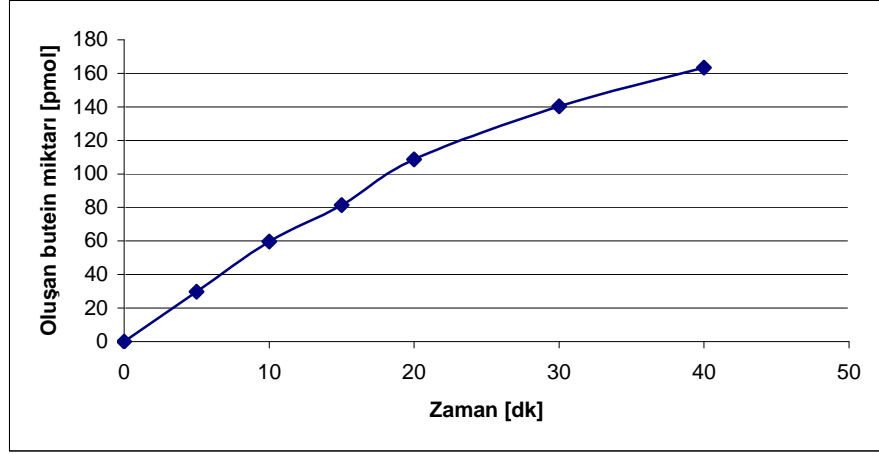
F3'H testinin bekletme işleminin farklı sıcaklık değerleri kullanılarak uygulanmıştır. Sıcaklığı 0 ile 60 °C aralığındaki su banyoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verim takibinde otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) için optimum sıcaklık değeri 20 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 36. *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) enziminin ISL ile sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.4.3. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3)) Zaman Kararlığı

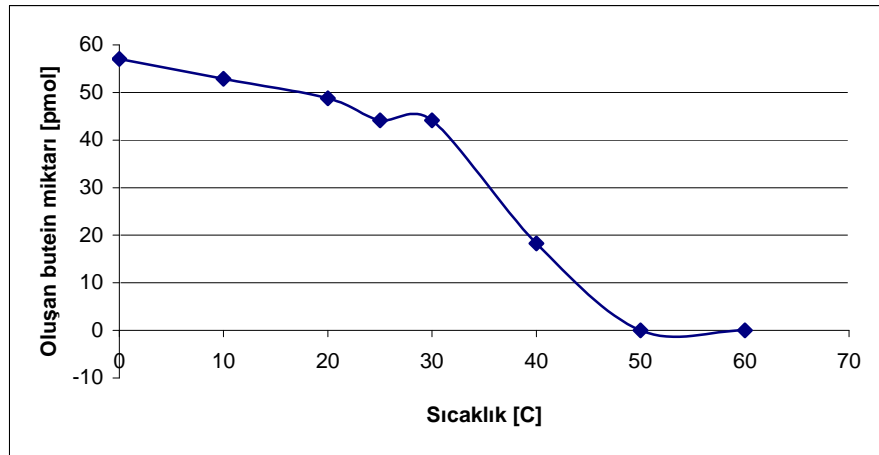
F3'H aktivite tayin testinin bekletme aşamasının farklı zaman aralıkları seçilerek uygulanmıştır. Bekletme için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 dk süreleri seçilmiştir. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) için 30 dk'ya kadar oluşan ürünün zamanla ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 37. *Sollya heterophylla* F3'5'H(3) enziminin zamana bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.4.4. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3)) Sıcaklık Duyarlılığı

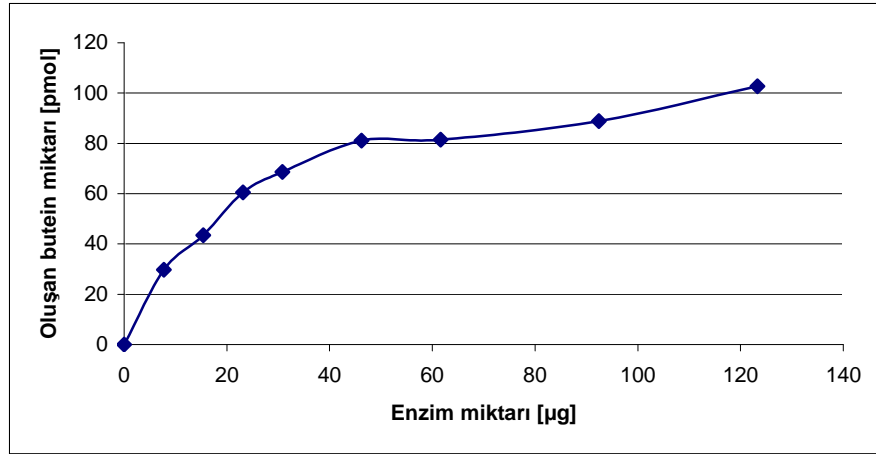
F3'H aktivite deneyinden farkı, enzimin önceden çeşitli sıcaklık değerlerinde bekletilmesidir. Sıcaklık değerleri olarak 0, 10, 20, 25, 30, 40, 50 ve 60 °C seçilmiş ve 15 dk bu sıcaklıklarda bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, eppiler aynı sıcaklık değerinde olmaları için 3 dk buzda bekletilmiş ve normal test uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak ölçülmüş ve 40 °C ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde protein denatürasyondan dolayı verimin gittikçe düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 38. *Sollya heterophylla* F3'5'H(3) enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktiviteleri

3.1.4.5. *Sollya Heterophylla* (F3'5'H(3)) Protein Duyarlığı

0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 μL değerlerinde enzim miktarları kullanarak ve normal F3'H testin aynısı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Otomatik TLC linear analyzer kullanarak verim ölçülmüş ve 40 μg 'a kadar substrat arasında bir ilişkinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

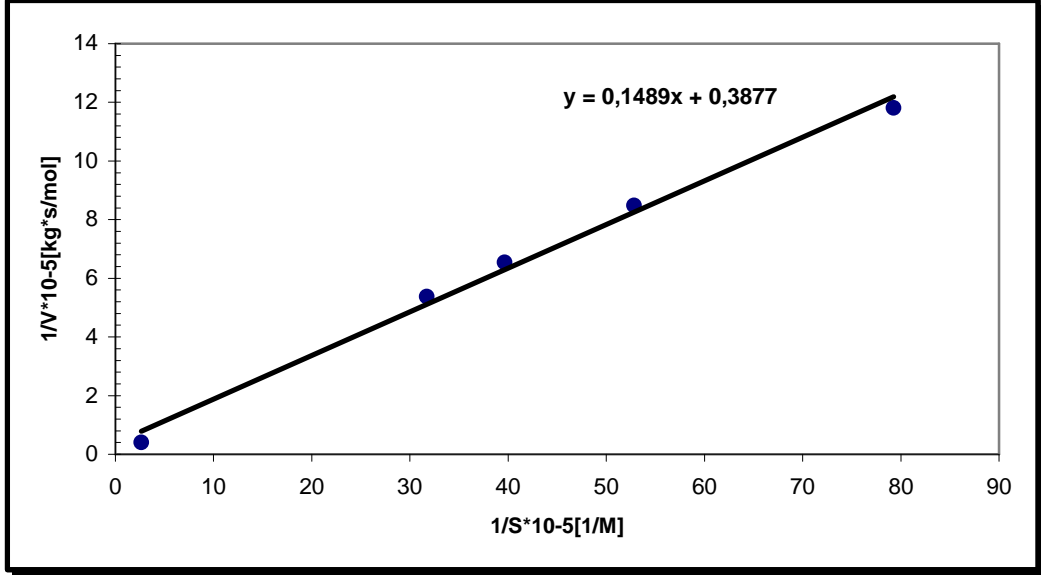


şekil 39. *Sollya heterophylla* F3'5'H(3) enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.4.6. *Sollya Heterophylla* İçin Kinetik alışmalar

3.1.5.4.1. Isolikuiritigenin Substrat Olarak Enzim Kinetiği

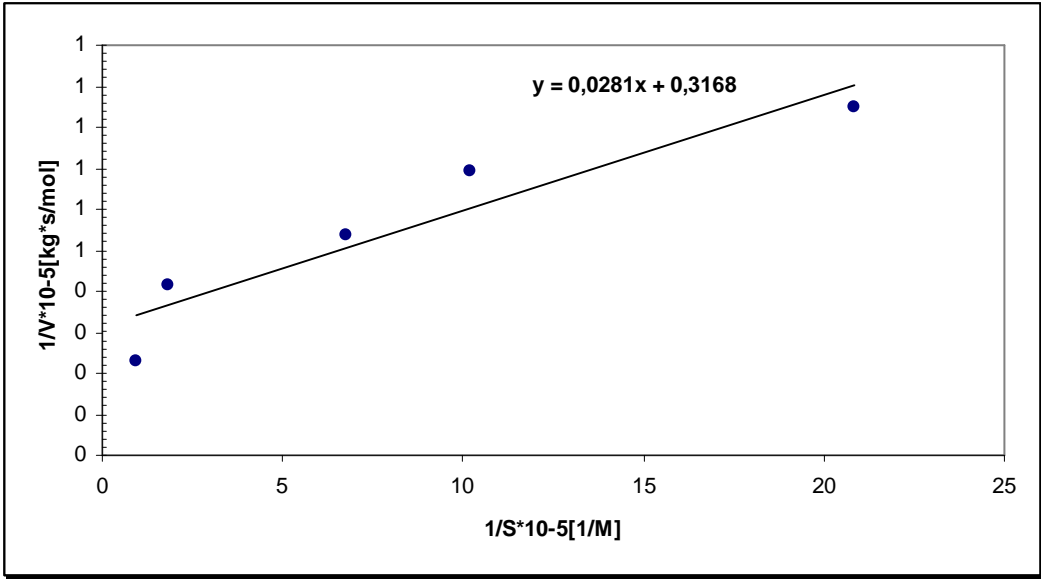
Çeşitli miktarlarda substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. K_m değeri $3,75\mu\text{M}$ ve V_{max} değeri ise $2,58\ \mu\text{kat/kg}$ olarak bulunmuştur. V_{max}/K_m değeri 6,88 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 40. *Sollya heterophylla* F3'5'H(3) enziminin isolikuiritigenin substrat olarak kinetiği

3.1.4.6.2. Kaemferol Substrat Olarak Enzim Kinetiği

Çeşitli miktarlarda substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Km değeri $0,88 \mu\text{M}$ ve Vmax değeri ise $3,15 \mu\text{kat}/\text{kg}$ olarak bulunmuştur. Vmax/Km değeri $35,79$ olduğu tespit edilmiştir.

