

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



GLUKOZ-6-FOSFAT-1-EPİMERAZ VE MİKROTÜBÜL
İLİŞKİLİ PROTEİN GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK
ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUNA SANCAR

BALIKESİR, HAZİRAN 2019

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



**GLUKOZ-6-FOSFAT-1-EPİMERAZ VE MİKROTÜBÜL
İLİŞKİLİ PROTEİN GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUNA SANCAR

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Hulusi MALYER

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU

BALIKESİR, HAZİRAN 2019

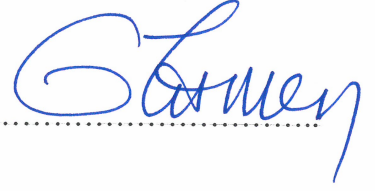
KABUL VE ONAY SAYFASI

Suna SANCAR tarafından hazırlanan “GLUKOZ-6-FOSFAT-1 EPİMERAZ VE MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİN GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

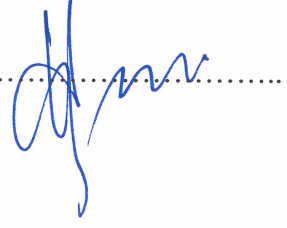
Jüri Üyeleri

İmza

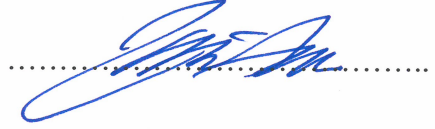
Danışman
Prof Dr. Gülendamar TÜMEN



Üye
Prof.Dr. Hulusi MALYER



Üye
Dr.Öğr.Üyesi Sümeyye AYDOĞAN
TÜRKOĞLU



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR



Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 1100108 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**GLUKOZ-6-FOSFAT-1-EPİMERAZ VE MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ
PROTEİN GENLERİNİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SUNA SANCAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Zeytin (*Olea europaea* L.) her zaman yeşil, ağaç boyu 4 ile 8 metre arasında değişen her dem yeşil, uzun ömürlü ve Akdeniz iklimine özgü bir bitkidir. Ülkemizin Akdeniz tarımına uygun topraklarında yetiştiği için ekonomik öneme sahiptir. Bu çalışmada zeytin meyve cDNA kütüphanesinden seçilen tahmini Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz (UPK 195) ve Mikrotübül İlişkili Protein (UPK 184) Geninin karakterizasyonu ve genin işlevinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Biyoinformatik analizi için nükleotid ve protein BLAST, BioEdit, FinchTV, Primer3 ve SOSUI programları kullanılmış, moleküler karakterizasyon çalışmaları için ise polimorfizm, anlık gösterimli (real-time) PCR, klonlama, transformasyon ve Western Blot yöntemleri uygulanmıştır. Bioinformatik analizler sonucunda; gDNA dizisi ile yapılan analizlerde zeytin tahmini UPK 195 kodlu genimizin *Ricinus communis*(Hint yağı) bitkisine ve protein benzerliği olarakta *Sesamum indicum* bitkisine benzediği görülmüştür. Gen ifadesi çalışmalarında cDNA dizisi pLATE51 vektörü kullanılarak E.coli (DH10B ve BL21) bakteri suşlarına transforme edilip, gen ekspresyonu IPTG ile indüklenme sağlanmıştır. UPK 195 kodlu genimizin 174 aa asit kodladığı, yaklaşık olarak 20 kDA ağırlığında bir protein olduğu ve en çok serin amino asitini kodladığı görüldü. UPK 184 kodlu genin ise 258 aa asit kodladığı, 29 kDA ağırlığında bir protein olduğu ve en çok serin, lösin, amino asitlerini içerdiği tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin, Mikrotübül İlişkili Protein, Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz

ABSTRACT

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF PROTEIN GENES RELATED TO GLUCOSE-6-PHOSPHATE-1-EPIMERASE AND MICROTUBULA

MSC THESIS

SUNA SANCAR

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)

BALIKESİR, JUNE 2019

Olives (*Olea europaea* L.) are always green, long-lasting and unique to the Mediterranean climate. The length of the tree is between 4 and 8 meters. It has economic importance because it grows on the land suitable for Mediterranean agriculture of our country. The aim of this study was to determine the characterization and function of Glucose-6-Phosphate-1-Epimerase (UPK 195) and Microtubule Associated Protein (UPK 184) gene selected from olive cDNA library. Nucleotide and protein BLAST, BioEdit, FinchTV, Primer3 and SOSUI programs were used for bioinformatics analysis and polymorphism; real-time PCR, cloning, transformation and Western Blot methods were used for molecular characterization studies. As a result of bioinformatics analysis; The analysis of the gDNA sequence revealed that the predicted UPK 195 gene of olives was similar to *Ricinus communis* (Sesame oil indicum) and protein similarity. In gene expression studies, the cDNA sequence was transformed into *E.coli* (DH10B and BL21) bacterial strains by using pLATE51 vector and gene expression was induced by IPTG. Our UPK 195 gene was found to encode 174 aa acid, a protein weighing approximately 20 kDA, and most likely encoded serine amino acid. It was found that the gene coded UPK 184 encodes 258 aa acid, is a protein weighing 29 kDA and contains mostly serine, leucine, amino acids.

KEYWORDS: Olive, Microtubule Related Protein, Glucose-6-Phosphate-1-Epimeras

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin (<i>Olea europaea</i> L.).....	1
1.1.1 Zeytinin Morfolojisi.....	2
1.1.2 Dünya’da ve Türkiye’ de Zeytinin Coğrafik Dağılımı	3
1.1.3 Uslu Zeytin Çeşidi	9
1.2 Mikrotübül ilişkili Protein Nedir?	9
1.2.1 Tau protein.....	11
1.2.2 Mikrotübül Kesilmesinin Regülasyonu	11
1.3 Epimeraz Nedir?.....	12
1.4 Glikoliz Nedir?	12
1.5 Glukoz 6-fosfatın glukoza dönüşümü	13
1.6 Pentoz fosfat yolu ve Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz.....	15
2. MATERYAL VE METOD	17
2.1 Biyoinformatik Analiz.....	17
2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	18
2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama	19
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	20
2.5 Agaroz Jel Elektroforezi.....	21
2.6 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu.....	22
2.7 RNA İzolasyonu	23
2.8 Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi.....	24
2.9 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR).....	24
2.10 Klonlama ve Transformasyon	25
2.10.1 Klonlama İçin Primer Dizaynı	25
2.10.2 Jelden Kazanım.....	26
2.10.3 PCR Pürifikasyonu	27
2.10.4 Ampisilin Hazırlama (50 mg/mL)	28
2.10.5 LB Agar ve LB Broth Hazırlama.....	28
2.10.6 Kompetan Hücre Hazırlama	28
2.10.7 Klonlama.....	29
2.10.8 Çoğaltma Suşuna Transformasyon	29
2.10.9 Koloni PCR ve Koloni Tarama.....	30
2.10.10 Plazmit İzolasyonu.....	30
2.10.11 Spektrometre İle Plazmit DNA Miktar Ölçümü	31
2.10.12 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu.....	31
2.11 Hücrelerin İndüklenmesi	32
2.12 IPTG Hazırlama	32
2.13 Hücreleri Çöktürme ve Lizis	32
2.13.1 Hücreleri Çöktürme	33
2.13.2 Protamin Sülfat Hazırlama.....	33

2.13.3	PMSF Hazırlama.....	33
2.13.4	5 mL'lik Lizozim Hazırlama	33
2.13.5	Lizis	34
2.14	Buffer A Hazırlama	34
2.15	Protein Saflaştırma	34
2.16	Tampon B Hazırlama	35
2.17	SDS Page Jel Elektrofrez ve Western Blot	36
2.17.1	%15'lik Ayırma Jeli Hazırlama	36
2.17.2	Lower Tampon Hazırlama	36
2.17.3	%10'luk APS Hazırlama.....	37
2.17.4	Yığıma Jeli Hazırlama	37
2.17.5	Üst Tampon Hazırlama	37
2.17.6	Yürütme Tamponu Hazırlama	37
2.17.7	Örnek Hazırlama.....	38
2.17.8	Commasie Blue Boyama Tekniği	38
2.17.9	Gümüş Boyama Tekniği	38
2.18	Western Blot.....	39
2.19	Primerlerin Tasarımı ve Sulandırılması.....	40
2.20	Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama.....	40
3.	BULGULAR	41
3.1	Bionformatik Analiz.....	41
3.1.1	Mikrotübül ilişkili proteinin (UPK 184) için Blast.....	42
3.1.2	Glukoz -6- Foafat-1-Epimeraz (UPK 195) için Blast.....	45
3.1.3	Mikrotübül İlişkili Proteinin için BioEdit Programı.....	48
3.1.4	Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz için için BioEdit Programı.....	51
3.1.5	Aminoasit Dizisi ve Tahmini Protein Yapısı.....	53
3.2	Moleküler Klonlama ve Protein Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	57
3.2.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	57
3.2.2	Polimorfizm Analizi	58
3.2.3	Tasarlanan Primerler	59
3.2.4	DH10B'ye Transformasyon.....	61
3.2.5	Koloni PZR	61
3.2.6	Rekombinant Plazmit'in E. coli' nin Ekspresyon (İfade) Suşuna Transformasyon.....	63
3.2.7	SDS-Page ve Western- Blot Analizi Sonuçları.....	63
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	65
5.	KAYNAKLAR	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Zeytinin Dünyadaki Üretim Oranları...	4
Şekil 1.2: Glikozun kullanılma yolları	13
Şekil 1.3: Glukoz ve Glukoz-6-Fosfatın açık formülü	14
Şekil 1.4: Fruktoz 6-Fosfat ve Glukoz 6-Fosfatın açık gösterimi	14
Şekil 1.5: Riboz 5-Fosfat	16
Şekil 2.1: UPK 184 geni için nükleotit blast	17
Şekil 2.2: UPK 195 gen dizisi için nükleotit blast gösterimi	18
Şekil 2.3: PCR çalışma aşaması.	20
Şekil 2.4: Agoroz jel hazırlama aparatları	22
Şekil 2.5: Western Blot hazırlama aşaması	40
Şekil 3.1:UPK 184 kodlu gen dizisinin BlastNCBI ' daki nükleotit blast sonuçları.....	43
Şekil 3.2: UPK 184 kodlu genin benzerlik gösterdiği canlıların Blast sonuçları.	44
Şekil 3.3: UPK 184 kodlu genin en çok benzeşme gösterdiği canlı türü örneği.....	44
Şekil 3.4: UPK 195 kodlu gen dizisi için Blast	45
Şekil 3.5: UPK 195 gen dizisinin susam bitkisine benzerliği	46
Şekil 3.6:UPK195 kodlu gen dizisinin Blast sonucu en çok benzediği canlıların görüntüsü.	45
Şekil 3.7: UPK 195 gen dizisinin <i>Sesamum indicum</i> ile örtüştüğü nükleotid dizileri..	47
Şekil 3.8: UPK 195 adlı gen dizisinin en yüksek benzeşme gösterdiği canlı.	47
Şekil 3.9: Glikoz-6-1-Epimeraz enzimin yakın olduğu filogenetik diyagramı.	48
Şekil 3.10 : Mikrotübül ilişkili proteinin cDNA dizisi nükleotit kompozisyonu.	49
Şekil 3.11: Mikrotübül ilişkili protein geninin açık okuma çerçevesi	50
Şekil 3.12: Mikrotübül ilişkili protein geninin amino asit kompozisyonu	50
Şekil 3.13: Glikoz-6-1-Epimerazın cDNA dizisi nükleotit kompozisyonu	51
Şekil 3.14: Glikoz-6-1-Epimeraz geninin açık okuma çerçevesi.	52
Şekil 3.15: Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninin amino asit kompozisyonu	52
Şekil 3.16: UPK 195 geninin PCR görüntüsü	58
Şekil 3.17: Polimorfizim için yapılan PCR	59
Şekil 3.18: UPK 184 için amino asit dizisi.	53
Şekil 3.19: Proteinin ağırlığı ve içerebileceği aminoasitler.	54
Şekil 3.20: Protein hidrofobite diyagramı	55
Şekil 3.21: UPK 195 gen dizisi için Protein hidrofobite diyagramı	56
Şekil 3.22: UPK 195 geninin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı	57
Şekil 3.23: Rekombinant DH10B suşunun koloni görüntüsü.....	61
Şekil 3.24: Koloni PCR görüntüsü	62
Şekil 3.25: Rekombinat BL21 suşunun kolonileri	63
Şekil 3.26: SDS görüntüsü.	64

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Dünya Zeytinyağı Üretimi (Bin Ton cinsinden) (UZK).....	5
Tablo 1.2: Dünya Zeytinyağı İhracatı Gösterimi (Bin Ton) (UZK)	6
Tablo 1.3: Dünya Zeytin İthalatı (Bin Ton) (UZK)	7
Tablo 1.4: Türkiye' de bölgelere göre ağaç sayısı, dikim alanı, üretim ve üretim oranı (Kaynak , TUIK).....	7
Tablo 2.1: Deney yapılmak üzere toplanan zeytin çeşitleri.....	19
Tablo 2.2: UPK 184 için vektörlere klonlamak için hazırlanan primerler.....	25
Tablo 2.3: UPK 195 geni için vektörlere klonlama amacıyla hazırlanan primerler.....	26
Tablo 3.1: UPK 184 gen dizisi için hazırlanan primerler.	60
Tablo 3.2: UPK 195 için tasarlanan primerler.	60
Tablo 3.3: UPK 195 gen dizisinin protein ağırlığı ve içerdiği aminoaitler.....	56

SEMBOL LİSTESİ

MAP90	: Mikrotübül bağlantılı protein
PH	: Parkinson hastalığı
MAPT	: Mikrotubul ilişkili tau
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dntp	: Deoksiribonükleosid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromid
FBPase	: Fruktoz-1,6-bifosfataz
GAP	: D-Gliseraldehit-3-fosfat
gDNA	: Genomik DNA
H2O2	: Hidrojen peroksit
IPP 2	: (N-formil-N-hidroksi)-aminoetilfosfonat
Kb	: Kilo baz
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
O2	: Oksijen molekülü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGH0	: Fosfoglikolohidroksimat
PGI	: Fosfogluko izomeraz
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
nBLAST	: Nucleotide Basic Local Aligment Search Tool
Rpe	: Ribuloz-5-fosfat 3-epimeraz

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca moleküler genetik ve biyoloji alanında, gerekse çalışmalarım boyunca karşılaştığım her zorlukta benden desteklerini esirgemeyen , her zaman her konuda yanımda olan ve bana sağladığı bütün katkılardan dolayı danışman hocam Sayın Prof .Dr. Gülendam TÜMEN hocama ve tez savunma sınavımda bulunarak bilimsel anlamda değerli katkılar sağlayan değerli hocam Prof.Dr. Hulusi MALYER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım bütün ders hocalarıma başta bölüm başkanımız olan güler yüzlülüğüyle hep hatırlayacağım biyoloji anabilim dalı başkanımız ve danışman hocam Sayın Prof.Dr. Gülandam TÜMEN'e Sayın Prof.Dr. Feray KOÇKAR'a, Sayın. Dr.Öğretim Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na ve tüm değerli öğretim üyeleri hocalarıma çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansta tanıdığım ve çok sevdiğim Ankara'lı canım arkadaşlarım Sümeyye ALTUNOK'a ve Büşra BAŞ'a ve Ali Can KAYA arkadaşşıma çok teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek lisans hayatım boyunca her türlü zorlukta yanımda olan canım dostlarım Fatma POYRAZLI ve Sinem GÜNTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyurum.

Beni bugünlere getiren emeğini hiç bir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Münasip BOZKURT, her zaman yanımda olan bana güvenen destek olan ömrü kısa olan fedakâr canım babam Katip BOZKURT'a ve canım kardeşlerime teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tezim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım eşim Dr. Özgür SANCAR'a teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.)

Zeytin ekonomik önemi olan ve Akdeniz Havzası'nda yetiştirilen en eski meyve türlerinden birisidir. Yeryüzünde ilk kültüre alınan ağaç türlerinden birisi olan zeytin, yazının keşfinden önce yetiştirilmeye başlanmıştır. İlk zeytin hasadının ne zaman ve hangi uygarlık tarafından yapıldığı bilinmemektedir. Kültüre alınmış zeytinin tarihi, günümüzden 6000 yıl öncesine kadar gittiği var sayılmıştır. Bununla birlikte, yabancı zeytinin aşısıyla "ehilleştirilmesinin" ilk kez M.Ö 4000'lerde Doğu Akdeniz'de Adana, Gaziantep'ten başlayıp, Suriye, Lübnan ve İsrail'e inen kıyı şeridi ve hinterlandında gerçekleştirildiği ve bu mucizeyi büyük olasılıkla Samilerin başardığı sanılmaktadır. Zeytinyağının yaygınlaşmasının ise M.Ö 2000'lerde gerçekleştiği tahmin edilmektedir [1].

Zeytin tarih boyunca Akdeniz çevresindeki ülkelerde insanlık için dostluk ve barışın simgesi, refahın kaynağı olmuştur. Akdeniz Bölgesi'nin en eski ağacından biridir [2]. Dünyanın en eski meyvelerinden biri olarak bilinen zeytin, insanlara tanrının bahşettiği bir armağan olarak kabul edilir. Yaradılış ve kuruluş efsanelerinde, kutsal kitaplarda önemi vurgulanır. Anadolu medeniyetlerinde de olduğu gibi zeytin yaprakları barış, zafer ve zenginlik simgesidir. Zeytinin anavatanı konusunda birçok görüş bulunmakla beraber Küçük Asya'da yani bugünkü adı ile Anadolu'da binlerce yıldır yetiştirildiği bilinmektedir. Araştırma sonuçlarına bakıldığında zeytinin anavatanının Anadolu olduğunu söylemek mümkündür. Akdeniz Havzası'nda binlerce yıldır yetiştirilen zeytin, birçok ülkenin ekonomik gelir kaynağı olmuştur [3]. Ayrıca zeytin ağaçları yılın her mevsimi aktif yaşamlarıyla toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik ortamını iyileştirirler. Bulunduğu toprağın yapısını ve su tutma kapasitesini geliştirirler. Zeytin ağaçları kökleri sayesinde topraktaki patojenleri ve hastalıkları engelleyici rol oynarlar. Erozyonu önleme açısından yetiştirme koşulları ve toprak seçiciliğinin az olması nedeniyle önemlidir. Bunun yanında; zeytinin tarımsal faaliyetlerin güçleştiği engebeli coğrafik bölgelerde eğimin fazla olduğu, taşlık, tınlı, çorak yerlerde

yetiştirilmesi, buralardaki toprak erozyonun önüne geçmesine önemli bir katkı yapmaktadır.

1.1.1 Zeytinin Morfolojisi

Zeytin her zaman yeşil, ağaç boyu 4 ile 8 metre arasında değişen bir bitkidir. Yaralandığında kolayca kendini yenileyebilen zeytin $2n=46$ kromozoma sahiptir. Soğuk kışlar, kuru ve sıcak yazlarda bile gelişimine devam edebilir [4].

Zeytin'in sıcaklık istekleri Zeytin ağacının sıcaklık gereksinimleri, fenolojik dönemlere göre farklılık göstermektedir. Nitekim normal bir gelişim için ortalama hava sıcaklığı, ilk sürgünlerin görülmesinden çiçeklenmeye kadar olan dönem boyunca $5-10^{\circ}\text{C}$, çiçeklenme döneminde $15-20^{\circ}\text{C}$, meyva oluşumu ve büyüme devresinde ise $20-25^{\circ}\text{C}$ arasında olmalıdır. Zeytin ağacının sıcaklık isteği, meyvaların olgunlaştığı dönemde 15°C 'dir. Tam olgunluktan hasat sonuna kadar olan dönemde ise sıcaklık isteği 5°C civarına düşmektedir. Yaprağını dökmeyen ağaçlardan biri olan zeytin, Ocak ayından Nisan ayına kadar olan dönemde çiçek tomurcuğu oluşumu için belli bir süre soğuklamaya gereksinim duymaktadır. Nitekim tropik bölgelerde zeytinin yetişmesine rağmen meyvanın oluşmaması, zeytin ağacının tropikal iklim bölgelerinde gereksinim duyduğu soğuklama döneminin olmayışına bağlanabilir. Vejetasyon dönemi dışında veya kış dinlenme döneminde düşük sıcaklıklara karşı oldukça duyarlı olan zeytin, günlük minimum sıcaklığın 7°C 'nin altına düşmesi durumunda zarar görmektedir. Ağacın soğuğa karşı dayanıklılığı birçok faktöre bağlıdır. Zeytin ağacında; ağacın cinsi, soğuğun devam süresi, şiddeti, rüzgârın hızı, havanın nemi, bakı, ağaçtaki özsu faaliyetleri, toprak nemi gibi faktörlere bağlı olarak, oranları farklı zararlar meydana getirmektedir [5].

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nden alınan bilgilere göre Türkiyede yetiştirilen 87 zeytin çeşidi bulunmaktadır. Anadolu'da yetiştiriciliği yapılan birçok zeytin (*Olde europaea L.*) çeşidi bulunduğu halde bunların morfolojik ve biyolojik özellikleri henüz tam olarak belirlenmiş değildir [6].

Hammadde; zeytin işlemindeki en önemli kalite unsurlarından biridir. İyi bir hammadde temin edebilmek için zeytin tarımının da iyi yapılması gerekmektedir. Zeytinliklerin planlanması ve plantasyonların oluşturulmasından, yetiştiriciliği yapılan zeytin çeşidine uygun toprak işleme sistemleri, gübreleme, sulama, terbiye ve budama metotları uygulaması ve hasat şekli, tekniği ve zamanına kadar tüm işlemler iyi bir hammadde teminine etki etmektedir [7]. Uygun zamanda tam kıvamına gelmiş taneleri hasat etmek gerekir. Zeytinlerin olgunlaşmalarının hasat edilmesi ve bunun belirli bir süre sürdürülmesi gerekir. Olgunlaşmamış veya fazla olgunlaşmış zeytinler aynı anda toplandığından gerek sofralık zeytin gerekse elde edilen yağ iyi kalitede olmaz. Bilimsel ölçütlere göre uygun hasat zamanı yağ kalitesi ve miktarı arasındaki dengenin belirlenmesinde önemli bir faktördür [8].

