T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oryctolagus cuniculus (TAVŞAN) GENOMUNDAN KİMOZİN GENİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Meral ATLI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN danışmanlığında, Meral ATLI'nın hazırladığı '***Oryctolagus cuniculus* (Tavşan) genomundan kimozin geninin izolasyonu ve karakterizasyonu**' konulu bu çalışma 15/03/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç.Dr.Mehmet KARAASLAN ……

Üye : Yrd.Doç.Dr. Hidayet SAĞLAM ….....…….

Üye : Doç.Dr.Hasan VARDİN …….……

Bu tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yapıldığını ve Enstitümüz kurallarına göre düzenlendiğini onaylarım.

Prof.Dr. H. Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir
Proje No: 16031

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
1.1. Katepsin 3
1.2. Pepsin 3
1.3. Kimozin 4
1.3.1. Kimozinin çalışma mekanizması 5
1.3.2. Rekombinant kimozin 7
1.3.3. Tavşan kimozini 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8
2.1. Aspartik Proteazlar 8
2.2. Kimozinin Fiziksel özellikleri 9
2.3. Kimozinin Yapısal Özellikleri 10
2.4. Rekombinant Kimozin 13
2.5. Biyoinformatik Çalışmalar 17
3. MATERYAL ve YÖNTEM 19
3.1. Materyal 19
3.1.1. Hayvan materyali 19
3.1.2. Kimyasal maddeler 19
3.2. Yöntem 19
3.2.1. DNA ekstraksiyonu 19
3.2.2. Spektrofotometre kullanılarak DNA miktarının ölçülmesi 20
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi 21
3.2.4. Primer tasarımı 21
3.2.5. PZR analizi 22
3.2.6. DNA saflaştırılması 23
3.2.7. Biyoinformatik analizler 24
3.2.8. Protein modellerinin belirlenmesi 25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 26
4.1. Tavşan Genomundan Kimozin Geninin İzolasyonu 26
4.2. PZR Sonuçları 27
4.3. Gen Dizileme Analizi ve Sonuçları 32
4.4. Biyoinformatik Analizler 40
4.4.1. Kimozin gen dizilimlerinin karşılaştırılması 40
4.4.2. Tavşan genomu 43
4.4.3. Farklı memeli türlerinin kimozin, katepsin ve pepsin genlerinin filogenetik analizi 48
4.4.3.1. Kimozin geni filogenetik ağacı 52
4.4.4. Protein modelleri 55
4.4.5. Dizilimlerin çoklu karşılaştırılması (Multiple Sequence Allignment) 61
4.4.6. Korunmuş motifler 63
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 68
KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 81
EKLER 83

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Oryctolagus cuniculus (TAVŞAN) GENOMUNDAN KİMOZİN GENİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Meral ATLI

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN
Yıl: 2017, Sayfa: 108

Hayvansal kaynakların sınırlı olması, yüksek maliyet ve artan maya ihtiyacının karşılanamaması gibi sorunlardan dolayı mikrobiyal kimozin üretim çalışmaları yapılmıştır. Buzağı genomundan izole edilen kimozin gen dizilim bilgisi rekombinant kimozin üretimi amacıyla kullanılmıştır. Buzağı kimozin geni uygun şekilde inşa edilen vektörlere yerleştirilerek *E. coli* bakterilerine aktarılmış ve fermentasyon ortamında transforme bakterilerin istenilen rekombinant kimozin üretimleri teşvik edilmiştir. Rekombinant buzağı kimozininde elde edilen başarı farklı memeli türlerinden izole edilecek olan kimozin genlerinin bu amaçla kullanılabileceğine işaret etmiştir. Bunun üzerine domuz, buffalo, kuzu, keçi ve son olarak deve, gibi memelilerin kimozin genleri üzerine araştırmalar yapılmış, bu genlerin karakterizasyonu yapılmış, gen dizilimleri belirlenmiş ve endüstriyel peynir üretiminde kullanılmak üzere rekombinant olarak üretimleri sağlanmıştır. Son otuz yıldan günümüze kadar birçok rekombinant kimozin kaynağı geliştirilmiştir. Farklı kimozin kaynakları için araştırmalar hala devam etmektedir. Tavşan midesinden (abomasum) izole edilen rennetin peynir yapımı için önemli bir kaynak olduğu belirtilmekte ve peynir üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir. Ancak tavşanın kimozin geninin karakterizasyonuna ve gen diziliminin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) genomundan kimozin geninin izole edilip karakterizasyonun yapılması için tavşan dokusundan DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen tavşan DNA'sından PZR analizleri ile kimozin geni izole edilmiştir. Biyoinformatik analizler ile tavşan genomu üzerinde kimozin lokusunun 13. Kromozom üzerinde 53.709.000-53.717.500 bazları arasında olduğu tespit edilmiş ve ekzon- intron bölgeleri belirlenmiştir. Filogonetik analizlerle tavşan kimozin geninin diğer memeli türleri ile olan evrimsel akrabalığı incelenmiş ve tavşan kimozinin diğer memelilere ait kimozin genlerinden farklı bir grubta olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kimozin genlerinin korunmuş olan motifleri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda kimozin geninde aktif bölgelerin çalışılan tüm memeli türlerinde korunduğu tespit edilmiştir. Protein modelleri incellendiğinde korunan aktif bölgelerin diğer türlerde aynı yapıları oluşturduğu ve akitf bölgelerin konumunun aynı olduğu gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Oryctolagus cuniculus*, kimozin, biyoinformatik analizler, PZR.

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION and CHARACTERISATION of *Oryctolagus cuniculus* (RABBIT) CHYMOSIN GENE

Meral ATLI

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARAASLAN
Year: 2017, Page: 108

The investigation on microbial chymosin production was carried out because of limited availability of animal resources. The sequence of cattle chymosin gene was used for the recombinant chymosin enzyme production. The recombinant chymosin enzyme production was induced in *E. coli* by using a suitably constructed vector carrying corresponding transgene sequence. The success obtained for recombinant *Bos taurus* chymosin enzyme paved the way for the investigation of novel chymosin sources. For this purpose pig, buffalo, lamb, goat, and camel, was used as gene source and the genes obtained from these organisms were characterized and sequenced. In the last decades several chymosin sources were studied and investigated for their possible use in food industry and new studies in this area is also currently being continued. The rennet obtained from rabbit stomach was also used for milk clotting. But the study of gene sequence and characterisation of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) chymosin gene is limited in the literature. In this study firstly DNA was extracted from tissue of rabbit because of isolation of chymosin gene from rabbit by PCR. Rabbit chymosin gene locus was determined on 13th chromosome and between 53.709.000-53.717.500 bases and exon-intron sites were determined by bioinformatic analyses. MUSCLE and Clustal W was used to determine the chymosin gene sequence of rabbit and the other cyhmosin gene sequence of mammalian species. The evolutionary relationship of chymosin gene of rabbit was examined by the phylogenetic analyses and the result of these analyses show that the rabbit chymosin gene was determined as different in group and so might have more characteristic properties different than chymosin genes of other mammalian species.

KEY WORDS: *Oryctolagus cuniculus*, chymosin, bioinformatic analyses, PCR.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde gerek konu seçiminde gerek araştırmalarımda, gerek laboratuvar çalışmalarımda daima bana yol gösteren sayın danışman hocam Doç. Dr Mehmet KARAASLAN'a çalışmalarımda bana yardımcı olan sayın Doç. Dr Hasan VARDİN Hocam'a maddi manevi her türlü desteği sağlayan aileme babam Davut ATLI'ya, manevi desteğini herzaman yüreğimde hissetiğim annem Gülçin ATLI'ya, kardeşlerim Şenay ve Semih ATLI'ya ve sevgili dayım Emrah CESUR'a, bu süreçte desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Arş. Gör. Selin ALİHANOĞLU'na ve yüksek lisans öğrencisi sevgili Demet EKTİREN'e arkadaşlarım Nuri ALİHANOĞLU, Harran Üniversitesi Öğr. Gör. Asliye KARAASLAN ve Ferzan KARAASLAN'a teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Tavşan pepsinin üç boyutlu yapısı 3
Şekil 1.2. Kimozinin A ve kimozin B'nin şematik yapısı 6
Şekil 4.1. DNA markörü 27
Şekil 4.2. Tavşan DNA'sı jel görüntüsü.....27
Şekil 4.3. ODF1-ODR1 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü 28
Şekil 4.4. Saflaştırma işleminin kontrolü 29
Şekil 4.5. ODF2-ODR2 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü 30
Şekil 4.6. Saflaştırma işleminin kontrolü 30
Şekil 4.7. ODF3-ODR3 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü 31
Şekil 4.8. Saflaştırma işleminin kontolü 32
Şekil 4.9. ODF4-ODR4 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü 33
Şekil 4.10. Saflaştırma işleminin kontrolü 33
Şekil 4.11. ODF1ODR1 PZR ürünü ve ODF1 ileri primeri ile okunan gen dizilimi 34
Şekil 4.12. ODF1ODR1 PZR ürünü ve ODR1 geri primeri ile okunan gen dizilimi 35
Şekil 4.13. ODF2ODR2 PZR ürünü ve ODF2 ileri primeri ile okunan gen dizilimi 35
Şekil 4.14. ODF2ODR2 PZR ürünü ve ODR2 geri primeri ile okunan gen dizilimi 36
Şekil 4.15. ODF3ODR3 PZR ürünü ve ODF3 ileri primer ile okunan gen dizilimi 37
Şekil 4.16. ODF3ODR3 PZR ürünü ve ODR3 geri primeri ile okunan gen dizilim 39
Şekil 4.17. ODF4ODR4 PZR ürünü ve ODF4 ileri primer ile okunan gen dizilimi 39
Şekil 4.18. ODF4ODR4 PZR ürünü ve ODR4 geri Primer ile okunan gen dizilimi 40
Şekil 4.19. NCBI veri tabanında kimozin dizilimlerinin veri giriş numaralarına ulaşılması 42
Şekil 4.20. Tavşan cDNA kimozin dizilimin diğer türlerle karşılaştırılması 43
Şekil 4.21. Tavşan *(Oryctolagus cuniculus*) kimozin geni cDNA dizilimi 44
Şekil 4.22. Tavşan kromozomları hakkında genel bilgiler 46
Şekil 4.23. Tavşan türü (*Oryctolagus cuniculus*) 47
Şekil 4.24. Tavşan hücresi 47
Şekil 4.25. Hücre çekirdeğinin yapısı 47
Şekil 4.26. DNA'nın üç boyutlu yapısı 47
Şekil 4.27. Tavşan kromozomları.....48
Şekil 4.28. Tavşanın 13. kromozomu 48
Şekil 4.29. Tavşan kimozin geninin ekzon ve intron bölgeleri 48
Şekil 4.30. Tavşan kimozinin ekzon intron dağılımı 49
Şekil 4.31. Kimozin (CHY), pepsin (pg) katepsin (CTSE) nükleik asit dizilimlerine göre filogenetik ağacı 52
Şekil 4.32. Aspartik protezların amino asit dizilimlerine göre filogenetik ağaç çizimleri 53
Şekil 4.33. Farklı türlerin kimozin geni cDNA dizilimlerine göre çizilen filogenetik ağaç 55
Şekil 4.34. Amino asit dizilimlerine göre çizilen kimozin geni filogenetik ağacı 56
Şekil 4.35. Buzağı kimozinin protein yapısı 58
Şekil 4.36. Buzağı kimozini aktif bölgesi 59
Şekil 4.37. Tavşan kimozini enziminin üç boyutlu yapısı 60
Şekil 4.38. Tavşan kimozini aktif bölgesi 61
Şekil 4.39. Tavşan pepsini protein yapısı 62
Şekil 4.40. Kimozin enziminin sinyal peptit kısımlarının karşılaştırılması 63
Şekil 4.41. Kimozin enziminin öncül (pro) kısımların karşılaştırılması 63
Şekil 4.42. Kimozin enzimlerinin aktif bölgelerin karşılaştırılması 64
Şekil 4.43. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 1) 65
Şekil 4.44. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 2).....66
Şekil 4.45. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 3) 67
Şekil 4.46. Korunmuş motiflerin kimozin genleri üzerinde gösterimi 68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Primer bilgileri…….....21
Çizelge 3.2. Primerler ile çoğaltılmak istenen hedef bölgeler ……..22
Çizelge 3.3. PZR bileşenleri ……..…….22
Çizelge 3.4. PZR analiz koşulları ……..…….....23
Çizelge 4.1. Tavşan DNA'sının OD değerleri ……..……26
Çizelge 4.2. Kimozin geninin amino asit ve cDNA dizilimleri veri giriş numaraları……....41
Çizelge 4.3. Tavşan ile diğer türlerin cDNA dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu benzerlik oranları.43
Çizelge 4.4. Filogenetik analizler için kullanılan memeli türleri ……..48

SİMGELER DİZİNİ

A°	Angstrom
°C	Santigrat
kDa	Kilo Dalton
nm	Nanometre
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
OD	Absorbans yoğunluğu
ε	Epsilon
κ	Kappa
C	Kalsiyum

1.GİRİŞ

Proeteazlar peptid bağlarının hidrolizini kataliz eden geniş bir aileye sahip olan enzimlerdir. Protezlar kendi içlerinde endopeptidaz ve ekzopeptidaz olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. Peptid bağlarını polipeptid zincirleri içerisinde kıran proteazlara endopeptidaz ve bu polipetid zincirlerini N ve C terminal bölgelerinden itibaren dekompoze eden proteazlara ekzopeptidazlar denir. (Lopez–Otin ve Bond, 2008). Proteaz terimi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz enzim grupları için kullanılırken proteinaz yalnızca endopeptidazları tanımlamak için kullanılmaktadır (Ryan, 1990). Proteazlar bütün organizmalarda mevcuttur ve kendilerine özgü fonksiyonel özelliklere sahiptirler: Hücre gelişimi için besinlerin üretimi, çoğalma (Lin ve ark., 2011), proteinlerin parçalanması (Ciechanover, 2005), farklı fiziksel fonksiyonlar için düzenleyici biyoajan olarak görev yaparlar (Ehrmann ve Clausen, 2004). Proteazlar katalitik aktivitelerine göre serin, sistein, metallo proteinazlar ve aspartik proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Kay, 1985).

Aspartik proteazlar birçok organizmada ve dokuda farklı fiziksel ve fonksiyonel özellikleri ile çok geniş bir dağılım göstermektedirler (Chitpinityol ve ark., 1998). Genel olarak asidik proteazlar olarak bilinen Aspartik proteazlar (APs; EC: 3.4.23) proteazların en önemli katalitik sınıflarındandır. Birçok organizmada ve dokuda farklı fiziksel, fonksiyonel özellikleri ile çok geniş bir dağılım göstermektedir. Doğada virüslerde, bitkilerde, memelilerde aspartik proteaz bulunabilmektedir. Aspartik proteaz grubunun en önemli alt grupları katepsin, pepsin ve kimozin enzimlerinden oluşmaktadır. Bu enzimler farklı kaynaklardan izole edilebilir. Bu kaynaklar;

1) Mide: Pepsin (EC 3.4.23.1) pepsin B (EC 3.4.23.2), gastriksin (EC 3.4 23.3), ve kimozin (EC 3.4.23.4) gibi abomasal mukozada inaktif (prekürzor) zimojen olarak bulunurlar. Pepsin yetişkin memelilerde yüksek miktarda bulunan bir aspartik proteazdır (Tang ve ark., 1973). Gastriksinler memeli midelerinin bütün kısımlarında, pankreas α hücrelerinde, prostat bezinde, sperm keselerinde bulunur. Kimozin yeni doğan memelilerin abomasal

mukozalarında hamilelik süresinden itibaren üretilmeye başlar: Buzağı (Foltmann, 1970), domuz (Foltmann ve ark., 1978) kedi yavrusu (Jensen ve ark., 1982), fok (Shamsuzzaman ve Haard, 1984) ve kuzu (Baudys ve Kostka, 1988; Pungercer ve ark., 1991) gibi hayvanların hücrelerinde bulunur. Sözü edilen çeşitli enzimlerin üretimi hayvanın yaşına ve beslenme düzenine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Andren ve Björck, 1986).

2) Birçok hücrenin lizozomları Katepsin D (Hurley ve ark., 2000) ve Katepsin E içermektedir. Katepsin E gastrik mukozada, timüste, dalakta ve kan hücrelerinde (Kageyama, 1995) bulunmaktadır. İnsan Katepsini (D) hücre içi ve endositoz yoluyla parçalanan proteinlerin prosesinde yer alabilir ve yayılabilen göğüs tümürlerinin prognostik indikatörüdür. Bu enzim peynirin olgunlaşmasında ve proteoliz evresinde önemli bir role sahiptir.

3) Böbrek ve çene altı bezleri gibi dokular rennin üretir (Kay, 1985). Rennin böbreklerin jukstaglomerüler hücrelerinde sentezlenir (Miyazaki ve ark.,). Rennin, kan basıncı ve sıvı dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

4) Bitkiler; kabak, salatalık, domates, arpa, pirinç, buğday, süpürge darısı, nilüfer çiçeği (Morris ve ark., 1985; Polanowski ve ark., 1985; Belozersky ve ark., 1989) gibi bitkilerden de asparik proteazlar izole edilebilmektedir.

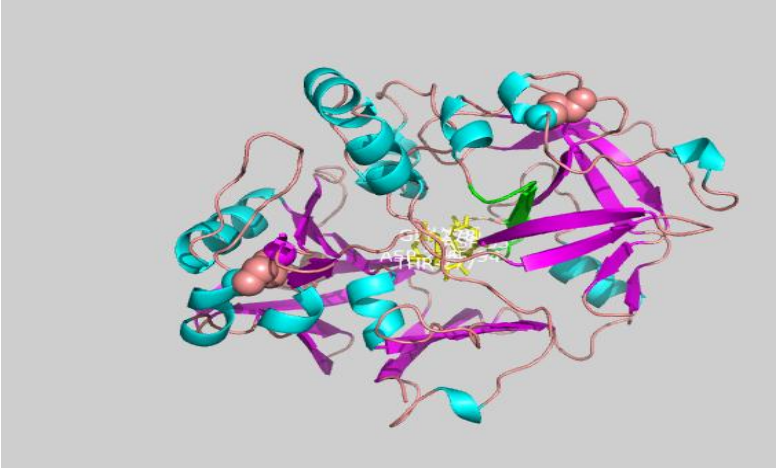
5) Mikroorganizmalar: Bazı aspartik proteazlar fungiler tarafından salgılanır; *Cryphonectria parasitica* (Sardinas, 1968), *Penicillium janthinellum* (Hofmann ve Shaw, 1964) *Rhizomucor pusillus* (Arima ve ark., 1970) *Rhizomucor miehei* (Sternberg, 1971) *Rhizopus chinensis* (Fumamoto ve ark., 1967) *Aspergillus niger* (Koaze ve ark., 1964). Proteazlar mayalarda da bulunmuştur; *Saccharomyces cerevisiae* (Mackay ve ark., 1988) *Candida tropicalis* (Togni ve ark., 1991).

1.1.Katepsin

Katepsinler lizozomal proteinazların içerisinde yer alan bir enzimdir ve ekzopeptidaz ve endopeptidaz ailesi içerisinde bulunur. Katepsin D, yaklaşık 40 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. Omurgasızların hepetopankreaslarında ve yaklaşık pH 3,5 düzeyinde optimal aktivite gösterir. Bazı katepsinler asidik pH ortamında aktifken, bazıları da nötral pH ortamında aktivite gösterirler. Katepsin D, bir aspartik proteazken kasta bulunan diğer katepsinler serin veya sistein proteazlar grubunda yer alırlar (Erickson ve ark., 1983). Katepsin D (EC 3.4.4.23) protein substratlarıyla birlikte pepsin gibi aktiviteye sahip bir endopeptidazdır. Fakat düşük moleküler ağırlıklı subsratlarla birlikte bu enzim aktivitesi pepsinden farklıdır. Katepsin enzimi 15 farklı grup olarak sınıflandırılmıştır. Bunların en önemlileri Katepsin A, B, D, V ve K'dır. (Anson, 1936; Nomura, Katunuma, 2005; Hook ve ark., 2011).

1.2. Pepsin

Pepsin ilk olarak 1836'da Alman Fizikçi Theodor Schwann tarafından izole edilmiştir. Amerikalı biyokimyacı John Howard Northrop 1929 yılında pepsinin protein yapısı ve kristalizasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Peptid zincirlerinin hidrolizini katalizleyen pepsin aspartik proteazların gastrik enzimler ailesine ait bir enzimdir. Birkaç çeşidi bulunan pepsinlerin bazı türleri pepsin A, B ve C, gastriksin ve kimozin olarak adlandırılır (Kageyema ve ark., 2002). Tüm bu enzimler inaktif form olan zimojenler olarak sentezlenir ve aktif forma ihtiyaç duyuluncaya kadar inaktif formları korunur. Pepsinin inaktif hali olan pepsinojen asidik ortamda pepsine dönüşür. Şekil 1.1. 'de tavşana (*Oryctolagus cuniculus*) ait pepsin A enziminin üç boyutlu protein yapısı gösterilmiştir (PyMol 2010 Schrodinger).

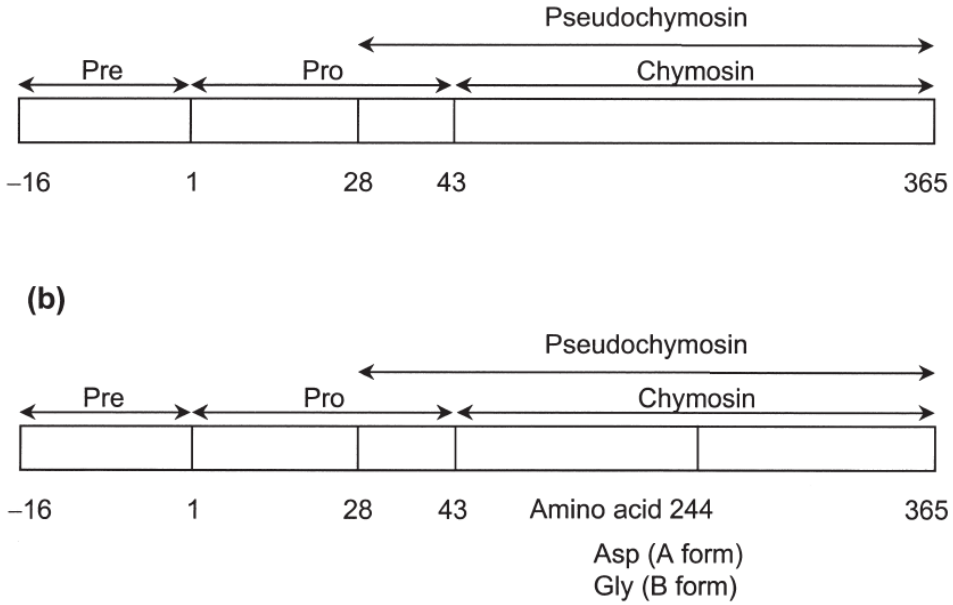


Şekil 1.1. Tavşan pepsininin üç boyutlu yapısı

1.3. Kimozin

Kimozin (EC 3.4.23.4) sütün pıhtılaşmasını sağlayan genç memelilerin midelerinin dördüncü bölümünde bulunan, 323 amino asitten oluşan ve 35,6 kDa ağırlığında olan bir aspartik proteazdır. Bu enzim mide mukozası tarafından inaktif prokimozin olarak salgılanır. İnaktif enzim 365 amino asitten oluşur ve 40,8 kDa ağırlığındadır. Asidik koşullarda 42 amino asidin oluşturduğu N terminal ön zincirinin otokatalitik ayrılması ile prokimozin aktif enzim halini alır (Foltmann, 1977) ve mide mukozası tarafından inaktif prokimozin olarak salgılanır.

Buzağı kimozininde iki farklı kimozin fraksiyonu görülmüştür; kimozin A ve kimozin B. Bu iki fraksiyon arasındaki tek fark polipeptid zincirindeki 286. Amino asitin farklı olmasıdır (Stanley, 1998). Şekil 1.2. ‘de görüldüğü gibi kimozin A’ da 286. amino asit kalıntısı aspartik asit iken kimozin B’ de ise glisin bulunmaktadır.



Şekil 1.2. Kimozin A ve kimozin B'nin şematik yapısı

1.3.1. Kimozinin çalışma mekanizması

Sığır sütü ve muhtemel diğer tüm türleri içeren mandaların sütleri belirgin olarak iki farklı protein grubu içerir; parakazein (pH 4.6 da ve 20 °C de çözünmez fosfoproteinler) ve peynir altı suyu (kazein içermeyen) proteinleri. Kazein sığır sütündeki nitrojenin yaklaşık %80'ni temsil eder. Kazein oranları sırasıyla 40:10:35:12 olan; alfaS1, alfaS2, beta(β) ve kappa(κ) dört temel proteinden oluşur. Tüm kazeinler fosforillenmiştir. Yüksek fosfat içeriğinden dolayı alfaS1, alfaS2, beta (β) kazeinleri Ca^{2+}'a güçlü bir şekilde bağlanır ve çökelti oluşur. Ancak, sadece bir tane fosfat kalıntısına sahip olan κ-kazein, güçlü bir şekilde kalsiyuma bağlanmaz ve ancak yüksek Ca^{2+} konsantrasyonunda çözünür. Aynı zamanda κ-kazein, alfaS1, alfaS2, beta (β) ile hidrofobik olarak tepki verir ve kalsiyuma duyarlı kazeinlerin ağırlığının, iri kolloidal küme formlarında çökelti oluşturmasına karşı 10 kata kadar stabile edebilir. Sütte doğal formda kazeinin %95 ten fazlası büyük kolloidal parçacıklar ve miseller olarak bulunur (Foltman, 1987; Fox, 1988).

Pıhtılaşma iki aşamalı bir prosestir; birincisi, ilk faz (proteolitik evre), parakazeinin (çözünmez) enzimatik üretimini ve glikomakropeptidlerin (çözünür) oluşumunu içerir.

Birinci aşamada rennetteki asit proteazlar özellikle rennin (kimozin) κ-kazeini fenilalanin (105)-metiyonin (106) arasındaki tek bir peptid bağını hidrolize ederek para-κ-kazein ve glikomakropeptide dönüştürür.

κ-kazein → Enzim-κ-kazein kompleksi→Enzim+para-κ-kazein+glikomakropeptid molekülü

İkinci faz; pıhtılaşma evresi olarak isimlendirilir ve parakazeinin 20 °C' den yüksek sıcaklıkta Ca^{2+} ile çökelti oluşturması ve jelleşmesini içerir. Proteolitik evre aslında tam pıhtılaşmanın başlangıcından öncedir (Fox, 1988).

Rennin enziminin etkisiyle κ-kazein, para-κ-kazein ve glikomakropeptid şeklinde parçalanmaktadır. Bu durumda kalsiyum karşısında α-s1 ve β kazeinlerin stabilitesi bozulur. Enzimatik proteoliz sırasında makropeptit moleküllerinin ayrılması nedeniyle miseller küçülür, negatif yükleri azalır ve viskozite geriler.

$$\text{Para-k-kazein} \xrightarrow{Ca^{2+}} \text{KalsiyumParakazeinat (Jel)}$$

Kazeinat sistemde rennin etkisi süresince κ-kazein öncelikli olarak harekete geçerken, kazeinin diğer fraksiyonları çok az harekete geçer. Renin ile κ-kazein fraksiyonun enzimolizizi, pH 6.7' de kalsiyum yokluğunda para-κ-kazeinat fraksiyonun çökmesine sebep olur. Renin etkisi, sisteme kalsiyumun eklenmesine bağlıdır. Ortamda kalsiyum olmadığında, kendi kendine çözünmeyen para-κ-kazein kalsiyuma duyarlı kazeinlerle etkileşime geçerek çökelmeden korunur. Kalsiyum iyonlarının varlığında çözünmez para-κ-kazein fraksiyonları ile kalsiyuma duyarlı kazeinat fraksiyonları bir pıhtı oluşturur (Fox, 1988; Mathur ve Dutta, 1983). Phe 105 ve Met 106 arasındaki bağların κ-kazeinin ayırması ile kimozin süt pıhtılaşmasını başlatır (Foltman, 1987; Kaye ve Jolles, 1978). Bu bağ, süt protein sisteminde asit proteinazlar için diğer peptid bağlarından çok daha hassastır. Phe-Met bağının tek hassasiyeti dikkate değer etkileri harekete geçirmesidir. HPhe-MetOH arasındaki dipeptid bağı hidroliz olmaz, Phe-Met bağı içeren hem tetrapeptidler hem de tripeptidler hidroliz olmazlar. Ancak bu bağ beşli peptidlerde, HSer-Ser-Phe-Met-Ala-OHze, hidroliz olur (Fox, 1988; Hill, 1968). Peptid bağlarının uzunluğu ve düzgün

kesilebilir bağ etrafındaki dizilimi, enzim-substrat etkileşiminde önemli belirleyicilerdir (Fox, 1988).

1.3.2. Rekombinant kimozin

Rekombinant kimozin, peynir yapımında potansiyel olarak kullanışlıdır ve tam anlamıyla hayvansal kaynaklı enzimlerin yerini alabilir. Rekombinant kimozin birçok peynir çeşidi üretiminde kullanılmış ve üretilen bu peynirlerin kalitesi ile buzağı renneti ile üretilen peynirlerin kalitelerinin karşılaştırabilir olduğu görülmüştür (Houen ve ark., 1996; Mohanty ve ark., 2003; Rogelj ve ark., 2001; Vega-Hernandez ve ark., 2004; Kappeler ve ark., 2009). Son yıllarda yürütülen çalışmalar daha çok maya sistemleri kullanılarak rekombinant kimozin üretimi üzerinde odaklanmış ve bu amaçla daha iyi optimize edilmiş heterolog maya ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Protein mühendisliğinin gıda üretim sistemlerine uygulandığı en önemli alanlardan birisi moleküler kimozin dizaynıdır. Protein mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant kimozinin aktivitesi artırabilir ve enzimin optimum çalışabilmesi için ideal pH değeri ayarlanabilir.

1.3.3 Tavşan kimozini

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda domuz, buzağı, kuzu, keçi ve son olarak deve kimozinin gen dizilimi ve bu genlerin karekterizasyonu yapılmış ve bunların rekombinant üretimi sağlanmıştır. Ancak kimozin için yeni kaynak arayışları devam etmektedir. Nüfusun giderek arttığı ve buna bağlı olarak peynir tüketiminin de arttığı günümüzde kimozin için kaynak arayışları da artmaktadır. Tavşan midesinden (abomasum) izole edilen rennetin peynir yapımı için önemli bir kaynak olduğu belirtilmiştir (Rao ve Dutta, 1981) ve peynir üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir. Ancak tavşanın kimozin geninin karakterizasyonuna ve gen diziliminin belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) genomundan kimozin geni izole edilerek karakterizasyonunun yapılması hedeflenmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Aspartik Proteazlar

Aspartik proteazlar birçok organizmada ve dokuda farklı fiziksel ve fonksiyonel özellikleri ile çok geniş bir dağılım göstermektedir (Chitpinityol, 1998). Kimozin ve aspartik proteazların moleküler ağırlıkları 32 ile 39 kDa aralığında değişmektedir. İzoelektrik noktaları izoenzim, otodegredasyon ve post translasyon ürünlerinin sayısıyla ilgili olarak çeşitlilik göstermektedir. N- bağlı glikolizasyon, katepsin D (N_{67} ve N_{183}) *Rhizomucor* proteaz, (N_{173}) ve insan rennini gibi birkaç proteinazda tespit edilmiştir. Fosforilasyon için domuz pepsini (S_{68}) (Tang ve ark., 1973), sığır pepsini ve katepsin D'de (Martin ve Corre, 1984; Metcalf ve Fusek, 1993) spesifik reseptörler bulunmuştur. Transgenik koyun kimozini buzağı kimozini ile benzerlik göstermektedir (Mezina ve ark., 2001). *Rhizomucor* proteaz, *cryphonectria* proteaz ve *S. cerevisia* proteinaz A pH 3.5- 7.0 arasında stabildir (Sardinas, 1968; Dreyer ve ark., 1986; Bailey ve Siika-aho, 1988).

Karbonhidrat içeren Aspartik proteazlar yüksek sıcaklık, denatürantlar ve degredasyonlara karşı karbonhidrat içermeyen proteinlerden daha kararlıdır (Aikawa ve ark., 1990; Berka ve ark., 1990; Brown ve Yada, 1991). Kimyasal ya da genetik modifikasyon yoluyla *Rhizomucor* proteazların glikolizasyonları daha kararsız bir yapıya dönüşür ve süt pıhtılaştırma aktivitesinin proteolitik aktiviteye oranında (C/P) artışa sebep olur (Brown ve Yada, 1991; Aikawa ve ark., 1992).

Bazı mikrobiyal aspartik proteazların; *S. cerevisiae* (Ammerer ve ark 1986), *C. tropicalis* (Togni ve ark., 1991), *R. pusillus* (Tonouchi ve ark., 1986) ve *R. miehei* (Gray ve ark., 1986) genlerinde intron olmadığı görülmüştür. Ancak *R. niveus* aspartik proteazında bir tane (Horiuchi ve ark., 1988) ve *A. awamori* (Berka ve ark., 1990) aspartik proteazında 3 tane kısa intron görülmüştür fakat ekzon ve intron bağlanma noktaları memeli ve kuş proteazlarından farklı durumdadır.

Aspartik proteazların sinyal peptit uzunlukları yaklaşık olarak 15-24 rezidü aralığındadır. Salgılanan bu dizilim hidrofobik amino asitler bakımından zengindir (Fox ve ark., 2004).

2.2. Kimozinin Fiziksel özellikleri

Kimozin (EC 3.4.23.4) sütün pıhtılaşmasını sağlayan genç memelilerin midelerinin dördüncü bölümünde bulunan, 323 amino asitten oluşan ve 35,6 kDa ağırlığında olan bir aspartik proteinazdır. Bu enzim mide mukozası tarafından inaktif prokimozin olarak salgılanır (Foltmann, 1977).

Kimozinin en stabil olduğu pH değerleri 5,3 ve 6,3 aralığıdır. Ancak kimozin pH 2 de bile kısmen kararlılık göstermektedir (Foltmann, 1959a). Asidik koşullar altında (pH 3,4) enzim aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmektedir (Cheeseman,1965). Kimozin A'nın aktivite kaybı Kimozin B'den daha yüksektir (Foltmann, 1966). Kimozin oda sıcaklığına göre 2 °C'de daha kararlıdır (Foltmann, 1959b). Kawaguchi ve ark. (1987), sıcaklığı 45 °C'den 55°C'ye çıkarttığında kimozinin aktivitesini hızlı bir şekilde kaybettiğini belirtmişlerdir. Histidinin foto oksidasyonunun yanı sıra lizinin ε-amino grubunun modifikasyonu kimozinin aktivitesini az bir oranda etkiler (Hill ve Laing, 1965; Simith ve ark., 1991b,c). Kimozin inkübasyon sonrası (4,6 mol/l ürede ve 37 °C 'de 30 dakkika) aktivitesinin yaklaşık olarak yarısını kaybetmektedir (Sugrue ve ark., 1990). Kimozinin denatürasyonundan sonra kimozinin yeniden katlanması için hem öncül kısım (propart) hem de sistein rezidüleri gereklidir (Sugrue ve ark., 1990; Huang ve ark., 1992). Kimozin kristal formda çok kararlı bir şekilde görünmektedir (Foltmann, 1992). Nötral pH ortamında prokimozin kimozinden daha stabildir (Foltmann, 1966). pH 5.0 altında prokimozin kimozine dönüşürken pH 11.0'in üstünde prokimozin konformasyonel değişimden dolayı stabilitesini kaybeder. Psödokimozin asidik pH'da günler boyunca stabildir fakat pH 4,5 üstüne çıkartılırsa hızlı bir şekilde kimozine dönüşür (Barkholt ve ark., 1979).

Pepsin genel olarak kimozinden daha büyük bir kararlılık (stabilite) göstermektedir; örneğin inkübasyondan sonra (6 mol/l ure 37 °C 30 dk) aktivitesinin

yalnızca %10'nu kaybetmektedir (Cheeseman, 1965). Pepsinin termostabilitesi yüksek pH çözünürlüğünde, üre varlığında ya da tuz solüsyonunda düşürülmektedir. Ancak pepstatin (Aspartik proteaz inhibitörü) varlığında termostabilitesi artırılır (Privalov ve ark., 1981). pH 6.0' da pepsin pepsinojenden daha kararlıdır. pH 8.5 ve 10.5 arasında prokimozin pepsinojenden daha az kararlı ve asidik ortamda pepsinojen aktif forma dönüşmez (McPhile, 1975). Hava oksidasyonunun yeniden kontrol edilmesi ile Prokimozin etkili bir şekilde yeniden katlanabilir (Menzella ve ark., 2002).

Kimozinin enzim çözünürlüğü pH, sıcaklık ve iyonik güçten etkilenmektedir (Foltmann, 1959b). Kristalize olmayan kimozin 1 mol/l NaCl ve pH 5.5 solüsyonunda çözünür durumdadır. Çözelti konsantrasyonu 2 mol/l NaCl miktarından fazla olduğunda kimozininin çözünmediği görülmüştür. Kristalleşmiş kimozin 2 °C'ye göre 25 °C 'de daha yüksek çözünürlük göstermektedir (Foltmann, 1970) ancak kimozinin amorf çökeltileri 2 °C daha kararlıdır. pH değeri izoelektrik noktasına yaklaştığında kimozin oldukça çözünmez bir yapı halini almaktadır. İyonik gücün artmasıyla kimozinin çözünürlüğü de artmaktadır.

2.3. Kimozinin Yapısal Özellikleri

Kuşlar (avia) ve memeli proteazları, tavuk embriyonik pepsinojeni (Hayashi ve ark., 1988), insan renini (Miyazaki ve ark., 1984), sığır kimozini (Hidaka ve ark., 1986) ve insan pepsinojenin (Sogawa ve ark., 1983) genomik DNA'sı 9 ekzon ve bu ekzonları ayıran 8 introndan oluşmaktadır. Tüm ekzon ve intronların bağlanma noktalarındaki bölgeler son derece iyi korunmuştur.

Buzağı kimozinin A ve B olmak üzere başlıca iki formu bulunmaktadır. Kimozin B daha yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kimozin A ve kimozin B arasındaki tek fark polipeptid zincirindeki 286. amino asitin farklı olmasıdır (Stanley, 1998). Kimozinin üçüncü bir formu olan kimozin C, kimozin A'nın degredasyonu sonucu (D_{244} ve F_{246} rezidülerinin kaybolması) ortaya çıkmaktadır (Danley ve Geoghegan, 1988). Kimozin A ve B'nin aynı polimorfik genin farklı allellerinden sentezlenmesi muhtemeldir.

Buzağı genomu ile kimozin geninin hibridizasyonundan kimozin geninin çoklu gen ailesi yerine sadece bir lokusunun olduğu bulunmuştur (Donnelly ve ark., 1986).

Kimozin sinyal peptid kısmı 16 amino asitten oluşmaktadır (Moir ve ark., 1982; Mellor ve ark., 1983).

Aspartik proteazların pro peptid kısımları 38-54 rezidü aralığında ve bazik rezidüler bakımından zengindir. Dizilim benzerliğinin ilgili enzimler arasında fazla olmasına rağmen pro segmenti ile aktif enzimin kırılma noktalarında değişkenlikler bulunmaktadır. Lizin rezidü (K_{36p} pepsin numaralandırması) kuzu prokimozini ve arpa aspartik proteazı dışında tüm proteazlarda korunmuştur. Bu rezidünün zimojen molekülünde katalitik aspartik rezidüleri ile etkileşimde olduğu kabul edilmiştir (James ve Sielecki, 1986; Foltmann, 1988). Zimojenlerin aktivasyonun kontrolü ve doğru katlanması için pro segmenti önemlidir (Koelsch ve ark., 1994).

Kimozin tek bir polipeptid zincirinde 323 amino asit rezidüsü bulunduran bir enzimdir. Bu rezidüler düşük miktarda bazik rezidüleri ve fazla miktarda dikarboksilik ve β-hidroksi amino asit rezidülerini içermektedir (Foltmann ve ark., 1977, 1979; Harris ve ark., 1982; Moir ve ark., 1982; Hidaka ve ark.,1986).

Sistein rezidü sayıları kimozin zincirlerinde değişkenlik göstermekte fakat konumları zincirlerde korunmuş durumdadır. Bundan dolayı *Rhizomucor* ve *Rhizopus* enzimleri için iki disülfat köprüsü, Cryphonectria, Penicillum ve Aspergillus enzimleri için tek disülfat köprüsünün olması muhtemeldir ancak *ırpex* aspartik proteazı için disülfat köprüsü bulunmamaktadır.