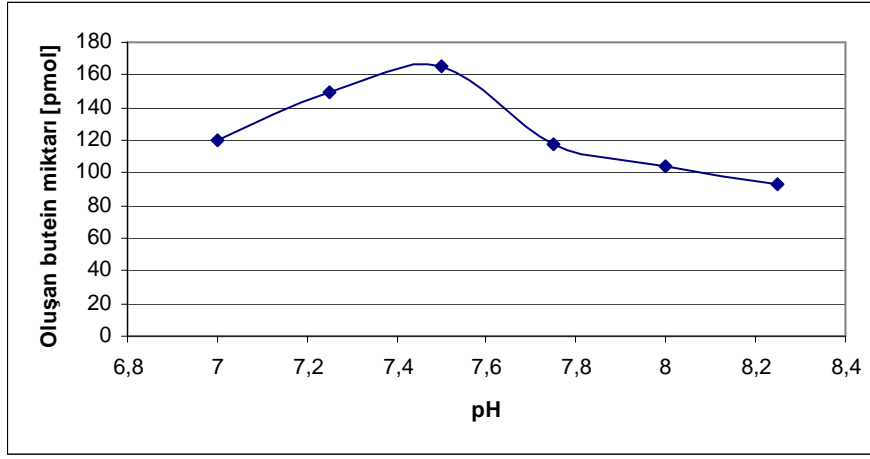


Şekil 41. *Sollya heterophylla* F3'5'H(3) enziminin kaemferol substrat olarak kinetiği

3.1.5. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak)

3.1.5.1. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak) Optimum pH

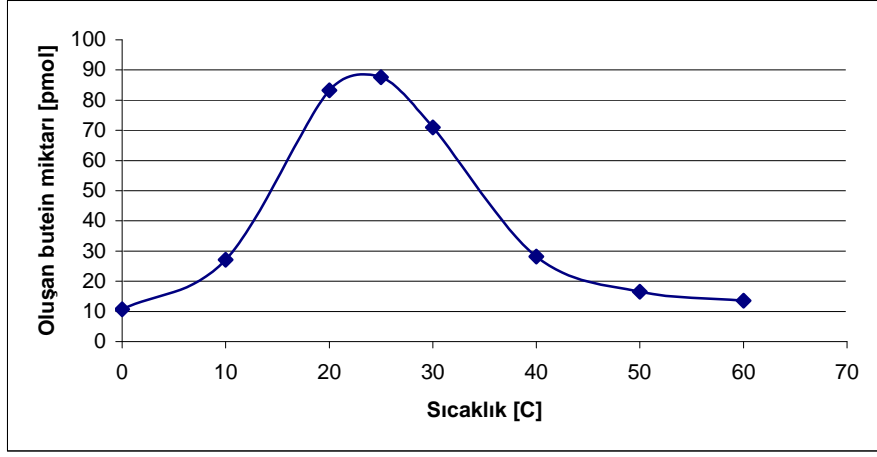
Bu deney normal F3'H testinden farklı olarak tamponun farklı pH değeri kullanılarak yapılmıştır. pH aralığı 6,5 ile 8,25 aralığındaki tamponlar hazırlanarak uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Rudbeckia hirta* F3'H için optimum pH'in 7,5 olduğu bulundu.



Şekil 42. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin pH'e bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.5.2. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak) Optimum Sıcaklık

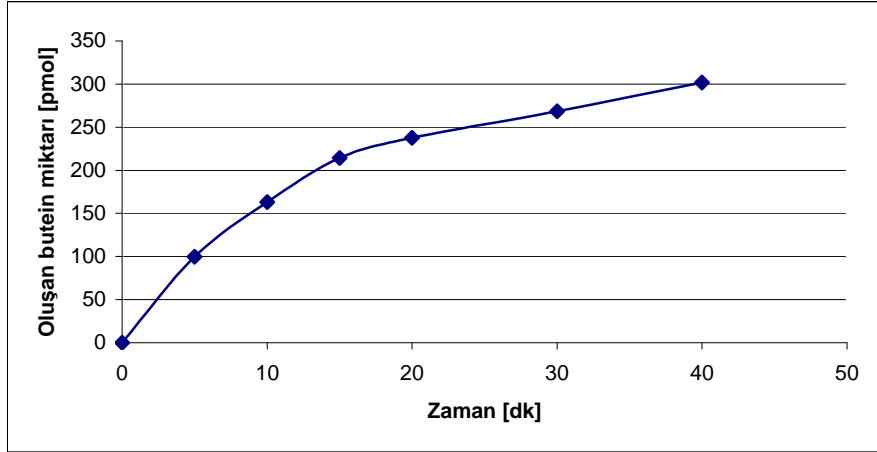
F3'H testinin inkübasyonun farklı sıcaklık değerleri kullanılarak uygulanmıştır. Sıcaklık aralığı 0 ile 60 °C aralığındaki su banyoları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verim takibi otomatik TLC linear analyzer kullanılarak *Rudbeckia hirta* F3'H için optimum sıcaklık değerinin 25 °C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 43. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin sıcaklığa bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.5.3. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak) Zaman Kararlılığı

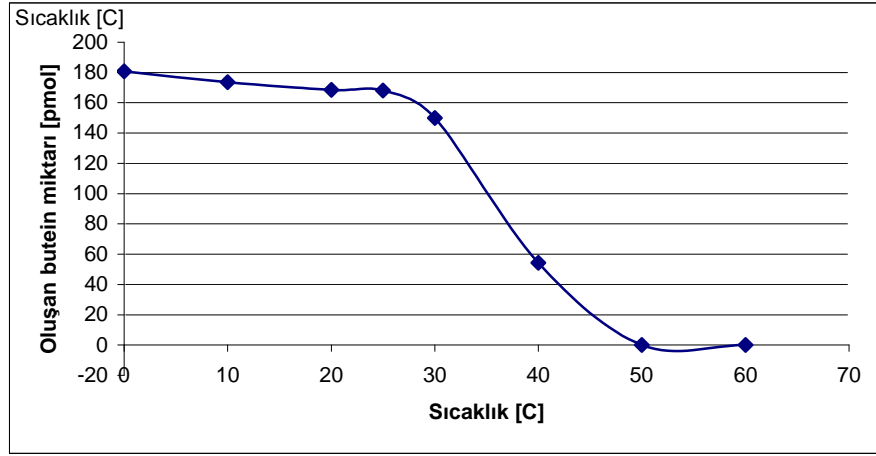
F3'H aktivite tayin testinin dinlendirilmesinin farklı zaman aralıkları seçilerek uygulanmasıdır. Zaman aralıkları 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 dk süreleri seçilmiştir. Verim otomatik TLC linear analizler kullanılarak *Rudbeckia hirta* F3'H 15 dk'ya oluşan ürünün zamanla ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.



Şekil 44. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin zamana bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.5.4. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak) Sıcaklık Duyarlılığı

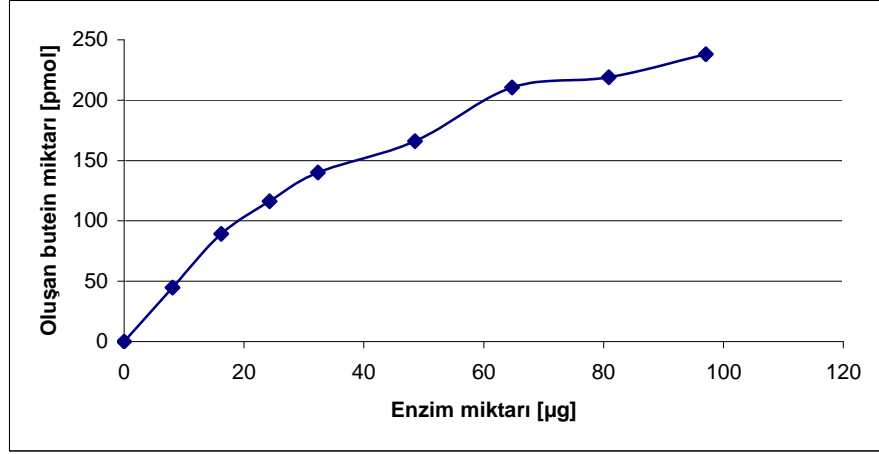
F3'H aktivite deneyinden farkı, enzimin önceden çeşitli sıcaklık değerlerinde bekletilmesidir. Sıcaklık değerleri olarak 0, 10, 20, 25, 30, 40, 50 ve 60 °C seçilmiş ve 15 dk bu sıcaklıklarda bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, eppiler aynı sıcaklık değerinde olmaları için 3 dk buzda bekletilmiş ve normal test uygulanmıştır. Verim otomatik TLC linear analyzer kullanılarak ölçülmüş ve 40 °C ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde protein denatürasyonundan dolayı verimin gittikçe düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 45. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin sıcaklığa karşı gösterdiği aktiviteleri

3.1.5.5. *Rudbeckia Hirta* (F3'H – Kozak) Protein Duyarlılığı

0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ve 50 µl değerlerinde enzim kullanılarak ve normal F3'H testin aynısı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Otomatik TLC linear analyzer kullanılarak verim ölçülmüş ve 70 µg'ye kadar substrat ile arasındaki bir ilişkinin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

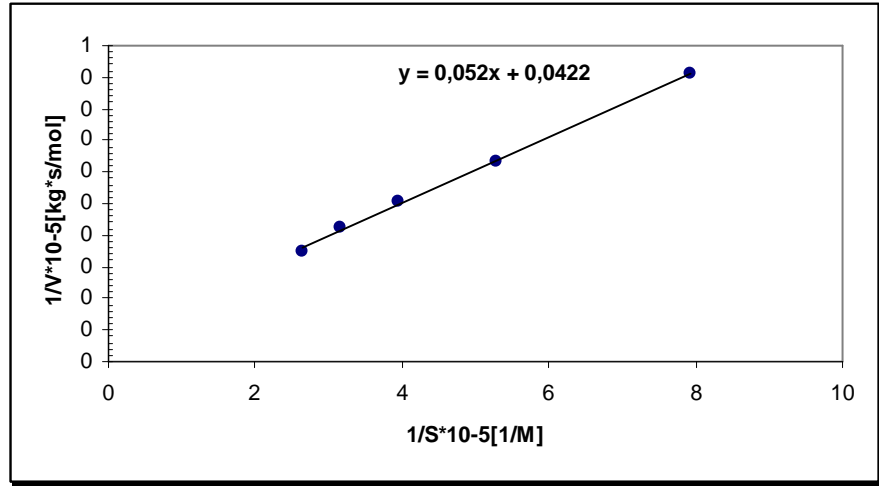


Şekil 46. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin protein miktarına bağlı olarak oluşan ürün miktarları

3.1.5.6. *Rudbeckia Hirta* için Kinetik Çalışmalar

3.1.5.6.1. Isolikuiritigenin Substrat Olarak Enzim Kinetiği

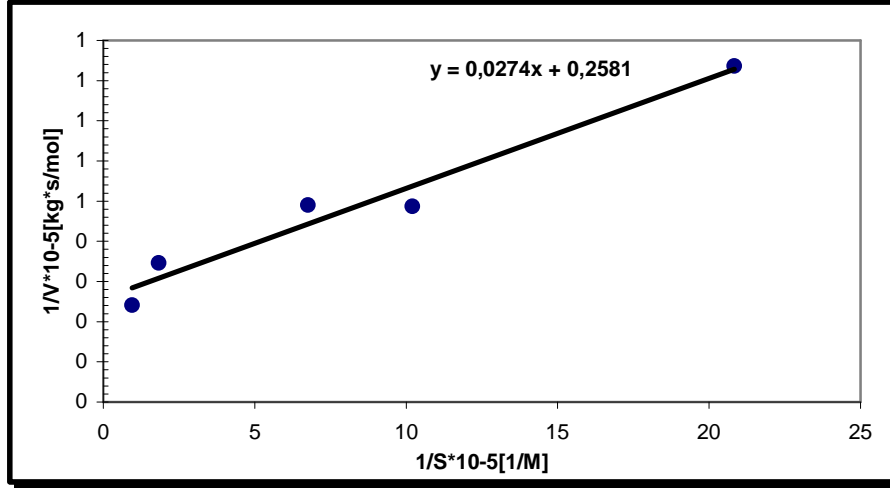
Çeşitli miktarlarda substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Km değeri 12,3 µM ve Vmax değeri ise 23,80 µkat/kg olarak bulunmuştur. Vmax/Km değeri 19,34 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 47. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin İSL ile kinetiği