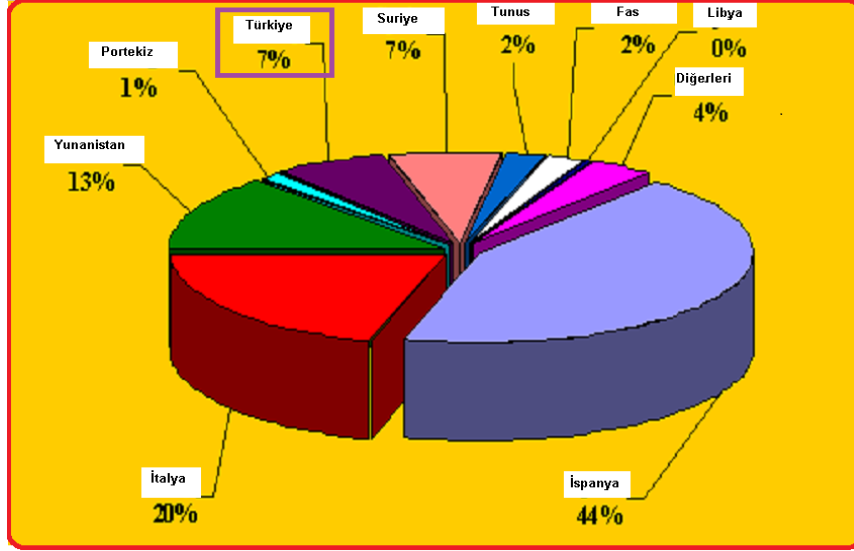
Zeytinyağında yağ asitlerinin bileşimi, özellikle oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi önemli yağ asitlerinin varlığı, yağın kalitesini ve insan sağlığını önemli ölçüde etkileyen unsurlardandır. Dolayısıyla zeytinin olgunluk aşamalarındaki yağ asitleri bileşimlerinin değişimi bu konuya önem veren üreticilerin de hasat tarihlerini ve kaliteli yağ eldesini şüphesiz olumlu etkileyecektir.

1.1.2 Dünya’da ve Türkiye’ de Zeytinin Coğrafik Dağılımı

Dünya genelindeki zeytin yetiştiriciliğinin % 90’lık bir kısmı Akdeniz havzası, geriye kalan kısmı ise Latin Amerika ülkelerinde yapılmaktadır. Dünyada yaklaşık 9 milyon hektar alanda 900 milyon zeytin ağacından yaklaşık 17 milyon ton dane zeytin elde edilmektedir. Dünya sofralık zeytin üretimi son beş sezon ortalamasına göre 2,87 milyon ton civarındadır.

Önemli zeytin üretici ülkeler sırasıyla, İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus, Suriye ve Türkiye’dir. Üretimde AB ülkelerinin payı yıllara göre değişmekle birlikte ortalama % 65 seviyelerindedir. AB ülkeleri arasında ilk sırayı İspanya almakta onu İtalya ve Yunanistan izlemektedir. İspanya’nın AB üretimdeki payı % 55’ler seviyesindedir. Bunların yanı sıra son yıllarda Avustralya, Japonya ve Arjantin gibi ülkelerde de zeytin üretimine başlanılmıştır. Zeytin, genetik özelliğinin yanı sıra

kültürel işlemlerin tam olarak uygulanamayışı nedeniyle alternans (bir yıl ürün verme-diğer yıl az/yok verme) gösterir.



Şekil 1.1: Zeytinin dünyadaki üretim oranları [9].

Türkiye, İspanya ve İtalya gibi Akdeniz ülkelerinden sonra gelen dünyadaki büyük zeytin üreticisidir. Türkiye'de zeytin ülke ekonomisi ve beslenme yönünden büyük öneme sahip tarımsal bir üründür. Toplam 81 ilin 36 'sında zeytin üretimine rastlanmaktadır [9]. Sofralık olarak Türkiye ve İspanya, zeytinyağında ise İspanya, İtalya ve Yunanistan başlıca üreticilerdir ve 2009'da dünyada üretilen yaklaşık 16 milyon ton zeytinin takribî 1,3 milyon tonu Türkiye'de üretilmiştir.

Türkiye sahip olduğu zeytin ağacı varlığı ile dünyanın önemli zeytin üreticisi ülkeleri arasındadır. Sofralık zeytin sektöründe ortaya çıkan kalite sorunları zeytin yetiştiriciliğinden ve sofralık zeytin üretiminin diğer aşamalarından kaynaklanabilmektedir. Özellikle üretimde, bölgelere adaptasyonu denenmeyen çeşitlerin seçiminin yanında, adaptasyon çalışmaları yapılmış çeşitlerin hatalı uygulamalarla yetiştirilmesinden dolayı da ciddi kalite kayıplarına neden olabilmektedir.

Tablo 1.1: Dünya Zeytinyağı Üretimi (Bin Ton cinsinden) (UZK) [10].

Zeytinyağı üretimi	2010/2011	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16 (öng.)
AB ülkeleri	2 209.0	2 395.1	1 461.7	2 485.0	1 535.5	1 960.5
İspanya	1391.9	1615.0	618.2	1781.5	829.0	1200.0
İtalya	440.0	399.2	415.5	463.7	302,5	350.0
Yunanistan	301.0	294.6	357.9	132.0	300.0	300.0
Portekiz	62.9	76.2	59.2	91.6	90.0	92.0
Diğer UZK Ülkeleri	785.0	851.5	859.5	652.0	758.0	861.0
Tunus	120.0	182.0	220.0	70.0	295.0	140.0
Suriye	180.0	198.0	175.0	180.0	50.0	215.0
Türkiye	160.0	191.0	201.0	135.0	160.0	143.0
Fas	130.0	120.0	100.0	120.0	120.0	130.0
Cezayir	67.0	39.5	66.0	44.0	44.0	73.5
Arjantin	20.0	32.0	17.0	30.0	6.0	25.0
Ürdün	27.0	19.5	21.5	19.0	35.0	39.0
TOPLAM	3 075.0	3 321.1	2 401.7	3 205.5	2 366.5	2 909.5

Tablo 1.1: de görüldüğü gibi zeytinyağı üretiminde önderlik yapan ülkelere bakıldığında AB birliğine mensup ülkelerin önde olduğu görülmektedir. Diğer ülkeler çatısı altında gösterilen kısma bakıldığında zeytinyağı üretiminde hafife alınmayacak sırada Türkiye yer alır.

Tablo 1.2: Dünya Zeytinyağı İhracatı Gösterimi (Bin Ton) (UZK) [10].

ÜLKELER	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15*
AB	481	555,5	491,5	600,7	504
İtalya	223,5	233,2	217,6	233,3	243,7
İspanya	196,2	248	197,6	289,7	225
Portekiz	42,7	51,5	50,5	53,8	53,3
Yunanistan	13	15,5	18	15,7	11,6
Fransa	1,8	1,9	1,7	2,3	2,5
Tunus	108	129,5	170	65	303
Suriye	23	25	30	25	0
Arjantin	12	23,5	12	21,5	9,5
Türkiye	12	20	92	35	15
Fas	30,5	11	10	11	20
Diğer	25	30	28	26,8	28,5
Toplam	695,5	803	843	785	832,5

Tablo 1,2’de görüldüğü gibi zeytinyağı ihracatında üretimle paralel olarak en çok ihracat yapan AB ülkeleri olmak üzere iken, akabinde ise Tunus ve Türkiye bu ülkeleri takip etmektedir. Zeytinyağı ithalatında gelişmiş ülkelerin ilk sıraları aldıkları görülmektedir. İthalatta % 33’lere varan oranla ABD ilk sırayı alırken AB ülkeleri arasında özellikle İtalya üretici ve ihracatçı olmasına rağmen aynı zamanda önemli bir ithalatçı ülke olarak görülmektedir.

Tablo 1.3: Dünya Zeytin İthalatı (Bin Ton) (UZK) [10].

ÜLKELER	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15*
ABD	245	255	258	275	318	299	302.5	294.5
AB	162	96	78	82	87,5	137	53	198.5
Brezilya	40	42	50,5	61,5	68	75	72.5	66.5
Japonya	29	30	40,5	35,5	42	54	54	59
Kanada	29	30	37	40	38,5	38	40.5	37.5
Avustralya	27	28,5	35	32	31,5	29	28	22
Diğer	104	119	153	178,5	183	200,5	229	213
Toplam	636	600,5	652	704,5	769	832,5	779.5	891

Tablo 1.4: Türkiye'de bölgelere göre ağaç sayısı, dikim alanı, üretim ve üretim oranı [11].

BÖLGELER	Dikim Alanı (ha)	Dikim Alan Payı (%)	Toplam Üretim (T)	Üretim Payı (%)
Ege	454.290.00	62.0	760.094.00	53.0
Marmara	115.008.00	16.0	260.987.00	18.0
Akdeniz	106.189.00	15.0	328.601.00	23.0
Güneydoğu	56.476.00	8.0	68.369.00	6.0
Karadeniz	349.00	0.2	3.236.00	2.2
Toplam	732.314.00	100.0	1.421.288.00	100.0

Türkiye’de tarım sektörüne ve bu ilişkiden dolayı ülke ekonomisine katkısı açısından ciddi bir öneme sahip tarımsal ürünlerden biri olan zeytin, ülkemiz tarım ekonomisinde en önemli on ürün içerisinde yer almaktadır. Dünyadaki önemli zeytin üreticilerinden biri olan ülkemiz dünya zeytin üretiminin %7.46’sını, zeytinyağı üretiminin %3.54’ünü, gerçekleştirmektedir [10]. Ülkemizde zeytin yetiştiriciliğinin 782 bin ha alan ile toplam tarım arazileri içindeki payı %3,2’dir. Üretilen zeytinin %64’ü yağlık çeşitlerden oluşmaktadır. Üretiminin %47’si Ege Bölgesinde yapılmakta ve bunun da %63’ü yağlık zeytin olarak değerlendirilmektedir. Marmara Bölgesindeki üretimin ise %41’i sofralık zeytindir [11].

Türkiye’de Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Bursa, Manisa, Çanakkale, Gaziantep ve Mersin önemli zeytin üretimi yapılan illerdir. Ege, Marmara, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri ise önemli zeytin üreten bölgelerimizdir. Türkiye’de sofralık zeytin üretimi, son on yılda ciddi bir artış göstermiştir. Sofralık zeytinde özellikle güney marmarada bulunan Gemlik, İzmit ve Mudanya ilçelerinde üretilmektedir. Türkiye’de sofralık zeytin üretiminin artması ile küresel ısınma gibi olumsuz iklimsel koşullara rağmen bu yükselişi, genç nüfusun büyük şehirlere göç etmesi ve arazilerin daha az iş gücü ve bakım isteği olan zeytinciliğe açılmasına, sertifikalı fidan kullanarak bahçe tesisine uygulanan yüksek destekleme primlerine bağlamak mümkündür. Ayrıca, zeytin fidancılığının çok gelişmiş olması ve her alanda kolaylıkla bulunabilmesinin ve en önemlisi de, sofralık zeytin üretiminin iyi getiri sağlayan bir tarımsal faaliyet kolu olmasının etkisi olduğundan da söz edilebilir.

Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan en önemli sofralık zeytin çeşitleri Gemlik, Ayvalık, Domat, Memecik, Erkence, Uslu, Eşek Zeytini, Yamalak Sarısı ve Edincik Su çeşitleridir. Bu çeşitler içerisinde siyah sofralık olarak değerlendirilen Gemlik çeşidi, yüksek sofralık kalitesi ve Türkiye içerisindeki yayılışı bakımından büyük önem taşımaktadır [12].

Yapılan birçok araştırma zeytininin bileşimine ve sofralık özelliklerine, yetiştirildiği yörenin ve işleme yönteminin belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir [13]. Zeytinin orijin merkezlerinden birisi olarak kabul edilen Türkiye zeytin

çeşitliliği bakımından son derece zengindir [14]. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nün 1968 yılından beri yapmış olduğu surveylerde 89 genotip belirlenmiş ve tescil ettirilmiştir. Sofralık zeytin kalitesine etki eden en önemli zararlılar; “Zeytin Kara Koşnili” (*Saissetia oleae* Olivier), “Zeytin Kabuklu Biti” (*Parlatoria oleae* COLV.), “Zeytin Sineği” (*Bactrocera oleae* Gmelin), “Zeytin Güvesi” (*Prays oleae* Bern.)’dir. Ayrıca üretimde karşılaşılan en önemli zararlılardan *dacus* zararı; “Akdeniz Meyve Sineği” (*Ceratitis capitata*) adını alan bir sinek tarafından yapılır. Bu sineğin verdiği zarar özellikle yeşil sofralık zeytinlerin ticari değerini tamamen yok etmektedir . Bu zararlılarla kültürel ve kimyasal mücadele mümkündür [15].

1.1.3 Uslu Zeytin Çeşidi

Akhisar’a özgü bir çeşittir [16]. Ağacı oldukça geniş bir taç oluşturur. Bu nedenle fidan dikim mesafeleri fazladır. Meyve oval ve orta büyüklükte ucu memersiz ve yuvarlaktır [17]. Soğuğa karşı oldukça duyarlıdır. Meyve kabuğu ince ve hassas olduğu için toplama sırasında kolay berelenir. Uslu çeşidi genellikle siyah sofralık olarak değerlendirilir [3]. Uslu Zeytin kolay tane dökken bir yapıya sahiptir. Meyveleri iri olup mor-siyah arası renktedir. Yağ oranı %20’dir [8]. Uslu zeytin çeşidi yağının son derece düşük bir oksidatif stabiliteye sahip olduğu şeklinde zeytinyağı sektöründe yaygın bir anlayış vardır [9].

Bu çalışmada Uslu (Meyvesini kolay bırakan) zeytin çeşidinin iki önemli geni çalışılmıştır. UPK184 (Mikrotübül ilişkili protein) ve UPK195(Glikoz 6-Fosfat 1-Epimeraz) İki zıt karaktere sahip olan bu çeşidler arasında meyve pedisellerinden elde edilen cDNA molekülleri incelenmiş ve bunların zeytin çeşidine veya pedisele has olup olmadıklarının ve meyve dökülmesi ile olan ilişkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.2 Mikrotübül ilişkili Protein Nedir?

Mikrotübüller, alfa ve beta tubulin heterodimerlerinden oluşan hücre iskeleti polimerleridirler. Hücre için son derece gerekli olup hücre taşınması, hücre hareketi,

hücre bölünmesi gibi hücre için hayati önem taşıyan olaylarda görevlidirler. Sinir hücrelerinde, MTler hücrenin büyümesine destek sağlamakla beraber hücre yapısının şekillenmesinde, akson ve dendritlerin oluşumunda da etkilidirler. Ayrıca MTler organel gibi moleküllerin akson boyunca çift yönlü taşınmasında da demir yolu vazifesi görmektedirler [18].

Mikrotübül bağlantılı protein (MAP90), bitki hücrelerinin değişmesinde hayati öneme sahip mikrotübüllerin hareketlerini ve organizasyonlarını ayarlamaktadır. Mikrotübül ve mikrofilament ağından oluşan apikal hücre iskeleti, hücre sitoplazmasındaki silyumun bazal kısımlarının (bazal cisim ve bazal ayak) sıkıca tutulmasından sorumludur [19]. Silya hayvanlarda, protozoada ve bazı bitkilerde bulunan ve spermatozoal flagella ile morfolojik benzerlik gösteren karmaşık yapıda ökaryotik organellerdir [20]. Silya, 360'ın üzerinde proteinden oluşmuş, ileri derecede özelleşmiş kompleks organellerdir [21]. Respiratuvar silya 6 µm uzunluğunda ve 200-250 nm çapındadır [22]. Her bir silyum 2 merkezi mikrotübül etrafında dizilmiş 9 periferik mikrotübül çiftinden oluşan 9+2 aksonem yapısı gösterir. Periferik çiftlerin her biri A ve B tübüllerinden meydana gelir [23]. A tübülünde 13, B tübülünde ise 11 protofilament bulunur. Protofilamentler alfa ve beta tübülün heterodimerlerinin birleşmesiyle oluşurlar. Merkezi mikrotübül çifti (C1 ve C2), 13 tübülün protofilamentinden oluşur ve yapısal ve biyokimyasal olarak asimetriktir.

Merkezi mikrotübül çifti, kom- şu silyadaki merkezi çifte göre oryantasyon gösterir. Bu oryantasyon silyer hareketin koordinasyonunda önemlidir [24]. Mikrotübülün merkezi çifti 23 özgün polipeptid içeren 13 protofilamentten oluşmakla birlikte, işlevsel ve biyokimyasal olarak dış mikrotübül çiftlerinden ayrılır [25].

Mikrotübül ilişkili protein kinaz (MAPK)/ekstraselüler sinyal-regüle kinaz (ERK) ve protein kinaz C (PKC) sinyal yolları aracılığı ile kalsiyum alımını ve protein sentezini iyileştirmektedir [26]. Alzheimer hastalığı olan beyin dokusunda norofibrille yumakların oluşması için mikrotübül ilişkili tau protein rol oynamaktadır [27]. Mikrotübüler işlevlerle ilgili bir parametre olan tirozinlenmiş/tirozinlenmemiş alfa-tubulin oranı (Tyr/Glu-Tub) ve MAP-2 ekspresyonunun hipokampal bölgede azalması yeni obje tanıma testi ile saptanan bellek bozukluklarında belirleyici bir

bulgudur. Agomelatinin hipokampal yapıda Tyr/Glu-Tub ve MAP-2 gibi mikrotübüler dinamiklerle ilişkili elemanları artırıcı etkilerinin antidepresan etkilerinin yanı sıra bellek üzerine olumlu etkileri ile de ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür [28].

1.2.1 Tau protein

Tau protein, nöronların aksonlarında yerleşmiş mikrotubul ilişkili proteindir. Aksonal mikrotubullere bağlanarak onları stabilize eder. Tau'nun Serin ve Treonin kinazlar tarafından fosforilasyonu, proteinin normal ve patolojik fonksiyonlarını düzenler [29]. Parkinson hastalığı (PH) yaşlılarda Alzheimer hastalığından sonra ikinci sıklıkta görülen nörodejeneratif hastalıktır. PH'nın çoğu sporadik olmasına karşın, zincir analizleri ile çeşitli mendel genlerinde patojenik mutasyonlar gösterilmiştir. MAPT (mikrotubul ilişkili tau) geninde değişimin işlev kaybı mutasyonlarının PH risk faktörü oldukları kanıtlanmıştır [30].

1.2.2 Mikrotübül Kesilmesinin Regülasyonu

Hücreler “dinamik kararsızlık” adı verilen mekanizma ile MTlerini yeniden yapılandırmaktadırlar. Ancak sinir hücrelerinde olduğu gibi, birçok hücre tipi karmaşık MT ağına sahiptir. Bu hücrelerin MT yapılanmalarını dinamik kararsızlık ile açıklamak, özellikle de MTler başka proteinler ile de etkileşim halindeyken oldukça güçtür. Bu bulgular MTlerin hücre içi hareketini açıklamaya çalışan başka modellerin de mevcut olduğunu düşündürmektedir. Üzerinde çalıştığımız modele göre (“kes ve koş” modeli), uzun MTler durağan, kısa MTler ise hareketlidirler. Bu modele göre, hücreler MTlerini hareketli hale getirmek için onların katanin, spastin gibi proteinler tarafından kesilip, küçük parçalara ayrılmasını sağlamaktadırlar. Kısa MTler tekrardan uzun hale geçtiklerinde ise hareket yeteneklerini kaybetmektedirler. Katanin ve spastin MT kesici enzimlerdir. Katanin, karakterizasyonu en güzel yapılan MT kesen proteinlerinden biridir. İki alt üniteden oluşur, p60 ve p80. En az onun kadar popüler olan diğer bir MT bölme proteini de spastindir ve p60–katanin alt ünitesi ile büyük benzerlik göstermektedir. Spastinin en fazla ilgi çeken proteinlerden

biri haline gelmesinin nedeni de bu proteinin MT temel hücre biyolojisini nörolojik hastalıklarla birleştirmesidir. Spastinin mutasyonunda kalıtsal spastik parapleji rahatsızlığına neden olduğu bilinmektedir.

1.3 Epimeraz Nedir?

Tek bir karbon atomunun konfigürasyonu (uzaydaki üç boyutlu düzenlenişi) bakımından farklı olan izomerlere epimer, bu reaksiyonları katalizleyen enzimlere ise epimeraz adı verilir.

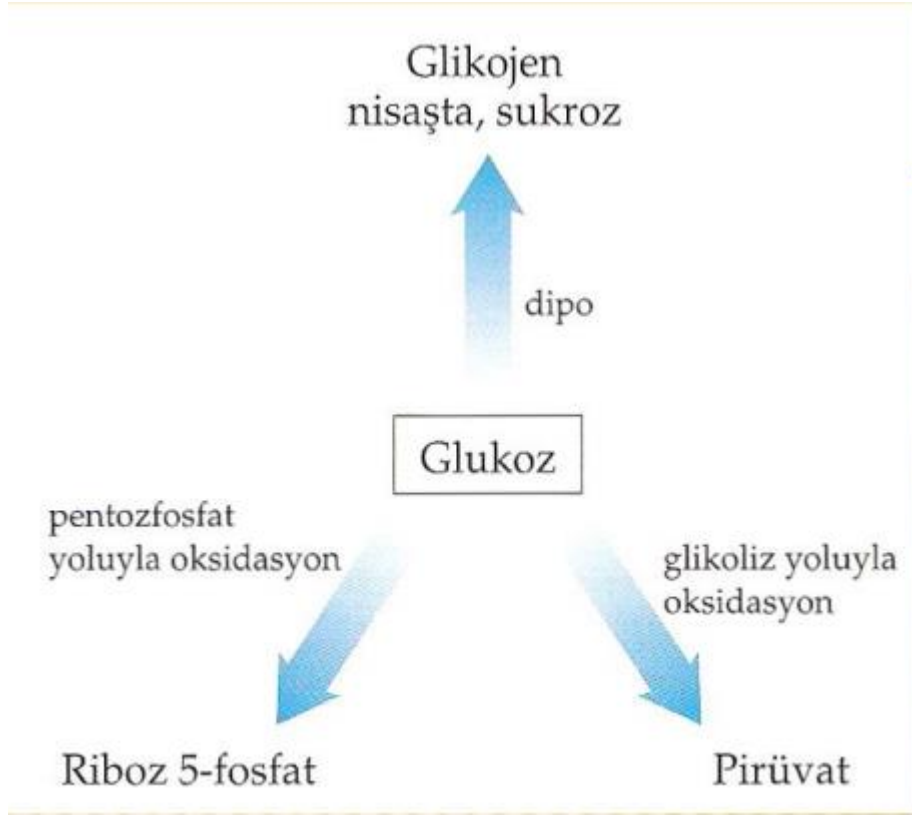
1.4 Glikoliz Nedir?

Glikoliz, glukozun çeşitli enzimler yardımıyla birbirini takip eden aşamalardan geçerek pürüvata kadar parçalanması olayıdır [31]. Bir molekül glukozun glikolizi sonucunda iki molekül pürüvat meydana gelir. Glikoliz, birbirini takip eden dokuz safha sonucunda gerçekleşir. Her bir reaksiyon basamağında ayrı bir enzim görev yapmak suretiyle, tepkime boyunca dokuz çeşit enzim faaliyet gösterir.

