

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



**ZEYTİNDE POLEN UYUMUNU KONTROL EDEN ADAY
GENİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ CAN KAYA

BALIKESİR, OCAK - 2017

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



**ZEYTİNDE POLEN UYUMUNU KONTROL EDEN ADAY
GENİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ CAN KAYA

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

Prof. Dr. Tülin Aşkun

Prof. Dr. Hulusi Malyer

Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım (Yedek Jüri)

Prof. Dr. Sevcan Çelenk (Yedek Jüri)

BALIKESİR, OCAK - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ali Can KAYA tarafından hazırlanan "ZEYTİNDE POLEN UYUMUNU KONTROL EDEN ADAY GENİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20.01.2017 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.

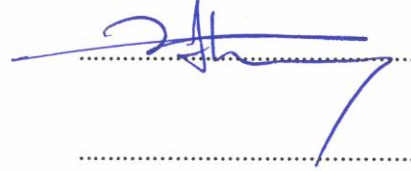
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Gülendamar Tümen



Üye
Prof. Dr. Tülin Aşkun



Üye
Prof. Dr. Hulusi Malyer

.....

Yedek Üye
Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım

.....

Yedek Üye
Prof. Dr. Sevcan Çelenk



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 110O108 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

ZEYTİNDE POLEN UYUMUNU KONTROL EDENADAY GENİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ CAN KAYA

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)

BALIKESİR, OCAK - 2017

Bu çalışmada zeytin cDNA kütüphanesinden edinilen bir tam uzunluktaki cDNA dizisinin moleküler analizi, çeşitli biyoinformatik araçlar ve çeşitli moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak yapıldı. Bu işlemler sonucu bu genin yapısı ve işlevi aydınlatılmaya çalışıldı. Bu çalışmada gene özgü tasarlanan primerlerle PZR amplifikasyonu yapıldı ve gen bölgesi çoğaltıldı. Böylelikle tam uzunlukta gen molekülleri elde edildi. Gen dizisi genom veri tabanlarında taratıldığında, Miyozin Ağır Zincir Kinaz B, E3 Ubiquitin Ligaz, WD40 Tekrarları İçeren Proteine ve Bitkisel Uyuşmazlık Geni gibi farklı genlere benzerlik gösterdiği saptandı. Genin daha sonra yine gene özgü tasarlanan primerlerle 23 zeytin çeşidinde polimorfizm çalışması yapıldı. Genin polimorfik bölgeler içerdiği saptandı. Zeytinin çeşitli dokularından, belirli periyotlarla toplanan örneklerle kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) analizi yapıldı ve bu işlemlerin sonucu grafiğe döküldü. Gen tasarlanılan His-Tag kuyruklu aLICator primerleri ile tekrar amplifiye edilip, pLATE51 vektörüne klonlandı. IPTG ile indüklenen gen ekspre edildi ve protein saflaştırması yapıldı. Saflaştırma sonucu elde edilen proteinlerin biyo ölçümlerinin yapılması amacıyla SDS- PAGE ve Western Blot analizleri gerçekleştirildi.

ANAHTAR KELİMELELER: *Olea europaea*L., polimorfizm analizi, ekspresyon seviyeleri, western blot, WD40 tekrarları içeren protein, moleküler karakterizasyon.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A CANDIDATE GENE ASSOCIATED IN POLLEN RECOGNITION OF OLIVE

MSC THESIS

ALİ CAN KAYA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)

BALIKESİR, JANUARY 2017

In this study, was made molecular characterization of a full length cDNA utilizing bioinformatic tools and molecular biology experiments. Results of these studies provided information about structure and functions of WD40 repeat containing gene. Firstly, PCR had conducted with gene specific primers, thus a full-length cDNA was obtained along with a full length gDNA clone. Then the gene was scanned at BlastN (non-redundant NCBI database), which showed similarity to different genes like myosin heavy chain kinase B gene, WD40 domain F- Box protein in *Sessamum indicum*, vegetative incompatibility gene in *Solanum tuberosum*, and E3 ubiquitin ligase gene in *A.thaliana*. Afterwards, polymorphism analysis was performed among 23 olive cultivars, and polymorphic regions were detected. The gene expression level was analysed in different tissues of olive. With His-Taq tail aLICator primers were designed for cloning. The cloning was carried out into pLATE51 vector. Also, transformation was made in order to express protein in *E.coli* DH10B and in *E.coli* DE3 through inducing with IPTG that expressed targeted protein. After protein purification was made, SDS-PAGE and Western blot analyses were conducted.

KEYWORDS: *Olea europaea* L., Polymorphism Analysis, Expression Levels, Western Blot, WD40 Repeats Containing Protein, Molecular Characterization.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Zeytin Morfolojisi ve Coğrafik Dağılımı	2
1.1.1 Zeytinin Ekonomik Yönü.....	2
1.2 WD40 Tekrarlarının İşlevi ve Yapısı	7
1.2.1 Ubiquitinler ve WD40 Tekrarları ile İlişkisi	8
1.3 Kendine Uyuşmazlık Durumu	8
1.4 Zeytinde Kendine Uyuşmazlık Durumu.....	10
2. MATERYAL VE METOD	11
2.1 Bitki Materyallerinin Toplanması	11
2.2 Bitki Materyallerinden DNA ve RNA İzolasyonları.....	11
2.3 DNA İzolasyonu (Ekstraksiyonu)	12
2.4 RNA İzolasyonu	12
2.5 RNA Örneklerinden cDNA Eldesi	12
2.6 %8'lik Agaroz Jel Hazırlama	13
2.7 Biyoinformatik Analiz.....	13
2.7.1 Primer Tasarımı.....	13
2.7.2 Dk29 Gen Dizisinin Açık Okuma Çerçevesinin belirlenmesi	14
2.7.3 Aminoasit Dizisinin Eldesi ve Proteinin Tahmini Yapısı	14
2.7.4 BlastN (Nükleotid Blast).....	14
2.7.5 BlastP (Protein Blast).....	14
2.7.6 Nükleotid Kompozisyonu	16
2.7.7 Aminoasit Kompozisyonu.....	16
2.8 Gen Amplifikasyonu (Çoğaltılması) ve İntron Analizi	18
2.9 Polimorfizm Analizi	19
2.10 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	21
2.10.1 Zamansal Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	21
2.10.2 Dokusal Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	21
2.11 Moleküler Klonlama ve Transformasyon.....	24
2.11.1 His- Taq Kuyruklu Primerlerle PZR Deneyi	24
2.11.2 <i>E.coli</i> nin Çoğaltma Suşuna (DH10B) Transformasyon.....	25
2.12 Koloni PZR.....	25
2.13 Plazmit DNA İzolasyonu.....	25
2.14 Rekombinant Plazmitin Ekspresyon Suşuna Transformasyonu.....	26
2.15 IPTG ile İndükleme	26

2.16 Proteinin Saflaştırılması	27
2.16.1 Çöktürme.....	27
2.16.2 Lizis.....	27
2.16.3 SDS- Page Deneyi (Elektroforezi)	28
2.16.4 Western Blot Analizi.....	29
3. BULGULAR	32
3.1 Tasarlanılan Primerler	32
3.2 Aminoasit Dizisi ve Tahmini Protein Yapısı	33
3.3 Blast Analizleri	37
3.3.1 Nükleotid Blast ve Protein Blast.....	37
3.4 Gen Amplifikasyonu ve İntron Analizi	40
3.4.1 PZR Deneyi Sonucu Elde Edilen Gen Dizisi.....	40
3.4.2 İntron Analizi	41
3.5 Polimorfizm Analizi Sonuçları.....	42
3.6 Gen Ekspresyon (İfade) Seviyeleri.....	45
3.6.1 Zamansal Ekspresyon Seviyeleri	45
3.6.2 Dokusal Ekspresyon Seviyeleri	47
3.7 Moleküler Klonlama.....	51
3.7.1 His- Taq Kuyruklu Primerlerle PZR ve Gen Purifikasyonu	51
3.8 <i>E. coli</i> ' nin Çoğaltma Suşuna Transformasyonu	52
3.9 Koloni PZR.....	53
3.10 Plazmit DNA İzolasyonu ve Sonuçların Dizilenmesi	54
3.11 Rekombinant Plazmit'in Plazmit'in <i>E. coli</i> ' nin Ekspresyon (İfade) Suşuna Transformasyonu	57
3.12 Protein Saflık Tayinlerinin Sonuçları.....	58
3.12.1 SDS- Page Sonucu	58
3.12.2 Western- Blot Analizi Sonuçları	59
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
5. KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: NCBI nükleotid blast ekranı.....	15
Şekil 2.2: NCBI protein blast ekranı.	16
Şekil 2.3: Bioedit protein nükleik asit kompozisyonu oluşturma.	17
Şekil 2.4: Kullanılan 96 well- plate gerçek zamanlı PZR şablonu.	22
Şekil 3.1: Aminoasit diziliminde tespit edilen WD40 motifi.	33
Şekil 3.2: Protein tahmini boyutu ve içerebileceği aminoasitler.	34
Şekil 3.3: Aminoasitlerin dağılım diyagramı.....	34
Şekil 3.4: Protein hidrofobisite diyagramı.....	35
Şekil 3.5: Genimizin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı.....	36
Şekil 3.6: Genimizin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı.....	36
Şekil 3.7: Genimizin NCBI da nükleotid blast sonuçları.	38
Şekil 3.8: NCBI dan tahmini aminoasit dizimizin blastP sonuçları.	39
Şekil 3.9: Dizileme sonucu.....	40
Şekil 3.10: NCBI ikili blast sonucu.	41
Şekil 3.11: Bioedit ile Polimorfizm Analizi.	42
Şekil 3.12: Nükleotid polimorfizminin filogenetik ağacı.....	43
Şekil 3.13: Protein Dizilerinden Polimorfizmin filogenetik ağacı.	44
Şekil 3.14: Zamansal olarak Süperoksit genine oranla ekspresyon seviyesi....	45
Şekil 3.15: Zamansal olarak Ubiquitin genine oranla ekspresyon seviyesi.....	46
Şekil 3.16: Zamansal GAPDH genine oranla ekspresyon seviyesi.	46
Şekil 3.17: Dokusal olarak Süperoksit Dismutaz genine oranla ekspresyon seviyesini belirten grafik.	48
Şekil 3.18: Dokusal olarak Ubiquitin genine oranla ekspresyon seviyesi.....	49
Şekil 3.19: Dokusal olarak GAPDH genine oranla ekspresyon seviyesi.	50
Şekil 3.20: His- taq kuyruklu primerlerle yapılan PZR deneyi sonuçları.....	51
Şekil 3.21: Rekombinant DH10B suşunun kolonileri.	52
Şekil 3.22: Rekombinant DH10B nin koloni PZR'ı.....	53
Şekil 3.23: Plazmit DNA İzolasyonu sonuçları.	54
Şekil 3.24: Plazmit DNA'nın dizileme sonuçları.	55
Şekil 3.25: İkili blast sonuçları.	56
Şekil 3.26: Rekombinant BL21 suşunun kolonileri.....	57
Şekil 3.27: SDS- Page deneyi sonrası elde edilen görüntü.....	58
Şekil 3.28: Western Blot Deneyi sonucu elde edilen görüntü.	59
Şekil 3.29: Western Blot Deneyi sonucu elde edilen görüntü.	59

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: 2003 yılı tahmini ekili hektar başına zeytin verimi (Zeytincilik Enstitüsü).....	3
Tablo 1.2: 2015 yılı ton bazında zeytin üretim rakamları (Uluslararası Zeytin Konsili).....	4
Tablo 1.3: 2015 yılı ton bazında zeytin ithalat rakamları (Uluslararası Zeytin Konsili).....	5
Tablo 1.4: 2015 yılı ton bazında zeytin ihracat rakamları (Uluslararası Zeytin Konsili).....	6
Tablo 2.1: Mix PZR deneyi için kullanılan içerik.....	18
Tablo 2.2: PZR karışımı ile yapılan amplifikasyon koşulları.....	18
Tablo 2.3: Polimorfizm analizi için toplanan zeytinin çeşitleri.....	20
Tablo 2.4: Gerçek zamanlı PZR içeriği.....	23
Tablo 2.5: Gerçek zamanlı PZR şartları.....	23
Tablo 2.6: Genimizi plate 51 vektörüne klonlama prosedürü tablosu.....	24
Tablo 2.7: Antikor hazırlama.....	30
Tablo 2.8: 1x TBST hazırlama.....	30
Tablo 2.9: Ecl hazırlama.....	31
Tablo 3.1: İçinde tasarlanılan primer dizilerinin yer aldığı tablo.....	32

SEMBOL LİSTESİ

Nt	:	Nükleotid
kDa	:	Kilo Dalton
RNA	:	Ribonükleik Asit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
gDNA	:	Genomik DNA
cDNA	:	Komplementer DNA
dNTP	:	Dinükleotit trifosfat
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
TAE	:	Tris-asetat
IPTG	:	İsopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
NH₄SO₄	:	Amonyum Sülfat
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TE	:	Tris-EDTA
TBS	:	Tris-Tamponlu Tuz
TBST	:	Tris-Buffered Saline ve Tween 20
LB	:	Luria-Bertani
PMSF	:	Phenylmethane Sulfonyl Fluoride
ECL	:	Enhanced Chemiluminescent
WD	:	Tryptophane (W)- Aspartic Asid (D) dipeptide
DDB1	:	DNA damage binding protein 1
CUL4A	:	Cullin- 4A
ARC1	:	Armadillo Repeat Complex 1
SOCS	:	Supressor of Cytokine Signaling
SI (KU)	:	Self Incompatibility (Kendine Uyuşmazlık)
S- RNase	:	Self Ribonuclease
GSI	:	Gametofik Self Incompatibility (Gametofik Kendine Uyuş
SSI	:	Sporofik Self Incompatibility
GKU	:	Gametofik Kendine Uyuşmazlık
SKU	:	Sporofik Kendine Uyuşmazlık
SRK	:	S- locus Receptor Kinase
SLG	:	S- locus Glycoprotein
ROS	:	Reaktif Oksijen Gazı
NO	:	Nitrik Oksit Gazı
E.coli	:	Echericia coli

ÖNSÖZ

2014 yılında başlamış olduğum yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar arkadaşlarım ile beraber zeytin genomu üzerinde bir takım faydalı çalışmalar yaptık. Başta danışman hocalarım Doç. Dr. Ekrem Dünder ve Prof. Dr. Gülendem Tümen olmak üzere laboratuvar arkadaşlarım, Yard. Doç. Dr. Görkem Deniz Sönmez, Tuğba Çakmak, Sümeyye Altunok, Büşra Baş, Özgün Salı, Eda Baki, ve Suna Bozkurt'a yardımları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım bilgileriyle beni aydınlatan hocalarım, Doç. Dr. Ekrem Dünder hocama, değerli bölüm hocalarım Doç. Dr. Fatih Coşkun, Prof. Dr. Feray Köçkarhocalarıma çok teşekkür etmek isterim. Lisans eğitimimi tamamladığım Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne ve hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir'de ve Bursa'da beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım, dostlarım her türlü zorlukta yanımda oldular onlara teşekkür ederim. En önemlisi Doğumumdan itibaren yanımda olan maddi manevi her türlü desteği üzerimden esirgemeyen aileme, dedem Emin Kaya, babaannem Necla Kaya, babam Hamdi Kaya, annem Hanife Kaya, kardeşim Miray Kaya'ya şükranlarımı sunarım çok teşekkür ederim iyi ki yanımdalar.

1. GİRİŞ

Zeytin ağacı gerek meyvesinden faydalandığı için gerekse odunundan ve yağından etkili şekilde faydalandığı için uzun yıllar boyu tarımı yapılmış ve doğada yabani şartlarda yaşamı devam etmiştir. Zeytin insanlık tarihi boyunca uzun çabalarla kültüre edilmeye çalışılmıştır. İnsan ile zeytin arasındaki ilişkinin mazisi çok eskilere dayanmaktadır. İlk olarak tek tanrılı, semavi dinlerin kutsal kitaplarında zeytin ile ilgili; Nuh tufanından sonra, Hz. Nuh'un gemiden anakarayı bulması için gönderdiği güvercinin gemiye ağızında bir zeytin dalıyla gelmesidir. Tevrat'ta, "Yahovanın" Musa peygambere zeytinyağı ile seçkin parfümlerin karışımından bir vaftiz yağının reçetesini verdiği anlatılmaktadır. İncil'de, "Genthsemane Bahçesinde" bulunan 8 büyük zeytin ağacının Hz. İsa'nın dualarına gözyaşlarına tanık olduğu yer almaktadır. Kur'an'da da zeytinin kutsal bir ağaç olduğu, Sina Dağı'nda yetiştirildiği, sıkılarak yağının çıkarıldığı, bu yağın yemeklere lezzet, hastalıklara şifa vermek için kullanıldığı yer almaktadır. İnsan ile zeytin arasındaki yakın ilişki böylece kutsal kitapların ayetlerine bile yansımıştır. Yazılı olan bu kaynakların dışında, Yunan mitolojisinde de zeytinden; Tanrıça Athena'nın hayatını sürdürebilmesi için zeytin ağacına sürekli bakması gerektiği şeklinde bahsedilmektedir. Ayrıca o çağlarda zeytin ağacına zarar verenlerin ölüm cezasına çarptırıldığı, kralların ve yeni doğan bebeklerin kutsanmasında kullanıldığı da rivayet edilmektedir. Zeytin ağacının akıl ve zaferin, zeytin dalının barışın, zeytin yağının da saflık ve sadeliğin sembolü sayıldığı nesilden nesile aktarılmış, birer efsane ya da mit halinde kayıtlara geçmiştir.

1.1 Zeytin Morfolojisi ve Coğrafik Dağılımı

Zeytin bitkisi Akdeniz ikliminin yaşandığı alanlarda yayılış gösteren 1500 yıldan fazla yaşadığı düşünülen uzun ömürlü, boyları 10 metreye kadar ulaşabilen her dem yeşil, çok yıllık bir ağaç olarak tespit edildi. Yaprakları 4-6 santimetre boyunda 1-3 santimetre genişliğinde gümüş yeşil renkte, çiçekleri er dişi yapısında bifid çiçek oluşumlu olduğu öğrenildi. Çiçekleri 1 adet stigma, 2 adet stamenden oluşan beyaz ve tüylü bir yapıda olduğu görüldü. Günümüzde de özellikle aralarında İtalya, İspanya, Yunanistan, İsrail, Fas gibi Akdeniz ikliminin ağırlıklı yaşandığı ülkelerde ekonomik değerinden ötürü zeytin yetiştiricisine ve tarımına büyük önem verilmekte çok geniş tarım arazileri zeytin yetiştirmek için kullanılmakta olduğu ve kullanılacağı çıkarımında bulunuldu.

1.1.1 Zeytinin Ekonomik Yönü

Dünyada kültürü en fazla yapılan meyve ağaçlarından biri olan zeytin hakkında; 2003 yılı Zeytincilik Enstitüsünden ve 2015 yılı Uluslararası Zeytin Konsilinin yayınladığı rakamlardan esinlenerek oluşturulan verilere göre en fazla yetiştiren ülke 9634576 hektar üzerine ekili zeytin kültürlerinden 7820060 ton ürün elde eden İspanya'dır. İspanya'dan sonra sırasıyla İtalya, Yunanistan ve son olarak kendine 4. sırada yer bulan, 798493 hektar alana ekili olan zeytin arazilerden 1750000 ton zeytin üreten Türkiyeyi aldı (Tablo 1.1, Tablo 1.2, Tablo 1.3, Tablo 1.4).

Tablo 1.1: 2003 yılı tahmini ekili hektar başına zeytin verimi (Zeyticilik Enstitüsü).

Sıralama	Bölge/ Ülke	Üretim (Ton)	Ekili Alan (Hektar)	Verim (Ton/Hektar)
1.	İspanya	7.820.100	2.330.400	29,781
2.	İtalya	3.182.150	1.444.420	27,806
3.	Yunanistan	1.950.000	850.000	23,527
4.	Türkiye	1.760.000	798.443	21,918
5.	Fas	1.416.000	597.513	22,835
6.	Suriye	1.100.000	684.490	16,003
7.	Cezayir	611.000	295.000	14,237
8.	Tunus	561.900	1.779.950	4,848
9.	Mısır	460.000	52.668	87,273
10.	Portekiz	444.000	343.200	12,931
<u>Toplam</u>	<u>Dünya</u>	<u>19.305.150</u>	<u>9.634.576</u>	<u>20,598</u>

Tablo 1.2: 2015 yılı ton bazında zeytin üretim rakamları.

(Uluslararası Zeytin Konsili)

ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016	ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016
ARNAVUTLUK	30	26	S. ARABİSTAN	4.5	4.5
CEZAYİR	232.5	235	AVUSTRALYA	4	4
ARJANTİN	29	119	BREZİLYA		
KIBRIS	-	-	BULGARİSTAN		
HIRVATİSTAN	-	-	KANADA		
MISIR	399	471	ŞİLİ	34.5	34
İRAN	66.5	88	USA	35.5	54
IRAK	8	8	JAPONYA		
İSRAİL	16	15	MEKSİKA	8	8
ÜRDÜN	28	30	FİLİSTİN	12.5	12.5
LÜBNAN	17	17	PERU	80	80
LİBYA	3	3	RUSYA		
FAS	100	120	İSVİÇRE		
KARADAĞ	-	-	DIĞER	15	15
SURİYE	75	180	<u>TOPLAM</u>	192	212,5
TUNUS	25	25			
TÜRKİYE	410	397			
AVRUPA BİRLİĞİ	841.5	796			
URUGUAY	-	-			
<u>TOPLAM</u>	2.279,5	2.531			

Tablo 1.3: 2015 yılı ton bazında zeytin ithalat rakamları

(Uluslararası Zeytin Konsili).

ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016	ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016
ARNAVUTLUK	3	2	S. ARABİSTAN	38,5	38,5
CEZAYİR	-	-	AVUSTRALYA	16	16
ARJANTİN	-	-	BREZİLYA	103	102
KIBRIS	-	-	BULGARİSTAN		
HIRVATİSTAN	-	-	KANADA	30	30
MISIR	-	-	ŞİLİ	15	15
İRAN			USA	153	153
IRAK	15	15	JAPONYA	4,5	4,5
İSRAİL	4	4	MEKSİKA	10	10
ÜRDÜN	2	2	FİLİSTİN	-	-
LÜBNAN	2	2	PERU	-	
LİBYA	11	11	RUSYA	60	60
FAS	-	-	İSVİÇRE	6	6
KARADAĞ	-	-	DİĞER	70,5	70,5
SURİYE	-	-	<u>TOPLAM</u>	506,5	505,5
TUNUS	-	-			
TÜRKİYE	113	111			
AVRUPA BİRLİĞİ	4	4			
URUGUAY	-	-			
<u>TOPLAM</u>	154	151			

Tablo 1.4: 2015 yılı ton bazında zeytin ihracat rakamları (Uluslararası Zeytin Konsili).

ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016	ÜLKE	2014/ 2015	2015/ 2016
ARNAVUTLUK	2,5	2	S. ARABİSTAN	-	-
CEZAYİR	-	-	AVUSTRALYA	-	-
ARJANTİN	38	60	BREZİLYA	-	-
KIBRIS	-	-	BULGARİSTAN	-	-
HIRVATİSTAN	-	-	KANADA	-	-
MISIR	70	100	ŞİLİ	2	2
İRAN	-	-	USA	6	8
IRAK	-	-	JAPONYA	-	-
İSRAİL	-	-	MEKSİKA	1,5	1,5
ÜRDÜN	4	4	FİLİSTİN	1	0,5
LÜBNAN	1,5	1,5	PERU	32	32,5
LİBYA	11	11	RUSYA	-	-
FAS	70	80,5	İSVİÇRE	-	-
KARADAĞ	-	-	DIĞER	-	-
SURİYE	-	25	<u>TOPLAM</u>	42,5	42,5
TUNUS	3	3			
TÜRKİYE	73	73			
AVRUPA BİRLİĞİ	319	303			
URUGUAY	-	-			
<u>TOPLAM</u>	581	648,5			

Bölümde yer alan tablolardaki veriler eşliğinde yapılacak yoruma göre Türkiye, Avrupa Birliği ve Mısır'dan sonra en çok zeytin üretimi yapan ülke durumunda iken, ihracatında üretimi oranında bir düşüş görülmektedir yani zeytinimizi yeterince ülke dışına ihraç edemez konumdayız. Öyle ki Türkiye'den çok daha az zeytin üreten Fas ihracat rakamı olarak Türkiye'nin önüne geçmektedir. Uluslararası Zeytin Konsili'nin yayınladığı tüketim rakamlarına bakıldığında ise Avrupa Birliği ve Mısır'dan sonra 3 sırada gelmekteyiz. Bu çalışma, katkıda bulunması umularak zeytinde var yılı, yok yılı, zeytinde kaliteyi artırma, zeytinde üretimi artırma gibi unsurlarını da hedefleyerek gelecek çalışmalara merdiven vazifesi görmesi için yapılmıştır. Daha önceden çıkartılan zeytin genomunun içinden bir gen dizisine moleküler kimlik kazandırılmıştır.

1.2 WD40 Tekrarlarının İşlevi ve Yapısı

WD40 domaini Triptofan- aspartic asit aminoasitleri ağırlıkta olmak üzere tekrarlanan 40 aminoasitten oluşur ve peptid zincirinin N- Terminal bölgesinin yanında, Glisin- Histidin peptidinin olduğu yerde yada C- terminalinin olduğu bölgede yer alabilirler [1]. En iyi karakterize edilmiş WD proteinlerinin kristalize 3 boyutlu yapısı, heterotrimerik G proteinin β alt ünitesi olduğu ve G proteinlerinin kristal yapı çalışmalarıyla elde edilen bigilerle WD proteini, yüksekçe simetrik β propel bağı ile bağlı her tekrar küçük 4'lü β tuşlarını içermektedir [2]. Bu durum ilerleyen bölümlerde de gösterilecek olan WD40 tekrarlarını içeren bir proteinin kaba hatlarıyla 3 boyutlu yapısını tarif etmektedir.

WD40 tekrarı içeren proteini kodlayan gen bitkilerde temel olarak protein – protein, DNA- protein etkileşiminde hizmet sağlayıp, sinyal transdüksiyonun temel mekanizmalarında görev alır [1]. WD40 tekrarları ayrıca çeşitli hücre proseslerinde, hücre bölünmesi, çiçek gelişimi [3], hafif sinyal oluşumu, ikincil metabolizma, bitkinin doğal bağışıklığı gibi aktivitelerde de rol almaktadır [4]. Abiotik stres esnasında bitkiler, tuzluluk, UV ve sıcaklığın anormal değiştiği durumlarda dehidrasyon sentez ifadesini değiştirir ve DDB1 gibi dehidrasyon cevap elementlerini ifade eder işte tam bu noktada WD40 tekrarları içeren proteinler bu elementleri regüle etmiş ve DNA,uv (ultraviöle) hasarı aldığında DDB1-CUL4A olarak isimlendirilen kompleksi oluşturmuştur [5]. Ayrıca WD40 tekrarlarının, histon metilasyonu basamaklarında E3- Ubiquitin görevini yerine getirebilmesi için, WD Tekrarlarını substrat tanıma ve moleküler adaptörülüğüne ihtiyacı olduğu saptanmış [6], ubiquinasyon sırasında tespit edilen 16 aminoasit deDWD kutusu olarak isimlendirilmiştir [7].

Bir makalede “ WD40 Tekrarlarının” bilinen en iyi fonksiyonunun F- box motifi içeren proteinlere benzer proteinleri substrat olarak tanıdığı belirtilmiştir [8]. Ayrıca Keten bitkisinde (*Linum usitatissimum*L.) polen uyumunu ve oluşumunu düzenlediği ifade edilmiştir [9]. Yine benzer konuyla alakalı olarak Rice İmmature Polen 1, 5 defa tekrar eden WD40 domainini içerdiği ve geç polen oluşumunu sağladığı aktarılmıştır [10].

1.2.1 Ubiquitinler ve WD40 Tekrarları ile İlişkisi

Hedef proteinlere Ubiquitinlerin bağlanması ve işlev görebilmesi için, Ubiquitin aktive edici enzim E1, Ubiquitin konjuge edici enzim E2, Ubiquitin Ligaz enzimi E3 olmak üzere 3 farklı Ubiquitin tanımlandı [11]. Kabaca söylemek gerekirse Ubiquitinler bitkilerde çeşitli düzenlemeleri yapmaktadırlar. Bunlar büyüme ve gelişmelerin düzenlenmesi [12], biyotik ve abiyotik stres oluşumlarına cevap [13], kromatin yapısının düzenlenmesi gibi [14] süreçlerde görev aldığı saptandı. E3 Ubiquitinler, WD40 Reseptör aracılığı ile birlikte 26S Proteasome Yolağını kullanarak protein aktivasyonu ya da degradasyonu için bir sinyal oluşturarak hareket edebilir [15]. İntraselüler yer belirteci, vesiküler trafiği ayarlama, histon modifikasyonu, transkripsiyonun düzenlenmesinde de görev alabilecekleri öğrenildi [16]. Dahası Ubiquitin Ligaz Geninin, Brassica' da kendine uyumsuz polenin reddi sırasında hedef proteinlerin ubiquinasyonlandığı ve bu deneyler sırasında ortamda bir "E3 Ubiquitin Ligaz" keşfedildiği "ARC1" olarak isimlendirildiği kaydedildi [17]. İncelenen bu son çalışmadan da yola çıkılarak ve yapılan literatür çalışması yeni bir ufuk açtı, Ubiquitin ve WD40 tekrarları arasındaki ilişkiyi tozlaşma, meyve oluşumu gibi proseslerde aramak üzere kendine-uyumsuzluk durumu araştırılmaya yönelildi.

1.3 Kendine Uyuşmazlık Durumu

Akdeniz mevsiminin yaşandığı ülkelerde ve özellikle de Türkiye gıda pazarında önemli bir yer tutan zeytin bitkisi ile ilgili sistematik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar yapılırken moleküler biyoloji alanında zeytin ile ilgili çalışmalara çok az rastlanmaktadır. Bitkiler üzerinde bu geni incelediğimizde, Kendine- Uyuşmazlık Geni ilk olarak, kendisiyle tozlaşmasını önleyen sistem "Self-Incompatibility" olarak isimlendirildi ve çalışıldı [18]. Kendi polenini red edip başka bir polenle döllenmiş çiçekli bitkilerde bu sistem çoklu aleller tarafından S- locusu adı verilen bir lokusta yer alan genler tarafından kontrol edilirdi [19]. Rosaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae familyalarındaki pistildeki S- locusunda temel glikoproteinler ve ribonükleazlar (RNase) üretilirdi [20].

Konuyu daha detaylı incelemek gerekirse kendine uyuşmazlık durumunda, tozlaşma sırasında bitki kendisinin olmayan S- RNase larıyla uyuşurken, kendinin olan S-RNase ları boşa çıkartan inaktif yapan bir sisteme sahip olmalıydı bu durum için kollaboratif sistem (iş birlikçi tanıma sistemi) önerildi [21]. Buna göre kendine uyuşmazlığın kontrolünü iki alel takımı tarafından yönetilmekteydi. Bunlardan birincisi kendine uyuşmazlık reaksiyonunu tetiklerken diğeri de polen tüpündeki gelişimi engellemektedir [22]. Bunlardan S- RNase lar pistilde kodlanarak uyuşmazlığı kontrol ederken, S- Locus F- Box Proteini polende kodlanmaktadır ve yine uyuşmazlığı kontrol etmektedir [23] [24]. Homomorfik çiçek yapısında olan angiosperm bitkilerde kendine uyuşmazlığın 2 tipi vardır. Birincisi Gametofik Kendine Uyuşmazlık (GKU), ikincisi ise Sporofik Kendine Uyuşmazlık (SKU) olarak isimlendirildi. Gametofik Kendine Uyuşmazlıkta her bir polen tanesinin polen tüpündeki gelişimi inhibe edilmektedir. Sporofik Kendine Uyuşmazlık ise genellikle stigma yüzeyinde polenin çimlenmesi engellenir veya polen tüpü gelişimi kısaltılır [25]. Tozlaşma sırasında görevli genleri tespit etme üzere yapılan bir çalışmada, Brassicaceae (turpgiller) familyasında bitkinin pistillerinde S- locusu üzerinde yer alan, stigma üzerinde erkek belirleyici olarak iş gören bir glikoprotein keşfedildi bu protein “SRK” olarak isimlendirildi. Sistince zengin proteinlerin ve stigma üzerinde kalan polen granüllerinin taşındığı reaksiyonları yapmakla sorumlu olduğu bildirildi [26]. Bu protein sporofik kendine uyuşmazlıkla ilişkilendirildi. Gametofik kendine uyuşmazlık sistemlerinde, çiçekte, stigmaya polen taşındığında sorumlu s- alel çiftlerinin ya da SLG nin etkisi ile çalışmaz. Çünkü polen tüpündeki gelişim engellendiği tespit edildi [27]. Kendine Uyuşurluk ve Kendine Uyuşmazlık durumu temel olarak: Plantaginaceae, Rosaceae, Solanaceae, Papaveraceae, ve Brassicaceae gibi beş familyayla ilişkilendirilmiştir [28]. Yukarıdaki beş familyadan Brassicaceae ve Papaveraceae familyasından Kendine Uyuşmazlığın Sporofik Kendine Uyuşmazlıkla sınırlı olduğu anlaşılırken, diğer üç familyada Gametofik Kendine Uyuşmazlığın olduğu anlaşılmıştır [29]. Böylece zaman içinde farklı bitkiler arasında kendine uyuşmazlık durumu farklılıklar göstermiştir.

1.4 Zeytinde Kendine Uyuşmazlık Durumu

Zeytinde dölleme ve çiçek gelişimi olayları genelde biyokimyasal, fitokimyasal ve fizyolojik olarak çalışmıştır. Konu ile ilgili olarak, çiçek gelişimi sırasında ROS ve NO gazlarının açığa çıkabileceği ve bu durumun Self-Incompatibility lokusundaki aktiviteden meydana gelebileceğini bildirilmiş ve ilerleyen çalışmalarda bu durumun aydınlatılacağı söylenmiştir [30].

Zeytinde tozlaşma sırasında toplanan örneklerden dölleme reaksiyonunun (kendine uyumsuzluk kontrolü) gerçekleştiği pistil, stigma yapılarında ROS gazı açığa çıkmıştır, ROS gazı yeşil floresan ışığa yapmıştır. Bu durumu diğer farklı dokuların kırmızı ışık yaymasıyla da gözlemlenmektedir [30]. Zeytinin üretiminin yapıldığı bahçelerde Kendine- Uyuşmazlık Durumu gözlemlenmiştir. Zeytinde uyumsuzluk durumu için GKU ile açıklama yapılmaya çalışılsa da meyve oluşumu kombinasyonlarının açıklamada başarısız olmuştur [31].

2. MATERİYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

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.

Polimorfizm çalışmaları için, Balıkesir'in Gömeç İlçesinde yer alan T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına Bağlı, Edremit Zeytin Üretme İstasyonu Müdürlüğü Bahçesinden, zeytinin 32 çeşidinin yaprak ve meyve örnekleri sıvı azotun içine toplandı. DNA izolasyonları yapıldı.

2.2 Bitki Materyallerinden DNA ve RNA İzolasyonları

Polimorfizm analizi, Gerçek zamanlıPZR çalışmaları, İntron analizi, saf ve tam uzunluktaki diziyi teyit etmek için ayrıcaklonlama çalışmalarında dakullanılmak üzere zeytinin farklı organ dokularının bölümlerinden DNA ve RNA izolasyonları yapıldı. İzolasyonları yaparken dokuları homojenize etmemiz gerekecekti, homojenizasyon, havan ve havaneliyle sıvı azotun içinde dondurulan doku örnekleri ezilerek yapıldı. Ayrıca, meyve, çekirdek gibisert dokuları homojenize edebilmek için çekirdek kırıcı ve el blendırı gibi mekanik araçlar kullanıldı.

2.3 DNA İzolasyonu (Ekstraksiyonu)

Sıvı azotla ve havan havaneli yardımıyla homojenize edilen doku örnekleri DNeasy Plant Mini Kit 50(Qiagen, Hilden, Germany, Kat. No:69104) ile bu kitin izolasyon protokolündeki adımlar uygulanarak izole edildi [32].

DNA ürünlerinin saflık tayinini belirlemek amacıyla %8'lik agaroz jelde koşturuldu.5 µL DNA örneği için 6 µL DNA marker (Fermentas, Vilnius, Litvanya, Kat.No: SM1333) kullanıldı ve sonuçlar UV görüntüleyicide görüntülenerek teyid edildi.Kalan ürünler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de buz dolabında muhafaza edildi.

2.4 RNA İzolasyonu

Homojenize edilmiş doku örneklerinin RNA izolasyonları Trizol yöntemi kullanılarak yine RNeasy Plant Mini Kit 50(Qiagen, Hilden, Germany, Kat. No: 74904) ürününün izolasyon protokol adımları uygulanarak yapıldı [33].

2.5 RNA Örneklerinden cDNA Eldesi

RNA örneklerini, Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher, Massachusetts, USA, Kat. No: K1621)kullanarak kitde tarif edilen prosedüre uygun olarak çeşitli klonlama ve gerçek zamanlıPZR deneyinde kullanılmak üzere komplementer DNA haline getirildi [34].Oluşturulan cDNA örneklerinin saflık tayinleri için %8 lik agaroz jelde koşturuldu.

Kitte ki tarif özetle, 6 µL total RNA 2 µL oligonükleotit eklendi, pipetaj yapıldı ve 70°'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra tüpe 10 µL reaksiyon karışımı ve 2 µL enzim karışımı eklendi ve pipetaj yapıldı.42 °C'de 1 saat ve 80° 'de 5 dakikainkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar bittikten sonra 30 µL distile su eklendi.

2.6 %0.8'lik Agaroz Jel Hazırlama

Hassas terazi üzerinde tartılan 0.8 gram toz agarozun üzerine 100 ml TAE eklendi, biraz karıştırılıp yüksek sıcaklıkta kaynatıldı, sıcaklığı 55 °C ye düştüğü zaman içine çeker ocakta yaklaşık 1.5 µL etidium bromid eklendi. Çeker ocakta biraz daha soğumaya bırakılan karışım jel tankına döküldü donmaya bırakıldı. Agaroz jel elektroforezi (Thermo Scientific, Massachusetts, U.S.A) elektroforez sistemi kullanıldı. Elektroforezde kullanılan Agaroz, Katalog No: 50004, Lonza, Darmstadt, Germany firmasından temin edilirken, TAE tampon çözeltisi için gerekli olan Tris-base, MERCK, Katalog No: K41623287 118/K42846187 144, Darmstadt, Germany firmasından, Borik Asit, AppliChem, Katalog No: A0768, Maryland Heights, MO, U.S.A, EDTA AppliChem, Katalog No: A5097,0250, Darmstadt, Germany firmasından temin edildi.

2.7 Biyoinformatik Analiz

Genimizi çoğaltmak, gen dizisini incelemek, tahmini protein yapısının saptanması ve incelenmesi çeşitli bilgisayar ve web üzerinden online olarak hizmet veren programlar kullanarak gen dizisi analiz edildi.

2.7.1 Primer Tasarımı

Zeytin genomik kütüphanesinin içinde bulunan Dk29 adı verilen 1616 nt uzunluğundaki tam uzunluktaki gen dizisini çoğaltmak için biri cDNA nın 5' ucundan diğeri 3' ucundan olmak üzere bir gene özgü primer çifti tasarlandı [35]. Daha sonra gerçek zamanlı PZR çalışmaları için birer primer çifti daha tasarlandı ve son olarak genimizi vektöre klonlama amacıyla LiCator adını verdiğimiz primerler tasarlandı. Primerlerin bir kısmı "Primer3" adında, online olarak çalışan bir web uygulamasından faydalanılarak tasarlandı [36]. Dizayn edilen primerler 'Macrogen (Korea)' dan sipariş edildi.

2.7.2 Dk29 Gen Dizisinin Açık Okuma Çerçevesinin Belirlenmesi

Gen dizisinin açık okuma çerçevesini belirlemek amacıyla (www.expasy.org) isimli online web hizmeti veren internet sitesine girildi. Resources A.Z'e tıklandı ve Translate'e gidildi. Verilen dizi gerekli boşluğa kopyalandı ve Translate Sequence yapıldı, okuma çerçeveleri arasında gen dizisine en uygun düşen uzunluktaki çerçeve seçildi [37].

2.7.3 Tahmini Aminoasit Dizisinin Eldesi ve Proteinin Tahmini Yapısı

Açık okuma çerçevesi belirlenen gen, Expasy uygulamasını kullanarak aynı zamanda tahmini protein dizisini, yaklaşık kaç aminoasit kodladığını, tahmini ağırlığı gibi bilgileri edindikten sonra yine aynı site içinde yer alan sırasıyla "Direct Submission to Swiss-Model" seçeneği ile tahmini olan proteinimizin yine tahmini olarak 3D yapısı öğrenildi, "ScanProsite tool" proteinin tahmini olarak içerebileceği motifler belirlendi, "Smart" seçeneğine gidilerek proteinimizin yine tahmini olarak N- terminal ve C- terminal bölgeleri belirlendi [37].

2.7.4 BlastN (Nükleotid Blast)

Bu bölümde www.ncbi.nlm.nih.gov internet adresine gidildi. Blast seçeneğine tıklandı ve BlastN seçeneği işaretlendi [38]. Gen dizisi, Bioedit adlı biyoinformatik yazılımından FASTA formatı olarak kopyalanıp "Somewhat Similar" seçeneği tıklanıp, blast edilip sonuçlar incelendi, şekil üzerinde gösterildi (Şekil 2.1).

2.7.5 BlastP (Protein Blast)

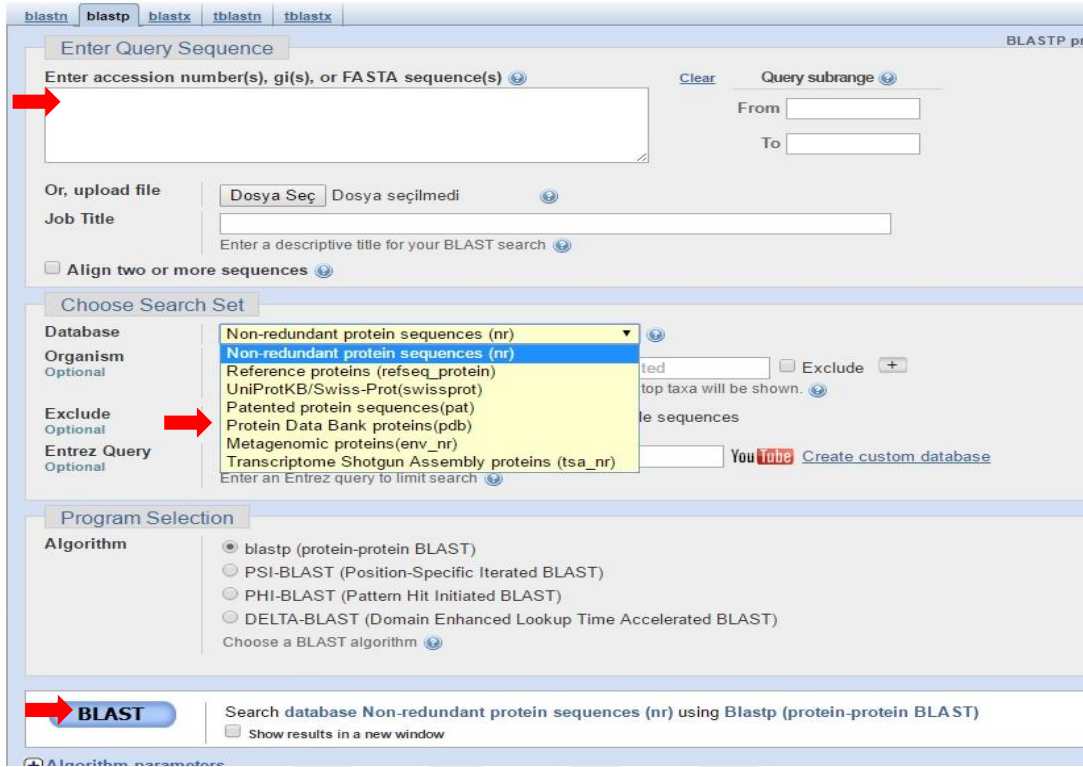
www.ncbi.nlm.nih.gov internet adresine girildi. Blast seçeneğine tıklandı ve BlastP seçeneğinin işaretlemesi yapıldı. Daha önceden belirlenen, açık okuma çerçevesindeki aminoasit dizisi FASTA formatı olarak kopyalanıp sitede dizi için bırakılan boşluğa yapıştırıldı, blast protein ayarlarından "Gen Bankası Proteinleri"

seçildi, blast edilip sonuçlar incelendi, aşamalara şekil üzerinde yer verildi(Şekil 2.2) [38].