Kimozininin ikincil yapısı ağırlıklı olarak β yaprakları ve birkaç α-helezon (helical) segmentlerinden oluşmaktadır. İplikler (strand) N terminali bölgesinde a_N, b_N, c_N, d_N, a'_N, b'_N, c'_N d'_N q_N ve r_N olarak isimlendirilmiştir; C terminali bölgesinde ise a_C, b_C, c_C, d_C, a'_C, b'_C, c'_C, d'_C, q_C ve r_C olarak adlandırılmaktadır. Helezonlar C terminal ve N terminal bölgesinde h_N ve h_C olarak adlandırılmaktadır. Antiparelel β-iplikleri iyi bir şekilde tanımlanmış olan üç yaprağı (β-sheet) oluşturur (Newman ve

ark., 1991). 1N ve 1C β yaprakları yedi veya sekiz iplikten oluşmaktadır. b, c, b' ve c' iplikleri 2N ve 2C yapraklarını oluşturmaktadır. Bu yapılar 1N ve 1C β yapraklarının alt kısmında oluşmuştur. Üçüncü yaprak tümü antiparalel olan aN, rN, qN, qC, rC ve aC olmak üzere altı iplikten oluşmaktadır ve bu yaprak aktif bölgeleri oluşturan ipliklerin alt kısmına yerleşmiştir.

Bazı aspartik proteazların üç boyutlu yapısı X ışını kristalografisinde çözülmüştür. Bunlardan bazıları domuz pepsini (Andreeva ve ark., 1984; Abad Zapatero ve ark., 1990; Cooper ve ark., 1990; Sielecki ve ark.,1989) pepsinojen (James ve Sielecki, 1986; Hartsuck ve Remington, 1988) insan renini (Sielecki., 1989) ve retroviral proteazlardır (Lapatto ve ark.,1989; Miller ve ark., 1989; Wlodawer ve ark., 1989).

Kimozin kristalleri Bunn ve ark. (1971), tarafından oluşturmuştur. Rekombinant sığır kimozinin yapısı 2.3 °A çözünürlükte (Gilliland ve ark., 1990) ve 2.2°A çözünürlükte (Newman ve ark., 1991) çözülmüştür. Kimozinin spesifik bir mutantı üzerine 2.2 °A çözünürlükte kristalografik çalışmalar uygulanmıştır. Bu spesifik mutantta V_{111} fenilalanin ile yeri değiştirilmiştir (Strop ve ark., 1990). Tüm moleküller çok benzer ikincil ve üçüncül yapılar göstermektedir.

Kimozin B'nin yapısı Gilliland ark. (1990) ve Newman ve ark. (1991), tarafından tanımlanmıştır. Kimozin kristalleri 1222 uzay grubunda, boyutları genel olarak yaklaşık 40x60x65 °A boyutundadır (Gilliland ve ark., 1990). N ve C terminal alanları enzimin iç kısmında derinlerde bulunan aktif bölgeler ile ayrılmıştır. Bu alanlar proteinin bilobal katlanma desenlerini oluşturmaktadır. 2,5 °A'da büyütülmüş aktif bölgelerin katalitik aspartatlar ve substrat bağlanma bölgeleri içerdiği görülmüştür. Simetrik olan N ve C lobları aktif bölgenin iç kısmında ve enzimin merkezinde bulunmaktadır (Newman ve ark., 1991). Üç disülfat köprüsü 45…50, 206…210 ve 249…282 rezidülerinde konumlanmıştır. Buna ek olarak iyon çiftleri R59…D57, R157…E308, R157…I326 (COO^{-}), R307…D11 ve R315…D138 arasında bulunmuştur (Gilliland ve ark., 1990; Newman ve ark., 1991).

Aspartik proteazların aktif bölgeleri oldukça iyi korunmuştur ve bu bölgeler Asp-Thr-Gly rezidülerini içermektedir. Kimozinin N ve C-terminal loblarında dizilimler arasındaki benzerliğin % 9 olduğu gözlenmiştir (Newman ve ark., 1991).

Kimozinin yapısı diğer aspartik proteazlar ile karşılaştırıldığında yüksek miktarda yapısal benzerliklerin olduğu ortaya çıkmıştır (Gilliland ve ark., 1990). Kimozin domuz pepsinine yapısal olarak çok yakındır. Fungal proteazlar, rhizopus proteaz moleküllerin kimozine olan yapısal benzerlikleri penicillopepsin ya da cryphonectria proteazlardan daha fazladır. Kimozinde Y_{77} rezidünün konumu hidrofibik olan F_{119} ve L_{32} rezidüleri ile etkileşimi sonucu stabilize edilmiştir (Gilliland ve ark., 1990).

Kimozin iki alternatif yapısal form bulundurmaktadır: Aktif oluşumda S1 ve S3 bağlanma paketleri bulunmaktadır bunlar substrata bağlanmak için serbest bir haldedir (Adreeva ve ark., 1992; Gustchina ve ark., 1996).

D_{32} ve D_{215} aktif aspartatları N ve C-terminali alanlarında iki uzun spiralin (loop) içinde bulunmaktadır. Bu iki aspartat zinciri hidrojen bağları ile desteklenmiş ve oluşan bu komplike yapıya 'firemans grip' tanımlaması yapılmıştır (Strisovsky ve ark., 2000). Bu oluşum, iki spiralin (loop 31-35 rezidü ve 214-218- rezidüleri) ve bir merkezi su molekülünün interaksiyonu sonucu oluşmuştur.

2.4. Rekombinant Kimozin

Herhangi bir kaynaktan elde edilen kimozinin aktivitesini ve kullanılabilirliğini en iyi test etme yolu onu peynir yapımında kullanmaktır. Daha önce yürütülen çalışmalar farklı konakçılar kullanılarak rekombinant kimozin üretimi yapılabileceğini ortaya koymuştur. Kimozin geninin klonlanması ve karakterizasyonu üzerine birçok araştırma grubu çeşitli plazmidler ve konakçı hücreler kullanarak çalışmalar yürütmüştür. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) *Escherichia coli* K12 kullanılarak üretilen kimozinin gıda maddeleri üretiminde kullanımını GRAS (Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen) statüsüyle onaylamış ve rennet yerine ikame olarak

kullanılabileceğini öngörmüştür (Flamm, 1991). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda; Kim ve Kim (1986), Cheddar peynirinin olgunlaşması üzerine *Mucor* kaynaklı enzimin etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda *Mucor miehei*'den elde edilen enzimle üretilen peynirin buzağı kimozin enzimi ile üretilen peynire göre peynir suyuna geçen yağ ve protein oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Şahan ve Konar (1990), yaptıkları çalışmada mikrobiyal kaynaklı enzimlerin (*Mucor miehei, Mucor pusillus Mucor miehei, Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*) genellikle asit proteaz olduğunu ve abomasum kaynaklı peynir mayasına göre daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduklarını belirlemiştir. Bu mikrobiyal kaynaklı kimozinin peynirin tat ve tekstüründe çeşitli bozulmalara yol açtığını belirlemişlerdir. *E. coli* ve mayalardan elde edilen kimozin ile üretilen peynirler ve geleneksel maya olan rennet ile yapılan birçok araştırma için Genex ve diğer ticari gruplar mali destek sağlamıştır (Genex, 1985).

Danimarka'da Chr. Hansen A/S Bio Ingredients şirketi, laboratuvarlarında kimozin enzimi kodlayan genleri, dana midesinden izole ederek genetik modifikasyon ile *Kluyveromyces lactis*'e aktarmışlardır ve bu mikroorganizmalar kullanılarak fermentasyon tanklarında kimozin üretimi gerçekleştirmişlerdir. *E. coli* ve maya kullanılarak üretilen kimozin ile yapılan peynir ve buzağı rennetinden yapılan peynir karşılaştırıldığında, mikrobiyal kimozin ile üretilen peynirlerin tat ve dokusunda kontrol örneklerine göre tespit edilebilir kayıp olmadığı ortaya konulmuştur (Mohanty, 1995).

Aspergillus niger, K. lactis ve E. coli kullanılarak üretilen rekombinant kimozin de başarılı bir şekilde peynir üretim denemelerinde kullanılmıştır. Farklı peynirlerin üretimindeki pek çok denemede (dambo, gouda, emmentale, cheddar, gravyer, edam, tilsiter, crasiote ve grana) geleneksel yöntemlerle hazırlanan rennet ve mikrobiyal kimozin kullanılarak üretilen ürünlerin kalitelerinde önemli farklılıklar olmadığı belirlenmiştir (Brusgard, C.1993).

Yun ve ark. (1993), mozarella peynirini *Endothia parasitica, Mucor miehei* ve hayvansal kaynaklı kimozin olmak üzere üç farklı pıhtılaştırıcı ile üretmişlerdir. *Endothia parasitica, Mucor miehei* ve hayvansal kimozin ile yapılan mozerella

peynirindeki pH, rutubet, yağ, protein, tuz ve Ca parametrelerinde önemli bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir.

Rekombinant kimozin, peynir yapımında potansiyel olarak kullanışlıdır ve tam anlamıyla hayvansal kaynaklı enzimlerin yerini alabilir. Rekombinant kimozin birçok peynir çeşidi üretiminde kullanılmış ve üretilen bu peynirlerin kalitesi ile buzağı renneti ile üretilen peynirlerin kalitelerinin karşılaştırabilir olduğu görülmüştür. Son yıllarda yürütülen çalışmalar daha çok maya sistemleri kullanılarak rekombinant kimozin üretimi üzerinde odaklanmış ve bu amaçla daha iyi optimize edilmiş heterolog maya ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Protein mühendisliğinin gıda üretim sistemlerine uygulandığı en önemli alanlardan birisi moleküler kimozin dizaynıdır. Protein mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant kimozinin aktivitesi artırabilir ve enzimin optimum çalışabilmesi için ideal pH değeri ayarlanabilir (Mohanty, 1999).

Rekombinant kuzu kimozini peynir üretimindeki kullanımı için hazırlanmış ve test edilmiştir. Rekombinant kuzu kimozinin sütün pıhtılaşma aktivitesi ve proteolitik aktivitesi ticari rekombinant buzağı kimozini, buzağı renneti, mikrobiyal pıhtılaştırıcılarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Rekombinant kuzu kimozini, rekombinant buzağı kimozini, buzağı renneti ve mikrobiyal pıhtılaştırıcılar pH değerlerinde benzer özellikler göstermiştir. Rekombinant kuzu kimozinin proteolitik aktivitesi buzağı rennetinden kayda değer bir şekilde düşüktür, fakat rekombinant buzağı kimozininden pek farklı değildir. Rekombinant kuzu ve buzağı kimozini ile yapılan peynirlerin toplam kaliteleri arasında farklılıkların çok az olduğu tespit edilmiş ve her iki peynir, buzağı renneti ile yapılan peynirden daha iyi sonuç vermiştir (Rogelj ve ark., 2001).

Vega-Hernández ve ark. (2004), keçi abomasumundan preprokimozin cDNA‘sını karakterize ederek klonlamışlardır. Daha sonra üretmiş oldukları rekombinant plazmitleri *Kluyveromyces lactis* ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine transforme etmişlerdir. Her iki transformant organizmanın kültür süpernatantları asidik pH‘daki aktivasyonlarından sonra süt phtılaştırıcı aktivite göstermişlerdir. Üretmiş oldukları rekombinant keçi kimozininin kazein

fraksiyonlarına karşı proteolitik aktivitesini ölçmüşler ve enzimin özellikle κ-kazeini hidrolize ettiğini belirlemişlerdir.

Kappeler ve ark. (2006), yaptığı çalışmada *Aspergilus niger'*de ekspres edilen rekombinant deve kimozininin enzimatik özellikleri ve ekspresyonu araştırılmıştır. Deve kimozinin, bovin kimozininden farklı özellikler gösterdiği gözlenmiştir. Sığır sütüne deve kimozini uygulandığında % 70 ten daha yüksek pıhtışlaştırma aktivitesi göstermiştir. Ayrıca bu enzimin ısıya dayanıklılığı bovin kimozininden daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Vallejo ve ark. (2008), *Pichia pastoris* süpernatant kültüründe rekombinant kimozin enzimini üretmişlerdir. Bu mikroorganizmayı seçme nedenleri, mikroorganizmanın kendine yabancı rekombinant proteinlerin üretiminde ve sekresyonunda çok kullanışlı olmasıdır. Buzağı abomasumundan RNA izole etmişler ve daha sonra preprokimozin, prokimozin ve kimozinin DNA sekanslarını izole ederek bunları *Pichia pastoris*'te eksprese etmişlerdir. Böylece bu çalışma ile aktif rekombinant kimozin enziminin üretimini *Pichia pastoris*'te ilk kez gerçekleştirmişlerdir.

El-Sohaimy ve ark. (2010), buzağı abomasumundan RNA izolasyonu yapmışlar ve bu saflaştırdıkları RNA'lardan da RT-PCR (Ters Transkriptaz PCR) yöntemiyle kimozinin cDNA'sını üretmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri cDNA'yı kullanarak *E. coli*'de rekombinant kimozin üretmeyi başarmışlardır. Araştırmacılar ürettikleri kimozin ile yaygın olarak kullanılan emsallerini karşılaştırdıklarında rekombinant kimozinin diğerlerine göre %105 oranında daha fazla pıhtılaştırıcı aktiviteye sahip olduğunu görmüşlerdir.

Wang ve ark. (2015), deve kimozinini *Pichia pastoris'*te ekspresyonu ve karakterizasyonunu yapmıştır. Bu çalışmada deve prokimozin geni sentezlenmiş ve pPIC9K vektörüne klonlamıştır. Bu vektör yardımıyla deve prokimozin geni *Pichia pastoris* mayasına transforme edilmiştir. Kimozin geninin ekspresyonu AOX1 uyarıcı promotörünün kontrolü altında yapılmıştır. Maya sistemi laboratuar koşulları altında 37mg/L rekombinant enzim üretmiştir. Bu çalışmanın sonucunda deve kimozinin

Pichia pastoris'te ekspresyonu, peynirin ticari olarak üretiminde kullanılmak üzere aktif prokimozin üretimi için mükemmel bir sistem olarak gösterilmiştir.

2.5. Biyoinformatik Çalışmalar

Mello ve ark., (2009) aspartik proteazların karekterizasyonu, farklı türler arasındaki evrimsel ilişkisini ve moleküller yapılarını incelemişlerdir. Bunun için farklı veri tabanlarından (www. sanger.ac.uk, BLASTx, GenBank, NEBC) türlerin amino asit dizilimlerine ulaşılmıştır. Amino asit dizilimleri belirlenen türler için protein dizilimleri arasındaki benzerliğin (MUSCLE, Multiple Sequence Alignment) baz alındığı merkezi bir noktası olmayan (unrooted tree) bir ağaç çizilmiştir (MEGA software) bu ağaca göre aspartik proteazların üç grup içerisinde dallandığı görülmüştür.

Seddigh ve Darabi (2016), yaptıkları çalışmada 11 farklı ailenin 19 türünü içeren böcek proteinlerinin dizilimi üzerine aspartik proteazların biyoinformatik analizini yapmışlardır. MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) ve MAST (Motif Alignment and Search Tool) programları kullanılarak oluşturulan korunmuş motiflere göre incelenen tüm böceklerde üç motifin ortak olduğu görülmüştür. ExPASy veritabanındaki protparam, SOPMA, SignalP 4.1, TMHMM 2.0 ve proDom programları ile farklı dizilimlere sahip seçilmiş 5 böceğin (tür) yapısal ve fonksiyonel özellikleri analiz edilmiştir. Protein dizilimlerinin karşılaştırılması için MegAlign programı kullanılmıştır. Filogenetik ağaç MEGA 6.06 (neighbor -joining Method) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

El-Sohaimy ve ark. (2010), rekombinant olarak elde ettikleri kimozinin hem nükleotid dizilimi hem de amino asit dizilimlerine göre 20 farklı kimozin geni ile karşılaştırılmasını yapmış ve 2 adet filogenetik ağaç çizilmiştir. Çizilen ağaçlarda başlıca iki grup görülmüştür: Bunlardan biri sığır türünü diğeri de deve türünü içermekte ve elde edilen rekombinant kimozinin 1.grup içerisinde olduğu ve *Bos primigenius* (yaban öküzü) türüne daha yakın olduğu tespit edilmiştir.

Dou ve ark., (2014) *Asp55* geninin klonlanması ve dizilim analizini gerçekleştirmiştir. Bunun için ileri ve geri olmak üzere bir çift primer tasarlanmıştır. *Asp55* geninin DNA ve cDNA dizilimlerine Gen Bankasından ulaşılmıştır. *Asp55* in Protein ailesi Pfam programı (http://pfam.sanger.ac.uk/) kullanılarak analiz edilmiştir. Dizilimlerin çoklu karşılaştırılması ClustalX programı ile yapılmıştır (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/). Filogenetik ağaç MEGA 5.10 (The neighbor-joining method) programı kullanılarak çizilmiştir.

Kageyama ve ark. (1990), tavşan pepsinojenlerinin yapısının ve gelişiminin açığa kavuşturulması, bu proteinlerin saflaştırılması ve moleküler klonlanması için farklı gelişme evreleri uygulamıştır. Bunun için birkaç pepsinojen türü izole edilip pepsinojen l, ll ve pepsinojen lll grupları içerisinde pepsinojen F ve pepsinojen M olarak sınıflandırılmıştır. Gelişim süresi boyunca çeşitli pepsinojenlerin spesifik aktiviteleri ve nisbi seviyeleri önemli bir miktarda değişim göstermiştir. Pepsinogen F ve M sadece doğum sonrası evrenin erken döneminde tespit edilmiş ve bu pepsinojenlerin miktarı diğer pepsinojen miktarlarından çok daha yüksek seviyede görülmüştür. Pepsinojen l, ll ve lll grupları doğum sonrası evrenin geç döneminde baskın zimojenler olarak görülmüştür. Pepsinojen l ve M dışındaki kodlanmış tüm pepsinojenlerin cDNA klonları oluşturulmuş ve nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. Her cDNA zinciri 15 amino asitten oluşan sinyal peptid (lider bölge), 44 amino asitten oluşan aktivasyon bölgesi (propepsin) ve 328 amino asitten oluşan pepsin bölgesi bulundurmaktadır (pepsinojen F bu durumun dışında, propepsin kısmı 43 amino asitten pepsin kısmı 330 amino asitten oluşmaktadır). Pepsinojen ll ve lll grupları birbirleriyle yüksek derecede benzerlik gösterirken pepsinojen F'de birçok yer değişimi bulunmuştur. Pepsinojen F'nin aktivasyon bölgesinde 21. amino asitteki Gly→Asp olarak belirtilen özgün yer değişimi (ikame) bu bölüme daha spesifik bir yapısal özellik kazandırmıştır. Farklı nükleotid dizilimlerinden yola çıkılarak çizilen filogenetik ağaçlardan açıkça görülmektedir ki ll. ve lll. gruplarda bulunan her pepsinojen, pepsinojen A (memelilerde bulunan başlıca pepsinojendir) olarak sınıflandırılmıştır. Pepsinojen F bu gruptan büyük ölçüde farklılık göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan materyali

Bu çalışmada kullanılan *Oryctalagus cuniculus* (tavşan) materyalleri Şanlıurfa piyasasında satılan tavşan derilerinin satın alınıp, uygun koşullarda laboratuvara taşınması ve saklanmasıyla elde edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal maddeler

DNA'nın tavşandan izole edilmesi için Thermo scientific firmasından GeneJet DNA Saflaştırma #K0721 kiti, Proteinaz K; DNA saflaştırması için Qiagen firmasından QİAquik DNA saflaştırma kiti; PZR analizleri için Biolab firmasından PZR kiti (Magnezyum klorür , dNTP, standart buffer, Taq Polimeraz) ve primerler Sigma firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Tavşan kimozin geninin izolasyonu ve karakterizasyonu için biyoinformatik analizler ve PZR analizleri yapılmıştır.

3.2.1. DNA ekstraksiyonu

Termo scientific firmasından alınan DNA saflaştırma kiti (GeneJet DNA purification kit # K0721) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. 400 µl liziz solüsyonu ile 20 µl proteinaz K karıştırılmış ve üzerine 200 µl örnek (tavşan derisi) eklenmiştir. Oluşan karışım üniform bir yapı oluşuncaya kadar vortekslenmiştir. Daha sonra 15 dakika buzda bekletilmiştir. 56 °C'de 40 dakika bekletildikten sonra 10 dakika daha vortekslenmiştir. 200 µl %96-100 etanol eklenmiş ve tekrar

vortekslenmiştir. Etanol eklenen karışım DNA saflaştırma kolonuna eklenmiştir. Kolon 6000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonun altında biriken sıvı toplama tüpüyle birlikte atılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Bundan sonra üzerine 500 µl yıkama tampon çözeltisi 1 (wash buffer 1) eklenmişitir. Yeni tüple birlikte tekrar 6000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı dökülüp kolon yeni bir tüpe aktarılmıştır. 500 µl yıkama tampon çözeltisi 2 kolona eklenip 12000 g'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Kolon toplama tüpünden çıkartılıp 1 µl'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Burda 200 µl elüsyon tampon çözeltisi kolona eklenmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolonun altında yani santrifüj tüpü içerisinde DNA kalmıştır. (Kullanılmak üzere – 20 °C'de depolanmıştır). Elde edilen DNA'nın saflık derecesini belirlemek için hem spektrofotometrede ölçüm yapılmış hem de Agaroz jelde görüntüleme yapılmıştır.

3.2.2. Spektrofotometre kullanılarak DNA miktarının ölçülmesi

Nükleik asitlerin konsantrasyonu genellikle bir köre karşı (boş örnek) 260 nm absorbans ölçülerek belirlenir. DNA ve RNA çözeltilerinin maksimum emilimi 260 nm'de, protein çözelitlerinin ise 280 nm'de olmaktadır. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler 280 nm'de absorbladığı için A260/ A280 oranı nükleik asit saflığını belirlemek için kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1.8, saf RNA ise yaklaşık 2.0 değerini vermelidir. Oran 2.0' dan büyük ise RNA kontaminasyonu 1.6' dan küçük ise protein kontaminasyonu varlığına işaret etmektedir.

Örnek DNA' sı deiyonize su ile 1/200 oranında sulandırılarak 1 ml lik kuvartz küvete aktarılmıştır. 260 nm ve 280 nm' de DNA' nın UV absorpsiyonu okunmuştur. A260/ A280 oranı hesaplanarak örnek miktarı tespit edilmiştir. DNA konsantrasyonu µg/ml olarak hesaplanmıştır. DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılan formül aşağıdaki gibidir:

DNA Konsantrasyonu = OD 260 x Katsayı (50) x Seyreltme Faktörü

OD260, A260' da ki optik yoğunluğu temsil etmektedir. 1 optik dansite (O.D) çift iplikli DNA için 50 µL/ mL olduğundan, katsayı olarak 50 kullanılmıştır.

DNA konsantrasyonu µg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

%0.8'lik agaroz jel hazırlamak için 70 ml 1X TBE buffer ve 0,846 gr agaroz erlenmayere aktarılmıştır. Erlenmayerdeki agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Çözelti ~ 55 ºC' ye kadar soğutulduktan sonra 10 mg/mL ethidium bromide stok solüsyonundan 4 µl ilave edilip, iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım jel tepsisine dökülmüş ve katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Jel iyice katılaştıktan sonra jel tepsisi dikkatlice elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Advance Mupid-One markalı elektroforez tankına jelin yüzeyini 2-5 mm kalınlığında kaplayacak şekilde 1XTBE tampon çözeltisi eklenmiştir. Elektroforez 100 voltta 50 dakika çalıştırılmıştır. Elde edilen jelin görüntüsü DNR markalı MiniBIS Pro modelli UV cihazında alınmıştır.

3.2.4. Primer tasarımı

Elimizde veri olarak bulunan tavşanın tahmini kimozin cDNA diziliminden yola çıkarak NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı üzerinden kimozin geninin tüm dizilimine ulaşılmıştır. Kimozin geni tavşanın 13. kromozomu üzerinde 143.360.832 bazdan oluşan 53.709.000 ile 53.717.500 bazları arasında kalmaktadır. EK 4'te gösterilen bu dizilim 8500 bazdan oluşmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak EK 4'te görülen dizilim üzerinden dört ileri dört geri olmak üzere 4 adet primer çifti tasarlanmıştır. Çizelge 3.1. 'de tasarlanmış olan primerlere ait bilgiler gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Primer bilgileri

Primer Adı	Baz Uzunluğu	Tm°	%GC	Baz dizilimi (5' 3')
ODF1(İleri)	20	67,4	55	GTTGTTGGCCCTGTCGAAGA
ODR1(Geri)	20	64,7	50	TCCACATCCAGAGAGCCATT
ODF2(İleri)	20	68,8	60	TGTCCAGGGTGAACTGCCAG
ODR2(Geri)	20	59,6	50	TACCTACCTGTTCCCTGTGA
ODF3(İleri)	20	59,9	50	ATACTGGATGTACAGGGGCT
ODR3(Geri)	20	64,4	55	AAGCACCAGGTCGAACTGAG
ODF4(İleri)	20	66	55	ATCGAGGTGTCGGATAACGG
ODR4(Geri)	20	66	55	AGGATGAAGTGCCTCGTGGT

3.2.5. PZR analizi

PZR analizi temel moleküler biyoloji kurallarına uyularak yapılmıştır (Maniatis, Sambrook ve Fritsch 1982). Biorad markalı thermocycler kullanılarak kimozin geni çoğaltılmıştır. Çizelge 3.1.'de bilgileri verilen primer çiftleri ile tavşan kimozin geni üzerinde çoğaltılmak istenen hedef bölgeler Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Çizelge 3.3.'de PZR analizinde kullanılan kimyasallar ve miktarları belirtilmiştir. Çizelge 3.4.'te PZR analizinin yapıldığı koşullar gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Primerler ile çoğaltılmak istenen hedef bölgeler

Primer Adı	Çoğaltılmak İstenilen Hedef Bölge
ODF1 ODR1	1190
ODF2-ODR2	910
ODF3-ODR3	1056
ODF4-ODR4	996

Çizelge 3.3. PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
Su	17,2
Buffer	2,5
$MgCl_2$	0,75
dNTP	1,25
DNA	1
Primer-F	1
Primer-R	1
Taq enzyme	0,30
	25 µl

Çizelge 3.4. PZR analiz koşulları

Stepler	ODF1-ODR1	ODF2-ODR2	ODF3-ODR3	ODF4-ODR4	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	94 ºC 3 dak	94 ºC 3 dak	94 ºC 3 dak	94 ºC 3 dak	1X
Denatürasyon	94 ºC 30 san	94 ºC 30 san	94 ºC 30 san	94 ºC 30 san	
Bağlanma	58 ºC 45 san	59ºC 45 san	60 ºC 45 san	60 ºC 45 san	35X
Uzama	72ºC 1.30 dak	72ºC 1 dak	72ºC 1.30 dak	72ºC 1.30 dak	
Son uzama	72ºC 10 dak	72ºC 10 dak	72ºC 10 dak	72ºC 10 dak	1X

3.2.6. DNA saflaştırılması

PZR reaksiyonundan DNA' nın saflaştırılması işlemi GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Purificiation Kit aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Tüpteki 100 µl örneğin üzerine 500 µl capture buffer type 3 eklenip iyice karıştırılmıştır. Örnek ile buffer karıştıktan sonra karışımın rengi kontrol edilmiştir. GFX Microspin kolonu toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Karışım GFX mikrospin kolonundan geçirilerek toplama tüpüne aktarılmıştır. Tüp 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Aynı Microspin kolonu sıvının uzaklaştırıldığı aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir ve 500 µl wash buffer type 1 eklenmiştir. Tüp 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası toplama tüpü atılmıştır. Kolon ise temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirilmiştir. Ependorf tüpüne 50 µl elution buffer type 4 eklenmiştir. Tüp

2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. Elde edilen sıvı faz gen dizilemeye gönderilmek üzere -20 ºC' de saklanmıştır (Quick-Start Protocol).

3.2.7. Biyoinformatik analizler

Bu çalışmada biyoinformatik analizler için aşağıdaki veri tabanları ve programları kullanılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler; farklı memeli türlerine ait kimozin genlerinin nükleik asit dizilimlerinin karşılaştırılması, amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması, kimozin genindeki korunmuş motiflerin tespit edilmesi, kimozin genlerinin çoklu karşılaştırılması, kimozin genlerinin sinyal peptid, inaktif ve aktif bölgelerin belirlenmesi (EK 5) ve filogenetik analizlerdir.

- NCBI (National Center for Biotechonology Information): 4 Kasım 1988'de Amerika'nın Maryland eyaletinde Bethesda şehrinde eski bir senatör olan Claude Pepper'ın desteğiyle kurulmuştur. NCBI biyoteknoloji, sağlık, tıp, biyomedikal, biyoinformatik, Genbankası gibi alanlarda oldukça önemli bir veri tabanıdır.
- NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Dizilimleri karşılaştırarak benzerlik oranlarını hesaplayan David Lipman tarafından kurulan bir biyoinformatik programdır.
- Clustal omega (1.2.2 versiyonu kullanılmıştır; http://www.ebi.ac.uk)
- Clustal W (2.1)
- MUSCLE (3.8.31)
- http://www.phylogeny.fr,
- http://www.ensembl.org/index.html
- http://meme-suite.org/tools/meme ,
- http://merops.sanger.ac.uk/
- http://www.signalpeptide.de/ ,
- http://www.expasy.org/tools,
- http://www.uniprot.org/ ,

3.2.5.1. Filogenetik ağaçların çizilmesi

Bilgisayar destekli filogenetik, bilgisayar algoritmalarının, metotlarının ve programlarının filogenetik analizlere uygulanmasıdır. Genlerin ve türlerin evrimsel akrabalıklarını gösteren bir filogenetik ağaç oluşturmak için katepsin, pepsin ve kimozin genlerine ait hem nükleotid hem de amino asit filogenetik ağaçları çizilmiştir. Bu ağaçların çizimi için clustal omega (1.2.2 http://www.ebi.ac.uk), clustal W (2.1) ve phylogeny.fr programları kullanılmıştır. Programların kullanımı için tavşan türüyle evrimsel akrabalıklarını görmek istediğimiz diğer 21 türün veri giriş numaralarına, amino asit dizilimlerine (EK 2) ve nükleik asit dizilimlerine (EK 3) NCBI' dan ulaşılmıştır. Elde edilen dizilimler programlara yüklenerek filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3.2.8. Protein modellerinin belirlenmesi

Protein modellerinin belirlenmesi için moleküler görüntüleme programı olan PyMOL programı kullanılmıştır. Bu programın Windows XP uyarlı 1.3 versiyonu kullanılmıştır (https://www.pymol.org, Schrödinger, 2010).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Tavşan Genomundan Kimozin Geninin İzolasyonu

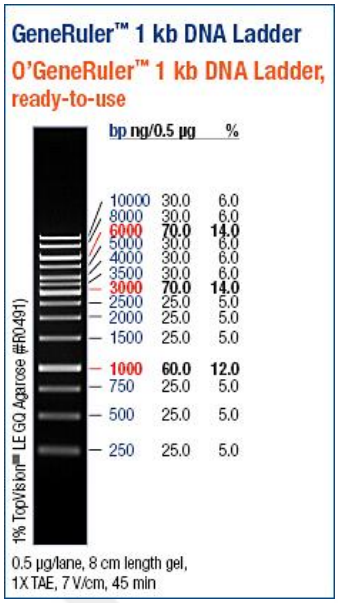
Tavşan genomundan kimozinin izole edilebilmesi için öncelikle DNA ektraksiyonun yapılması gerekmektedir. Ektraksiyonu yaptığımız DNA'nın saflık derecesini ölçmek için spektrofotometrede 260 ve 280 nm de okuma yapılmıştır. 260 ve 280 nm' de okuma yapılmasının nedeni DNA çözeltilerinin maksimum emilimi 260 nm'de, protein çözelitlerinin ise 280 nm'de olmaktadır. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler 280 nm'de absorbladığı için A260/ A280 oranı nükleik asit saflığını belirlemek için kullanılır. Oran 2.0' dan büyük ise RNA kontaminasyonu 1.6' dan küçük ise protein kontaminasyonu varlığına işaret etmektedir. Spektrofotometre sonuçları verilen Çizelge 4.1. 'de örnek 1'de OD değeri 1,5; örnek 2 de OD değeri 1,65 olarak tespit edilmiştir. Yukardaki açıklamalardan yola çıkarak örnek 2'nin kullanım için daha uygun olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. Tavşan DNA'sının spektrofotometrik absorbans değerleri

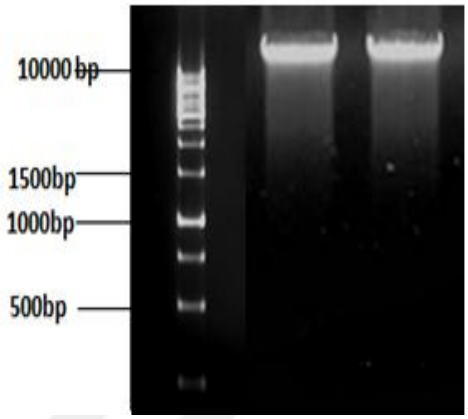
Örnek	260 nm	280 nm	260/280
1	0,033	0,022	1,5
2	0,033	0,020	1,65

DNA ektraksiyonun başarılı bir şekilde yapılıp yapılmadığını belirleyebilmenin diğer bir yöntemi de Agaroz jel de görüntüleme yöntemidir. Şekil 4.2. 'de Agaroz jel sonucunun UV cihazında görüntülenmesi yapılmıştır. Saflaştırdığımız DNA'nın PZR için uygun olduğu görülmüştür.

Örnekler elektroforez cihazına yüklenirken bant boyutlarının belirlenmesi için Fermentas firmasına ait GeneRuler markalı #SM0311 kodlu DNA markörü kullanılmıştır (Şekil 4.1.)



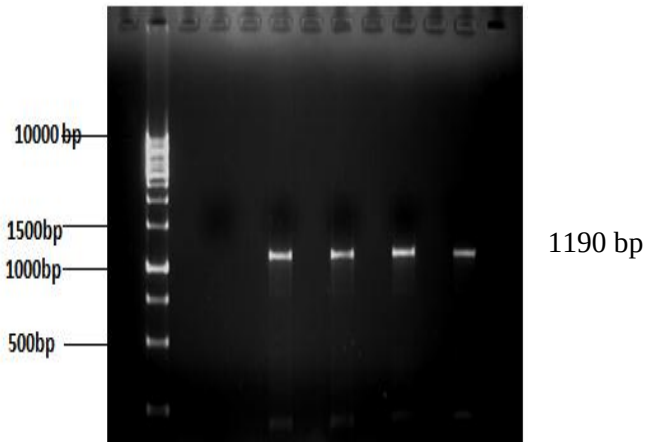
Şekil 4.1. DNA markörü



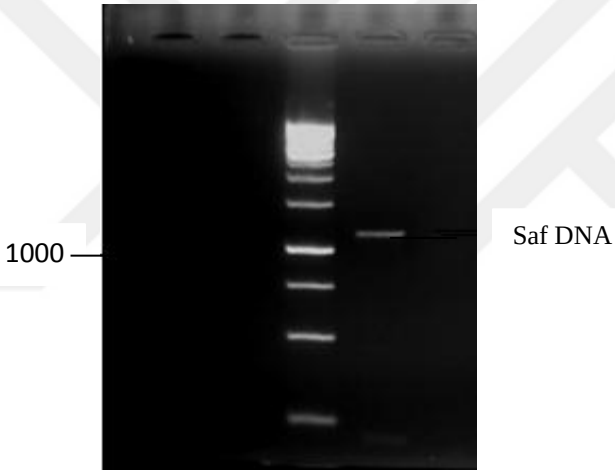
Şekil 4.2. Tavşan DNA 'sı jel görüntüsü

4.2. PZR Sonuçları

Şekil 4.3. 'te ODF1 ileri primeri ve ODR1 geri primeri ile yapılan PZR analizinde hedeflenen bölge tavşanın 13. kromozomu üzerinde kimozin lokusunun olduğu bölgede, sekizinci ekzon, sekizinci ve yedinci intronu içerisinde bulunduran 53,709,350 ile 53,710,540 bazları arasında 1190 bazdan oluşan bir bölgedir. PZR analizi ve elektroforez sonucunda jel görüntüsü incelendiğinde hedeflenen bölgenin çoğaltıldığı görülmüştür. İstenilen baz boyutlarının elde edildiği PZR analiz ürünlerinden DNA saflaştırılması için ürünlere GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Purificiation Kiti ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin kontrol edilmesi için elektroforez analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda Şekil 4.4. 'te jel görüntüsü incelendiğinde saflaştırma işleminin etkin bir şekilde yapıldığı görülmüştür. Saflaştırma işleminin etkinliği kontrol edildikten sonra elde edilen saf DNA dizileme analizine gönderilmiştir.



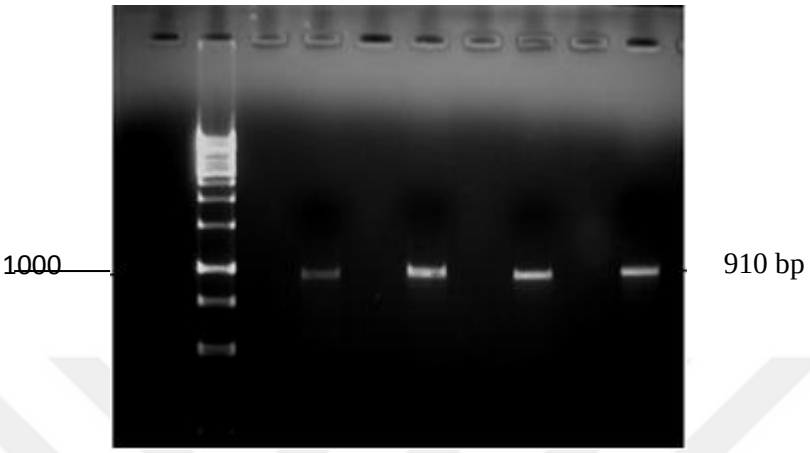
Şekil 4.3. ODF1-ODR1 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü



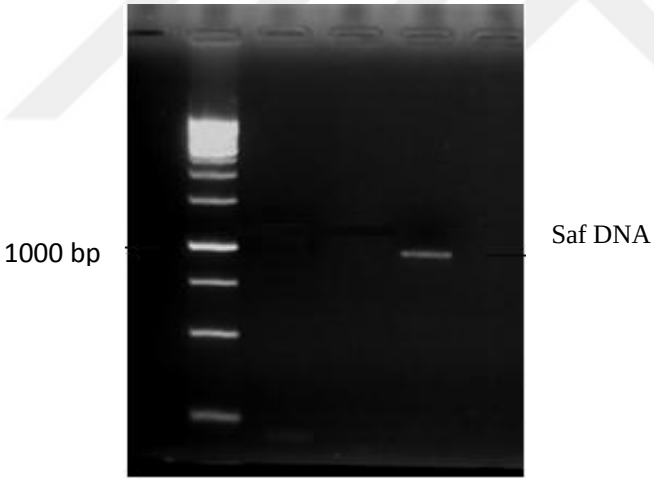
Şekil 4.4. Saflaştırma işleminin kontrolü

Şekil 4.5. 'te ODF2 ileri primeri ve ODR2 geri primeri ile yapılan PZR analizinde hedeflenen bölge tavşanın 13. kromozomu üzerinde kimozin lokusunun olduğu bölgede, altıncı ekzon ve beşinci intronu içerisinde bulunduran 53,711,100 ile 53,712,010 bazları arasında (EK 4'te hedeflenen bölge kimozin geni üzerinde gösterilmiştir.) 910 bazdan oluşan bir bölgedir. PZR analizi ve elektroforez sonucunda jel görüntüsü incelendiğinde hedeflenen bölgenin çoğaltıldığı görülmüştür. İstenilen baz boyutlarının elde edildiği PZR analiz ürünlerinden DNA saflaştırılması için ürünlere GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Purificiation Kiti ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin kontrol edilmesi için elektroforez analizi

yapılmıştır. Analiz sonucunda Şekil 4.6. ’da jel görüntüsü incelendiğinde saflaştırma işleminin etkin bir şekilde yapıldığı görülmüştür. Saflaştırma işleminin etkinliği kontrol edildikten sonra elde edilen saf DNA dizileme analizine gönderilmiştir.