Glikoliz temel basamakların yanında, hücrenin temel yapıtaşlarının oluşumunu sağlayan dağılım noktalarını içerir (amino asitler, nükleotitler gibi). Bu dağılım noktalarından biri glikolitik yolun pentoz fosfat yolu ile birleştiği glikoz-6-fosfat dağılım noktasıdır. Bu noktada glikoz-6-fosfat fosfoglikoz izomeraz enzimi ile fruktoz-6-fosfata dönüşebilir ya da pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi ile 6-fosfoglukanolaktone dönüşür [32]. Aldolazın kataliziyle dihidroksiaseton fosfat ve D-gliseraldehit-3-fosfat meydana gelir. Tersinirdir, regülasyonu yoktur. Böylece glikolizin ilk aşaması tamamlanır. Bu iki ürün triozfosfat izomeraz ile birbirine dönüşebilir. Reaksiyon daha çok glikoliz yönüne işleyeceğinden, gliseraldehit-3-fosfat daha çok oluşur [33].

Glukozun metabolik döngüsüyle ilgili kapsamlı bir çalışma yüzlerce veya binlerce dönüşümü içerebilir. Yüksek bitki, hayvan ve insanlarda glukoz üç temel yola sahiptir: depo edilebilir (polisakkarit veya sukroz olarak), glikoliz yoluyla üç

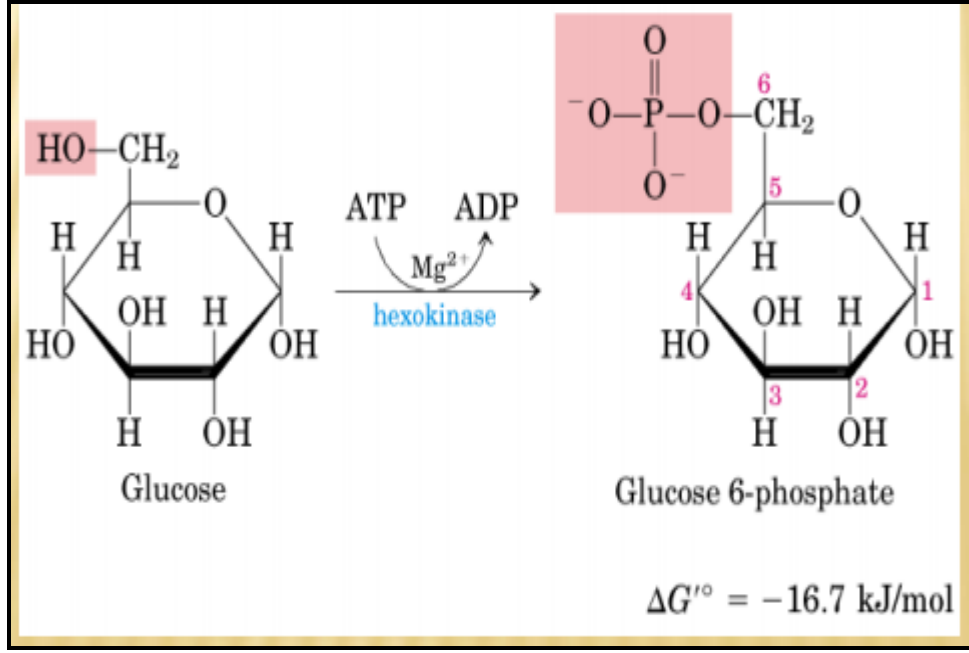
karbonlu bileşiklere oksitlenebilir (pirüvat), veya pentoz fosfat (fosfoglukonat) yoluyla pentozlara oksitlenebilir.



Şekil 1.2: Glukozun kullanılma yolları [33].

1.5 Glukoz 6-fosfatın glukoz dönüşümü

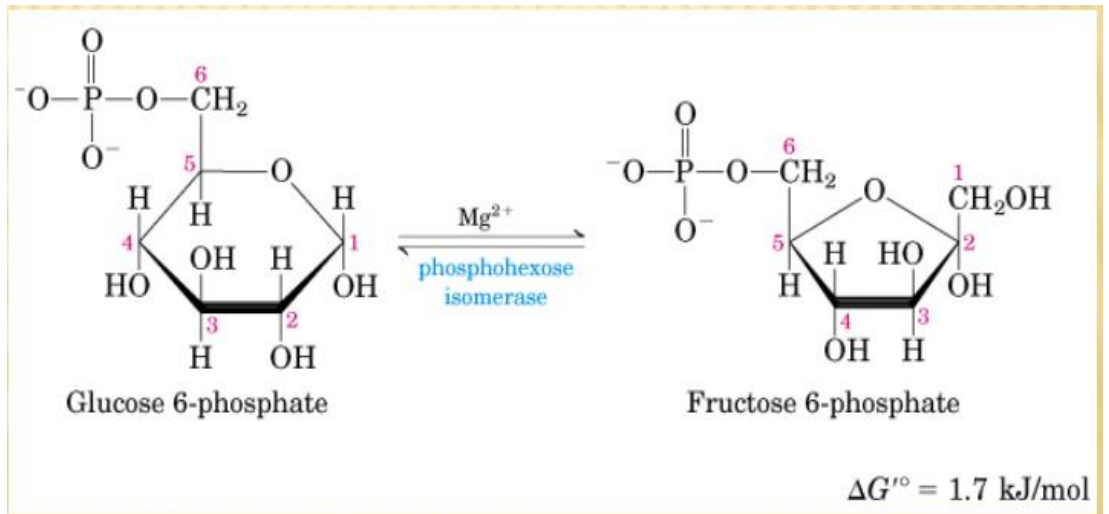
Glukoz 6-fosfatın defosforillenmesiyle glukoz oluşur. Reaksiyonun enzimi glukoz 6-fosfataz 'dır. $\text{Glukoz 6-fosfat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glukoz} + \text{Pi}$ $\Delta G_0 = -13,8$ kJ/mol Kofaktör: Mg^{+2} Bu enzim glukoneogenezin görülmediği beyin ve kas hücrelerinde bulunmaz. Bunun yerine karaciğer veya böbrekte glukoneogenezle üretilen veya besinlerle alınan glukoz kan dolaşımıyla beyin ve kasa götürülür [34].



Şekil 1.3: Glukoz ve Glukoz-6-Fosfatın açık formülü [34].

Glukoz-6-fosfatın, fruktoz-6-fosfata dönüşümü;

Glukoz-6-fosfatın, fruktoz-6- fosfata izomerizasyonudur (Şekil 1:3). Aldehid grubu keto grubuna değişir, aldoz şeker ketoz şekere dönüşür. Bunu sağlayan enzim Glukoz 6- fosfat izomeraz= fosfoheksoz izomerazdır ve bu olay geri dönüşümlü bir reaksiyondur [35].



Şekil 1.4: Fruktoz 6-Fosfat ve Glukoz 6-Fosfatın açık gösterimi [35].

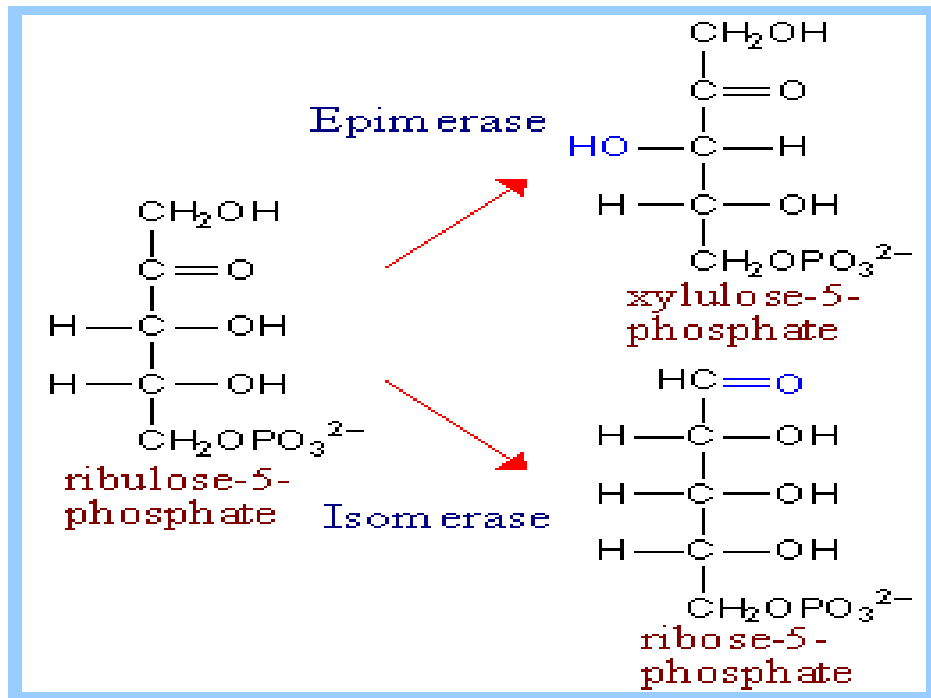
1.6 Pentoz fosfat yolu ve Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz

Pentoz fosfat yolu ile yağ asidlerinin sentezi, kolesterol sentezi, safra asidi sentezleri reaksiyonları yapılmaktadır. Steroid hormonlar dediğimiz testosteron, östrojen gibi hormonların sentezinde pentoz fosfat yolu reaksiyonları neticesinde şekillenmektedir. Pentoz fosfat yolu ile yağların sindirimi yapılmakta, nörotransmitter madde dediğimiz sinir sistemi ile alakalı elektronların verici olarak görevlerde kullanılmaktadır [36]. *Escherichia coli* ile yapılan pentoz-fosfat yolu çalışmalarında, glikoz veya pentoz gibi şekerlerin parçalanmasına yönelik bir yol olarak rolüne ek olarak, hücreye amino asitlerin, vitaminlerin, nükleotitlerin ve hücre duvarı bileşenlerinin anabolizması için ara maddeler sağlar. . Oksidatif dalı sayesinde NADPH'nin ana kaynağıdır. NADP'ye bağımlı 6-fosfo-glukonat dehidrojenaz (gnd) için genin ifadesi, *Escherichia coli*'nin büyüme oranı ile düzenlenir [37]. Pentoz fosfat yolunda dediğimiz durum karaciğerde, yağ bezleri, süte bezleri ve adrenal korteks de gerçekleşen bir olay olup, bu yol ile enerji sentezi (NADPH, Riboz fosfat sentezi, 3-7 karbonlu şekerlerin utilizasyonu) elde edilir. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları, oksidatif ve non-oksidatif reaksiyonlar olarak ikiye ayrılırlar. Pentoz fosfat yolu ile oksidatif reaksiyonlar NADPH ve Riboz fosfat sentezidir. Pentoz fosfat yolu ile non-oksidatif reaksiyon ise 3-7 karbonlu şekerlerin kullanılması ile enerji elde edilmesidir. Pentoz fosfat yolu, her ikisi de pentoz fosfat oluşumuna doğru çalışan iki ayrı yol olarak işlev görür. İki yolun kontrolü tartışılmıştır [38]. Tarif edilen enzimlerin bazıları doğada geniş ölçüde dağılmamakta, ancak yalnızca belirli hücrelerde veya dokularda, örneğin; glukoz dehidrojenaz, glukoz oksidaz, aldoz 1-epimeraz ve glukoz-6-fosfat 1-epimeraz ve araştırılan enzimler farklı biyolojik kaynaklardan gelmektedir. Bu nedenle, reaksiyon şeması, bir veya tüm hücreler için temsili olarak kabul edilmemelidir.

SaLas ve arkadaşları, glukosfosfat izomerazın spesifik olmayan bir şekilde D-glukopiranoz-6-fosfatın [39] izomerizasyonunu katalize ettiği ve izomerizasyon reaksiyonuna ek olarak, bu enzim ayrıca 3-D-glikopiranoz6-fosfat'nin anomerizasyon reaksiyonlarını katalize ettiğini; dahası mayadan glukosfosfat izomerazın D-mannoz-6-fosfata doğru anomeraz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir [40]. D-glukoz-6-fosfata karşı anomeraz etkinliği tavşan kası, *E. coli*, *Rhodotorulagr cilis*, patates yumruları, sıçan karaciğeri, sıçan böbreği ve sıçan kası glukosfosfat izomerazı için de

gösterilebilir. D-glukoz için, aldoz 1-epimeraz, glukoz-6-fosfat 1-epimeraz ve glukosifosfat izomeraz ile katalizlenen D-glukoz-6-fosfat ve D-fruktoz-6-fosfat anomerizasyon reaksiyonları meydana gelir. Keston tarafından öne sürüldüğü gibi şeker taşınmasında 1-epimerazın olası bir işlevi tartışmalıdır [41].

Araştırılan tüm hücrelerde ve dokularda, D-glukoz-6-fosfatın anomerizasyonunun, glukosfosfat izomeraz ile katalize edildiği gösterilmiştir. Glukozfosfatın mayadan ve tavşan kasından izomeraz olduğu gösterilmiştir. D-glukoz-6-fosfata karşı anomeraz aktivitesi gösterdiği, glukosfosfat olup olmadığı araştırılmaktadır [42].



Şekil 1.5: Riboz 5-Fosfat gösterimi [42].

Pentoz fosfat yolunda glukoz 6-fosfat, riboz 5-fosfata ve CO₂'ye oksitlenirken NADPH üretilir. Bu beş karbonlu şeker ve onun türevleri, ATP, CoA, NAD⁺, FAD, RNA ve DNA gibi hayati öneme sahip biyomoleküllerin bileşenleridir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Biyoinformatik Analiz

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önceden oluşturulan cDNA kütüphanesinden temin edilen “UPK 184” ve “UPK 195” kodlu dizinin benzerlik gösterdiği nükleotit dizilerini saptamak için; NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [43] programının “nBLAST” (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi kullanılarak benzerlik gösteren diziler her gen için ayrı ayrı tespit edildi. Daha sonra cDNA dizisinin BioEdit [44] programındaki “Sorted Six - Frame Translation” sekmesi ile açık okuma çerçevesi (ORF) belirlendi. Bulunan amino asit dizisine göre; NCBI veri tabanındaki BLAST [43] programının “pBLAST” (Protein Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla protein dizisine benzerlik gösterenlerin belirlenmesinin yanı sıra her iki dizi için en yakın benzerlik gösterdiği gen ailesi tespit edildi.

The image shows the NCBI BLAST search interface. The top section is for entering the query sequence. The 'Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)' field contains a FASTA sequence for UPK184. The 'Job Title' field is 'Upk184-Microtubule associated protein'. The 'Choose Search Set' section shows 'Database' set to 'Nucleotide collection (nr/nt)'. The 'Program Selection' section shows 'Optimize for' set to 'Somewhat similar sequences (blastn)'. A red arrow points to the 'blastn' option.

Şekil 2.1: UPK 184 geni için nükleotit blast.

Enter Query Sequence BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) [Reset page](#) [Bookmark](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)
 From: To:

Or, upload file Dosya seçilmedi

Job Title
 Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):

Organism Exclude
 Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Sequences from type material

Entrez Query
 Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)
 Show results in a new window

Şekil 2.2: UPK 195 gen dizisi için nükleotit blast gösterimi.

2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan PCR tüpleri, beher, erlen, pipet uçları, endorf tüpleri gibi malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer tüm malzemeleri çalışma öncesinde 121 °C’de 20 dakika 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak olası mikroorganizmalardan arınık edildi. Daha sonra uygun deney koşullarında kullanılmak üzere hazırlanılıp muhafaza edildi.

2.3 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama

Polimorfizm deneyleri yapmak için zeytin (*Olea europaea* L.) eřitlerinin yaprak örnekleri toplandı. Bu rnekler, Edremit Zeytincilik Fidan retim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edildi. Toplanan rnekler Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği'nden alınan sıvı azot içerisinde laboratuvara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 C dolabına yerleştirildi.

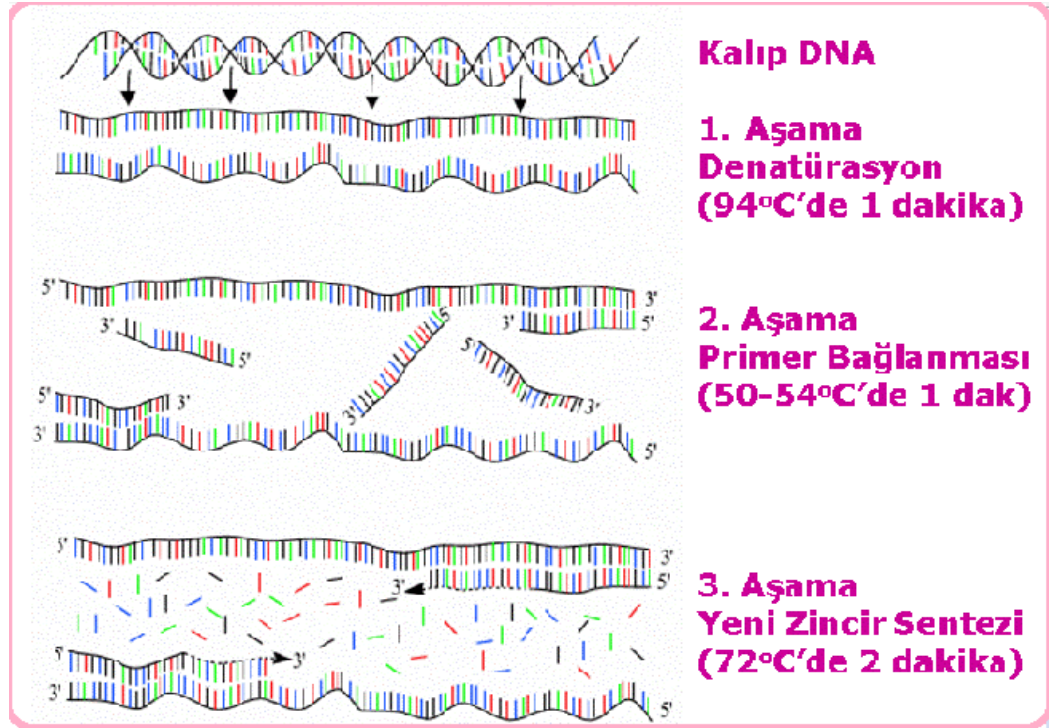
Tablo 2.1: Polimorfizm deneyleri için toplanan zeytin eřitleri.

1. <i>Olea europaea</i> cv. Hojiblanca
2. <i>Olea europaea</i> cv. Domat
3. <i>Olea europaea</i> cv. Cormona
4. <i>Olea europaea</i> cv. Hermandos
5. <i>Olea europaea</i> cv. UB10
6. <i>Olea europaea</i> cv. Negral
7. <i>Olea europaea</i> cv. Memecik
8. <i>Olea europaea</i> cv. akır
9. <i>Olea europaea</i> cv. Verdial
10. <i>Olea europaea</i> cv. UB1
11. <i>Olea europaea</i> cv. UB3
12. <i>Olea europaea</i> cv. Kiraz
13. <i>Olea europaea</i> cv. Gemlik
14. <i>Olea europaea</i> cv. Ascolana
15. <i>Olea europaea</i> cv. Leccino
16. <i>Olea europaea</i> cv. İzmır sofralık
17. <i>Olea europaea</i> cv. Uslu
18. <i>Olea europaea</i> cv. Ayvalık
19. <i>Olea europaea</i> cv. Erkence
20. <i>Olea europaea</i> cv. Memeli
21. <i>Olea europaea</i> cv. Samanlı
22. <i>Olea europaea</i> cv. Gordales
23. <i>Olea europaea</i> cv. Edincik su

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığını ve nükleotit dizisinin doğruluğunu kontrol etmek için PCR [45] deneyleri yapıldı.

PCR 25 μL 'lik total hacimde manuel ve mix (komponentlerin hazır karışımı) olarak iki çeşitte yapıldı. Manuel PCR için; 3 μL gDNA, 1 μL Forward primer, 1 μL Reverse primer, 2.5 μL NH_4SO_4 , 0.5 μL dNTP (A,T,G,S), 2 μL DMSO, 1.5 μL MgCl_2 , 13 μL dH_2O ve 0.5 μL Taq DNA polimeraz kullanıldı. Mix PCR için; 2 μL gDNA, 1 μL F primer, 1 μL R primer, 8.5 μL dH_2O ve 12.5 μL mix (OneTaq® Quick-Loader 2X MM w/Std Buffer) kullanıldı. Primerlerin çalıştığı sıcaklığa göre belirtilen PCR programı kullanıldı.



Şekil 2.3: PCR çalışma aşaması [45].

2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının OWL EASYCAST™ B2 sistemi kullanıldı. Elektroforozde kullanılan agaroz Lonza (Massachusetts, ABD; Katalog No: 50004) markasından, TAE tamponu için gerekli olan Tris-Base MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144) markasından, EDTA ise AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: A5097,0250), MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K35629118 606) markalarından temin edildi. 50X TAE hazırlamak için 242 gr Tris-Base, 57.1 mL Glacial asetik asit, 22 gr EDTA, 1L dH₂O karıştırıldı ve karışım otokavlandı. Agaroz jel elektrofrezinde kullanmak üzere 100 mL 50X'lik TAE, 5L dH₂O karıştırılarak 1X TAE hazırlandı. Bu tampona alternatif olarak 54 gr Tris-Base, 27,5 gr borik asit ve 20 mL 0.5 M'lık EDTA pH'ı 8 olacak şekilde 5X TBE tamponu hazırlandı. Bu tampon stok olarak kullanıldı. 200 mL 5X TBE'den alınarak üzerine 800 mL distile suyla tamamlandı ve 1X TBE hazırlandı. Fakat yürütme tamponu için 1X TBE'den 50 mL alınıp üzeri 50 mL distile suyla tamamlanarak 0.5 X TBE'ye seyreltilerek her defasında taze hazırlandı. PCR ürünlerini yürütmek için % 1.2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1.2 gr agaroz tartıldı, erlene konuldu ve üzerine 150 mL 1X TAE eklendi ve mikrodalgada 2 dakika kaynatıldı. Jel soğuyana kadar jel sistemi ve kullanılacak taraklar saf su ile yıkandı. Jel ılık hale geldiğinde üzerine 1.5 µL EtBr (Etüdyum bromür) eklendi ve 1-2 dakika sonra tarakları takılmış olan jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleşip örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluştuktan sonra taraklar çıkarıldı. Sonrasında jelin üzerini kaplayacak şekilde tanka 1X TAE eklendi. İlk kuyucuğa DNA standardı olan Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Katalog No: #SM1333) firmasının GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder ready-to use 6 µL marker yüklendi. Mix ile yapılan PCR sonucu elde edilen ürünlerden boya ile karıştırılmadan 5 µL, manuel PCR sonucu elde edilen ürünlerden ise 1 µL Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) Waltham, Massachusetts, ABD Katalog No: R021) ile karıştırıldıktan sonra 5 µL yüklendi. Örnekler 140 volt, 200 amper 35 dakikada yürütüldü. Yürütülen örnekler UV transillüminatöründe görüntülendi ve görüntü kaydedildi.