Bu uygulamayı ve blastn kullanmamızdaki amaç, gen dizimizin yada protein dizimizin dünya üzerinde araştırılıp, gen veri bankasına yüklenen genlerden hangisine yada hangilerine benzerlik gösteriyor, bu genler hangi canlılarda sentezlenmiş yada hangi canlılarda çalışılmış olduğunu öğrenmekti. Yani bu genin yada proteinin yapısı ve işleyişi hakkında azda olsa bilgi edinmek ve literature çalışması yapmak amacı güdüldü.

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. The top navigation bar includes tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. The main content area is titled 'Enter Query Sequence' and contains a large text input field for the query sequence, a 'Clear' button, and a 'Query subrange' section with 'From' and 'To' input fields. Below this is the 'Or, upload file' section with a 'Dosya Seç' button and a 'Job Title' input field. The 'Choose Search Set' section includes options for 'Database' (Human genomic + transcript, Mouse genomic + transcript, Others (nr etc.)), 'Organism' (Optional), 'Exclude' (Optional), and 'Limit to Entrez Query' (Optional). The 'Program Selection' section has 'Optimize for' radio buttons for 'Highly similar sequences (megablast)', 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. At the bottom, there is a 'BLAST' button and a 'Show results in a new window' checkbox. The interface is in Turkish.

Şekil 2.1: NCBI nükleotid blast ekranı.



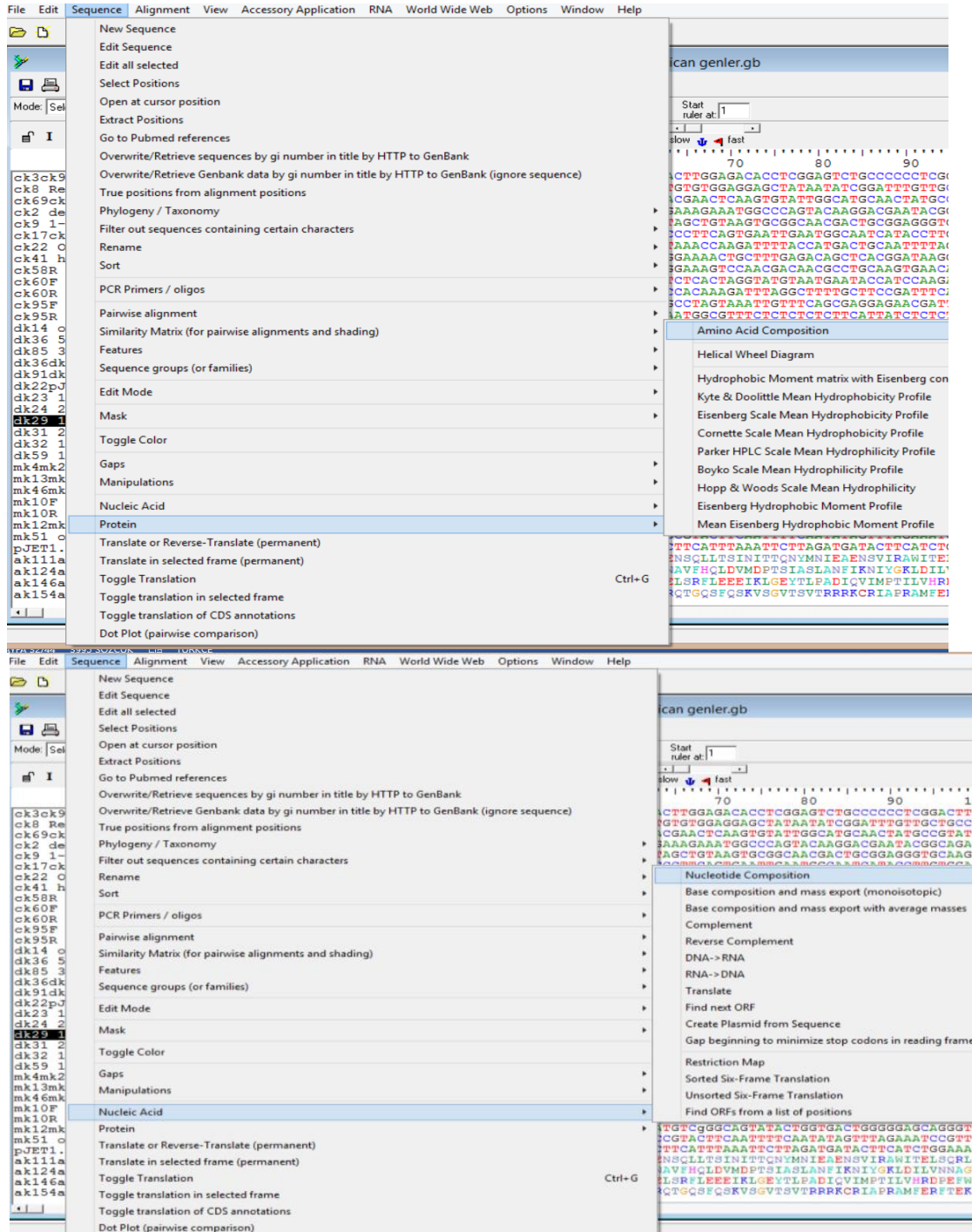
Şekil 2.2: NCBI protein blast ekranı.

2.7.6 Nükleotid Kompozisyonu

Gen dizisini aydınlatmak, primer dizaynına katkıda bulunmak ve gerekli incelemeleri yapmak amacıyla yapılan biyoinformatik çalışmalardan biride Bioedit yazılımı kullanılarak gen dizimizin nükleotid kompozisyonunu, A, T, G, S olarak yüzdelerinin ifade edildiği bir tablo oluşturmak oldu[39].

2.7.7 Aminoasit Kompozisyonu

Açık okuma çerçevesini daha önce belirlediğimiz gen dizisinin Bioedit biyoinformatik yazılımını kullanarak aminoasit dağılımı belirlendi ve bir tablo oluşturuldu, oluşturma aşamaları ayrıca gösterildi (Şekil 2.3). Tablodaki aminoasitlerin dağılımlarına göre tahmini olarak proteinin hidrofilik protein mi, yoksa hidrofobik bir protein mi olduğu öğrenildi. İçerdiği protein motifleri ve pH değeri gibi bilgilerde bu kompozisyon sayesinde çıkartılabildi.



Şekil 2.3: Bioedit protein nükleikası kompozisyonu oluşturma.

2.8 Gen Amplifikasyonu (Çoğaltılması) ve İtron Analizi

Gen dizisini 5' den ve 3' ne tam uzunlukta çoğaltması amacıyla daha önceki bölümlerde primer tasarlamıştık. Bu primeri kullanarak PZR reaksiyonu gerçekleştirerek gen çoğaltıldı. Sonuçlar %8'lik agaroz jelde görüntülendi. PZR sonuçları dizilemeye gönderildi. Tüm PZR çalışmaları standart olarak (Gerçek zamanlı PZR hariç), manuel PZR da, 2 µl kalıp DNA 0,4µl dNTP, 2,5µl NH₄SO₄, 1,5µl MgCl₂, 1,5µl DMSO, 0,3µl Taq polimeraz, 14,8µl dH₂O, 1 µl Forward primer, 1 µl Reverse primer ve gerçekleştirilirken; Mix PZR Tablo 2.8.1'de değinildiği üzere, 12,5 µl mix(OneTaq®2XMaster Mix ile Standart Tampon Katalog No: M0482L), 1 µl Forward primer, 1 µl Reverse primer ve 1 µl kalıp DNA ile gerçekleştirildi. PZR döngü koşulları standart olarak, Tablo 2.8.2'de tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Kabaca tarif etmek gerekirse, denatürasyon 95°C'de 30 sn, bağlanma 50°C'de 45 sn, son uzama 65°C'de 5 dk ve 35 döngü olacak şekilde PZR cihazına kuruldu, içerik ve koşullar tablo üzerinde ayrıca gösterildi (Tablo 2.1 ve Tablo 2.2).

Tablo 2.1: Mix PZR deneyi için kullanılan içerik.

PZR Komponentleri	Miktarları
Kalıp (gDNA, cDNA örnekleri)	2µL
Forward Primer	1µL
Reverse Primer	1µL
PZR Karışımı (OneTaq®2XMaster Mix with Standart Tampon Katalog No: M0482L)	12,5µL
Su	8,5µL
	Toplam Hacim: 25µL

Tablo 2.2: PZR karışımı ile yapılan amplifikasyon koşulları.

PZR Koşulları	Sıcaklık, Zaman
İlk Denatürasyon	94°C 30sn
Denatürasyon	94°C 30sn
Bağlanma	50 °C 45sn
İlk Uzama	68 °C 1dk
Son Uzama	68 °C 5dk
Saklama	4°C 10dk
Döngü Sayısı	35

2.9 Polimorfizm Analizi

Hedef dizi, Edremit Zeytin Üretim Müdürlüğü'nün bahçesinden toplanılan zeytinin farklı çeşitlerinden (Çeşitler Tablo 2.3' de gösterildi) elde edilen gDNA'lar ve gene özgü tasarlanılan primerlerle PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. PZR deneylerinde GPDH primerleri ve Zeytinin Şamanlı çeşidi kontrol grubu olarak kullanıldı. Cihazda Mix PZR koşulları kullanıldı, her çeşitten 2µL gDNA kalıp olarak kullanıldı. Sonuçlar %8'lik agaroz jelde koşturuldu ve UV ışığın altında görüntülendi. Pozitif sonuç veren çeşitlerden elde edilen gen dizileri, dizilemeye gönderildi. Dizilemeden "forward dizi" ve "reverse dizi" olarak gelen sonuçlar, BioEdit yazılımı yardımıyla önce forward ve reverse diziler birleştirilip tek dizi haline getirildi. Daha sonra zeytinin çeşitlerinden elde edilen tek diziler alt alta hizalanıp BioEdit programıyla ClustalW seçeneğine tıklanıldı, zeytin çeşitleri arasındaki nükleotid farklılıkları saptandı, heterozigot bölgeler analiz edildi. Daha sonra alt alta hizalanan dizilerin çoğu "Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0)" isimli program kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulup zeytin çeşitlerinin akrabalık durumları incelendi. Bu deneyi yapmakla, gen dizisinin zeytin çeşitleri üzerinde bir marker (belirteç) gen olup olmadığının incelenmesi amaçlandı.

Tablo 2.3: Polimorfizm analizi için toplanan zeytinin çeşitleri.

Toplanılan Zeytin Çeşitleri	Toplanılan Zeytin Çeşitleri	Toplanılan Zeytin Çeşitleri
<i>Olea europaea</i> L. cv. Ascolona	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık(UB3)	<i>Olea europaea</i> L. cv. Kormano
<i>Olea europaea</i> L. cv. . Şamanlı	<i>Olea europaea</i> L. cv. Domat	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık (O308)
<i>Olea europaea</i> L. cv. Verdiel	<i>Olea europaea</i> L. cv. Leccino	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık (O108)
<i>Olea europaea</i> L. cv. Memeli	<i>Olea europaea</i> L. cv. Gordale	<i>Olea europaea</i> L. cv. Memecik
<i>Olea europaea</i> L. cv. Çakır	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık(UB1)	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Erkence	<i>Olea europaea</i> L. cv. Edinciksu	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik	<i>Olea europaea</i> L. cv. Hajiplanka	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu	<i>Olea europaea</i> L. cv. İzmir Sofralık	
<i>Olea europaea</i> L. cv. . Negriol	<i>Olea europaea</i> L. cv. Hermendes	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık(UB5)	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık	<i>Olea europaea</i> L. cv. Ayvalık(UB10)	

2.10 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

2.10.1 Zamansal Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

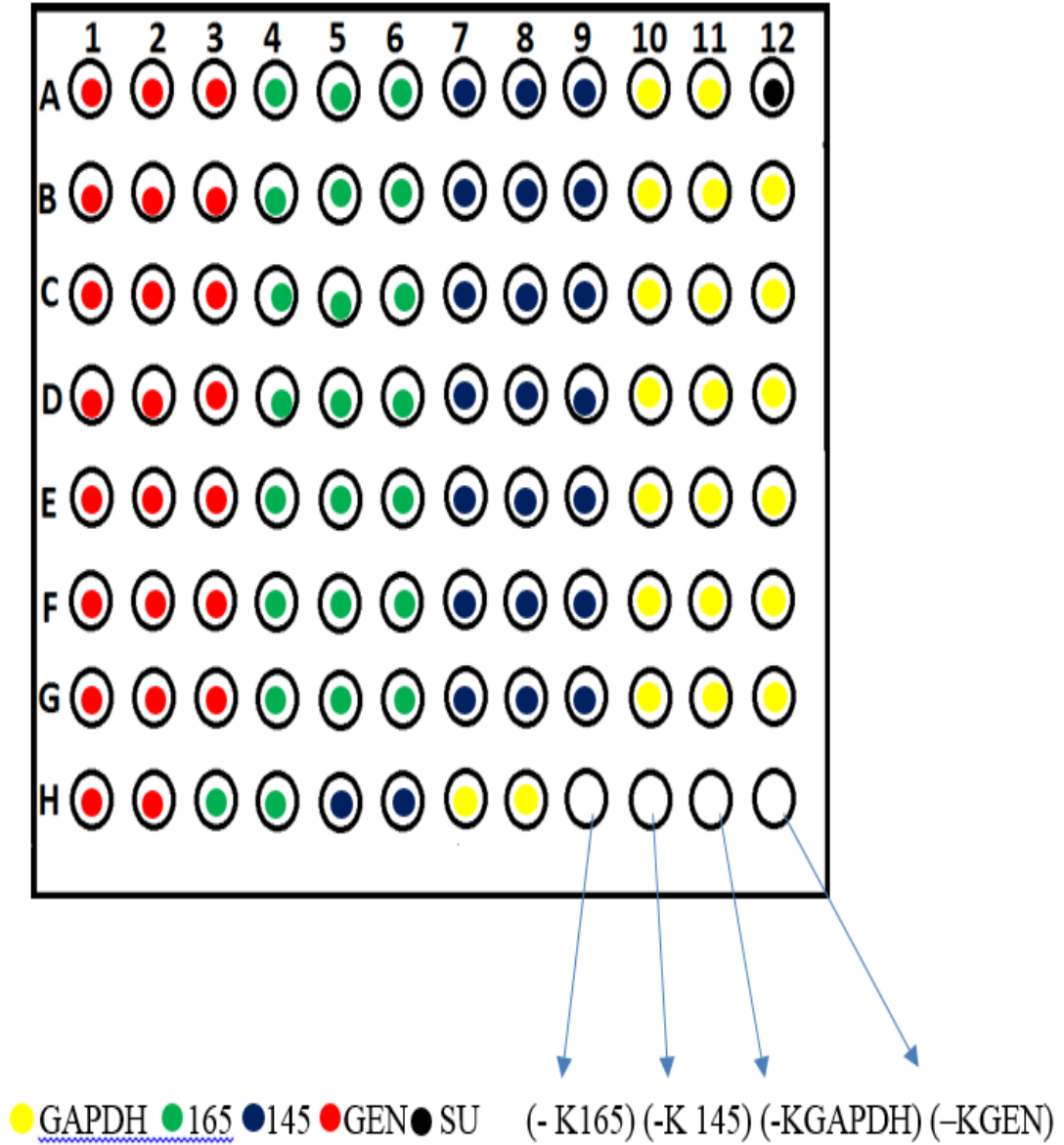
Genin ekspresyon (ifade) seviyelerinin belirleme amacıyla günümüzün önemli zeytin sorunlarından biri olan zeytin ağaçlarında “var yılı” ve “yok yılı” sorunsalı, şöyle ki bu sorunsalı açıklamak gerekirse iç ve dış etkiler tarafından kaynaklanan zeytin ağacının bir sene tam verimde meyve verip çiçek açarken, takiben diğer yıl çok çok az, hatta hiç meyve vermemesi durumudur, bu sorunsal baz alarak belirlenen Var Yılı Ağacı ve Yok Yılı Ağacı olarak ağaçların her birinden ayrı ayrı periyodik olarak her ay örnek toplandı ve bu örneklerden sırasıyla RNA izolasyonu ve cDNA eldesi yapıldı. Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak Gerçek zamanlıPZR (Real-Time PCR) deneyi yapıldı. Deneylerde genin küçük bir kısmını çoğaltacak daha önceki bölümlerde de belirtilen özel Real- Time Primerleri tasarlandı. Tasarlanılan bu primerler ve karakterize ettiğimiz genin ekspresyon seviyesi ile kıyaslayabilmek amacıyla kullanılan normalizatör primerlerle Gerçek zamanlıPZR deneyi yapıldı. Normalizatör olarak, GPDH (Glikoz 6 Fosfat Dehidrogenaz), 165 (Süperoksit Dismutaz), 145 (Ubiquitin) kullanıldı. PZR ekipmanı olarak: AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix 96 Well-Plate’i (Bioneer, California, USA, Kat. No: K- 6203) kullanıldı.Sonuçlar hesaplandı, grafik olarak ekrana yansıtıldı.

96 well– platelerin içine 1 µL kalıp cDNA örnekleri ve bu kalıplardan hariç forward ve reverse primerlerden 0.5’er µL, toplam hacim 20 µL olacak şekilde 18 µL DEPC’li su buz üzerinde, soğuk metal plate plaka üzerinde çabucak eklendi ve cihaza yüklenip uygun program seçilerek Gerçek zamanlıPZR’a Exicycler™ 96 BIONEER marka cihazla başlandı.

2.10.2 Dokusal Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Genin dokusal olarak ekspresyon seviyelerini belirleme amacıyla, zamansal ekspresyonu belirlemek için kullanılan yöntemden pek de farklı bir yöntem kullanılmadı, farklı olarak zeytin ağacının yaprak, tomurcuk, meyve, çiçek vs. gibi

organların dokularından izole edilen RNA örneklerinden cDNA örnekleri elde edildi. Reaksiyonlarda bu cDNA örnekleri 1'er µL olmak üzere kalıp olarak kullanıldı. PZR içeriği, Tablo 2.4, döngü koşulları, Tablo 2.5 ve Şekil 2.4'de de gerçek zamanlı PZR şablonu ifade edildi.



Şekil 2.4: Kullanılan 96 well- plate gerçek zamanlı pzs şablonu.

Tablo 2.4: Gerçek zamanlı PZR içeriği.

Ag- PZRKomponentleri	Miktarları
Forward Primer	0.5 µL
Reverse Primer	0.5 µL
Kalıp (cDNA)	1 µL
Su	18 µL

Tablo 2.5: Gerçek zamanlı PZR şartları.

Döngü Amacı	Sıcaklık	Süre	Döngü Adeti
Denatürasyon	95 °C	5 dk.	
Denatürasyon	94 °C	15 sn.	
Bağlanma	55 °C	15 sn.	
Tarama			
Uzama	72 °C	15 sn.	
Tekrar			35 döngü
Son Uzama	72 °C	1 dk.	
Ayrılma	70 °C - 94 °C	Her saniyede 1 °C artarak.	

2.11 Moleküler Klonlama ve Transformasyon

2.11.1 His- Taq Kuyruklu Primerlerle PZRDeneyi

Moleküler klonlamaya geçişin ilk basamağında, geni aLICator LIC Cloning and Expression Kit 1 de (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA, Kat. No: K1241) tarif edildiği şekilde gen dizisi plate 51 vektörüne N- Terminal uçlarından klonlamaya yardım edecek his- taq kuyruklu primerler tasarlandı [40]. Ayrıca tasarlanan bu primerler ile PZR kuruldu. Kalıp olarak cDNA kullanıldı ve genin His- Taq kuyruklu primerlerle çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri NucleoSpin Clean Up(Macherey- Nagel, Duren, Germany, Kat. No: 740770.10) DNA pürifikasyon kiti ile saflaştırıldı [41]. Oluşturulan saf gen ile Plate 51 vektörüne firma tarafından tarif edildiği şekilde klonlanması yapıldı [40]. Ek olarak klonlama prosedürü tablo üzerinde de gösterildi (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: Genimizi plate 51 vektörüne klonlama prosedürü tablosu.

Klonlama Kitinin İçeriği	Kullanılan Miktarlar
5X LIC Tamponu	2 µL
T4 DNA Polymerase	1 µL
EDTA Solüsyon	0.6 µL
Plate 51 Vektör	1 µL
Saf DNA	Baz Çiftinin Boyutuna Göre bç. İçin 4.7 µl eklendi
Nükleassız Su	Toplam hacim 10µl'ye tamamlandı

Klonlama yapılırken, - 20 °C den 5X LIC Tampon çıkartılıp buzu çözüldü ardından vortexlendi. Bir PZR tüpünün içine 2µL LIC Tampon eklendi.İçine Klonlama prosedürüne göre hesapladığımız saf gen miktarı ilave edilidi.Üzerine T4 DNA polimeraz ilave edildi.Karışım vortexlenip, 20- 25 °C oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakıldı.İnkübe süresi dolunca içine EDTA solüsyonu eklendi, karışım dikkatlice karıştırıldı.Bu karışımın da üzerine Plate 51 vektörü ve su eklenip oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakıldı.

2.11.2 *E.coli* nin ođaltma Suşuna (DH10B) Transformasyon

-80 °C' de ependorfların içinde 50 µL hacimde stok olarak beklettiğimiz *E. coli*' nin DH10B suşunun üzerine 5 µL bir önceki bölümde hazırlanılan klondan buz üzerinde ilave edildi. Bu karışım buz içinde 30 dk. inkübasyona bırakıldı, inkübasyon süresi dolduğunda 42 °C 1.5 dakika inkübasyona bırakıldı, daha sonra 2dk. buzda bekletildi.