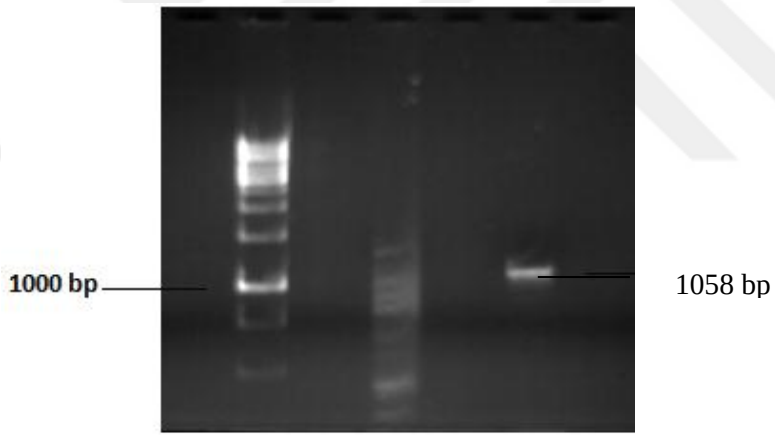


Şekil 4.5. ODF2-ODR2 primer çiftleri ile yapılan PZR sonucu jel görüntüsü

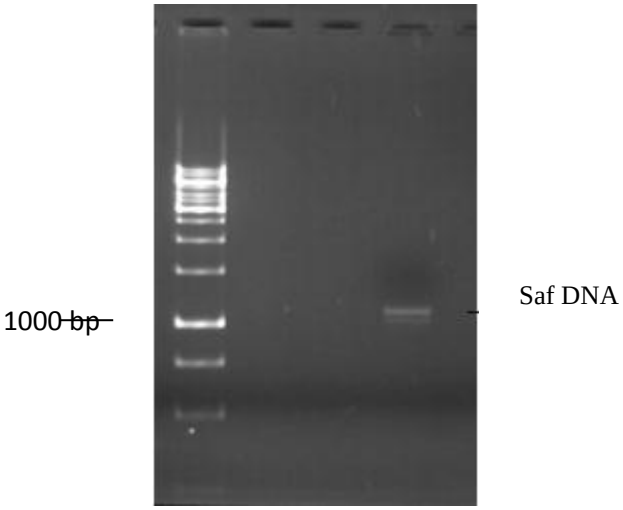


Şekil 4.6. Saflaştırma işleminin kontrolü

Şekil 4.7. ’de ODF3 ileri primeri ve ODR3 geri primeri ile yapılan PZR analizinde hedeflenen bölge tavşanın 13. Kromozomu üzerinde kimozin lokusunun olduğu bölgede, altıncı ekzon ve beşinci intronu içerisinde bulunduran 53,714,600 ile 53,715,658 bazları arasında (EK 4’te hedeflenen bölge kimozin geni üzerinde gösterilmiştir.) 1058 bazdan oluşan bir bölgedir. PZR analizi ve elektroforez sonucunda jel görüntüsü incelendiğinde hedeflenen bölgenin çoğaltıldığı görülmüştür. İstenilen baz boyutlarının elde edildiği PZR analiz ürünlerinden DNA saflaştırılması için ürünlere GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Purificiation Kiti ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin kontrol edilmesi için elektroforez analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda Şekil 4.8. ’de jel görüntüsü incelendiğinde saflaştırma işleminin etkin bir şekilde yapıldığı görülmüştür. Saflaştırma işleminin etkinliği kontrol edildikten sonra elde edilen saf DNA dizileme analizine gönderilmiştir.

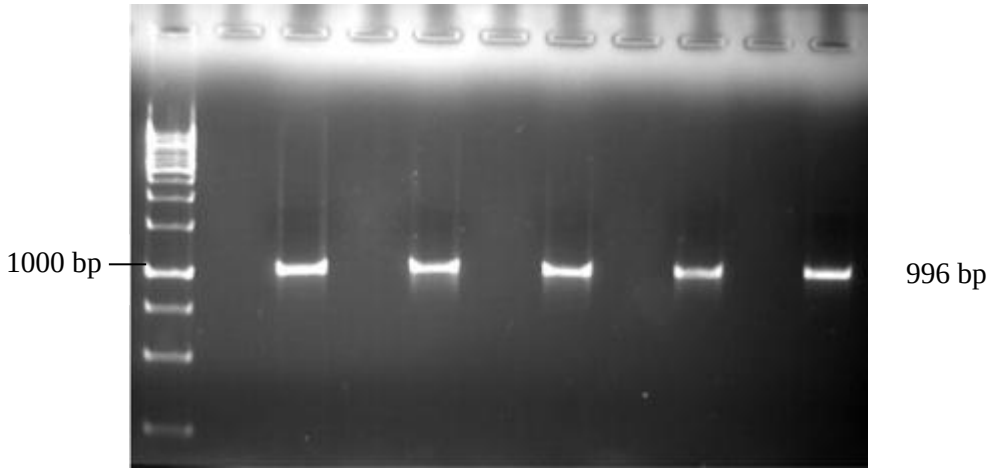


Şekil 4.7. ODF3-ODR3 primer çiftleri ile yapılan PZR sonucu jel görüntüsü

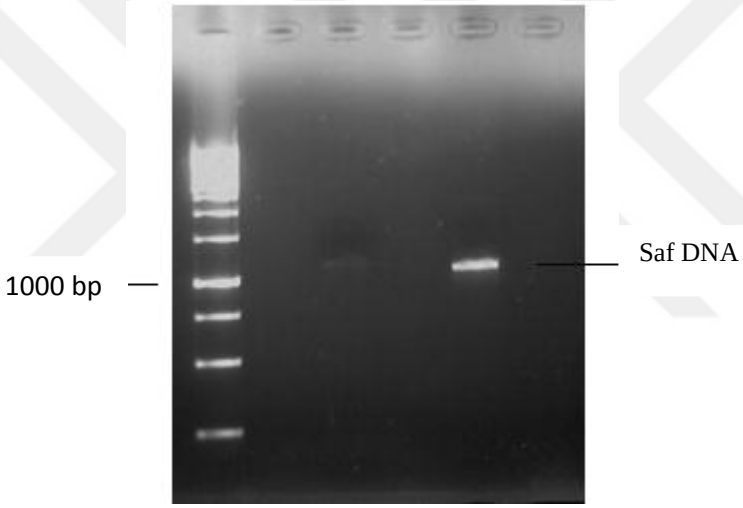


Şekil 4.8. Saflaştırma işleminin kontrolü

Şekil 4.9. ’da ODF4 ileri primeri ve ODR4 geri primeri ile yapılan PZR analizinde hedeflenen bölge tavşanın 13. kromozomu üzerinde kimozin lokusunun olduğu bölgede, birinci ekzon ve birinci intronu içerisinde bulunduran 53,716,294 ile 53,717,290 bazları arasında (EK 4’te hedeflenen bölge kimozin geni üzerinde gösterilmiştir) 996 bazdan oluşan bir bölgedir. PZR analizi ve elektroforez sonucunda jel görüntüsü incelendiğinde hedeflenen bölgenin çoğaltıldığı görülmüştür. İstenilen baz boyutlarının elde edildiği PZR analiz ürünlerinden DNA saflaştırılması için ürünlere GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Purificiation Kiti ile saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin kontrol edilmesi için elektroforez analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda Şekil 4.10. ’da jel görüntüsü incelendiğinde saflaştırma işleminin etkin bir şekilde yapıldığı görülmüştür. Saflaştırma işleminin etkinliği kontrol edildikten sonra elde edilen saf DNA dizileme analizine gönderilmiştir.



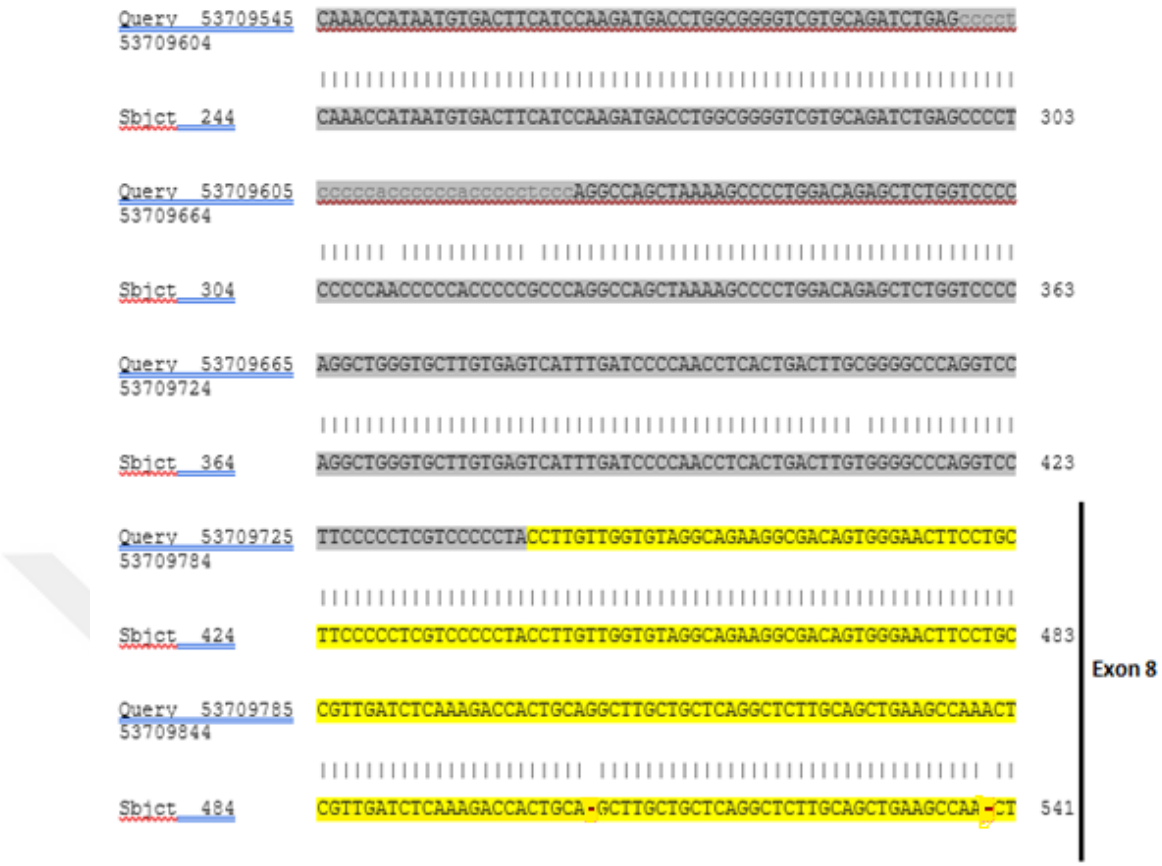
Şekil 4.9. ODF4-ODR4 primer çiftleri ile yapılan PZR sonucu jel görüntüsü



Şekil 4.10. Saflaştırma işleminin kontrolü

4.3. Gen Dizileme Analizi ve Sonuçları

PZR sonucu elde edilen ürünler saflaştırıldıktan sonra Agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun amacı saflaştırmanın etkinliğinin kontrol edilmesidir. Hedef baz boyutu UV cihazında görüntülendikten sonra PZR ürünleri gen dizilimi için gen dizileme firmasına gönderilmiştir. Dizileme yapılırken hem ileri primerler hem de geri primerler ile okuma yapılmıştır. Dizileme sonuçları ile tavşanın (*Oryctolagus cuniculus*) 13. kromozomu üzerinde bulunan kimozin lokusu birbirleriyle karşılaştırılmıştır.



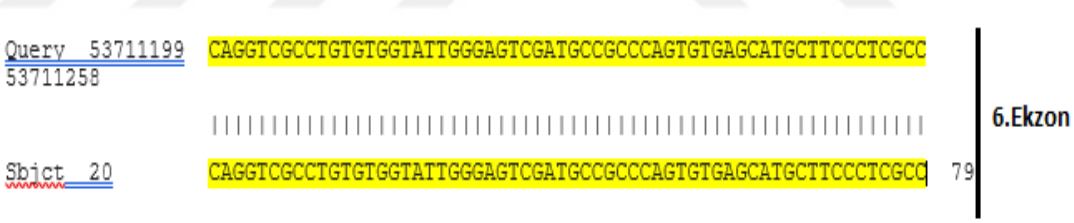
Şekil 4.11. ODF1ODR1 PZR ürünü ve ODF1 ileri primeri ile okunan gen dizilimi

Şekilde 4.11. 'de saflaştırılan PZR ürünün (ODF1ODR1) ileri primer (ODF1) ile okunması sonucunda 620 bazlık bir dizilim elde edilmiştir. Bu dizilim hedef gen olan kimozin geni (veri giriş numarası NC_ 013681.1) ile karşılaştırılmıştır (NCBI blastn). Bu karşılaştırılma sonucunda hedef kimozin geni ile PZR ürününden elde edilen dizilimin şekilde de görüldüğü gibi %100 eşleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bölgenin içerisinde 8. Ekzon da mevcuttur. Sarı ile işaretlenen 8. Ekzonun ODF1 ileri primeri ve ODR1 geri primeri ile okunması sonucunda sonucunda 8. Ekzonun tüm dizilimi oluşturulmuştur.



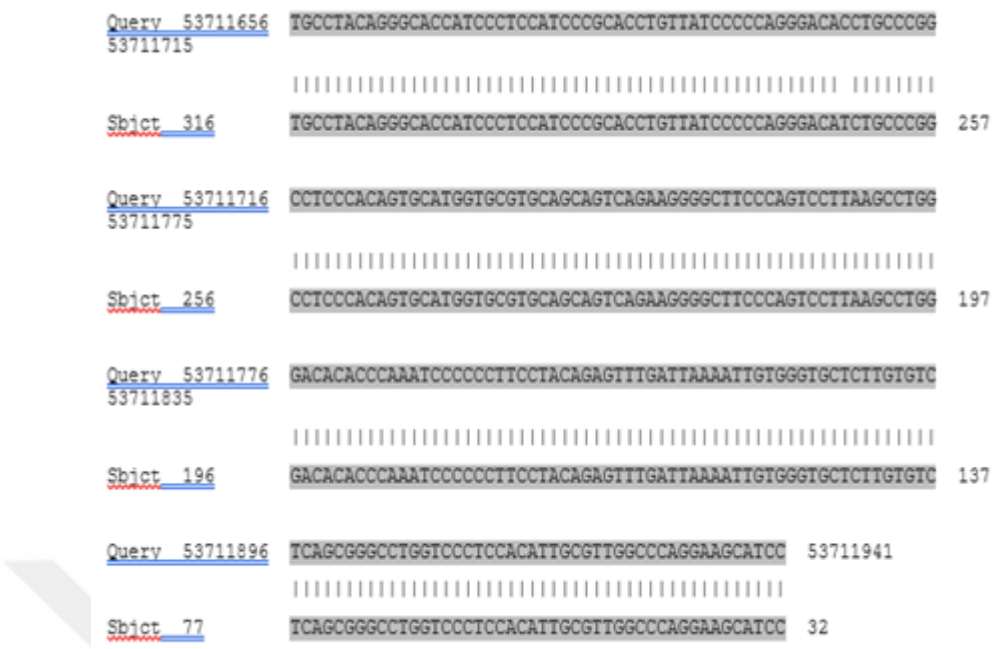
Şekil 4.12. ODF1ODR1 PZR ürünü ve ODR1 geri primeri ile okunan gen dizilimi

Şekil 4.12. ’de saflaştırılan ODF1ODR1 PZR ürünü ve ODR1 geri primeri okunan dizilim sonucu, tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu (veri giriş numarası; NC_ 013681.1) ile karşılaştırılmıştır. Kimozin geninin 53709893 ile 53710013 arasındaki bazların tamamen eşleştiği görülmüştür. Bu bölge yedinci intron üzerindedir.



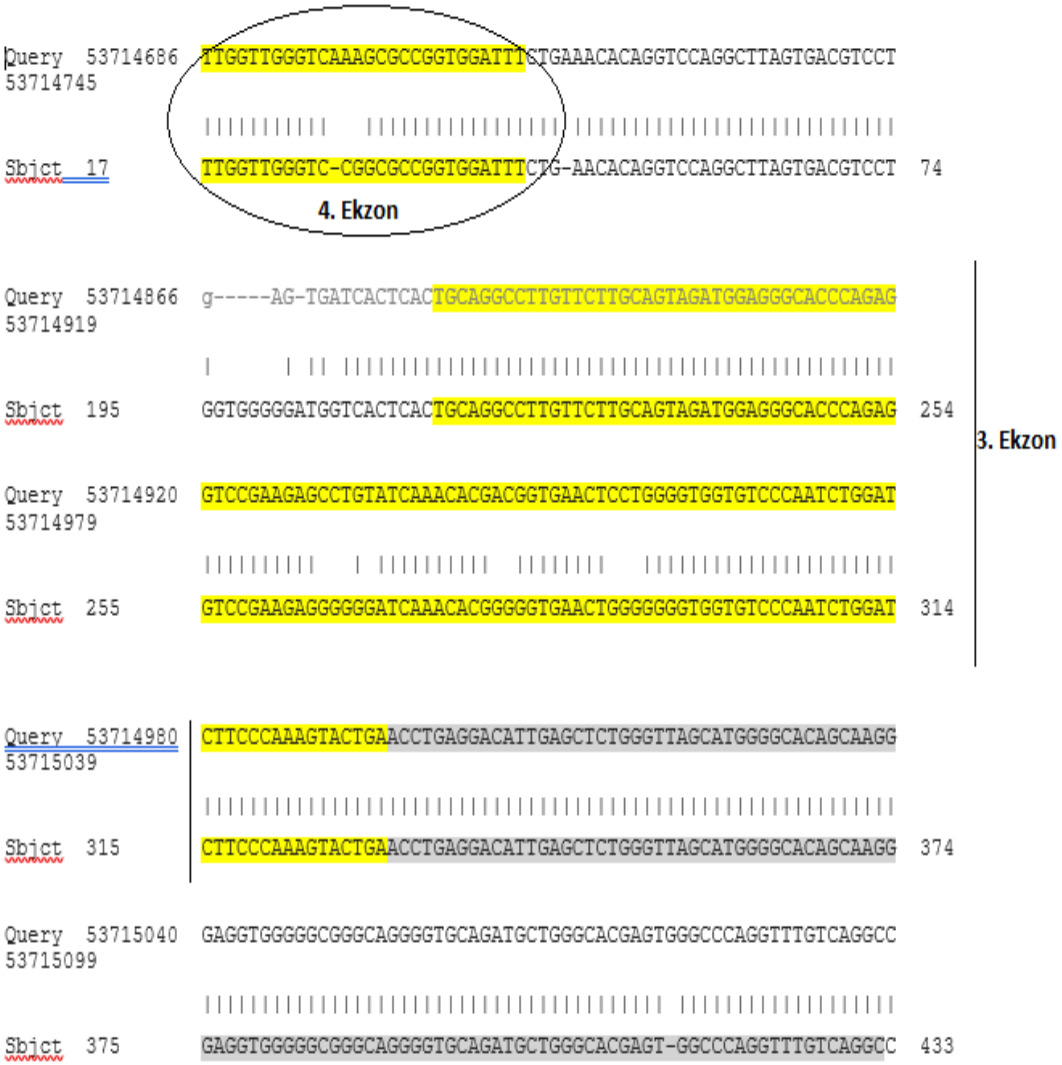
Şekil 4.13. ODF2ODR2 PZR ürünü ile ODF2 ileri Primeri ile okunan Gen Dizilimi

Şekil 4.13. ’te ODF2 ileri primeri ile okunan dizilim tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu ile karşılaştrılması sonucu 6. Ekzon üzerinde 60 bazlık bir dizilimin genom üzerinde 53711199-53711258 arasındaki dizilim ile tamamen eşleştiği tespit edilmiştir.



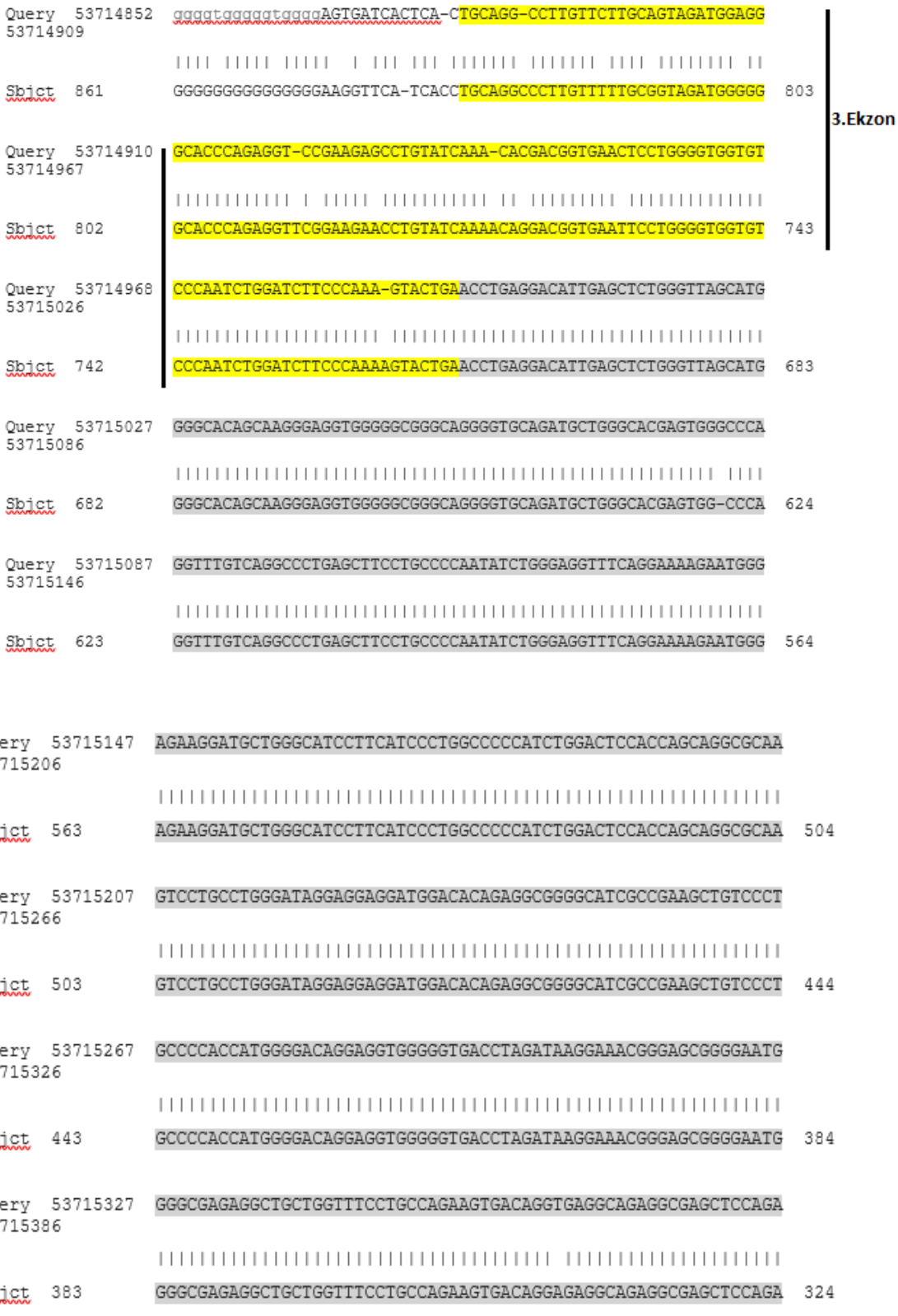
Şekil 4.14. ODF2ODR2 PZR ürünü ile ODR2 geri primeri ile okunan gen dizilimi

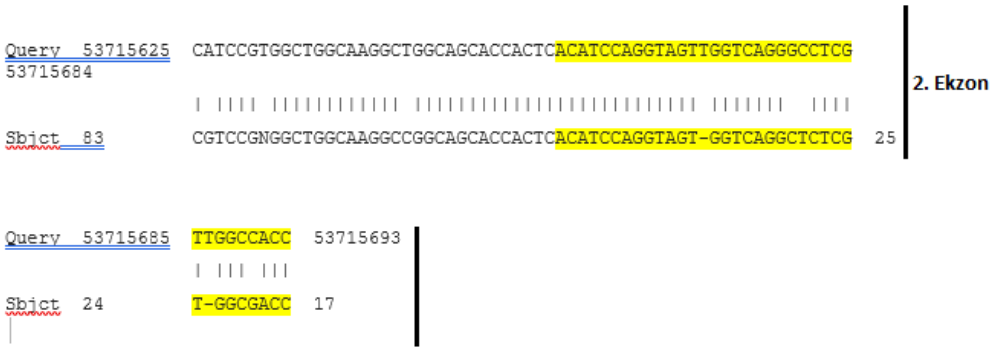
Şekil 4.14. ‘te ODR2 geri primeri ile okunan dizilim tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu ile karşılaştırılması sonucunda 5. İntron bölgesinde 53711656-53711941 arasındaki bazların tamamen eşleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. ODF3ODR3 PZR ürünü ile ODF3 ileri primer ile okunan gen dizilimi

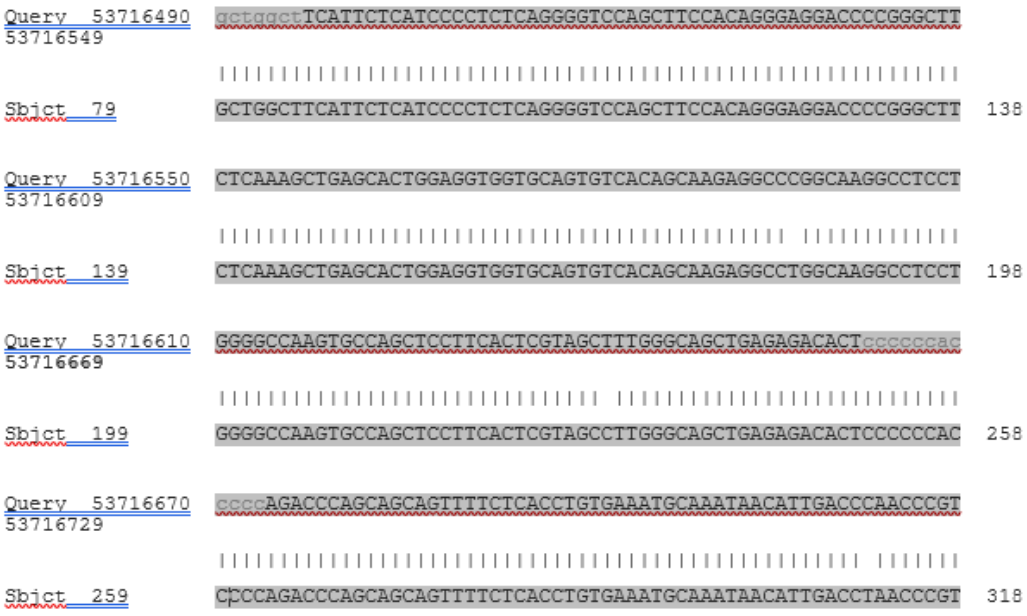
Şekil 4.15. 'te ODF3 ileri primeri ile okunan dizilimde 4. Ekzonun 27 bazlık kısmı okunmuştur. Ekzon üç hem ODF3 ileri primeri hem de ODR3 geri primeri ile okunması sonucunda dizilimin tamamı oluşturulmuştur. Böylece 115 bazdan oluşan Ekzon 3'ün tüm dizilimi elde edilmiştir. Üçüncü ekzon bölgesi dışında 2. İntron bölgesinin 104 bazlık kısmı tamamen okunmuştur.


Query 53714852 ggggtgggggtgggAGTGATCACTCA-CTGCAGG-CCTTGTTCTTGCAGTAGATGGAGG 53714909
Sbjct 861 GGGGGGGGGGGGGGGAAGGTTCA-TCACCTGCAGGCCCTTGTTTTTGCGGTAGATGGGGG 803
Query 53714910 GCACCCAGAGGT-CCGAAGAGCCTGTATCAAA-CACGACGGTGAACTCCTGGGGTGGTGT 53714967
Sbjct 802 GCACCCAGAGGTTCGGAAGAACCTGTATCAAAACAGGACGGTGAATTCCTGGGGTGGTGT 743
Query 53714968 CCCAATCTGGATCTTCCCAAA-GTACTGAACCTGAGGACATTGAGCTCTGGGTTAGCATG 53715026
Sbjct 742 CCCAATCTGGATCTTCCCAAAAGTACTGAACCTGAGGACATTGAGCTCTGGGTTAGCATG 683
Query 53715027 GGGCACAGCAAGGGAGGTGGGGGCGGGCAGGGGTGCAGATGCTGGGCACGAGTGGGCCCA 53715086
Sbjct 682 GGGCACAGCAAGGGAGGTGGGGGCGGGCAGGGGTGCAGATGCTGGGCACGAGTGG-CCCA 624
Query 53715087 GGTTTGTCAGGCCCTGAGCTTCCTGCCCCAATATCTGGGAGGTTTCAGGAAAAGAATGGG 53715146
Sbjct 623 GGTTTGTCAGGCCCTGAGCTTCCTGCCCCAATATCTGGGAGGTTTCAGGAAAAGAATGGG 564
3.Ekzon
Query 53715147 AGAAGGATGCTGGGCATCCTTCATCCCTGGCCCCCATCTGGACTCCACCAGCAGGCGCAA 53715206
Sbjct 563 AGAAGGATGCTGGGCATCCTTCATCCCTGGCCCCCATCTGGACTCCACCAGCAGGCGCAA 504
Query 53715207 GTCCTGCCTGGGATAGGAGGAGGATGGACACAGAGGCGGGGCATCGCCGAAGCTGTCCCT 53715266
Sbjct 503 GTCCTGCCTGGGATAGGAGGAGGATGGACACAGAGGCGGGGCATCGCCGAAGCTGTCCCT 444
Query 53715267 GCCCCACCATGGGGACAGGAGGTGGGGGTGACCTAGATAAGGAAACGGGAGCGGGGAATG 53715326
Sbjct 443 GCCCCACCATGGGGACAGGAGGTGGGGGTGACCTAGATAAGGAAACGGGAGCGGGGAATG 384
Query 53715327 GGGCGAGAGGCTGCTGGTTTCCTGCCAGAAGTGACAGGTGAGGCAGAGGCGAGCTCCAGA 53715386
Sbjct 383 GGGCGAGAGGCTGCTGGTTTCCTGCCAGAAGTGACAGGAGAGGCAGAGGCGAGCTCCAGA 324



Şekil 4.16. ODF3ODR3 PZR ürünü ile ODR3 geri primeri ile okunan dizilim

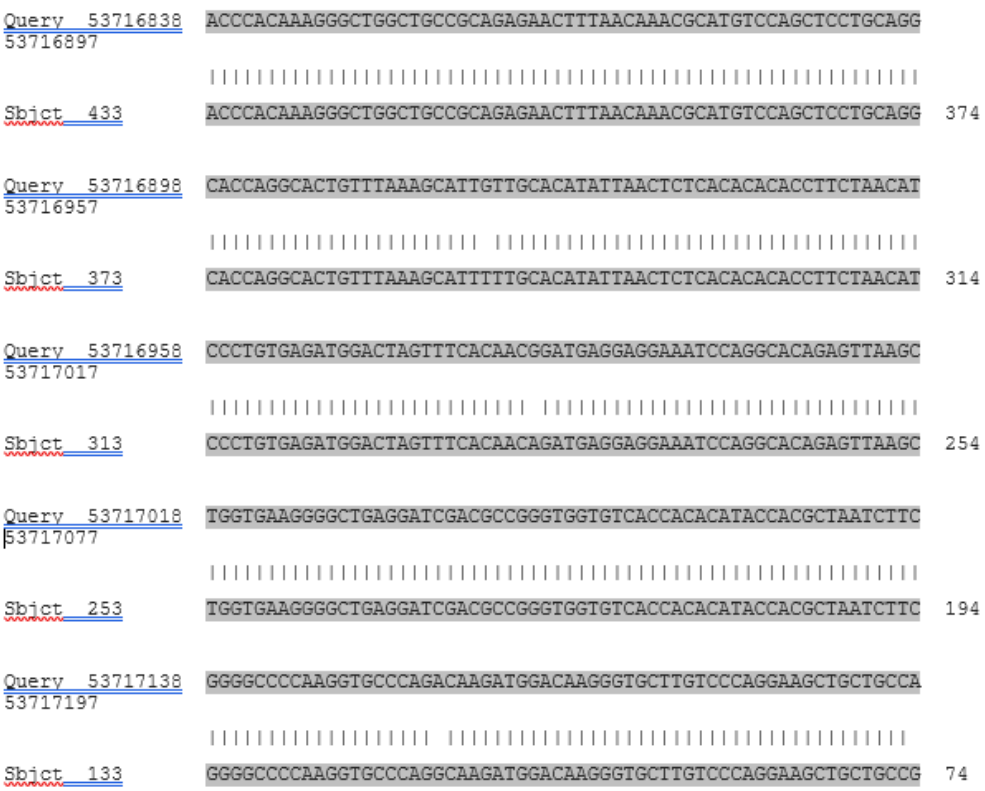
Şekil 4.16. 'da ODR3 geri primeri ile okunan dizilim sonucu tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırıma sonucunda üçüncü ekzon oluşturulmuştur. ODR3 geri primeri ile okunan kısım 889 bazdan oluşmaktadır. 3. Ekzon dışında 2. İntronun 659 bazdan oluşan 415 bazlık kısmı tamamen okunmuştur. Bunun yanında 2. Ekzon bölgesinin 36 bazlık kısmı okunmuştur.



Şekil 4.17. ODF4ODR4 PZR ürünü ve ODF4 ileri primer ile okunan gen dizilimi

Şekil 4.17. 'de ODF4 ileri primeri ile okunan dizilim sonucu, tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu ile karşılaştırılmıştır. ODF4 ileri primeri ile okunan dizilim

sonucunda birinci intron bölgesinde 240 bazlık kısım tavşan genomu üzerindeki kimozin lokusu ile tamamen eşleşmiştir.



Şekil 4.18. ODF4ODR4 PZR ürünü ve ODR4 geri primeri ile okunan gen dizilimi

Şekil 4.18. 'de ODR4 geri primeri ile okunan dizilim sonucu tavşan genomu üzerinde kimozin lokusu ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda birinci intron bölgesinde 300 bazlık kısmın tamamen eşleştiği görülmüştür.

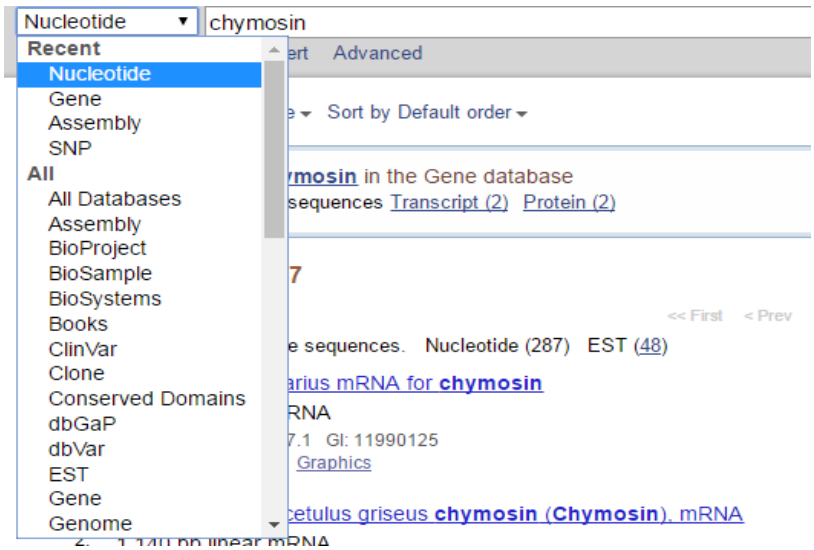
Tüm karşılaştırılmalar sonucunda ODF1(ileri) ve ODR1(geri) primerleri ile okunan dizilimler sonucunda sekizinci ekzonun tüm dizilimi tavşan genomu ile % 100 eşleşmiş ve böylece tüm dizilim oluşturulmuştur. ODF2 ve ODR2 primerleri ile okunan dizilim sonucunda altıncı ekzonun 60 bazlık bir kısmının tamamen eşleştiği görülmüştür. ODF3 ve ODR3 primerleri ile okunan dizilim sonucunda dördüncü ekzonun 27 bazlık kısmı, üçüncü ekzonun tüm dizilimine ulaşılmıştır. ODF4 ve ODR4 ile okuna dizilim sonucunda birinci intron bölgesinde 300 bazlık bir bölge tavşan genomu ile tamamen eşleşmiştir.

4.4. Biyoinformatik Analizler

Geçtiğimiz son 15-20 yıl içersinde geliştirilen teknikler sayesinde moleküler biyoloji bilimi oldukça farklı seviyelerde kapsamlı gelişmelere tanık olmaktadır. Hızlı DNA dizi analiz yöntemleri farklı türlerin genomlarının DNA dizilerinin belirlenmesini sağlamıştır (Venter, 2001; Lander, 2001). Bu gelişmeler sonucunda inanılmaz bir hızla ve miktarda biriken bu verileri saklamak ve analiz etmek giderek zorlaşmıştır. Bu bağlamda bilgisayar biliminin giderek artan ivmelenmeyle biriken bu verilerin dikkkatli bir şekilde saklanması, düzenlenmesi, birleştirilmesi, kategorilere ayrılmasına ve kolayca erişilmesinde katkısı büyük olmuş ve biyoinformatik bilimi böylece doğmuştur (Altschul, 1994). Biyoinformatik biyoloji, bilişim teknolojisi ve bilgisayar bilimini bir araya getiren bir bilim dalıdır.

4.4.1. Kimozin gen dizilimlerinin karşılaştırılması

Öncelikle literatürde kimozin enzimi en fazla çalışılmış olan sığır *(Bos taurus)* türünün kimozini referans alınarak NCBI veri tabanından kimozin gen dizilimleri bilinen diğer canlıların ve kimozin benzeri dizilimlere ulaşılmıştır. (Şekil 4.19) Bu genlerin dizilimleri ikili olarak biribirleri ile karşılaştırılmıştır.



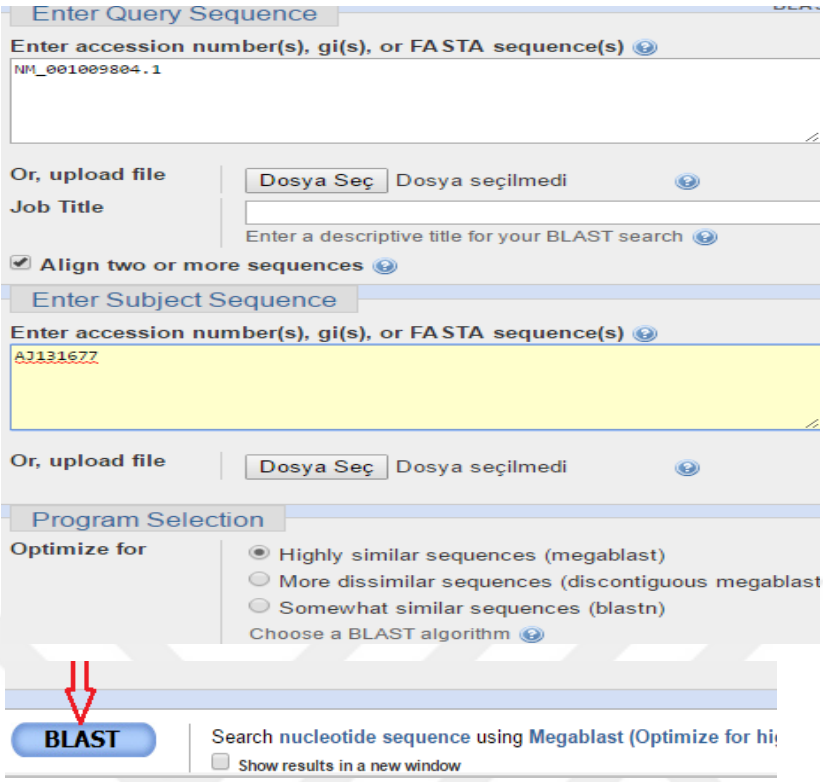
Şekil 4.19. NCBI veri tabanında kimozin dizilimlerinin veri giriş numaralarına ulaşılması

Şekil 4.19. ’da olduğu gibi kimozin gen dizilimi bilinen tüm canlılara ulaşılmış ve Çizelge 4.2. ’de görüldüğü gibi hem cDNA dizilimleri için hem de amino asit dizilimleri için veri giriş numaraları kaydedilmiştir.