3.1.5.6.2. Kaemferol Substrat Olarak Enzim Kinetiği

Çeşitli miktarlarda substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Km değeri 1,06 μM ve Vmax değeri ise 3,87 $\mu\text{kat/kg}$ olarak bulunmuştur. Vmax/Km değeri 36,509 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 48. *Rudbeckia hirta* F3'H enziminin kaemferol substrat olarak kinetiği

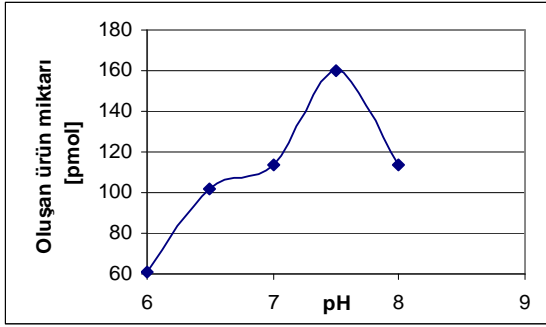
3.2. Substrat İlgileri

Tablo 7. Çeşitli süs bitkilerinden klonlanan F3'H ve F3'5'H enzimlerinin substratlara karşı olan ilgileri

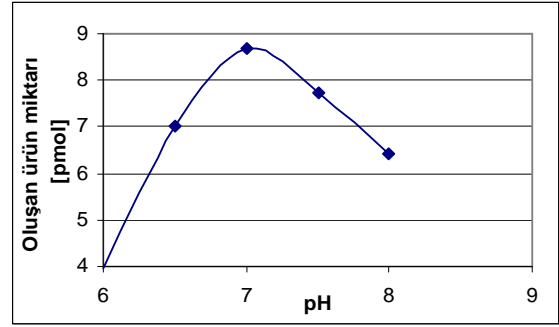
	Enzim adı	Naringenin	Dihidrokaempferol	Kaempferol	Apigenin	ISL
1-	Gerbera Hybrida F3'H	+++	+++	+++	++	-
2-	Gerbera Hybrida F3'H (8)	+++	+++	+++	-	-
3-	Gerbera Hybrida F3'H (9)	+++	+++	+++	++	-
4-	Dahlia CN F3'H	+++	+++	+++	+	+
5-	Tagetes erecta F3'H	+++	+++	+++	++	++
6-	Echinops F3'H (1)	+++	+++	+++	++	-
7-	Echinops F3'H (6)	+++	+++	+++	++	+
8-	Echinops F3'5'H (1)	+++	+++	+++	++	++
9-	Echinops F3'5'H (6)	+++	+++	+++	++	-
10-	Wegvarte F3'H	+++	+++	T.E.	T.E.	-
11-	Wegvarte F3'5'H (4)	+++	+++	+++	++	-
12-	Kornblume F3'H	+++	+++	T.E.	T.E.	-
13-	Kornblume F3'H (27)	+++	+++	+++	++	-
14-	Arabidopsis F3'H	+++	+++	+++	++	++
15-	Osteospermum F3'H (11)	+++	+++	+++	+++	-
16-	Osteospermum F3'5'H	+++	+++	+++	++	-
17-	Rudbeckia hirta F3'H	+++	+++	+++	++	+++
18-	Rudbeckia hirta F3'H(nK)	+++	+++	+++	++	+
19-	Sollya F3'5'H (3)	+++	+++	+++	++	++

(+++ : Verim %50 üzerinde , ++ : Verim %10-50 arasında , + : Verim %10 altında , - : verim yok , T.E. : test edilmedi)

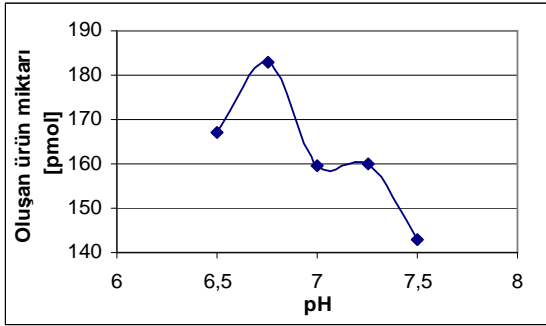
3.3. Optimum pH'lar



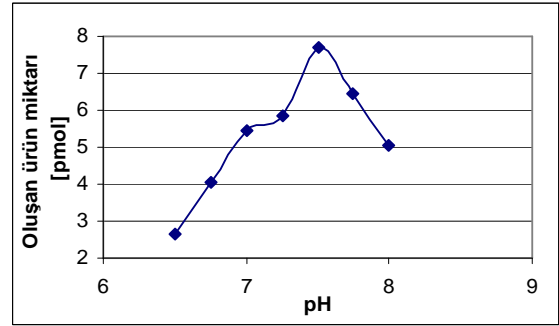
Şekil 49. Rud. F3'H(K) – ISL Opt. pH grafiği



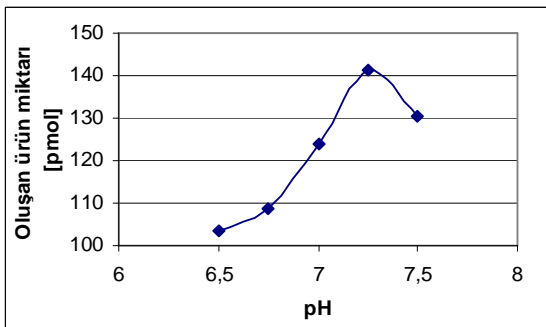
Şekil 50. Rud. hirta F3'H – NAR Opt. pH grafiği



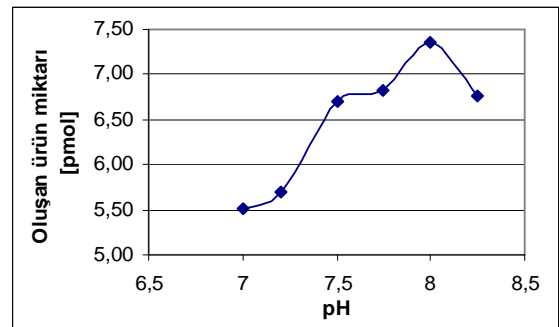
Şekil 51. Rud. hirta F3'H – DHK Opt. pH grafiği



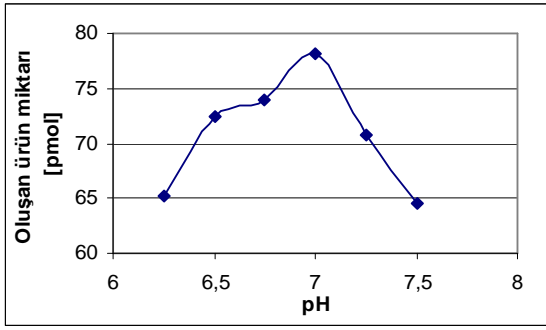
Şekil 52. Rud. F3'H(K) – APİ Opt. pH grafiği



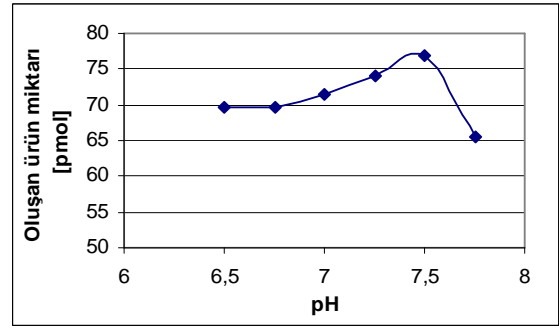
Şekil 53. Rud. F3'H(K) – KAEM Opt. pH grafiği



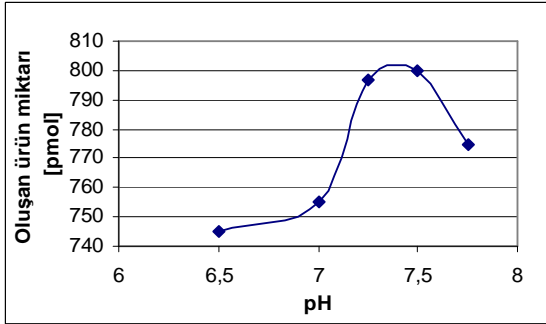
Şekil 54. Sol. F3'5'H(3) – APİ Opt. pH grafiği



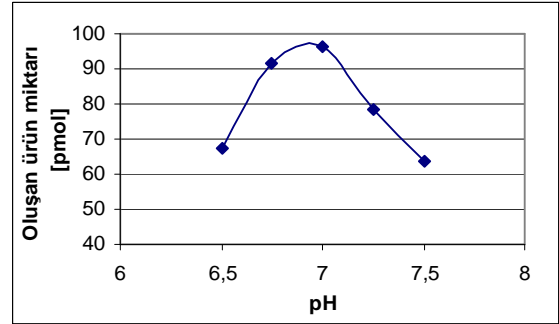
Şekil 55. Sol. F3'5'H(3) – DHK Opt. pH grafiği



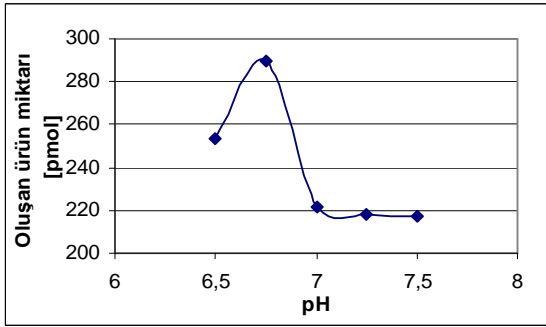
Şekil 56. Sol. F3'5'H(3) – KAEM Opt. pH grafiği



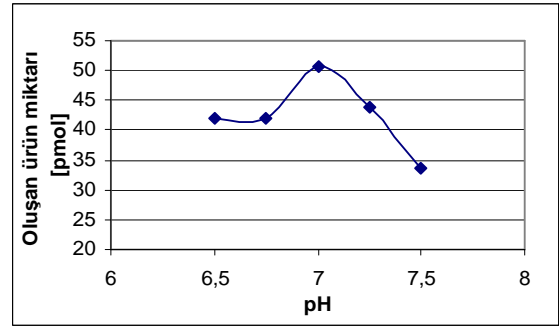
Şekil 57. Sol. F3'5'H(3) – NAR Opt. pH grafiği