İçinde bakteri suşu ve klon barındıran toplam hacmi 55 µL ürünün üzerine toplam hacim 500 µL olacak şekilde 445 µL sıvı LB besiyeri eklendi ve 37 °C 1.5 saat 220 rpm de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda karışım 3 dk. 3000 rpm'de santrifüj edildi. Rekombinant plazmiti içeren bakteriler çöktürüldü ve üzerinden 150 µL supernatant çekildi, kalan ürün ters düz edilip daha önce hazırlanılan petrilerin içinde bulunan içinde ampisilin ihtiva eden LB agarlı petrilere ekimi yapıldı. Petriler 37 °C'de 20 saat etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.12 Koloni PZR

Etüvde inkübasyona bırakılan ürünlerin içinden üreme olan petriler seçildi, petrilerin içinde bir koloni belirlenerek öze yardımıyla alındı, içinde 20 µL su olan PZR tüpünün içine konulup çözüldü sonra 10 adet PZR tüpü daha alındı içlerine 10 ar µL su konuldu ve içinde koloni barındıran PZR tüpünden 2 şer µL alınarak bu 10 PZR tüpünün içine alınarak seyreltildi. Şu 10 PZR tüpleri her biri ayrı ayrı olmak şartıyla kalıp olarak kullanıldı ve PZR kuruldu. PZR sonuçları %8 lik agaroz jelde görüntülendi. En iyi sonuç veren koloniler belirlendi ve plazmit DNA izolasyonu yapmak üzere ayrıldı.

2.13 Plazmit DNA İzolasyonu

İçerisinde ampisilin olan 10 mL sıvı LB besiyerinin içine, seçilen koloniler aktarıldı ve 1 gece 37 °C de 230 rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda 10 ml örnekten 5ml kompetan hücre hazırlamak amacıyla ayrıldı,

kalan 5 mL üründen 850 µL si alınarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmit DNA izolasyonu GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA, Cat. No: K0502) kullanılarak ve kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi [42].50 µL plazmit ürün elde edildi.Elde edilen plazmit ürününün 5 µL'si %8'lik agaroz jelde koşturuldu UV ışığın altında görüntülendi.Plazmitimizin 20µL'si klonlama kitinin primerleriyle dizilemeye gönderildi.

2.14 Rekombinant Plazmitin Ekspresyon Suşuna Transformasyonu

Daha önceki bölümlerde de anlatılan izole edilen plazmit DNA dan 5 µL - 80 °C de buzdolabında stok halinde bekletilen *E. coli*' nin BL21 suşuna buz üzerinde eklendi. 20 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, inkübasyon süresi dolduğunda karışım 42 °C de sıcak su banyosunda 1,5 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda sıcak su banyosundan alınan örnekler 2 dk. buz üzerinde bekletildi. 55 µL olan toplam hacmin üzerine toplam hacim 1000 µL yapacak şekilde sıvı LB besiyeri eklendi, çalkalamalı inkübatörde 37 °C de 230 rpm de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda içinde 1000 µL örnek olan ependorf 3000 rpm'de 3dk. santrifüj yapıldı.

Supernatanttan 300 µL si pipetle çekildi pellet çözüldü, karışım 400 µl ve 200 µL olarak ampisilinli LB agarlı (Fisher Scientific markalı) petrilere ekildi. Petrilere etüvde 37 °C de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.15 IPTG İle İndükleme

Rekombinant plazmitimizi daha önceden *E.coli*'nin BL21 suşuna klonlanmıştı. Petrilere üreme olan koloniler tespit edildi. Tespit edilen kolonilerden ön kültür yapıldı, şöyleki rekombinant plazmitimizi taşıyan kolonilerden 1 tanesi öze yardımıyla alındı içinde 10 mL sıvı LB besiyeri olan falconun içine konuldu 37 °C de 220 rpm de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Yarın çalkalamalı inkübatörden alınacak ön kültür, içinde 100 mL LB besiyeri olan erlenin içine zerkedildi. 600 nm de ki OD değeri 0.5- 0.6 olana kadar yaklaşık 5 saat çalkalamalı inkübatörde hücreler büyütüldü ve OD değeri istediğimiz değer aralığına ulaştığında

erlenin içine 1000 µL IPTG ilave edildi, bakteri hücrelerinin protein sentezi indüklenmiş oldu.

Sıvı LB Besiyeri Hazırlama; 5 g toz tryptone, 2.5 g toz yeast ekstrakt, 2.5 g toz NaCl üzerine 500 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı pH 7' de sabitlendi ve çözelti otoklavlandı.

LB Agar Hazırlama;5 g toz tryptone, 2.5 g toz yeast ekstrakt, 2.5 g toz NaCl ve 7.5 g toz agaroz total hacim 500 mL olacak şekilde saf suyla tamamlandı pH 7'de sabitlendi ve çözelti otoklavlandı. Çözelti otoklavdan çıkartıldığında soğuması beklendi soğuduğunda üzerine 1mL ampisilin eklendi.

Standart otoklav şartları kullanıldı, 121°C 20 dk.

Ampisilin Hazırlama;0.25 g toz ampisilin üzerine 5 mL saf su eklendi ve karışım filtre edildi.

IPTG Hazırlama; 0.238 g toz IPTG üzerine 10 mL saf su eklendi ve çözelti filtre edildi.

0.1 M CaCl₂ Hazırlama;5.55 g toz CaCl₂ üzerine 500 mL saf su eklendi.

2.16 Proteinin Saflaştırılması

2.16.1 Çöktürme

IPTG ile indükleme işleminden sonra hücreler 5 mL'lik iki ayrı falkona eşit olarak ayrıldı, daha sonra örnekler 4°C de 10 dk. 10000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet – 20 °C de saklandı.

2.16.2 Lizis

Hazırlanan pelletin üzerine 1 mL PMSF eklendi, pipetaj yapıldı, üzerine 2 mL Lizis Tampon eklendi (Qiagen, Hilden, Germany), vortexlendi. Üzerine 125 µL lizozim eklendi, vortexlendi, 10- 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi, karışım sümüksü

bir kıvama geldiğinde, buz üzerine alındı, içine 1 mL protamin sülfat çözeltisi ilave edildi, 15 dk. buzun içinde bekletildi. İnkübasyon süresi bittiğinde ependorf 10000 rpm de 10 dk. santrifüj yapıldı. Supernatant alındı, saklandı, pellet atıldı. Lizise edilen sıvıda istenilen proteinin olup olmadığını teyid etmek amacıyla sds- page yapıldı.

2.16.3 SDS- PAGE Deneyi (Elektroforezi)

SDS- Page deneyine girişte ilk olarak ayırma jelini dökmekle işe başlandı. Ayırma jelinin içeriği; 2.5 mL Lower Tampon, 3.75 mL Bis- Akrilamid, 3.75 mL otoklavlanmış su, 100 µL APS, 10 µL TEMED karışımı jel kalıbına döküldü. Dökülen jeli düzleme amacıyla ayırma jelinin üzerine 5 µL izopropanol eklendi. Ayırma jelinin polimerleşmesi için beklenen 10 dk. sonrasında hemen yağma jeli döküldü. Yağma jeli 1.25 mL Bis- Akrilamid, 6.14 mL otoklavlanmış su, 2.5 mL Upper Tampon, 10 µL TEMED, 100 µL APS en son eklendi, jel tarafları oturtulup, jelin polimerleşmesi için 15 dk. beklenildi.

Yapılan SDS- Page deneyinde ikinci aşama örnekleri deneye hazırlamak oldu. Lizise edilen hücreler, 135 µL SDS boyası, 15 µL β- Merkaptto Etanol içeren boyayla boyandı. Boyama 30 µL lizise edilen hücreler ve 20 µL yukarıda anlatılan boya karışımının birbirine karıştırılmasıyla yapıldı. Daha sonra bu karışım 72 °C' de 10 dk. su banyosunda inkübasyona bırakıldı.

Hazırlanan örneklerden kuyucuklara 20 µL, 5 µL protein marker (Thermo Scientific, USA, 26619 katalog numaralı) kuyucuğa eklendi. İlk olarak 90 Volt akım da 25 dk. elektroforez tankında koşturuldu, daha sonra ayırma jelin de örnekler ve marker hizalandığında 120 Voltta 1 saat koşturuldu. Elektroforez işlemi tamamlandığında SDS Jeli dikkatlice kalıptan çıkartılıp, 45 dk. Comassie Metilen Blue boyasında çalkalamalı etüvde 70 rpm' de oda sıcaklığında tutuldu. Boyama olduktan sonra boyanın içinden alınan jel 1 gün boyunca renk açma solüsyonunda bekletildi. Sonuçlar görüntüleyicide görüntülenip kayıt altında alındı. SDS- Page deneyi "Bio-Rad PowerPac Basic System" kullanılarak yapılmıştır.

Amonyum Persülfat (APS) Hazırlama; % 10'luk amonyum persülfat (APS) 0,1 gr APS'nin 1 mL dH₂O çözünmesiyle hazırlanmaktadır.

Yürütme Tamponunun Hazırlanması;100 mL 10X Tris-Glisin SDS Buffer'ın üzeri otoklavlı suyla (900 mL) 1L'ye tamamlandı. Tris, pH ortamı uygun olmasını sağlarken glisin, örneklerin kuyucuklar içinde tutunmasına katkıda bulunur.

2.16.4 Western Blot Analizi

Western Blot deneyi yapısı bakımından yukarıda tarif edilen SDS- Page deneyine benzer unsurlar göstermektedir. Bu benzer unsurlar, ikiside Bis- Akrilamid yapılı jelde aynı elektroforez tankında, aynı şekilde boyanmış olan örneklerin benzer süre ve voltta yürütülmesinden ibaret oldu. Bu bağlamda Western Blot deneyinin SDS- Page deneyinden farkı, ayrıca yapılan blokajlama, antibody ile yapılan antikorlama işlemlerinden geçirilmesiyle gerçekleştirildi.

Yukarıda bahsettiğimiz bilgiler göz önünde tutularak elektroforez sonunda içinde protein örneklerimiz bulunan Bis- Akrilamid Jel dikkatlice Transfer Tamponunun içine alındı. 5- 10 dk. Tampon içinde bekletilen jel, sırasıyla kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı olacak şekilde sandviç haline getirildi. Bu işlemler transfer tamponu olan ortamda yapıldı. Sonrasında içinde membran ve jelin yer aldığı sandviç yapısı, transfer cihazının içine konuldu. 10 dk. jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için elektro şok verildi. Transfer süresi dolduğunda, membran alındı, 10 dk. da bir tazelenmesi şartıyla 30 dk. TBSTile yıkandı, süre dolduğunda membran 1 saat boyunca Blocking Tampon içinde bırakıldı, sonrasında membran tekrar TBS ile 3 set tekrar yıkandı. Ardından membrana 1 saat antikorlama yapıldı. Süre dolduğunda 40 dk. TBSde yıkandı.Eclile muamele edilen membran chemulinesans ışığa yaparak görüntüleyicide görünür hale getirildi. Membran görüntüleyicide görüntülendi. Sonuçlar kayıt altına alındı.Western- Blott Deneyi de "Bio-Rad PowerPac Basic System" kullanılarak yapılmıştır.

Antikor hazırlamak için, daha önce Tablo 2.7' de de belirtilen firmadan toz halde Penta·His HRP Conjugate antikor siparis edildi, kullanıma hazır hale getirmek için daha önceden hazırlanılan TBST'den (Tablo 2.8'de de gösterildi) 6 mL ve antikordan 6 µL olacak şekilde bir çözelti oluşturuldu ve bu çözelti filtre edildi.

Tablo 2.7: Antikor hazırlama.

Antikor Hazırlama	(QIAGEN, Hilden, GERMANY) Penta-His HRP Conjugate Kit Kat No./ID: 34460
Ant-i kor Miktarı	10 µL
TBST Miktarı	6 mL

Tablo 2.8: 1x TBST hazırlama.

1x TBST Hazırlama	1x TBST Hazırlama	1x TBST Hazırlama
NaCl		44 gr
Tris- Base		12 gr
Tris- HCl		2.8 gr
Twin20		500 µL
Saf Su		500 mL

Western- Blott deneyinin birçok basamağında kullanılmak üzere tampon olarak hizmet görmesi için, TBST adı verilen tampon oluşturuldu. 44 g NaCl, 12g Tris- Base, 2.8 g Tris- HCl, toplam hacim 500 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Bu çözelti üzerine 500 µL Twin20 ilave edildi.

Membranımızın üzerinde yer alan protein bölgelerini görüntüleme cihazında görünür hale getirebilmek membran üzerine ECL adını verdiğimiz Tablo 2.9'de de yer alan firmadan sipariş üzerine Pierce ECL isimli ürün elde edildi. İki farklı komponentden 3 mL Luminol Enhancer Solüsyon, 3 mL Peroxide Solüsyon olacak şekilde bir ependorfun içinde karıştırıldı kullanıldı.

Blocking Tampon Hazırlama; Antikorum hedef protein ve membran yüzeyine tutunabilmesi amacıyla bir blokajlama işlemi yapıldı. Blokajlama işlemi için Blocking Tampon oluşturuldu. Bu tampon için, QIAGEN Toz Blocking Reagent'dan 0.1 g, QIAGEN Reagent Buffer'dan 2 mL olacak şekilde ve son karışımın üzerine 18 mL TBST eklendi. Böylece Blocking Tampon oluşturuldu.

Tablo 2.9: Ecl hazırlama.

Ecl Hazırlama	Pierce ECL (Thermo Scientific, Mas., USA) Western Blotting Substrate Kat.No: 32106
Luminol Enhancer Solüsyon	3 mL
Peroxide Solüsyon	3 mL

3. BULGULAR

3.1 Tasarlanılan Primerler

Genimizi tam uzunlukta çoğaltmak amacıyla Primer 1, gerçek zamanlı PZR çalışmasında kullanılmak üzere Primer 2, genimizi ifade vektörlerine klonlamak için ise His- Tag kuyrukları içeren Primer 3 ve Primer 4 olarak isimlendirilen primerler forward ve revers olacak şekilde tasarlandı, Tablo 3.1’ de gösterildi. Toz halde elimize ulaşan primerler, kullanım talimatı üzerinde yazan miktarlar uyarınca otoklavlanmış su ile sulandırıldı. Daha sonra sulandırılmış primerler çalışmalarda kullanılmak üzere 1 e 9 oranında 10 µL’si sulandırılmış primer, 90 µL’si su toplam hacim 100 µL olacak şekilde seyreltildi.

Tablo 3.1: İçinde tasarlanılan primer dizilerinin yer aldığı tablo.

Primer Adı	Forward Dizi	Reverse Dizi
Primer 1	TGATAGAAGAAAGAAAAGG ATCGACAA	CTACATGAAGCGCTCCATT TATAAAG
Primer 2	TGATAGAAGAAAGAAAAGG ATCGACAA	CAATTAAACCATTTTGAG GCAAGTTTG
Primer3	GGTGATGATGATGACAAGAT GGTTCATATGTGTTCCACCAC	GGAGATGGGAAGTCATTA GCTGAGCCACTAGATT
Primer 4	GGTGATGATGATGACAAGAT GGTTCATATGTGTTCCACCAC	GGAGATGGGAAGTCATTA ATACTTTGCTGATAGTATT GATT

3.2 Aminoasit Dizisi ve Tahmini Protein Yapısı

331 Aminoasit'i kodlayan gen dizimiz ayrıca Expasy, SIB adlı çevrimiçi uygulama yardımıyla, yapısal olarak içinde Şekil 3.1'de 2 kez sarı boyalı alanda gösterildiği gibi WD40 tekrarı yapan ve bir F- Box motifi içeren protein olduğu öğrenildi [24].

```
MVHNVFTTTDENFAFSAYDLCSQSADASPTMMSPWNPTSPFMKSPWSNFN  
ETVLTTLNLPQONGLIGSFVRKEGHIYSLSVKNGILYTGSDSKNIRVWKNMK  
EFAAFKSNNSGFVKAI I ISGDKIFTGHQDGKIRVWKI SSKNPSNHKRVGTL  
PMFFDIFKASISQKIMWKSSEKRTTLWIKHADAI SCMSMNPEQEFLYSGS  
WDRTERVWRVSSSSCVESVKAHDDAVNSVVATLDGVVYTGSDGAVKVWK  
REQNGRYIRHVLVQTLLES GMCHHSIGRQQVGFGLQWLIRWTSELLGAR  
EAVVTRRSTQGSQTAGALSRHGRESSGQWLS 331
```

Şekil 3.1: Aminoasit diziliminde tespit edilen WD40 motifi.

Yapılan biyoinformatik çalışmalar ışığında genin tahmini olarak, 331 amino asidi kodladığı, 37 kDA ağırlığında bir protein olduğu, en çok “Serin” aminoasiti kodladığı öğrenildi, sonuçlar Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 üzerinden gösterildi. Proteinin genellikle hidrofobik bir yapıda olduğu elde edilen Şekil 3.4’de yer alan “Kyte&Doolittle” grafiğinden de anlaşıldığı üzere hidrofilik yapıyla taraflarında olduğu tespit edildi. Öyleyse bu proteinin bir “İntegral Membran Protein” olduğu yorumu yapıldı. Ayrıca genimizin yapısal olarakta 2 tane WD40Tkrarı motifi içermekte olan bir protein olduğu yapılan biyoinformatik çalışmalarla ortaya çıkartıldı. Literatür bölümünde WD40 geninin kodladığı proteinin 3 boyutlu kristalize yapısından bahsedildi. Bu bölümde 3 boyutlu kristalize biyoinformatik çalışılması da yapıldı. Proteinin tahmini 3 boyutlu yapısı, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da gözler önüne serildi. Şekilde β - propel bağları ve bu bağların bağladığı β tuşaları açıkça görülmekte ve 3’e katlanmalı (heterotrimeric) yapı, G proteini yapısında olduğu ayrıca incelendikten sonra görüldü.

Number of amino acids: 331

Molecular weight: 37065.0

Tahmini Moleküler Ağırlık 37 kDA

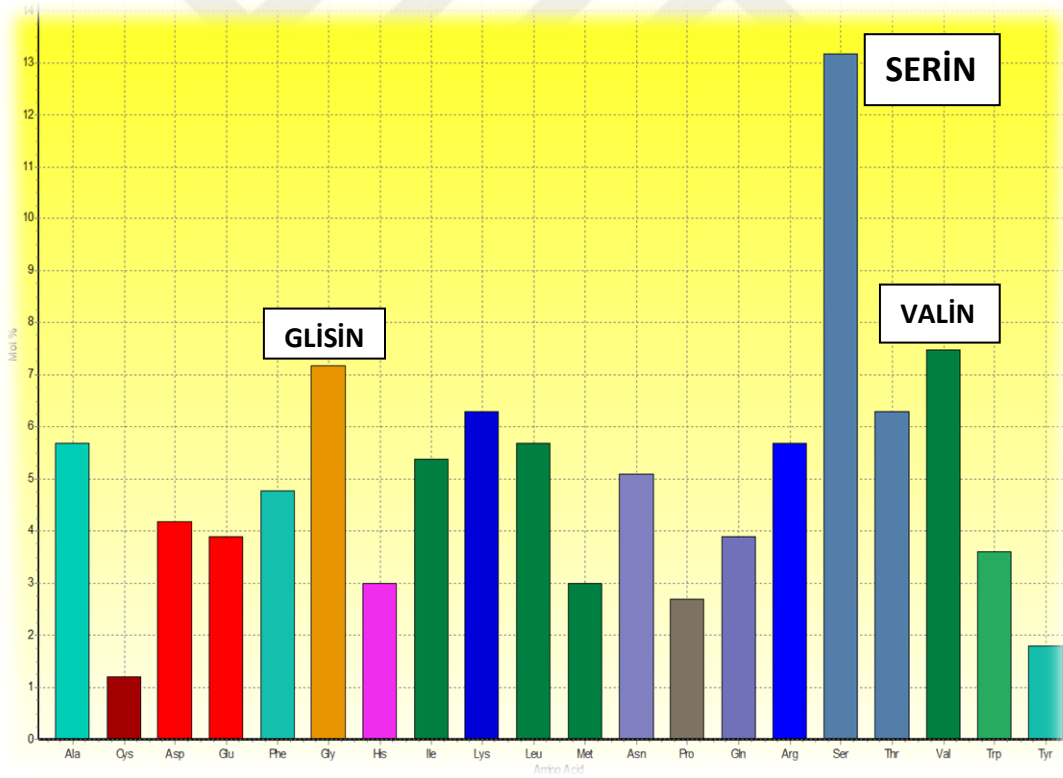
Theoretical pI: 9.67

Amino acid composition: C:

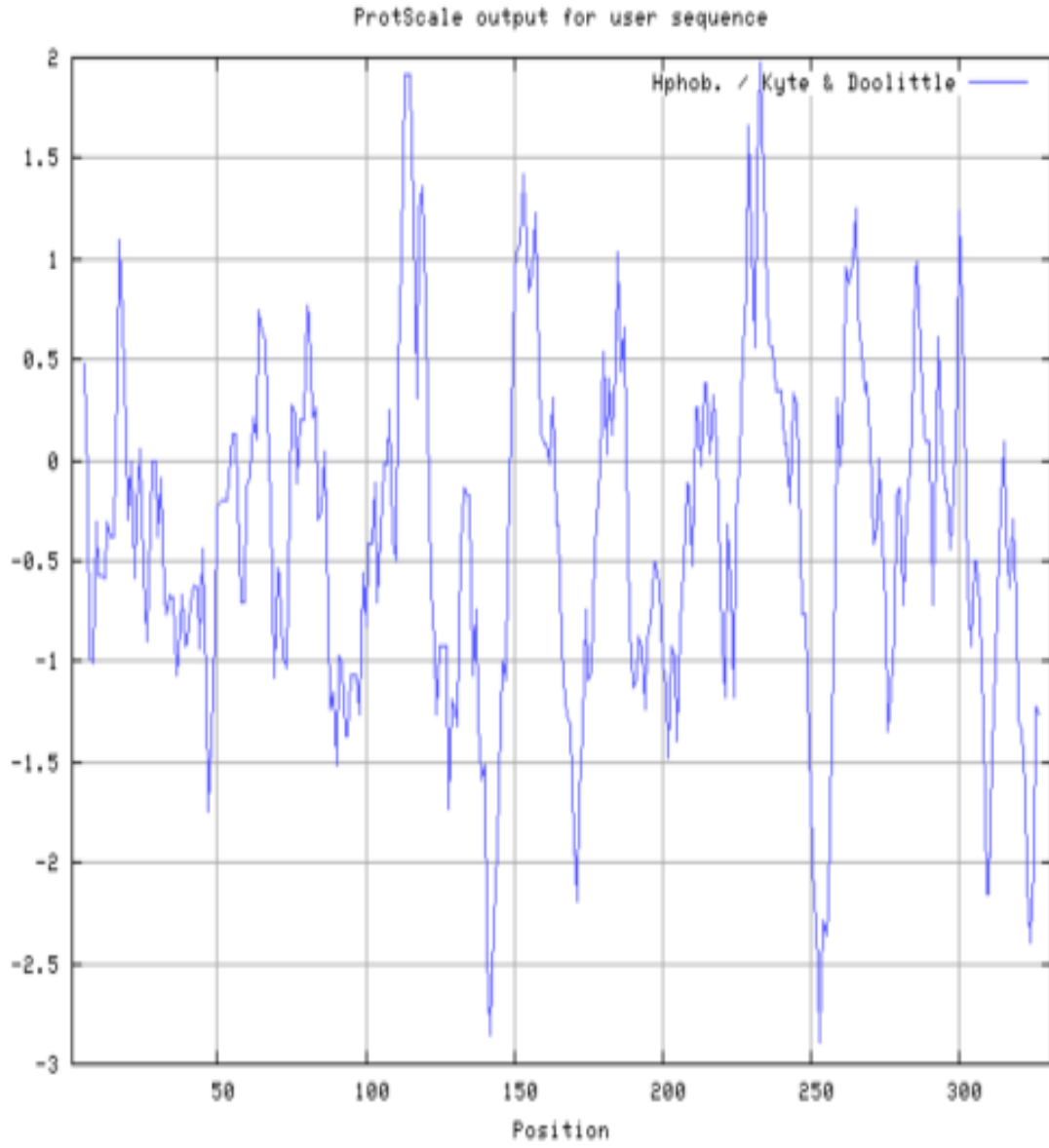
Ala (A)	19	5.7%
Arg (R)	18	5.4%
Asn (N)	16	4.8%
Asp (D)	13	3.9%
Cys (C)	4	1.2%
Gln (Q)	13	3.9%
Glu (E)	13	3.9%
Gly (G)	24	7.3%
His (H)	10	3.0%
Ile (I)	18	5.4%
Leu (L)	19	5.7%
Lys (K)	21	6.3%
Met (M)	10	3.0%
Phe (F)	16	4.8%
Pro (P)	9	2.7%
Ser (S)	44	13.3%
Thr (T)	21	6.3%
Trp (W)	12	3.6%
Tyr (Y)	6	1.8%
Val (V)	25	7.6%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

SERINE

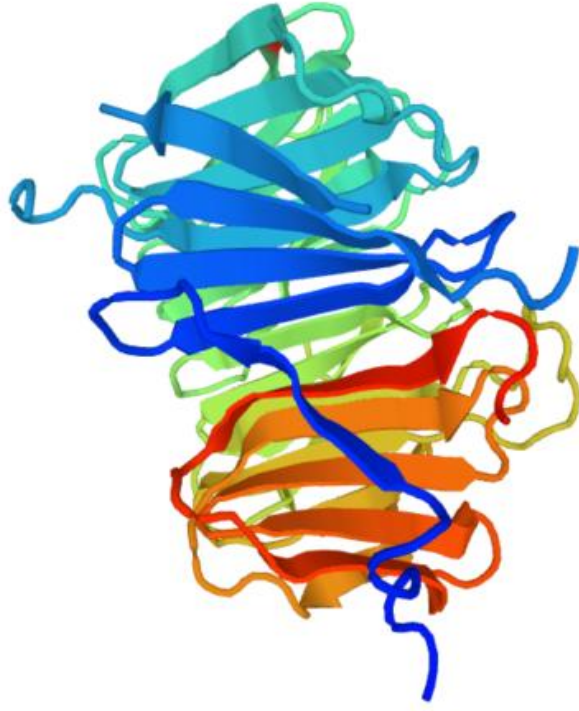
Şekil 3.2: Proteinin tahmini boyutu ve içerebileceği aminoasitler.



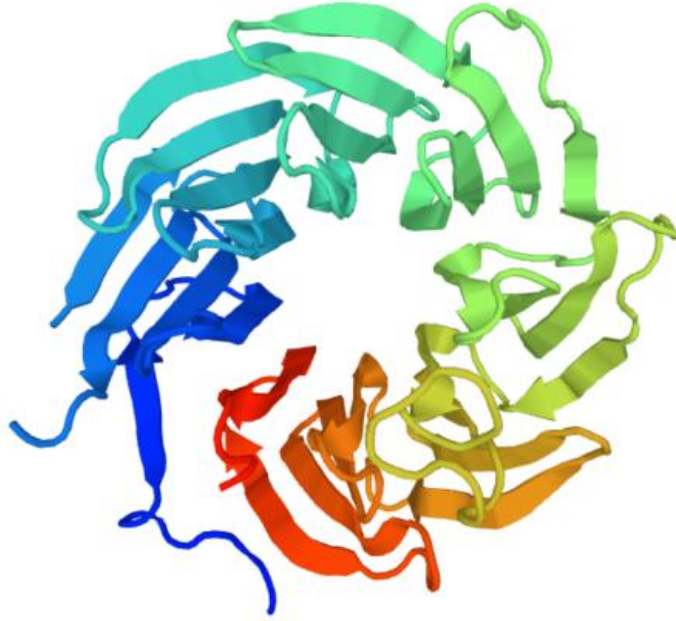
Şekil 3.3: Aminoasitlerin dağılım diyagramı.



Şekil 3.4: Protein hidrofobisite diyagramı.



Şekil 3.5: Genin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı.

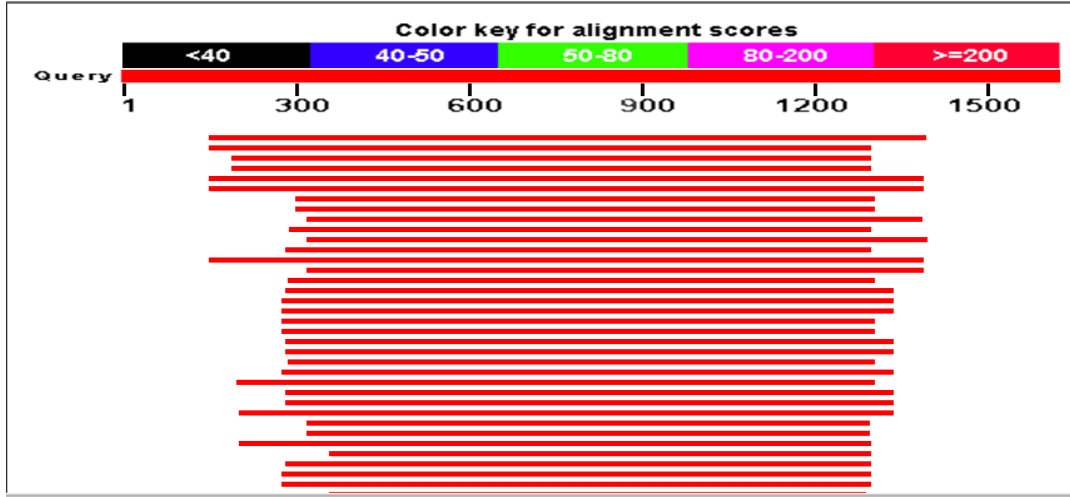


Şekil 3.6: Genin kodladığı proteinin tahmini 3D yapısı.

3.3 Blast Analizleri

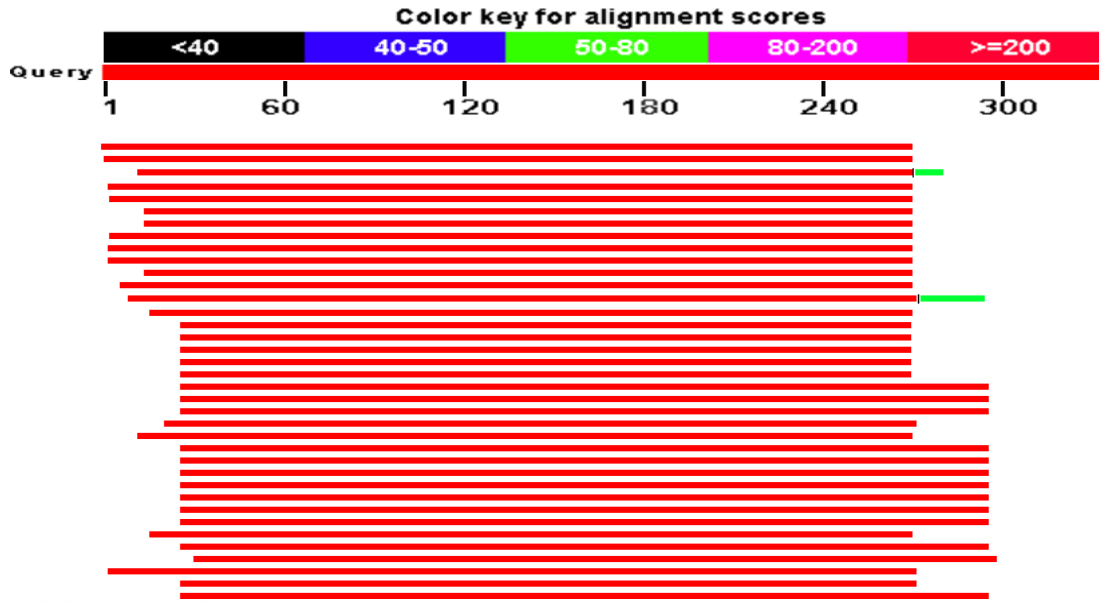
3.3.1 Nükleotid Blast ve Protein Blast

Önceki sayfada Şekil 3.8’de gösterildiği üzere gen dizisi genomik veritabanlarında araştırıldığında, Susam, Tütün, Patates, Domates, Maymun Çiçeği gibi farklı bitki türlerinden, WD40 Tekrarı İçeren Protein, E3 Ubiquitin- Protein Ligase, Guanine Nucleotid Binding alt Ünitesi β , Myosin Heavy Chain Kinase B, Vegetative Incompatibility Proteini gibi farklı farklı proteinleri kodlayan genlere benzerlik gösterdiği ortaya çıkartıldı. Peki bu sonuçların geni tanıma hakkında verdiği ip uçları nelerdi. Gen dizisi, zeytin genomundan alınan bir cDNA dizisi olduğundan ve Blast analizi sonucu elde edilen sonuçlardan hiç birinin zeytin bitkisinden elde edilmediği anlaşıldı. Bu da, bu gen dizisinin ve proteinin zeytin de ilk defa tarafımızdan karakterize edildiğini gösterdi. Sonuçlardan anlaşılacağı üzere, benzerlik kısmında gösterilen hiçbir genin %100 olarak karakterize edilecek olan gene benzemediği ve en çok benzerlik oranlarının %60 ile %76 arasında farklılık gösterdi, farklı oranlarda benzerlik gösteren bu genlerin aynı derecede isimleri de birbirinden farklılık göstermekteydi, bunun anlamı da şunlar olabilirdi, gen dizileri çalışıldığı canlılarda tam olarak karakterize edilemedi yada bu gen dizileri farklı canlılarda yada aynı canlı üzerinde ki farklı genlere Analoji ya da Homoloji gösterdiği fikrini oluşturdu. Aynı yada farklı canlı üzerinde farklı görevleri olan genler olabileceği anlamı çıkarılabildi. Bir taraftandan da WD40 proteinini incelenen bir çalışmada ortaya bir gerçek çıkartıldı o gerçek şudur ki, Arabidopsis ve pirinç üzerinde yapılan çalışmalarda WD40 tekrarları içeren bir proteinin yapısında keşfedilen DWD domainin yanında ekstradan başka motiflerde keşfedildiğide not edildi [8]. Bu bilgilerle bu araştırmada ki karmaşıklığı bir nebze de olsun gidermek mümkün olabildi.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Sesamum indicum WD repeat-containing protein 86 (LOC105166203), mRNA	756	756	76%	0.0	74%	XM_011085465.1
PREDICTED: Sesamum indicum E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7-like (LOC105159195), mRNA	728	728	70%	0.0	75%	XM_011076171.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (LOC104222782), mRNA	672	672	68%	0.0	74%	XM_009619885.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (LOC104222782), mRNA	654	654	68%	0.0	74%	XM_009774078.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris myosin heavy chain kinase B-like (LOC104249731), mRNA	650	650	76%	0.0	72%	XM_009806212.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis myosin heavy chain kinase B-like (LOC104100588), mRNA	630	630	76%	2e-176	72%	XM_009607849.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris myosin heavy chain kinase B (LOC104246871), mRNA	607	607	61%	3e-169	74%	XM_009802767.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis F-box/WD repeat-containing protein sel-10 (LOC104094849), mRNA	607	607	61%	3e-169	74%	XM_009600864.1
PREDICTED: Erythranthe guttatus guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (LOC10595889), mRNA	569	569	65%	7e-158	72%	XM_012982900.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum myosin heavy chain kinase B-like (LOC101260153), mRNA	549	549	62%	6e-152	72%	XM_004242909.2
PREDICTED: Erythranthe guttatus guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (LOC10597639), mRNA	545	545	66%	8e-151	71%	XM_013001671.1
PREDICTED: Solanum tuberosum vegetative incompatibility protein HET-E-1-like (LOC102579547), mRNA	536	536	62%	4e-148	72%	XM_006351874.1
PREDICTED: Solanum tuberosum vegetative incompatibility protein HET-E-1-like (LOC102588343), mRNA	508	508	76%	2e-139	69%	XM_006366377.1

Şekil 3.7: GeninNCBI’da nükleotid blast sonuçları.



	Description	score	score	cover	value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: myosin heavy chain kinase B-like [Nicotiana sylvestris]	393	452	80%	1e-130	69%	XP_009804514.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: myosin heavy chain kinase B-like [Nicotiana tomentosiformis]	391	451	80%	6e-130	68%	XP_009606144.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7-like [Sesamum indicum]	385	441	80%	2e-127	71%	XP_011074473.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Coffea canephora]	380	441	80%	1e-125	67%	CDP07591.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: vegetative incompatibility protein HET-E-1-like [Solanum tuberosum]	375	470	79%	5e-124	66%	XP_006366439.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [Erythranthe guttata]	372	465	76%	2e-122	69%	XP_012838354.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [Erythranthe guttata]	371	464	76%	4e-122	69%	XP_012857125.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: myosin heavy chain kinase B-like [Solanum lycopersicum]	370	462	79%	7e-122	65%	XP_004238202.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [Nicotiana sylvestris]	368	458	80%	5e-121	64%	XP_009772380.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [Nicotiana tomentosiformis]	368	419	80%	5e-121	64%	XP_009618180.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: vegetative incompatibility protein HET-E-1 [Erythranthe guttatus]	363	462	76%	3e-119	68%	XP_012846569.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: WD repeat-containing protein 86 [Sesamum indicum]	357	411	79%	1e-116	68%	XP_011083767.1
<input type="checkbox"/>	F-box and wd40 domain protein, putative [Ricinus communis]	352	443	85%	3e-114	63%	XP_002510317.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: vegetative incompatibility protein HET-E-1-like [Solanum tuberosum]	349	401	76%	1e-113	66%	XP_006351936.1

Şekil 3.8: NCBI dan tahmini aminoasit dizisinin blastP sonuçları.

3.4 Gen Amplifikasyonu ve İntron Analizi

3.4.1 PZR Deneyi Sonucu Elde Edilen Gen Dizisi

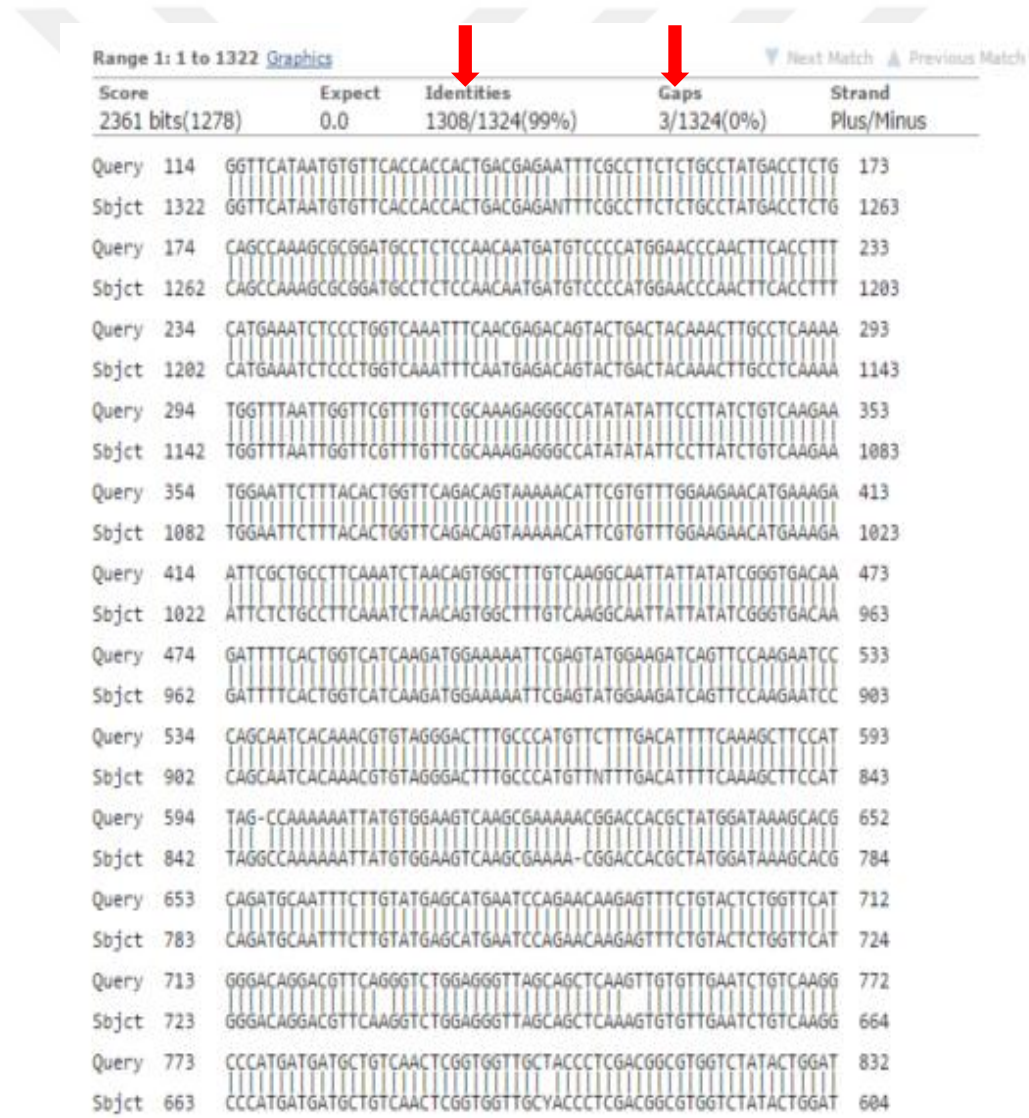
PZR deneyi sonrası dizilenen 1322 nükleotitlik tam uzunluktaki dk29 gen dizisinin dizileme sonuçlarının en güvenilir olanı verildi (Şekil 3.9).

```
ICACACCAGGATCAACCATCAAAATCAAATAACAGATTATTTGACTTTG
ATTTGATCAATACTTTGCTGATAGTATTGATTCCCAGTTAATATCCCCTCG
AACATGTTGCACCATATCCATCTGCTGTGTATCGGACACCATTTCTGAAA
CGCTCCACACCTTGACAGATTTATCAAGACTCCCCTATACACAACCCAT
TTCTGATCGCCGCTGAGGATTCTTTATCCTTCTCCACCGTGAGACACTTG
ACCGGTCCGGTGTGCCACTCAACACCGAGAGAAAAGTGTGAACCGCGG
CCTCCTTCTCCACACGCATATGGTTTTATCAGCTGAGCCACTGACCACTA
GATTCGCGCCGTGGCGAGACAGAGCACCGGCAGTTTGTGACCCCTGAG
TAYTCTCCGTGTGACAACTGCTTCTCGCGCTCCAGAAGTTCAGTACTAGTC
CATCTGATGAGCCACTGTAGAGAACCGAATCCGACTTGTGACGGCCAAT
GCTGTGATGGCACATTCCTGACTCAAGAGTGTTCACCAAAAACATGCCT
AATATATCTACCATTTTGTCTCTTTTCCATACTTTCACTGCCCCGTCAGCT
GATCCAGTATAGACCACGCCGTCGAGGGTRGCAACCACCGAGTTGACAG
CATCATCATGGGCCTTGACAGATTCAACACACTTTGAGCTGCTAACCCCTC
CAGACCTTGAACGTCCTGTCCCATGAACCAGAGTACAGAACTCTTGTTTC
TGGATTTCATGCTCATAACAAGAAATTGCATCTGCGTGCTTTATCCATAGCG
TGGTCCGTTTTCGCTTGACTTCCACATAATTTTTTGGCCTAATGGAAGCTT
TGAAAATGTCAAANAACATGGGCAAAGTCCCTACACGTTTGTGATTGCTG
GGATTCTTGGAAGTATCTTCCATACTCGAATTTTTCCATCTTGATGACCA
GTGAAAATCTTGTACCCGATATAATAATTGCCTTGACAAAGCCACTGTT
AGATTTGAAGGCAGAGAATTCTTTTCATGTTCTTCCAAACACGAATGTTTT
TACTGTCTGAACCAGTGTAAGAATTCCATTCTTGACAGATAAGGAATAT
ATATGGCCCTCTTTGCGAACAACGAACCAATTAACCATTTTGAGGCAA
GTTTGTAGTCAGTACTGTCTCATTGAAATTTGACCAGGGAGATTTTCATGA
AAGGTGAAGTTGGTTCCATGGGGACATCATTGTTGGAGAGGCATCCGC
GCTTTGGCTGCAGAGGTCATAGGCAGAGAAGGCGAAANTCTCGTCAGTG
GTGGTGAACACATTATGAACC- 1322
```

Şekil 3.9: Dizileme sonucu.

3.4.2 İtron Analizi

Şekil 3.10'da da gösterildiği üzere, NCBI vasıtasıyla yapılan intron analizinde zeytin genomundan alınan cDNA dizisi üzerinden tasarlanan primerler ile yapılan PZR deneyi sonrası gen dizisinin en iyi okunmuş reverse ve forward parçaları Bioedit programı yardımıyla alt alta getirildi, contig oluşturuldu, sağlam gen dizisi elde edildi. Daha sonra NCBI üzerinde İkili Blast yapıldı, eldeki sağlam dizi ile kütüphaneden alınan dizi karşılaştırıldı. Sonuç olarak, sağlam dizi ile kütüphane dizisi %99 benzerlik gösterdi ve genin içinde hiç intron tespit edilmedi. Bu çalışma ile genin full- lenght (tam uzunlukta) bir cDNA dizisi olduğu ortaya çıkartıldı.