Çizelge 4.2. Kimozin geninin amino asit ve cDNA dizilimleri veri giriş numaraları

Organizma Türleri	Amino Asit Veri Giriş Numaraları	cDNA Veri Giriş Numaraları
Callithrix jacchus chymosin (İpek maymunu)	BAA90873	XM_002751197.2
Cebus capucinus chymosin (Beyaz başlıklı kapıçin)	XP_017354863	XM_017499374.1|
Saimiri boliviensis boliviensis chymosin (Sincap maymunu)	XP_003933485	XM_003933436.2
Aotus nancymaae (Gece maymunu)	XP_012323439	NW_012183090.1
Odobenus rosmarus divergens (Deniz aygırı)	XP_004407213	XM_004407156.1
Tupaia chinensis	ELW65241	XM_006149562.1
Balaenoptera acutorostrata scammoni (Balina)	XP_007169498	XM_007169436.1
Mustela putorius furo (Feret)	XP_004769805	NW_004569292.1
Sus scrofa (Domuz)	AAB08492	SSU14406
Bubalus bubalis (Asya mandası)	ABX55935	EU265816.1
Bison bison bison (Bizon)	XP_010829174	XM_010830872.1
Bos taurus (Sığır)	ABU41411	NM_180994.2
Capra hircus (Keçi)	ABN13683	GQ369727.1
Ovis aries (Koyun)	CAA37209	NM_001009804.1
Canis lupus familiaris (Köpek)	XP_003639181	XM_003639133.1
Vicugna pacos	XP_006197500	XM_006197438.1
Oryctolagus cuniculus (Tavşan)	XP_002715833	XM_002715787.2
Camelus dromedarius (Deve)	NP_001290503	AJ131677.1
Mus musculus (Fare)	NP_001104613	NM_001111143.1
Rattus norvegicus (Sıçan)	NP_064476	NM_020091.1
Myotis brandti (Yarasa)	EPQ03835	XM_006762989.2
Homo sapiens chymosin pseudogene (İnsan)		NR_003599.2|

Çizelge 4.2. ’de görülen veri giriş numaraları (Accession Number) kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. NCBI nucleotide blast veri tabanı kullanılarak çizelgedeki tüm canlıların kimozin gen dizilimleri ve amino asit dizilimleri tavşanınki ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.20. Tavşan cDNA kimozin dizilimin diğer türlerle karşılaştırılması

ORIGIN

```
      1 atgaagtgcc tcgtggtgct ccttgcggtc ctcgctctct cccagggtgg ggagatcacc
     61 aggatcccgc tgtacaaagg gaacacgctg agaaaggccc tcaaggagca cgggcttctg
    121 ggagacttcc tgaagaagca ccaggtcgaa ctgagcagga agcgctccca ctccggcgtg
    181 gtggccaacg aggccctgac caactacctg gatgttcagt actttgggaa gatccagatt
    241 gggacaccac cccaggagtt caccgtcgtg tttgatacag gctcttcgga cctctgggtg
    301 ccctccatct actgcaagaa caaggcctgc aaaatccacc ggcgctttga cccaaccaag
    361 tcctccacct tccagcacat gcacaagccc ctgtacatcc agtatggcac aggcagcatg
    421 cagggcgtcc tgggctacga cacggtcacc gtcgctggca tcgtggacac acaccagact
    481 gtgggcctga gcaccaagga gcctggcgat gtcttcgtct actcggagtt cgacgggatc
    541 ctgggcatgg gctatccgaa catcgccttc cctcactcgg tgccggtgtt tgacaacatg
    601 atgcacaagc acctggtggc ccaggacctg ttttcagttt acatgagcag gtctggcgag
    661 ggaagcatgc tcacactggg cggcatcgac tcccaatacc acacaggcga cctgcactgg
    721 gtgcccgtga ctgtgcaggg atactggcag ttcaccctgg acagggtcac cgtggacggc
    781 aaggtggtgg cctgtgagcg gggctgccag gccatcctgg acacaggcac ttccttgctg
    841 atcggtcccg acagcgagat cctccacatc cagagagcca ttggggcctc agagggggag
    901 tatggagagt ttggcttcag ctgcaagagc ctgagcagca agcctgcagt ggtctttgag
    961 atcaacggca ggaagttccc actgtcgcct tctgcctaca ccaacaagga caagggcttg
   1021 tgctacagcg gcttcgaggg cggttcccag ctgtggatcc tgggggatgt cttcatccgg
   1081 gcgtactaca gtgtcttcga cagggccaac aaccgcctgg gactggccac agctatctga
```

Şekil 4.21. Tavşan (*Oryctolagus cuniculus)* kimozin geni cDNA dizilimi

Şekil 4.20. ’de NCB blastn veri tabanında nükleik asit dizilimleri bilinen canlı türlerinin dizilimlerinin nasıl karşılaştırılacağı gösterilmiştir. Burdan yola çıkarak Buzağı kimozini ile tavşan kimozinin Şekil 4.21.’de gösterilen cDNA dizilimlerinin karşılaştırılmıştır (EK 1’de dizilim karşılaştırılmaları gösterilmiştir) (NCBI blastn). Diğer türlerin de kimozin gen dizilimleri EK’1 de gösterildiği gibi yapılmış ve Çizelge 4.3.’ teki sonuçlar elde edilmiştir.

Bu karşılaştırmalar sonucunda Çizelge 4.3. ‘te olduğu gibi benzerlik oranları görülmüştür. Bu benzerlik oranlarının daha sonra yapılan filogenetik analizlerle doğrudan ilişkili olduğu görülecektir.

Çizelge 4.3. Tavşan ile diğer türlerin cDNA dizilimlerinin karşılaştırılması sonucu benzerlik oranları

CANLI TÜRLERİ	BENZERLİK ORANI
Bos taurus and oryctolagus cunıculus	% 79
Homo sapıens and oryctolagus cunıculus	% 78
Mus musculus and oryctolagus cunıculus	% 75
Ovıes arıes and oryctolagus cunıculus	% 80
Rattus norvegıcus and oryctolagus cunıculus	%75
Sus sucrofa and oryctolagus cunıculus	% 80
Bubalus bubalıs and oryctolagus cunıculus	% 80
Capra hırcus and oryctolagus cunıculus	% 80
Bos grunıens and oryctolagus cunıculus	% 79
Camelus dromedarius and oryctolagus cuniculus	% 80

4.4.2. Tavşan genomu

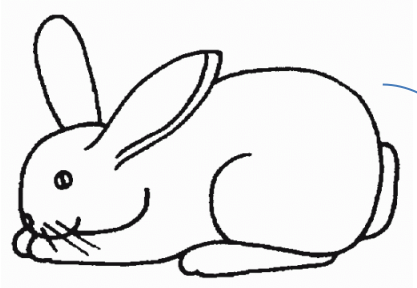
Tavşan memeliler sınıfının, lagomorpha (tavşanımsı) takımının, leporidae (tavşangiller) familyasına ait bir türüdür. Bu tür 44 kromozoma sahiptir. Aşağıdaki tabloda tavşan genomuna ait kromozomları özellikleri verilmiştir. Tablo incelendiğinde, NCBI ve Ensemble veri tabanlarında yapılan araştırmalara göre tavşan kimozinin 13. kromozom üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Tavşanın 13. kromozomu

üzerinde 143.360832 nükleotit, 2886 protein, 1934 gen bulunmaktadır. Kimozin geni de bu kromozom üzerinde 53708876-53717491 aralıklarında bulunmaktadır.

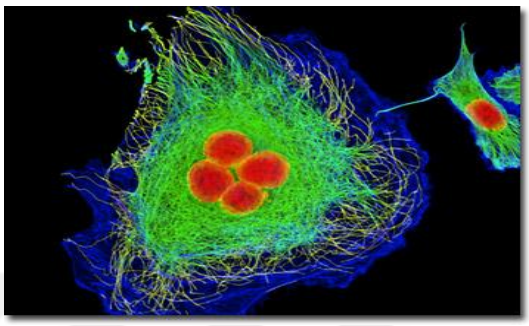
Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	tRNA	Other RNA	Gene
Chr	1	NC_013669.1	CM000790.1	194.85	42.9	2,883	11	263	2,204
Chr	2	NC_013670.1	CM000791.1	174.33	42.6	1,912	8	294	1,419
Chr	3	NC_013671.1	CM000792.1	155.69	42.7	1,565	8	241	1,148
Chr	4	NC_013672.1	CM000793.1	91.39	44.2	1,539	5	225	1,076
Chr	5	NC_013673.1	CM000794.1	37.99	46.7	663	9	66	478
Chr	6	NC_013674.1	CM000795.1	27.5	48.8	450	3	41	292
Chr	7	NC_013675.1	CM000796.1	173.68	41.5	1,686	24	220	1,250
Chr	8	NC_013676.1	CM000797.1	111.8	42.2	1,068	4	132	733
Chr	9	NC_013677.1	CM000798.1	116.25	44.2	1,654	4	284	1,074
Chr	10	NC_013678.1	CM000799.1	48	44.1	494	1	89	376
Chr	11	NC_013679.1	CM000800.1	87.55	41.6	651	9	115	499
Chr	12	NC_013680.1	CM000801.1	155.35	42.0	1,866	69	258	1,508
Chr	13	NC_013681.1	CM000802.1	143.36	44.9	2,886	124	305	1,934
Chr	14	NC_013682.1	CM000803.1	163.9	41.3	1,600	3	241	1,163
Chr	15	NC_013683.1	CM000804.1	109.05	40.9	950	2	137	751
Chr	16	NC_013684.1	CM000805.1	84.48	44.0	959	4	182	739
Chr	17	NC_013685.1	CM000806.1	85.01	43.4	1,377	25	222	1,030
Chr	18	NC_013686.1	CM000807.1	69.8	44.6	1,095	4	126	728
Chr	19	NC_013687.1	CM000808.1	57.28	48.2	1,618	29	166	1,053
Chr	20	NC_013688.1	CM000809.1	33.19	45.6	439	1	60	285
Chr	21	NC_013689.1	CM000810.1	15.58	50.9	314	-	44	216
Chr	X	NC_013690.1	CM000811.1	111.7	41.2	1,160	2	114	1,030
Chr	MT	NC_001913.1	AJ001588.1	0.017245	40.2	13	22	-	13
Un	-	.	-	489.69	48.6	9,621	110	1,227	8,099

Şekil 4.22. Tavşan kromozomları hakkında genel bilgiler (NCBI)

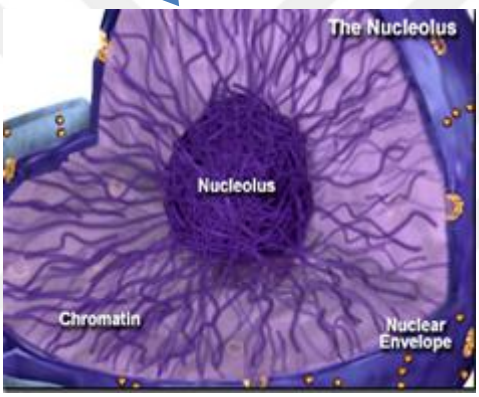
Şekil 4.22. ’da tavşanın tüm kromozomlarının veri giriş numaraları, boyutları, G/C oranlar, protein sayıları, ve bulundurdukları gen sayısı bilgilerine ulaşılmaktadır. Şekil 4.29. ’da 13.kromozom incelendiğinde 143.36 Mb boyutunda, G/C oranın % 44.9, içerdiği gen sayısının 1934 olduğu görülmektedir.



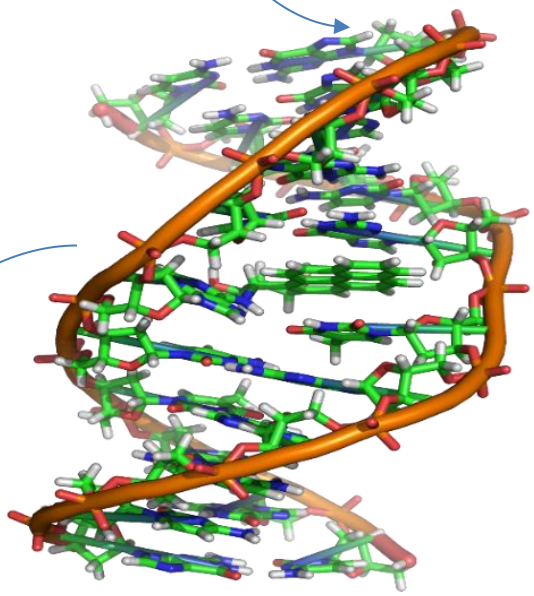
Şekil 4.23. Tavşan türü
(Oryctolagus cuniculus)



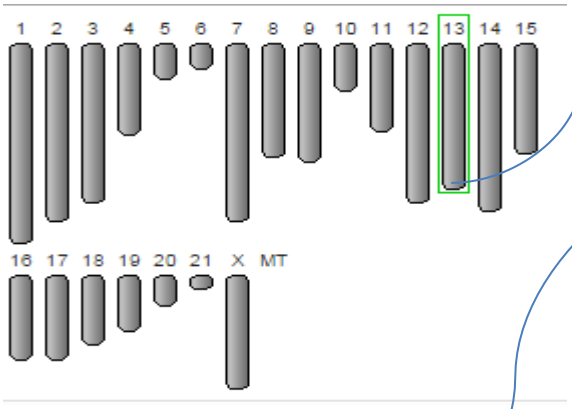
Şekil 4.24. Tavşan hücresi



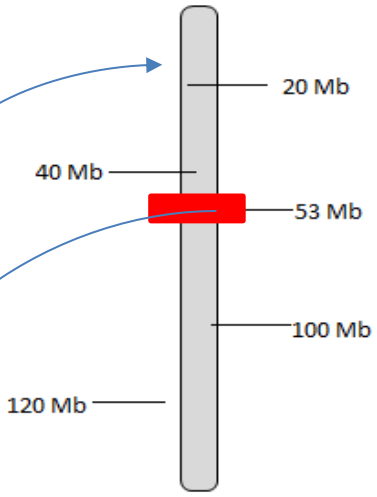
Şekil 4.25. Hücre çekirdeğinin yapısı



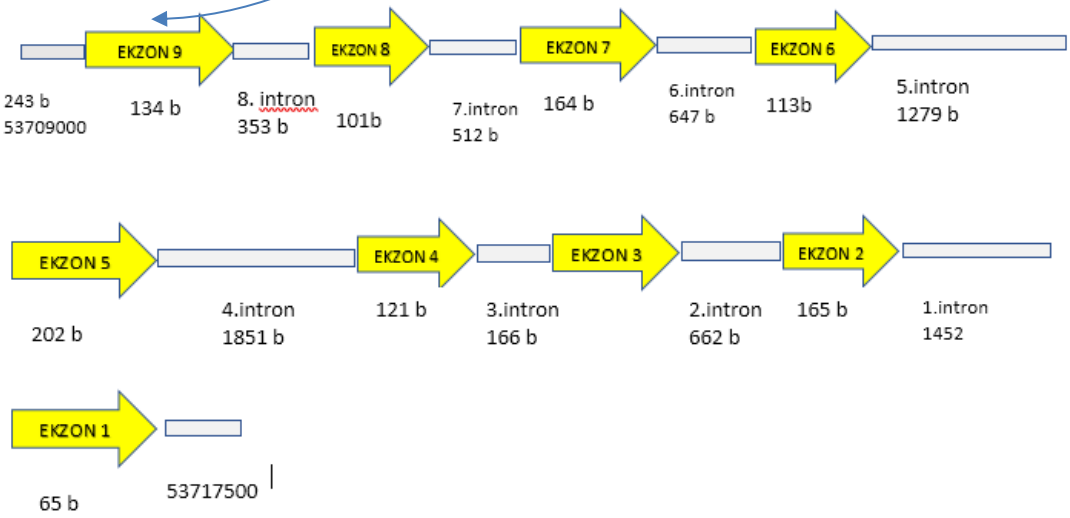
Şekil 4.26. DNA'nın üç boyutlu yapısı yapısı



Şekil 4.27. Tavşan kromozomları



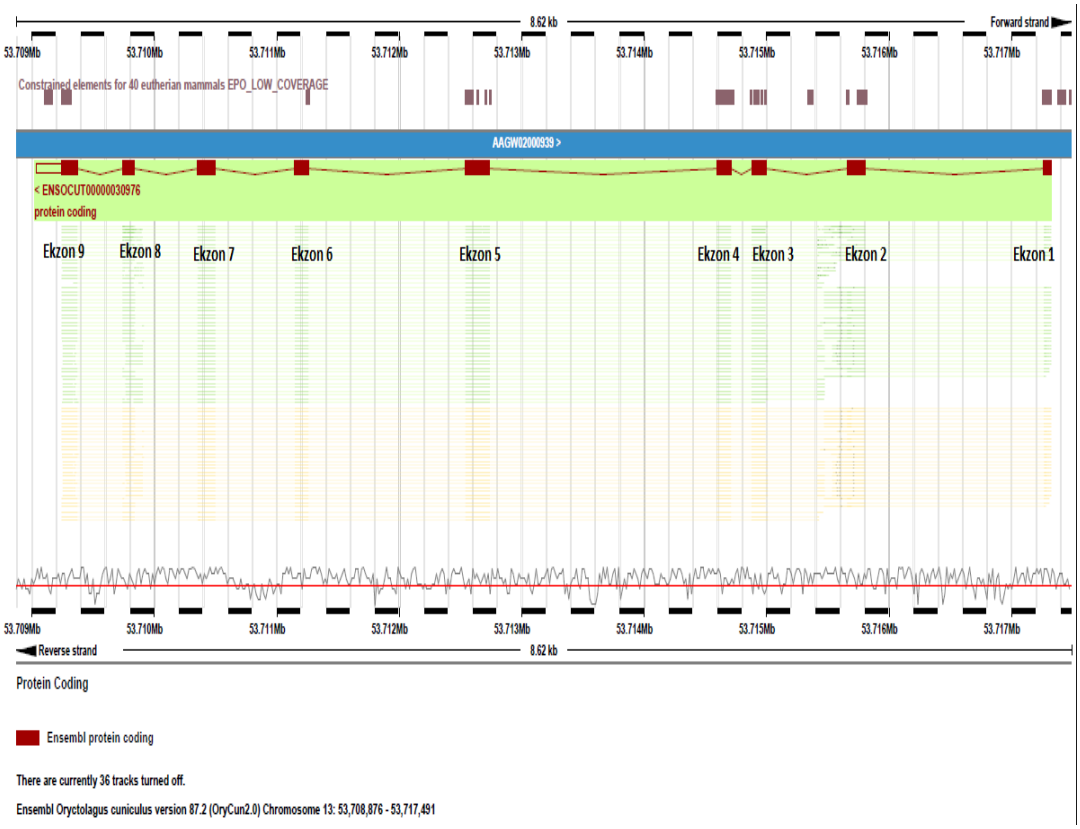
Şekil 4.28. Tavşanın 13. kromozomu



Şekil 4.29. Tavşan kimozin geninin ekzon ve intron bölgeleri

On üçüncü kromozom üzerinde tavşan kimozinin ekzon ve intron dizilimlerine ulaşılması ve şekil 4.29. 'un oluşturulması birkaç seri analizden sonra gerçekleşmiştir. Öncelikle kimozin geninin tek lokustan sentezlendiği (Donelly ve ark., 1986) 13. kromozomun 53709000 ile 53717500 bazları arasında 8500 bazdan oluştuğu görülmüştür (NCBI, ensemble). Bunun yanında tavşanın genomik DNA'sının dokuz ekzon bulundurabileceği düşüncesine; sığır kimozini (Hidaka ve ark., 1986), deve kimozini (Kappeler ve ark., 2006) ve insan reninin (Miyazaki ve ark., 1984) genomik

DNA'larının dokuz ekzon ve bunları bağlayan sekiz introndan oluştuğunun belirlenmiş olmasından ulaşılmaktadır. Burdan yola çıkarak tavşanın genomik DNA sı (13. kromozom) ile cDNA dizilimi karşılaştırılarak dokuz ekzon bölgesine ulaşılmıştır.



Şekil 4.30. Tavşan kimozinin ekzon intron dağılımı

Tavşana ait kimozin geninin ekzon ve intron dağılımı Şekil 4.30.'da gösterilmektedir. Ekzon bölgeleri kutucuklar şeklinde işaretlenmiş ve soldan sağa dokuzuncu ekzondan birinci ekzona doğru sıralanmıştır. (www.ensembl.org)

4.4.3. Farklı memeli türlerinin kimozin, katepsin ve pepsin genlerinin filogenetik analizi

Farklı memeli türlerinin genomlarında bulunan kimozin, katepsin ve pepsin genlerinin filogenetik analizlerinin yapılabilmesi amacıyla bu genlere ait dizilimler ilgili DNA bilgi bankalarında aranmışlardır. Bu amaçla ncbi.gov sitesi kullanılmış ve

burada bulunan ilgili genlerin dizilimleri bağlı bulundukları giriş numaralarıyla beraber indirilerek dizi analizlerinde kullanılmışlardır.

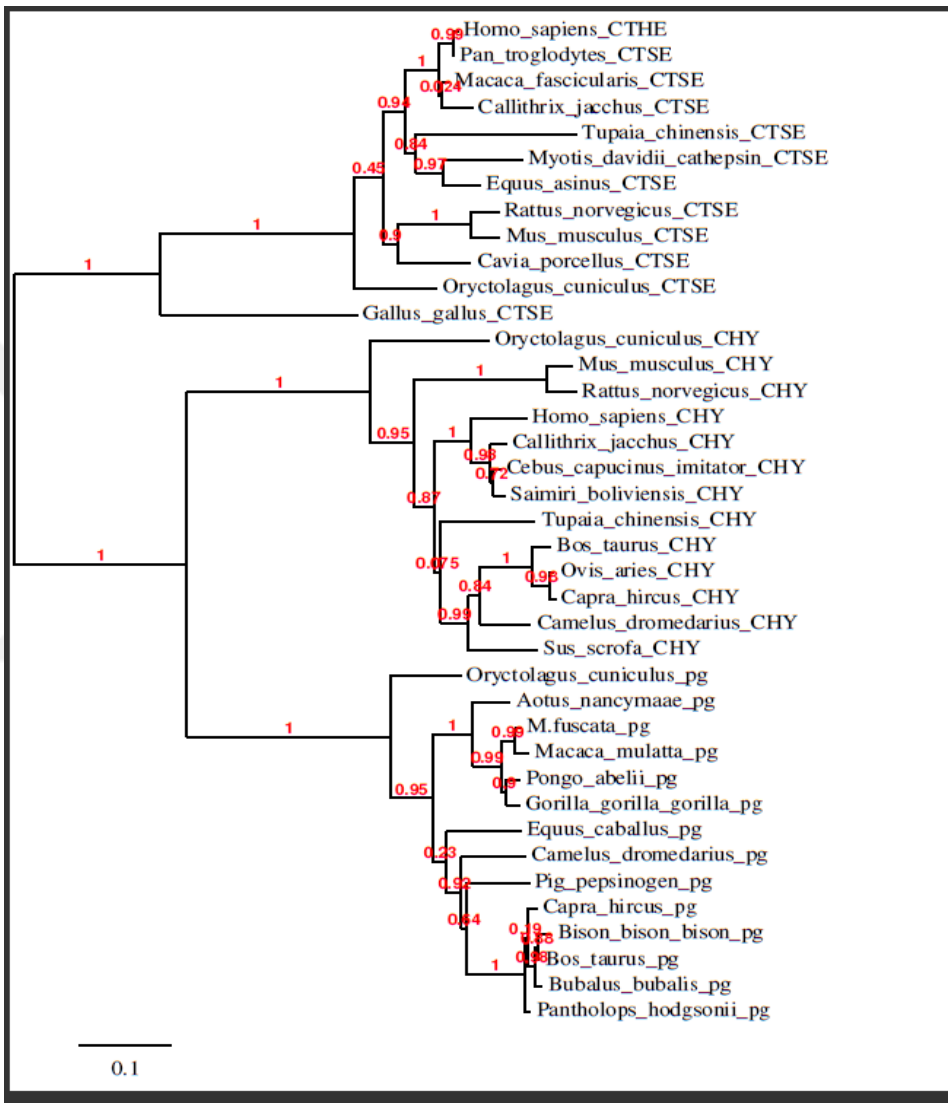
Filogenetik ağaçların çizilmesi hedeflenen türlerin her biri için kimozin, pepsin katepsin genlerinin amino asit dizilimleri ve nükleotid dizilimlerine ulaşılmış ve bu genlerin hem amino asit dizilimerine göre hem de nükleik asit dizilimlerine göre filogenetik ağaçlar çizilmiştir. Toplam 6 adet filogenetik ağaç çizilmiştir. Bu çizimlerden sonra kimozin, pepsin ve katepsin genleri şekil 4.33. ve 4.34. 'de olduğu gibi tek bir ağaç üzerinde gösterilmiştir. Çizelge 4.4. 'te filogenetik analizlerde kullanılan canlı türleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Filogenetik analizler için kullanılan canlı türleri

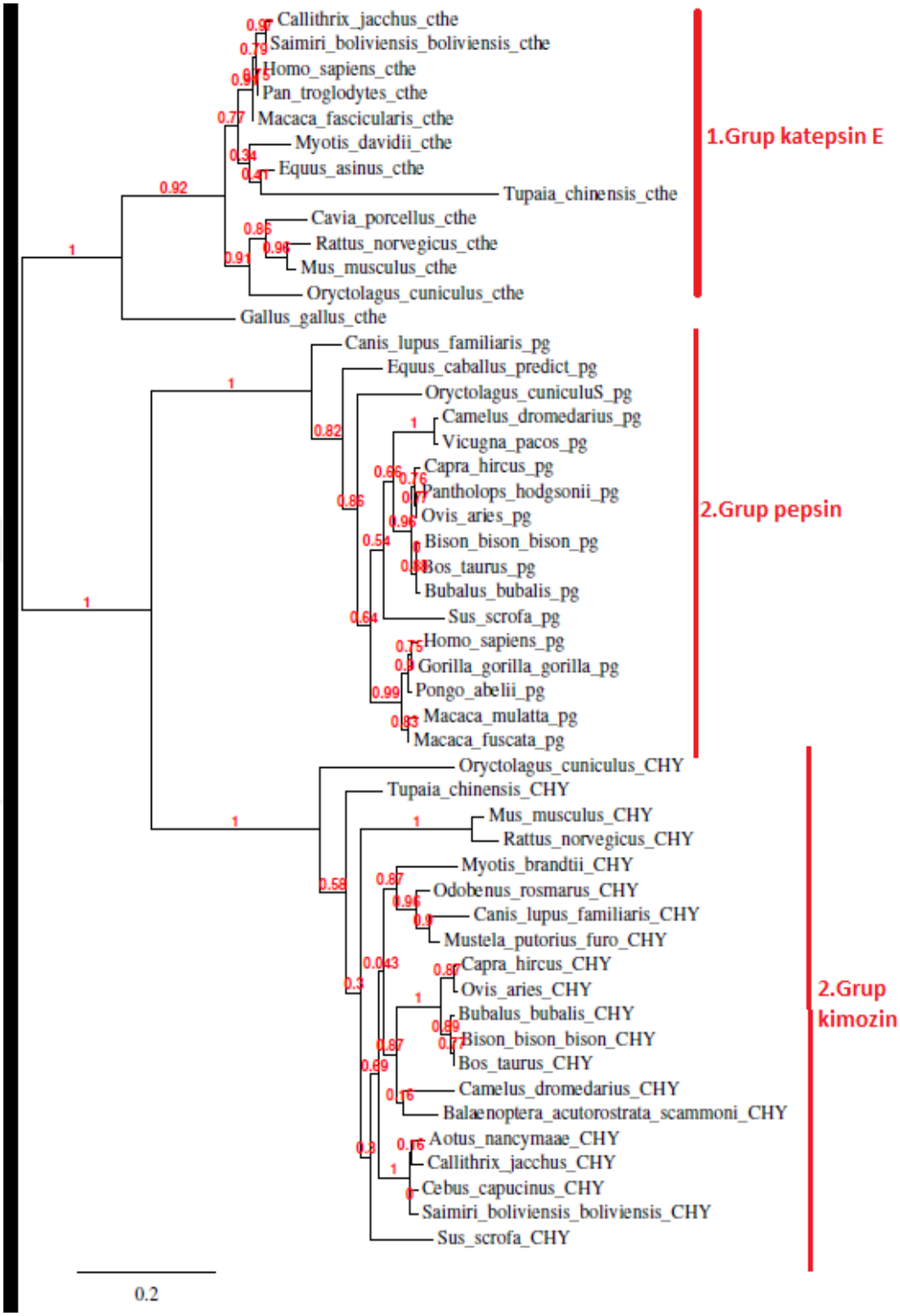
Türlerin Bilimsel Adlandırılması	
Callithrix jacchus chymosin	İpek maymunu
Cebus capucinus chymosin	Beyaz başlıklı kapıçin
Saimiri boliviensis boliviensis chymosin	Sincap Maymunu
Aotus nancymaae	Gece Maymunu
Odobenus rosmarus divergens	Deniz aygırı
Balaenoptera acutorostrata scammoni	Balina
Mustela putorius furo	Feret
Sus scrofa (	Domuz
Bubalus bubalis	Asya mandası
Bison bison bison	Bizon
Bos taurus	Sığır
Capra hircus	Keçi
Ovis aries	Koyun
Canis lupus familiaris	Köpek
Oryctolagus cuniculus	Tavşan
Camelus dromedarius	Deve
Mus musculus	Fare
Rattus norvegicus	Sıçan
Myotis brandti	Yarasa
Homo sapiens chymosin pseudogene	İnsan

Hem cDNA dizilimleri hem de amino asit dizilimlerine göre çizilen aspartik asit filogenetik ağaçları incelendiğinde kimozin ve pepsinin katepsine göre birbirine daha yakın olduğu görülmektedir. MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk) Rawlings ve ark., 2010) sınıflandırılmasına bakıldığında da kimozin ve pepsinin pepsin-like

familyasının A1 sınıfına ait olduğu ve gen dizilimlerinin % 55 oranında benzer olduğu anlaşılmaktadır. Pepsin ve kimozinin özellikle β düzlemsel yapılarını oluşturan kıvrımlı (foldedbarrel domain) alanın tamamıyla aynı yapısal özellikler gösterdiği belirtilmiştir (Tang ve ark., 1973).



Şekil 4.31. kimozin (CHY), pepsin (pg) katepsin (CTSE) nükleik asit dizilimlerine göre filogenetik ağacı



Şekil 4.32. Aspartik protezların (kimozin pepsin katepsin) genlerinin amino asit dizilimlerine göre filogenetik ağaç çizimleri

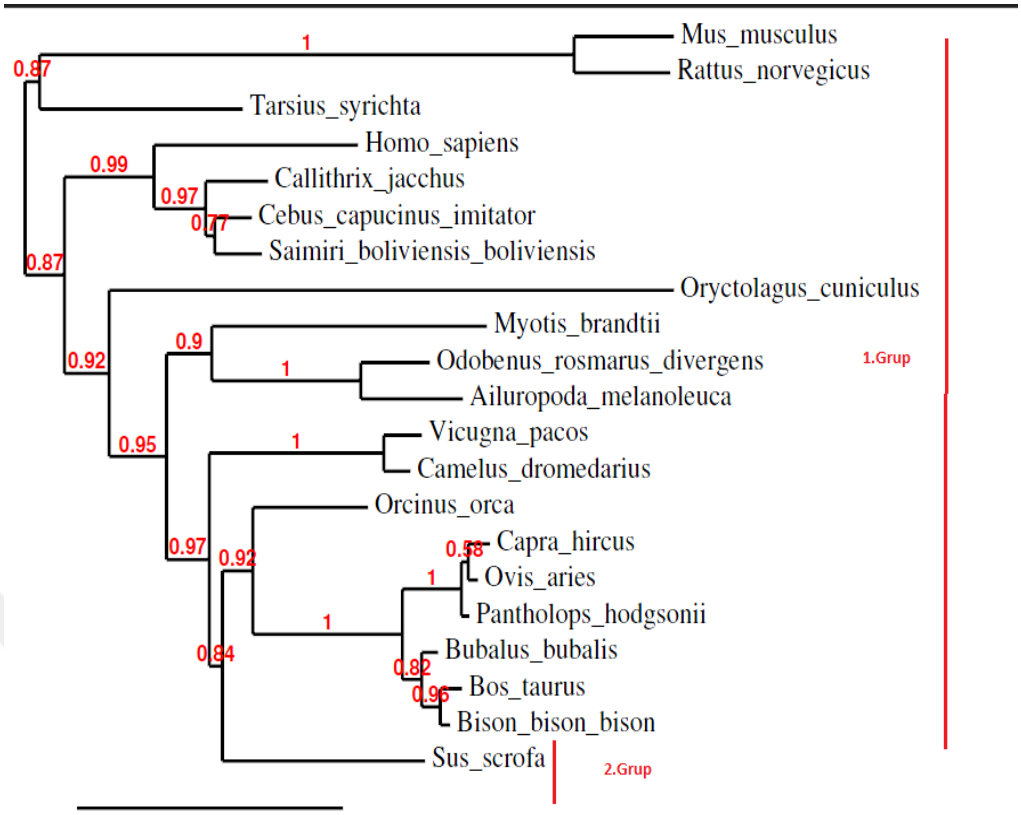
Şekil 4.32. incelendiğinde filogenetik ağacın başlangıçta 2 gruba ayrıldığı görülmüştür. Birinci grupta katepsin proteini, 2.grupta pepsin ve kimozin olarak iki ayrı dala bölündüğü görülmüştür. Bu da kimozin proteinin pepsine olan benzerliğinin katepsine olan benzerliğinden daha fazla olduğunu göstermektedir. Tavşanın aspartik proteaz ağacı içerisindeki konumu incelendiğinde 1. Grupta kemirgenlere daha yakın olduğu görülmektedir. İkinci grupta pepsin ailesi içerisindeki konumuna bakıldığında deve köpek ve eşek türlerine yakın olduğu görülmektedir.

4.4.3.1. Kimozin geni filogenetik ağacı

Kimozin geni için filogenetik ağaç çizilmeden önce gen bankalarından kimozin gen dizilimleri bilinen canlıların veri giriş numaraları kaydedilmiş (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) hem cDNA dizilimleri hem de amino asit dizilimleri baz alınarak filogenetik ağaç çizilmiştir.

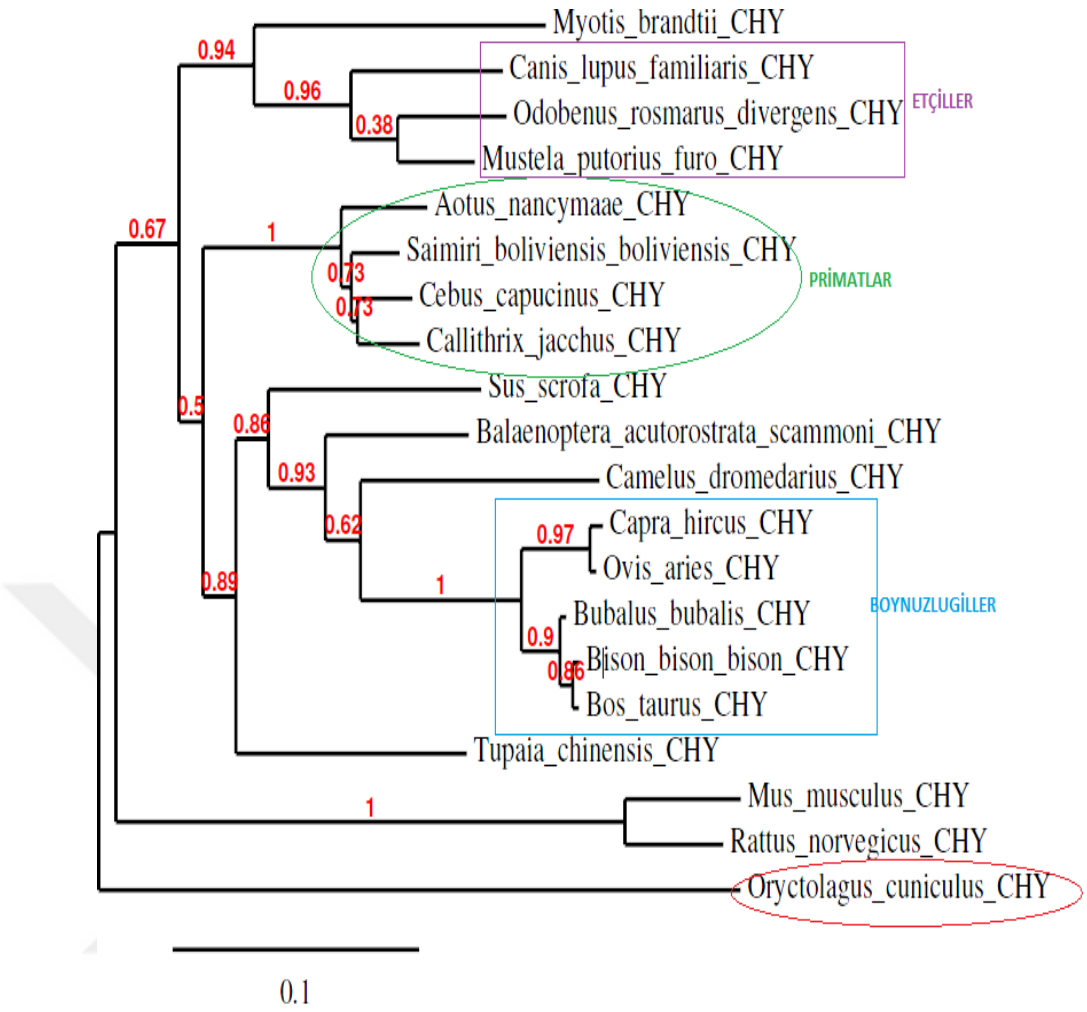
Bu analizlerde amaç farklı canlı türlerinin kimozin genleri arasındaki evrimsel akrabalığı ve tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) kimozinin diğer türlere olan yakınlığı ve diğer türlerle olan evrimsel ilişkisini değerlendirmektir.

Öncelikle cDNA dizilimleri baz alınarak kimozin genin filogenetik ağacı çizilmiştir. Analiz için 21 farklı canlı türü belirlenmiştir. Bu canlı türlerinin tamamı memeliler sınıfına ait, 8 farklı takımdan, 16 sınıf ve 3 alt sınıftan oluşmaktadır (NCBI taxonomy).



Şekil 4.33. Farklı türlerin kimozin geni cDNA dizilimlerine göre çizilen filogenetik ağaç

Şekil 4.33. 'teki filogenetik ağaç incelendiğinde başlangıçta ağacın 2 grup şeklinde dallandığı görülmektedir. İkinci grupta domuz kimozini (*Sus sucrofa*), 1. grupta ise diğer 20 canlı türü bulunmaktadır. Tavşanın (*Oryctolagus cuniculus*) da 1. grupta olduğu tespit edilmiştir. Bu grup içerisinde tavşanın primatlara yakın olduğu bununla birlikte deve türüne olan yakınlığı, ruminantlara (koyun, keçi, antilop, sığırlar) olan yakınlığından daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.34. Amino asit dizilimlerine göre çizilen kimozin geni filogenetik ağacı

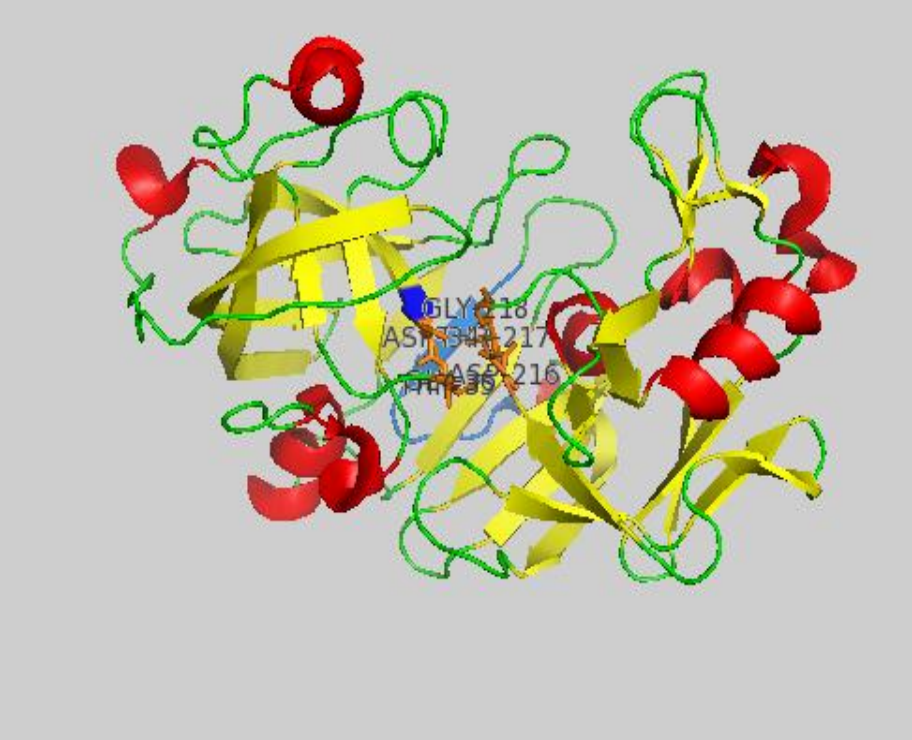
Şekil 4.34.' te amino asit dizilimleri baz alınarak çizilen filogenetik ağaçta ise ağacın 3 grup şeklinde dallandığı görülmüştür. Birinci grupta primatlar, etçiller ve çift toynaklılar; 2. grupta kemirgenler, 3. grupta ise sadece tavşan türü bulunmaktadır. Burdan yola çıkarak tavşanın kimozinin diğer türlerden daha farklı bir özelliğe sahip olduğu söylenebilir. Tavşan kimozinin amino asit dizilimi diğer türlerle karşılaştırılması yapıldığında da benzerlik oranlarının %75 ile %72 arasında olduğu görülmüştür (NCBI blastx).