Şekil 2.4: Agoroz jel hazırlama aparatları

2.6 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

UPK184 ve UPK195 kodlu genlerimizin zeytin çeşitleri arasında polimorfizm gösterip göstermediğini anlamak için polimorfizm deneyleri kuruldu. Bunun için öncelikle polimorfizm amacıyla toplanan zeytin yaprak örneklerinden QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının DNeasy® Plant Mini Kiti (Katalog No: 69104) kullanılarak gDNA izolasyonu öncelikle yapılmak üzere şu şekilde gerçekleştirildi: -80 °C’de sıvı azot içerisinde saklanan yaprak örnekleri steril bir havanda üzerine tekrar sıvı azot eklenerek tokmak ile toz haline getirildi ve ependorfa alındı. Üzerine 400 µL AP1 tampon ve 4 µL RNase A eklendi. Vorteks yapılarak karıştırıldı. Daha sonra uygun ortam sağlanarak, 65 °C’de 10 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon devam ederken karışımın birbirilerine geçmesi için ependorf 2-3 kez alt üst edildi. 130 µL P3 tampon ilave edildi, pipetajla karıştırıldı ve 5 dk buzda inkübasyona bırakıldı. Ardından 14000 rpm’de +4 °C’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant mikropipet yardımı ile QIAshredder Mini Spin kolona (lila kolon) aktarıldı. Kolana aktarılan süpernat 14000 rpm’de +4 °C’de 2 dk santrifüj yapıldı. Kolon atıldı ve supernatant mikropipet ile yeni bir ependorfa alındı. Üzerine

süpernatantın 1.5 katı kadar AW1 tampon eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Bu karışımın 650 µL 'si DNeasy Mini Spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve karışımın geriye kalanı da DNeasy Mini Spin kolona aktarıldı ve 8000rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. Kolona 500 µL AW2 tampon eklendi. 14000 rpm'de +4 °C'de 2 dk santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve kolona 100 µL AE tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında beklendi. 8000 rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bütün bu işlemlerden geçildikten sonra elde edilen gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılmak üzere ; UPK184 ve UPK195 genleri için özel tasarlanan primerler ile birlikte kullanılarak PCR [27] yapıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüledi. Görüntüleme sonucu markera göre olması gereken büyüklükte tek ve parlak bant veren PCR ürünü Ligand Biyoteknoloji ticari firmasına dizilemeye gönderildi. Elimize ulaşan dizileme sonuçları BioEdit [28] programı kullanılarak hizalandı ve polimorfik bölge saptaması yapıldı. Sonrasında Phylogeny.fr (phylogeny.lirmm.fr) programı ile filogenetik ağaç dizayn edildi.

2.7 RNA İzolasyonu

Zeytinin yaprak, meyve, çiçek, sürgün, tomurcuk ve pedisel organlarından QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının RNeasy® Plant Mini kiti (Katalog No: 74904) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu şu şekilde yapıldı; öncelikle 450 µL RLF ve 5 µL β-merkaptetanol karıştırılarak lizis tampon hazırlandı. Sonra zeytinin ilgili bölümlerindeki örnekler hiç sıvı azot bitmeden havanda ezildi. Sıvı azotla birlikte ependorfa alındı ve ependorfun kapağı açık bırakıldı. Üzerine lizis tampon eklendi. Sonrasında bu karışım kolona aktarıldı ve 14000 rpm'de 2 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolon atıldı ve kolonun altındaki tüpte bulunan karışımın yarısı kadar etanol eklendi. Daha iyi karışmaları için pipetaj yapıldı ve hemen başka bir kolona aktarıldı. 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve kolonun üzerine 700 µL RW1 tampon eklendi. 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve kolonun üzerine 500 µL RPE eklendi. Tekrar 10000 rpm'de 1

dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Bu sefer 10000 rpm'de 2 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bunun akabinde temiz bir tüpe kolon yerleştirildi ve 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Sonrasında kolona 50 µL RNase free water eklendi ve 14000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bunun sonucunda 1. Elüsyon elde edilmiş oldu. Kolon başka bir tüpe aktarıldı ve yine 50 µL RNase free water eklendi ve 14000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bunun sonucunda ise 2. Elüsyon elde edilmiş oldu.

2.8 Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) [29] için RNA'dan Fermentas (Vinius, Lithuania) firmasının RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kiti (Katalog No: K163) kullanım kılavuzu kullanılarak cDNA sentezi yapıldı.

cDNA sentezi şu şekilde gerçekleştirildi: Bir ependorfa 5 µL RNA kondu. Üzerine 1 µL Oligo dT, 6 µL DEPC su eklendi ve 14000 rpm'de 3-5 sn +4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj yapıldı. 70°C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Sonrasında bir süre buzda bekletildi ve bu aşamadan sonra buzda çalışıldı. İnkübe edilen karışıma 4 µL 5X tampon, 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL dNTP eklendi. 14000 rpm'de 3-5 sn +4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj yapıldı. 37°C'de 5 inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışıma 1 µL reverstranskriptaz eklendi ve 42 °C'de 60dk inkübasyon ve son olarak 70 °C'de 10 dakika inkübasyon yapıldı.

2.9 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

UPK184 ve UPK195 kodlu genlerimizin zeytinin hangi organında, ne zaman ve ne kadar sentezlendiğini tespit edebilmek için RT-PCR [29] yapıldı. RT-PCR için BIONEER (Kore) firmasının AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix kiti (Katalog No: K-6210) kullanıldı.

RT-PCR'da UPK 184 ve UPK 195 kodlu genlerin zeytinde ne kadar sentezlendiği tespit edildi. RT-PCR [46] yapmak için ; 1 µL cDNA, 0.5 µL RT primer F, 0.5 µL RT primer R, 18 µL DEPC su kullanıldı.

RT-PCR [46] sonuçları Microsoft Excel'e aktarıldı ve gerekli hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar doğrultusunda grafik oluşturuldu ve yorumlandı.

2.10 Klonlama ve Transformasyon

Genin zeytindeki işlevini belirlemek için geni protein olarak üretmek gerekir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle geni bir vektöre klonlamak, vektöre klonlanan geni bakteriye aktarmak, bakteriyi uygun şartlarda protein sentezi yapabilecek kapasiteye kadar büyütmek gerekmektedir. Bu nedenle bir dizi deneyler yapılarak klonlama ve transformasyon yapıldı.

2.10.1 Klonlama İçin Primer Dizayını

Klonlama öncesinde içinde hem vektörün gen dizisinin bir kısmını hem de UPK184 ve UPK195 kodlu gen dizisinin bir kısmını bulunduran bir çift primer tasarlandı (Tablo) ve Macrogen firmasından temin edildi.

Tablo 2.2: UPK 184 için vektörlere klonlamak için hazırlanan primerler.

Primerler	Nükleotit Dizileri (5'-3')	Tm Derecesi
UPK 184-F	GGTGATGATGATGACAAGATGATTTATCCTGGGT TTTATTA	57.86
UPK 184-R	GGAGATGGGAAGTCATTACTTTGCCCGAGTCGTC TGATGAC	59.6

Tablo 2.3: UPK 195 geni için vektörlere klonlama amacıyla hazırlanan primerler.

Primerler	Nükleotit Dizileri (5'-3')	Tm Derecesi
UPK 195-F	GGTGATGATGATGACAAGATGCCATCTTTGTAC AAAAGCAG	59.86
UPK 195-R	GGTGATGATGATGACAAGATGCCATCTTTGTAC AAAAGCAG	60.88

2.10.2 Jelden Kazanım

Vektörün geni içine alabilmesi için ortamda sadece istenilen gen olmalıdır. Bu nedenle klonlama için tasarlanan primerler ile kurulan PCR [45] sonucu elde edilen üründen saf/pürifiye DNA elde etmek gerekir. Bunun için Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının GeneJET Gel Extarction kiti (Katalog No: K0691) kullanım kılavuzu kullanılarak jelden kazanım yapıldı.

Jelden kazanım için öncelikle tasarlanan primer ile zeytin meyve cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak total hacmi 50µL olan bir PCR [45] kuruldu. Kalıp olarak meyve cDNA'sı kullanılmasının nedeni geninin RT-PCR [46] sonucunda en çok meyvede sentezlendiğinin bulunmasıdır. PCR ürününden 5µL kuyucuğa yüklenerek agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntülendi. Beklenen yerde tek ve parlak bant veren PCR ürününün tamamı agaroz jel elektroforezinde tekrar yürütüldü ve görüntülendi. Görüntüledikten sonra örneğin yüklü olduğu kuyucuk UV ışık altında kesildi ve bir ependorfa konuldu. Sonra üzerine 350 µL Binding tampon eklendi ve 55 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe olan karışımdan 800µL kolona konur ve 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı döküldü ve kolona 100µL Binding tampon eklendi. Yine 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.

Kolon yeni bir tüpe kondu ve kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı döküldü ve kolona hiçbir şey eklenmeden tekrar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra kolona 50µL Elüsyon tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Saf/ pürifiye DNA elde edildi.

Klonlama ve transformasyon aşamasına geçmeden önce bütün malzemelerin hazır halde bulunması gerekir. Çünkü klonlama aşamasından hemen sonra hiç beklemeden transformasyon aşamasına geçilir ve yine hemen sonra inkübasyon aşamasına geçilmelidir.

2.10.3 PCR Pürifikasyonu

Pürifiye DNA eldesi için jelden kazanım metoduna alternatif olarak Macherey-Nagel (Germany) firmasının NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Kat. No: 1506/005) kitinin prosedürü kullanılarak PCR pürifikasyonu yapılmıştır.

Öncelikle 50 µL total hacimde hazırlanan PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İstenilen yerde bant gösteren PCR ürününe 55 µL dH₂O ilave edildi. toplam hacim 100 µL olarak ayarlandı. Üzerine 200 µL NT1(Bağlanma tamponu) ilave edildi ve bu karışım kitin içindeki kolona yüklendi. 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı ve kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. Kolona 700 µL NT3 (Yıkama tamponu) eklendi ve 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve yine kolona 700µL NT3 (Yıkama tamponu) eklendi ve 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. kolona hiçbir şey ilave edilmeden 11000 rpm'de 1 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüp atıldı ve kolon yeni bir tüpe koyuldu. Kolona 30 µL NE (Elüsyon tamponu) konuldu. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 11000 rpm'de 1 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Bu sefer kolon atıldı tüpte kalan sıvı pürifiye DNA olarak -20 °C'de saklandı.

2.10.4 Ampisilin Hazırlama (50 mg/mL)

Mutasyona uğramış ya da değiştirilmiş hücreleri ampisilin direnci aracılığıyla ayırmak için kullanılır. Bu nedenle hazırlanan besiyerleri ampisilinli olmalıdır. Sigma Aldrich firmasının (St. Louis, Missouri, ABD) ampicillin sodyum tuzundan (Kat. No: A9518-5G) (ampicillin sodium salt) 0.25 gr bir falkona alındı ve 5 mL saf suda çözüldü. Sonrasında steril bir filtreden geçirilerek ependorflara paylaştırıldı. -20 °C' de saklandı.

2.10.5 LB Agar ve LB Broth Hazırlama

Mikroorganizmaların ya da hücrelerin büyüme ya da kültür ortamı katı ya da sıvı olabilir. LB (Luria – Bertani) broth büyüme LB (Luria – Bertani) agar ise kültür için kullanılmaktadır.

LB agar hazırlanışında Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının LB Agarı (Katalog No: BP1425-500) kullanıldı. 4 gr LB agar ve 100 mL dH₂O karıştırıldıktan sonra otoklavda steril hale getirildi. Otoklavdan sonra soğumaya bırakıldı ve ılıyınca üzerine 100 µL ampisilin eklendi. Petrilere döküldü.

LB broth için 10 gr Triptone (Conda; Kat. No: 1612,00), 5 gr Yeast Extract (Conda; Kat. No: 1702,00) ve 5 gr Sodyum klorid (Chem Cruz; Kat. No: sc-203274A) tartıldı ve üzeri 1 L saf su ile tamamlandı. ardından otoklavlanarak steril edildi. Bu işlemden sonra soğuyunca +4 °C'ye kaldırılarak saklandı.

2.10.6 Kompetan Hücre Hazırlama

E.coli DH10B, *E. coli* BL21 bakteri suşları tek koloni elde edebilmek için LB agara [amp(-)] ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tek koloni seçilip 5 mL'lik LB brotha [amp(-)] aktarıldı ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 80 mL'lik LB brotha 2 mL önkültürden eklendi. OD (canlı hücre sayısı) 0.2 olana kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. OD 0.2 olunca 1M MgCl₂'den 1.6 mL ve 1M glikozdan 888µL eklendi. OD 0.5 oluncaya kadar

37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona devam edildi. OD 0.5 olunca buz içinde +4 °C'de buzdolabına kaldırıldı ve 2 sa. bekletildi. Bekleme aşamasında pH 5.5'te 23 mL 1M CaCl₂, 17 mL 1M MnCl₂ ve 10 mL 1M NaAc karıştırılarak 50 mL'lik tritalasyon tampon hazırlandı. Bekleme süresi bittikten sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pellet 40 mL tritalasyon tamponda çözüldü. Pellet çözülünce 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hiçbir şey ekmeden tekrar 5000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Pellet 3,4 mL tritalasyon tampon ve 0.6 mL % 15'lik gliserol içeren 4 mL'lik tritalasyon tamponda çözüldü. Her bir ependorfa 50 µL dağıtıldı. - 80 °C'de muhafaza edildi.

2.10.7 Klonlama

Klonlama için Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının aLICator LIC Cloning and Expression kiti (Katalog No: K1251) kullanıldı ve klonlama kullanım kılavuzuna uygun yapıldı.

Bunun için bir ependorfa 7µL pürifiye DNA, 2µL LIC tampon, 1µL T4 DNA Polimeraz eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 0,6µL EDTA ve kullanılacak olan vektörden (pLATE 51) [37] 1µL ilave edildi.

2.10.8 Çoğaltma Suşuna Transformasyon

Transformasyon için *E. coli*'nin bir çoğaltma suşu olan DH10B kullanıldı. Bunun için yaklaşık 13 µL'lik hazırlanan vektör - pürifiye DNA karışımı -80 °C'de ependorfta muhafaza edilen DH10B'ye aktarıldı. 30 dk buzda bekletildi. Sonra ısı şoku için 42 °C'de 90 sn bekletildi. Tekrar 1-2 dk buzda bekletildi. Üzerine 450 µL LB Broth yavaş yavaş eklendi ve 37 °C'de 1 sa 30 dk çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra 14000 rpm'de 1-2 dk santrifüj yapıldı. Yaklaşık 400 µL kadar sıvı atıldı. Kalan sıvı ile pellet pipetajyoluyla iyice karıştırıldı ve hazırlanan LB agara yayma ekim yöntemiyle ekildi. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.10.9 Koloni PCR ve Koloni Tarama

Bu işlemin amacı büyüyen kolonileri daha çok büyütme ve protein sentezi yapabilecek duruma getirmektir. Bunun için 1 gece inkübasyon sonrası büyüyen bakteri kolonileri tarandı. Tek tek büyümüş olan kolonilerden 10 tanesi seçildi. Ayrı ayrı PCR tüplerine alındı ve üzerlerine 10'ar µL saf su eklendi. Hazırlanmış olan sulandırma örneklerinden 1 µL alınıp kalıp olarak kullanıldı ve Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının aLICator LIC Cloning and Expression kiti (Katalog No: K1251) primerleri ile PCR [27] kuruldu. Örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüledi. Görüntüleme sonucunda tek ve daha parlak bant veren PCR ürünü Ligand Biyoteknoloji ticari firmasına dizilemeye gönderildi. Dizileme sonucu içinde gen tarandı yani vektör geni içine almış mı ve DH10B suşuna aktarım gerçekleşmiş mi diye kontrol edildi. Dizilemeye gönderilen PCR ürünü kalıp olarak kullanılan sulandırma örneğinin tamamı, içinde 10 mL LB broth, 10 µL ampsilin bulunan 50 mL'lik falkona eklendi. Falkonun ağzı hafif açık kalacak şekilde çalkalamalı inkübatöre yatay olarak kondu. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.10.10 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Fermentas (Litvanya) firmasının GeneJET Plasmid Miniprep kiti (Katalog No: K0502) kullanıldı.

Büyütülmüş olan koloni 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Sıvı kısım 4 ependorfa paylaştırıldı ve üzerine 150 µL %100 gliserol eklendi. -80°C'de muhafaza edildi.

Falkonda kalan pelletin üzerine 250 µL Resuspension solution eklendi ve pipetaj yoluyla iyice karıştırıldı. Sonra 250 µL lizis solüsyon eklendi ve yavaş yavaş pipetaj yoluyla karıştırıldı. Bu karışım ependorfa aktarıldı. Üzerine 350 µL neutralization solution eklendi ve 3-5 kez alt üst edildi. Sonra 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı kısım kolona aktarıldı ve tekrar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı atıldı ve kolona 500 µL Wash solution eklendi, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Yine kolonun altındaki sıvı atıldı ve

kolona 500 µL Wash solution eklendi, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı atıldı ve kolona bir şey eklenmeden 14000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolon boş bir tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µL elüsyon tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. 1. Elüsyon elde edildi. Sonra kolon başka tüpe aktarıldı ve bu sefer üzerine 20 µL elüsyon tampon eklendi. 14000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. 2. Elüsyon elde edildi.

2.10.11 Spektrometre İle Plazmit DNA Miktar Ölçümü

Ölçüm için 96 gözlü plastik hücre kültürü plakası (96 well plastic cell culture plate) kullanıldı. Plakadaki bir kuyucuğa 195 µL saf su kondu ve üzerine 5 µL izole plazmit eklendi. Diğer bir kuyucuğa sadece 200 µL saf su (KÖR) kondu. Spektrometreye hücre kültür plakası yerleştirildi ve ölçüm yapıldı. Miktar hesaplaması aşağıdaki gibi yapıldı.

$$A(\text{ng} / \mu\text{L}) = \text{ölçüm sonucu} - \text{Kör'ün sonucu}$$

2.10.12 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu

Bunun için *E.coli*'nin ekspresyon suşu BL21 kullanıldı. 3 - 5 µL izole edilen plazmit aktarıldı. Çoğaltma suşuna transformasyon aşamasında yapılan işlemler sırayla uygulandı. Öncelikle 30 dk buzda, sonra ısı şoku için 42 °C’de 90 sn, ardından birkaç dakika buzda bekletildi. Üzerine 450 µL LB broth yavaş yavaş eklendi. 37 °C’de 1 sa 30 dk çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra birkaç dakika 14000 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatanttan yaklaşık 400 µL döküldü. Kalan kısım ile pellet pipetaj yoluyla iyice karıştırıldı ve LB agara yayma ekim yoluyla ekim yapıldı. 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.11 Hücrelerin İndüklenmesi

Bir gece inkübasyona bırakılan hücrelerin üremesi sonucunda tek bir koloni seçildi ve içinde 10 mL LB broth ve 10 µL ampisilin [Sigma (Kat. No: A9518-5G)] bulunan 50 mL'lik falkona eklendi. Falkonun ağzı hafif açık kalacak şekilde yatay olarak çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi. 37 °C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Üreme sonucunda bir erlene 90 mL LB broth, 12.5 µL ampisilin [Sigma (Kat. No: A9518-5G)] ve 10 mL 1 gece inkübasyona bırakılmış önkültür eklendi. OD 0.6 oluncaya kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. OD 0.6 olduğunda üzerine 1 mL laktozun kükürtlü bir analogu olan IPTG (İsopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid) [Thermo Scientific (Lithuania; Kat. No: R0392)] eklenerek indüklendi. 37 °C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

2.12 IPTG Hazırlama

IPTG (İsopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid) laktozun kükürtlü bir analogu olup ortamda yeterli sayıda canlı hücre bulunduğu anda ortama eklenerek protein sentezini başlatır. 0.24 gr Thermo Scientific (Lithuania; Kat. No: R0392) firmasından temin edilen IPTG bir falkona eklendi ve üzerine 10 mL saf su ilave edildi. Saf suda çözülen IPTG steril bir filtreden geçirildi ve ependorflara paylaştırıldı. -20 °C'de saklandı.

2.13 Hücreleri Çöktürme ve Lizis

İndükleme işleminden sonra protein üreten hücreler çöktürülür, lizis edilir ve üretilen protein hücre artıklarından uzaklaştırılır.

2.13.1 Hücreleri Çöktürme

Çöktürme işlemi için hücreler 50 mL'lik falkonlara paylaştırıldı. 4000 rpm'de 20 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı atıldı. Pellet ise lizis işleminin hazırlıkları yapılırken -20 °C'de saklandı.

2.13.2 Protamin Sülfat Hazırlama

1 mL'lik total hacim için 0.03 gr protamin sülfat (Sigma; Kat No: 041M1437V) tartıldı. Üzeri otoklavlı su ile tamamlandı. Vorteks ve pipetaj yoluyla çözüldü.

2.13.3 PMSF Hazırlama

PMSF (Fenilmetilsülfonil florid) bir serin proteaz inhibitörüdür. Hücre parçalanmasından yani lizisinden sonra ilgilenilen proteini sindiren proteazları etkisiz hale getirmek için kullanılır. Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD, KatNo: P7626) firmasından temin edilen PMSF'den 17,4 gr bir falkona eklendi ve 10 mL izopropanol ile çözüldü. -20 °C'de saklandı.

2.13.4 5 mL'lik Lizozim Hazırlama

1,4-beta-bağlarının hidrolizini katalize ederek, bakteriyel hücre duvarına zarar verir. 0.25 gr lizozim (Sigma ;Kat No: SLBO8654V) tartıldı ve total hacim 5 mL olacak şekilde üzeri otoklavlı su ile tamamlandı. Sonra 1'er mL ependorflara paylaştırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C'de saklandı.

2.13.5 Lizis

Lizis hazırlıkları yapılırken -20 °C’de saklanan örnekler çıkarıldı ve pelletin üzerine 2 mL lizis tampon [QIAGEN(Venlo, Hollanda); Kat. No: 41832775] eklendi. İyice çözüldü. Sonra 100 µL PMSF eklendi. Pipetaj ya da vorteks yoluyla karıştırıldı. 125 µL lizozim eklendi. Pipetaj ya da vorteks yoluyla karıştırıldı. 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 1 mL protamin sülfat eklendi ve 10 dk buzda bekletildi. 2 ependorfa örnek paylaştırıldı ve 14000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant başka bir ependorfa aktarıldı. Protein elde edildi. -20 °C’de saklandı.