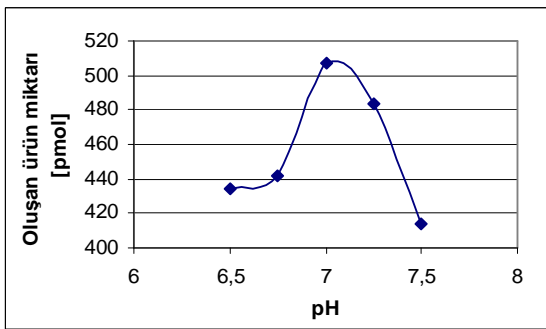
Şekil 58. Sol. F3'5'H(3) – ISL Opt. pH grafiği



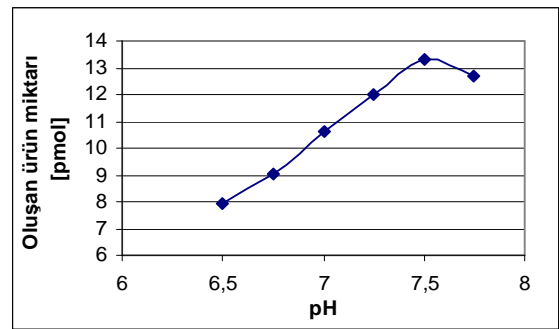
Şekil 59. Ger. F3'H – NAR Opt. pH grafiği



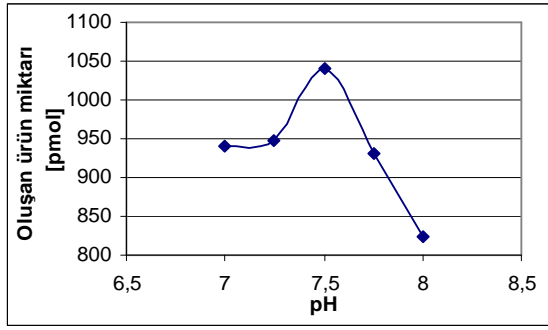
Şekil 60. Ger. F3'H – DHK Opt. pH grafiği



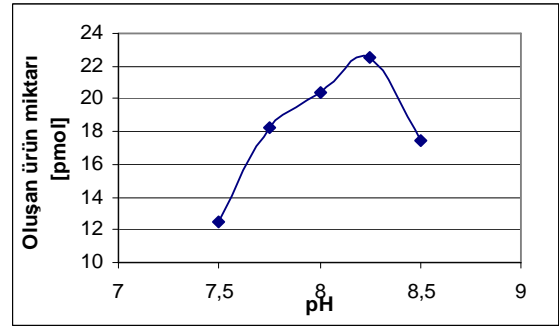
Şekil 61. Ger. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği



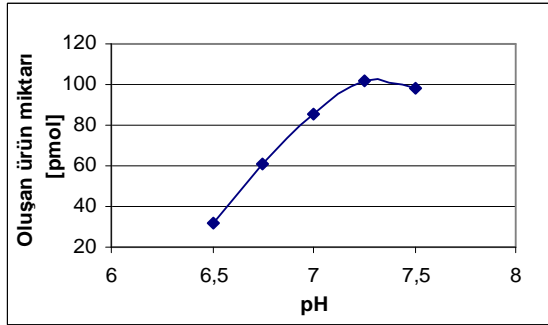
Şekil 62. Ger. F3'H – APİ Opt. pH grafiği



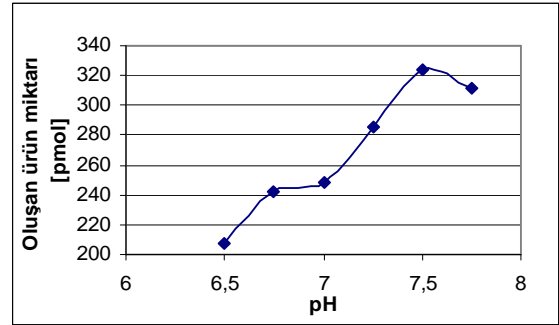
Şekil 63. Arab. F3'H – DHK Opt. pH grafiği



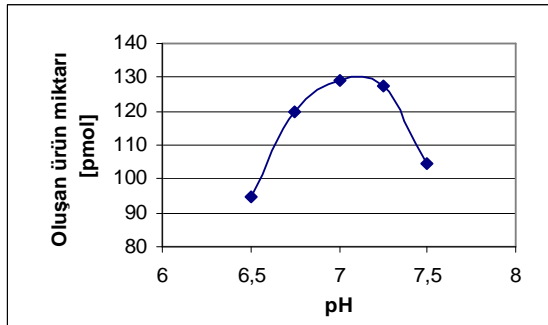
Şekil 64. Arab. F3'H – APİ Opt. pH grafiği



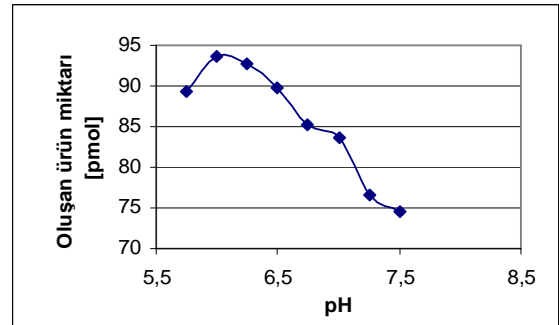
Şekil 65. Arab. F3'H – ISL Opt. pH grafiği



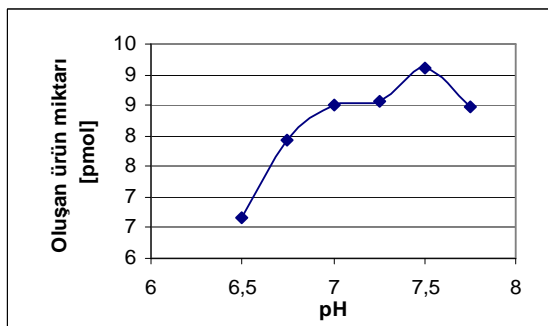
Şekil 66. Arab. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği



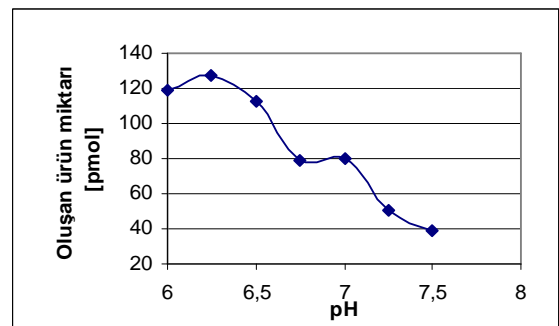
Şekil 67. Ech. F3'5'H(1) – ISL Opt. pH grafiği



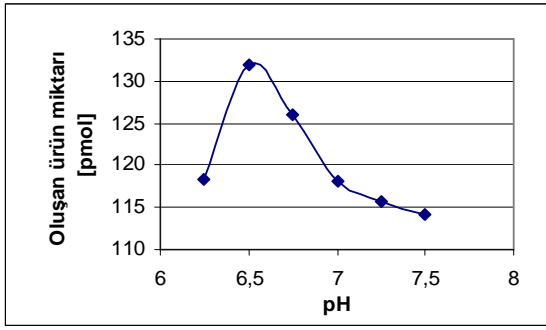
Şekil 68. Ech. F3'5'H(1) – KAEM Opt. pH grafiği



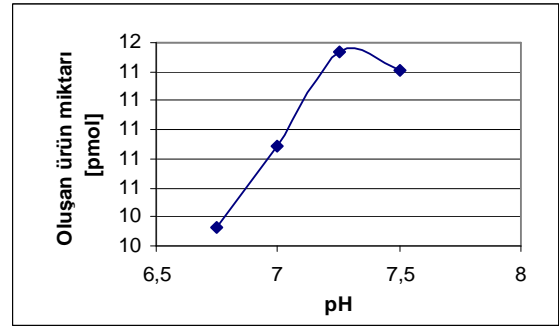
Şekil 69. Ech. F3'5'H(1) – APİ Opt. pH grafiği



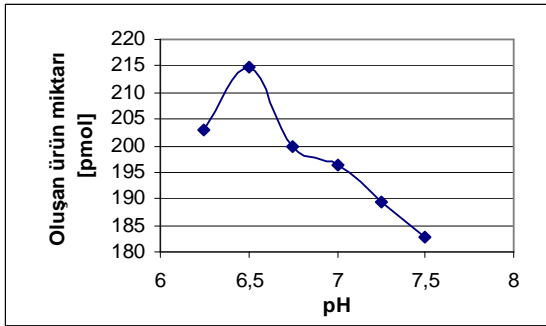
Şekil 70. Ech. F3'5'H(6) – DHK Opt. pH grafiği



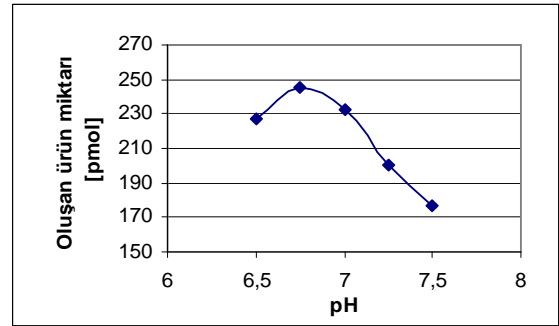
Şekil 71. Ech. F3'5'H(6) – KAEM Opt. pH grafiği



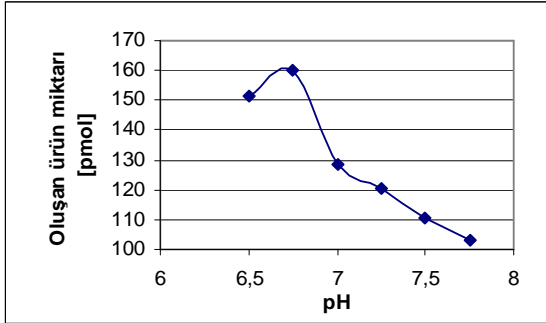
Şekil 72. Ech. F3'H(1) – API Opt. pH grafiği



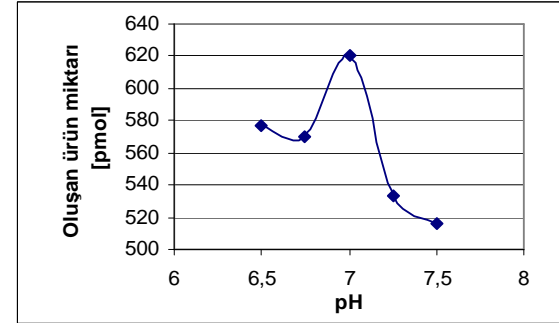
Şekil 73. Ech. F3'H(1) – KAEM Opt. pH grafiği



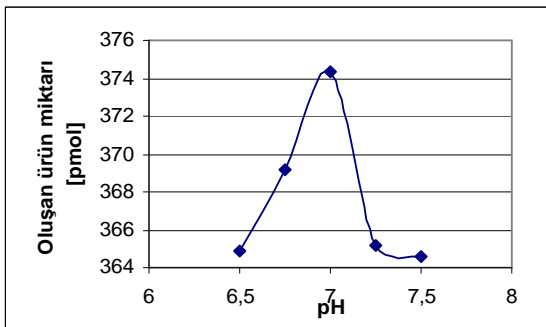
Şekil 74. Ech. F3'H(1) – DHK Opt. pH grafiği