4.4.4. Protein modelleri

Bu çalışmada amaç farklı türlere ait kimozin enzimi, pepsin ve katepsin enzimlerinin kendi içinde modellerinin karşılaştırılması ve aynı zamanda bu enzimlerin modellerinin yapıları birbiri ile karşılaştırılarak yapısal farklılıklar ya da benzerliklerin bulunması amaçlanmıştır. Bu bağlamda modelleme programı kullanılmıştır. Bu program ile türlere ait amino asit dizilimleri programa yüklenmiş ve protein modelleri incelenmiştir. Aşağıda bazı türlere ait protein modelleri gösterilmiştir.

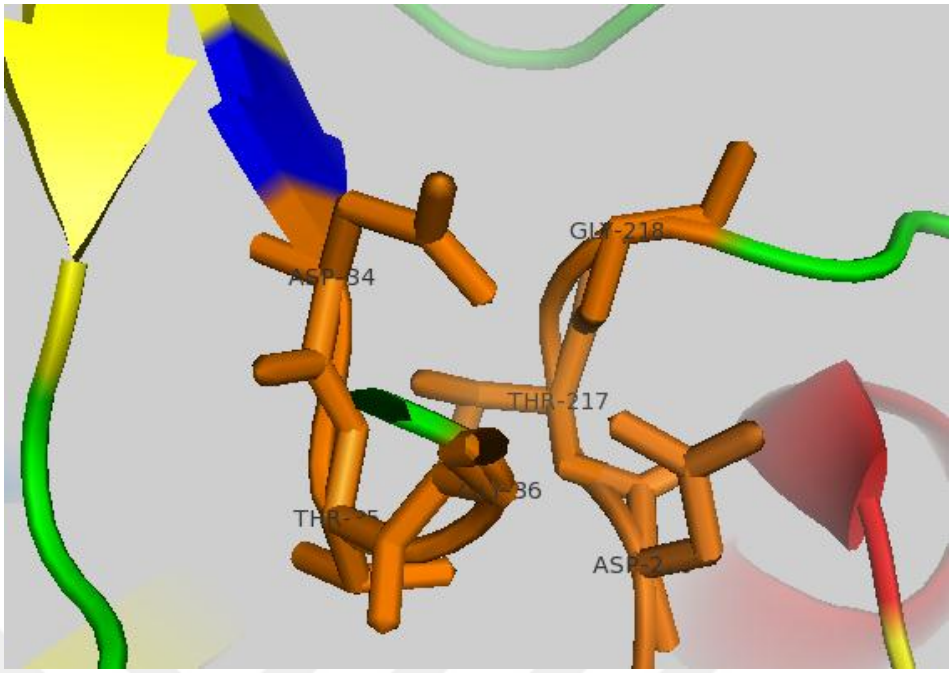
Tüm aspartik proteazların en önemli özelliği hidrojen bağlarıyla desteklenen korunmuş kompleks bir yapı iskelesini bulundurmasıdır. Bu yapı 'fireman grip' olarak adlandırılmıştır. Aspartik proteazların aktif bölgeleri Asp-Xaa-Gly motifi içerisinde yerleşmiştir. Xaa olarak gösterilen amino asit serin veya treonin olabilir (Blundell ve ark., 1991; Sielecki ve ark., 1991).

Şekil 4.35. 'te buzağı kimozinin (amino asit dizilimi veri giriş numarası ABU41411) üç boyutlu yapısı PyMol programı (1.3 versiyonu) ile çizilmiştir. Kırmızı ile gösterilen yapılar helezonlar, sarı ile gösterilen yapılar beta düzlemsel yapılarını göstermektedir. Şekilde rezidüleri adlandırılmış ve kahverengi ile gösterilmiş yapılar aktif bölgeyi belirtmektedir. Şekil 4.36. 'da bu bölge daha ayrıntılı olarak çizilmiştir.



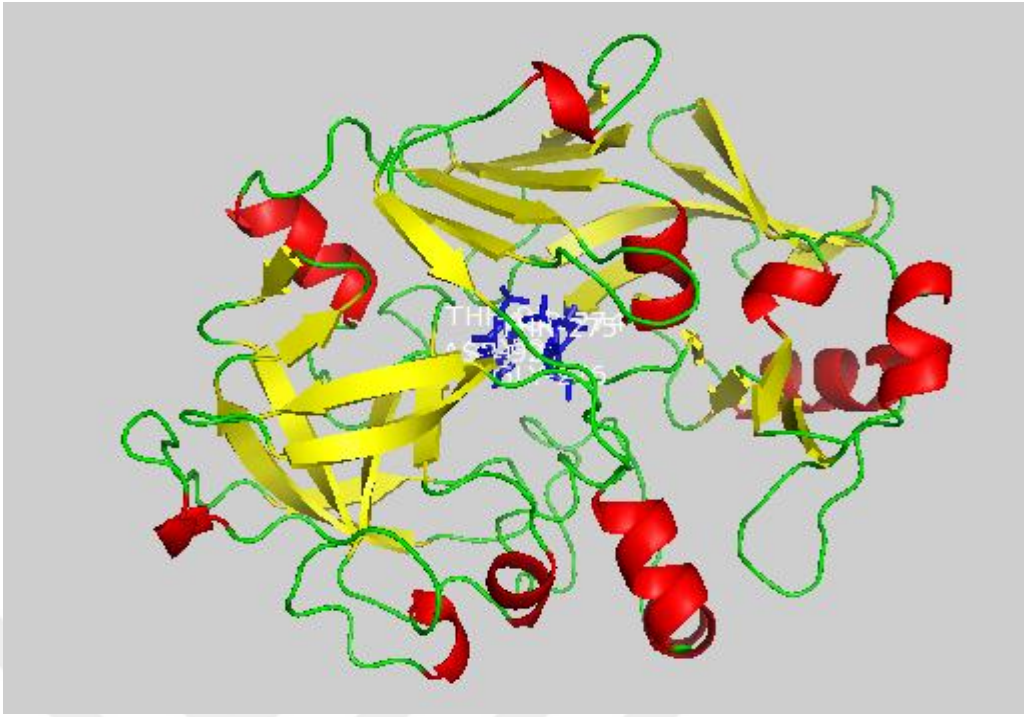
Şekil 4.35. Buzağı kimozinin protein yapısı

Şekil 4.36. ’da buzağı kimozinin (amino asit veri giriş numarası ABU41411) aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı 4 °A çözünürlükte PyMol programı (1.3 versiyonu) ile çizilmiştir. Kahverengi ile gösterilen aktif bölge Asp34Thr35Gly36 (DTG) ve Asp216Thr217Gly218 (DTG) rezidülerinden oluşmaktadır. Şekil 4.35. ’te kimozin enziminin üç boyutlu yapısının tamamı incelendiğinde aktif bölgenin enzimin iç kısmında konumlandığı görülmüştür.



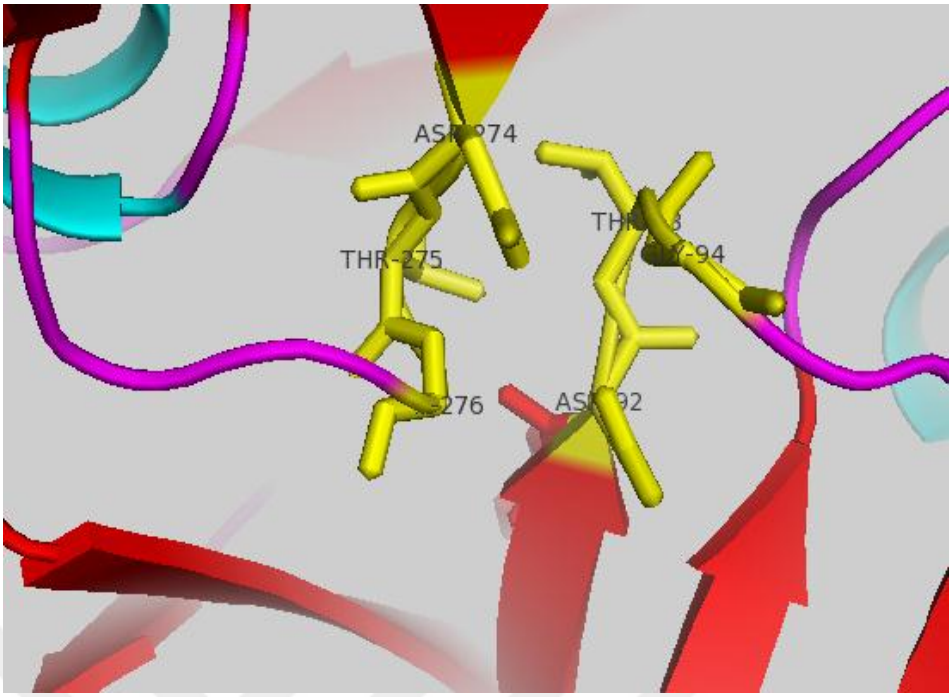
Şekil 4.36. Buzağı kimozini aktif bölgesi

Şekil 4.37. ’de tavşan kimozinin (amino asit veri giriş numarası; XP_002715833) üç boyutlu yapısı PyMol programı (1.3 versiyonu) programı ile çizilmiştir. Kırmızı ile gösterilen yapılar helezonlar, sarı ile gösterilen yapılar beta düzlemsel yapılarını göstermektedir. Şekilde rezidüleri adlandırılmış ve mavi ile gösterilen bölge aktif bölgeyi belirtmektedir. Şekil 4.38. ’de bu bölge daha ayrıntılı bir şekilde çizilmiştir. Şekil 4.37., Şekil 4.36. ile karşılaştırıldığında buzağı ve tavşan kimozinin enzim yapılarının benzer olduğu görülmüştür.



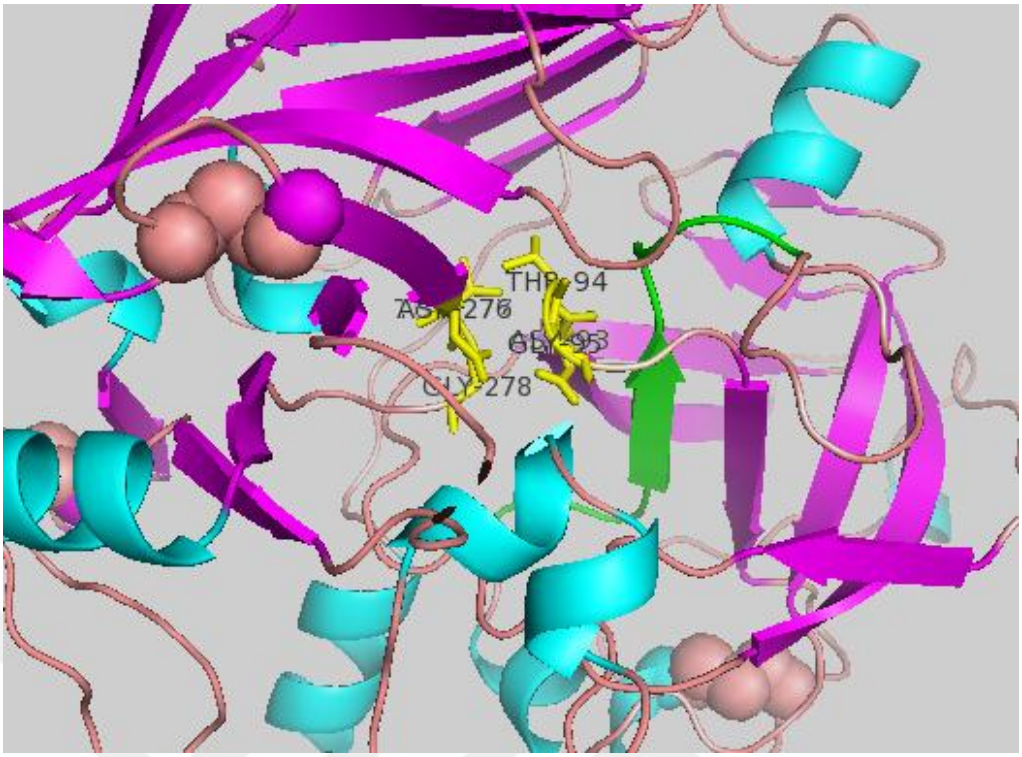
Şekil 4.37. Tavşan kimozini enziminin üç boyutlu yapısı

Şekil 4.38. ’de tavşan kimozinin (amino asit dizilimi veri giriş numarası XP_002715833) aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı 4°A çözünürlükte PyMol programı ile çizilmiştir. Sarı ile gösterilen bu bölge Asp92Thr93Gly94 (DTG) ve Asp274Thr275Gly276 (DTG) rezidülerinden oluşmaktadır. Şekil 4.36. ’da çizilmiş olan buzağı kimozini enziminin aktif bölgesi ile tavşan kimozini enziminin aktif bölgesi karşılaştırıldığında yapıların aynı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.38. Tavşan kimozini aktif bölgesi

Şekil 4.39. ’da tavşanın pepsin enzimine (amino asit dizilimi veri giriş numarası AAA85370) ait üç boyutlu yapısı PyMol programı ile çizilmiştir. Şekilde helezonlar mavi ile, beta düzlemsel yapıları mor ile gösterilmiştir. Protein modellerine ait şekiller incelendiğinde kimozin ve pepsin protein modellerinin benzerlik gösterdiği ve tavşan pepsinin de tıpkı tavşan kimozini gibi aktif bölgesinin aynı motiflerden oluştuğu ve bu bölgelerin de karşılıklı olarak yapılandığı görülmüştür. Önceki çalışmalarda Mello ve ark., (2009) protein modellemede kimozin ve pepsin yapılarının birbirine çok yakın olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 4.39. Tavşan pepsini protein yapısı

Şekil 4.39'da tavşanın pepsin enzimine (amino asit dizilimi veri giriş numarası AAA85370) ait üç boyutlu yapısı PyMol programı ile çizilmiştir. Şekilde helezonlar mavi ile, beta düzlemsel yapıları mor ile gösterilmiştir. Protein modellerine ait şekiller incelendiğinde kimozin ve pepsin protein modellerinin benzerlik gösterdiği ve tavşan pepsinin de tıpkı tavşan kimozini gibi aktif bölgesinin aynı motiflerden oluştuğu ve bu bölgelerin de karşılıklı olarak yapılandığı görülmüştür. Önceki çalışmalarda Mello ve ark., (2009) protein modellemede kimozin ve pepsin yapılarının birbirine çok yakın olduğunu tespit etmişlerdir.

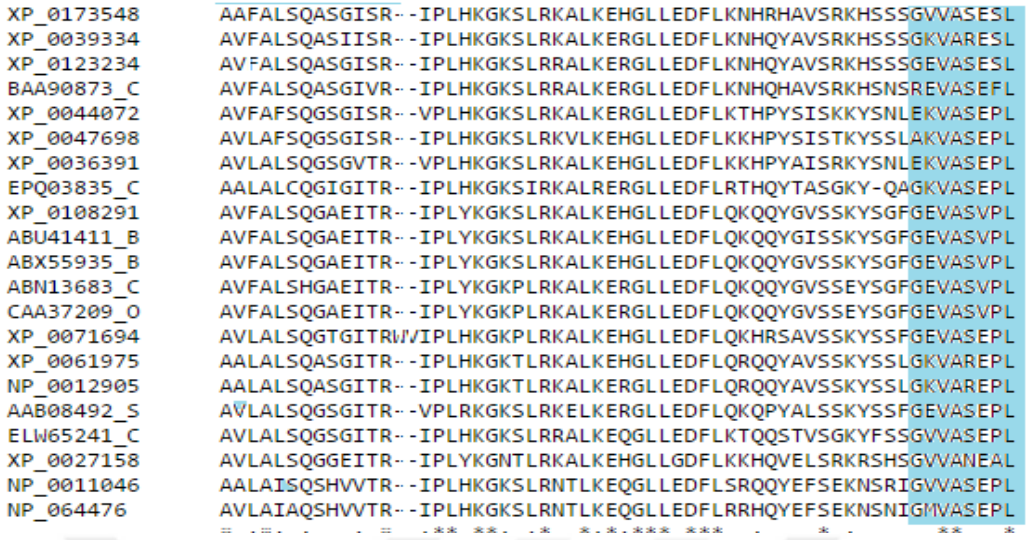
4.4.5. Dizilimlerin çoklu karşılaştırılması (Multiple Sequence Allignment)

Şekil 4.40., Şekil 4.41., Şekil 4.42. MUSCLE (3.8.31) programı kullanılarak 21 canlı türüne ait kimozin enzimlerinin amino asit dizilimleri birlikte karşılaştırılmıştır. Şekil 4.40 incelendiğinde sinyal peptit dizilimlerinin motiflerinin benzer olduğu tespit edilmiştir. 13 canlı türünde motifin MRCLVVLL olduğu, 4 canlı türünde MRGFVVLL olduğu, diğer motiflerden daha farklı bir motife sahip olan IRGRVLL motifinin de Çizelge 4.2. 'deki amino asit veri giriş numaraları incelendiğinde domuza ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.40. kimozin enziminin sinyal peptit kısımlarının karşılaştırılması

Şekil 4.41. 'de yapılan çoklu dizlim karşılaştırılmasında kimozin enziminin öncül kısımlarının başlangıç dizilimlerinin benzer olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.41. Kimozin enziminin Öncül (pro) kısımların karşılaştırılması

Şekil 4.42. ’de aktif bölgenin DTG motifinin 21 canlı türünün tamamında %100 korunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında DTG motifinin sağında ve solundaki 10 adet rezidünün de % 85-%75 arasında korunduğu tespit edilmiştir. Bu çoklu karşılaştırmalar sonucunda kimozin enziminin 21 canlı türünde evrimsel bir akrabalık ilişkisinin olduğunu ve aktif bölgelerdeki motiflerin aynı enzim substrat ilşkisinin aynı etkileri gösterdiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.42. kimozin enzimlerinin aktif bölgelerin karşılaştırılması

4.4.6. Korunmuş motifler

Multiple Em For Motif Eliciation DNA, RNA ya da protein dizilimlerinde korunmuş motifleri bulmak için kullanılan bir programdır (http://meme.nbcr.net). Bu program kullanılmadan önce tüm dizilimlerin FASTA formatında oluşturulup programa yüklenmesi gerekmektedir. Program bize korunmuş üç motif dizilimi vermekte ve her dizilim 6-50 amino asitten oluşmaktadır.

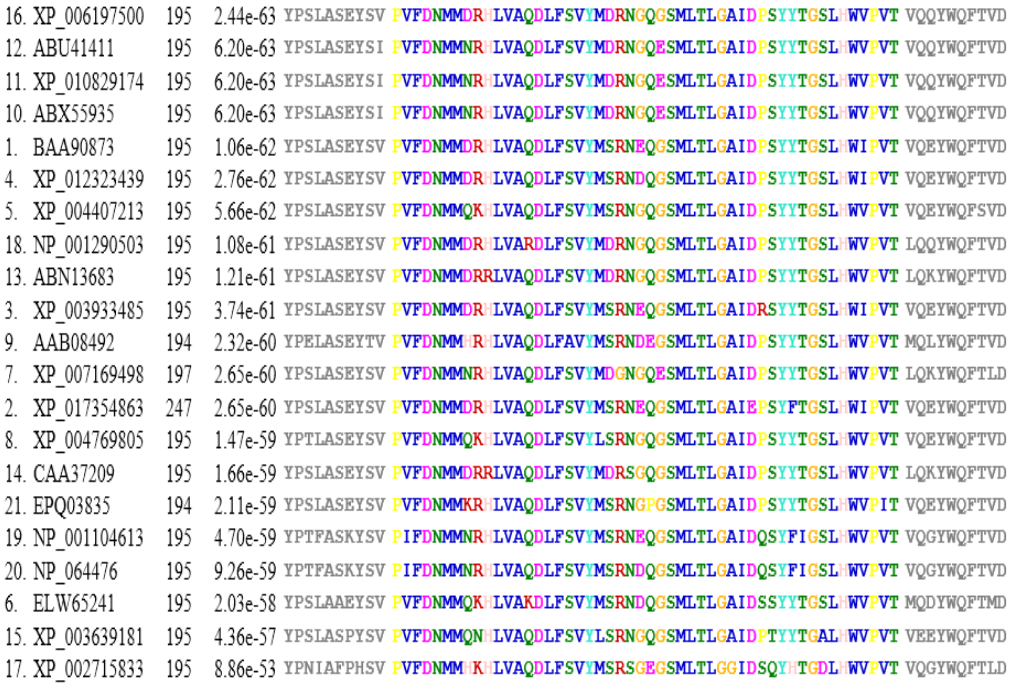
Kimozin enziminin amino asit dizilimlerinde korunmuş bölgelerin bulunması için MEME (Multiple Em for Motif Eliciation) programı kullanılmıştır. Programda 21 canlının kimozin enzimlerinin amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır ve program sonunda korunmuş üç motif bulunmuştur. Bulunan her motifin amino asit zincir uzunluğu 50 amino asitten oluşmaktadır. İncelenen motiflerde dikey eksende 4 birimlik bir uzunluğun olduğu ve amino asitlerin korunmuşluk durumuna göre harflerin (amino asitlerin) birim uzunluklarının değiştiği görülmüştür. Örneğin Şekil 4.43. 'te görüldüğü gibi prolin (P) amino asitinin uzunluğu 4 birim olarak görüntülenmiştir. Bu ifade prolin amino asitinin 21 canlı türünde de % 100 korunduğu anlamına gelmektedir. Bu analiz sırasıyla hem pepsin hem de katepsin için yapılmıştır.

Motif 1(195-244)

Motif 1 incelendiğinde üç boyutlu protein yapılarında bulunan helix yapılarının 195-202 diziliminin (PVFDNMMdr) amino asitlerinin tüm üç boyutlu yapılarda helezonları oluşturduğu ve bunun analizdeki tüm türlerde % 90 oranında korunduğu gözlenmiştir. Ayrıca %100 korunmuş olan SMLTGAID motifi incelendiğinde beta düzlemsel yapıyı oluşturan bir dizilim olduğu ve bunun analizlerdeki tüm canlılarda ortak olduğu gözlenmiştir. Bu dizilimi takip eden zincirin de bir helezonal yapı ve beta düzlemsel yapıyı oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.43. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 1)



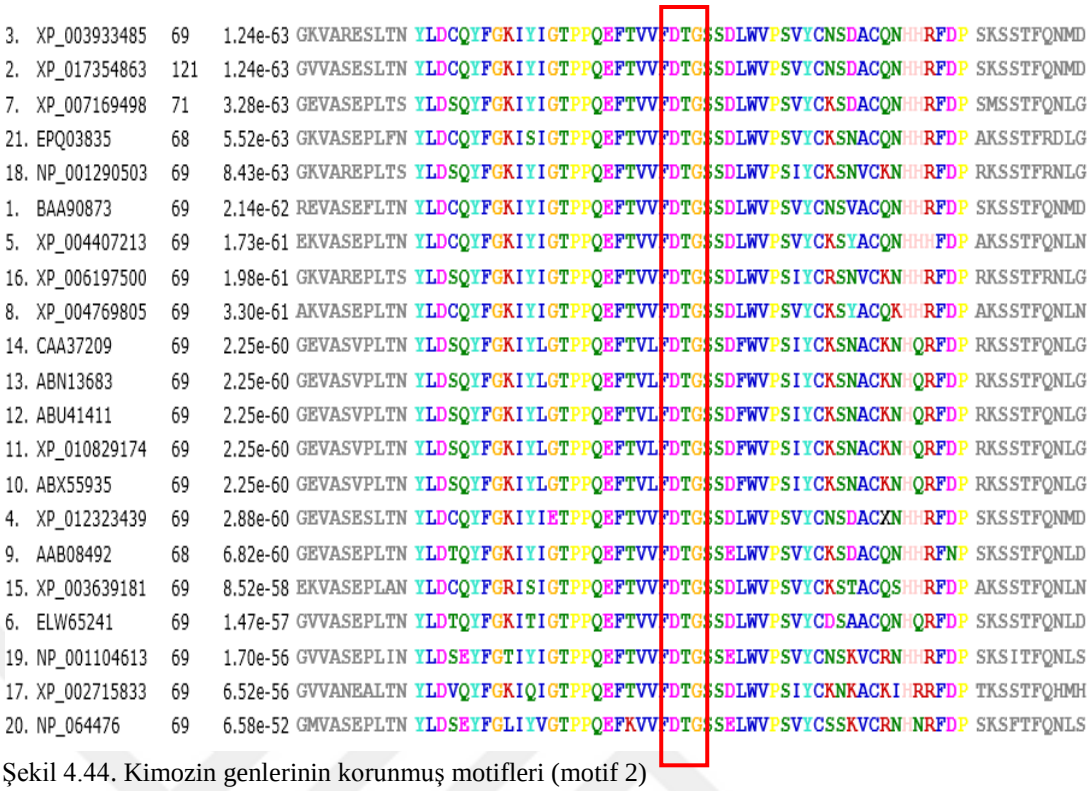
Şekil 4.43. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 1)

Motif 2 (69-118)

Şekil 4.44.'te kimozin genlerinin korunan 2. Motifleri gösterilmiştir. Motif ikinin dizilimi, kimozin genlerinin amino asit dizilimlerinde 69 ile 118 rezidüleri arasında kalmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta 92. rezidüde de bulunan aktif bölgenin (aspartikasid, D) analizlerdeki tüm türlerde korunmuş olmasıdır. Bunun yanında aktif bölgenin sağında ve solunda bulunan amino asitlerin n tamamı korunmuş durumdadır.



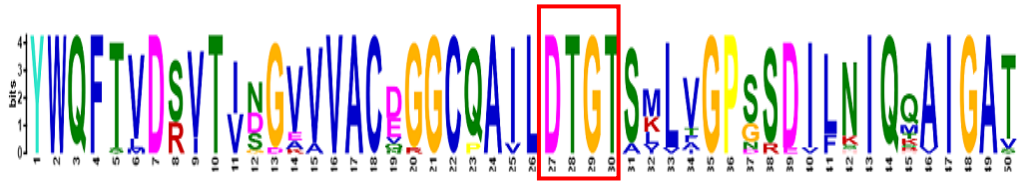
Şekil 4.44. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 2)



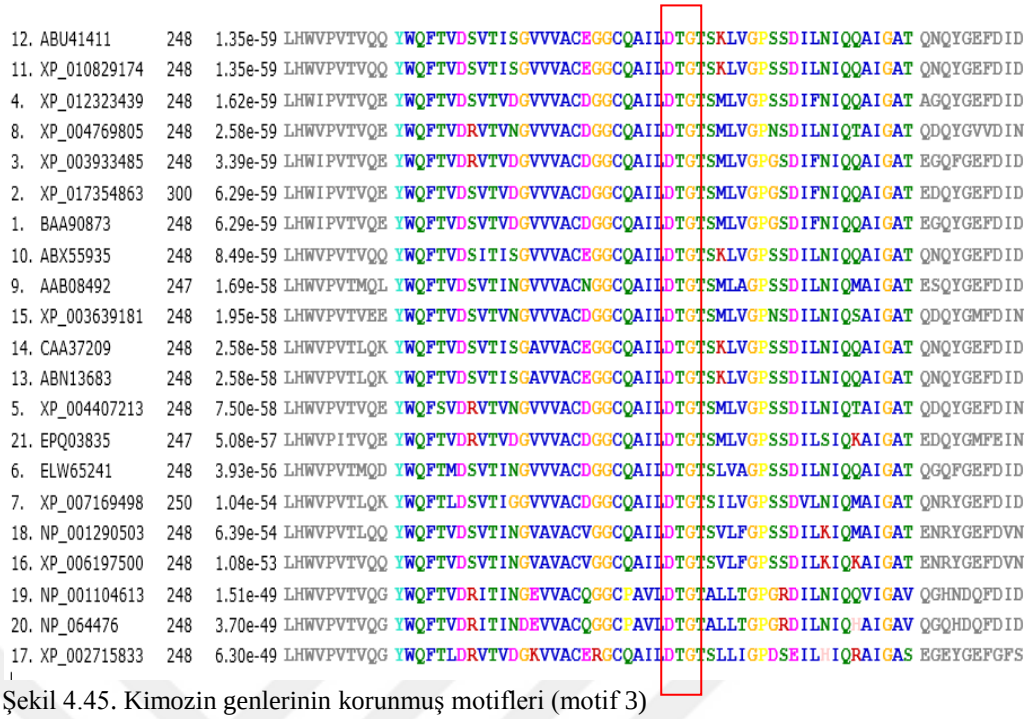
Şekil 4.44. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 2)

Motif 3 (248-297)

Şekil 4.45. ‘te gösterilen Motif 3 incelendiğinde aktif bölgenin yani DTG (Asp-Thr-Gly) motifinin tüm türlerde tamamen korunduğu görülmüştür. Ayrıca bu motifin sağındaki ve solundaki amino asitler de tüm türlerde korunmuştur. Bu motif tavşan kimozini üzerinde incelendiğinde katlanmış dört boyutlu yapının iç kısımlarında gömülü olarak görülmüştür. Bunun dışında YWQF ve AIGA motiflerin de tamamen korunduğu görülmüştür.

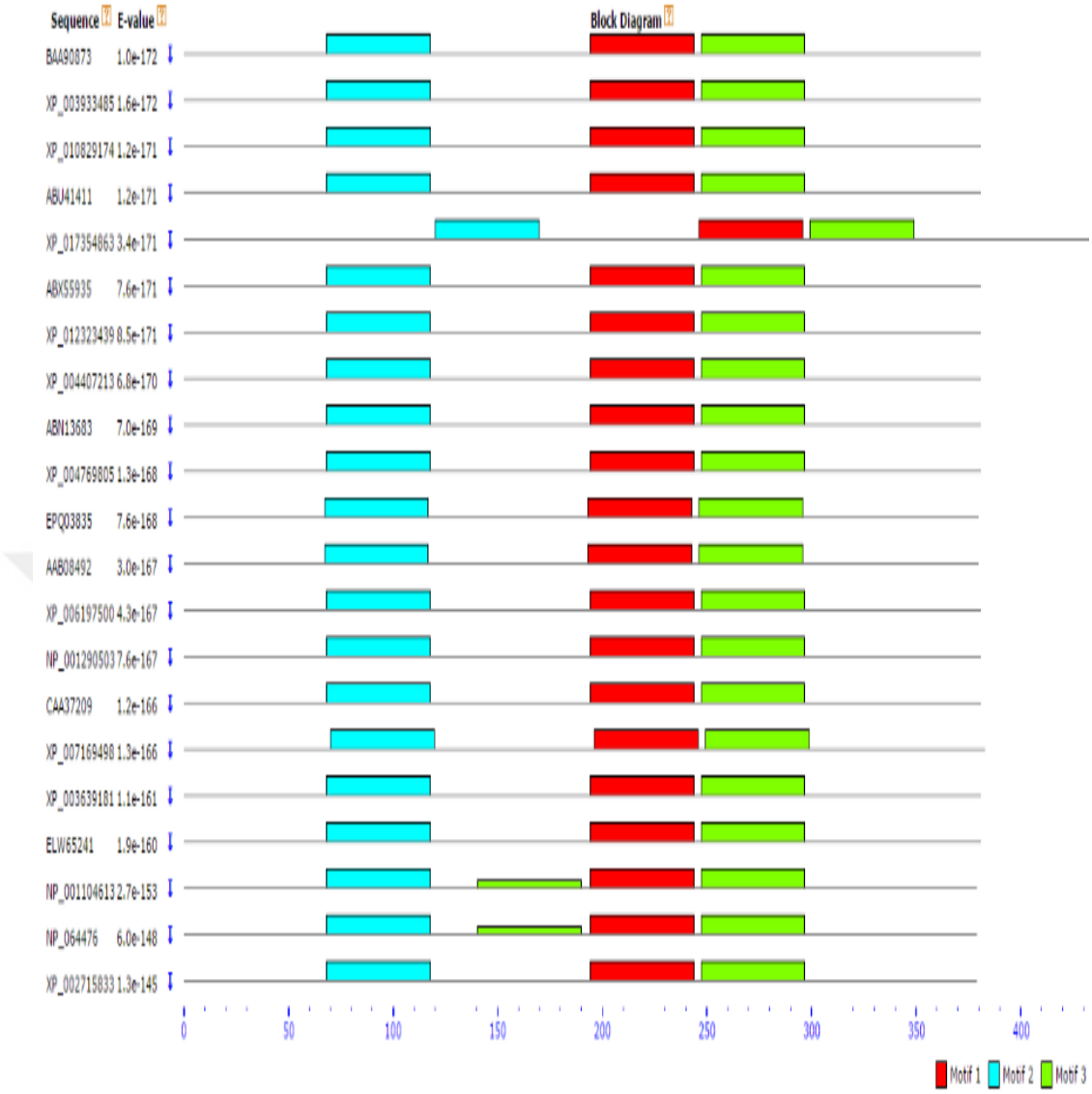


Şekil 4.45. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 3)



Şekil 4.45. Kimozin genlerinin korunmuş motifleri (motif 3)

Şekil 4.46. 'da motif 1, motif 2 ve motif 3 desenlerinin kimozin geninin tüm amino asit dizilimi üzerindeki konumları gösterilmiştir. Şekilde motif 1 kırmızı, motif 2 mavi, motif 3 yeşil ile gösterilmiştir. Şekil incelelendiğinde amino asit dizilimi veri giriş numarası XP_017354863 (Çizelge 4.2.) olan bir maymun türü dışında motiflerin aynı bölgelerde konumlandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.46. Korunmuş motiflerin kimozin genleri üzerinde gösterimi

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Peynir yapımı için bugün dünyada hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan sağlanan enzimler kullanılmaktadır. Ancak artan nüfus ile birlikte tüketimin artması her alanda seri (endüstriyel) gıda üretimi ihtiyacını zorunlu kılmıştır. Bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı enzimlerin peynir yapımında yeterli etkiyi gösterememesi, hayvansal kaynaklardan elde edilen kimozinin sınırlı miktarda olması, yüksek maliyeti ve hayvandan izole edilirken yaşanan olumsuzluklardan dolayı artan peynir ihtiyacını karşılamak için mikrobiyal kaynaklı enzimlere yönelme olmuştur. Bu da rekombinat kimozin teknolojisinin büyük bir hızla ilerlemesine yol açmıştır. Rekombinant kimozin üretimi için günümüze kadar domuz (Housen ve ark 1996), buffalo (Mohanty ve ark., 2003), kuzu (Rogelj ve ark., 2001), keçi (M.C. Vega-Hernandez ve ark., 2004) ve son olarak deve (Kappeler ve ark., 2006) gibi memelilerin kimozin genlerinin karakterizasyonu yapılmış, gen dizilimleri belirlenmiş ve endüstriyel peynir üretiminde kullanılmak üzere rekombinant olarak üretimi sağlanmıştır. Tavşan rennetinin de peynir üretimi için iyi bir kaynak olduğu belirtilmiştir (Rao ve Dutta, 1981). Ancak şu ana kadar tavşan kimozininin karakterizasyonu ve mikrobiyal olarak üretimi yapılmamıştır. Bu çalışmada tavşan genomundan kimozin geni izole edilip karakterizasyonu yapılarak gen dizilimi belirlenmiş ve rekombinat tavşan kimozini üretimi için gerekli olan genetik bilgiler elde edilmiştir. Bu bağlamda üzerinde çok fazla araştırma yapılan ve ilk rekombinat kimozin olarak üretilen sığır kimozininden yola çıkarak diğer memeli türlerin ve tavşan genomuna ait kimozin ve benzeri genlere Gen Bankalarından ulaşılmıştır. Kimozin genlerine ulaşılan türlerin hem nükleotid dizilimleri için hem de amino asit dizilimleri için veri giriş numaraları kaydedilmiştir. Bu numaralar daha sonra yapılacak olan kimozin geninin karakterizasyonu için oldukça önem arzetmektedir. Memeli türlerinin genomik DNA'ları üzerine yapılan araştırmalar sonucunda (Buzağı kimozini 3. Kromozom Hidaka ve ark., 1986; insan renini 1. kromozom Miyazaki ve ark., 1984; domuz 4. kromozom Houen ve ark., 1996; deve 1. kromozom Kappeler ve ark., 2006) kimozin geninin tek bir lokustan sentezlendiği sonucuna ulaşılmıştır. Tavşan kimozinin de 13. kromozom üzerinde 53709000 ile 53717500 bazları

arasındaki bölgede olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu lokus üzerine yapılan araştırmalar sonucunda kimozin geninin dokuz ekzon ve sekiz introndan oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Kimozin genini tavşan genomundan izole edebilmek için ileri ve geri olmak üzere dört adet primer çifti tasarlanmıştır. Tasarlan bu primerler ile uygun koşullar sağlanarak PZR analizleri gerçekleşmiştir. Hedeflenen baz boyutlarındaki jellerden saflaştırılma yapılıp gen dizileme analizi için dizileme firmasına gönderilmiştir. Dizileme sonuçlarına ulaşıldıktan sonra tavşan genomu ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılmalar sonucunda ODF1(ileri) ve ODR1(geri) primerleri ile okunan dizilimler sonucunda sekizinci ekzonun tüm dizilimi tavşan genomu ile % 100 eşleşmiş ve böylece tüm dizilim oluşturulmuştur. ODF2 ve ODR2 primerleri ile okunan dizilim sonucunda altıncı ekzonun 60 bazlık bir kısmının tamamen eşleştiği görülmüştür. ODF3 ve ODR3 primerleri ile okunan dizilim sonucunda dördüncü ekzonun 27 bazlık kısmı, üçüncü ekzonun tüm dizilimine ulaşılmıştır. ODF4 ve ODR4 ile okuna dizilim sonucunda birinci intron bölgesinde 300 bazlık bir bölge tavşan genomu ile tamamen eşleşmiştir.

Farklı memeli türlerin ve tavşanın kimozin genlerinin cDNA dizilimleri üzerine yapılan araştırmalar ve karşılaştırılmalar sonucunda amino asit dizilimleri üzerinde sinyal (pre) kısımları, öncül kısımları (öncül) ve aktif dizilim bölgeleri belirlenmiştir (EK 5). Yapılan karşılaştırmalar sonucunda sinyal bölgelerin tüm türlerde aynı dizilimlerden oluştuğu görülmüştür. Pro kısımları incelendiğinde bu dizilimlerde de benzerlik görülmüştür. Aktif enzim bölgesini incelediğimizde ise aktif bölgelerin tüm türlerde % 100 korunduğu görülmüştür.

Öncelikle kimozin geninin diğer memeli aspartik proteazları olan katepsin ve pepsin ile olan evrimsel ilişkisini anlayabilmek adına filogenetik analizler yapılmıştır. Aspartik proteazlar için (katepsin, pepsin, kimozin) çizilen ağaçlar incelendiğinde iki grup şeklinde bir dallanma olduğu görülmüştür. Birinci grupta katepsin ikinci grupta pepsin ve kimozin genleri görülmüştür. Bu da kimozinin pepsinle olan evrimsel akrabalığının katepsinden daha fazla olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan farklı türlere ait sadece kimozin genleri için filogenetik analizler yapılmıştır. Amino asit

dizilimleri için çizilen ağaçlar incelendiğinde üç grup şeklinde bir dallanma görülmüştür. Birinci grupta primatlar, etçiller ve çift toynaklılar; 2. Grupta kemirgenler, 3. Grupta ise sadece tavşan türü bulunmaktadır. Burdan yola çıkarak tavşanın kimozinin diğer türlerden daha farklı bir özelliğe sahip olduğu söylenebilir. Tavşan kimozinin amino asit dizilimi diğer türlerle karşılaştırılması yapıldığında da benzerlik oranlarının % 75 ile % 72 arasında olduğu görülmüştür.

Kimozin proteinleirinin korunmuş bölgeleri incelendiğinde üç motif şeklinde 50 bazlık dizilimlerden oluşan bölgeler görülmüştür. Birinci motif bölgesinde %100 korunmuş olan PVFDNMDR diziliminin üç boyutlu yapılarda helezonları oluşturduğu tespit edilmiştir. Birinci motifte diğer %100 korunmuş olan SMLTGAID motifi incelendiğinde beta yapraklarını oluşturan dizilim olduğu ve bunun analizlerdeki tüm canlılarda ortak olduğu gözlenmiştir. Bu dizilimi takip eden zincirin de bir helezonal yapı ve beta düzlemsel yapıyı oluşturduğu gözlenmiştir. İkinci motif incelendiğinde 92. rezidüde de bulunan aktif bölgenin DTG motifinin (aspartikasid, D) analizlerdeki tüm türlerde korunmuş olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında aktif bölgenin sağında ve solunda bulunan amino asitlerin de tamamı korunmuş durumdadır. Motif üç incelendiğinde 216.rezidüdeki aktif bölgenin yani DTG motifinin yine tüm türlerde tamamen korunduğu görülmüştür. Tüm bu korunmuş modeller incelendiğinde aktif bölgenin tüm kimozin proteinlerinde ve tavşan kimozin proteininde enzimin iç kısmına gömülü bir şekilde ve aynı konumsal özellikleri taşıdığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

ABAD-ZAPATERO, C., RYDEL, T. J., and ERICKSON, J., 1990. Revised 2.3 °A structure of porcine pepsin: evidence for a flexible subdomain. Proteins: struct. Funct. Genet., 8: 62-81.