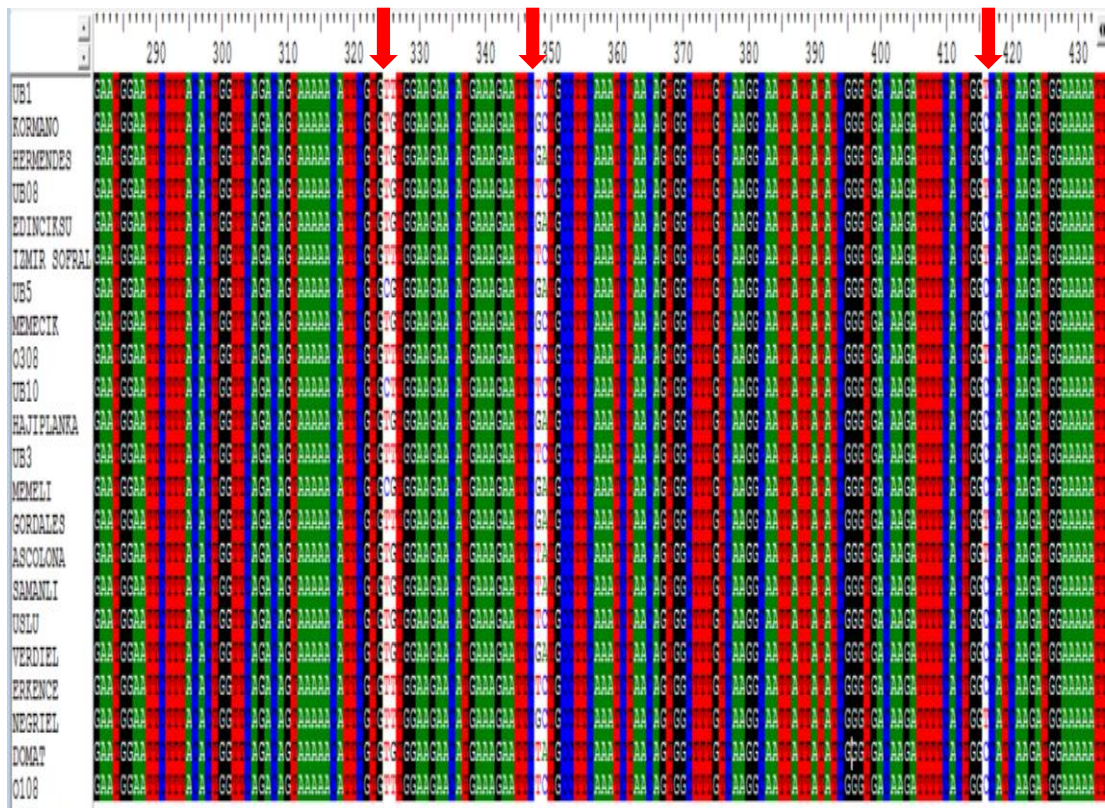


Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2361 bits(1278)	0.0	1308/1324(99%)	3/1324(0%)	Plus/Minus
Query 114	GGTTCATAATGTGTTCAACCACCTGACGAGAATTTGCGCTTCTCTGCCTATGACCTCTG	173		
Sbjct 1322	GGTTCATAATGTGTTCAACCACCTGACGAGANTTTGCGCTTCTCTGCCTATGACCTCTG	1263		
Query 174	CAGCCAAAAGCGCGGATGCCCTCTCAACAATGATGCCCCATGGAACCCAACTTCACCTTT	233		
Sbjct 1262	CAGCCAAAAGCGCGGATGCCCTCTCAACAATGATGCCCCATGGAACCCAACTTCACCTTT	1203		
Query 234	CATGAAATCTCCCTGGTCAAATTTCAACGAGACAGTACTGACTACAACTTGCCTCAAAA	293		
Sbjct 1202	CATGAAATCTCCCTGGTCAAATTTCAATGAGACAGTACTGACTACAACTTGCCTCAAAA	1143		
Query 294	TGGTTAATTGGTTCGTTTGTTCGCAAGAGGGCCATATATATTCTTATCTGTCAAGAA	353		
Sbjct 1142	TGGTTAATTGGTTCGTTTGTTCGCAAGAGGGCCATATATATTCTTATCTGTCAAGAA	1083		
Query 354	TGGAATCTTTACACTGGTTGAGACAGTAAAAACATTCGTGTTTGGAAAGACATGAAAGA	413		
Sbjct 1082	TGGAATCTTTACACTGGTTGAGACAGTAAAAACATTCGTGTTTGGAAAGACATGAAAGA	1023		
Query 414	ATTCGTCGCTTCAAATCTAACAGTGGCTTGTCAAGGCAATTATTATATCGGGTGACAA	473		
Sbjct 1022	ATTCGTCGCTTCAAATCTAACAGTGGCTTGTCAAGGCAATTATTATATCGGGTGACAA	963		
Query 474	GATTTTCACTGGTCATCAAGATGGAAAAATTCGAGTATGGAAGATCAGTTCCAAGAAATCC	533		
Sbjct 962	GATTTTCACTGGTCATCAAGATGGAAAAATTCGAGTATGGAAGATCAGTTCCAAGAAATCC	903		
Query 534	CAGCAATCACAACGTGAGGGACTTTGCCCATGTTCTTTGACATTTTCAAAGCTTCCAT	593		
Sbjct 902	CAGCAATCACAACGTGAGGGACTTTGCCCATGTTNTTTGACATTTTCAAAGCTTCCAT	843		
Query 594	TAG-CCAAAAAATTATGTGGAAGTCAAGCGAAAAACGGACCACGCTATGGATAAAGCACG	652		
Sbjct 842	TAGGCCAAAAAATTATGTGGAAGTCAAGCGAAAA-CGGACCACGCTATGGATAAAGCACG	784		
Query 653	CAGATGCAATTTCTTGTATGAGCATGAATCCAGAACAAGAGTTTCTGTACTCTGGTTCAT	712		
Sbjct 783	CAGATGCAATTTCTTGTATGAGCATGAATCCAGAACAAGAGTTTCTGTACTCTGGTTCAT	724		
Query 713	GGGACAGGACGTTCAAGGCTCGGAGGTTAGCAGCTCAAGTTGTGTTGAATCTGTCAAGG	772		
Sbjct 723	GGGACAGGACGTTCAAGGCTCGGAGGTTAGCAGCTCAAGTTGTGTTGAATCTGTCAAGG	664		
Query 773	CCCATGATGATGCTGTCAACTCGGTGGTTGCTACCCCTCGACGGCGTGGTCTATACTGGAT	832		
Sbjct 663	CCCATGATGATGCTGTCAACTCGGTGGTTGCYACCCCTCGACGGCGTGGTCTATACTGGAT	604		

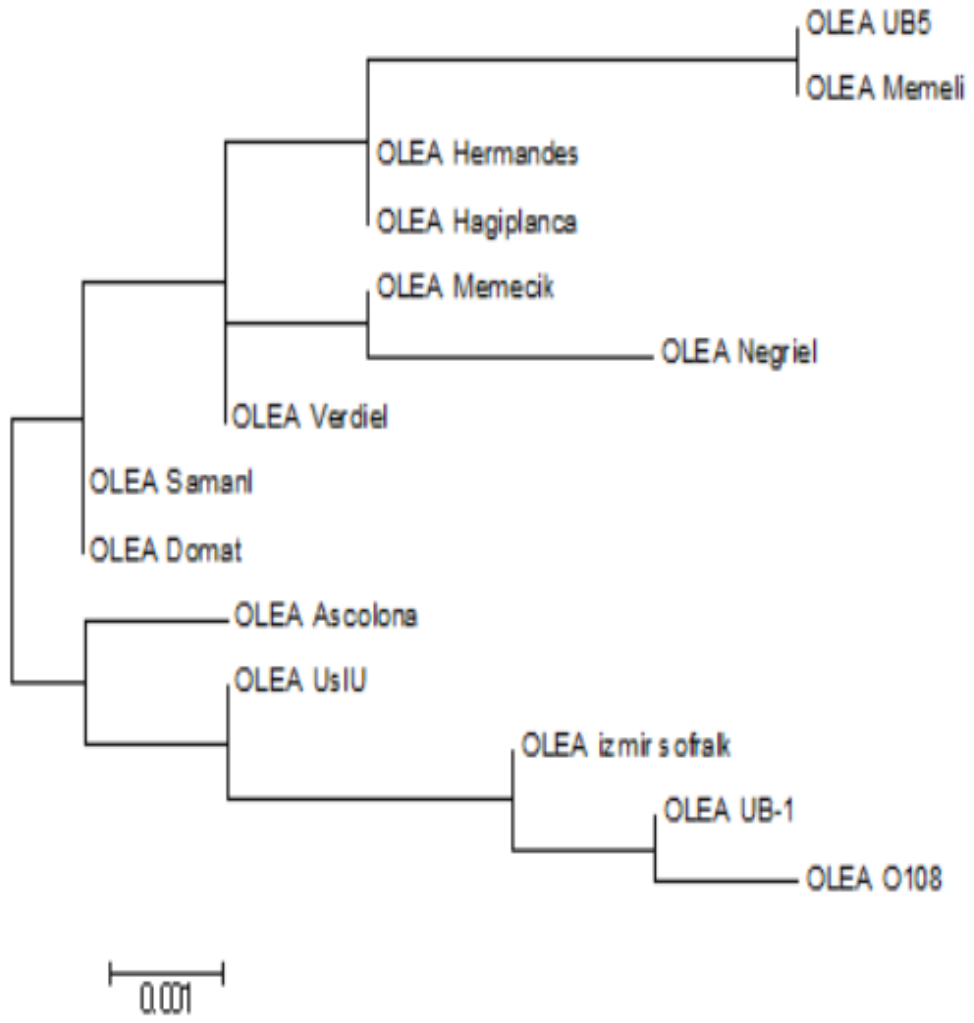
Şekil 3.10: NCBI ikili blast sonucu.

3.5 Polimorfizm Analizi Sonuçları

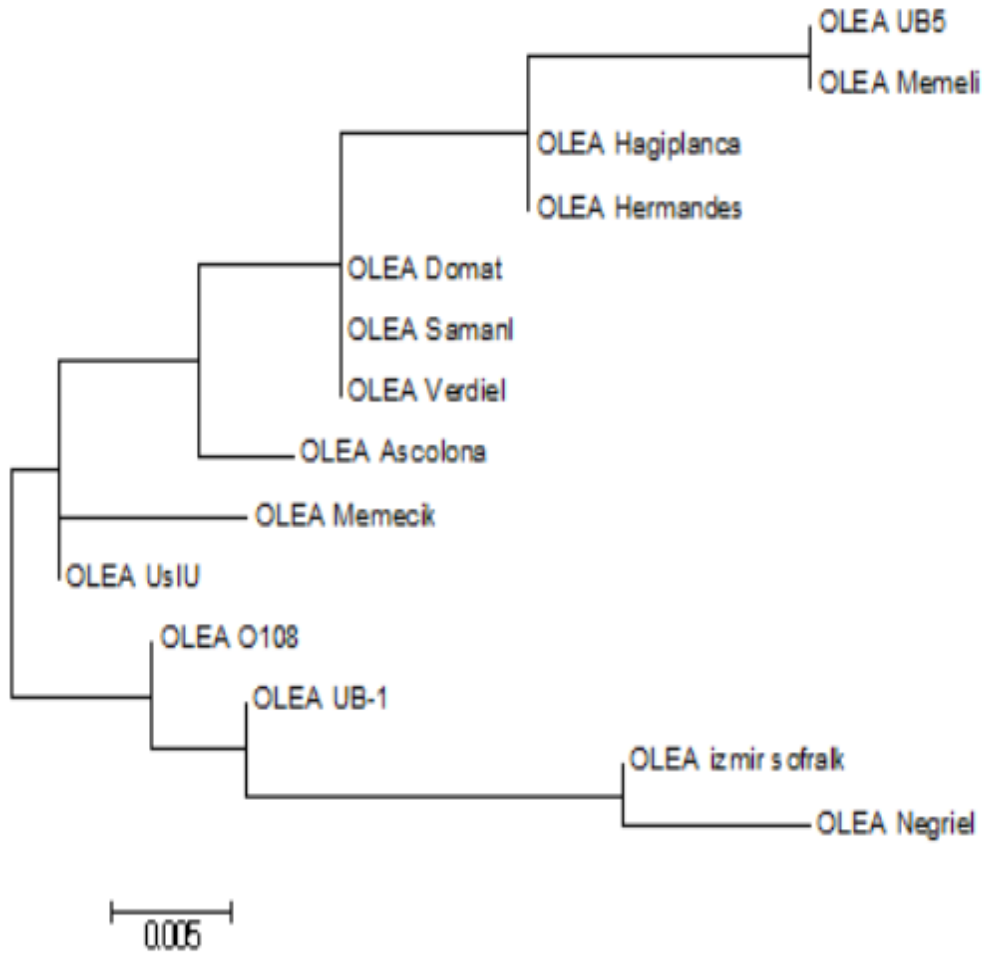
Bioedit programının yardımı ile yapılan bioinformatik analizlerinin yapılması sırasında elde edilen polimorfik bölgeler yukarıdaki şekil üzerinde verildi. Dizi analizleri zeytinin 23 çeşidi üzerinde yapıldı ve dizileme sonucunda en sağlam şekilde dizilenen DNA örnekleri üzerinde araştırmalar yapıldı. İlk aşamada genimizin üzerinde bolca polimorfik bölgelerin olduğu görüldü (Şekil 3.11). Daha sonrasında elde edilen bu dizilerden akrabalık çalışmaları için “Mega” yazılımı kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Tablo 3.12 ve Tablo 3.13).



Şekil 3.11: Bioedit ile polimorfizm analizi.



Şekil 3.12: Nükleotid polimorfizminin filogenetik ağacı.



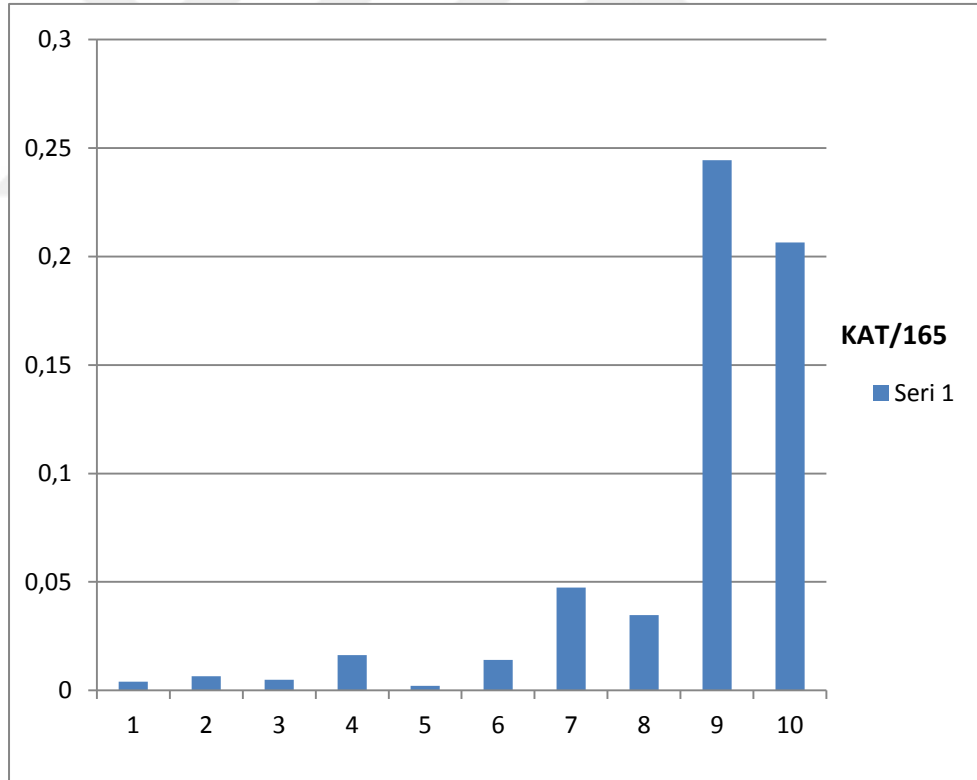
Şekil 3.13: Protein Dizilerinden Polimorfizmin filogenetik ağacı.

Filogenetik çalışmalar neticesinde, nükleotid diziler üzerinde maksimum olasılık metoduyla çalışıldı. Zeytinin Şamanlı ve Domat, Hermandes ve Hajiplanca, Ayvalık çeşidinin klonu olan UB5 ve Memeli Çeşitlerinin WD40 Gen Dizileri yakın akrabalık gösterdiği sonucuna varıldı. Ayrıca Ascolona, Uslu, İzmir Sofralık ve Ayvalık çeşitlerinin klonları olan UB1, O108 çeşitlerinin akraba oldukları sonucuna ulaşıldı. Yine aynı çalışma, oluşturulan protein dizileri üzerinde de yapıldı. Zeytinin Verdiel, Şamanlı ve Domat, yine Hermandes ve Hajiplanca Çeşitlerinin WD40 Tekrarı İçeren Proteinlerinin akraba oldukları tespit edildi. Yine ayrıca, Negriell, İzmir Sofralık, Ayvalık çeşidi klonları olan UB1 ve O108'in yakınlıkları keşfedildi.

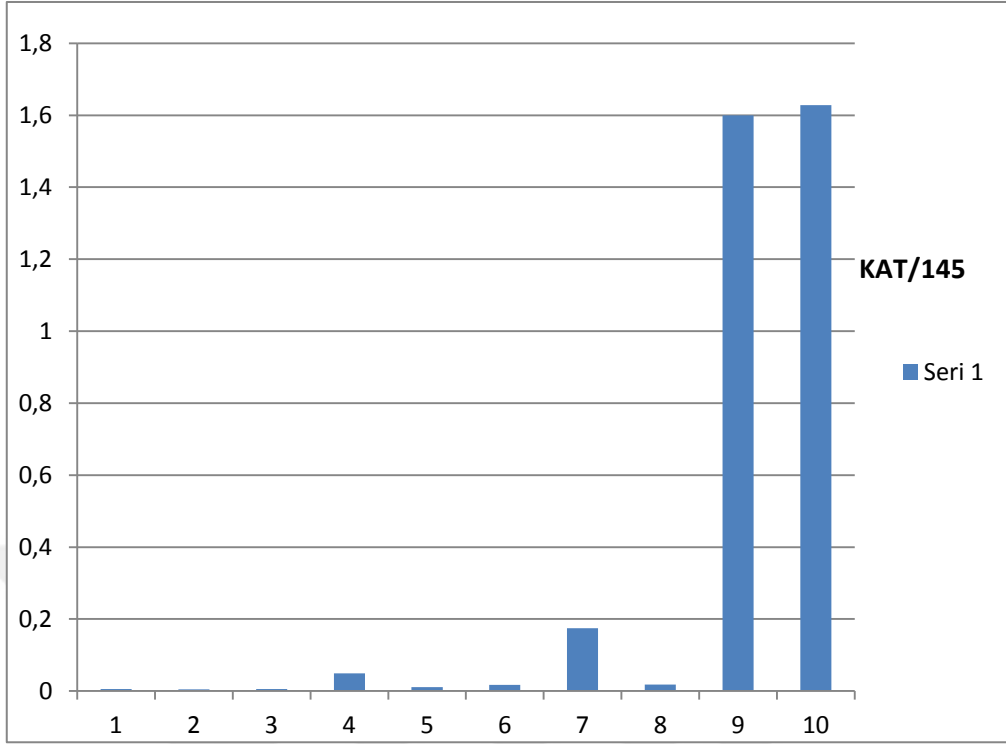
3.6 Gen Ekspresyon (İfade) Seviyeleri

3.6.1 Zamansal Ekspresyon Seviyeleri

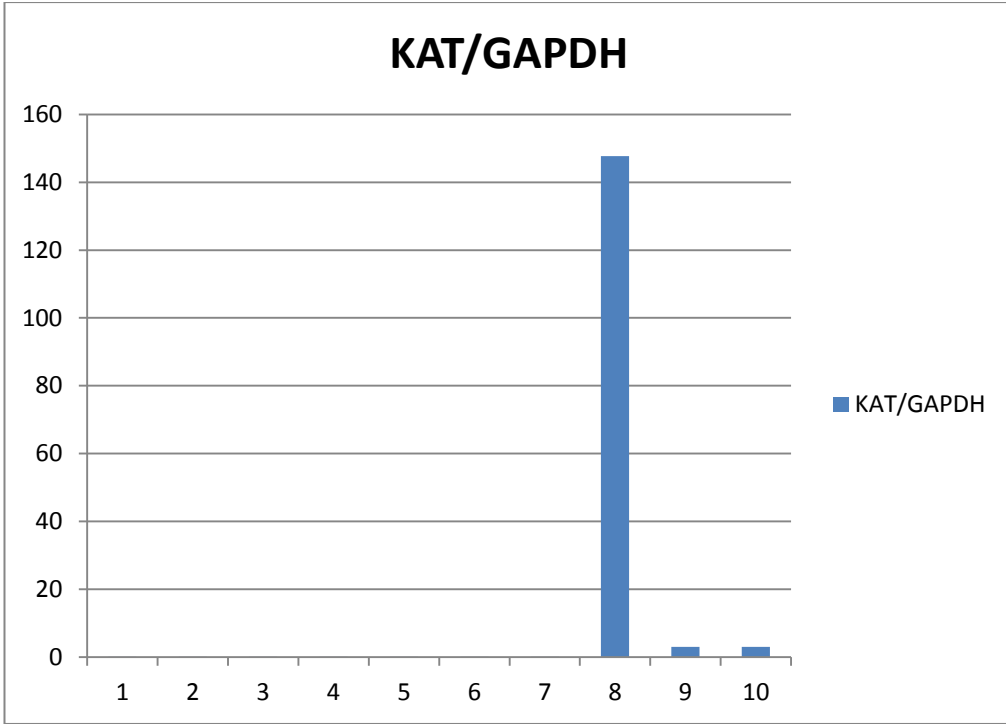
Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16'da yer alan Grafiklerde 1 den 10'a kadar olan rakamlar sıra ile gitmek şartıyla 1 ve 2 numaralarla mart ayı var yılı, mart ayı yok yılı ağaçları, 3 ve 4 numaralar nisan ayı varyılı, nisan ayı yok yılı ağaçları, 5 ve 6 numaralar mayıs ayı var yılı, mayıs ayı yok yılı ağaçları, 7 ve 8 numaralar haziran ayı var yılı, haziran ayı yok yılı ağaçları, 9 ve 10 numaralar temmuz ayı var yılı, temmuz ayı yok yılı ağaçlarını belirtmek için kullanılan rakamlardır. Yukarıda ifade edilen bu rakamlar diğer zamansal ekspresyon ölçüm grafiklerinde de bulunmaktadır, rakamlarla oluşturulan bu sıralama değiştirilmeden aktarıldı. Yani sıralama tüm zamansal ekspresyon seviyeleri grafiklerinde aynı olacak şekilde ifade edildi.