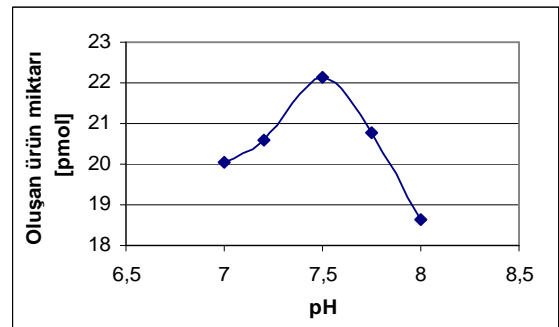
Şekil 75. Ech. F3'H(1) – NAR Opt. pH grafiği



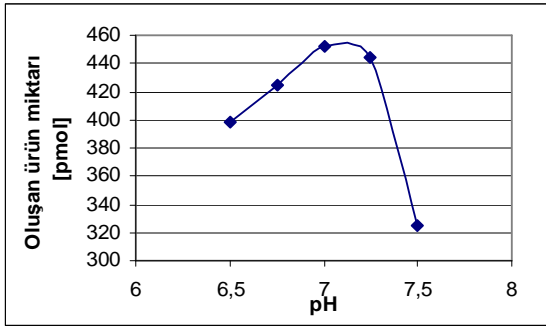
Şekil 76. Ech. F3'H(6) – DHK Opt. pH grafiği



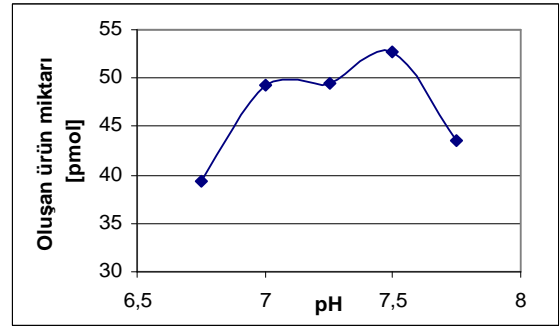
Şekil 77. Ech. F3'H(6) – KAEM Opt. pH grafiği



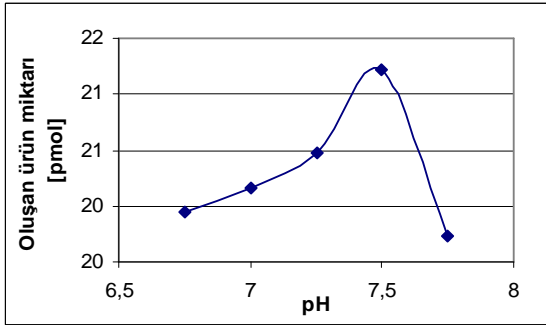
Şekil 78. Ech. F3'H(6) – API Opt. pH grafiği



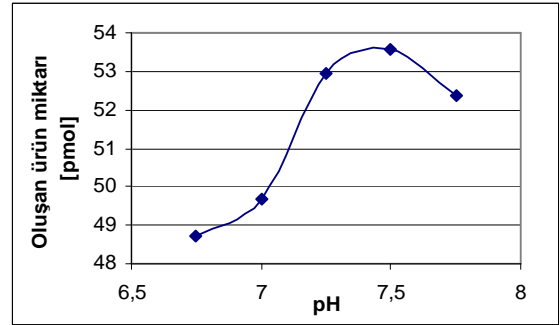
Şekil 79. Ech. F3'H(6) – NAR Opt. pH grafiği



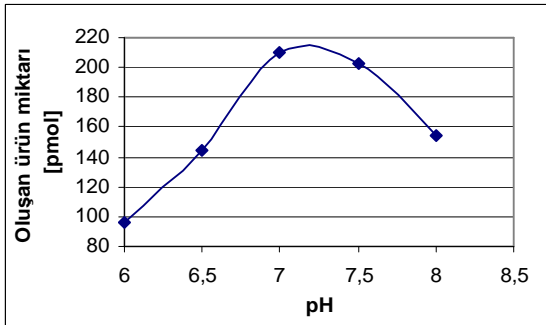
Şekil 80. Ger. F3'H(8) – NAR Opt. pH grafiği



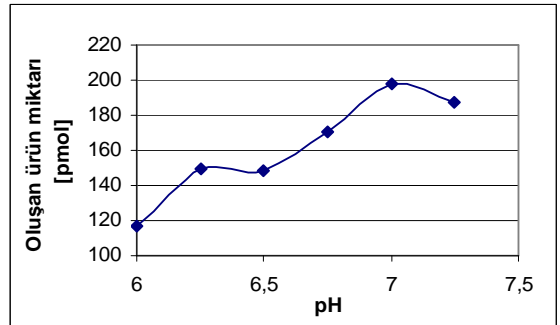
Şekil 81. Ger. F3'H(8) – KAEM Opt. pH grafiği



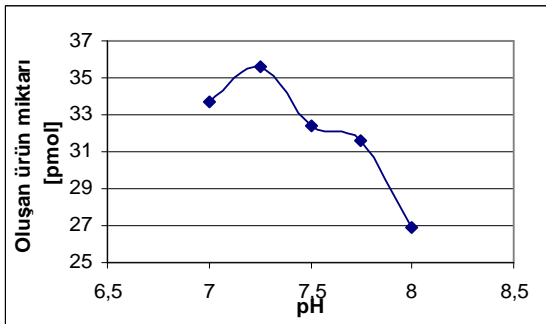
Şekil 82. Ger. F3'H(8) – DHK Opt. pH grafiği



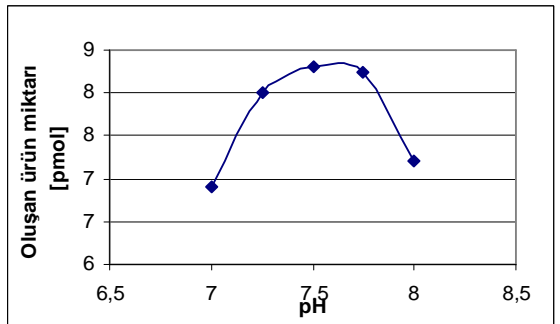
Şekil 83. Ger. F3'H(9) – NAR Opt. pH grafiği



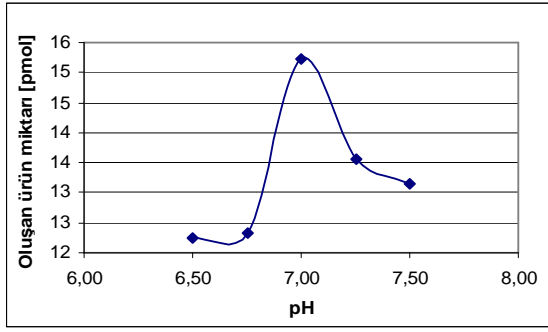
Şekil 84. Ger. F3'H(9) – DHK Opt. pH grafiği



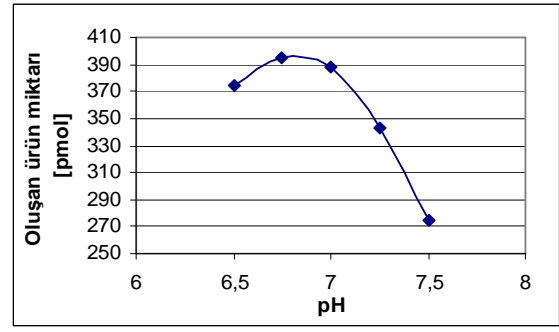
Şekil 85. Ger. F3'H(9) – KAEM Opt. pH grafiği



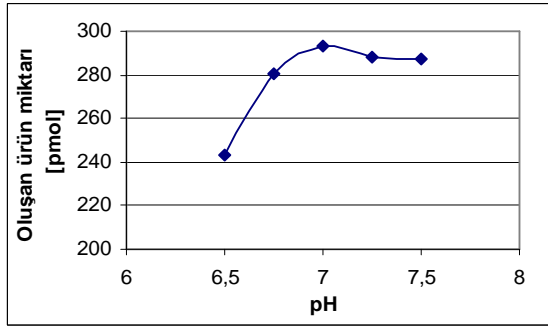
Şekil 86. Ger. F3'H(9) – APİ Opt. pH grafiği



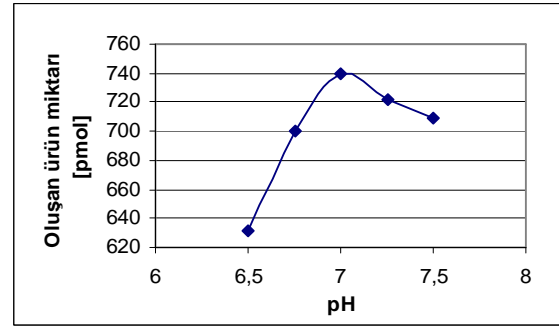
Şekil 87. Korn. F3'H – NAR Opt. pH grafiği



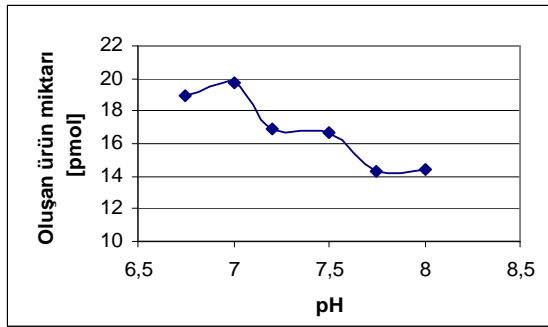
Şekil 88. Korn. F3'H(27)–DHK Opt. pH grafiği



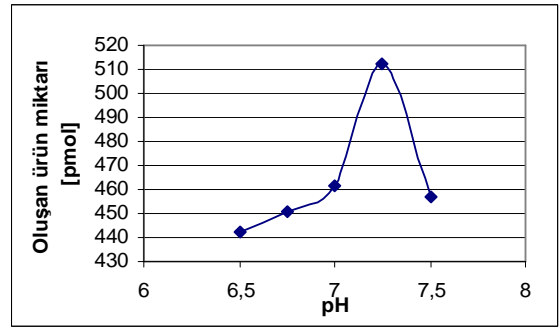
Şekil 89. Korn. F3'H(27)–KAEM Opt. pH grafiği



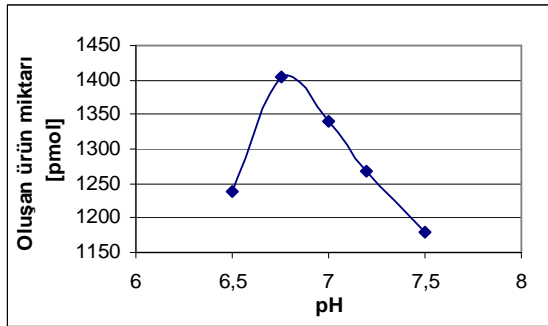
Şekil 90. Korn. F3'H(27)–NAR Opt. pH grafiği