AIKAWA, J., YAMASHITA, T., NISHIYAMA, M., HORINOUCHI, S., and BEPPU, T., 1990. Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of mucor rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. J. Biol. Chem, 265: 13955-13959.

AIKAWA, J., NISHIYAMA, M., and BEPPU, T., 1992. Protein engineering of milk-clotting aspartic proteinases. Scand. J.Clin.Lab.Invest., 52: 51-58.

ALTSCHUL, S. F., BOGUSKİ, M. S., GİSH, W., and WOOTTON, J. C., 1994. Issues in Searching Molecular Sequence Databases. Nature Genetic, 6:119-129.

ALTSCHUL, S. F., GİSH, W., MİLLER, W., MYERS, E. W., and LİPMAN, D. J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol., 215:403-410.

AMMERER, G., HUNTER, C. P., ROTHMAN, J. H., SAARI, G. C., WALLS, L. A., and STEVENS, T.H., 1986. PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. Mol.Cell. Biol., 6: 2490-2499.

ANDREEVA, N., ZDANOV, A. S., GUSTCHINA, A. E., and FEDOROV, A. A., 1984. Structure of ethanol-inhibited porcine pepsin at 2 °A resolution and binding of the metyl ester phenylalanyl-diiodotyrosine to the enzyme. J. Biol. Chem., 259: 11353-11365.

ANDRÉN, A., and BJÖRCK, L., 1986. Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. Acta Physiologica, 126(3): 419-427.

ANSON, M. L., 1936. The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. The Journal of General Physiology, 20(4): 565–574.

ARIMA, K., YU, J., and IWASAKI, S., 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. Methods in enzymology, 19: 446-459.

BAILEY, M. J., and SIIKA-AHO, M., 1988. Production of microbial rennin. Biotechnol. Lett., 10:161-166.

BAUDYS, M., and KOSTKA, V., 1983. Covalent structure of chicken pepsinogen. European Journal of Biochemistry, 136(1): 89-99.

BARKHOLT, P.V., CHRISTENSEN, K.A., and FOLTMANN B., 1979. Investıgatıons on the activation of bovine prochymosin. Eur. J. Biochem., 94: 573-580.

BAXEVANİS, A. D., and OUELLETTE, B. F. F., 2001. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins. NY: John Wiley& Sons, Inc., New York, 356.

BELOZERSKY, M. A., SARBAKANOVA, S. T., and DUNAEVSKY, Y. E., (1989). Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. Planta, 177(3): 321-326.

BEPPU, T., 1983. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. Trends Biotechnology, 1: 85–89.

BERKA, R. M., WARD, M., WILSON, L. J., HAYENGA, K. J., 1990. Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori.* Gene, 86(2): 153-162.

BLUNDELL, T., COOPER, J., SALİ, A., ZHU, Z., 1991. Comparison of the sequences, 3-D structures and mechanisms of pepsin-like and retroviral aspartic proteinases. In Structure and Function of the Aspartic Proteases, New York, NY, USA, 443-453.

BROWN, E. D., and YADA, R. Y., 1991. A kinetic and equilibrium study of the denaturation of aspartic potease from the fungi, *Endothia parasitica* and *Mucor miehei.* Biochim. Biophys., 1076(3): 406-415.

BRUSGARD, C., 1993. Regulatory approval and commercialization of chymogen. Scandinavian Dairy Information, 6(1): 46–47.

BUNN, C. W., MOEWS, P. C., and BAUMBER, M. E., 1971. The crystallography of calf rennin (chymosin). Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 178(1052): 245-258.

CIECHANOVER, A., 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. Nature reviews Molecular cell biology, 6(1): 79-87.

CHEESEMAN, G. C., 1965. Denaturation of rennin: effect on activity and molecular configuration. Nature, 205:1011-1012

CHISTI, Y., 1999. Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. Biocatalysis and Bioseparation, 5: 2450-2451.

CHITPINITYOL, S., JAMES, M., CRABBE, C., 1998. Chymosin and aspartic proteinases. Food Chemistry, 61(4): 395-418

CLAVERIE, J. M., 2001. What if There Are Only 30,000 Human Genes. Science, 291(5507): 1255-7.

COOPER, J. B., KHAN, G., TAYLOR, G., TICKLE, I. J., and BLUNDELL, T. L., 1990. X-ray analyses of aspartic proteinase: II. Three- dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 °A resolution. Journal of molecular biology, 214(1): 199-222

DANLEY, D.E., and GEOGHEAN, K. F., 1988. Structure and mechanism of formation of chymosin C derived from recombinant chymosin A. J. Biol. Chem., 263: 9785-9789.

DAYHOFF, M.O., 1976. The Origin and Evolution of Protein Superfamilies. FedProc, 35(10): 2132-2138.

DELANO, W.L: The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web. [http://www.pymol.org]

DELFOUR, A., JOLLES, J., ALAİS, C., JOLLES, P., 1965. Caseino-glycopeptides: Characterization of methionine residue and of the N-terminal sequence. Biochem Biophys Res Commun., 19: 452

DREYER, T., HALKIER, B., SVENDSEN, J., and OTTESEN, M., 1986. Primary structure of the aspartic proteinase A from *Saccharomyces cerevisiae.* Carlsberg Res. Commun., 51: 27-41.

DONNELLY, W. J., CAROLL, D. P., and WALLS, D., 1986. Genetic polymorphisim of bovine chymosin. Journal of Dairy Research, 53: 657-664.

DOU, K., WANG, Z., ZHANGB, R., WANG, N., FAN, H., DIAOA, G., and LIUA., Z., 2014. Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene Asp55 from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. Microbiological research, 169(12): 915-923.

DUNN-COLEMAN, N. S., BLOEBAUM, P., BERKA, R. M., ROBİNSON, N., ARMSTRONG, G., WARD, M., PRZETAK, V., CARTER, G. I., LACOSTA, R., 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus.* Nature Biotechnology, 9(10): 976–981.

EDGAR, R. C., 2004. MUSCLE: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced time and Space Complexity. BMC Bioinformatics, 5: 113.

EHRMANN, M., CLAUSEN, T., 2004. Proteolysis as a regulatory mechanism. Annu Rev Genet., 38: 709-24

EL-SOHAİMY, S. A., and EL-SAADANI, M. A., 2010. Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in *E. coli.* The Nutraceuticals Journal, 3: 63-68.

ERICKSON, M. C., GORDON, D. T., ANGLEMEIER, A. F., 1983. Proteolytic Activity in True Cod. Journal of Food Science, 48: 1315.

FLAMM, E.L., 1991. How FDA approved chymosin: A case history. Nature Biotechnology, 9: 349–351.

FOLTMANN, B., 1959a. Studies on rennin II. On the crystallisation, stability and proteolytic activity of rennin. Acta Chem. Scand., 13: 1927-1935.

FOLTMANN, B., 1959b. Studies on rennin III. On the solubility of rennin. Acta Chem. Scand., 13: 1936-1942.

FOLTMANN, B., 1966. A review on prorennin and rennin. Travaux Lab. Carlsberg, 35: 143–231.

FOLTMANN, B., PEDERSEN V. B., JACOBSEN M., KAUFFMAN, D., WİJBRANDT G., 1977. The complete amino acid sequence of prochymosin. Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 2321–4.

FOLTMANN, B., LONBLAD, P., and AXELSEN, N.H., 1978. Demonstration of chymosin (EC 3.4.23.4) in the stomach of newborn pig. Biochem. J., 160: 425–427.

FOLTMANN, B., 1970 Prochymosin and chymosin (Prorennin and rennin) Methods Enzymology, 19: 421–436.

FOLTMANN, B., PEDERSON V. B., KAUFFMAN, D., WYBRANT, G., 1979. The primary structure of calf chymosin. Journal of Biological Chemistry, 254(17): 8447-8456.

FOLTMANN, B., 1987. General and molecular aspects of rennets. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, London, Elsevier, 37–68.

FOLTMANN, B. 1988., Structure and function of proparts in zymogens for aspartic proteinases. Biol. Chem., 369: 311–314.

FOLTMANN, B. 1992., Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 52: 65–79.

FOX, P. F., 1988. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. Biotechnol. Appl. Biochem., 10: 522–35.

FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L., COGAN, M. T., GUINEE, P. T., 2004. Cheese chemistry, physics and microbiology. Elsevier Academic, London, 19-47.

FUMAMOTO, J., TSURU, D., and YAMAMOTO, T., 1967. A rennin like enzyme from *Rhizopus chinensis*. Agric. Biol. Chem., 31: 710-717.

GENEX, 1985. Production of chymosin by recombinant DNA methods. European Patent Application EP134662.

GILLILAND, G. L, WINBORNE, E. L, NACHMAN, J., and WLODAWER, A., 1990. The Tree Dimensional Structure of Recombinat Bovine Chymosin at 2,3 °A Resolution. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 8(1): 82-101.

GOFF, C. G., MOİR, D. T., GRAVİNS, T. C., SMİTH, R. S., YAMASAKİ, E., TAUNTON-RİGBY, A., 1984. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 27: 35–46.

GRIBSKOV, M., 1999. The New Biological Literature. Bioinformatics 15(5): 347.

GRAY, G. L., HAYENGA, K., CULLEN, D., WILSON, L. J., and NORTON, S., 1986. Primary structrue of *Mucor miehei* aspartyl protease: evidence for a zymogen intermediate. Gene, 48: 41-53.

GUSTCHINA, E., RUMSH, GINODMAN, L., MAJER, P., and ANDREEVA, N., 1996. Post X-ray crystallographic studies of chymosin: the existence of two structural forms and the regulation of the activity by the interaction with the histidine-proline cluster of κ-casein. FEBS Lett., 379: 60-62.

HAARD, N., 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J Aquat Food Prod Technol., 1:17-35.

HARRIS, T. J. R., LOWE, P. A., EATON, M. A. W., MILLICAN, T. A., PATEL, T. P., BOSE, C. C., CAREY, N. H., DOEL M. T., 1982. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. Nucl Acid Res, 10: 2177–2187.

HARTSUCK, J. A., and REMINGTON, S. J., 1988. Porcine pepsinogen crystallography. In 18th Linderstrom-Lang Confererence Proceedings. Elsinore, Denmark, 33-34.

HIDAKA, M., SASAKI, K., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1986. Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. Gene, 43: 197–203.

HILL, R. D., and LAING, R. R., 1965. The action of rennin on casein: the effect of modifying functional groups on the rennin. Journal of Dairy Research, 32(02): 193- 201.

HILL, R. D., 1968. The nature of the rennin sensitive bond in casein and its possible relation to sensitive bonds in other proteins. Biochemical and biophysical research communications, 33(4): 659-663.

HILL, R.D., 1969. Synthetic peptide and ester substrates for rennin. J Dairy Res, 36: 409–415.

HORIUCHI, H., YANAI, K., OKAZAKI, T., TAKAGI, M., and YANO, K., 1988. Isolation and sequencing of a genomic clone encoding aspartic protease of *Rhizopus niveus.* J. Bacteriol., 170: 272-278.

HOUEN, G., MADSEN, M.T., HARLOW, K.W., LØNBLAD, P., FOLTMANN, B., 1996. The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin. Int J Biochem Cell Biology. 28(6):667-675.

HOOK, GREGORY; HOOK, VIVIAN; KINDY, MARK., 2011. The cysteine protease inhibitor, E64d, reduces brain amyloid-β and improves memory deficits in Alzheimer's disease animal models by inhibiting cathepsin B, but not BACE1, β-secretase activity, Journal of Alzheimer's disease, 26(2): 387–408.

HOFMANN, T., and SHAW, R., 1964. Proteolytic enzymes of Penicillium janthinellum: I. Purification and properties of a trypsinogen-activating enzyme

(peptidase A). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects, 92(3): 543-557.

HUANG, H., ZHANG, Z., LIU, N., ZHANG, Y., ZHANG, G., and YANG, K., 1992. Functional implication of disulfide bond, Cys250-Cys283, in bovine chymosin. Biochemical and biophysical research communications, 187(2): 692-696.

HURLEY, M. J., LARSEN, L. B., KELLY, A. L., and MCSWEENEY, P. L. H., 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. International Dairy Journal, 10(10): 673-681.

JAMES, M. N. G., and SIELECKI, A. R., 1986. Molecular structure of an aspartic protease zymogen, porcine pepsinogen at 1.8 °A resolution. Nature, 319: 33-38.

JENSEN, J., MØLGAARD, A., NAVARRO, J. C., HARBOE, M. K., SİMONSEN, J. B., LORENTZEN, A. M., and LARSEN, S., 2013. Camel and Bovine Chymosin: The Relationship Between Their Structures and Cheese-Making Properties. Biological Crystallography, 69(5): 901-913.

JENSEN, T., AXELSEN, N.H., and FOLTMANN, B., 1982. Isolation and partial characterization of prochymosin and chymosin from cat. Biochim. Biophys. Enzymol., 248: 120–136.

KAGEYAMA, T., TANABE, K., KOIWAI, O., 1990. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. Journal of Biological Chemistry, 265.28: 17031-17038.

KAGEYAMA, T., 1995. Procathepsin E and cathepsin E. Meth. Enzymol. 248: 120-136.

KAPPELER, S. R., VAN DEN BRİNK, H. J., RAHBEK-NİELSEN, M., FARAH, Z., PUHAN, Z., HANSEN, E., JOHANSEN, E., 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. Biochem. Biophys. Res. Commun, 342: 647−654.

KAWAGUCHİ, T., YANAGİDA, N., UOZUMİ, T., BEPPU T., 1986. Improved direct expression of prochymosin cDNA through changing the SD-ATG codon length. Agric Biol Chem, 50: 499–500.

KAY, J., 1985. Aspartic proteinases and their inhibitors. Biochem. Soc. Trans., 13:1027-1029.

KAYE, N.M.C., and JOLLES, P., 1978. The involvement of one of the three histidine residues of cow k-casein in the chymosin initiated milk clotting process. Biochim Biophys Acta., 536:329–340.

KIM, K. S., KIM, Y.K., 1986. Studies on the ripening of cheddar cheese made with *Mucor rennet*. Dairy Sci Abstr, 48(12): 875-876.

KLESSEN, C., SCHMIDT, K. H., GUMPERT, J., GROSSE, H. H., MALKE, H., 1989. Complete secretion of active bovine prochymosin by genetically engineered L-forms of *Proteus mirabilis.* Appl Env Microbiol, 55: 1009–1015.

KOAZE, Y., GOI, H., EZAWA, K., YAMADA, Y., and HARA, T., 1964. Fungal Proteolytic Enzymes: Part I. Isolation of two Kinds of Acid-proteases Excreted by *Aspergillus niger* var. macrosporus. Agricultural and Biological Chemistry, 28(4): 216-223.

KOELSCH, G., MARES, M., METCALF, P., and FUSEK, M., 1994. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. FEBS Lett., 343: 6-10.

KOLMER, M., ORD, T., ULMANEN, T., 1991. Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture. Journal of biotechnology, 20(2): 131-139.

LANDER, E. S., LİNTON, L. M., BİRREN, B., ve ark., 2001. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. Nature, 409(6822): 860-921.

LAPATTO, R., BLUNDELL, T., HEMMINGS, A., OVERINGTON, J., and HOBART, P. M., 1989. X-ray analysis of HIV-I proteinase at 2,7 °A resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. Nature, 342: 299-302.

LEEUW, A. D., SWINKLES, B. W., 1993. Production of chymosin by yeast *Kluyveromyces lactis.* Voedingsmiddelen-Technologie, 26: 16–17 91.

LIPMAN, D. J., WILBUR, W. J., SMITH, T. F., and WATERMAN, M. S., 1984. On the Statistical Significance of Nucleic Acid Similarities. Nucl. Acids Res., 12:215-226.

LIN, M. F., JUNGREIS, I., and KELLIS, M., 2011. PhyloCSF: a comparative genomics method to distinguish protein coding and non-coding regions. Bioinformatics, 27(13): 275-282.

LÓPEZ-OTÍN, C., and BOND, J. S., 2008. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. Journal of Biological Chemistry, 283(45): 30433-30437.

MACKAY, V. L., WELCH, S. K., INSLEY, M. Y., MANNEY, T. R., HOLLY, J., SAARI, G. C., & PARKER, M. L., 1988. The *Saccharomyces cerevisiae* BAR1 gene encodes an exported protein with homology to pepsin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(1): 55-59.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J., 1982. Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545.

MANTAFOUNİS, D., and PİTTS, J., 1990. Protein engineering of chymosin; modification of the optimum pH of enzyme catalysis. Protein engineering, 3(7): 605-609.

MCCAMAN, M. T., 1989. Fragments of prochymosin produced in *E. coli* from insoluble inclusion bodies. J Bacteriol, 171: 1225–1227.

MCGUİRE, J., 1986. Cloning, expression, purification and testing of chymosin. Bio-expo-86 Proceedings, 121–41.

MCPHILE, P., 1975. The origin of the alkaline inactivation of pepsinogen. Biochemistry, 14: 5253-5256.

MARAGONİ, A. G., 2003. Enzyme kinetics: a modern approach. New Jersey, John Wiley & Sons.

MARSTON, F. A. O., LOWE, P., DOEL, M. T., SCHOEMAKER, J. M., WHITE, S., ANGAL, S., 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *E. coli.* Biotechnology, 2: 800–804.

MARSTON, F. A. O., ANGAL, S., WHITE, S., and LOWE, P. A., 1985, Solubilization and activation of recombinant calf prochymosin from *E. coli.* Biochim. Soc. Trans., 13(6): 1035-1035.

MARTİN, P., RAYMOND, M. N., BRİCAS, E., and DUMAS., B. R., 1980. Kinetic studies on the action of *Mucor pussilus, Mucor miehei* acid propteinases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 612(2): 410-420.

MARTIN, P., and CORRE, C., 1984. Fractionation of the multiple forms of bovine gastric aspartic proteases by chromatofocusing. Analytical biochemistry, 143(2): 256-264.

MATHUR, M. P, DUTTA, R. D., 1983. Rennet from living calves. Dairy Guide, 5(12): 39–47.

MELLO, L. V., O'MEARA, H., RIGDEN, D. J., and PATERSON, S., 2009. Identification of novel aspartic proteases from Strongyloides ratti and characterisation of their evolutionary relationships, stage-specific expression and molecular structure. BMC genomics, 10(1): 611.

MELLOR, J., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae.* Gene, 24: 1–14.

MENZELLA, H. G., GRAMAJO, H. C., and CECCERELLI, E. A., 2002. Hig recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation. Protein Expr. Purific., 25: 248-255.

METCALF, P., and FUSEK, M., 1993. Two crystal structures for cathepsin D: the lisosomal targetting signal and active site. The EMBO Journal 12(4): 1293.

MEZINA, M. N., LAVRENOVA, G. I., PROKOVEF, M. I., 2001. Isolation of milk clotting enzyme from transgenic sheep milk and its comparision with calf chymosin. Biochemistry, Moscow, 66:378-383.

MIYAZAKI, H., FUKAMIZU, A., HIROSE, S., HAYASHI, T., HORI, H., and MURAKAMI, K., 1984. Structure of the human rennin gene. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 5999-6003.

MILLER, M., JASKOLSKI, M., RAO, J. K. M., LEIS, J., and WLODAWER, A., 1989. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. Nature, 337: 576-579.

MOIR, D., DUNCAN, M., KOHNO, T., MAO, J., SMITH, R., 1984. Production of calf chymosin by the yeast *S. cerevisiae.* Proceedings: Biotechnology, 84: 189–97.

MOIR, D., MAO, T., SCHUMM, J. W., VOVIS, G. F., ALFORD, B. L., TAUNTON-RIGBY, A., 1982. Molecular cloning and characterization of double stranded cDNA coding for bovine chymosin. Gene, 19: 127–138.

MOHANTY, A. K., GROVER, S., BATISH, V.K., MUKHOPADHYAYA, U.K., 1995. Recombinant chymosin. Indian Dairyman, 12: 29–33.

MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., GROVER, S., BATISH, V. K., 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. Biotechnology Advances, 17(2): 205-217.

MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., KAUSHIK, J. K., GROVER, S., and BATISH, V. K., 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (Bubalus bubalis). Journal of Dairy Research, 70(01): 37-43.

MORRIS, P.C., MILLER, R.C. and BOWLES, D.J., 1985. Endopeptidase activity in dry harvest – ripe wheat and barley grains. Plant Sci., 39: 121–124.

NEWMAN, M., SAFRO, M., FRAZAO, C., KHAN, G., BLUNDELL, T.L. and ANDREEVA, N., 1991. X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. Journal of molecular biology, 221(4): 1295-1309.

NEWMAN, M., SAFRO, M., FRAZAO, C., KHAN, G., ZDANOV, A., TİCKLE, I., BLUNDELL, T. L., 1993. X- ray Analyses of Aspartic Protease.V. Structure and Refinement at 2.0 °A Resolotion of the Aspartic Protease.V. from *Mucor pusillus*. Journal of molecular biology, 230: 206-283.

NISHIMORI, K., SHIMIZU, N., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., and BEPPU, T., 1984. Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. Gene, 29(1): 41-49.

NISHIMORI, K., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1982. Expression of cloned calf prochymosin gene sequence in *E. coli.* Gene, 19: 337–344.

NISHIMORI, K., KAWAGUCHI, Y., HIDAKA, M., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1981. Cloning in *E. coli* of the structural gene of Prorennin, the precursor of calf milk clotting enzyme rennin. J Biochem., 90: 901–904.

NIELSEN, P., FOLTMANN, B., 1995. Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. Archives of biochemistry and biophysics, 322(2): 417-422.

NOMURA T, KATUNUMA N., 2005. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. The journal of medical investigation, 52(1, 2): 1-9.

PEDERSEN, V. B., CHRISTENSEN, K.A., FOLTMAN, B., 1979. Investigations on the activation of bovine prochymosin. European Journal of Biochemistry, 94(2): 573-580.

PITTS, J. E., DHANARAJ, V., DEALWIS, C. G., MANTAFOUNIS, D., NUGENT, P., ORPRAYOON, P., and BLUNDELL, T. L., 1992. Multidisciplinary cycles for protein engineering: site-directed mutagenesis and X-ray structural studies of aspartic proteinases. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 52: 39-50.

POLANOWSKI, A., WILUSZ, T., KOLACZKOWSKA, M. K., WIECZOREK, M., and WILIMOWSKA-PELC, A.,1985. Purification and characterization of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* seeds. Aspartic proteinases and their inhibitors, 49-52.

PRIVALOV, P. L., MATEO, P., KHECHINASHVILI, N. N., STEPANOV, V. M., and REVINA, L. P., 1981. Comparative thermodynamic study of pepsinogen and pepsin structure. J. Mol. Biol., 152: 445-464.

PUNGERCAR, J., STRUKELJ, B., GUBENSEK, F., TURK, V., and KREGAR, I., 1991. Amino acid sequence of lamb preprochymosin and its comparison to other chymosin, in Structure and Function of Aspartic Proteinases. Dunn, B.M., ed., Plenum Press, New York, 127–131.

RAO, S., DUTTA, S.M., 1981. Extraction of rennet from abomasum of suckling buffalo calves. Ind J Dairy Sci., 34 (2): 235–237.

RYAN, C. A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual review of phytopathology, 28(1): 425-449.

ROGELJ, I., PERKO, B., FRANCKY, A., PENCA, V., and PUNGERČAR, J., 2001. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. Journal of dairy science, 84(5): 1020-1026.

SEDDIGH, S., and DARABI, M., 2016. Proteomics comparison of aspartic protease enzyme in insects. Turkish Journal of Biology, 40(1): 69-83.

SARDINAS, J. L., 1968. Rennin enzymes of *Endothia parasitica.* Appl. Microbial., 16: 248-2533.

SCHERER, S. W., and CHEUNG, J., 2001. Discovery of the Human Genome Sequence in the Public and Private Databases. Current Biology, 11(20): R808-11.

SHAMSUZZAMAN, K. and HAARD, N.F., 1984. Purification and characterization of a chymosin-like protease from the gastric mucosa of the harp seal (Pagphilusgroen landicus). Can. J. Biochem. Cell Biol., 62: 699–708.

SIELECKI, A., FUJINAGA, M., READ, R., JAMES, M., 1991. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 A resolution. J Mol Biol., 219: 671–692.

SIMPSON, P. J., KREISER, T. H., 1983. Molecular cloning of cDNA for a eucaryotic gene function prochymosin in *E. Coli*. Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol., 83: 129.

SMITH, R. A., DUNCAN, M., GILL, T., STASHENKO, K., YAMASAKI, E., MOIR, DT., 1985. Improved production of activable calf prochymosin by yeast. Abstracts: Am Chem Soc Meeting, 32.

SMITH, J. L., BILLINGS, G. E., and YADA, R.Y., 1991 b, c. Chemical modification of amino groups in *Mucor miehei* aspartic proteinase, porcine pepsin, and chymosin I-II structure and function, Agric. Biol. Chem. 55, 2009-2016.

SMITH WD, SKUCE PJ, NEWLANDS GF, SMITH SK, PETTIT D., 2003. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of Haemonchus contortus as protective antigens for sheep. Parasite Immunol., 25(11-12):521-530.

SOGAWA, K., FUJII-KURIAYMA, Y., MIZUKAMI, Y., ICHIHARA, Y., and TAKAHASHI, K., 1983. Primary structure of human pepsinogen gene. J. Biol. Chem., 258: 5306-5315.

STANLEY, G., 1998. Microbiology of Fermented Foods (ed. Wood, B. J. B.), Blackie Acad and Prof., London, 1:263–307.

STEINER, D.F., QUINN, P.S., CHAN, S.J., MARSH, J., TAGER H.S., 1980. Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins, Ann NY Acad Sci., 343: 1–16.

STERNBERG, M. Z., 1971. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. Journal of Dairy Science, 54(2): 159-167.

STROP, P., SEDLACEK, J., STYS, J., NEWMAN, M., FRAZAO, C., TICKLE, I. J., and BLUNDELL, T.L., 1990. Engineering enzyme subsite specifity: preparatiın, kinetic characterization, and X-ray analysis at 2.0 °A resolution of Val111 Phe site-mutated calf chymosin. Biochemistry, 29: 9863-9871.

STRISOVSKY, K., TESSMER, U., LANGNER, J., KONVALİNKA, J., and KRÄUSSLİCH, H. G., 2000. Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase: Rethinking the "fireman's grip" hypothesis. Protein Science, 9(9): 1631-1641.

SUGRUE, R., MARSTON, F.A.O., LOWE, P.A., and FREEDMAN, R.B., 1990. Denaturation studies on natural and recombinant bovine prochymosin. Biochemistry, 271: 541-547.

Şahan, N., ve Konar, A., 1990. Peynir üretiminde sütü pıhtılaştırmada kullanılan proteolitik enzimler. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(4): 129-140.

TANG, J., JAMES, M.N.G., HSU, I.H., JENKINS, J.A., BLUNDELL., 1973. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteinases. Nature, 271: 618–621.

TOGNI, G., SANGLARD, D., FALCHETTO, R., and MONOD, M., 1991. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis.* FEBS Lett, 286: 181-185.

TONOUCHI, N., SHOUN, H., UOZUMI, T., and BEPPU, T., 1986. Cloning and sequencing of the gene for mucor rennin, an aspartate protease for *Mucor pusillus.* Nucl. Acids Res., 14: 7557-7568.

TSUCHIYA, K., GOMI, K., KITAMOTO, K., KUMAGAI, C., TAMURA, G., 1993. Secretion of chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae.* Appl Microbiol Biotechnol., 40: 327–332.

TSUCHIYA, K., NAGASHIMA, T., YAMAMOTO, Y., GOMI, K., KITAMOTO, K., KUMAGAI, C., TAMURA, G., 1994. High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase fusion gene in *Aspergillus oryzae.* Biosci Biotechnol., 58: 895–899.

UCHIYAMA, H., UOZUMI, T., BEPPU, T., ARIMA, K., 1980. Purification of prorennin mRNA and its translation in vitro. Agricultural and Biological Chemistry, 44: 1373–1381.

UNSITALO, J. M., NEVALAINEN, K. M., HARKKI, A. M., KNOLES, J. K., PENTTILA, M. F., 1991. Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. Biotechnology, 17: 35–49.

WARD, M., WİLSON, I. J., KODAMA, K. H., RAY, M. W. O., BERKA R. M., 1990 Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. Biotechnology NY., 8(5): 435–440.

WANG, G., 1995. High level expression of prochymosin in *E. coli.* Effect of the secondary structure of the ribosome binding site Protein Expression and Purification, 6 (3): 284–290.

WANG, N., WANG, K. Y., LI, G., GUO, W., & LIU, D., 2015. Expression and characterization of camel chymosin in Pichia pastoris. Protein expression and purification, 111: 75-81.

WISEMAN, A., 1991. Manual de Biotecnología de las Enzimas. Acribia.,

WLODAWER, A., MILLER, M., JASKOLSKI, M., SELK L. M., and KENT, S. B. H., 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-I protease. Science, 245: 616-621.

VALLEJO, J. A., AGEITOS, J. M., POZA, M., and VILLA, T. G., 2008. Cloning and expression of buffalo active chymosin in Pichia pastoris. Journal of agricultural and food chemistry, 56(22): 10606-10610.

VAN-DEN-BERG, J.A., VAN-DER-LAKEN, K.J., VEM-DOYEN, A.J., RENNİERS T.C., 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression and secretion of prochymosin Biotechnology NY, 8 (2) (1990), pp. 135–139.

VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., GÓMEZ-COELLO, A., VILLAR, J., and CLAVERIE-MARTÍN, F., 2004. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. Journal of biotechnology, 114(1): 69-79.

VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., and GOCAYNE, J. D., 2001. The sequence of the human genome. Science, 291(5507): 1304-1351.

YONEZAWA, M., SUZUKI, J., UISHIYAMA, M., HORINOUCHI, S., BEPPU T., 1993. Role of the amino-terminal amino acid sequences determining the in-vitro refolding process of prochymosin polypeptide. Biotechnology, 28 (1): 85–97.

YUN, J. J., KIELY, L. J., KINDSTEDT, P. S., & BARBANO, D. M., 1993. Mozzarella Cheese: Impact of Coagulant Type on Functional Properties1. Journal of Dairy Science, 76(12): 3657-3663.

ZHANG, Z., MOO-YOUNG, M., CHISTI, Y., 1996. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnol Adv., 14: 401–435.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu : TC

Doğum Yeri ve Tarihi : DİYARBAKIR/1986

Telefon : 0537 970 18 35

e-mail : atlimeral@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise :	Fatih Lisesi/Diyarbakır	2004
Üniversite :	Gaziantep Üniversitesi/Gaziantep	2010

İŞ DENEYİMLERİ Yıl	Kurum	Görevi
2011	Taş gıda yemek Hizmetleri	Üretim Sorumlusu
2012	Metro Cash& Carry	Kalite Güvence Uzmanı

UZMANLIK ALANI: Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı

YABANCI DİLLER: İngilizce

EKLER

EK 1 Sığır ve tavşan kimozini cDNA dizilimlerinin karşılaştırılması

```
Query  26    ATGAGGTGTCTCGTGGTGCTACTTGCTGTCTTCGCTCTCTCCCAAGGCGCTGAGATCACC
85

             |||| ||| |||||||||||| ||||| ||| |||||||||||| || |  |||||||||

Sbjct  1     ATGAAGTGCCTCGTGGTGCTCCTTGCGGTCCTCGCTCTCTCCCAGGGTGGGGAGATCACC
60

Query  86    AGGATCCCTCTGTACAAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGGCGCTGAAGGAGCATGGGCTTCTG
145

             |||||||| |||||||||||  ||  | ||||| ||||| || |||||||| |||||||||

Sbjct  61    AGGATCCCGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAGCACGGGCTTCTG
120

Query  146   GAGGACTTCCTGCAGAAACAGCAGTATGGCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTTCGGGGAG
205

             |  ||||||||| |||| || |||   |   | ||||| |||  ||||  || ||| | |

Sbjct  121   GGAGACTTCCTGAAGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCCCACTCCGGCGTG
180

Query  206   GTGGCCAGCGTGCCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTC
265

             ||||||| || | ||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||| |  |

Sbjct  181   GTGGCCAACGAGGCCCTGACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGGAAGATCCAGATT
240

Query  266   GGGACCCCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACTTCTGGGTA
325

             ||||| || |||||||||||||||||  ||||||| || ||||| || ||| |||||||

Sbjct  241   GGGACACCACCCCAGGAGTTCACCGTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCGGACCTCTGGGTG
300

Query  326   CCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCGAGAAAG
385

             ||||| |||||||||||||| ||| |||||||||| ||||| |||||| ||||| |  |||

Sbjct  301   CCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCAAAATCCACCGGCGCTTTGACCCAACCAAG
360

Query  386   TCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAGCCCCTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATG
445

             || |||||||||||| || ||  ||||||||||  ||||| || || ||||||||||||
```

```
Sbjct  361   TCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACATCCAGTATGGCACAGGCAGCATG
420

Query  446   CAGGGCATCCTAGGCTATGACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATCCAGCAGACA
505

              |||||| |||| ||||| ||||| ||||| ||| |   ||| |||||||  || |||||

Sbjct  421   CAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGTGGACACACACCAGACT
480


Query  506   GTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGGACGTCTTCACCTATGCCGAATTCGACGGGATC
565

              || |||||||||||| ||||||| || || ||||||  |||  | || ||||||||||||

Sbjct  481   GTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAGTTCGACGGGATC
540

Query  566   CTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTTGACAACATG
625

              ||||| |||| ||| ||     ||||||      ||||| | || ||||||||||||||

Sbjct  541   CTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTGTTTGACAACATG
600

Query  626   ATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAATGGCCAG
685

              ||| ||| ||||||||||||||| |||||||| || |||||||||  ||||  |||| ||

Sbjct  601   ATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGCAGGTCTGGCGAG
660

Query  686   GAGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATCAACCCGTCCTACTACACAGGGTCCCTGCACTGG
745

              |  |||||||||| ||||| | |||| || |    ||| |||||||   ||||||||||

Sbjct  661   GGAAGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGCGACCTGCACTGG
720

Query  746   GTGCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTCACCATCAGCGGT
805

              |||||||||| ||||||   |||||||||||||  ||||||| |||||| |   |||

Sbjct  721   GTGCCCGTGACTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTCACCGTGGACGGC
780

Query  806   GTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTCAGGCCATCTTGGACACGGGCACCTCCAAGCTG
865

                |||  |||||||||||  | ||||| |||||||||  |||||||  ||||| |||  ||||

Sbjct  781   AAGGTGGTGGCCTGTGAGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGCACTTCCTTGCTG
840
```

```
Query  866   GTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAG
925

               |||| |||  |||||| |||||| ||||||||   |||||||| ||| || ||    ||

Sbjct  841   ATCGGTCCCGACAGCGAGATCCTCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCCTCAGAGGGGGAG
900

Query  926   TACGGTGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACTGTGGTCTTTGAG
985

               || || ||||||| | ||  |||| | | |||||||  || |||  | ||||||||||||

Sbjct  901   TATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGAGCCTGAGCAGCAAGCCTGCAGTGGTCTTTGAG
960



Query  986   ATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCCTCCGCCTATACCAGCCAAGACCAGGGCTTC
1045

               ||||| ||||  | || ||||||| | || || ||||| |||| | | ||| |||||||

Sbjct  961   ATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGCCTACACCAACAAGGACAAGGGCTTG
1020

Query  1046  TGTACCAGTGGCTTCCAGAGTGAAAATCATTCCCAGAAATGGATCCTGGGGGATGTTTTC
1105

               ||   ||| |||||| || | |       |||||||   |||||||||||||||| |||

Sbjct  1021  TGCTACAGCGGCTTCGAGGGCG------GTTCCCAGCTGTGGATCCTGGGGGATGTCTTC
1074

Query  1106  ATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCC
1165

               ||||| | ||| ||||| ||||| |||||||||||||||| | |||| |||||||| |||

Sbjct  1075  ATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGGGACTGGCCACAGCT
1134Ç.

Query  1166  ATCTGA  1171

               ||||||

Sbjct  1135  ATCTGA  1140
```

EK 2 Farklı türlere ait kimozin genlerinin amino asit dizilimleri

>BAA90873 Callithrix jacchus chymosin

MRGFVVLLAVFALSQASGIVRIPLHKGKSLRRALKERGLLEDFLKNHQHAVSRKHSNSREVASEFLTNY
LDCQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCNSVACQNHHRFDPSKSSTFQNMDKSLSIQYGTGS
MQGLLGYDTVTVSSIVDPHQTVGLSTQEPGDVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVAQ
DLFSVYMSRNEQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWIPVTVQEYWQFTVDSVTVDGVVVACDGGCQAILDTG
TSMLVGPGSDIFNIQQAIGATEGQYGEFDIDCGTLSSMPTVVFEINGKKYPLPPSAYTNQDQGFCTSGFQG
DDSSQQWILGDVFIREYYSVFDRASNLVGLAKAI

>XP_017354863 Cebus capucinus chymosin

MPASSEVRSEEGRQISRGLSLKSGLLATGHPAPSIKAVRWTLAGVVDSPWSKMRGFVVLLAAFALSQAS
GISRIPLHKGKSLRKALKEHGLLEDFLKNHRHAVSRKHSSSGVVASESLTNYLDCQYFGKIYIGTPPQEFT
VVFDTGSSDLWVPSVYCNSDACQNHHRFDPSKSSTFQNMDKSLSIQYGTGSMQGLLGYDTVTVSNIVH
QTVGLSTQEPGDVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVAQDLFSVYMSRNEQGSMLTL
GAIEPSYFTGSLHWIPVTVQEYWQFTVDSVTVDGVVVACDGGCQAILDTGTSMLVGPGSDIFNIQQAIGA
TEDQYGEFDIDCGRLSSMPTVVFEINGKKYPLPPSAYTSQDDGFCTSGFQGDYGSQQWILGDVFIREYYS
VFDRASNRVGLAKAI

>XP_003933485 Saimiri boliviensis boliviensis chymosin

MRGFVVLLAVFALSQASIISRIPLHKGKSLRKALKERGLLEDFLKNHQYAVSRKHSSSGKVARESLTNYL
DCQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCNSDACQNHHRFDPSKSSTFQNMDKSLSIQYGTGS
MQGLLGYDTVTVSNIVDRHQTVGLSTQEPGDVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVA
QDLFSVYMSRNEQGSMLTLGAIDRSYYTGSLHWIPVTVQEYWQFTVDRVTVDGVVVACDGGCQAILDT
GTSMLVGPGSDIFNIQQAIGATEGQFGEFDIDCGRLSSMPTVVFEINGKKYPLPPSAYTSQDQGFCTSGFQ
GDYSSQQWILGDVFIREYYSVFDRASNRVGLAKAI

>XP_012323439 Aotus nancymaae

MRGFVVLLAVFALSQASGISRIPLHKGKSLRRALKERGLLEDFLKNHQYAVSRKHSSSGEVASESLTNYL
DCQYFGKIYIETPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCNSDACXNHHRFDPSKSSTFQNMDKSLSIQYGTGN
MQGLLGYDTVTVSNIVDPHQTVGLSTQEPGDIFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVAQ
DLFSVYMSRNDQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWIPVTVQEYWQFTVDSVTVDGVVVACDGGCQAILDTG
TSMLVGPSSDIFNIQQAIGATAGQYGEFDIDXGRLSGMPTVVXEINDEKYPLPPSTYTSQVRGFCTSGFQG
DYGSQQWILGDVFSREYYSVFDRASNRVGLAKAI

>XP_004407213 Odobenus rosmarus divergens

MRCLVVLLAVFAFSQGSGISRVPLHKGKSLRKALKERGLLEDFLKTHPYSISKKYSNLEKVASEPLTNYL
DCQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKSYACQNHHHFDPAKSSTFQNLNKTLSIQYGTGS
MQGFLGVDTVTVSNIVDSQQTVGLSTQEPGNVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMQKHLVA
QDLFSVYMSRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQEYWQFSVDRVTVNGVVVACDGGCQAILD
TGTSMLVGPSSDILNIQTAIGATQDQYGEFDINCRSLSSMPEVVFEIHGQKYPLPPSAYTSTDMGFCASGF
QGEGDSQLWILGDVFIREYYSVFDRVNNRLGLAKAI