Şekil 3.14: Zamansal olarak Süperoksit genine oranla ekspresyon seviyesi.



Şekil 3.15: Zamansal olarak Ubiquitin genine oranla ekspresyon seviyesi.

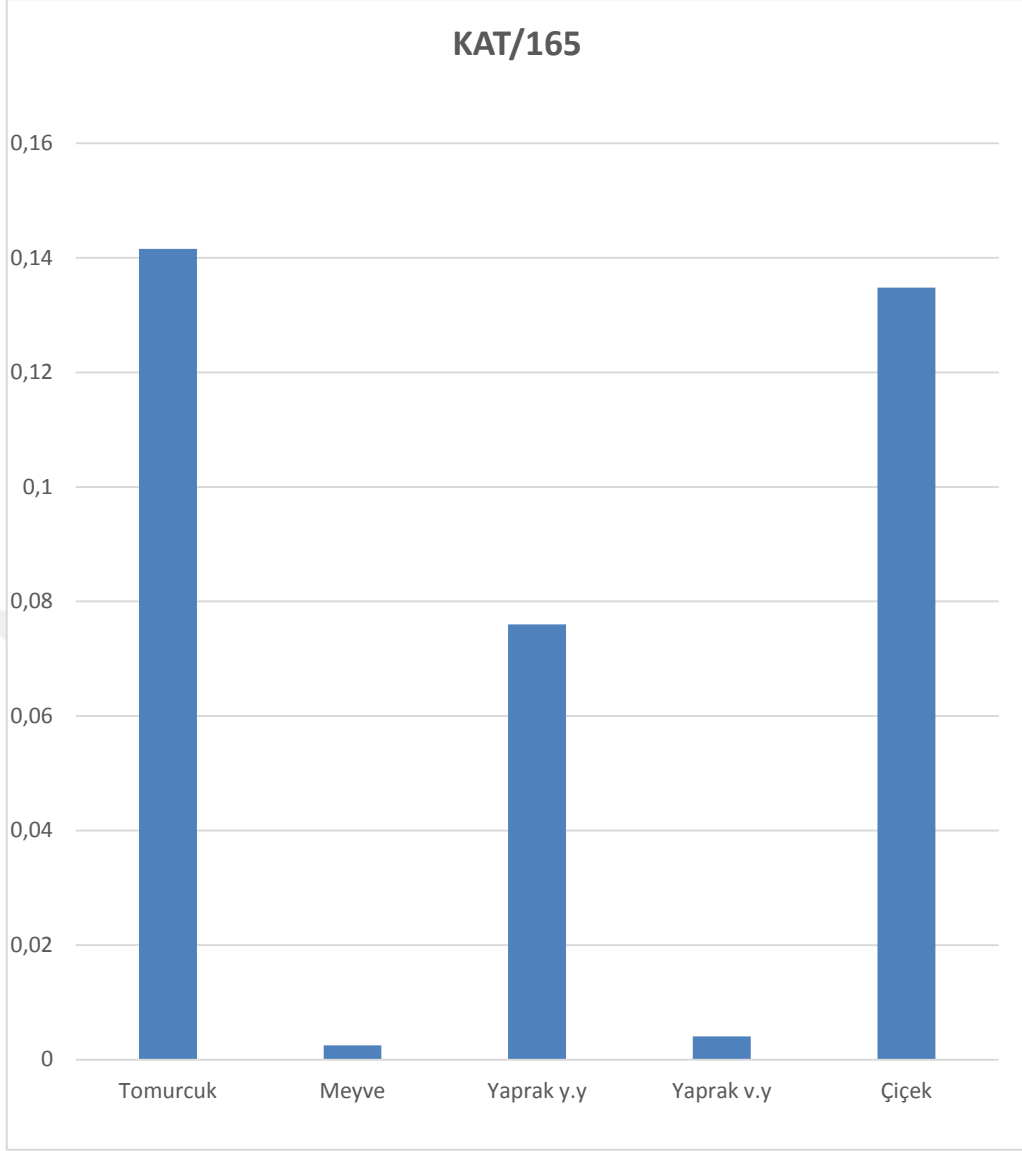


Şekil 3.16: Zamansal GAPDH genine oranla ekspresyon seviyesi.

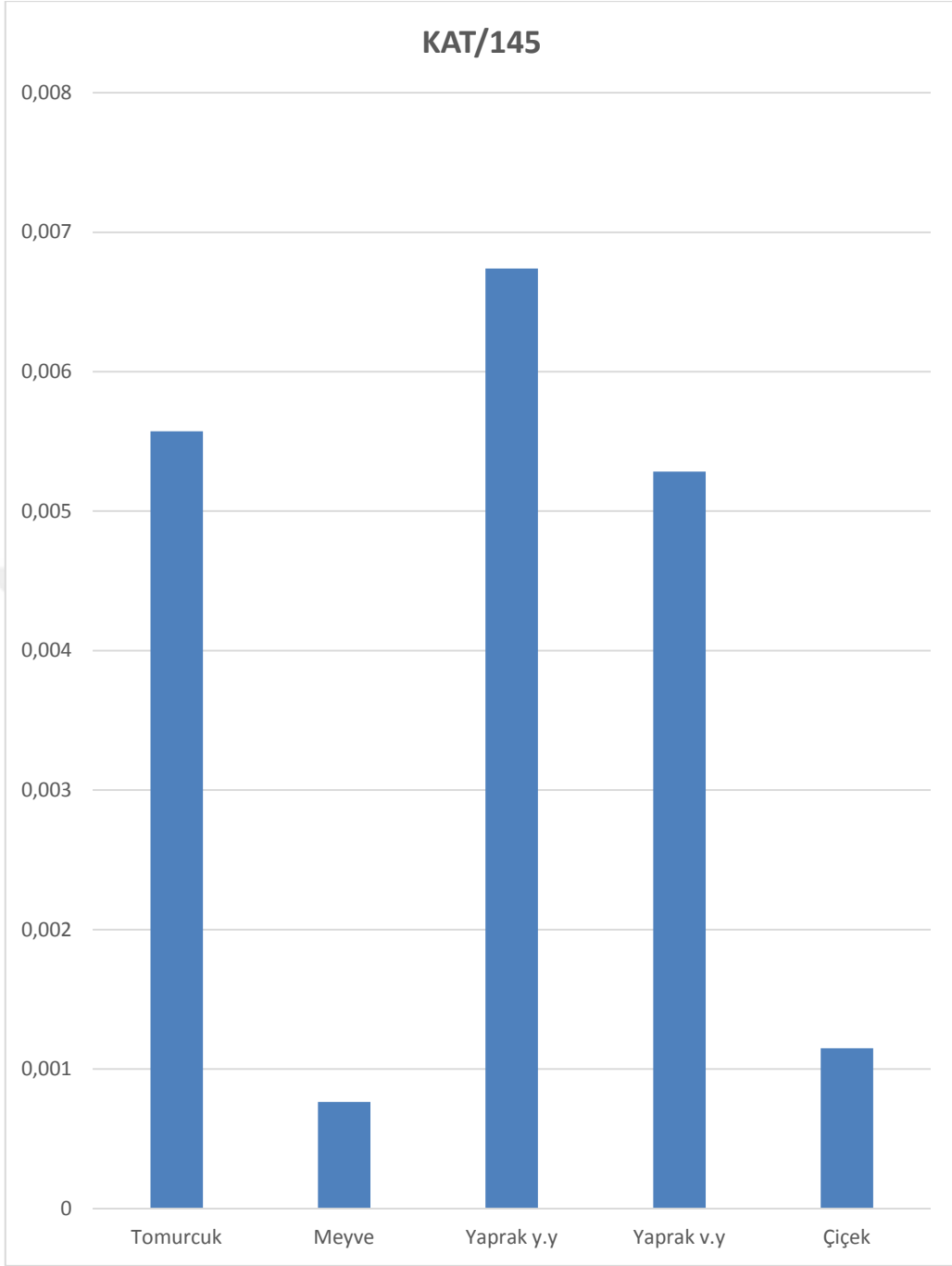
Genin zamansal olarak ifade seviyeleri belirlendi, sonuçlar grafik olarak yansıtıldı. 1 den 10 a kadar olan rakamlar, 3. Ay (Mart) Var yılı yani zeytin veriminin tam olduğu ağaçtan, 7. Ay (Temmuz) Yok Yılı yani zeytin meyvesinin veriminin en az hatta hiç olmadığı ağaca gitmek üzere yapıldı. Grafik üzerinde karakterize edilecek olan genin süperoksit dismutaz (165) genine oranla en çok 7. ayda en az da 5. ayda toplanan yaprak örneklerinde ifadesi olduğu belirlendi. 7. ay zeytinin ham meyveden çıkıp olgun meyve oluşumu gözlemlendiği bir ay olduğu, 5. ay ise zeytinin dölllenme gibi aktivitelerinin olduğu bir ay olarak tespit edildi. Ubiquitin genine oranla ifade grafiği yorumlandı ve yine en fazla 7. ayda ve en az bitkinin soğuğa karşı toleransını arttığı zaman 1. 2. ve 3. aylarda ifadesi belirlendi. GAPDHgenine oranla da belirgin bir şekilde bitkinin ham meyve oluşumu gözlemlenmesi beklenen fakat bitkinin meyve üretmediği bir ay olan olan 6. ay yok yılında ifadesinin en fazla olduğu, en azda 1. 2. 3. aylarda ifadesinin olduğu belirlendi. Durum periyodisite sorunu baz alınarak incelendi. Genin, çiçek oluşumunun ve döllenenin gözlemlendiği aylarda işlevini aradığımız için ayrı bir parantez açacak olursak, 4. ve 5. aylarının yok yılında daha fazla sentezlendiği belirlendi.

3.6.2 Dokusal Ekspresyon Seviyeleri

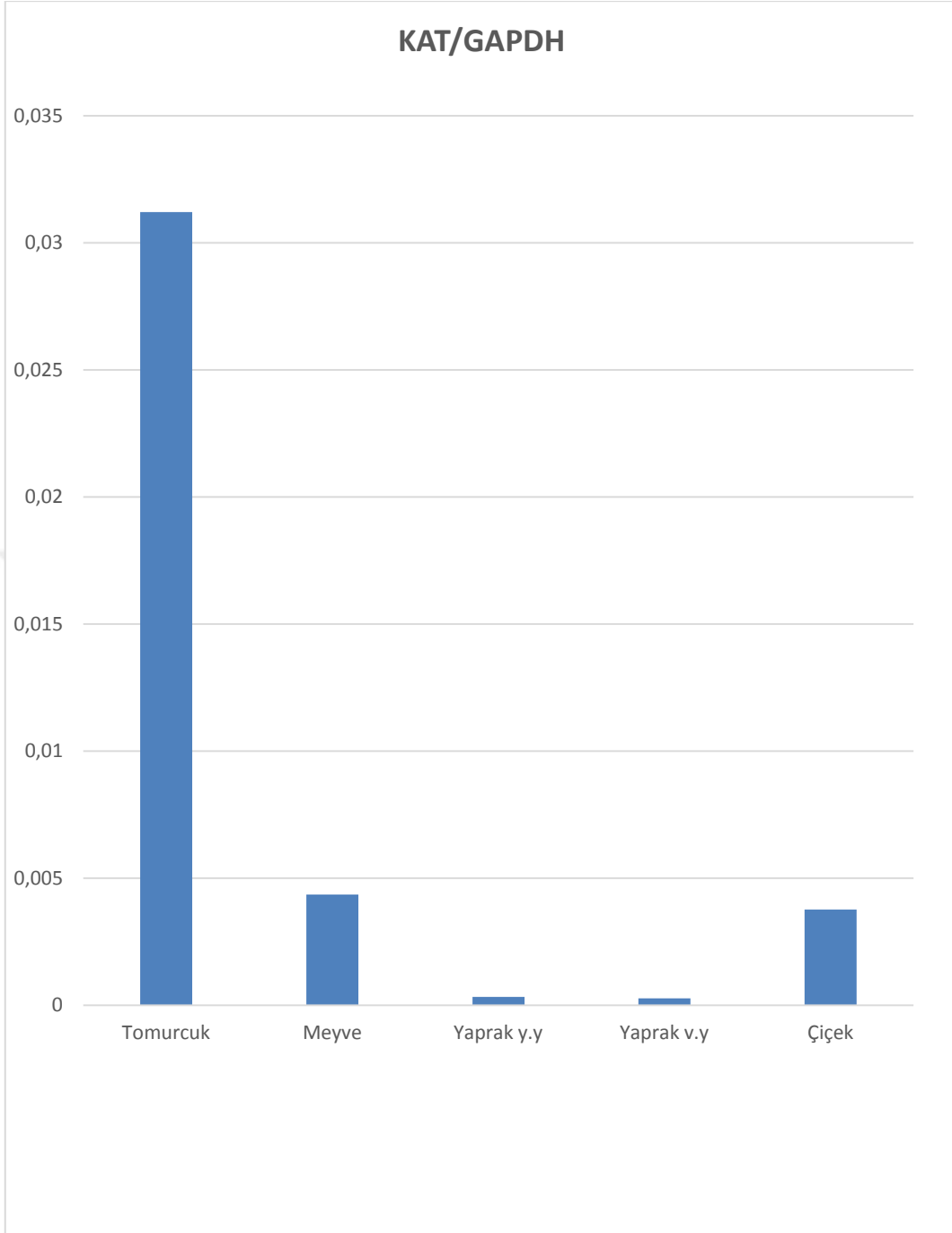
Genin ifade seviyeleri dokusal olarak da incelendi. Sonuçlar, Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'da grafik olarak verildi. Dokusal olarak, S. Dismutaz genine oranla en fazla “tomurcuk” dokusunda en azda “ham meyve” dokusunda ifadesi olduğu tespit edildi. Ubiquitin genine oranla en fazla “yok yılı yaprağında” ve yine en azda ham meyve dokusunda ifadesi olduğu tespit edildi. GAPDHgenine oranla en fazla “tomurcuk” dokusunda, en az “var yılı yaprak” dokusunda ifadesi tespit edildi. İçinde “WD40 Tekrarları İçeren Proteini” kodlayan bir gen olarak tahmin edilen gen dizisinin ifade seviyesi ile ilgili olarak bir makalede deney sonucunu onaylarcasına yer alan bilgiye göre de, WD40 tekrarları içeren proteinin çekirdeğe yerleştiği ve bitkisel bölümlere geçiş sırasında örneğin solmuş yaprak, tohum, kök gibi yapıların oluşumu sırasında ekspresyon seviyeleri yüksek, yenilenebilen dokuların oluşumu sırasında örneğin ovaryum, erkek organ, ham meyve gibi dokularda ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu not edildi [9].



Şekil 3.17: Dokusal olarak Süperoksit Dismutaz genine oranla ekspresyon seviyesini belirten grafik.



Şekil 3.18: Dokusal olarak Ubiquitin genine oranla ekspresyon seviyesi.

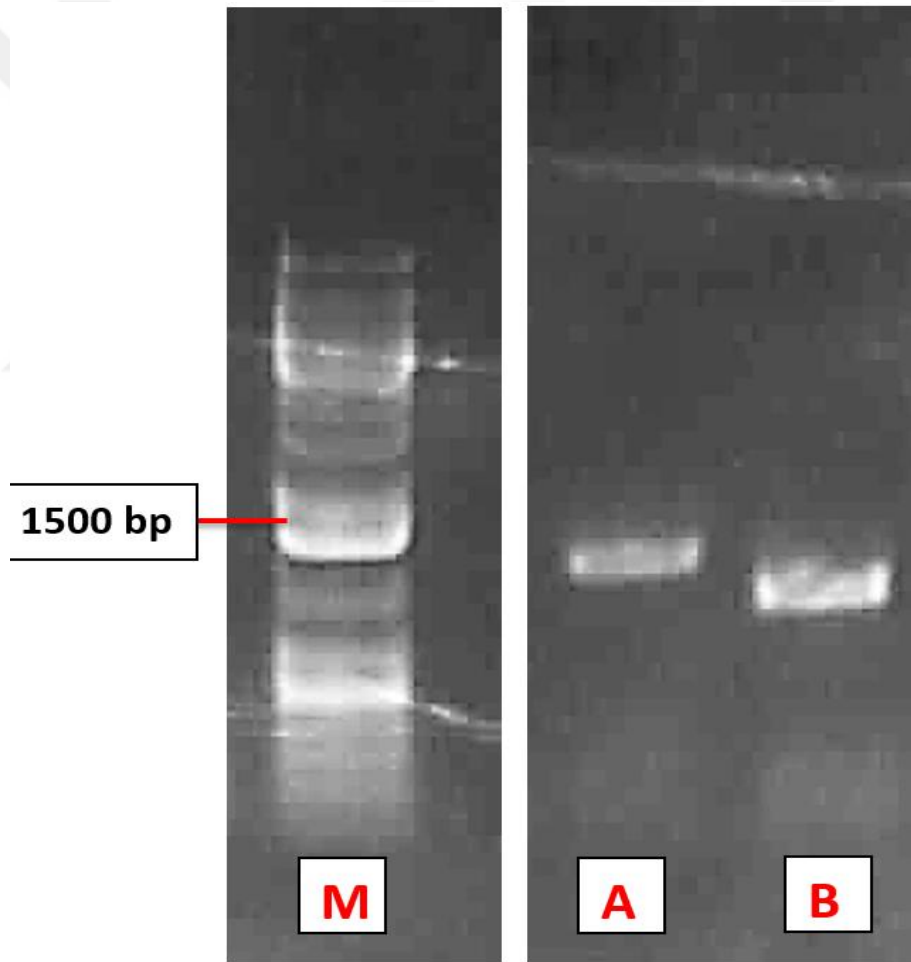


Şekil 3.19:Dokusal olarak GAPDH genine oranla ekspresyon seviyesi.

3.7 Moleküler Klonlama

3.7.1 His- Taq Kuyruklu Primerlerle PZR ve Gen Purifikasyonu

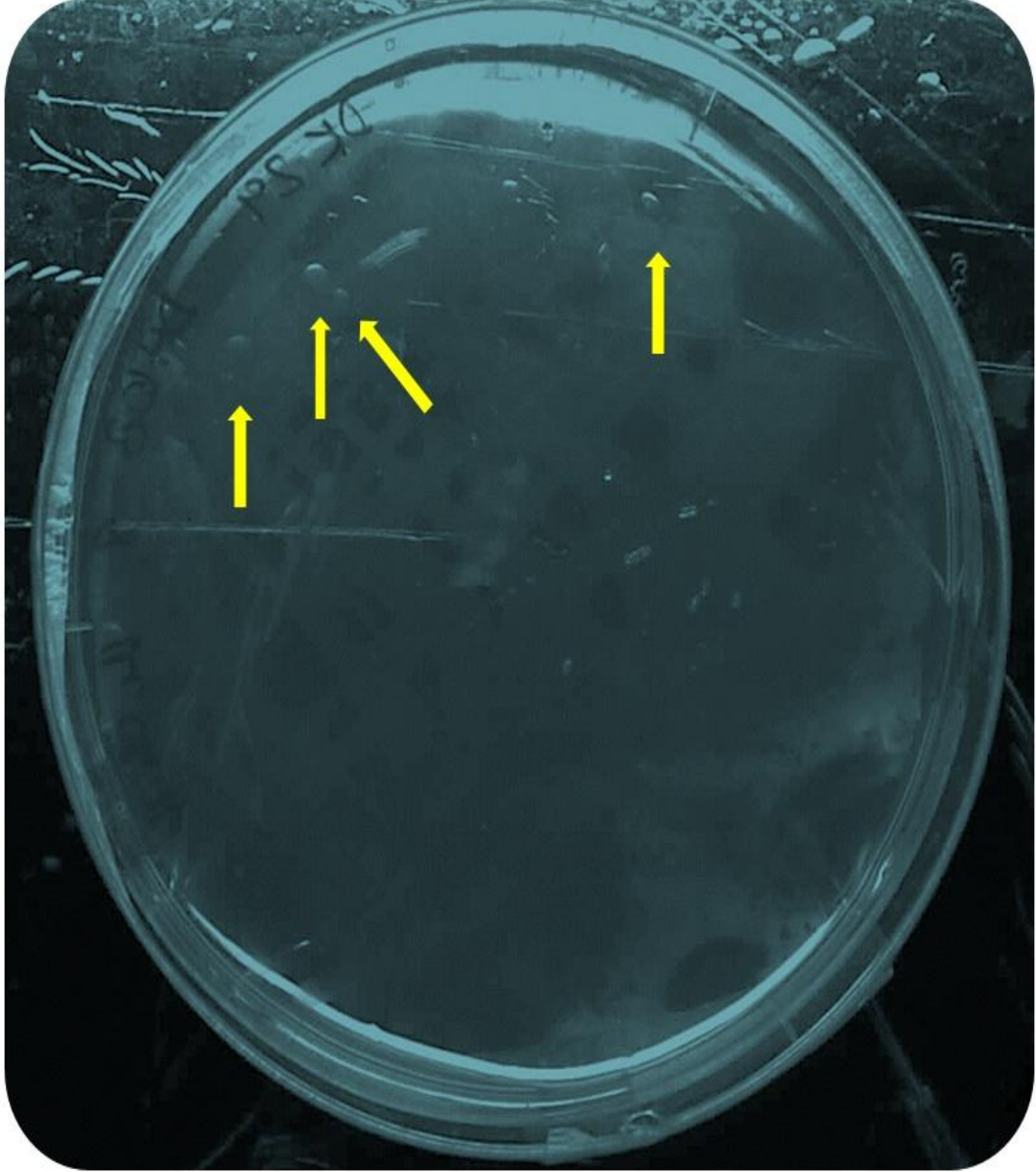
Şekil 3.20'in gösterdiği bilgilerle birlikte, çalışmada kalıp olarak cDNA kullanıldı. Bu çalışma kapsamında, primerlerin sonuç vermeme durumuna karşın iki farklı primer çifti tasarlandı ve bu primerlerin ikisi de sonuç verdi. Bunlardan A ile gösterilen sonuçta yaklaşık 1400 nt'lik gen bölgesi çoğaltıldı, B ile gösterilen sonuçta tasarladığımız gen primerleri ile yaklaşık 1300 nt'lik bölge çoğaltıldı. M ile gösterilen bölüm ile marker ifade edildi.