Bu lizis yöntemine alternatif olarak başka bir lizis yapılmıştır: 1 pellet için 2 mL buffer A ve 20 µL PMSF karışımı hazırlandı ve -20 °C’de saklanan pellet bu karışım ile çözüldü. 1 spatül katı lizozim bu karışım ile çözülen örneğin tam ortasında döküldü ve çok kısa bir vorteks yapıldı. Bu aşamada lizozim yerine ultrasonik banyo kullanılarak da parçalama işlemi yapıldı. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu esnada 1 mL’lik protamin sülfat hazırlandı (1 mL için 0.03 gr protamin sülfat). Bekleme süresi bittikten sonra bu karışımın üzerine 200 µL protamin sülfat eklendi ve 15 dakika buzda bekletildi. sonrasında artık sümüksü bir yapı kazanan karışım 2 ependorfa paylaştırılarak 14000 rpm’de 5 dakika +4 °C’de santrifüj yapıldı. Protein elde edildi.

2.14 Buffer A Hazırlama

50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0.5 mM TCEP pH 7.5 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

2.15 Protein Saflaştırma

Elde edilen protein sonrasında şırınga ile filtreden geçirilerek 15 mL’lik falkona aktarıldı ve üzerine "START" yazıldı. Falkonda bir miktar çözelti bırakılarak bu çözelti bazik ponza üzerine eklendi. Bazik ponza ile çözelti iyice çözüldü ve 60 dakika yatay bir şekilde buzda bekletildi. Arada alt üst edildi. Sonrasında 8000 rpm’de +4 °C’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant başka bir 15 mL’lik falkona

alınarak üzerine "FT" (flow through) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W1" (wash) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W2" (wash) yazıldı. Yine kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W3" (wash) yazıldı. Sonrasında kalan pellet 1 mL buffer B ile çözüldü ve 5 dakika yatay bir şekilde buzda bekletildi. 5 dakikanın sonunda 8000 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "E1" (elüsyon) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer B ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "E2" (elüsyon) yazıldı.

Bu saflaştırma metoduna alternatif olarak Ni-NTA kolon (Nikel kolon) kullanılarak saflaştırma yapıldı. 1 pellet 5 mL Buffer A ve 50 µL PMSF karışımı ile çözüldü ve ardından ultrasonik banyoda 5 dakika parçalamaya bırakıldı. Ardından çözelti ependorflara paylaştırılarak 14000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant filtreden geçirilerek 15 mL'lik falkona alındı ve üzerine "START" yazıldı. Eş zamanlı olarak bazik ponza tozu Buffer A ile Ni-NTA kolonda yıkandı. Üzerine "START" yazılan çözelti bazik ponzanın üzerine eklendi ve Ni-NTA kolonda 10 dakika bekletildi. 10 dakikanın sonunda kolondan geçirilene süzüntü başka bir falkona alındı ve üzerine "FT" yazıldı. Ardından 5 mL Buffer A bazik ponzanın üzerine eklendi ve hiç beklemeden Ni-NTA kolondan süzüntü başka bir ependorfa alındı, üzerine "W1" yazıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve falkonun üzerine "W2" yazıldı. Bu işlemin sonunda bazik ponzanın üzerine 2mL Buffer B eklendi, 2 dakika beklendi ve süzüntü başka bir falkona alındı, üzerine "E1" yazıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve falkonun üzerine "E2" yazıldı.

2.16 Tampon B Hazırlama

50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, 0.5 mM TCEP ve %5 gliserol pH 7.5 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

2.17 SDS Page Jel Elektrofözezi ve Western Blot

SDS Page jel elektrofözezi (Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Jel Elektrofözezi) [47]; SDS ile denatüre olan proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre [48] poliakrilamid jelde ayrılması prensibine dayanır. Western blot [49] ise bir protein solüsyonunda aranılan proteini özel antikörler ile tespit etmek için kullanılır. Bu işlemler için BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD) firmasının Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer kit, Nitrocellulose (Kat. No: 170-4270) kullanıldı.

2.17.1 %15'lik Ayırma Jeli Hazırlama

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılır. Jel 2.5 mL Lower tampon, 3.75 mL Bisakrilamid [Fisher BioReagents® (New Jersey, USA; Kat. No: 105199)], 3.75 mL otoklavlı su, 100 µL % 10'luk amonyum persülfat (APS) [Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Kat. No: 1007840)], 10 µL Tetrametilendiamin (TEMED) [Fermentas(Vinius, Lithuania; Kat. No:111383)] karıştırılarak hazırlandı.

Bisakrilamid iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Bisakrilamid miktarı arttıkça jelde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik artar ve daha kolay yıkanır. APS polimerleşmeyi başlatırken TEMED ise bu olayı katalizler. Bu nedenle jel dökülmeden hemen önce APS ve TEMED eklendi. Jel döküldükten sonra hava kabarcıklarını gidermek ve jeli düzeltmek için jelin üzerine bir miktar izopropanol döküldü. Jel donduktan sonra izopropanol kurutma kağıdı veya saf su ile uzaklaştırıldı.

2.17.2 Lower Tampon Hazırlama

1 L'lik (pH 8.8) lower (ayırıcı) tampon için 19.8 gr Tris [MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144)], 0.4 gr SDS [AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: 151-21-3)] karıştırıldı. Üzeri otoklavlı su ile tamamlandı.

2.17.3 %10'luk APS Hazırlama

Polimerizasyon olayını başlatır. 0.1 gr APS (Amonyum persülfat) ve 1 mL otoklavlı su ile hazırlandı.

2.17.4 Yığma Jeli Hazırlama

Moleküler ağırlıkları farklı olan proteinleri ayırma jeline kadar yığar. Yığma jeli 2.5 mL Upper tampon, 1.25 mL Bisakrilamid [Fisher BioReagents® (New Jersey, USA; Kat. No: 105199)], 6.14 mL otoklavlı su, 100 µL % 10'luk APS [Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Kat. No: 1007840)], 10 µL TEMED [Fermentas(Vinius, Lithuania; Kat. No: 111383)] karıştırılarak hazırlandı. Jel döküldükten sonra kuyucukların oluşması için tarak takıldı.

2.17.5 Üst Tampon Hazırlama

1 L'lik Upper tampon için 6.6 gr Tris [MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144)], 0.4 gr SDS [AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: 151-21-3)] karıştırıldı ve üzeri otoklavlı su ile tamamlandı.

2.17.6 Yürütme Tamponu Hazırlama

1 L'lik yürütme tamponu için 100 mL 10X Tris-Glisin SDS tampon [BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD; Kat. No:161-0732)] ve 900 mL otoklavlı su kullanıldı.

2.17.7 Örnek Hazırlama

25 µL'lik ya da 50 µL'lik örnek hazırlandı. 25 µL'lik örnek için 20 µL örnek, 5 µL boya karıştırıldı. 50 µL'lik örnek için ise; 45 µL örnek, 5 µL boya karıştırıldı. Örnek yükleme boyası [BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD) 4X Laemmli örnek tampon; Kat. No:161-0747] Betamerkaptoetanol (Sigma Kat. No: 125K0165) ile muamele edilip kullanıldı. Boya örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde hazırlandı. Örnekler boya ile karıştırıldıktan sonra 70°C'de 5 dk bekletildi.

SDS jel elektroforezi için Thermo Scientific (Lithuania) firmasının PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Katalog No: 26619) markerı kullanıldı. Hazırlanan örnekten 20 µL, markerdan 3 µL kuyucuğa yüklendi. Jel önce proteinlerin ayırma jeline kadar yığılması için 90 volta 20 dk, sonra proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için 120 volta 90 dk yürütüldü

2.17.8 Commasie Blue Boyama Tekniği

Bu boyama tekniği lizis işleminden sonra gerçekleştirildi. Yürütülen jel bir kaba kondu ve Commasie Blue ile boyandı. 25°C'de çalkalamalı inkübatörde 45 dk bekletildi. Boya önce su ile sonra SDS renk açma solüsyonu (75 mL asetik asit glisial, 50 mL metanol karıştırılarak üzeri dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı) ile yıkandı. Renk açma solüsyonu içinde 25°C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde bekletildi. UV transillüminatöründe moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler görüntülendi ve görüntü kaydedildi.

2.17.9 Gümüş Boyama Tekniği

Commasie Blue boyama yöntemine alternatif olarak protein saflaştırıldıktan sonra yapılan gümüş boyama tekniği uygulandı. Yürütülen jel 10 mL asetik asit, 40 mL etil alkol ve 50 mL dH₂O ile hazırlanan çözelti içinde 1 saat bekletildi. sonrasında jel dH₂O ile 1 gece yıkandı. Ertesi gün jel %0.02'lik sodyumtiyasilfat (0.04 gr Na₂S₂Ost, 200 mL dH₂O) içinde sadece 1 dakika tutuldu ve 3 kez 30 saniye dH₂O ile yıkandı. Sonrasında jel +4 °C'de soğuk %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisinde

(0.2 gr AgNO₃, 200 mL dH₂O ve 40 µL formaldehit) 20 dakika bekletildi. Jel tekrar 3 kez 30 saniye dH₂O ile yıkandı ve yıkanan jel yeni bir kaba alındı. 1 dakika dH₂O ile yıkandı. Jel %3 'lük sodyumkarbonat çözeltisinde (15 gr Na₂CO₃, 250 mL dH₂O ve 125 µL formaldehit) konuldu.

Çözelti sarı renk alınca yenisiyle değiştirildi ve bu işlem boyama belirgin olana kadar devam etti. Jel 20 saniye dH₂O ile yıkandı. Yıkandıktan sonra son işlem olarak jel %5 'lik asetik asit içinde 5 dakika bekletildi. %1'lik asetik asit içinde +4 °C'de saklandı.

2.18 Western Blot

SDS jel elektroforeziyle yürütülen jel transfer bufferla muamele edilmiş nitroselüloz membrana 1.3 A, 25 V 7 dakika BIORAD-Trans-Blot Turbo Transfer System ile transfer edildi. Transfer işlemine alternatif yöntem olarak öncelikle metanol ile aktive edilen sonrasında transfer bufferla muamele edilen PVDF membran kullanılarak 250 V, 90 A 24 saat +4 °C'de transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yıkama işlemleri için öncelikle 3 tekrarlı 10'ar dakika 1X TBS ile oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde yıkandı. Ardından 1 saat blocking tampon da çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Sonra tekrar 3 tekrarlı 10'ar dakika 1X TBS ile oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde yıkandı. 40 dakika çalkalamalı inkübatörde anti-bodyde bekletildi ve yine 3 tekrarlı 10'ar dakika 1X TBS ile oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde yıkandı. Son yıkamanın ardından antikora uygun bir substrat olan ECL içinde yaklaşık 1 dk bekletildikten sonra Fusion FX Vilber Lourmat ile membran görüntülendi ve görüntü kaydedildi.



Şekil 2.5: Western Blot hazırlama aşaması.

2.19 Primerlerin Tasarımı ve Sulandırılması

PCR [45] deneylerinde kullanılan spesifik primerler (Tablo 2.1) Primer3 Input Version 0.4.0 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) programı kullanılarak tasarlandı. Primerler Macrogenfirmasından konsantre halde temin edildi. Temin edilen primerler stok olarak saklamak için üzerinde yazan miktar kadar otoklavlı su ile sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden (100 reaksiyon için) 10 μ L ependorfa alındı üzeri 90 μ L saf su ile tamamlanarak PCR'da [45] kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

2.20 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama

Var yılı, yok yılı araştırmaları için ve zeytinin çeşitli organları üzerinde genimizi aramak, gerekli olan DNA ve RNA örneklerini elde etmek için Balıkesir, Altieylül İlçesi civarında yer alan iki ağaç daha önceden belirlendi ve bu ağaçlar üzerinden toplanan bitki dokularından DNA ve RNA izolasyonları yapıldı. Doku örnekleri meyve, yaprak, tomurcuk, çiçek ve polen olacak şekilde sıvı azotun içine atılarak toplandı.

3. BULGULAR

Çalışılan bu tezde zeytin Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geni karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgulara aşağıda yer verilmektedir

3.1 Bionformatik Analiz

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önceden oluşturulan cDNA kütüphanesinden temin edilen "UPK184" ve "UPK195" kodlu dizinin benzerlik gösterdiği nükleotit dizilerini saptamak için; NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [43] programının "nBLAST" (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren diziler her gen için ayrı ayrı tespit edildi. Daha sonra cDNA dizisinin BioEdit [44] programındaki "Sorted Six - Frame Translation" sekmesi ile açık okuma çerçevesi (ORF) belirlendi. Bulunan amino asit dizisine göre; NCBI veri tabanındaki BLAST [43] programının "pBLAST" (Protein Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla protein dizisine benzerlik gösterenlerin belirlenmesinin yanı sıra her iki dizi için en yakın benzerlik gösterdiği gen ailesi tespit edildi.

Tahmini UPK184 (mikrotübül ilişkili proteinler) ve UPK195 (Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz) dizisinin zeytin taslak genom ve cDNA klon kütüphanesindeki akrabaları ve kopyalarını bulabilmek için CLC Genomics Workbench 7 [50] programı kullanıldı.

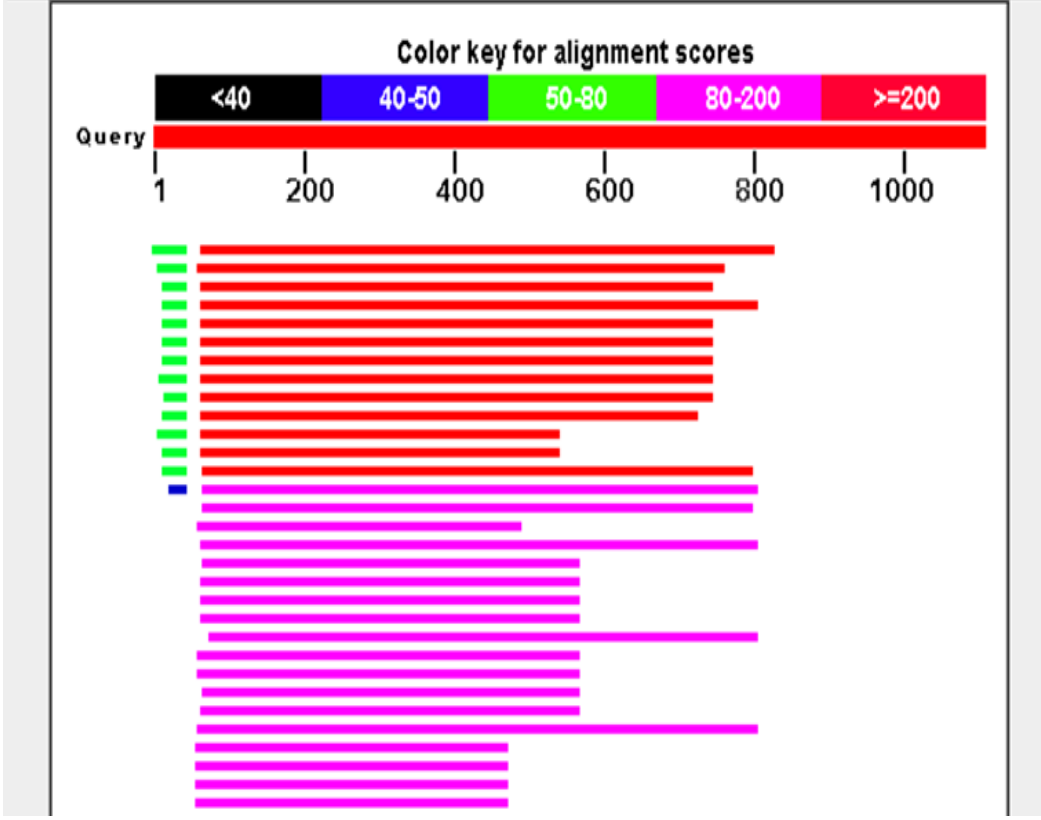
Mikrotübül ilişkili proteinin ve Glukoz-6-Fosfat-1-Epimerazın aktif bölgesini ve bu bölgenin özelliğini tespit etmek için NCBI veri tabanından CDD (Conversed Domain Database) programı kullanıldı. Bu proteinlerin olası üç boyutlu yapısı ve domain dizilerini belirlemek içinse Cn3D [51] programı kullanıldı.

MAP90 ve Glukoz-6-Fosfat-1-Epimerazın *cDNA* dizisinin doğruluğunu tespit etmek ve intron analizi yapmak için Ligand Biyoteknoloji ticari firmasından gelen dizileme sonuçları BioEdit [44] programında işlenip, hizalandı.

Tahmini gen dizilerinin transkripsiyon sonrası özelliklerini tespit etmek için ExPASy (www.expasy.org) [52] web sayfasındaki programlar kullanıldı. SOSUI programı ile genin tahmini hücre içi lokasyonu belirlendi.

3.1.1 Mikrotübül ilişkili proteinin (UPK 184) için Blast

Mikrotübül ilişkili protein geninin nükleotit dizileri NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [26] programının “nBLAST” (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren diziler her gen için ayrı ayrı tespit edildi. Aşağıdaki şekillerde görüldüğü gibi; *Solanum lycopersicum*(domates), *Nicotiana benthamiana*(tütün bitkisi), *Ricinus communis* (Hint yağı bitkisi) ve *Sesamum indicum* (susam) gibi canlılarla en çok benzeşme gösterdiği söylenilebilir.



Şekil 3.1: UPK 184 kodllu gen dizisinin BlastNCBI ' daki nükleotit blast sonuçları.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Sesamum indicum TBC1 domain family member 5 homolog A-like (LOC105173889). mRNA	403	403	68%	4e-108	72%	XM_011095792.1
PREDICTED: Sesamum indicum TBC1 domain family member 5 homolog A-like (LOC105161657). mRNA	338	338	63%	1e-88	71%	XM_011079423.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris uncharacterized LOC104240451 (LOC104240451). mRNA	315	315	61%	1e-81	71%	XM_009795294.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis uncharacterized LOC104093820 (LOC104093820). mRNA	313	313	66%	5e-81	70%	XM_009599633.1
Nicotiana benthamiana microtubule-associated protein (MAP90) mRNA, complete cds	309	309	61%	6e-80	71%	FJ914316.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum uncharacterized LOC101260951 (LOC101260951). mRNA	293	293	61%	5e-75	71%	XM_004242773.2
Solanum lycopersicum chromosome ch07, complete genome	293	293	61%	5e-75	71%	HG975519.1
PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102587117 (LOC102587117). mRNA	288	288	61%	2e-73	70%	XM_006361579.1
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1021CG03, HTC in leaf	284	284	61%	2e-72	70%	AK319241.1
Solanum pennellii chromosome ch07, complete genome	280	280	59%	3e-71	71%	HG975446.1
PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102604464 (LOC102604464). transcript variant X2, mRNA	219	219	43%	8e-53	71%	XM_006340471.1
PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102604464 (LOC102604464). transcript variant X1, mRNA	219	219	43%	8e-53	71%	XM_006340470.1
PREDICTED: Pinus x breitschneideri uncharacterized LOC103950447 (LOC103950447). mRNA	215	215	66%	1e-51	68%	XM_009361651.1

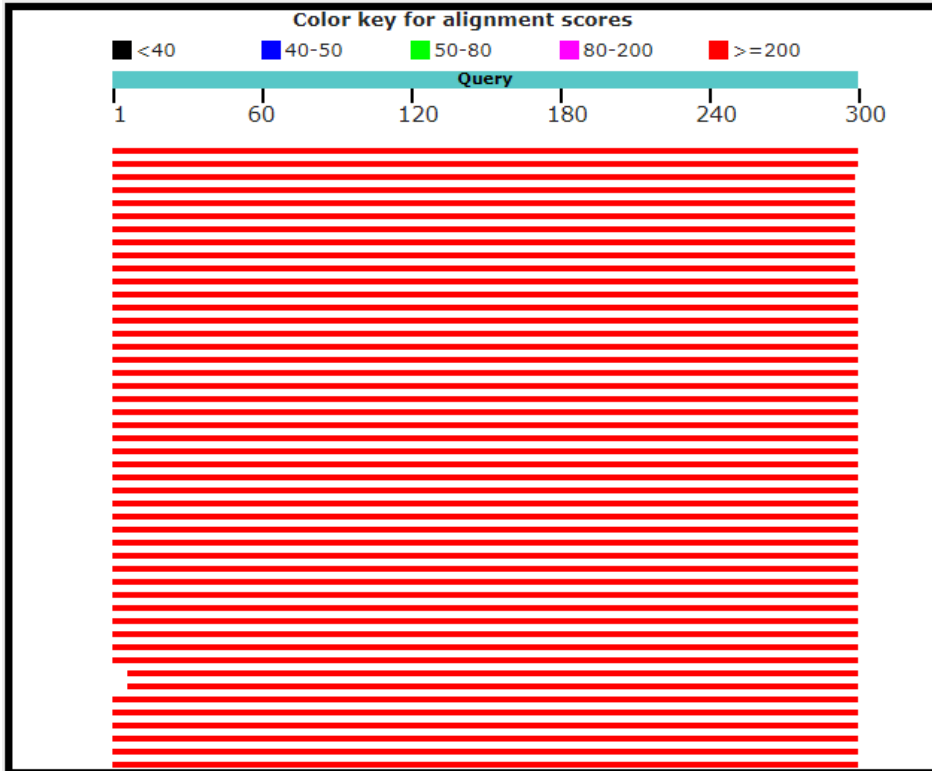
Şekil 3.2: UPK 184 kodlu genin benzerlik gösterdiği canlıların Blast sonuçları

UPK 184:
En yüksek benzeşme:
gb FJ914316.1 <i>Nicotiana benthamiana</i> microtubule-associated protein (MAP90) mRNA, complete cds Length=3204 Score = 226 bits (250), Expect = 8e-56 Identities = 314/435 (72%), Gaps = 16/435 (4%) Strand=Plus/Plus

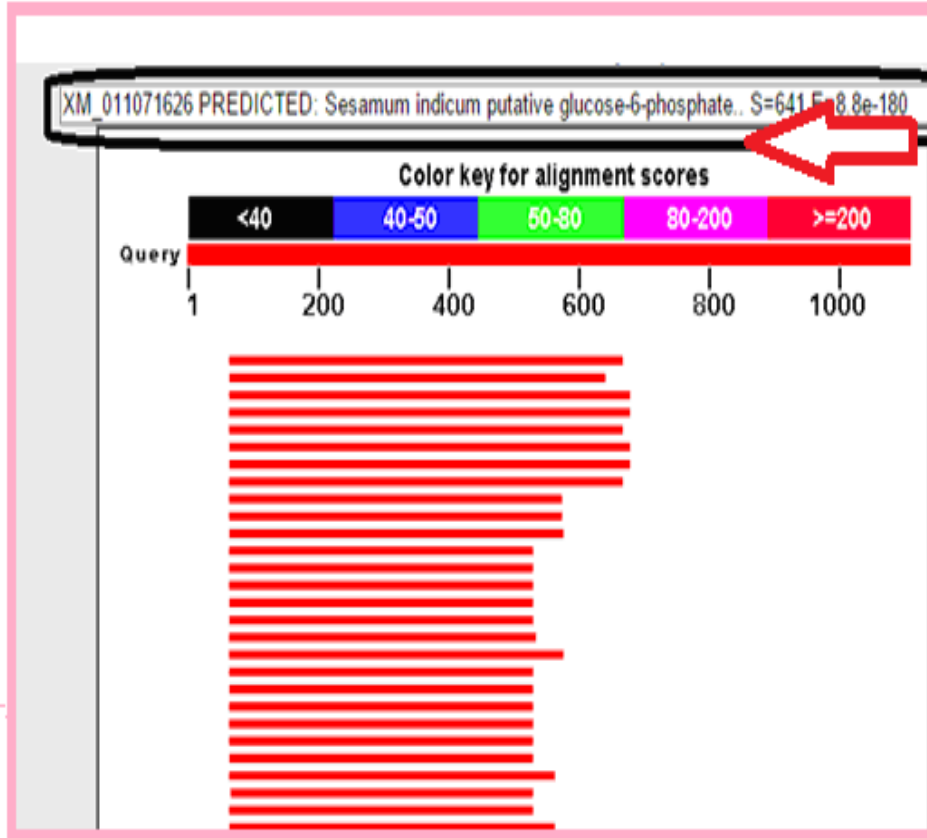
Şekil 3.3: UPK 184 kodlu genin en çok benzeşme gösterdiği canlı türü örneği.