>ELW65241 Chymosin Tupaia chinensis

MRCLVVLLAVLALSQGSGITRIPLHKGKSLRRALKEQGLLEDFLKTQQSTVSGKYFSSGVVASEPLTNYL
DTQYFGKITIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCDSAACQNHQRFDPSKSSTFQNLDKPLSIQYGTGSM
QGFLGYDTVTVSDIVDTHQTVGLSTQEPGNVFTYAEFDGILGLAYPSLAAEYSVPVFDNMMQKHLVAK

DLFSVYMSRNDQGSMLTLGAIDSSYYTGSLHWVPVTMQDYWQFTMDSVTINGVVVACDGGCQAILDT
GTSLVAGPSSDILNIQQAIGATQGQFGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGRKYPLPPSAYTNQNQDFCTSGFQ
GDDDSQQWILGDVFIREYYSVFDRANNRLGLAKAI

>XP_007169498 Balaenoptera acutorostrata scammoni

MRCLVVLFAVLALSQGTGITRWVIPLHKGKPLRKALKEHGLLEDFLQKHRSAVSSKYSSFGEVASEPLTS
YLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKSDACQNHHRFDPSMSSTFQNLGKPLSIQYGTG
SMQGFLGYDTVTVSNIADPQQTVGLSTQEPGDVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMNRHLVA
QDLFSVYMDGNGQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTLDSVTIGGVVVACDGGCQAILDT
GTSILVGPSSDVLNIQMAIGATQNRYGEFDIDCGSLSSMPTVVFEINSRMYPLTPSAYTNQDQGFCTSGFQ
GENNSQQWILGDVFIREYYSVFDRADNRVGLAKAV

>XP_004769805 Mustela putorius furo

MRCLVVLLAVLAFSQGSGISRIPLHKGKSLRKVLKEHGLLEDFLKKHPYSISTKYSSLAKVASEPLTNLD
CQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKQKHHRFDPAKSSTFQNLNEPLSIQYGTGSMQ
GFLGLDTVTVSNIVDPQQTVGLSTKEPGNVFTYSEFDGILGLAYPTLASEYSVPVFDNMMQKHLVAQDL
FSVYLSRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQEYWQFTVDRVTVNGVVVACDGGCQAILDTGTS
MLVGPNSDILNIQTAIGATQDQYGVVDINCGSLNSMPDVVFEINGRKYPLPPSAYTSTDMGFCSSGFQGE
GDSQLWILGDVFIREYYSVFDRVNNRLGLAKAI

>AAB08492 Sus scrofa

IRGRVLLAVLALSQGSGITRVPLRKGKSLRKELKERGLLEDFLQKQPYALSSKYSSFGEVASEPLTNYLD
TQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSELWVPSVYCKSDACQNHHRFNPSKSSTFQNLDKPLSIQYGTGSIQG
FLGYDTVMVAGIVDAHQTVGLSTQEPSDIFTYSEFDGILGLGYPELASEYTVPVFDNMMHRHLVAQDLF
AVYMSRNDEGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTMQLYWQFTVDSVTINGVVVACNGGCQAILDTGTS
MLAGPSSDILNIQMAIGATESQYGEFDIDCGSLSSMPTVVFEISGRMYPLPPSAYTNQDQGFCTSGFQGDS
KSQHWILGVVFIQEYYSVFDRANNRVGLAKAI

>ABX55935 Bubalus bubalis

MRCLVVLLAVFALSQGAEITRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGVSSKYSGFGEVASVPLTNL
DSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSM
QGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQLF
SVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSITISGVVVACEGGCQAILDTGTSKL
VGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSENRS
QQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

>XP_010829174 Bison bison bison

MRCLVVLLAVFALSQGAEITRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGVSSKYSGFGEVASVPLTNL
DSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSM
QGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQD
LFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVVACEGGCQAILDTGT
SKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSE
NRSQKWILGDVFIREYYSIFDRANNLVGLAKAI

>ABU41411 Bos taurus

MRCLVVLLAVFALSQGAEITRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGISSKYSGFGEVASVPLTNYL
DSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSM
QGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQD
LFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVVACEGGCQAILDTGT
SKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSE
NHSQKWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

>ABN13683 Capra hircus

MRCLVVLLAVFALSHGAEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFLQKQQYGVSSEYSGFGEVASVPLTNY
LDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGS
MQGILGYDTVTVSNIVDTQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVA
QDLFSVYMDRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDT
GTSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYTSQEEGFCTSGFQ
GENHSHQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

>CAA37209 Ovis aries

MRCLVVLLAVFALSQGAEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFLQKQQYGVSSEYSGFGEVASVPLTNY
LDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGS
MQGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQ
DLFSVYMDRSGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTG
TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYTSQEEGFCTSGFQG
ENHSHQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

>XP_003639181 Canis lupus familiaris

MRCLVVLLAVLALSQGSGVTRVPLHKGKSLRKALKEHGLLEDFLKKHPYAISRKYSNLEKVASEPLAN
YLDCQYFGRISIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKSTACQSHHRFDPAKSSTFQNLNEPLSIQYGTGS
MQGFLGLDTVTVSSIVDPQQTVGLSTQEPGSIFTYSEFDGILGLAYPSLASPYSVPVFDNMMQNHLVAQD
LFSVYLSRNGQGSMLTLGAIDPTYYTGALHWVPVTVEEYWQFTVDSVTVNGVVVACDGGCQAILDTGT
SMLVGPNSDILNIQSAIGATQDQYGMFDINCGNLGSMPSVVFEIHGRKYPLPPSAYTSQDMGFCSSGFQG
EGDSQLWILGDVFIREYYSVFDRVNNRLGLAKAI

>XP_006197500 Vicugna pacos

MRCLVVLLAALALSQASGITRIPLHKGKTLRKALKEHGLLEDFLQRQQYAVSSKYSSLGKVAREPLTSY
LDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCRSNVCKNHHRFDPRKSSTFRNLGKPLSIHYGTGSM
EGFLGYDTVTVSNIVDPNQTVGLSTEQPGEVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVAQD
LFSVYMDRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTG
TSVLFGPSSDILKIQKAIGATENRYGEFDVNCGSLRSMPTVVFEINGRDYPLSPSAYTSKDQGFCTSGFQG
DNNSELWILGDVFIREYYSVFDRANNRVGLAKAI

>XP_002715833 Oryctolagus cuniculus

MKCLVVLLAVLALSQGGEITRIPLYKGNTLRKALKEHGLLGDFLKKHQVELSRKRSHSGVVANEALTN
YLDVQYFGKIQIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKNKACKIHRRFDPTKSSTFQHMHKPLYIQYGTG
SMQGVLGYDTVTVAGIVDTHQTVGLSTKEPGDVFVYSEFDGILGMGYPNIAFPHSVPVFDNMMHKHLV
AQDLFSVYMSRSGEGSMLTLGGIDSQYHTGDLHWVPVTVQGYWQFTLDRVTVDGKVVACERGCQAIL
DTGTSLLIGPDSEILHIQRAIGASEGEYGEFGFSCKSLSSKPAVVFEINGRKFPLSPSAYTNKDKGLCYSGF
EGGSQLWILGDVFIRAYYSVFDRANNRLGLATAI

>NP_001290503 Camelus dromedarius

MRCLVVLLAALALSQASGITRIPLHKGKTLRKALKERGLLEDFLQRQQYAVSSKYSSLGKVAREPLTSY
LDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKSNVCKNHHRFDPRKSSTFRNLGKPLSIHYGTGSM
EGFLGYDTVTVSNIVDPNQTVGLSTEQPGEVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVARD
LFSVYMDRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQQYWQFTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTGT
SVLFGPSSDILKIQMAIGATENRYGEFDVNCGNLRSMPTVVFEINGRDYPLSPSAYTSKDQGFCTSGFQG
DNNSELWILGDVFIREYYSVFDRANNRVGLAKAI

>NP_001104613 embryonic pepsinogen precursor [Mus musculus]

MRRFVLLLAALAISQSHVVTRIPLHKGKSLRNTLKEQGLLEDFLSRQQYEFSEKNSRIGVVASEPLINYLD
SEYFGTIYIGTPPQEFTVVFDTGSSELWVPSVYCNSKVCRNHHRFDPSKSITFQNLSKPLFVQYGTGRMEG
FLAYDTVTVSDIVVSHQTVGLSTQEPGDIFTYSPFDGILGLAYPTFASKYSVPIFDNMMNRHLVAQDLFS
VYMSRNEQGSMLTLGAIDQSYFIGSLHWVPVTVQGYWQFTVDRITINGEVVACQGGCPAVLDTGTALL
TGPGRDILNIQQVIGAVQGHNDQFDIDCWRLDIMPTVVFEIHGREFPLPPYAYTNQVQGFCSSGFKQGSH
MWILGDVFIREFYSVFDRANNRVGLAKAI

>NP_064476 embryonic pepsinogen precursor [Rattus norvegicus]

MRCFVLLLAVLAIAQSHVVTRIPLHKGKSLRNTLKEQGLLEDFLRRHQYEFSEKNSNIGMVASEPLTNYL
DSEYFGLIYVGTPPQEFKVVFDTGSSELWVPSVYCSSKVCRNHNRFDPSKSFTFQNLSKPLFVQYGTGSV
EGFLAYDTVTVSDIVVPHQTVGLSTEEPGDIFTYSPFDGILGLAYPTFASKYSVPIFDNMMNRHLVAQDL
FSVYMSRNDQGSMLTLGAIDQSYFIGSLHWVPVTVQGYWQFTVDRITINDEVVACQGGCPAVLDTGTA
LLTGPGRDILNIQHAIGAVQGQHDQFDIDCWRLNFMPTVVFEINGREFPLPPSAYTNQFQGSCSSGFRHGS
QMWILGDVFIREFYSVFDRANNRVGLAKAI

>EPQ03835 Chymosin [Myotis brandtii]

MRSLVVLLAALALCQGIGITRIPLHKGKSIRKALRERGLLEDFLRTHQYTASGKYQAGKVASEPLFNYLD
CQYFGKISIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKSNACQNHHRFDPAKSSTFRDLGEPLTIQYGTGSME
GVLGTDTVIVSDIVDRQQTVGLSTEEPGDVFTYSQFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMKRHLVAQDL
FSVYMSRNGPGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPITVQEYWQFTVDRVTVDGVVVACDGGCQAILDTGTS
MLVGPSSDILSIQKAIGATEDQYGMFEINCGSLSSMPTVVFEINGKKYPLPASAYTSQDSGFCSSGFQGDD
SSEQWILGDVFIREYFSVFDRANNRVGLAKAI

EK 3 Farklı türlere ait kimozin genlerinin cDNA dizilimleri

> Bos taurus CHY
AGCAGCGGCTGGACCCAGATCCAAGATGAGGTGTCTCGTGGTGCTACTTGCTGTCTTCGCTCTCTCC
CAAGGCGCTGAGATCACCAGGATCCCTCTGTACAAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGGCGCTGAAGGA
GCATGGGCTTCTGGAGGACTTCCTGCAGAAACAGCAGTATGGCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTT
CGGGGAGGTGGCCAGCGTGCCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCT
CGGGACCCCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACTTCTGGGTACCCTCT
ATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCGAGAAAGTCGTCCACCTTC
CAGAACCTGGGCAAGCCCCTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATGCAGGGCATCCTAGGCTAT
GACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATCCAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCC
GGGGACGTCTTCACCTATGCCGAATTCGACGGGATCCTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAG
AGTACTCGATACCCGTGTTTGACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCGGT
TTACATGGACAGGAATGGCCAGGAGAGCATGCTCACGCTGG00GGGCCATCAACCCGTCCTACTAC
ACAGGGTCCCTGCACTGGGTGCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTC
ACCATCAGCGGTGTGGTTGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTCAGGCCATCTTGGACACGGGCACCTCC
AAGCTGGTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAG
TACGGTGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACTGTGGTCTTTGAGATCAATG
GCAAAATGTACCCACTGACCCCCTCCGCCTATACCAGCCAAGACCAGGGCTTCTGTACCAGTGGCTT
CCAGAGTGAAAATCATTCCCAGAAATGGATCCTGGGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGT
CTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCCATCTGATCACATCGCTGACAGAACCT
CACTGTCCCCACACACCTGCACACACACATGCACACATGTACATGAGCACATGTGCACACACACAG
ATGAGGTTTCCAGACAGATGATTCTCAATAAACGTTGTCTTTC

> Ovis aries CHY
CCCAGATCCAAGATGAGGTGTCTTGTGGTGCTACTTGCTGTCTTTGCTCTCTCCCAGGGCGCTGAGA
TCACCAGGATCCCACTGTACAAAGGCAAGCCTCTGAGGAAGGCACTGAAGGAGCGTGGGCTTCTGG
AGGACTTCCTGCAGAAACAGCAATATGGCGTCAGCAGCGAGTACTCCGGCTTTGGGGAGGTGGCCA
GTGTGCCCTTGACCAATTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTCGGGACCCCGCCCCA
GGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACCGGCTCCTCTGACTTCTGGGTACCCTCTATCTACTGCAAGAGC
AATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCAAGAAAGTCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAG
CCCCTGTCTATCCGCTATGGGACGGGCAGCATGCAGGGCATCCTGGGCTACGACACCGTCACTGTCT
CCAACATTGTGGACATCCAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGGGATGTCTTCACCT
ATGCCGAGTTCGACGGGATCCTGGGGATGGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGGTGCCCGT
GTTTGACAACATGATGGACAGGCGCCTGGTGGCCCAGGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAG
TGGCCAGGGGAGCATGCTCACACTGGGGGCCATCGACCCGTCCTACTACACAGGGTCCCTCCACTG
GGTGCCCGTGACGCTGCAGAAGTACTGGCAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCATCAGCGGTGCGGT
TGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTCAGGCCATCCTGGACACGGGCACCTCCAAGCTGGTCGGGCCCAG
CAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAGTATGGCGAGTTTGACAT
CGACTGCGACAGCTTGAGCAGCATGCCCACTGTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACT
GACCCCCTACGCCTATACCAGCCAGGAGGAGGGCTTCTGCACCAGTGGCTTCCAGGGTGAAAATCA
TTCCCATCAATGGATCCTGGGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACA
GGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCCATCTGATCACATCGCTGACCAAGAACCTCACTGT
CCCCACACACCTGCACATACACACGCACACGTGTACGTGAGCACACGTGTGCACACACAGATGAGG
TTTCCAGACAGATGATTCTCAATAAATGTTGTCTTTCTGC

> Camelus dromedarius CHY
TGACCAGGTCCAGGTCCAGGATGCGGTGCCTCGTGGTGCTACTTGCAGCCCTCGCTCTCTCCCAGGC
CAGTGGGATCACCAGGATCCCTCTGCACAAAGGCAAGACTCTGAGAAAAGCGCTGAAGGAGCGTG
GGCTCCTGGAGGACTTTCTGCAGAGACAACAGTATGCCGTCAGCAGCAAGTACTCCAGCTTGGGGA
AGGTGGCCAGGGAACCCCTGACCAGCTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACATCGGGA
CCCCACCCCAGGAGTTCACCGTGGTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACCTGTGGGTGCCCTCTATCTA
CTGCAAGAGCAATGTTGCAAAAACCACCACCGCTTTGACCCGAGAAAGTCGTCCACCTTCCGGAAC
CTGGGCAAGCCCCTGTCCATCATTACGGCACGGGCAGCATGGAGGGCTTTCTGGGCTACGACACCG
TCACCGTCTCCAACATTGTGGACCCCAACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCGAGCAACCTGGCGAGG
TCTTCACCTACTCCGAGTTTGACGGGATCCTGGGGCTGGCCTACCCCTCGCTTGCCTCCGAGTACTC
GGTGCCCGTGTTTGACAATATGATGGACAGACACCTGGTGGCCCGAGACCTGTTCTCGGTTTACATG
GACAGGAATGGCCAGGGGAGCATGCTTACACTGGGGGCCATTGACCCGTCCTACTACACCGGCTCC
CTGCACTGGGTGCCCGTGACCTTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCATCAAC
GGGGTGGCAGTGGCCTGTGTTGGTGGCTGTCAGGCCATCCTGGACACGGGTACCTCCGTGCTGTTCG
GGCCCAGCAGCGACATCCTCAAAATTCAGATGGCTATTGGAGCCACAGAGAACCGATATGGTGAGT
TTGACGTCAACTGTGGGAACCTGAGGAGCATGCCCACCGTGGTCTTCGAGATCAATGGCAGAGACT

ACCCACTGTCCCCCTCCGCCTACACAAGCAAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGCTTTCAAGGTG
ACAACAATTCCGAGCTGTGGATCCTGGGGGATGTCTTCATCCGGGAGTATTACAGTGT
CTTTGACAGGGCCAACAATCGCGTGGGGCTGGCCAAGGCCATCTGATTGCAC

> Homo sapiens CHY
ATGAGGGGCCTTGTGGTATTCCTTGCAGTCTTTGCTCTCTCTGAGGTCAATGCCATCACCAGGGTTCC
TCTGCACAAAGGGAAGTCGCTGAGGAGGGCCCTGAAGGAGCGCAGGCTCCTGGAGGACTTCCTGA
GGAATCACCATTATGCAGTCAGCAGGAAGCACTCCAGCTCTGGGGTGGTGGCCAGCGAGTCTCTGA
CCAACTACCTGGATTGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACATCGGGACCCTTCCCCAGAAGTTCACCTT
GGTGTTTGATACAGGCTCCCCGGATATCTGGGTGCCCTCTGTCTACTGCAACAGTGATGCCTGTCAA
AACCACCAACGCTTCGATCCGTCCAAGTCCTCCACCCACAGAACATGGGCAAGTCCCTGTCCATCCA
GTATGGCACAGGCAGCATGCGGGGCTTGCTGGGCTATGACACTGTCACCGTCTCCAACATTGTGGA
CCCCCACCAGACTGTGGGTCTGAGCACCCAGGAACCTGGCGACGTCTTCACCTACTCCGAGTTTGAT
GGGATCCTGGGGCTGGCCTATCCCTCTCTTGCCTCTGAGTAGTCAGTGCCAGTGTTTGACAACACGA
TGCAGAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCAGTCTACATGAGTAGGAATGACCAGGGGAGCA
TGCTCACGCTGAGGGCCATTGATCTGTCGTACTACACAGGCTCCCTGCACTGGATACCCATGACTGC
AAGAATACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTCATCATTGACGGCGTGGTGGTGGCCTGTGACGGTG
GCTGTCAGGCCATCCTGGACACCGGCACCTCCCTGCTGGTGGGGCCTGGCGGCAACATCCTCAACA
TCCAGCAGGCCATTGGAGCCACTGCGGGCCAGTACAATGAGTTTGACATCGACTGCGGGCGCCTGA
GCAGCATTCCCACGGCTGTCTTCGAGATCCACGGCAAGAAGTACCCCCTGCCACCCTCCGCCTATAC
CAGCCAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGTTTCCAGGGTGACTATAGTTCCCAGCAGTGGATCCT
GGGGAATGTCTTCATCTGGGAGTATTACAGTGTCTTTGACAGGACCAATAACCGTGTGGGGCTGGC
GAAGGCTGTCTGATTGCATCACTGGCCATGGACCTCAATGTGACCAAACACACACACGCACATAGA
TGAGATGTGCAGGCAGATGGTTCCCAATAAACACCGCATTTCTGC

> Mus musculus CHY
AGAGAGGCCATTTCCTGTGATCCAGAATGAGGCGCTTTGTGCTGCTCCTCGCTGCTCTCGCCATCTC
CCAGAGCCATGTGGTCACCAGGATCCCCCTGCACAAAGGGAAGTCTCTGAGGAACACCCTGAAGGA
GCAAGGACTGCTGGAGGACTTTCTGAGCAGACAGCAGTACGAGTTCAGTGAGAAGAACTCCCGCAT
CGGGGTGGTGGCCAGTGAGCCTCTGATCAACTATCTAGATAGTGAGTACTTTGGAACGATCTACATT
GGGACACCACCGCAGGAGTTCACCGTGGTGTTTGACACAGGCTCCTCAGAACTCTGGGTACCCTCT
GTCTACTGCAACAGCAAAGTGTGCCGAAACCACCACCGTTTTGACCCATCCAAGTCCATCACCTTCC
AGAACCTGAGCAAGCCCCTGTTTGTCCAGTATGGTACTGGTAGAATGGAGGGCTTCCTGGCCTACG
ACACTGTCACAGTCTCTGATATTGTAGTGTCCCATCAGACTGTGGGCCTGAGTACCCAGGAACCGGG
CGACATCTTCACCTACTCTCCATTTGATGGCATCCTGGGCCTGGCCTATCCTACTTTTGCCTCCAAAT
ACTCAGTACCCATATTTGACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCCGTTTA
CATGAGCAGGAATGAGCAGGGGAGCATGCTCACACTGGGGGCCATCGATCAGTCCTACTTCATAGG
CTCACTGCACTGGGTGCCTGTGACAGTACAGGGATATTGGCAGTTCACAGTGGACAGGATCACAAT
CAATGGTGAAGTGGTGGCTTGTCAAGGTGGCTGCCCTGCCGTTCTGGACACAGGCACTGCCCTGTTG
ACGGGGCCTGGTAGAGACATCCTCAATATTCAGCAAGTCATTGGAGCTGTGCAAGGCCATAATGAC
CAGTTTGACATCGACTGCTGGAGGCTGGACATCATGCCCACCGTTGTCTTTGAGATCCATGGTAGGG
AGTTCCCACTGCCACCCTACGCTTATACCAACCAGGTCCAGGGCTTCTGCTCCAGTGGCTTCAAGCA
GGGCTCCCACATGTGGATCCTTGGGGATGTTTTCATTCGGGAGTTCTACAGTGTGTTTGACAGAGCC
AACAATCGTGTTGGGCTGGCCAAGGCTATCTGATTATACACCCCCCCACACACACACAATTTATCAA
GTGGAACGTTCCCAATAAACACAGCATTTCTTGA

> Rattus norvegicus CHY
GTGGTCCAGAATGAGGTGCTTTGTGCTGCTCCTCGCGGTTCTTGCCATCGCCCAGAGCCATGTGGTA
CCAGGATCCCTCTGCACAAAGGGAAGTCTCTGAGGAACACCCTGAAGGAGCAAGGACTGCTGGAG
GACTTTCTGAGGAGACACCAGTATGAGTTCAGTGAGAAGAACTCCAACATCGGGATGGTGGCCAGT
GAGCCTCTGACCAACTATCTAGATAGTGAGTACTTCGGACTGATCTACGTTGGAACACCACCCCAG
GAGTTCAAGGTGGTGTTTGACACAGGCTCCTCAGAACTCTGGGTGCCCTCTGTGTACTGCAGCAGCA
AAGTTTGCAGAAACCACAACCGCTTTGACCCATCCAAGTCCTTCACCTTCCAGAACCTGAGCAAGCC
CCTGTTTGTCCAGTATGGTACTGGCAGTGTGGAGGGCTTCCTGGCCTATGACACTGTCACGGTCTCT
GACATTGTAGTTCCCCATCAGACTGTGGGCCTGAGTACTGAGGAACCAGGTGACATCTTCACCTACT
CTCCATTTGATGGCATCCTGGGCCTGGCCTACCCTACTTTTGCCTCCAAGTACTCAGTACCCATATTT
GACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCCGTTTACATGAGCAGGAATGAC
CAAGGGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATCGATCAGTCCTACTTCATAGGCTCACTGCACTGGGTG
CCTGTGACTGTACAAGGATATTGGCAGTTCACAGTGGACAGGATCACAATCAATGATGAGGTGGTG
GCTTGTCAAGGTGGCTGCCCTGCTGTTCTGGACACAGGCACTGCCCTGCTGACAGGGCCTGGTAGA
GACATCCTCAATATTCAGCACGCCATTGGAGCTGTGCAGGGCCAACATGACCAGTTTGACATTGACT
GCTGGAGGCTGAACTTCATGCCCACGGTTGTCTTTGAGATCAATGGTAGGGAGTTCCCACTGCCACC
CTCTGCCTATACCAACCAGTTCCAGGGCTCCTGCTCCAGTGGCTTCAGGCATGGCTCCCAGATGTGG
ATCCTTGGAGATGTGTTCATTCGGGAGTTCTACAGTGTGTTTGACAGGGCCAACAATCGTGTCGGAC

TGGCCAAGGCTATCTGATTATACAACCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACACACACACACATGATTTATCAAGTGGAACGCTCCCAATAAATACTGCATTTCTCC

> Capra hircus CHY
GCTGTGGGAGTGGGCCCTGGCTGCAGCAGCGGCCGGACCCAGATCCAAGATGAGGTGTCTTGTGGT
GCTACTTGCTGTCTTCGCTCTCTCCCACGGCGCTGAGATCACCAGGATCCCACTGTACAAAGGCAAG
CCGCTGAGGAAGGCACTGAAGGAGCGTGGGCTTCTGGAGGACTTCCTGCAGAAACAGCAATATGGC
GTCAGCAGCGAGTACTCCGGCTTTGGGGAGGTGGCCAGTGTGCCCTTGACCAACTACCTGGATAGT
CAGTACTTTGGGAAGATCTACCTCGGGACACCGCCCCAGGAGTTCACCGTGCTGTTTGACACCGGCT
CCTCTGACTTCTGGGTACCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAAATCACCAGCGCTTCGA
CCCAAGAAAGTCGTCCACCTTCCAGAACCTGGGCAAGCCCCTGTCTATCCGCTATGGGACGGGCAG
CATGCAGGGCATCCTGGGCTACGACACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACACCCAGCAGACAGT
AGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGGGATGTCTTCACCTATGCCGAGTTCGACGGGATCCTGGGGAT
GGCCTACCCCTCGCTCGCCTCAGAGTACTCGGTGCCCGTGTTTGACAACATGATGGACAGGCGCCTG
GTGGCCCAGGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAATGGCCAGGGGAGCATGCTCACGCTGGGG
GCCATCGACCCGTCCTACTACACAGGGTCCCTCCACTGGGTGCCCGTGACGCTGCAGAAGTACTGG
CAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCATCAGCGGTGCGGTGGTGGCCTGTGAGGGTGGCTGTCAGGCC
ATCCTGGACACGGGCACCTCCAAGCTGGTCGGGCCCAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCC
ATTGGAGCCACACAGAACCAGTATGGCGAGTTTGACATCGACTGCGACAGCTTGAGCAGCATGCCC
ACTGTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCCTACGCCTATACCAGCCAGGAG
GAGGGCTTCTGTACCAGTGGCTTCCAGGGTGAAAATCATTCCCATCAATGGATCCTGGGGGATGTTT
TCATCCGAGAGTATTACAGTGTCTTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCCA
TCTGATCACATCGCTGACCAAGAACCTCACTGTCCCCACACACCTGCACATACACACGCACACATGT
ACGTGAGCACACGTGTGCACACACAGATGAGGTTTCC
> Sus scrofa CHY
GAATTCGCGGCCGCGTGCTCCTTGCGGTCCTCGCGCTCTCCCAGGGCAGTGGGATCACCAGGGTCCC
TCTGCGCAAAGGCAAGTCTCTGAGAAAGGAGCTAAAGGAGCGTGGGCTCCTGGAGGACTTTCTGCA
GAAACAGCCGTATGCCCTCAGCAGCAAGTACTCCAGCTTCGGGGAGGTGGCCAGTGAGCCCCTGAC
CAACTACCTCGATACTCAGTACTTTGGGAAGATCTACATCGGGACCCCACCCCAGGAGTTCACCGTG
GTGTTTGACACCGGCTCCTCCGAACTCTGGGTGCCCTCTGTCTACTGCAAGAGCGATGCCTGCCAAA
ACCACCACCGCTTCAACCCGAGCAAGTCATCCACCTTCCAGAACCTGGACAAGCCCCTGTCCATCCA
GTACGGCACGGGCAGCATTCAGGGCTTTCTGGGCTACGACACCGTCATGGTCGCCGGCATCGTGGA
CGCCCACCAGACCGTGGGCCTGAGCACCCAGGAGCCCAGTGACATCTTCACCTACTCGGAGTTTGA
CGGCATCCTGGGGCTGGGCTACCCCGAGCTCGCCTCTGAGTACACGGTGCCTGTGTTTGACAACATG
ATGCACAGGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTCGCGGTTTACATGAGCAGGAATGACGAGGGGAGC
ATGCTCACGCTGGGGGCCATTGACCCGTCCTACTACACGGGATCCCTGCACTGGGTGCCCGTGACCA
TGCAGTTGTACTGGCAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCATCAATGGTGTGGTGGTGGCCTGTAATGG
TGGCTGTCAGGCCATCCTGGACACGGGCACCTCCATGCTGGCTGGGCCCAGCAGTGACATCCTCAA
CATCCAGATGGCCATTGGAGCCACAGAGAGCCAGTATGGCGAGTTTGACATCGACTGCGGCAGCCT
GAGCAGCATGCCCACCGTGGTCTTTGAGATCAGCGGCAGAATGTACCCCCTGCCCCCCTCCGCCTAA
CCAACCAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGCTTCCAGGGTGACAGTAAGTCTCAGCACTGGATCC
TGGGAGTTGTCTTCATCCAGGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGAGCCAACAACCGCGTGGGGCTGG
CCAAGGCCATCTGAAGGCACCCTGACTACAAACCTCGCTGTCGCCCCCCACCCCCGCCACGTACAC
ACATGTACACACGCGTGTGCGCGCACACATTTA

> Oryctolagus cuniculus CHY
ATGAAGTGCCTCGTGGTGCTCCTTGCGGTCCTCGCTCTCTCCCAGGGTGGGGAGATCACCAGGATCC
CGCTGTACAAAGGGAACACGCTGAGAAAGGCCCTCAAGGAGCACGGGCTTCTGGGAGACTTCCTGA
AGAAGCACCAGGTCGAACTGAGCAGGAAGCGCTCCCACTCCGGCGTGGTGGCCAACGAGGCCCTG
ACCAACTACCTGGATGTTCAGTACTTTGGGAAGATCCAGATTGGGACACCACCCCAGGAGTTCACC
GTCGTGTTTGATACAGGCTCTTCGGACCTCTGGGTGCCCTCCATCTACTGCAAGAACAAGGCCTGCA
AAATCCACCGGCGCTTTGACCCAACCAAGTCCTCCACCTTCCAGCACATGCACAAGCCCCTGTACAT
CCAGTATGGCACAGGCAGCATGCAGGGCGTCCTGGGCTACGACACGGTCACCGTCGCTGGCATCGT
GGACACACACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCAAGGAGCCTGGCGATGTCTTCGTCTACTCGGAGTT
CGACGGGATCCTGGGCATGGGCTATCCGAACATCGCCTTCCCTCACTCGGTGCCGGTGTTTGACAAC
ATGATGCACAAGCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTTTCAGTTTACATGAGCAGGTCTGGCGAGGGA
AGCATGCTCACACTGGGCGGCATCGACTCCCAATACCACACAGGCGACCTGCACTGGGTGCCCGTA
CTGTGCAGGGATACTGGCAGTTCACCCTGGACAGGGTCACCGTGGACGGCAAGGTGGTGGCCTGTG
AGCGGGGCTGCCAGGCCATCCTGGACACAGGCACTTCCTTGCTGATCGGTCCCGACAGCGAGATCC
TCCACATCCAGAGAGCCATTGGGGCCTCAGAGGGGGAGTATGGAGAGTTTGGCTTCAGCTGCAAGA
GCCTGAGCAGCAAGCCTGCAGTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGGAAGTTCCCACTGTCGCCTTCTGC
CTACACCAACAAGGACAAGGGCTTGTGCTACAGCGGCTTCGAGGGCGGTTCCCAGCTGTGGATCCT
GGGGGATGTCTTCATCCGGGCGTACTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACCGCCTGG
GACTGGCCACAGCTATCTGA

Cebus capucinus imitator CHY
ATGCCGGCTTCCAGTGAAGTCAGATCCGAGGAGGGGAGGCAGATAAGTCGGGGCCTTTCTCTGAAT
CTGGGCTTCTAGCCACAGGGCACCCAGCTCCCTCTATAAAGGCCGTGAGGTGGACGCTGGCTGGAG
TAGTGGACAGCCCGTGGTCCAAGATGAGGGGCTTCGTGGTGCTCCTTGCAGCCTTTGCTCTCTCCCA
GGCCAGTGGAATCAGCAGGATTCCTCTGCACAAAGGGAAGTCGCTGAGGAAGGCCTTGAAGGAGC
ATGGGCTCCTGGAAGACTTCCTGAAGAATCACCGGCATGCAGTCAGCCGGAAGCACTCCAGTTCTG
GGGTGGTGGCCAGCGAGTCTCTGACCAACTACCTAGATTGTCAGTACTTCGGGAAGATCTACATCG
GGACCCCTCCCCAGGAGTTCACCGTGGTGTTTGACACAGGCTCCTCGGACCTCTGGGTGCCCTCTGT
CTACTGCAACAGTGATGCCTGCCAAAACCACCACCGCTTCGACCCGTCCAAATCCTCCACCTTCCAG
AATATGGACAAGTCCCTGTCCATCCAGTTGGCACGGGCAGCATGCAGGGCTTGCTGGGCTACGACA
CTGTCACCGTCTCCAACATTGTGGACCCCCACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGCG
ACGTCTTCACCTACTCTGAGTTCGACGGGATCCTGGGGCTGGCCTATCCCTCTCTTGCCTCTGAGTAC
TCCGTGCCTGTGTTTGACAACATGATGGACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCAGTCTACA
TGAGCAGGAATGAGCAGGGGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATTGAGCCGTCCTACTTCACAGGCT
CCCTGCACTGGATACCCGTGACCGTGCAAGAATACTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTCACCGTCG
ACGGCGTGGTGGTGGCCTGTGATGGCGGCTGTCAGGCTATCCTGGACACCGGCACCTCCATGCTGG
TGGGGCCAGGCAGCGACATCTTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACTGAGGACCAGTACGGTG
AGTTTGACATCGACTGCGGGAGACTGAGCAGCATGCCCACGGTTGTCTTTGAGATCAATGGCAAGA
AGTACCCACTGCCACCGTCCGCCTACACCAGCCAGGACGACGGCTTCTGCACCAGTGGTTTCCAGG
GTGACTACGGCTCCCAGCAGTGGATCCTGGGGGATGTCTTCATCCGGGAGTATTACAGCGTCTTCGA
CAGGGCCAGTAACCGTGTGGGGCTGGCCAAGGCAATCTGAGTGCATCACCAGCCACAGACCTCGAT
GTGACCAAACACACACACGCACACAGAGGGGATGTGCAGACAGATGGTTCCCAATAAACACCGCA
CTTCTGCAAA

> Cricetulus griseus CHY
ATGAGGTGCTTTGTGCTGCTCCTGGCTGTCTTTGCTGTCTCTCAGAGCCATGTGGCCACCAGGATCCC
TCTGCACAAAGGGACATCTCTGAGGAACACCCTGAAGGAGCATGGACTGCTGGAGGACTTTCTGAG
CAGACACCAGTCGGAGTTCAGTGAGAAGGACTCCAACACCGGGATGGTGGCCAATGAACCTCTGAC
CAACTACCTAGATAGTGAGTACTTTGGAACGATCTACATCGGGACACCACCCCAGGAGTTCACGGT
GGTATTTGACACAGGCTCTTCGGAACTCTGGGTGCCGTCTGTCTACTGTAGCAGCAGAGTCTGCCAA
AACCATCACCGCTTTGACCCATCCAAGTCGTTCACCTTCCAGAACCTGAGCAAGCCCCTGTTTGTCC
AGTATGGCACTGGCAGAATGCAGGGCTTCCTGGGCTATGACACTGTCACAATCTCTGATATTGTAGT
TCCCCACCAGACTGTGGGCCTGAGTACTCAGGAGCCGGGTGAAATCTTCATCTACTCTCCATTCGAT
GGCATCCTGGGGCTGTCCTACCCTTCTCTTGCTTCCAAGTATTCAGTACCCATATTTGACAACATGAT
GAATAGGCACCTGGTTGCCCAGGACCTGTTCTCCGTTTACATGAGCAGGAATGACCAGGGGAGCAT
GCTCACGCTGGGGGCCATCGATCAGTCCTATTTCGTAGGCTCACTGCACTGGGTGCCTGTGACTGTG
CAGGGTTATTGGCAGTTCACAGTGGACAGGATCACAATCAATGATGAAGTGGTGGCTTGTCAAGGT
GGCTGCACAGCTGTTCTGGACACAGGCACTGCCCTGCTGGCAGGGCCTGGCAGAGACATCCTCAAT
ATCCAGCAGGCCATTGGGGCTGTGCAGGGCCAGTATGGCCAGTTTAAAATCAACTGCTGGAGGTTG
GGCATCATGCCCACAATTGTCTTTGAGATCCATGGCAGGAAGTTCCCACTGCCACCCTCGGCCTATA
CCAACCAAGAACTGGACTCCTGCTCCAGTGGCTTCAAGCTTGGTTCCCACATATGGATCCTGGGGGA
TGTTTTCATTCGGGAGTTCTACAGTGTCTTTGACAGGGCCAACAATCGAGTTGGGCTGGCCAAGGCT
ATCTGA

> Pteropus alecto CHY
ATGAAGTGTCTCGTGGTGTTACTTGCAGTCCTCACTCTGACCCAGGGCAGTGGCATCACTAGGGTCC
CTCTGCACAAAGGCAAGTCGCTGAGAAAGGCCCTGAAGGAGCGTGGGCTCCTGGAGGACTTTCTGA
GGACGCACCGCTATGCCATCAGCAAGGAGAACTCCGGCGTCGGCAAGGTGGCCCGCGAGCCCCTGG
TGAACTACCTGGACAGTCAGTACTTTGGGAAGATCAGCATCGGGACCCCACCCCAGGACTTCACCG
TGGTGTTTGACACTGGTTCCTCGGACCTCTGGGTACCCTCTGTCTACTGCAAGAGTGACGCCTGCAA
AAACCACCGCCGCTTCAACTCATCCGAGTCCTCCACCTTCCAGAAACTGGGCCAGCCCCTGTCCATC
CAGTACGGCACAGGCAGCATGAGGGGATTCTGGGCTCTGACACCGTCACCGTCTCCAACATTGTGG
ACTCCCGCCAGACTGTGGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGCGACGTCTTCACCTACTTCGAGTTCGA
CGGGATCCTGGGCCTGGCCTACCCATCTCTGGCCGCCAAGGACTCGGTGCCTGTGTTTGACAACATG
ATGAAGCATCACCTGGTGGCCCAGGACCTGTTCTCTGTGTACATGAGCAGGAATGACCAGGGGAGC
ATGCTGACGCTGGGGGCCATCGACTCATCCTACTACAGAGGCTCACTGCACTGGGTGCCCGTGACC
GTGCGGGAGTACTGGCAGTTCACTGTGGACAGCGTCACCGTTGACGGGGTGGTGGTGGCCTGTGAC
GGTGGCTGTCAGGCCATCCTGGACACAGGCACTTCCATGCTGGTTGGGCCTAGCAGTGACATCCTCA

ACATCCAGCAGGCCATCGGTGCCACAGAGGACCAGTATGGCCTGTTTAACATCAACTGTGGAAGCC
TGAGCAGCATGCCCACGGTGGTCTTTGAGATCAACGGCAGAACGTACCCACTGCCCCCCTCCGCCT
ATACCAGCCAGGACATGGACTTCTGCACCAGTGGCTTCCAGGGCGAAGATGACTCCCAGCTGTGGA
TCCTGGGGGATGTGTTCATCCGGGAGTATTTCAGCGTATTCGACAGGGCCAACAACCGCGTGGGGC
TGGCCAAGGCCATCTGA

> Vicugna pacos CHY
CCAGGTCCAGGATGCGGTGCCTCGTGGTGCTACTTGCAGCCCTCGCTCTCTCCCAGGCCAGTGGGAT
CACCAGGATCCCTCTGCACAAAGGCAAGACTCTGAGAAAAGCGTTGAAGGAGCATGGGCTCCTGGA
GGACTTTCTGCAGAGACAACAGTATGCCGTCAGCAGCAAGTACTCCAGCTTGGGGAAGGTGGCCAG
GGAACCCCTGACCAGCTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACATCGGGACCCCACCCCA
GGAGTTCACTGTGGTGTTTGACACTGGCTCCTCCGACCTGTGGGTGCCCTCTATCTACTGCAGGAGC
AATGTCTGCAAAAACCACCACCGCTTTGACCCGAGAAAGTCATCCACCTTCCGGAACCTGGGCAAG
CCCCTGTCCATCCATTACGGCACGGGCAGCATGGAGGGCTTTCTGGGCTACGACACCGTCACCGTCT
CCAACATTGTGGACCCCAACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCGAGCAACCTGGCGAGGTCTTCACCT
ACTCCGAATTTGACGGGATCCTGGGGCTGGCCTACCCCTCGCTTGCCTCCGAGTACTCGGTGCCCGT
GTTTGACAATATGATGGACAGACACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCAGTTTACATGGACAGGAA
CGGCCAGGGGAGCATGCTCACACTGGGGGCCATTGACCCGTCCTACTACACCGGCTCCCTGCACTG
GGTGCCCGTGACCGTGCAGCAGTACTGGCAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCATCAACGGGGTGGC
GGTGGCCTGTGTTGGTGGCTGTCAGGCCATCTTGGACACGGGCACCTCTGTGCTGTTTGGGCCCAGC
AGTGACATCCTCAAAATTCAGAAGGCTATTGGGGCCACAGAGAACCGGTATGGCGAGTTTGACGTC
AACTGTGGGAGCCTGAGGAGCATGCCCACTGTGGTCTTCGAGATCATGGCAGAGACTACCCACTGT
CCCCCTCAGCCTACACAAGCAAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGCTTTCAAGGTGACAACAATT
CCGAGCTATGGATCCTGGGGGATGTCTTCATCCGGGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCAACA
ATCGCGTGGGGCTGGCCAAGGCCATCTGATTGCACCGCTGACCAAGCACCTCGCTGTCCCCAAACA
CACGCACACACACACATGCATGCACACACACACACACAGAGATGAGGTTTTCAGGTAGATGGTTCT
CAATAAATACTATGTCTCTGC