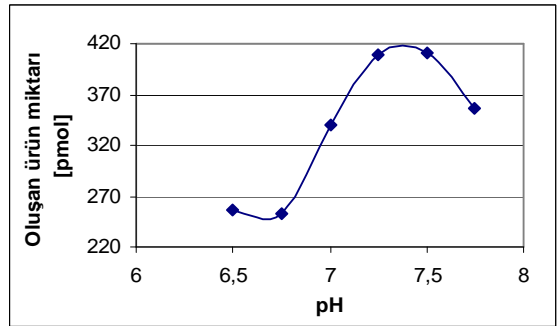
Şekil 91. Korn. F3'H(27) – APİ Opt. pH grafiği



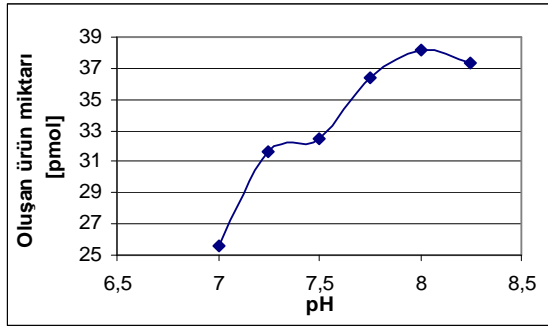
Şekil 92. Ost. F3'H(11) – KAEM Opt. pH grafiği



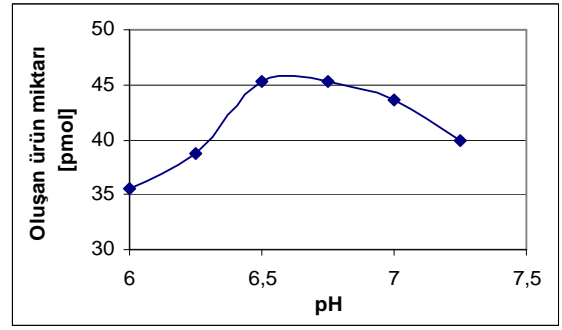
Şekil 93. Ost. F3'H(11) – DHK Opt. pH grafiği



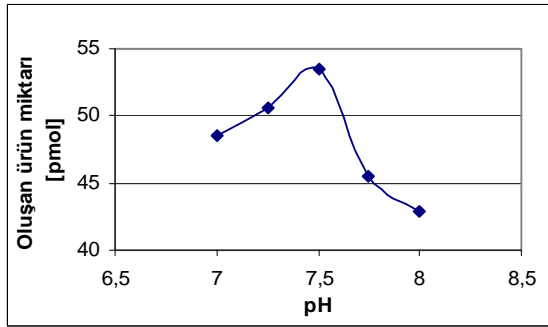
Şekil 94. Ost. F3'H(11) – NAR Opt. pH grafiği



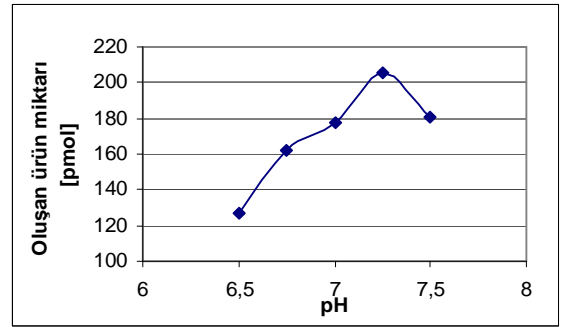
Şekil 95. Ost. F3'H(11) – APİ Opt. pH grafiği



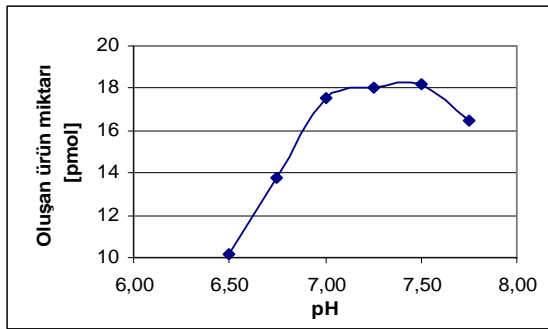
Şekil 96. Ost. F3'5'H – DHK Opt. pH grafiği



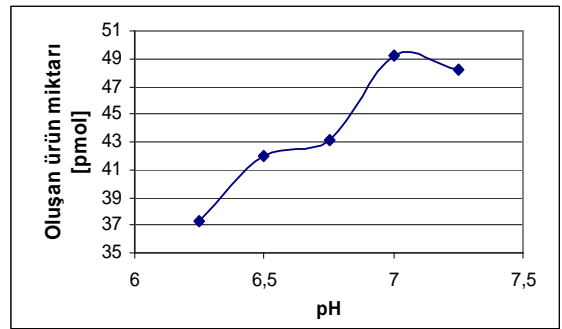
Şekil 97. Ost. F3'5'H – KAEM Opt. pH grafiği



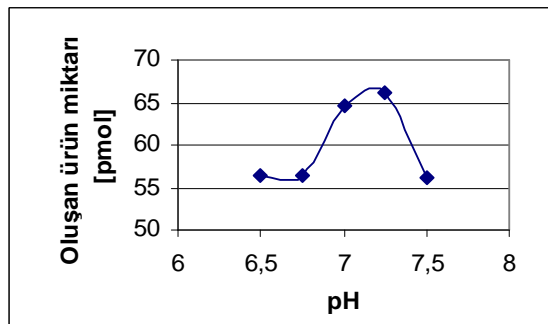
Şekil 98. Ost. F3'5'H – NAR Opt. pH grafiği



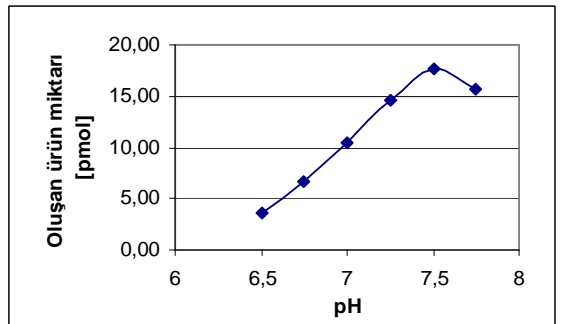
Şekil 99. Weg. F3'H – NAR Opt. pH grafiği



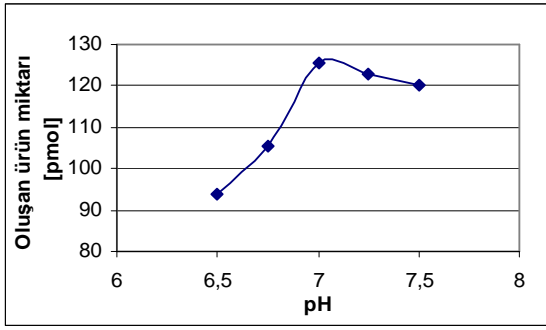
Şekil 100. Weg. F3'5'H(4) – DHK Opt. pH grafiği



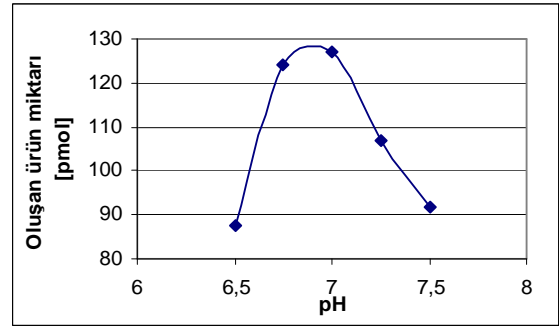
Şekil 101. Weg. F3'5'H(4) – KAEM Opt. pH grafiği



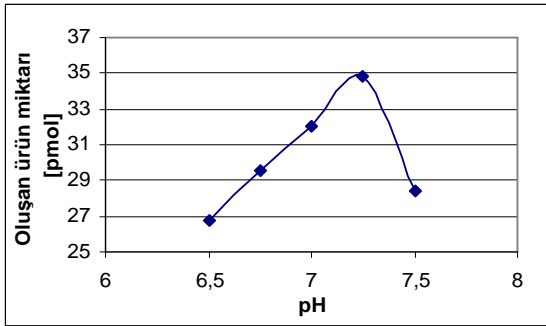
Şekil 102. Tag. F3'H – ISL Opt. pH grafiği



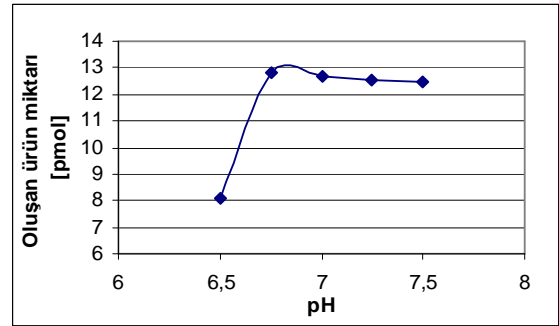
Şekil 103. Tag. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği



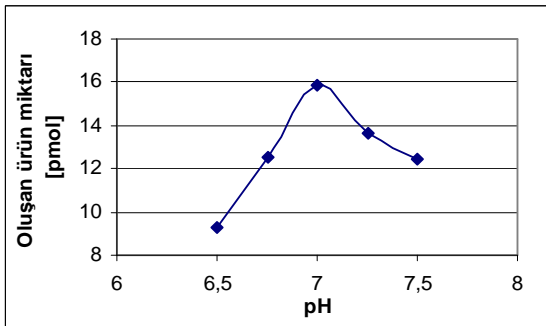
Şekil 104. Tag. F3'H – DHK Opt. pH grafiği



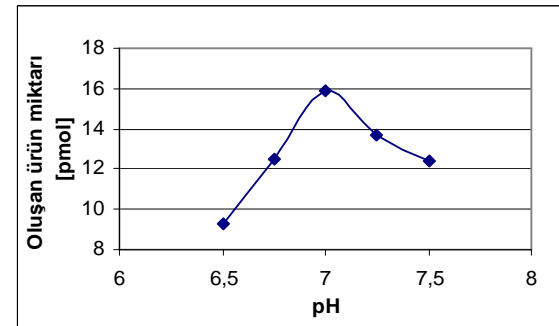
Şekil 105. Dah. F3'H – NAR Opt. pH grafiği