3.1.2 Glukoz -6- Foafat-1-Epimeraz (UPK 195) için Blast

Mikrotübül ilişkili protein geni için yapılan aynı aşamalar glukoz-6fosfat-1-Epimeraz gen dizisi içinde yapıldı. Şöyleki; nükleotit dizileri NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [43] programının “nBLAST” (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren diziler her gen için ayrı ayrı tespit edilip; Ricinus communis (Hint yağı bitkisi) ve Sesamum indicum (susam) gibi canlılarla en çok benzeşme gösterdiği söylenilebilir.



Şekil 3.4: UPK 195 kodlu gen dizisi için Blast.



Şekil 3.5: UPK 195 gen dizisinin susam bitkisine benzerliği.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC105155706)	392	392	100%	3e-105	89%	XM_011071626.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC	365	365	100%	4e-97	87%	XM_017387410.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Helianthus annuus putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC110865543	360	360	99%	2e-95	87%	XM_022114824.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XM_018950406.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XM_018950405.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XR_001994249.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XR_001994248.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XM_018950404.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XM_018950403.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC108979686). tra	360	360	99%	2e-95	87%	XM_018950402.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Vigna radiata var. radiata putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC1067	356	356	100%	2e-94	86%	XM_014637317.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Vigna radiata var. radiata putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC1067	356	356	100%	2e-94	86%	XM_022778170.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Vigna radiata var. radiata putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC1067	356	356	100%	2e-94	86%	XM_022778169.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Vigna radiata var. radiata putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC1067	356	356	100%	2e-94	86%	XM_022778168.1

Şekil 3.6: UPK 195 kodlu gen dizisinin Blast sonucu en çok benzediği canlıların görüntüsü.

PREDICTED: *Sesamum indicum* putative glucose-6-phosphate 1-epimerase (LOC10515570)
Sequence ID: [reflXM_011071626.1](#) Length: 1822 Number of Matches: 1

Range 1: 703 to 1313 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
641 bits(710)	9e-180	517/614(84%)	18/614(2%)	Plus/Plus
Query 66	tttACATTTGCATATCATACCTATTTCTCTGTTTCAGATATCAGTGAAGTTCGAGTCGAA			125
Sbjct 703	TTTACATTTGCTTATCACACCTATTTCTCTGTTTCGATATCAGTGAAGTACGGGTGAA			762
Query 126	GGATTGGAAACTTTGGATTATCTTGATAATCTGCAGAACAAGCAGCGTTTTACTGAACAA			185
Sbjct 763	GGATTGGAGACACTGGATTATCTTGATAATCTGCAGAACAACAGCGATTTACTGAACAA			822
Query 186	GGGGATGCAATTACTTTTGAATCAGAAGTGGACAAAATATACCTCAGCACACCCACAAAG			245
Sbjct 823	GGGGATGCAATCACCTTCGAGTCAGAAGTGGATAAGATATATCTCAGCACGCCTACAAAG			882
Query 246	ATTGCGATCCTGGATCATGAAAAGAAACGGACATTTGTGATCCGTAAAGATGGGCTTCCT			305
Sbjct 883	ATTGCAATTCTGGACCACGAAAAGAAGCGAACATTTGTCAATCGTAAAGATGGTCTTCCT			942
Query 306	GATGCAGTTGTATGGAATCCTTGGGATAAGAAGGCAAAGGCAATGGCTGATTTTGGAGAT			365
Sbjct 943	GATGCCGTTGTCTGGAATCCTTGGGATAAGAAGGCAAAGGCAATGGCTGATTTTGGAGAT			1002


Şekil 3.7: UPK 195 gen dizisinin *Sesamum indicum* ile örtüştüğü nükleotit dizileri.

UPK 195:

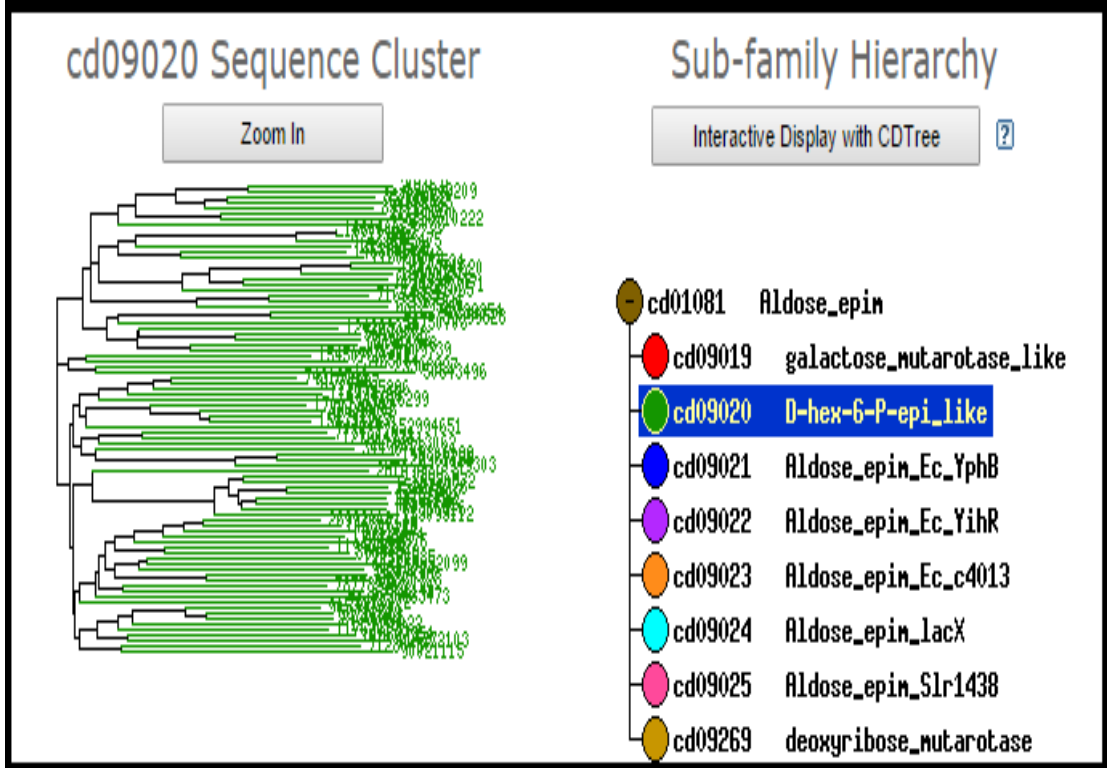
En yüksek benzeşme:

[reflXM_011071626.1](#) *Ricinus communis* aldose 1-epimerase, putative, mRNA
Length=726

[GENE ID: 8269030 RCOM_0121410](#) | aldose 1-epimerase, putative [*Ricinus communis*]
Score = 434 bits (480), Expect = 4e-118
Identities = 348/420 (83%), Gaps = 0/420 (0%)
Strand=Plus/Plus



Şekil 3.8: UPK 195 adlı gen dizisinin en yüksek benzeşme gösterdiği canlı.

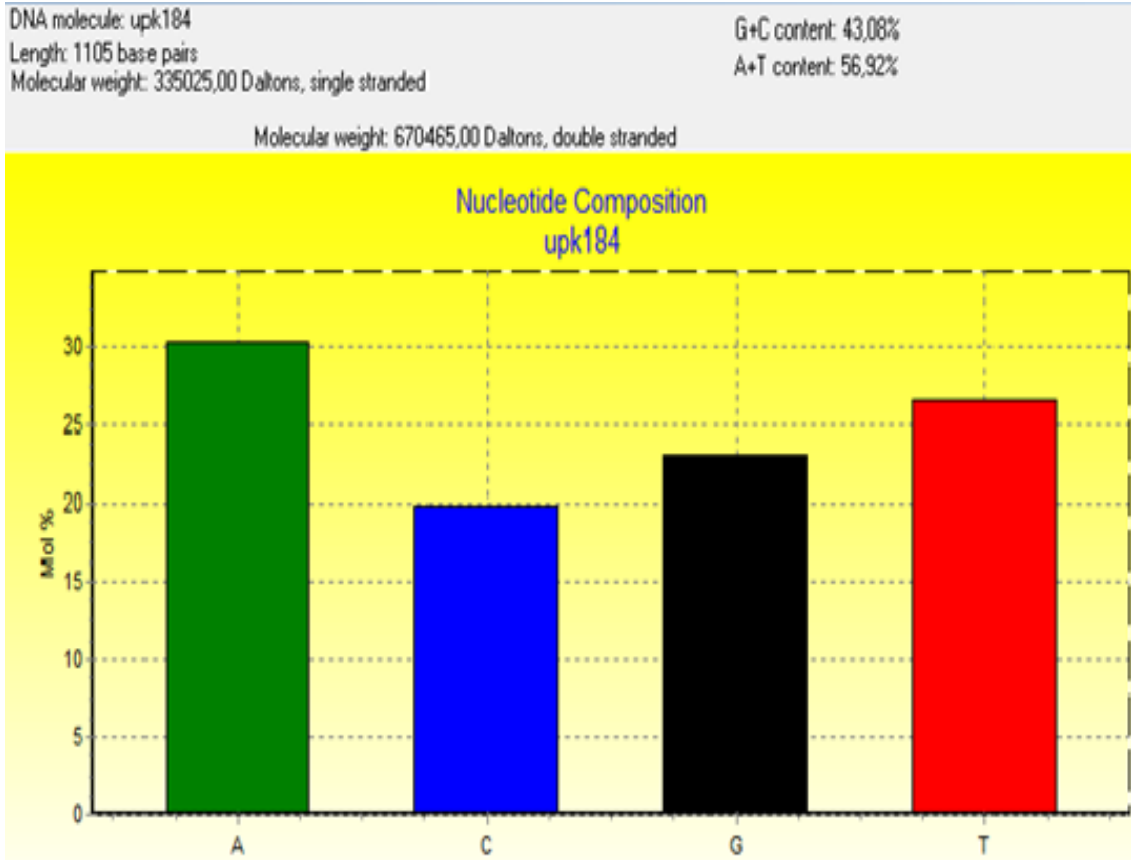


Şekil 3.9: Glikoz-6-1-Epimeraz enzimin yakın olduğu filogenetik diyagramı.

3.1.3 Mikrotübül İlişkili Proteinin için BioEdit Programı

Zeytin tahmini mikrotübül ilişkili protein geninin (UPK 184) cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçları aşağıdaki şekilde 3:15 'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre 1105 nükleotit uzunluğundaki UPK184 kodlu dizinin %43.08 G+C ve

%56,92 A+T nükleotitleri içerdiği belirlendi. Bu kompozisyona bakıldığında Adenin nükleotitinin daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 3.10: Mikrotübül ilişkili proteinin cDNA dizisi nükleotit kompozisyonu.

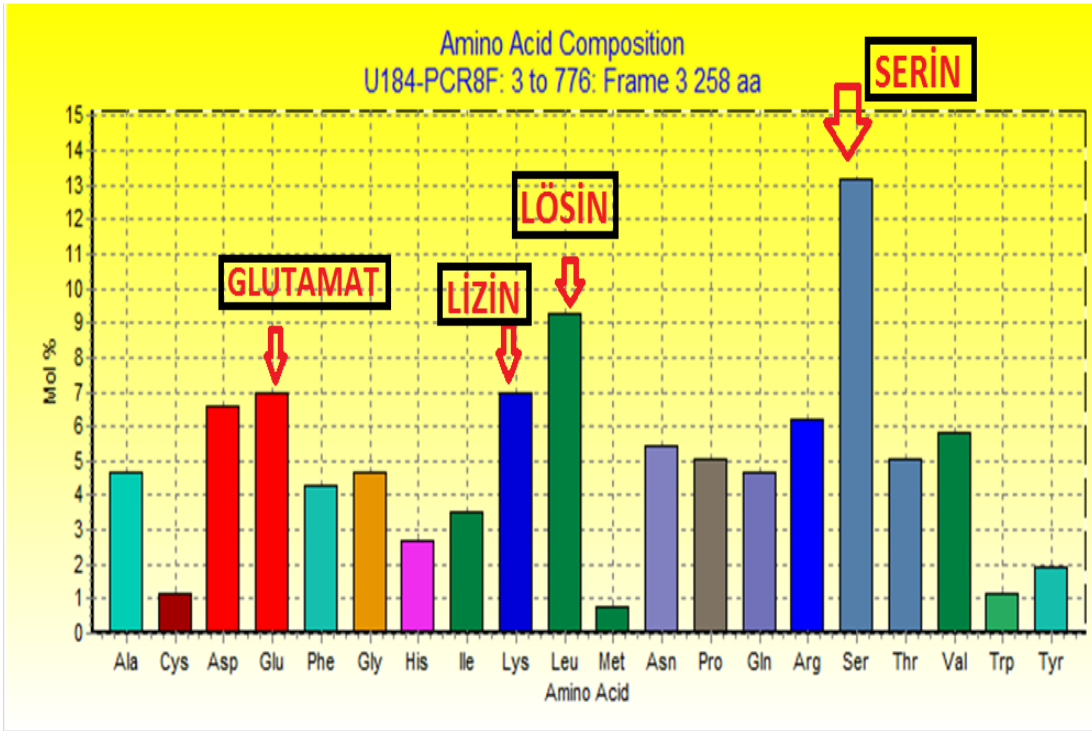
Mikrotübül ilişkili protein geninin cDNA dizisini, Bioedit [44] programı kullanılarak tespit edilen açık okuma çerçevesi (ORF) şekil 3.9 gösterildi. Mikrotübül ilişkili protein geninin açık okuma çerçevesinin amino asit kompozisyonu bakıldı (Şekil 3.10). Burada; serin ve lösin amino asit içeriği sırasıyla %13 ve %9 olduğu, glutamat ve lizin amino asitlerinin her ikisinde % 7 olduğu bunun yanı sıra; glutamat gibi asidik özellikte, lizin gibi bazik ve serin gibi hidrofilik aminoasitlerinin bir arada bulunması kompleks amino asitlerin olduğu dikkati çekmektedir. BioEdit [44] programının Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile [53] sekmesi kullanılarak hidrofobisite gösterildi.

```

>upk184: 3 to 776: Frame 3 258 aa
LNAIFVQKQAPNSPFFFFFFFILHRSQVLATENATAQLRLLNFPDDIDLKLLVKAKSLQALAI DANNSTSPMIYPGFYRSKSVSTRGHSLDLTSPRTPPNVVFD SYWE
EKWRDLHKEGEHEEGVVEKLHKSRKGSERVRRLRLSRTESDQSSSKVGKIQKDKSSVRRLLKDLASQLRSDDETEKTVCDGDIGHQDPVEVNGQEITDKNFGSMSEPRYLSG
NAESEENSPNFDSSSPINGSNCHQTTRAK

```

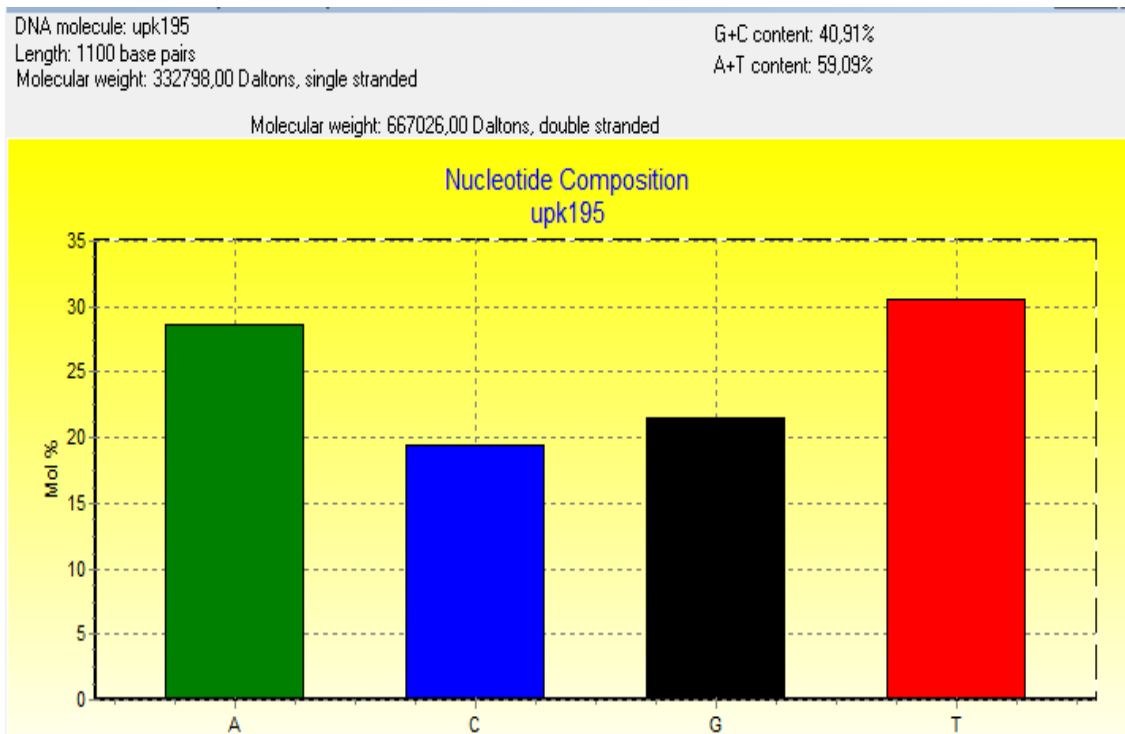
Şekil 3.11: Mikrotübül ilişkili protein geninin açık okuma çerçevesi.



Şekil 3.12: Mikrotübül ilişkili protein geninin amino asit kompozisyonu.

3.1.4 Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz için için BioEdit Programı

Zeytinde tahmini Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz (UPK195) geni için cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçları aşağıdaki şekilde görülmektedir. Şekle bakıldığında 1100 nükleotit uzunluğundaki UPK195 kodlu dizinin %40,91 G+C ve %59,09 A+T nükleotitleri içerdiği belirlendi. Timin amino asidi % 31' lik yoğunlukla daha çok olduğu görülmüştür.

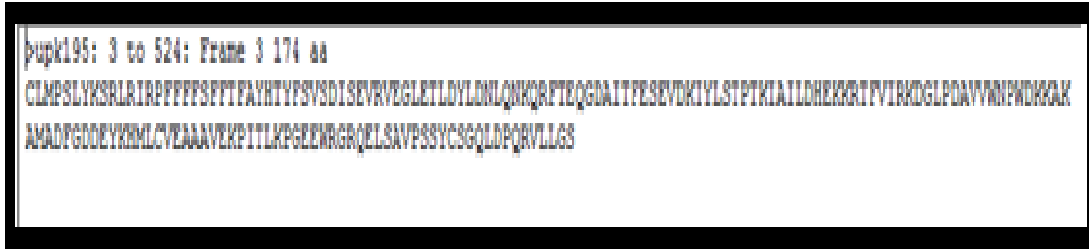


Şekil 3.13: Glikoz-6-1-Epimerazın cDNA dizisi nükleotit kompozisyonu.

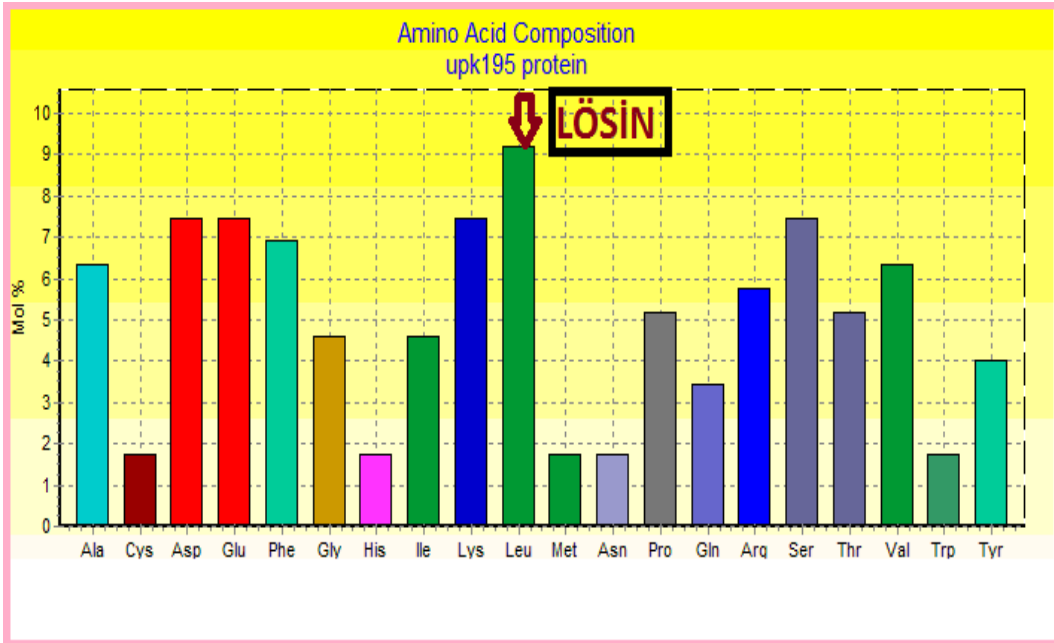
Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninin cDNA dizisinin , Bioedit [44] programı kullanılarak tespit edilen açık okuma çerçevesi (ORF) şekil 3.9 gösterildi. Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninin açık okuma çerçevesinin amino asit kompozisyonuna bakılıp aşağıda gösterilen Şekil 3.10 'deki gibidir. Burada; lösin amino asidinin en

çok bulunduğu görülmüştür. Lösin aminoasiti valin ve izölösin ile birlikte dallı zincirli amino asitler grubunda yer alır. Lösin amino asitinin fazla çıkması ve proteinlerin yapısına en fazla katkıta bulunan amino asit olması Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geni için düşündürücüdür.