> Tupaia chinensis CHY
GGTCCAGGATGCGGTGCCTCGTGGTGCTCCTCGCTGTCCTCGCCCTCTCTCAGGGCAGTGGCATCAC
CAGGATCCCTCTGCACAAAGGGAAGTCATTGAGGAGGGCCTTGAAGGAGCAGGGGCTTCTGGAGG
ACTTTCTAAAGACGCAGCAGTCTACAGTCAGCGGGAAGTACTTCAGCTCCGGGGTGGTGGCCAGTG
AGCCGCTCACCAACTACCTAGACACCCAGTACTTTGGGAAGATCACCATCGGGACCCCGCCCCAGG
AGTTCACAGTGGTATTCGATACGGGCTCCTCGGACCTCTGGGTGCCCTCTGTCTACTGCGACAGTGC
TGCCTGCCAGAACCACCAGCGCTTCGACCCGTCCAAGTCCTCCACCTTCCAGAACCTGGACAAGCC
GCTGTCCATCCAGTATGGCACAGGCAGCATGCAGGGCTTTCTGGGCTACGACACCGTCACCGTCTCT
GATATCGTGGACACTCACCAGACCGTGGGCCTGAGCACCCAGGAACCTGGCAACGTCTTCACTTAC
GCTGAGTTTGATGGGATCCTAGGACTGGCCTACCCCTCACTGGCCGCCGAGTACTCAGTGCCTGTGT
TTGACAATATGATGCAGAAACACCTGGTGGCCAAAGACCTCTTCTCGGTTTACATGAGCAGGAACG
ACCAGGGGAGCATGCTTACCCTGGGGGCCATCGACTCCTCTTACTACACCGGCTCACTGCACTGGGT
GCCCGTGACCATGCAGGACTACTGGCAGTTCACCATGGACAGTGTCACCATCAATGGCGTGGTGGT
GGCTTGTGATGGCGGCTGTCAGGCCATCCTGGACACAGGCACCTCCCTTGTGGCCGGGCCCAGCAG
CGACATCCTCAACATTCAGCAGGCCATTGGAGCCACGCAGGGCCAGTTCGGCGAGTTTGACATCGA
CTGTGATAGCCTAAGCAGCATGCCCACTGTTGTCTTCGAGATCAATGGCAGGAAGTACCCACTGCC
ACCCTCCGCCTACACCAACCAGAACCAAGACTTTTGCACCAGCGGCTTTCAGGTGACGATGACTCCC
AGCAGTGGATCCTGGGGGATGTCTTCATCCGGGAGTATTACAGTGTCTTCGACAGGGCCAACAACC
GCCTGGGGTTGGCCAAGGCTATCTGAGGGCACCACTGAGCACGGACCCCACTGCACACACATGTGC
ACATGTGCGCACACACACA

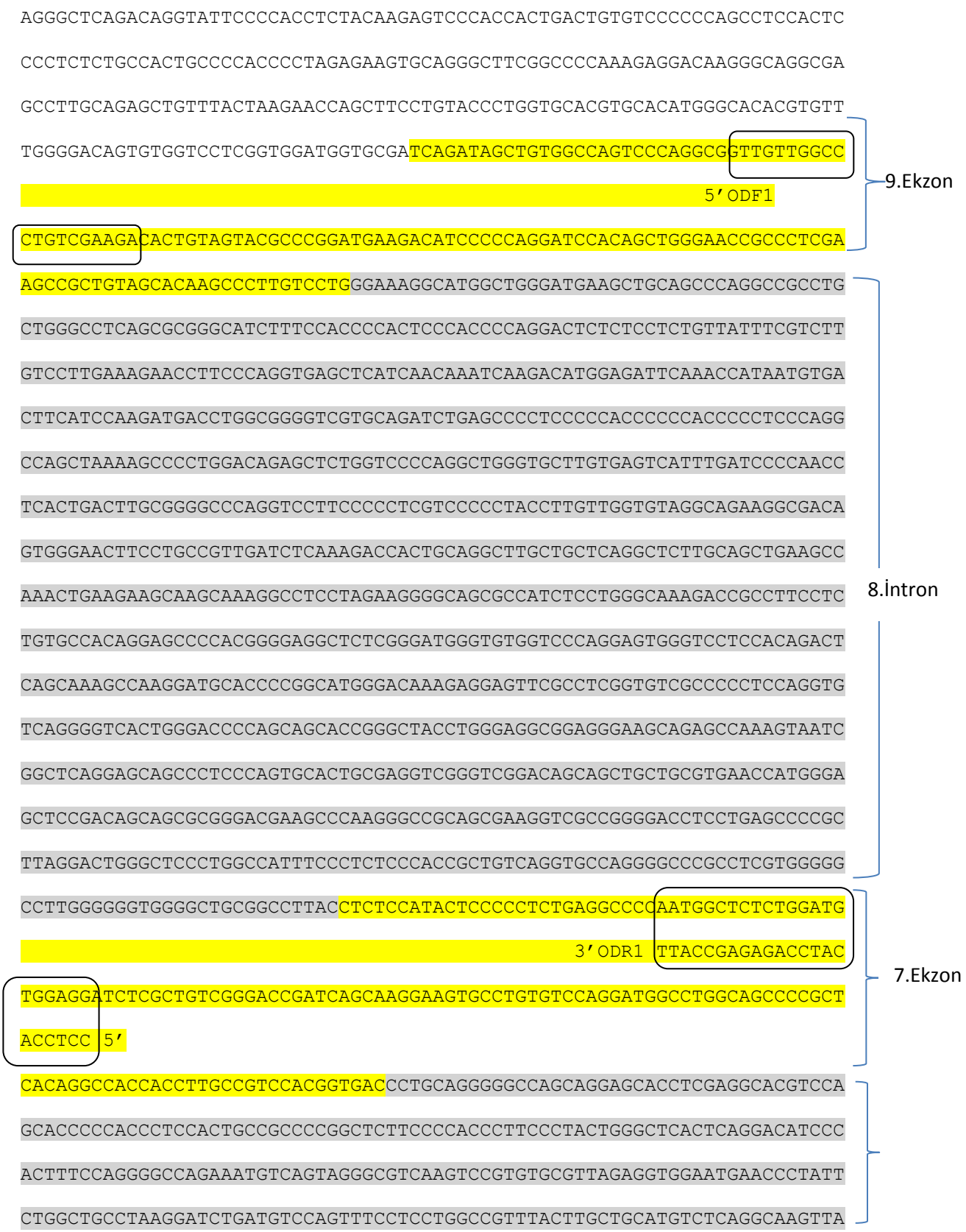
> Saimiri boliviensis CHY
ATGAGGGGCTTCGTGGTGCTCCTTGCGGTCTTTGCTCTCTCCCAGGCCAGTATAATCAGCAGGATTC
TCTGCACAAAGGGAAGTCGCTGAGGAAGGCCTTGAAGGAGCGTGGGCTCCTGGAAGACTTCCTGAG
AATCACCAGTATGCGGTCAGCCGGAAGCACTCCAGTTCTGGGAAGGTGGCCAGAGAGTCTCTGACC
AACTACCTAGATTGTCAATACTTCGGGAAGATCTACATCGGGACCCCTCCCCAGGAGTTCACCGTGG
TGTTTGACACGGGCTCCTCTGACCTCTGGGTGCCCTCTGTCTACTGCAACAGTGATGCCTGCCAAAA
CCACCACCGCTTCGACCCGTCCAAATCCTCCACCTTCCAGAATATGGACAAGTCCCTGTCCATCCAG
TATGGCACGGGCAGCATGCAGGGCTTGCTGGGCTACGACACTGTCACTGTCTCCAACATTGTGGAC
CGCCACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGCGACGTCTTCACCTACTCTGAGTTCGAC
GGGATCCTGGGGCTGGCCTATCCCTCTCTGGCCTCTGAGTACTCCGTGCCTGTGTTTGACAACATGA
TGGACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCAGTCTACATGAGCAGGAATGAGCAGGGGAGCA
TGCTCACGCTGGGGGCCATTGACCGGTCCTACTACACAGGCTCCCTGCACTGGATACCCGTGACTGT
GCAAGAATACTGGCAGTTCACTGTGGACAGAGTCACCGTCGACGGCGTGGTGGTGGCCTGTGACGG
CGGCTGTCAGGCTATCCTGGACACCGGCACCTCCATGCTGGTGGGGCCAGGCAGCGACATCTTCAA

CATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACCGAGGGCCAGTTCGGTGAGTTTGACATCGACTGCGGGAGACT
GAGCAGCATGCCCACAGTTGTCTTTGAGATCAATGGCAAGAAGTACCCACTGCCACCCTCCGCCTC
ACCAGCCAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGTTTCCAGGGTGACTACAGTTCCCAGCAGTGGATC
CTGGGGGACGTCTTTATCCGGGAGTATTACAGCGTCTTCGACAGGGCCAGTAACCGCGTGGGGCTG
GCCAAGGCAATCTGAGTGCATCACCAGCCACGGACCTCGATGTGACCGAACACACACACGCACACG
AAGGGGATGTGCGGACAGATGCTTCCCAATAAACAACACACTTCTG

> Callithrix jacchus CHY
GGTCCAAGATGAGGGGCTTTGTGGTGCTCCTTGCAGTCTTTGCTCTCTCCCAGGCCAGTGGAATTGC
AGG00ATTCCTCTGCACAAAGGGAAGTCGCTGAGGAGGGCCTTGAAGGAGCGTGGGCTCCTGGAAG
ACTTCCTGAAGAATCACCAGCATGCGGTCAGCCGGAAGCACTCCAATTCTAGGGAGGTGGCCAGCG
AGTTTCTGACCAACTACCTAGATTGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACATCGGGACCCCTCCCCAGGA
GTTCACCGTGGTGTTTGACACGGGCTCCTCGGACCTCTGGGTGCCCTCTGTCTACTGCAACAGTGTT
GCCTGCCAAAACCACCACCGCTTCGACCCGTCCAAATCCTCCACCTTCCAGAATATGGACAAGTCCC
TGTCCATCCAGTACGGCACGGGCAGCATGCAGGGCTTGCTGGGCTACGATACTGTCACCGTCTCCA
GCATTGTGGACCCCCACCAGACTGTGGGCCTGAGCACCCAGGAGCCTGGCGACGTCTTCACGTACT
CCGAGTTTGATGGGATCCTGGGGCTGGCCTATCCCTCTCTTGCCTCTGAGTACTCCGTGCCTGTGTTT
GACAACATGATGGACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTTCTCAGTCTACATGAGCAGGAATGAG
CAGGGGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATTGACCCATCCTACTACACAGGCTCCCTGCACTGGATA
CCCGTGACCGTGCAAGAATATTGGCAGTTCACTGTGGACAGTGTCACCGTCGACGGCGTGGTGGTG
GCCTGTGACGGCGGCTGTCAGGCTATCCTGGACACTGGCACCTCCATGCTTGTGGGGCCGGGCAGC
GACATCTTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACCGAGGGCCAGTACGGTGAGTTTGACATCGAC
TGCGGGACACTGAGCAGCATGCCCACGGTTGTCTTTGAGATCAATGGCAAGAAGTACCCACTGCCA
CCCTCTGCCTACACCAACCAGGACCAGGGCTTCTGCACCAGTGGTTTCCAGGGTGACGACAGTTCGC
AGCAGTGGATCCTGGGGGATGTCTTCATCCGGGAGTATTACAGCGTCTTCGACAGGGCCAGTAACC
TCGTGGGGCTGGCCAAGGCAATCTGAGTGCGTCACCAGCTACCGGCCTCCATGTGACCAAACACAC
ACACGCAGAGGGGATTTGCAGACAGATGGTTCCCAGTAAACACTGCACTTCTGCAAA

> PREDICTED: Tarsius syrichta chymosin
ATGAGGTGTCTTGTGTTGCTCCTTGTCGCCCTTGCTCTGTCCCACAGCAGTGGGTTCATCAGTGTCTC
TGCAGAAAGCAAAGTCGCTGAGGAAGACCCTGAAGGAGCATGGGCTCCTGGAGGACTTCCTGAGC
AAGTACCAGCATGAGATTGGCCGGAAGTACTCCAACTTTGGGAAGGTGGCCAGCGAGCCCCTGACC
AACTACTTAGACTGTCAGTACTTTGGGAAGATTTCCATCGGGACCCCACCCCAGGAATTCACTGTGG
TGTTTGACACGGGCTCCTCTGACCTCTGGGTACCCTCTGTTGACTGCAACAGCGATGCCTGCCAAAA
CCATCACCGCTTTGACCCATCCAAATCCTCCACCTTCCAGAACATGGACAAGTCTCTGTCCATCCAG
TATGGCACGGGCAGCATGGAGGGCTTTCTGGGCTACGACACTGTCACCGTCTCCAGCATTGTAGAC
CTCCACCAGACTGTGGGCTGAGCACCCAGGAACCCGGTGACTTCTTCACCTACTCCAATTTTGACGG
CATCTTGGGGCTGGCCTATCTCGCCTGCGAGTACTCAGTGCCCGTATTTGACAACATGATGCAACAG
CACCTGGTGGCCCAAGACCGTTCTCGGTCTACATGAGCAGGAATGACCAGGGGAGCATGCTCACGC
TGGGGGCCATCGACCCGTCCTACTACATGGGCTCCCTGCACTGGGTGCCCGTGACCGTGCAGGAAT
ACTGGCAGTTCACCGTGGACAGTGTCACCGTCGATGGTGTCGTGGTGGCCTGTGATGGCGGCTGTCG
GCCATCCTGGACACGGGCACGTCCCTGCTGGTTGGGCCCAGCAGTGACATTTTCAACATCCAGCAG
GTCATTGGAGCCACACAGGGCCAGTATGGTGAGTTTGACATCGACTGCGGGAAGCTGAGCAGTATG
CCCACAGTTGTCTTCGAGATCAACGGCAGGAAGACCCACTGCCACCCTCCGCCTACACCAGCCAGG
ACCAAGGCTTCTGCACCAGCGGTTTCCAGGGTGACAATGATTCCCAGCAGTGGATCCTGGGGGATG
TCTTCATCCGGGAGTACTACAGCGTCTTCGACAGGGCCAATAACCGCGTGGGGCTGGCCAAGGCTG
TCTGA

EK 4 Tavşan kimozin lokusu üzerinde ekzon-intron ve primerlerin Yeri



TCCCAGAGCCTTTGTGTCCTCAGCCTTCCCATCTACAAAATGGGTACATTAGCAATTCCCTCCTTGACTT

CCTCAAAGGGTGGTCATGAGCTTTGTACTCCATGTCAGTAAATTAGAAAATGGGGATAATAACAGCACCC

ACTTCATAGGGAATTTGTGAGCATTAATGAGATGGTCAAACCATCACTCAGCACAGTGCCTAGCAGGTAG

TGAGTGCTCAGTCAGTGGAACTAGTCTCATCAACAACAAAGGTGGAAGTGTGACAGCCTCACTGACAAAG

GCCACCTACTTCAGATTCTGCTGAGTGGCCCTCGAGCTCCTGCACCCGACACAGGGCCCCCGTCCCCACT

CCTGGAGTCAGCCTCTGGCCGGGGGCCACACAGGATGCCTCTCACCCACCTGTCCAGGGTGAACTGCCAG

5′ODF2 3′

TATCCCTGCACAGTCACGGGCACCCAGTGCAGGTCGCCTGTGTGGTATTGGGAGTCGATGCCGCCCAGTG

TGAGCATGCTTCCCTCGCCAGACCTGGAACCAAGGCACAGTGACACGCAGCCCAGCGGGAAGGTGGCAAG

CCCCGCCCGGCCCCCCCCCCCCCCCCGAGGCCTCAGAAGCACTCCCGAGCCTCCCCACACGCCTCCACAG

CCAGGCTTTGCTCTGACGTCAGCCACAGCCCTTTTTCTTCTGGGCCCTGAAGCCCCGACCTGGGCTCAGG

CAGCACCTGGAACCCACAGCCCAACCAGAGGGGAGGTCATGGAGCAGCCAGAGCCCAACCCCTTCTGTTC

CTCCTGGGCTCTGTCACAGGCATGGCCGGGATACCCTCCCCCAGTCTCCCTCACCTGCTTCCCACACCAT

TGCTTGCAGCTCCTGGAACTCAGCAAGGCTTTCCCAGCTGCAGGCTCTGGCACATGTGGCCCTCGCTGCC

TACAGGGCACCATCCCTCCATCCCGCACCTGTTATCCCCCAGGGACACCTGCCCGGCCTCCCACAGTGCA

TGGTGCGTGCAGCAGTCAGAAGGGGCTTCCCAGTCCTTAAGCCTGGGACACACCCAAATCCCCCCTTCCT

ACAGAGTTTGATTAAAATTGTGGGTGCTCTTGTGTCTGTCTTCCCTGTTAAAATGTAACCTCCGTGTTCA

CATTGCAGATTGCTGATGCAGCCCCATCAGCGGGCCTGGTCCCTCCACATTGCGTTGGCCCAGGAAGCAT

CCAGCGAGTGACTGAATGGACGGTTGGGTGCAATGTACCAATTTACCTCTCTCCTGGGGTCCCCTGGCCT

CAGCCTCCTGGGCATGAACCCCTTCTCCCCATCCTGCCACCCATCCTTCTGTCCAAGGTGACCCACGTCA

TCACAGGGAACAGGTAGGTAGAGTGTGGGAACCCTGGGCCAGGAGAGGAGCCCTGGGCCCCATGCCTGGC

AGTGTCCCTTGTCCATCCAT ODR2 5′

TGTGTCCCTAGTTCCCAAGAGACCCCAGTTCCCTCCCTAATGAGAGGAGGTTCAGCTGTAAGATCTGTGC

CGTCTCTAAGAGTCTGCACATCTAACGGTATCCACAGATGATTGCTGAGACGTTGCCACGTTGGGGAAAA

GAAGGCAAAGGTGCCTGTGCCAAGACAGCCGAGGCTAACTCAGAGTCCAATGCTGGCCCAGGGAGCTCCC

GCTGCACCCATGGCCACATCCGGGCCTTGAACAAGAGACTGGATGTGCCTGGGAACAAGGGAGGGTTTAC

TTGGATGCTGGGGACAGCCCCTGGGCTTCGTGTCTCTGAGTAGGGCCCACTCCTCAGCTGGCGATCTCCA

CCGGGTCGTCACAGCCCTGCCCCGGCTGTGCTCAGCCCCTACCTGCTCATGTAAACTGAAAACAGGTCCT

GGGCCACCAGGTGCTTGTGCATCATGTTGTCAAACACCGGCACCGAGTGAGGGAAGGCGATGTTCGGATA

GCCCATGCCCAGGATCCCGTCGAACTCCGAGTAGACGAAGACATCGCCAGGCTCCTTGGTGCTCAGGCCC

6.intron

6.Ekzon

5.İntron

5.Ekzon

ACAGTCTGGTGTGTGTCCACGATGCCAGCGACCTGCAAGAGTCATGTTGACACCCACCAGGGAGCCCCCT

GCAGCCAGAAACAGCCAAGTCCCAAGGACAGGGGTAGCCAGGCCCAGATCAGGAGCTGGCGTCAGAGTTT

CGGCCTTGCTGGCTTTGCCTCGATCGCTCGTACAGGCAACACAGTTATCTGAGCTTAAGAGGAAACACTA

CCCCCACCCCACTCCCTTCCCAAGACCCCGTGCTGTGGATGACAGGAGCCAGTTCATTGCTGCAGGGAAG

GGGGTGGGGAGTAGACCTCCAAGGAAGGGGGTTGGACCAGGGATGTGCCAAGGCCCTGTGTGTCATCTGT

GGCACCTGGGCATCACAGAGGCACACAATGTACAGGAAAAGCAAGGTCACATCGTGCATCCACAGGGCCC

CAGTGGGGACAGGTGTCTCTCAAGCTATGCAATGCCGACACCGAGCACTGATCCTGGCTGATCCTGGCTG

CACGCTGCCAGGAAGCGCTGACCCCAAGGCAGCTCCTCAGTCTTCCCAGCCCCCTGGGGTAGGCCCCTGT

GTCCCCCAGCCTACTCTCCGCCACCCTGTCTCTAGCCTAGACCACCACCGAAGCCGGTTCAGGCTTCCCG

CTCCCAGTCTGGCCCCAGATAAACCACTCTCCACAAAGGCAGAGTGGCCAAAGAGAACTTTAAAAATGGA

CGCCCAAGTCACGCCATCACCGTGGCAACCATAGTGCCCCAGGGGAGCCTGAGGGAGCTCAGAGTACAGC

CCTTGTAAGCCTAGGTGGGGGGAGGGGAAAGGCAGGTCCTTGGCCCCTCTTGTCCCTCACTGGACCCCCA

GTTCCTGTAATGAGGTCCAAAAAACATTTGTGAGGTAAATGAGTGAATGATGATTAAGCTCAAGAATAAA

TGGTTCATTCTTCCAGTGTGTGTTGCTGGGCCCTGTGGATGTGGCCATGGGCCTGACCGGGGGACGGTCC

ATTCCTGTGCCGGGGGCGGGCAGCCCTCTGACAGCCACAGTGACTGAGTCACAGGGAGCCCGACTGCAGG

AAGAGGAGGCGGGGCCTTTGGAGATTTGGACCAAGGGGGCCGCGTGCTGGAAACACCTCCATTTTACAGA

GTGGGATATTGAGGTCTGCCCAAAGCAACAGAGCTCACAAGAAGTCAGCTGTACCCGCCCCGGAGATCTG

CTCCTGACCGCAGTGGATCTCCTCCCCCAGGTGCTCCTGGGTGAGTGGGAGACCCCCCACATGGAAGAGA

CCTCAGCTGTTTCCCTCCCACACCTGTGCTCAGAGCCCCCTGCCCCCGTGGCTCTTGTGATAGCCCCAGC

TGCTCCAACCCCGACTCCCCCGCCCTCACTCGAGCCAGGCTAAGCCCCCTGGACTTCCTCGTTGTCCCCT

CAACCCCTAAAGCCCTTCCTGCTCAAGACAGGCAGCTGGAGGACCTCCCATTCCATCCCCTCAGCAGCCC

TATCCAACGCTGGTCCAAACAGGCAAAGCCCAAACCAGCCTGAGGCCTTCTTGCCACCTAGGGGGAGGGA

GGGCCTGACCCAAGGCACACAGGTGGACACAGCCAGGCTCGCCACAGCAGAGGCACAGGGCCAGCTCTCT

GGGGAGGAGGCAAGTTTGTGCCTCGCCCCCCAAAAAAGGAGAAGAAAGCAAATGGCTGCAGATGGTGGCA

GAGGAAAACGAATGTCTGGGCAGCAAATCCCCCTGCCAGGAGCCCTAATTCGTCAGCCTGCGGCAGGAAG

GAGAGGAGGGCGGCTGGCTGCTGGCTGGCTGGCCCCTCCGCCTGAGCTAGCATGTGGGCAGGACCCAAAG

GGCTCCTGGCCACTGGCCACAGGAAGGCGAGGTGCACCCCACCCCCAGCCAGCAGCCCCACTTACGGTGA

CCGTGTCGTAGCCCAGGACGCCCTGCATGCTGCCTGTGCCATACTGGATGTACAGGGGCTTGTGCATGTG

5’ ODF3 3’

4.İntron

4.Ekzon


3.İntron
3.Ekzon
2.İntron
2.Ekzon
1.İntron
3’ ODR3
5’ ODF4 3’

AGCACTGGAGGTGGTGCAGTGTCACAGCAAGAGGCCCGGCAAGGCCTCCTGGGGCCAAGTGCCAGCTCCT

TCACTCGTAGCTTTGGGCAGCTGAGAGACACTCCCCCCACCCCCAGACCCAGCAGCAGTTTTCTCACCTG

TGAAATGCAAATAACATTGACCCAACCCGTGGGGATTAGTGACCGCACAGGTGAAGATCTGGCTAAGTGC

CTGGGACCCGGTAGTAAACAGCTCAGCAAACACCAGCTATAACTTTTGGAGGCGATCCTAGGGCCTTCAC

CCACAAAGGGCTGGCTGCCGCAGAGAACTTTAACAAACGCATGTCCAGCTCCTGCAGGCACCAGGCACTG

TTTAAAGCATTGTTGCACATATTAACTCTCACACACACCTTCTAACATCCCTGTGAGATGGACTAGTTTC

ACAACGGATGAGGAGGAAATCCAGGCACAGAGTTAAGCTGGTGAAGGGGCTGAGGATCGACGCCGGGTGG

TGTCACCACACATACCACGCTAATCTTCCCGGGCTGCCCGTCCGCTCTTTGTCACCAAGGCACGGGCGGT

AGGGACAACATAGAGGCGGGGGCCCCAAGGTGCCCAGACAAGATGGACAAGGGTGCTTGTCCCAGGAAGC

TGCTGCCATTCCTCCCGTGACTCCCCAGGACCAGGGACAGGACCTGCCCTCCCCCGACCCGGATCTGACA

1.İntron

GTCACCTGGTGATCTCCCCACCCTGGGAGAGAGCGAGGACCGCAAGGAGCACCACGAGGCACTTCATCCT

ODR43'TGGTGCTCCGTGAAGTAGGA5'

1.Ekzon

GGACGGCAGACCGGCCACTGCTGCGGCCAGCATCCATCCCCGCAACTTTTATTGAGAGAGCAGAGCGCCG

CTGGCTAGAAGCCCTGACTCCAGGGCACTCCAGAAACACGGTGAAGATAGCACCCTCACTCCCTAAGACC

CACACTGATAAGGGCCACAAATTCCACCAGG

EK 5 Memeli Türlerine Ait Kimozin Enzimlerinin Sinyal, Öncül ve Aktif Bölgelerinin Amino Asit Dizilimi

***Bos taurus* (Sığır)**

Veri giriş numarası: NM_180994 XM_608340 XM_616986

MRCLVVLLAVFALSQG AEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFL
Pre kimozin pro kimozin
QKQQYGVSSEYSGFGEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPS

IYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQT

VGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRS

GQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTG

TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYT

SQEEGFCTSGFQQGENHSHQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

Pre Kimozin Dizilimi

M	R	C	L	V	V	L	L	A	V	F	A	L	S	Q	G
atg	agg	tgt	ctc	gtg	gtg	Cta	Ctt	gct	gtc	ttc	gct	ctc	tcc	caa	ggc

Sinyal peptid 29-73

Pro Kimozin Dizilimi

A E I T R I P L Y K G K P L R K A L K E R G L L E D F L Q K Q Q YGVSSEYSGF

gctgaga tcaccaggat ccctctgtac aaaggcaagt ctctgaggaa ggcgctgaag gagcatgggc
ttctggagga cttcctgcag aaacagcagt atggcatcag cagcaagtac tccggcttc

***Bos grunıens* (Tibet Sığırı)**

Veri giriş numarası: JX839990

MRCLVVLLAVFALSQG AEITRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFL
Pre kimozin pro kimozin
QKQQYGISSKYSGFGEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPS

IYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQT

VGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRN

GQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTIGGVVVACEGGCQAILDTG

TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYDEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYT

SQDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI"

Pre Kimozin Dizilimi

M	R	C	L	V	V	L	L	A	V	F	A	L	S	Q	G
atg	agg	tgt	ctc	Gtg	gtg	Cta	Ctt	gct	gtc	ttc	gct	ctc	tcc	caa	ggc

Sinyal peptid: 1..48

Pro Kimozin Dizilimi

A E I T R I P L Y K G K P L R K A L K E R G L L E D F L Q K Q Q YGVSSEYSGF

gctgaga tcaccaggat ccctctgtac aaaggcaagt ctctgaggaa ggcgctgaag gagcatgggc
ttctggagga cttcctgcag aaacagcagt atggcatcag cagcaagtac tccggcttc

***Bubalus bubalis* (Asya Mandası)**

Veri giriş numarası: EU265816

MRCLVVLLAVFALSQG AEITRIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFL
Pre kimozin Pro kimozin
QKQQYGVSSKYSGFGEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPS

IYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQT

VGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRN

GQESMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSITISGVVVACEGGCQAILDTG

TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYT

SQDQGFCTSGFQSENRSQQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

Pre Kimozin Dizilimi

M	R	C	L	V	V	L	L	A	V	F	A	L	S	Q	G
atg	agg	Tgt	Ctc	Gtg	Gtg	Cta	ctt	gct	gtc	ttc	gct	Ctc	tcc	caa	ggc

Sinyal peptid: 1..48

Pro Kimozin Dizilimi

A E I T
Gct gag atc acc

61 agg atccctc tgtacaaagg caagtctctg aggaaggcgc tgaaggagca tgggcttctg
RIPLYKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGVSSKYSGF

121 gaggacttcc tgcagaaaca gcagtatggc gtcagcagca agtactccgg cttc
EHGLLEDFLQKQQYGVSSKYSGF

***Bubalıs arnee bubalıs* (Asya Mandası)**

Veri giriş numarası: AF177290

MAEITRIPLCKGKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGVSSKYSGF GEVAS
Pro kimozin
VPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFD

PRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTATVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYA

EFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSY

YTGSLHWVPVTVQQYWQFTVDSITISGVVVACEGGCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQ

QAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMPTVVSEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSEN

RSQQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

Pro Kimozin Dizilimi

M A E I T R I P L C K G K S L R K A L K
atggctgaga tcaccaggatccc tctgtgcaaa ggcaagtctc tgaggaaggc gctgaag

E H G L L E D F L Q K Q Q Y G V S S K Y
gagcatgggc ttctggagga cttcctgcag aaacagcagt atggcgtcag cagcaagtac

tcc ggc ttc
S G F

Ovis aries (koyun)

Veri giriş numarası: NM_001009804

MRCLVVLLAVFALSQG AEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFLQKQQYGVSSEYSGF
Pre kimozin pro kimozin
GEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRF

DPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFT

YAEFDGILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRS

GQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTG

TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYT

SQEEGFCTSGFQGENHSHQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI

Pre Kimozin Dizilimi

```
 M     R    C    L    V    V    L    L    A    V    F    A    L    S    Q    G
 atg   agg  Tgt  Ctc  Gtg  gtg  Cta  ctt  gct  gtc  ttc  gct  Ctc  tcc  caa  ggc
```

Sinyal peptid: 13..60

Pro Kimozin Dizilimi

```
 A  E I T R I P L Y K G K P L R K A L K E
ggc tagatcaccaggatcccactgtacaaaggcaagcctctgaggaaggcactgaaggag

    RGLLEDFLQKQQYGVSSEYS
121 cgtgggcttc tggaggactt cctgcagaaa cagcaatatg gcgtcagcag cgagtactcc

181 ggc ttt
     G  F
```

Capra hİrcus (Keçi)

```
MRCLVVLLAVFALSHG AEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFLQKQQYGVSSEYSGF
  Pre kimozin        Pro kimozin

GEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPS
                    IYCKSNACKNHQRFDPRKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDTQQT
                    VGLSTQEPGDVFTYAEFDGILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRN
                    GQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTG
                    TSKLVGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYT
SQEEGFCTSGFQGENHSHQWILGDVFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI
```

Sinyal peptid: 50..97

Pre Kimozin Dizilimi

```
  M     R    C    L    V    V    L    L    A    V    F    A    L    S    H    G
  Atg   agg  Tgt  ctc  gtg  gtg  cta  ctt  gct  gtc  Ttc  gct  ctc  tcc  cac  ggc
```

Pro Kimozin Dizilimi

```
    A   E   I    T   R   I   P    L
    gct gag atc acc agg atc cca ctg


122 tacaaaggcaagccgctgaggaaggcactgaaggagcgtgggcttctggaggacttcctg
     YKGKPLRKALKERGLLEDFL

182 cagaaacagcaatatggcgtcagcagcgagtactccggcttt
    QKQQYGVSSEYSGF
```

Camelus dromedarius (Deve)

Veri giriş numarası: AJ131677

```
 MRCLVVLLAALALSQA SGITRIPLHKGKTLRKALKERGLLEDFLQRQQYAVSSKYSSL
```

Pre kimozin pro kimozin

GKVAREPLTSYLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPS

IYCKSNVCKNHHRFDPRKSSTFRNLGKPLSIHYGTGSMEGFLGYDTVTVSNIVDPNQT

VGLSTEQPGEVFTYSEFDGILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRN

GQGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTLQQYWQFTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTG

TSVLFGPSSDILKIQMAIGATENRYGEFDVNCGNLRSMPTVVFEINGRDYPLSPSAYT

SKDQGFCTSGFQGDNNSELWILGDVFIREYYSVFDRANNRVGLAKAI"

Sinyal peptid: 21..194

Pre Kimozin Dizilimi

M	R	C	L	V	V	L	L	A	A	L	A	L	S	Q	A
atg	Cgg	TgC	ctc	gtg	Gtg	cta	ctt	gcA	gCC	CTC	gct	ctc	tcc	caG	ggc

Pro kimozin dizilimi

S G I T R I P L H K G K T L R K A

Agt ggg atc acc agg atc cct ctg cac aaa ggc aag act ctg aga aaa gcg

ctg aag gag cgt ggg ctcctg gaggactttc tgcagagaca acagtatgcc gtcagcagc

L K E R G LLEDFLQRQQYAVSS

aag tac tcc agc ttg

K Y S S L

***Sus sucrofa* (Domuz)**

Veri giriş numarası: U14406

"IRGRVLLAVLALSQGS GITRVPLRKGKSLRKELKERGLLEDFLQ

Pre kimozin Pro kimozin

KQPYALSSKYSSF GEVASEPLTNYLDTQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSELWVPSV

YCKSDACQNHHRFNPSKSSTFQNLDKPLSIQYGTGSIQGFLGYDTVMVAGIVDAHQTV

GLSTQEPSDIFTYSEFDGILGLGYPELASEYTVPVFDNMMHRHLVAQDLFAVYMSRND

EGSMLTLGAIDPSYYTGSLHWVPVTMQLYWQFTVDSVTINGVVVACNGGCQAILDTGT

SMLAGPSSDILNIQMAIGATESQYGEFDIDCGSLSSMPTVVFEISGRMYPLPPSAYTN

QDQGFCTSGFQGDSKSQHWILGVVFIQEYYSVFDRANNRVGLAKAI

Pre Kimozin Dizilimi

I R G R V L L A V L A L S Q G S

att cgc ggc cgc gtg ctc ctt gcg gtc ctc gcg ctc tcc cag ggc agt

Pro Kimozin Dizilimi

GITRVPLRKGKSLRKELKERGLLEDFLQKQPYALSSKYSSF
gggatcacca

61 gggtccctct gcgcaaaggc aagtctctga gaaaggagct aaaggagcgt gggctcctgg

121 aggactttct gcagaaacag ccgtatgccc tcagcagcaa gtactccagc ttc

***Mus musculus* (Fare)**

Veri giriş numarası: NM_001111143 XM_131138

Sinyal peptid: 27..74

MRRFVLLLAALAISQS HVVTRIPLHKGKSLRNTLKEQGLLEDFL
Pre kimozin pro kimozin
SRQQYEFSEKNSRIGVVASEPLINYLDSEYFGTIYIGTPPQEFTVVFDTGSSELWVPS

VYCNSKVCRNHHRFDPSKSITFQNLSKPLFVQYGTGRMEGFLAYDTVTVSDIVVSHQT

VGLSTQEPGDIFTYSPFDGILGLAYPTFASKYSVPIFDNMMNRHLVAQDLFSVYMSRN

EQGSMLTLGAIDQSYFIGSLHWVPVTVQGYWQFTVDRITINGEVVACQGGCPAVLDTG

TALLTGPGRDILNIQQVIGAVQGHNDQFDIDCWRLDIMPTVVFEIHGREFPLPPYAYT

NQVQGFCSSGFKQGSHMWILGDVFIREFYSVFDRANNRVGLAKAI"

Pre Kimozin Dizilimi

M R R F V LLLAALAISQS

atg agg cgc ttt gtg ctgctcctc gctgctctcg

Pro Kimozin Dizilimi

H V V T R I P L H K G K S L R

cat gtg gtc acc agg atc ccc ctg cac aaa ggg aag tct ctg agg

NTLKEQGLLEDFLSRQQYEF
aacaccctgaa ggagcaagga ctgctggagg actttctgag cagacagcag tacgagttc

S E K N S R I

agt gag aag aac tcc cgc atc

***Rattus norvegicus* (Sıçan)**

Veri giriş numarası: NM_020091

MRCFVLLLAVLAIAQS HVVTRIPLHKGKSLRNTLKEQGLLEDFLRRHQYE

FSEKNSNI GMVASEPLTNYLDSEYFGLIYVGTPPQEFKVVFDTGSSELWVPS

VYCSSKVCRNHNRFDPSKSFTFQNLSKPLFVQYGTGSVEGFLAYDTVTVSDIVVPHQT

VGLSTEEPGDIFTYSPFDGILGLAYPTFASKYSVPIFDNMMNRHLVAQDLFSVYMSRN

DQGSMLTLGAIDQSYFIGSLHWVPVTVQGYWQFTVDRITINDEVVACQGGCPAVLDTG

TALLTGPGRDILNIQHAIGAVQGQHDQFDIDCWRLNFMPTVVFEINGREFPLPPSAYT

NQFQGSCSSGFRHGSQMWILGDVFIREFYSVFDRANNRVGLAKAI"

Pre Kimozin Dizilimi

MRCFVLLLAVLAIAQS

atgaggtgct ttgtgctgct cctcgcggtt cttgccatcg cccagagc

Pro Kimozin Dizilimi

H V V T R I P L H K G K S L RNTLKE

Cat gtg gtc acc agg atc cct ctg cac aaa ggg aag tct ctg aggaacaccctgaaggag

Caa ggactgctg gaggactttc tgaggagaca ccagtatgag ttcagtgaga agaactccaa

Q GLLEDFLRRHQYE FSEKNSNI

catc

***Oryctolagus cuniculus* (Tavşan)**

Veri giriş numarası: XM_002715787

Aktif bölge site(92)

MKCLVVLLAVLALSQG GEITRIPLYKGNTLRKALKEHGLLGDFL
pre kimozin pro kimozin
KKHQVELSRKRSHS GVVANEALTNYLDVQYFGKIQIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPS

IYCKNKACKIHRRFDPTKSSTFQHMHKPLYIQYGTGSMQGVLGYDTVTVAGIVDTH aktif bölge(274)
VGLSTKEPGDVFVYSEFDGILGMGYPNIAFPHSVPVFDNMMHKHLVAQDLFSVYMSRS
GEGSMLTLGGIDSQYHTGDLHWVPVTVQGYWQFTLDRVTVDGKVVACERGCQAILDTG
TSLLIGPDSEILHIQRAIGASEGEYGEFGFSCKSLSSKPAVVFEINGRKFPLSPSAYT
NKDKGLCYSGFEGGSQLWILGDVFIRAYYSVFDRANNRLGLATAI

cggttcccag ctgtggatcc tgggggatgt cttcatccgg

1081 gcgtactaca gtgtcttcga cagggccaac aaccgcctgg gactggccac agctatctga

Pre Kimozin Dizilimi

M K C L V V L L A V L A L S Q G

atg aag tgc ctc gtg gtg ctc ctt gcg gtc ctc gct ctc tcc cag ggt

Pro Kimozin Dizilimi

G E I T R I P L Y K G N T L R K A L K

ggg ga*g* atc acc agg atc ccg ct*g* tac aaa ggg aac acg ctg aga aag gcc ctc aag

E H G L L G D F L K K H Q V E L S R

Gag cac ggg ctt ctg gga gac ttc ctg aag aag cac cag gtc gaa ctg agc agg

Aag cgc tcc caC tcc

K R S H S