Şekil 106. Dah. F3'H – KAEM Opt. pH grafiği



Şekil 107. Dah. F3'H – DHK Opt. pH grafiği



Şekil 108. Rud. F3'H(nK) – DHK Opt. pH grafiği

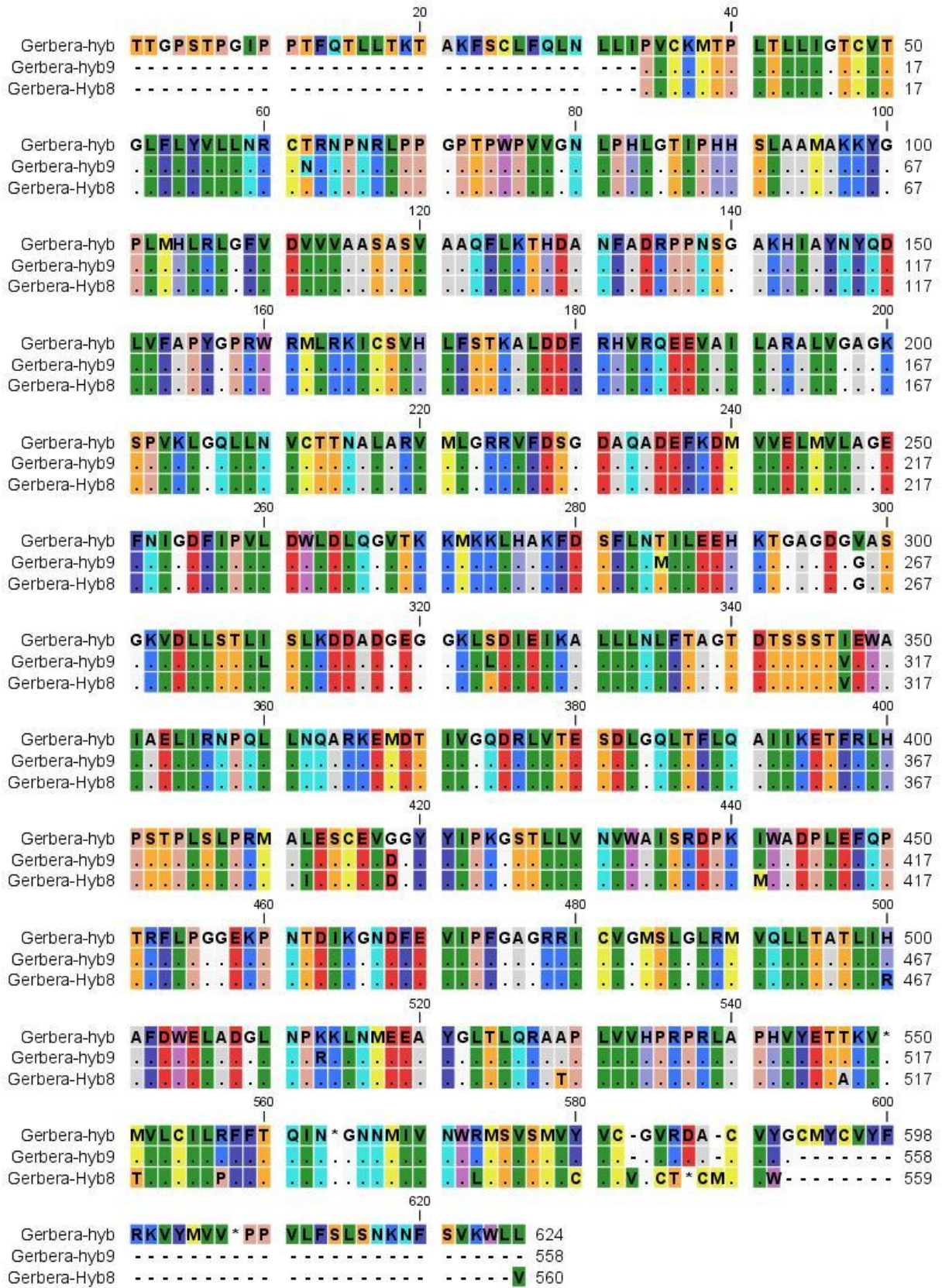
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde edilen substrat spesifite bilgilerinden yola çıkarak, isolikuiritigenin (ISL) ile reaksiyona giren 10 bitkiden ifade edilen 19 farklı klonlardan; *Rudbeckia hirta*-Kozak, *Rudbeckia hirta*-nonKozak F3'H, *Tagetes erecta* F3'H, *Dahlia Chat Noir* F3'H, *Arabidopsis thaliana* F3'H, *Echinops bannaticus* F3'5'H (1), *Echinops bannaticus* F3'H (6) ve *Sollya heterophylla* F3'5'H (3) enzimlerin ISL'yi 3 ve 3'5' pozisyonlarından hidroksilleyebildiği belirlendi. Bu 6 klondan ISL ile vermiş olduğu verim bakımından ortaya konulduğunda en aktif enzimin *Rudbeckia hirta*-kozak olduğu belirlendi ve onu aktivite yönünden sırasıyla *Arabidopsis thaliana* F3'H, *Echinops bannaticus* F3'5'H (1), *Tagetes erecta* F3'H, *Sollya heterophylla* F3'5'H (3), *Echinops bannaticus* F3'H (6) ve *Rudbeckia hirta*-nonKoz izledi. *Rudbeckia hirta*-nonkozak F3'H enziminin düşük verim vermesi beklenenin tersine bir durum oluşturdu. Gen dizi bakımından bakıldığında *Rudbeckia hirta*-Kozak dizisinin başlangıç kısmında olan bir amino asidin mutasyonla değiştirilmesi ile oluşturulan bu enzimin düşük aktivite göstermesinin sebebinin, enzimin ifade edilmesi sırasında iyi klonun elde edilememiş olması önemli bir sebep olarak gösterilebilir. İyi ifade edilmediğinden dolayı mayada heterojenik olarak ifadeside paralel olarak etkileyecektir ve çok aktif bir enzim ifade edilemeyecektir. Affinite ilgili olarak ilginç bir olayda Chicory bitkisinden ifade edilen F3'H ve F3'5'H enzimlerinin ISL ile reaksiyon vermemesidir. Bilindiği gibi bir antosiyanidin türü olan mavimsi renklerin oluşumunda anahtar rol oynayan delphinidin ve türevlerinin sentezinde bu enzime ihtiyaç duyulmasıdır. Bu birleşikler chicory bitkisinde yoğunca bulunmaktadır. *B. napus* bitkisinde aynı enzimin iki farklı gen dizisine sahip olan iki farklı enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Böyle bir durumunda chicory içinde mevcut olabileceğidir.

Optimum pH grafikleri incelendiğinde apigenin'in diğer substratlara göre daha bazik ortamı seven bir substrat olduğu belirlendi. Naringenin, isolikuiritigenin, kaemferol ve dihidrokaemferol'un benzer optimum pH'lı ortamları sevdiği belirlendi. *Echinops bannaticus*'dan elde edilen F3'H ve F3'5'H enzimlerin düşük pH'larda çalışmaları belirlendi. Apigeninin enzimlerle verdikleri verim incelendiğinde diğer flavonoidlere göre çok daha düşük bir aktivite gösterdiği görülmüştür. Isolikuiritigenin kalkon olmasına rağmen bazı enzimler için apigenin'den daha iyi bir substrat olduğu belirlendi.

Aktivite deneyinin tayini için yapılan gen dizi karşılaştırmalarda farklı üç bazın bir araya gelmesiyle oluşan amino asitler bazlar yerine kullanılmıştır. Çünkü bazlar üzerinden yapılan gen dizi karşılaştırılması bize yanlış yönlendirebilir. Aynı amino asit farklı bazlardan oluşabilmektedir. Bundan dolayı gen dizileri mevcut olan enzimlerin önce dizileri amino asite çevrilmiş ve daha sonra gen dizi karşılaştırılmasına geçilmiştir. *Gerbera hybrida* klonlarından sadece *Gerbera hybrida* (8) numaralı klonun apigenin substratı ile reaksiyona girmediği belirlendi ve nedeninin araştırılması için gez dizisi karşılaştırılması öncelikle kendi türünden klonlanan *Gerbera hybrida* ve *Gerbera hybrida* (9) klonlarıyla karşılaştırması yapıldı (Şekil 109). Gen dizi karşılaştırılmasıyla sırasıyla 412, 441, 500, 529, 547, 551, 556, 573 ve 580. bölgelerde farklılıklar bulundu. Reaksiyon vermemesinin sebebinin bulunabilmesi için ikinci bir gen dizi karşılaştırması bütün enzimler kullanılarak yapıldı. 423. ve 511. bölgede diğer enzimlerin dizilerinde olmayan amino asidin varlığı bulundu. Benzer bir karşılaştırma da isolikuitigenin için yapıldı (Şekil 110). ISL ile reaksiyonlar veren enzimler belirlenip, onların gen dizilerindeki benzerlikler bulunduktan sonra ISL ile reaksiyon vermeyen substratların gen dizileri kullanılarak gerçekleştirildi Şekil-111. Isolikuitigenin için Iso ile reaksiyon verenler ile vermeyenler arasında 204, 241, 301, 314 ve 473.bölgelerde farklılıklar bulundu.

Bu çalışmanın ileriki aşamasında yapılabilecek şey gen dizisinde aktivite ya da inaktivite sorumlu olan amino asitlerin mutasyona uğratılıp, enzimin aktivitesi üzerinde rol oynayıp oynamadığını belirlemektir.



Şekil 109. Gerbera hybrida, Gerbera hybrida (8) ve Gerbera hybrida (9) enzimlerinin protein asit dizisine göre karşılaştırılması

Tablo 7 incelendiğinde en iyi substratların sırasıyla naringenin (flavonon), kaemferol (flavonol), dihidrokaemferol (dihidroflavonol), apigenin (flavon) ve sonuncu sırada da isolukuiritigenin olduğu görülmektedir. Apigeninin diğer flavonoid türlerine göre daha kötü substrat olması, tam olarak açıklanamamakla birlikte Gelinda, 2003'deki doktora tezinde bulunan sonuçlarla uyuşmamaktadır. Gelinda'nın tezinde belirtilen *Arabidopsis thaliana*'nın aynı substratlar ile verdikleri reaksiyonlar belirtilene göre apigenin dihidrokaemferol'dan daha iyi bir substrat olduğu belirtilmişti. Bu çalışmada Gelinda'nın tezinin aksine apigenin dihidrokaemferoldan çok daha kötü bir substrat olduğu belirlenmiştir (deney aynı enzimle, bütün substratlar için aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir). Apigenin en iyi verimini *Osteospermum bamba* (11) klonu ile vermiştir (%57). Onu sırasıyla *Gerbera hybrida* (9) ve *Arabidopsis thaliana* izlemiştir.

ISL ile %10'nun altında verim veren *Dahlia* CN F3'H, Ech. F3'H(6) ve *Rudbeckia hirta* F3'H (nK)'ların daha aktif bir şekilde ifade edilemedikleri için onların kinetik çalışmaları gerçekleştirilememiştir.