Glutamat , aspartat , lizin ve serin amino asitlerinin hepsinin yaklaşık olarak % 7,5 olduğu görülmüştür. Glutamat ve aspartat asidik özellikteki amino asitlerken , lizin bazik aminoasit ve serin ise hidrofilik aminoasit olduklarından Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninde kompleks amino asitlerinin olduğunu göstermektedir. BioEdit [44] programının Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile [53] sekmesi kullanılarak hidrofobisite gösterildi.



Şekil 3.14: Glikoz-6-1-Epimeraz geninin açık okuma çerçevesi.



Şekil 3.15: Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninin amino asit kompozisyonu.

3.1.5 Aminoasit Dizisi ve Tahmini Protein Yapısı

UPK 184 kodlu genimizin biyoinformatik çalışmaları yapıldığında , genin tahmini olarak 258 aa asit kodladığı görüldü. Yaklaşık olarak 29 kDA ağırlığında bir protein olduğu ve en çok “SERİN” ,”LÖSİN “ ve “LİZİN” amino asitlerini kodladığı görüldü. Bu konuda detaylı bilgi Bioinformatik analizi bölümünde verildi. Ayrıca Şekil 3.3 ‘ te protein hidrofobite diyagramı gösterilmiştir.

- >U184-PCR8F: 3 to 776: Frame 3 **258 aa** ←
- LNAIFVQKQAPNSPFFFFFFFILHLSQVLATENATAQLRLLNFPDDIDLKLL
VKAKSLQALAIANNSTSPMIYPGFYRSKSVSTRGHSLDLTSPRTPPNVVP
DSYWEEKWRDLHKEGEHEEGVVEKLHKSRLGWSERVRLRLSRTESDQSSSKV
GKIQKDQKSSVRRLLKDLASQLRSEDETEKTVCDGDIGHQDPVEVNGQEITD
KNFGSMSEPRYLSGNAESEENSPNFSDSSSPINGSNCHQTTRAK

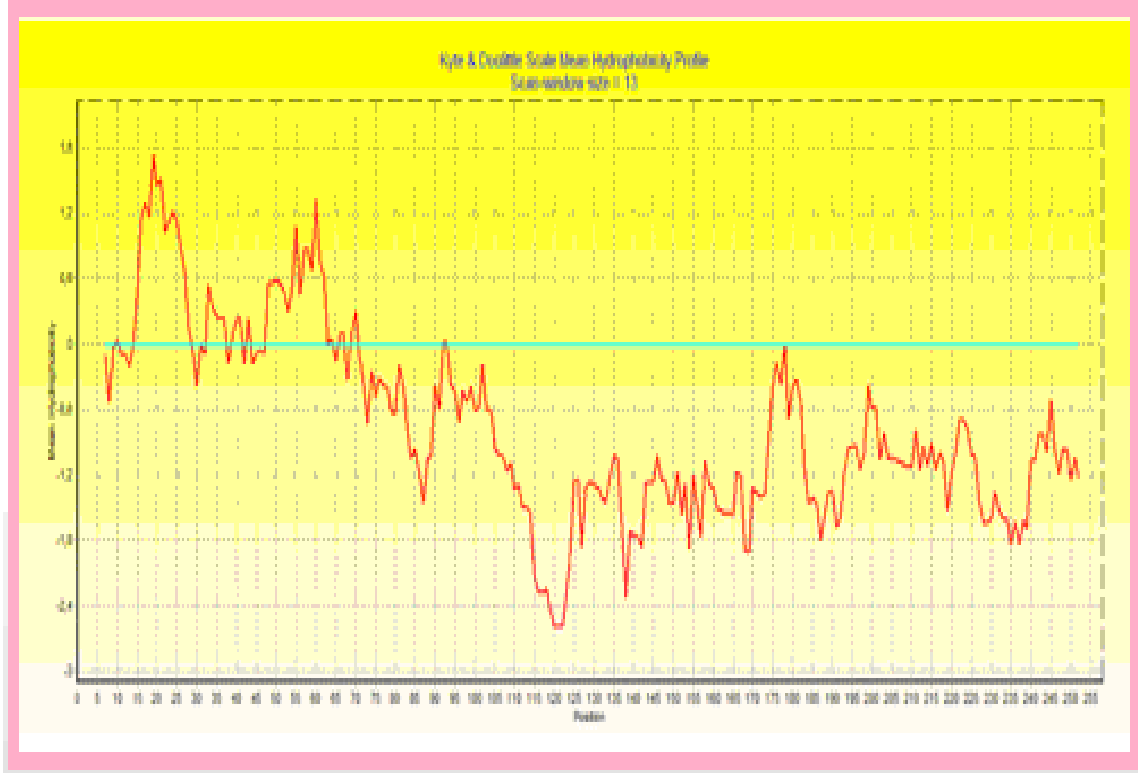
Şekil 3.16: UPK 184 için amino asit dizisi.

Protein: U184-PCR8F: 3 to 776: Frame 3 258 aa
Length = 258 amino acids
Molecular Weight = 29059,81 Daltons

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	12	4,65
Cys C	3	1,16
Asp D	17	6,59
Glu E	18	6,98
Phe F	11	4,26
Gly G	12	4,65
His H	7	2,71
Ile I	9	3,49
Lys K	18	6,98
Leu L	24	9,30
Met M	2	0,78
Asn N	14	5,43
Pro P	13	5,04
Gln Q	12	4,65
Arg R	16	6,20
Ser S	34	13,18
Thr T	13	5,04
Val V	15	5,81
Trp W	3	1,16
Tyr Y	5	1,94

Şekil 3.17: Proteinin ağırlığı ve içerebileceği aminoasitler.

Amino asit analizi sonucunda tahmini proteinin 258 amino asitten oluştuğu ve Serinin yüksek oranda bulunduğu tespit edildi (Şekil 3.19).Serin amino asitinin polar olduğu ve O-linked glikolizasyon yaptığını dikkate aldığımızda proteinin sitoplazmik veya hidrofilik bir ortamda çalıştığı , aynı zamanda bir bölgesi ile glikolizasyonda görev yaptığı tahmini olarak söylenebilir.



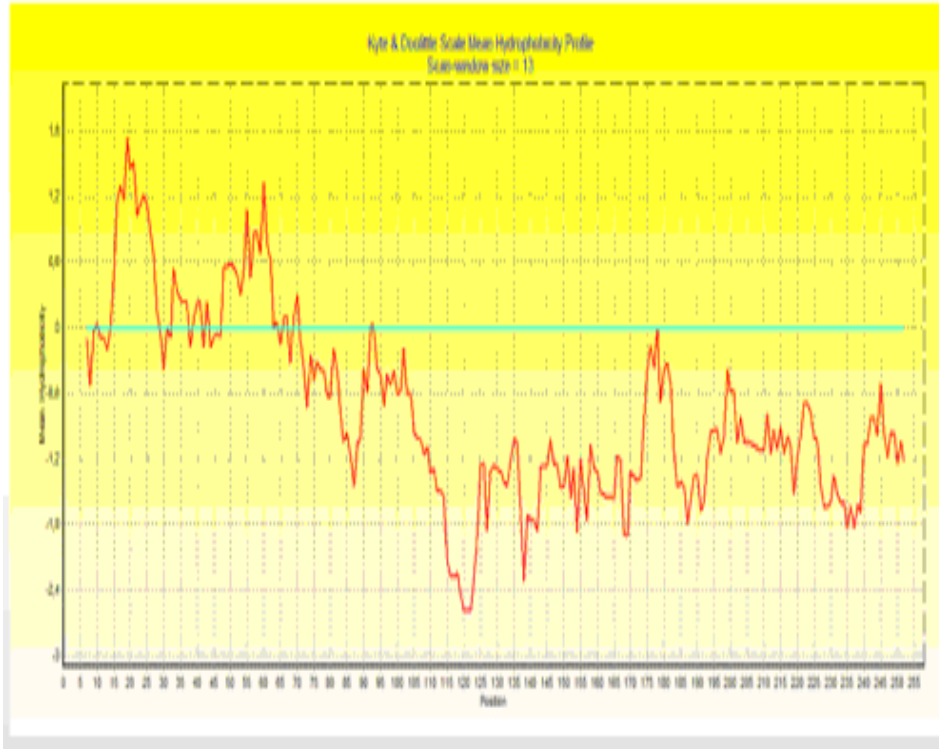
Şekil 3.18: Protein hidrofobite diyagramı.

UPK 195 kodlu genimizin biyoinformatik çalışmaları yapıldığında ise , genin tahmini olarak 174 aa asit kodladığı görüldü. Yaklaşık olarak 200072.82 Dalton ağırlığında bir protein olduğu ve en çok “SERİN” amino asitini kodladığı görüldü. Bu konu içinde detaylı bilgi Bioinformatik analizi bölümünde verildi. Ayrıca Tablo 3.3 ‘ te UPK 195 gen dizisinin Protein ağırlığı ve içerdiği aminoaitler gösterilmiştir. Şekil 3.4 ‘de protein hidrofobite diyagramı ve Şekil 3.5‘te ise genin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı gösterildi

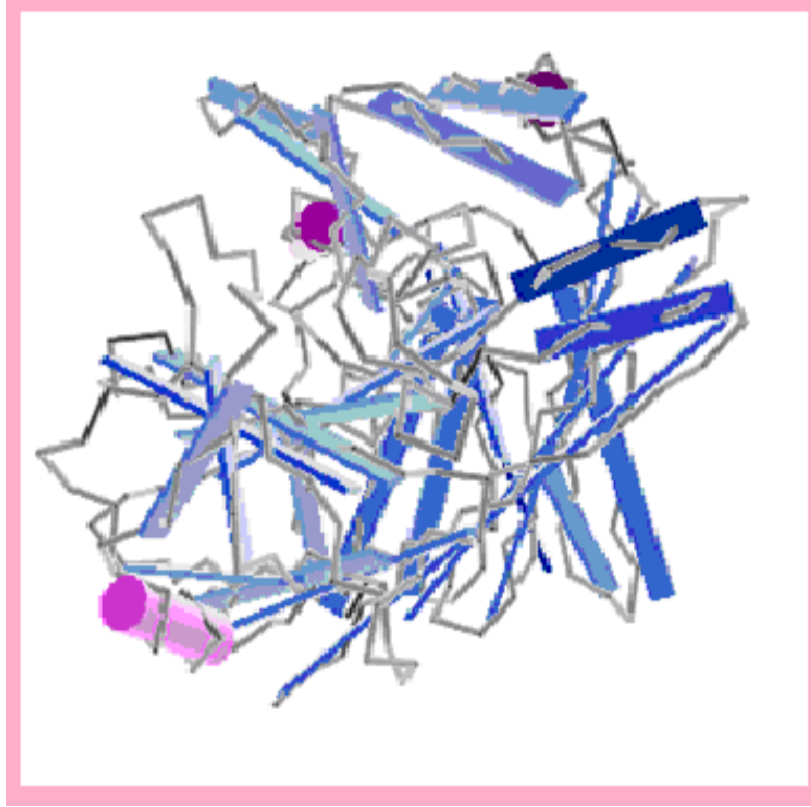
Protein: upk195 protein
Length = 174 amino acids
Molecular Weight = 20072,82 Daltons

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	11	6,32
Cys C	3	1,72
Asp D	13	7,47
Glu E	13	7,47
Phe F	12	6,90
Gly G	8	4,60
His H	3	1,72
Ile I	8	4,60
Lys K	13	7,47
Leu L	16	9,20
Met M	3	1,72
Asn N	3	1,72
Pro P	9	5,17
Gln Q	6	3,45

Tablo 3.1: UPK 195 gen dizisinin Protein ağırlığı ve içerdiği aminoaitler.



Şekil 3.19: UPK 195 gen dizisi için Protein hidrofobisite diyagramı.



Şekil 3.20: UPK 195 geninin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı.

3.2 Moleküler Klonlama ve Protein Ekstraksiyonu Çalışmaları

Klonlama deneylerine başlamadan önce PCR, polimorfizim analizi ve primerler tasarlanıp bir dizi klonlama deneyleri yapılmıştır.

3.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

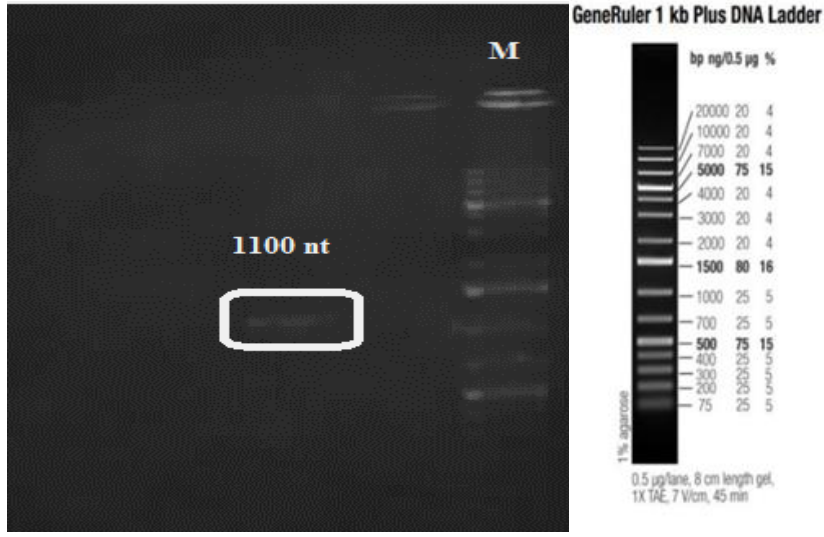
UPK195 dizisini baştan sona çoğaltacak 1 çift primer tasarlandı (bkz. Tablo 2.1). Tasarlanan primerlerin kontrolü için gDNA kalıp olarak kullanılarak PCR kurulup yaklaşık 1100 nt'lik bir bölgede bant gözlemlendi.



Şekil 3.16: UPK 195 geninin PCR sonucu. M: Marker, 1: gDNA PCR sonucunun 1100 nt'lik bölgedeki görüntüsü.

3.2.1 Polimorfizm Analizi

UPK195'in polimorfik olup olmadığını anlamak için gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak PCR kuruldu. PCR ürünleri sırayla jele yüklendi. Sonrasında istenilen yerde parlak bant veren örnekler dizilemeye gönderildi ve dizileme sonuçları FinchTV programıyla kromatogramlar değerlendirildi ve zeytin çeşidinden 16 tanesinin sonucu güvenilir olduğu için polimorfizm analizi 16 tane zeytin çeşidiyle yapıldı. BioEdit programıyla sağlam olan diziler arasında contig yapıldı, polimorfik bölgeler saptandı .



Şekil 3.17: Polimorfizim için yapılan PCR: M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: 1100 nt'lik bant.

3.2.2 Tasarlanan Primerler

UPK184 ve UPK195 kodlu gen dizilerini tam uzunlukta çoğaltmak amacıyla öncelikle Primer 1, gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılmak üzere Primer 2 ve genimizi ifade vektörlerine klonlamak için ise His-Tag kuyrukları içeren Primer 3 olarak isimlendirilen primerler tasarlandı. Primerler amacına göre farklı uzunluklarda tasarlandı. UPK 184 için çoğaltma ve var / yok tespiti primerleri 20 nt , dizileme primerleri 27 nt, klonlama primerleri ise 40 nt olarak tasarlandı. Özellikle laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda primerlerin amaca yönelik uzunluk farklılıkları verimli sonuçlar doğurmuş ve bu olumlu sonuçlar bu tezde de doğrulanmıştır. Sipariş edilen primerler elimize toz halinde ulaştı. Kullanım talimatında belirlenen miktarlar doğrultusunda primerler otoklavlanmış su ile sulandırıldı. Daha sonra sulandırılmış primerler deneylerde kullanılmak üzere, primerlerden 100 µL reaksiyon oluşturmak için, 10 µL ependorfa primer konulup, üzeri 90 µL saf su eklenerek tamamlandı.

Tablo 3.2: UPK 184 gen dizisi için hazırlanan primerler.

Primer Adı	Forward Dizi	Reverse Dizi
Primer 1	TTTCCCGATGATATAGA TCTTGTTAAG	TTCAACAAAGTTCTTCTAACAG ATGAC
Primer 2	CTCGGGCAAAGTAGCAT AGC	AATGCAAGCTCACCGAGAGT
Primer 3	GGTGATGATGATGACAA GATGATTTAT CCTGGGTTTT ATTA	GGAGATGGGAAGTCATTACTTT GCCCGAGTCGTCTGATGAC

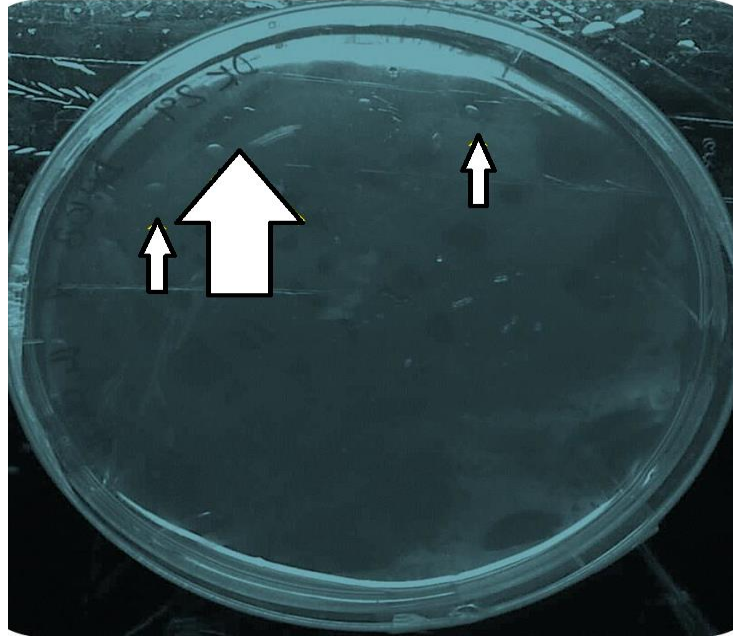
Tablo 3.3: UPK 195 için tasarlanan primerler.

Primer Adı	Forward Dizi	Reverse Dizi
Primer 1	GTTTCAGATATCAGTGA AGTTCGAGTC	ACCTGTACATGATATA ATGGGCATATC
Primer 2	AAAGGCAATGGCTGATT TTG	CTCCTTGGCAGCTGAA AATC
Primer 3	GGTGATGATGATGACAA GATGCCATCTTTGTACA AAAGCAG	GGAGATGGGAAGTCA TTAGCTGCCAAGGAG GACTCTCTGAG

Tablo 3:2’de görüldüğü gibi UPK 195 için Primerler amacına göre farklı uzunluklarda tasarlandı. UPK 195 için çoğaltma ve var / yok tespiti primerleri 27 nt , dizileme primerleri 22 nt, klonlama primerleri ise 40 nt olarak tasarlandı.

3.2.3 DH10B'ye Transformasyon

His- Taq kuyruklu gen bölgesini içeren recombinant plazmitimizin çoğaltılması amacıyla *E.coli*'nin DH10B suşuna transforme edildi. Başarılı bir transformasyon sonrası rekombinant plazmit çoğaltıldı. Koloniler oluşturan petriyeler transformasyonu teyid amacıyla fotoğraflandı.

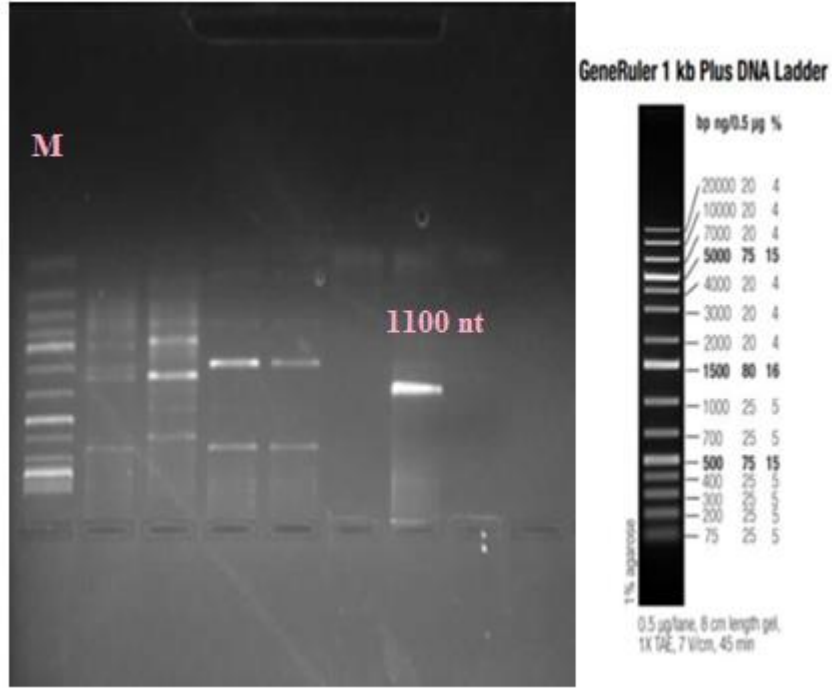


Şekil 3.23: Rekombinant DH10B suşunun koloni görüntüsü.

3.2.4 Koloni PZR

Plazmit DH10B ye transforme ettik. Sonra *E.coli*'nin plazmiti bünyesine alıp almadığını ya da plazmiti üretilip üretilmediğini kontrol etme amacıyla, içinde rekombinant plazmitimizin de olduğunu düşünülen *E.coli*'nin DH10B suşunun LB-agarlı petriyelerde oluşturmuş olduğu kolonilerden biri seçildi. 1/20 oranında

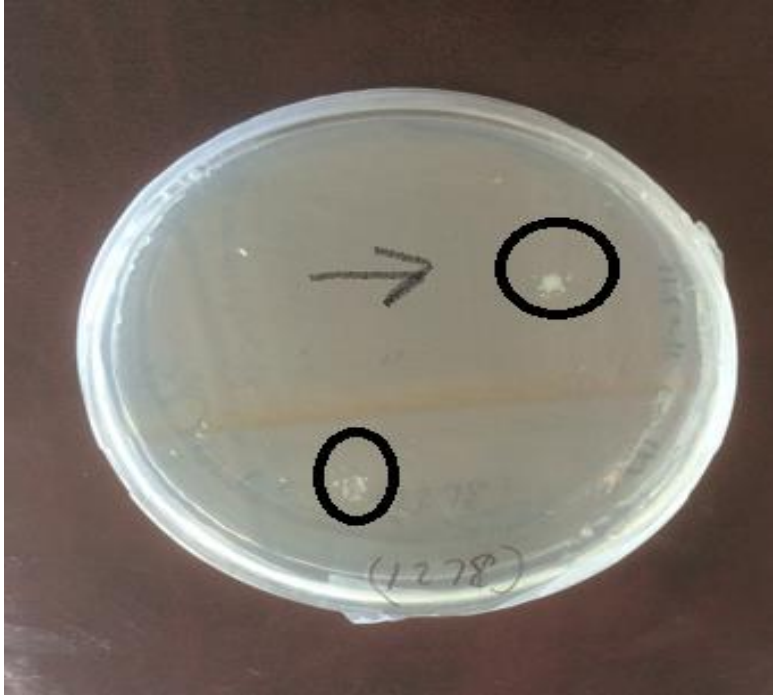
seyreltildi. Daha sonra bu koloniler PZR kalıbı olarak kullanıldı. PZR kuruldu ve sonuçlar gözlemlendi. Agaroz jelde koşturulan örneklerin yaklaşık 1100 nt'lik bantlar verdiği gözlemlendi. Sonuç Şekil :35'de gösterildi. Bu sonuçlar, daha önce plate 51 vektörüne klonladığımız genin verdiği bant uzunluğuyla uyduğu görüldü. Burada başarılı bir transformasyon işleminin gerçekleştirildiği bir kez daha perçinlendi.



Şekil 3.24: Koloni PCR görüntüsü. M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: 1100 nt'lik bant.

3.2.5 Rekombinant Plazmit'in *E. coli*' nin Ekspresyon (İfade) Suşuna Transformasyonu

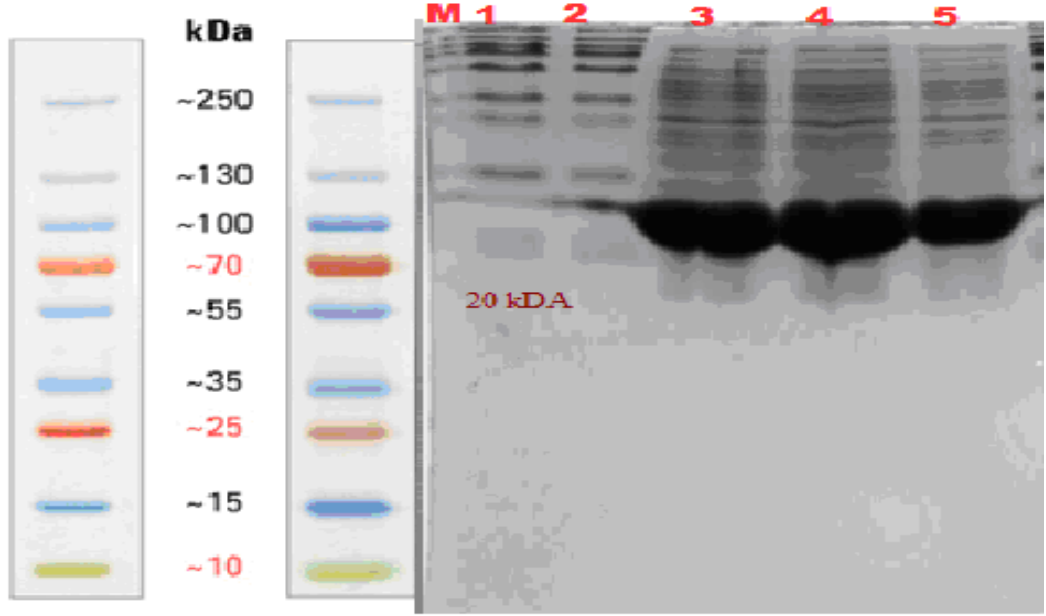
E. coli'nin BL21 suşuna transforme edilen rekombinant plazmitten başarılı sonuçlar alındı. Şekil 3.21'de da gösterildiği gibi, petri kaplarında bakteri kolonileri saptandı ve bu kolonilerden protein ifadesinin sağlanması amacıyla IPTG ile indüklendi. Ayrıca bu kolonilerden daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere kompetan hücreler oluşturuldu.



Şekil 3.21: Rekombinat BL21 suşunun kolonileri.

3.2.7 SDS-Page ve Western- Blot Analizi Sonuçları

Elde edilen proteininin degrades olup olmadığını anlayabilmek için proteini meteryal metot bölümünde anlatıldığı gibi uygulanmıştır ama SDS PAGE jel elde edilemedi. Özel his-tag antikolar ve blokajlamalar ile western deneyi gerçekleştirildi lakin çoklu denemelere rağmen bantlaşma görülemedi.



Şekil 3.26: Commasie Blue ile yapılan SDS PAGE jel görüntüsü. 1: Ham ekstrakt, 2: Flowthrough, 3: Wash-1, 4: Wash-2, 5: Elution-1.

E. coli rekombinant protein sentezi için kullanılmasında bir takım problemler ortaya çıkar. Bunlardan ilki: Rekombinant proteininin uygun çalışmamasıdır. Genellikle canlıların proteinleri translasyon sonrasında aminoasitlerinin kimyasal modifikasyonu ile işlenirler. Bakterilerin proteinleri bu şekilde işlenmezler. Bazı hayvansal proteinler translasyon sonrası glikozillenirler. E. coli'de rekombinant proteinlerde glikozillenme doğru bir şekilde gerçekleşmez. İkincisi: E. coli rekombinant proteinlerinin doğru katlanmaması ve disülfid bağlarının üretilmemesidir. Bundan dolayı bakterilerde inklüzyon cisimcikleri oluşur, çünkü protein uygun bir tersiyer yapı alamaz ve çözünemez. Deney tüpündeki proteinin doğru katlanmış haline döndürülmesinin imkanı yoktur. Üçüncüsü: Rekombinant protein E. coli tarafından parçalanıp bozulabilir [53].

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Sonuç ve tartışma kısmını yüksek lisans boyunca yapılan çalışmaları göz önünde bulundurarak toparlariszek şu şekilde özetleyebiliriz. UPK184 ve UPK195 kodlu gen dizilerini tam uzunlukta çoğaltmak amacıyla öncelikle Primer 1, gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılmak üzere Primer 2 ve genimizi ifade vektörlerine klonlamak için ise His-Tag kuyrukları içeren Primer 3 olarak isimlendirilen primerler tasarlandı. Primerler amacına göre farklı uzunluklarda tasarlandı. Primerler ile ilgili çok söylenecek bir şey yok ama “primerler normalden daha uzun (27-30 nt arası) tasarlandığı için beklendiği gibi ampikon özgünlüğü ve verim yüksek oldu.” diyebiliriz. UPK 184 için çoğaltma ve var / yok tespiti primerleri 20 nt , dizileme primerleri 27 nt, klonlama primerleri ise 40 nt olarak tasarlandı. UPK 195 için Primerler amacına göre farklı uzunluklarda tasarlandı. UPK 195 için çoğaltma ve var / yok tespiti primerleri 27 nt, dizileme primerleri 22 nt, klonlama primerleri ise 40 nt olarak tasarlandı. Özellikle laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda primerlerin amaca yönelik uzunluk farklılıkları verimli sonuçlar doğurmuş ve bu olumlu sonuçlar bu tezde de doğrulanmıştır. Zeytin tahmini mikrotübül ilişkili protein geninin (UPK 184) cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçları bakıldığında bu sonuçlara göre 1105 nükleotit uzunluğundaki UPK184 kodlu dizinin %43,08 G+C ve %56,92 A+T nükleotitleri içerdiği belirlendi. Bu kompozisyona bakıldığında ise Adenin nükleotitinin daha fazla olduğu görüldü.

UPK 184 kodlu genimizin biyoinformatik çalışmaları yapıldığında bu genin en çok benzeşme gösterdiği canlı türünün *Nicotiana benthamiana* olduğu ve genin tahmini olarak 258 amino asit kodladığı görüldü. Yaklaşık olarak 29 kDA ağırlığında bir protein olduğu ve en çok “SERİN” ,”LÖSİN “ ve “LİZİN” amino asitlerini kodladığı görüldü.

Mikrotübül ilişkili protein geninin açık okuma çerçevesinin amino asit kompozisyonuna bakıldığında. Burada; serin ve lösün amino asit içeriği sırasıyla %13 ve %9 olduğu , glutamat ve lizin amino asitlerinin her ikisinde % 7 olduğu bunun yanı sıra; glutamat gibi asidik özellikte, lizin gibi bazik ve serin gibi hidrofilik

aminoasitlerinin bir arada bulunması kompleks amino asitlerin olduğu dikkatini çekmektedir. Amino asit analizi sonucunda tahmini proteinin 258 amino asitten oluştuğu ve Serinin yüksek oranda bulunduğu tespit edildi (Şekil 3.2). Serin amino asitinin polar olduğu ve O-linked glikolizasyon yaptığını dikkate aldığımızda proteinin sitoplazmik veya hidrofilik bir ortamda çalıştığı, aynı zamanda bir bölgesi ile glikolizasyonda görev yaptığı tahmini olarak söylenebilir.

Zeytinde tahmini Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz (UPK195) geni için cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu analiz sonuçlarını ise şu şekilde yorumlayabiliriz. Şöyleki 1100 nükleotit uzunluğundaki UPK195 kodlu dizinin %40,91 G+C ve %59,09 A+T nükleotitleri içerdiği belirlendi. Timin amino asidi % 31' lik yoğunlukla daha çok olduğu görülmüştür.

Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geninin açık okuma çerçevesinin amino asit kompozisyonuna bakıldığında genin tahmini olarak 174 aa asit kodladığı görüldü. Yaklaşık olarak 200072.82 Dalton ağırlığında bir protein olduğu ve en çok "LÖSİN" kodladığı görüldü. Bu konu içinde detaylı bilgi Bioinformatik analizi bölümünde verildi. Burada; lösin amino asidinin en çok bulunmasını şöyle yorumlarisek:Lösin aminoasiti valin ve izolösin ile birlikte dallı zincirli amino asitler grubunda yer alır. Bu bilgiye istinaden lösin amino asitinin fazla çıkması ve proteinlerin yapısına en fazla katkıta bulunan amino grup asit olması Glikoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geni için düşündürücüdür. UPK195 adlı gen dizisinin en yüksek benzeşme gösterdiği canlının *Ricinus communis* olduğunu söyleyebiliriz.

Genden proteine ilkesine dayanılarak yapılan bu tez çalışmasının içerisinde yer alan protein eldesi için Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geni (UPK 195) kullanıldı. Protein elde etmek için materyal ve metot bölümünde bahsedilen alternatif lizis yönteminden elde edilen protein kullanılarak SDS PAGE jel elektroforezi yapıldı. Daha sonrasında bu tam uzunluklataki gen dizisi his- tag kuyruklu primerlerle çoğaltılıp plate 51 vektörüne klonlanması yapıldı, *E. coli*'ye transformasyonu yapıldı, rekombinant plazmitimizi taşıyan *E. coli*, IPTG ile indüklenerek proteinin ifadesi sağlanlanmaya çalışılmıştır ve malesefki birçok tekrarlı deneyler yapılmasına rağmen protein bantlaşması görülemedi.

Yapılan literatür taramalarında zeytin (*Olea europaea* L.) Glukoz-6-Fosfat-1-Epimeraz geni ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Böylelikle ilgili gen ile yapılan biyoinformatik çalışmalar ile biyolojik düzeyde literatüre katkı sağlanmıştır ve daha ileri bir tarihte bu konu üzerine çalışma planlanmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Ünsal, A., *Ölmez Ağacın Peşinde (Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağı)*, İstanbul: YKY, 14. (2006).
- [2] Koca, U., Süntar, I., Akkol, E. K., Yilmazer, D. and Alper, M., “Wound repair potential of *Olea europaea* L. leaf extracts revealed by in vivo experimental models and comparative evaluation of the extracts' antioxidant activity”, *Journal of medicinal food*, 14(1-2), 140-146, (2011).
- [3] Efe, R., Soykan, A., Cürebal, İ. ve Sönmez, S., *Dünyada, Türkiye’de, Edremit Körfezi Çevresinde Zeytin ve Zeytinyağı*, Balıkesir: Akmat Yayıncılık, 1-2, (Şubat 2013).
- [4] Fabbri, A., Lambardi, M. and Tokatli, Ö.Y., *Olive Breeding*, in *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, S.M. Jain, Priyadarshan, P. M., New York: Springer, 423-465, (2009).
- [5] Temuçin, E., "Türkiye’de Zeytin Yetiştirilen Alanların Sıcaklık Değişkenine Göre İncelenmesi.", *Ege Coğrafya Dergisi*, 7(1), (1993).
- [6] Özkaya, M. T., . "Genetic and biologic characterization of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars grown in Turkey." *Tarım Bilimleri Dergisi*, 10(2), 231-236, (2004).
- [7] Pastor, M. ve Cobo, M., *Zeytin Yetiştirme Teknikleri*. 1.Basım, Barselona : Dünya Zeytin Ansiklopedisi, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, 145-194, (1997).
- [8] Dağdelen, A., Tümen, G., Özcan, M. M., and Dündar, E., “Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalık, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages”, *Food chemistry*, 136(1), 41-45.,(2013).
- [9] Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milloni, D. and Haralampidis, K., “Breeding, molecular markers and

molecular biology of the olive tree”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 574-586, (2002).

- [10] Dıraman, H., “Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde Çeşitli Sistemlerle Üretilmiş Natürel Zeytin yağlarında Oksidatif Stabilitate ve Serbest Asitlik Düzeyi Üzerine Çalışmalar”, *Gıda Dergisi*, 32, 63-74, (2007).
- [11] Tan, M., *Ülkemiz Zeytinciliğinin Bugünü Ve Geleceğine Yönelik Perspektifler*, Çanakkale: Çanakkale Tarımı Sempozyumu; Dünü, Bugünü, Geleceği, 10-16 (2011).
- [12] Kaynaş ,N., Yalçınkaya, E., Sütçü, A.R. ve Fidan, A.E., *Gemlik Zeytininde Klonal Seleksiyon*, , Yalova: Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Bilimsel Araştırma ve İnceleme Yayınları, No: 111, (1998).
- [13] Güngör, Ö.F., “Farklı Yörelerde Yetiştirilen Gemlik Zeytininden Sofralık Siyah Zeytin Elde Edilmesi Sırasında Temel Bileşenlerinde Meydana Gelen Değişmeler Üzerine Bir Araştırma”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2010).
- [14] Çetin, Ö., Mısırlı, A., Tanyolaç, M. B., “Zeytin (*Olea europaea* L.) Genotiplerinin DNA Markörleri Yardımı ile Karakterizasyonu.” , Doktora Tezi, *Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 7(1), 5-14, (2017).
- [15] Aktan, N. ve Kalkan, H., *Sofralık Zeytin Teknolojisi*, İzmir: Ege Üniversitesi, 122 pp, (1999).
- [16] Sesli, M. and Yegenoglu E. D., "Genetic Relationships among and within Wild and Cultivated Olives Based on Rapds", *Genetics and Molecular Research*, 9(3), 1550-1556, (2010).
- [17] Akgün, Ş., “Kiraz ve Uslu Zeytin Çeşitlerinde Pedisele Has Genlerin Tespiti”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).

- [18] Korulu, Ş., "Mikrotübül Kesilmesinin Regülasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, (2015).
- [19] Şirvanci, S., ve Çilingir Kaya, Ö.T., "Silya Bozukluklarında Elektron Mikroskopi." *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 2(1), (2012).
- [20] Şirvanci, S., ve Çilingir Kaya, Ö.T., "Silya Bozukluklarında Elektron Mikroskopi", *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2, (1), (2012).
- [21] Hogg, C., "Primary ciliary dyskinesia: when to suspect the diagnosis and how to confirm it", *Paediatric Respiratory Reviews*, 10, 4-50, (2009).
- [22] Dağlı, E. ve Karakoç, F. *Primer silyer diskinezi*, 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 247-252, (2007).
- [23] Meeks, M. and Bush, A., "Primary ciliary dyskinesia (PCD)", *Pediatric Pulmonol*, 29, 307-316, (2000).
- [24] Ibanez, T., Heintz, N. and Orman H., "To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease", *Hum Mol Genet.*, 12(1), R27-35, (2003).
- [25] Porter, M.E. and Sale, W.S., "The 9+2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility", *J Cell Biol.*, 151(5), 37-42, (2000).
- [26] Aydın, S., Eren, M.N., ve Aydın, S., "Kardiyovasküler Sistemde Salusin- α ve Salusin- β 'nin Fizyolojisi ve Klinik Rolü", *Turkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*, 26(1), 33-38, (2014).
- [27] Kim, J.H., Lee, S.C., Lim, J.Y., Kim, D.S., Yun, H.Y., Kwon, N.S., et al., " α 1B-Adrenoceptor signaling molecule expression in Alzheimer's disease brain tissue/Alzheimer hastalığı olan beyin dokusunda α 1B-Adrenoseptör Sinyal Molekülü Ekspresyonu.", *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(5), 376-385, (2015).

- [28] Uzbay, İ. Tayfun. "Agomelatin: Genel Bilgiler, Farmakolojisi ve Kullanım Güvenliği.", *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 15 (Ek 1), 9-19, (2012).
- [29] Zemlan F.P., Rosenberg W.S., Luebbe P.A., Campbell T.A., Dean G.E., Weiner N.E., et al., "Quantification of axonal damage in traumatic brain injury: Affinity purification and characterization of cerebrospinal fluid tau proteins", *J Neurochem.*,72, 741-750, (1999).
- [30] TOKÇAER, A. B., "Parkinson Hastalığında Genetik", *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*, 5(4), 13-18, (2012).
- [31] Hall, A. and Knowles, J. R., "The uncatalyzed rates of enolization of dihydroxyacetone phosphate and of glyceraldehyde 3-phosphate in neutral aqueous solution. The quantitative assessment of the effectiveness of an enzyme catalyst.", *Biochemistry*, 14, 4348–4353, (1975).
- [32] Alagöz, E., "Saccharomyces cerevisiae’da Glikoz-6-Fosfat Dağılım Noktasının Kinetik Analizi", Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, (2005).
- [33] Rose, I. A., Fung, W. J. and Warms, J. V., "Proton diffusion in the active site of triosephosphate isomerase", *Biochemistry*, 29, 4312–4317, (1990).
- [34] Gross, K. C. and Acosta, P. B., "Fruits and vegetables are a source of galactose; implications in planning the diets of patients with galactosaemia", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14, 253-258, (1991).
- [35] Brown, T.A., *Gene Cloning & DNA Analysis Fifth Edition*, (Çev: F. Bardakçı, A. F. Yenidünya, N. Yılmaz), Nobel Akademik Yayıncılık, 291, (2009).
- [36] Sonmez,G., "Zeytin Beta Glukozidaz ve Metalotionein Genlerinin Moleküler Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).

- [37] Sprenger, G. A., “Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12”, *Archives of microbiology*, 164(5), 324-330, (1995).
- [38] Gumaa, K. A. and McLean, P., “The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Enzyme profiles and transient and steady-state content of intermediates of alternative pathways of glucose metabolism in Krebs ascites cells”, *Biochemical Journal*, 115(5), 1009-1029, (1969).
- [39] Wurster, B. and Hess B., “Anomeric specificity of enzymes of D glucose metabolism”, *FEBS letters*, 40, 105-111, (1974).
- [40] Rose, I.A., O'Connell, E.L. and Schray, K.J., “Mannose 6-Phosphate: Anomeric Form Used by Phosphomannose Isomerase and Its L-Epimerization by Phosphoglucose Isomerase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 2232-2234, (1973).
- [41] Bentley, R., *Configurational and conformational aspects of carbohydrate biochemistr*, Pennsylvania, 41,953-996, (1972).
- [42] Wurster, B. and Hess B., “Benno. Enzyme catalyzed anomerization of D-glucose-6-phosphate” *FEBS letters*, 38(1), 33-36, (1973).
- [43] Hirakawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, s., “SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins”, *Bioinformatics*, 14(4), 378-379, (1998).
- [44] Hall, T.A., “BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt”, *Nucleic Acids Symposioum Series*, 41, 95-98, (1998).
- [45] Alche, J.D., Butowt, R., Castro, A.J. and Rodriguez-Garcia M.I., “Ubiquitin and Uniquitin-Conjugated Proteins in the Olive (*Olea europaea* L.) Polen”, *Sexual Plant Reproduction*, 12(5), 285-291, (2000).
- [46] Corpas, J.F., Fernandez-Ocana, A., Carreras, A., Vaderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., et. al., “The Expression of Different Superoxide Dismutase

Forms is Cell-Type Dependent in Olive (*Ole europaea* L.) Leaves”, *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 984-994, (2006).

- [47] Ornberg, R.L., Harper, T.F. and Liu, H., “Western Blot Analysis with Quantum Dot Fluorescence Technology: A Sensitive and Quantitative Method for Multiplexed Proteomics”, *Nature Methods*, 2, 79-981, (2005).
- [48] Kyte, J.A. and Doolittle, R.F., “A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein”, *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132, (1982).
- [49] Guex, N. and Peitsch, M.C., “SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling”, *Electrophoresis*, 18, 2714-2723, (1997).
- [50] Reddy, B., Patel, A.K., Singh, K.M., Patil, D.B., Parikh, P.V., Kelawala, D.N., et. al., “De Novo Assembly and Transcriptome Characterization of Canine Retina Using High-Throughput Sequencing”, *Genet. Res. Int.*, (2015).
- [51] Porter, S.G., Doy, T., McCarty, R.E., Shearn, A., Shingles, R., Fletcher, L., et. al., “Exploring DNA Structure with Cn3D”, *CBE-Life Sciences Education*, 6, 65-73, (2007).
- [52] Claros, M.G. and Von Heijene, G., “Tappred Ii: An Improved Software for Membrane Protein Structure Predictions”, *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 685-686, (1994).
- [53] Kyte, J.A. and Doolittle, R.F., “A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein”, *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132, (1982).