Bu çalışmanın devamında fizyolojik önem taşıyan isoliquiritigenin adlı kalkonun buteine dönüştürebilen enzimler ile reaksiyon vermeyen enzimlerin sayısı artırılarak yani ISL ile reaksiyon vermeyen diğer enzimler kullanılarak yapılacak geniş protein dizi karşılaştırmasında bulunacak aktiviteden sorumlu bölge sayısı düşürülebilir ve bu bölgedeki bazlar mutasyona uğratarak gerekli amino asitler oluşturulup, enzim yeniden heterolojik olarak mayada ifade edilip ISL ile reaksiyona sokarak aktiviteden sorumlu amino asitler bulunabilir. Aynı prosedür *Gerbera hybrida* (8) klonu içinde geçerli olup benzer biçimde enzimin aktif bölgesinde bulunan ve enzim aktivitesinden sorumlu amino asitler bulunabilir. Bu çalışmanın bir diğer boyuntunda çiçeklerinde yoğunca delphinidin içeren bitkilerden bu enzimler klonlanıp ISL üzerinde aktiviteleri tekrar kapsamlı olarak incelenebilir. Çünkü çiçek renk pigmentlerinden olan delphinidin ve türevlerinin sentezlenebilmesi için bu enzimler aktivitesinin yüksek olması gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Baker, M. E., 1988. Flavonoids as Hormones. A Perspective From an Analysis of Molecular Fossils, Adv. Exp. Med. Biol., 439, 249-267.
- Bernard F. X., 1997. Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.F., Crouzet, J., & Blanche, F., Glycosylated Flavones as Selective Inhibitors of Topoisomerase IV., Antimicrob. Agents Chemother., 41, 992-998.
- Bors, W.ve Michel, C., 1997. Stettmaier, K., Antioxidant Effect of Floavonoids, Biofactors 6, 399-402.
- Bradley, D. V., and Cazort, R. J., 1970. Relief of Bladder Spasms by Flavoxate: a Comparative Study, J. Clin. Pharmacol., 10, 65-68.
- Britsch, L. ve Grisebach, M., 1978. Improved Preparation and Assay of Chalcone Synthase, Phytochemistry, 24, 1975-1976.
- Britsch, L. Ruhnau-Brich, B. ve Forkmann G., 1992. Molecular Cloning, Sequence Analysis, and In Vitro Expression of Flavonone 3B-Hydroxylase from Petunia Hybrida. Journal of Biological Chemistry, 267, 8, 5380-5387.
- Cantley, L. C. and Hammes, G. G., 1976. Investigation of Quercetin Binding Sites on Chloroplast Coupling Factor 1, Biochemisty, 15, 1-8.
- Conti, M., & Setnikar, I., 1975. Flavoxate, a Potent Phosphodiesterase Inhibitor. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 213, 186-189.
- Duthie, S. J. and Dabson, V. L., 1999. Dietary Flavonoids Protect Human Colonocyte DNA from Oxidative Attack in Vitro. Eur. J. Nutr., 38, 28-34.
- Harborne, J. B. ve Baxter H., 1999. The Handbook of Natural Flavonoids, 2 Volumes, Wilwy VCH, WeinHeim, 257 S.
- Hausen, B. M. and Wollenweber, E., 1988. Propolis allergy (III), Sensitization Studies With Minor Constituents, Contact Dermatitis, 19, 296-303.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E. Seuff, H. and Post, B., 1987. Propolis allergy (I), Origin, Properties, Usage and Literature Review, Contact Dermatitis, 17, 163-170.
- Herbst, W. P., 1970. Double-Blind Comparison of Flavoxate and Propantheline as Urologic Anti-Spasmadics., J. Biol. Chem., 240, 877.
- Hollman, P. C. and Katan, M. B., 1997. Absorbtion, Metabolism and Health Effects of Dietary Flavonoids in Man, Biomed. Pharmacoter., 51, 305-310.

- Holmann, P. C., Bijman, M. N., Van Gameren Y., Chossen, E. P., de Vries, J.H., & Katan, M. B., 1999. The Sugar Moiety is a Major Determinant of The Absorbtion of Dietary Flavonoids Glycosides in Man, Free Radic. Res., 567-573.
- Jain, S., Sareen, V. and Narula, A., 1993. Oestrogenic and Pregnancy Interceptory Efficacy of a Flovonoid Mixture from Grangea-Maderaspana Poir (Artemisia Maderaspatana) in The Mouse, Phytother. Res., 7, 381-383.
- Li, M. W., Yudin, A. I., C. A., Sabeur, K., Primakoff, P. and Overstreet, J. W., 1997. Inhibition of Monkey Sperm Hyaluronidase Activity and Heterologous Cumulus Penetration by Flavonoids. Biol. Reprod., 56, 1383-1389.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. ve Randall R. J., 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent, Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 193, 265-275.
- Michelle L. Fraser, Gladys S. Mok. ve Andy H. L., 2007. Green Tea and Stroke Prevention: Emerging Evidence, Complementary Theraphies in Medicine, 13, 46-53.
- Muster, G., Flavonoid Biosynthesis in Dahlia Variables, Doctorate Thesis, TU-WIEN, Vienna, 2003.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S. ve Higashida, M., 1978. Quercetin, an Energy Transfer Inhibitor in Photophosphorylation, FEBS Letter, 85, 215-218.
- Nabaei-Bidhendi G. ve Bannerjee N. R., 1990. Convenient Synthesis of Polyhydroxy Flavonoids, Indian Chem S., 670, 43-45.
- Pene, J., Rousset, F., Briere, Fien ., Chretien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N. and Banchereau, J., 1988. IgE Production by Normal Human Lymphocytes is Indced by Interleukin 4 and Suppressed by Interferons Gamma and Alpha and Prostaglandin E2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6880-6884.
- Petersen, H. O., 1977. Allergy to Propolis in Patients with Eczema, Ugeskr Laeger, 139, 2331-2333.
- Petersen, H. O. and Afzelius, H., 1977. Maximization Test with Propolis on Albino Guinea Pigs, Ugeskr Laeger, 139, 2329-2331.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. and Urban, P., 1996. Yeast Expression of Animal and Plant P450s in Optimized Redox Environments, Methods in Enzymology, 272, 51-64.
- Sandermann, H., 1972. Reactivation of C₅₅-Isoprenoid Alcohol Phosphokinase Apoprotein by Synthetic Lecithins. FEBS Letters, 21, 254-258.

- Saponara, R. and Bosisio, E., 1988. Inhibition of cAMP-Phosphodiesterase by Biflavones of Ginko Biloba in Rat Adipose Tissue, J. Nat. Prod., 61, 1386-1387.
- Singh, P., Jain, S., Bhala, M., Goyal, R. B., Java prokash, D. and Lohiya N. K., 1992. Wagonin, 5, 7-Dihydroxy -8 -Methoxy-Flavone as Oestrogenic and Anti-Implantational Agent in The Rat, Phytoter. Res., 4, 86-89.
- Sonnen B, J. and Pohl, A., 1980. Mechanism of Silybin Action, IV, Structure –Action Relationship, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361, 1757-1761.
- Sonnen B, J., Mattersberger, J. And Hanser, G., 1980. Mechanism of Silybin Action, III, Resorption of The Flavonolignane Derivative Silybin into Rat Liver Cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 36, 1751-1756.
- Stotz, G., De Vlaming, P., Wiering, H., Schraum, A.W. and Forkmann, G., 1985. Genetic and Biochemical Studies on Flavonoid 3'-Hydroxylations in Flowers of Petunia Hybrida . Theoretical and Applied Genetics 70, 300-3005
- Tanaka, Y., Katsumoto, Y., Brugliera, F. and Mason, J., 2005. Genetic Engineering in Floriculture, Plant Cell Tis. Org. Cult., 80, 1-24.
- URL –1, <http://www.klinikpsikiyatri.org/pdf/4/4/Ek9/5.pdf>, 01.01.2007.
- URL –2, <http://www.anaesthetist.com>, 01.02.2007.
- URL –3, <http://www.mall-net.com/mcs/p450.html>, 01.02.2007.
- URL –4, http://www.uchsc.edu/sm/psych/ppfr/cyp_metabolism.htm, 09.02.2007.
- URL –5, <http://www.aafp.org/afp/980101ap/cupp.html>, 12.02.2007.
- URL –6, <http://www.drnelson.utmem.edu/Cytochrome P450.html>, 14 .02.2007.
- URL –7, <http://herbarium.usu.edu/taxa/asteraceae.htm>, 14.02.2007.
- URL –8, <http://en.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>, 17.02.2007.
- URL –9, <http://www.anbg.gov.au/plantfam/austif.htm>, 22.02.2007.
- URL –10, <http://www.hort.purdue.edu/proceedings1993/v2-338.html>, 23.02.2007.
- URL –11, <http://en.wikipedia.org/wiki/Gerbera>, 22.02.2007.
- URL –12, http://www.floridata.com/ref/r/rudb_hir.cfm, 22.02.2007.
- URL –13, <http://en.wikipedia.org/wiki/Osteospermum>, 22.02.2007.
- URL –14, <http://en.wikipedia.org/wiki/Cornflower>, 23.02.2007.

- URL –15, <http://en.wikipedia.org/wiki/Dahlia>, 23.02.2007.
- URL –16, <http://cemadera.ucdavis.edu>, 22.02.2007.
- URL –17, <http://en.wikipedia.org/wiki/Echinops>, 22.02.2007.
- URL –18, <http://en.wikipedia.org/wiki/Pittosporaceae>, 22.02.2007.
- URL –19, <http://asgap.org.au/s-het.html>, 24.02.2007.
- URL –20, <http://www.crocus.co.uk>, 24.02.2007.
- URL –21, http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/brass/index_e.php, 26.02.2007
- URL –22, <http://members.iinet.com.au/~weeds/brassicaceae.htm>, 26.02.2007.
- URL –23, <http://www.arabidopsis.org/education/aboutarabidopsis.jsp>, 22.02.2007.
- URL –24, <http://www.vplants.org/plants/species/species.jsp?gid=2239>, 27.02.2007.
- URL –25, <http://user.rcn.com>, 27.02.2007.
- URL –26, http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana, 27.02.2007.
- URL –27, <http://www.flickr.com>, 27.02.2007.
- URL –28, <http://www.science.edu.sg>, 27.02.2007.
- URL –29, <http://www1.qiagen.com/literature>, 27.02.2007.
- URL –30, <https://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures>, 27.02.2007.
- Weginer, B., Haag - Berruier, M. and Anton, R., 1982. Plant of Haiti Used as Antifertility Agents. *J. Ethnopharmacol.*, 6, 67-84.
- Wozniak, K. D. and Braun, W., 1972. Erste Ergebnisse der Behandlung mit Propolis Losing (Mylyt R) bei Mykosen und Ekzemen, *Medicamentum*, 13, 114-116.
- Yazaki, Y., 1976. Co-Pigmentation and The Colour Change with Age in Petals of Fuchsia Hybrida, *Bot. Mag. Tokyo*, 89, 45.
- Zloch, Z. and Ginter, E., 1979. Effects of Flavonoids on Vitamin C Activity of D-Isoascorbic Acid. *Physiol Bohemoslov*, 28, 519-524.
- Zloch, Z. and Sidlova, A., 1977. Relationship between The Biological Action of Flavonoids and The Function of Vitamin C in The Organism, *Cesk Gastroenterol Vyz* 31, 340-343.

ÖZGEÇMİŞ

1986 Erzurum`un İspir ilçesinde doğdu. 2000 yılında Trabzon Erdoğan Lisesini bitirdi. Aynı yıl KTÜ Kimya bölümüne başladı. 2005 yılında KTÜ Kimya bölümünden Kimyager unvanıyla mezun oldu. 2 ay Aydın İnşaat, İyidere şantiyesi şantiye şefi, 3 ay Aydın İnşaat Çayeli şantiyesinde muhasebeci olarak çalıştı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans'a başladı. 2006 güz döneminde erasmus programı ile Viyana Teknoloji Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Enstitüsünde yüksek lisans tezine başladı. İyi derece bilgisayar bilip yabancı dil olarak ta İngilizce bilmektedir.