Şekil 3.20: His- taq kuyruklu primerlerle yapılan PZR deneyi sonuçları.

3.8 *E. coli*' nin ođaltma Suşuna Transformasyonu

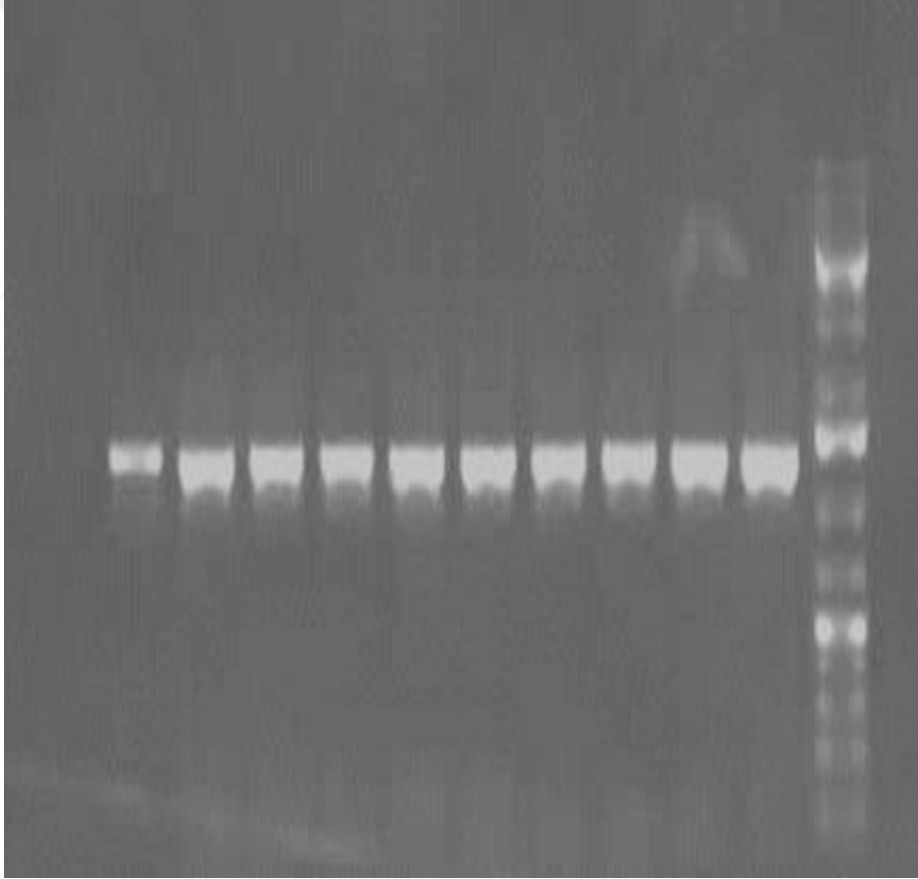
Şekil 3.21 ile ispatlandığı üzere, His- Taq kuyruklu gen bölgesini içeren recombinant plazmitimizin çoğaltılması amacıyla *E.coli*'nin DH10B suşuna transforme edildi. Başarılı bir transformasyon sonrası rekombinant plazmit çoğaltıldı. Koloniler oluşturan petripler transformasyonu teyid amacıyla fotoğraflandı.



Şekil 3.21:Rekombinant DH10B suşunun kolonileri.

3.9 Koloni PZR

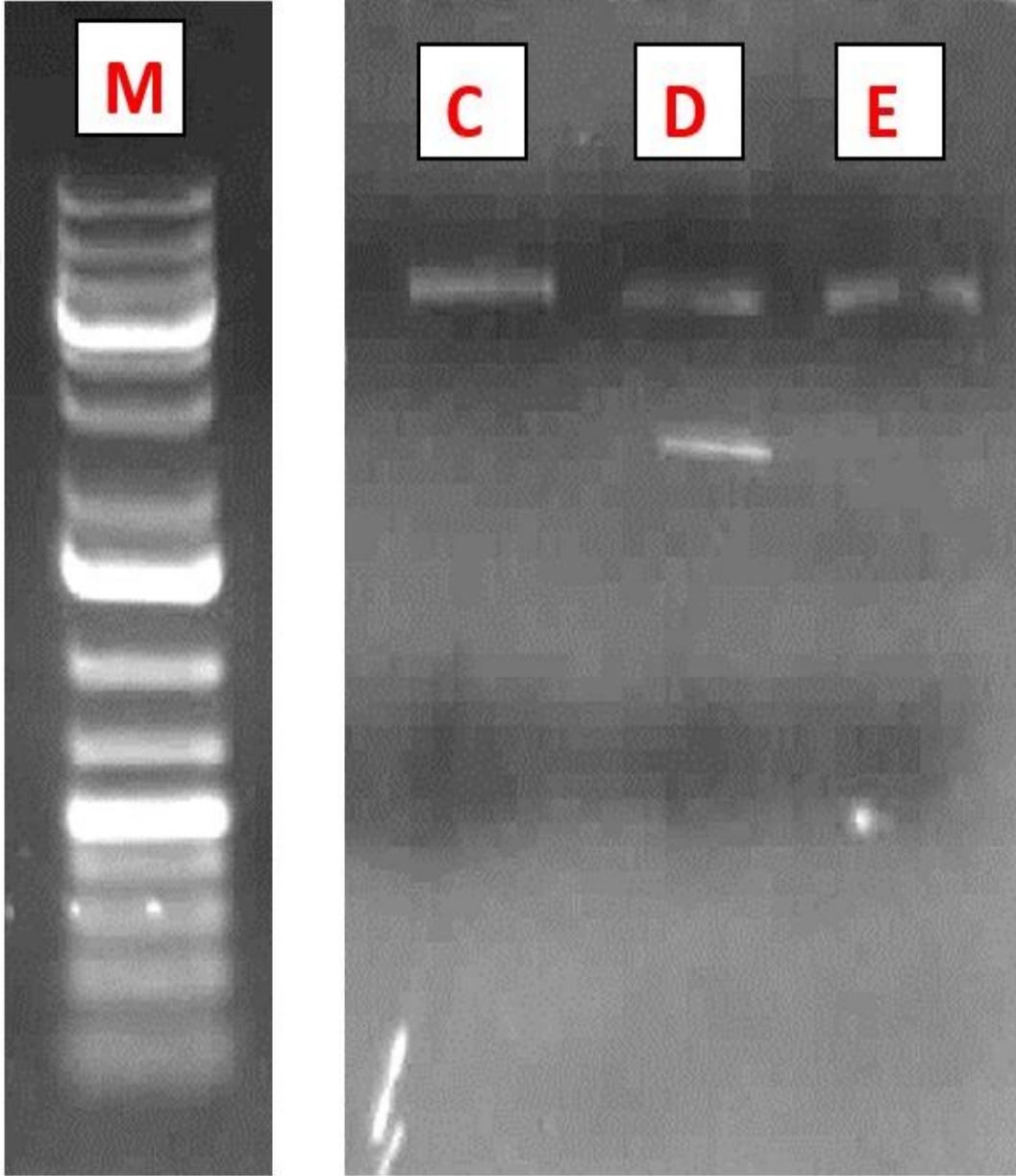
Plazmit DH10B ye transforme ettik. Sonra E.coli' nin plazmiti bünyesine alıp almadığını yada plazmiti üretip üretmediğini kontrol etme amacıyla, içinde rekombinant plazmitimizin de olduğunu düşünülen *E.coli*'nin DH10B suşunun LB-agarlı petrilerde oluşturmuş olduğu kolonilerden biri seçildi. 1/20 oranında seyreltildi. Daha sonra bu koloniler PZR kalıbı olarak kullanıldı. PZR kuruldu ve sonuçlar gözlemlendi. Agaroz jelde koşturulan örneklerin yaklaşık 1400 nt'lik bantlar verdiği gözlemlendi. Sonuç Şekil 3.22'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 3.22: Rekombinant DH10B nin koloni PZR'ı.

3.10 Plazmit DNA İzolasyonu ve Sonuçların Dizilenmesi

Şekil 3.23 üzerinde **C, D, E** olarak gösterilen bölümler yaklaşık 5500 nt uzunluğundaki Plazmit DNA'dan elde edildi. Yaklaşık 1400 ve 1300 nükleotidlik geni klonlama yapılan boş Plate 51 Vektörünün uzunluğu yaklaşık 4000 baz çifti olduğu göz önüne alındı ve sonuçlarda da bu uyum gözlemlendi.



Şekil 3.23: Plazmit DNA İzolasyonu sonuçları.

Şekil 3.24’de klonlama kitinden elde edilen His- Taq belirteçli LIC Forward, LIC Reverse primelerle yapılan dizileme sonuçları yer almaktadır. Daha önceki bölümlerde His- taq kuyruklu primerlerle DNA kalıp olarak kullanılarak deneme PZR deneyi yapıldı, sonuçları agaroz jelde görüntülendi, o görüntülerde PZR yaklaşık 1300- 1400 bp uzunluğunda bantlar tespit edildi. Dizileme sonucunda 1234 bp olarak gelmesi genimizin plate 51 vektörüne klonlanmasını teyid eder nitelikte oldu. Dizilemeden gelen 1234 nt lik dizinin içinden yaklaşık 1000 nükleotidlik bölgenin %100 güvenilir olduğu anlaşıldı. Daha sonrasında dizileme sonucu ile zeytin genomik kütüphanesinden elde edilen dizi ile NCBI ikili Blast uygulaması ile karşılaştırıldı, %97’lik bir benzerlik görüldü. Genin plate 51 vektörüne klonlandığı kesin olarak garanti altına alındı.

>plazmit_contig

```
GACTCTACTCAGTATAGGTANGACTGTANGCCGNTTCAACCAGTATNCCCCTCTAGACATAATTTG
NTTAAACATTTAACATCCAGAAGGAGATATCAACTATGGCAGGCTTCTCATCATTATCATCATCAT
GGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGCTCCGGTGATGATGATGACAAGATGG
TCCATAATGTGTTACCACCACTGATGAGGANTTTTCGCTTCTCTGCCTATGGCCTCTGCAGCCAAA
GCGCGGATGCCTCTCAACAATGATGTCCCATGGAACCCAACCTCACCTTTCATGAAATCTCCCTG
GTCAAATTTCAATGAGACAGTACTGACTACAACTTGCTCAAATGGTTAATTGGTTGTTTGTTC
GCAAAGAGGGCCATATATATTCCTTATCTGTCAAGAATGGAATCTTTACTGGTTCAGACAGTAA
AACATTCGTGTCTGGAAGAACATGAAAGAATTCTCTGCCTTCAAATCTAACAGTGGCTTTGTCAAG
GCAATTATTATATCGGGTGACAAGATTTTCACTGGTCATCAAGATGGAAAAATTCGAGTATGGAAG
ATCAGTTCGAAGAATCCCAGCAATCACAAGCGTGTAGGGACTTTGCCCATGCTTTTTGACATTTCA
AAGCTTCCATTAGGCCAAAAAATTATGTGGAAGTCAAGGAAAAACGGACCACGCTATGGATAAAG
CACGCGGATGCAATTTCTGTATGAGCATGAATCCAGAACAAGAGTTTCTGTACTCTGGTTCATGGG
ACAGGACGTTAAGGTCTGGAGGGTTAGCAGCTCAAAGTGTGTTGAATCTGTCAAGGCCCATGATG
ATGCTGTCAACTCGGTGGTTGCCACCCTCGACGGCGTGGTCTATACTGGATCAGCTGACGGGGCAG
TGAAGGTATGGAAAAGAGAACAAAATGGTAGATATATTAGGCATGTTTTGGTGCAAAAACTTTG
AGTCAGAAATGTGCCATCACAGCATTGGCCGTCACAAGTCGGGTTCTGTTNCTCTACAGTGGCTCA
TCAGATGGACTAGTGAACTTTCTGGGAGCGCGAGAAAGCAGTTGTNCACACGGAANGAATNACT
CANGGGGTCACAACTNCCGGTGCTCTGTCTCGCCACGGCCGGAATCTAGTGGTCAGTGGNTCA
GCTAATGACTTCCATNTCCGGTTAAACAGGCCTGCATGCAGCGTANTACATGTACATTTNAATCCC
CG- 1234
```

Şekil 3.24: Plazmit DNA’nın dizileme sonuçları.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1635 bits(1812)	0.0	971/1004(97%)	10/1004(0%)	Plus/Minus
Query 329	ATCAGCTGAGCCACTGACCACTAGATTCCC	GGCCGTGGCGAGACAGAGCACCGGCAGTTT		388
Sbjct 1201	ATTAGCTGANCCACTGACCACTAGATTCCC	GGCCGTGGCGAGACAGAGCACCGGNAGTTT		1142
Query 389	GTGACCCC-TGAGT-AYTCT-CCGTGTG-ACA	ACTGCTT-CTCGCGCTCCCAGAAG--T		441
Sbjct 1141	GTGACCCNTGAGTNATTNNTCCGTGTGNACA	ACTGCTTCTCGCGCTCCCAGAAAAGTT		1082
Query 442	TCACTAGTCCATCTGATGAGCCACTGTAGAG	-AACCGAATCCGACTTGTGACGGCCAAT		500
Sbjct 1081	TCACTAGTCCATCTGATGAGCCACTGTAGAG	NAACAGAACCCGACTTGTGACGGCCAAT		1022
Query 501	GCTGTGATGGCACATTCTGACTCAAGAGTG	TTT-GCACAAAAACATGCCATAATATCT		559
Sbjct 1021	GCTGTGATGGCACATTCTGACTCAAAAGT	TTTTGACCAAAAAACATGCCATAATATCT		962
Query 560	ACCATTTTGTCTCTTTCCATACTTTCACTG	CCCCGTGAGCTGATCCAGTATAGACCAC		619
Sbjct 961	ACCATTTTGTCTCTTTCCATACTTTCACTG	CCCCGTGAGCTGATCCAGTATAGACCAC		902
Query 620	GCCGTCGAGGGTGGCAACACCGAGTTGAC	AGCATCATCATGGGCCTTGACAGATTCAAC		679
Sbjct 901	GCCGTCGAGGGTGGCAACACCGAGTTGAC	AGCATCATCATGGGCCTTGACAGATTCAAC		842
Query 680	ACACTTTGAGCTGCTAACCTCCAGACCTT	GAACGTCTGTCCCATGAACAGAGTACAG		739
Sbjct 841	ACACTTTGAGCTGCTAACCTCCAGACCTT	AAACGTCTGTCCCATGAACAGAGTACAG		782
Query 740	AAACTCTTGTCTGGATTATGCTCATACA	AAGAAATGCATCTGCGTCTTTATCCATAG		799
Sbjct 781	AAACTCTTGTCTGGATTATGCTCATACA	AAGAAATGCATCCGCGTCTTTATCCATAG		722
Query 800	CGTGGTCCGTTTTTCGCTTGACTTCCACA	AATTTTTTGGCCTAATGGAAGCTTTGAAAAT		859
Sbjct 721	CGTGGTCCGTTTTTCCTTGACTTCCACA	AATTTTTTGGCCTAATGGAAGCTTTGAAAAT		662
Query 860	GTCAAAAACATGGGCAAAGTCCCTACAC	GTTGTGATTGCTGGGATTCTTGGAACTGAT		919
Sbjct 661	GTCAAAAACATGGGCAAAGTCCCTACAC	GTTGTGATTGCTGGGATTCTTGGAACTGAT		602
Query 920	CTTCCATACTCGAATTTTCCATCTTGAT	GACCAGTAAAAATCTTGTCACCCGATATAAT		979
Sbjct 601	CTTCCATACTCGAATTTTCCATCTTGAT	GACCAGTAAAAATCTTGTCACCCGATATAAT		542
Query 980	AATTGCCTTGACAAAGCCACTGTTAGAT	TTGAAGGCAGAGAATCTTTTCATGTTCTTCCA		1039
Sbjct 541	AATTGCCTTGACAAAGCCACTGTTAGAT	TTGAAGGCAGAGAATCTTTTCATGTTCTTCCA		482
Query 1040	AACACGAATGTTTTACTGTCTGAACCA	GTAAAGAATTCATTCTTGACAGATAAGGA		1099
Sbjct 481	AACACGAATGTTTTACTGTCTGAACCA	GTAAAGAATTCATTCTTGACAGATAAGGA		422
Query 1100	ATATATATGGCCCTCTTTCGGAACAAAC	GAACCAATTAACCATTTTGAGGCAAGTTTGT		1159
Sbjct 421	ATATATATGGCCCTCTTTCGGAACAAAC	GAACCAATTAACCATTTTGAGGCAAGTTTGT		362
Query 1160	AGTCAGTACTGTCTCATTGAAATTTGAC	CAGGGAGATTTTCATGAAAGGTGAAGTTGGGTT		1219
Sbjct 361	AGTCAGTACTGTCTCATTGAAATTTGAC	CAGGGAGATTTTCATGAAAGGTGAAGTTGGGTT		302
Query 1220	CCATGGGGACATCATTGTTGGAGAGGCAT	CCGCGCTTTGGCTGCAGAGGTCATAGGCAGA		1279
Sbjct 301	CCATGGGGACATCATTGTTGGAGAGGCAT	CCGCGCTTTGGCTGCAGAGGTCATAGGCAGA		242
Query 1280	GAAGGCGAAANT-CTCGTCAGTGGTGGT	GAACACATTATGAACC	1322	
Sbjct 241	GAAGGCGAAANTCCTCATCAGTGGTGGT	GAACACATTATGGACC	198	

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.9 bits(24)	0.20	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Minus
Query 160	CCTTGACAGATT	171		
Sbjct 857	CCTTGACAGATT	846		

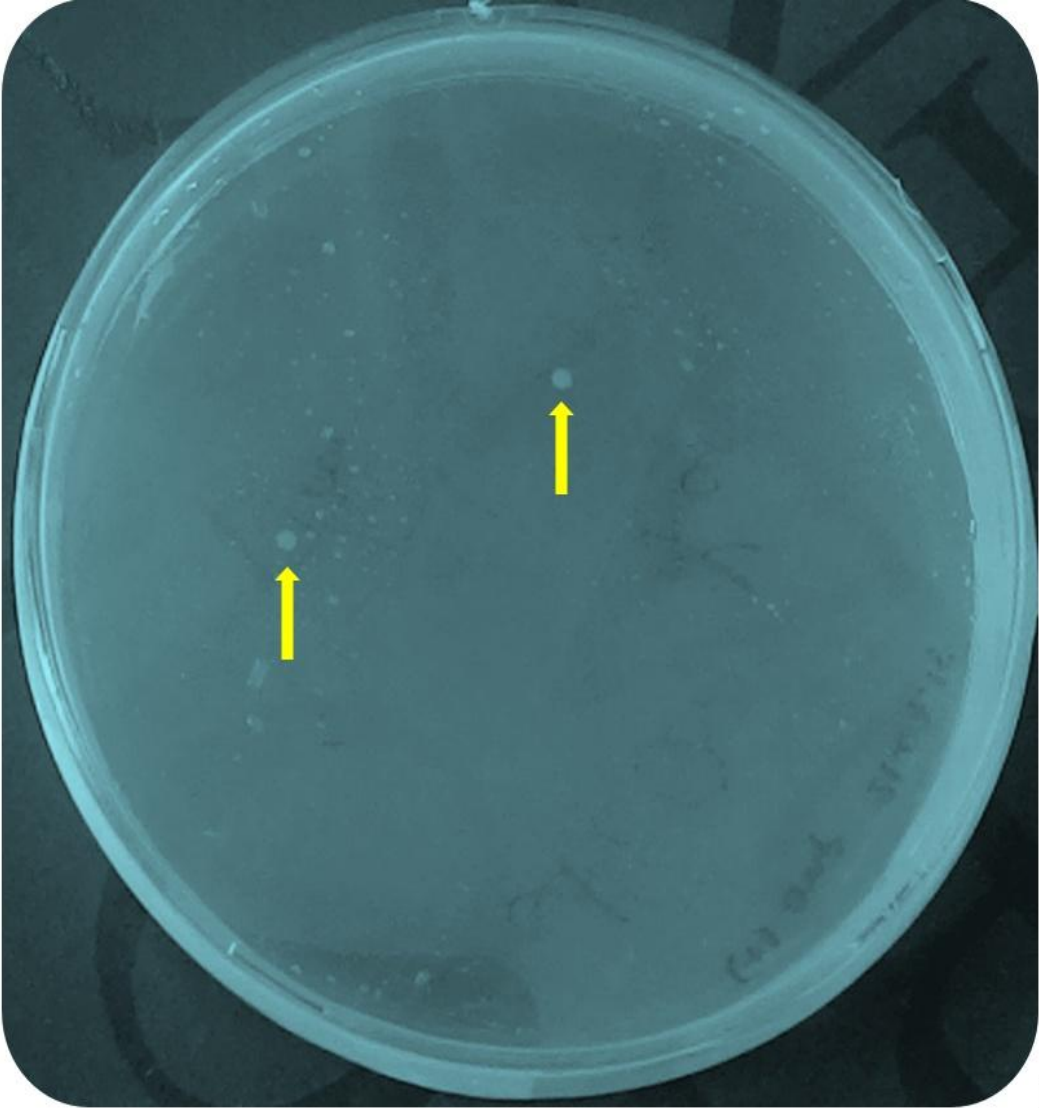
Range 3: 123 to 136 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
21.1 bits(22)	0.71	13/14(93%)	0/14(0%)	Plus/Plus
Query 649	CAGCATCATCATGG	662		
Sbjct 123	CATCATCATCATGG	136		

Şekil 3.25: İkili blast Sonuçları.

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

E. coli'nin BL21 suşuna transforme edilen rekombinant plazmitten başarılı sonuçlar alındı. Şekil 3.26'da 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.

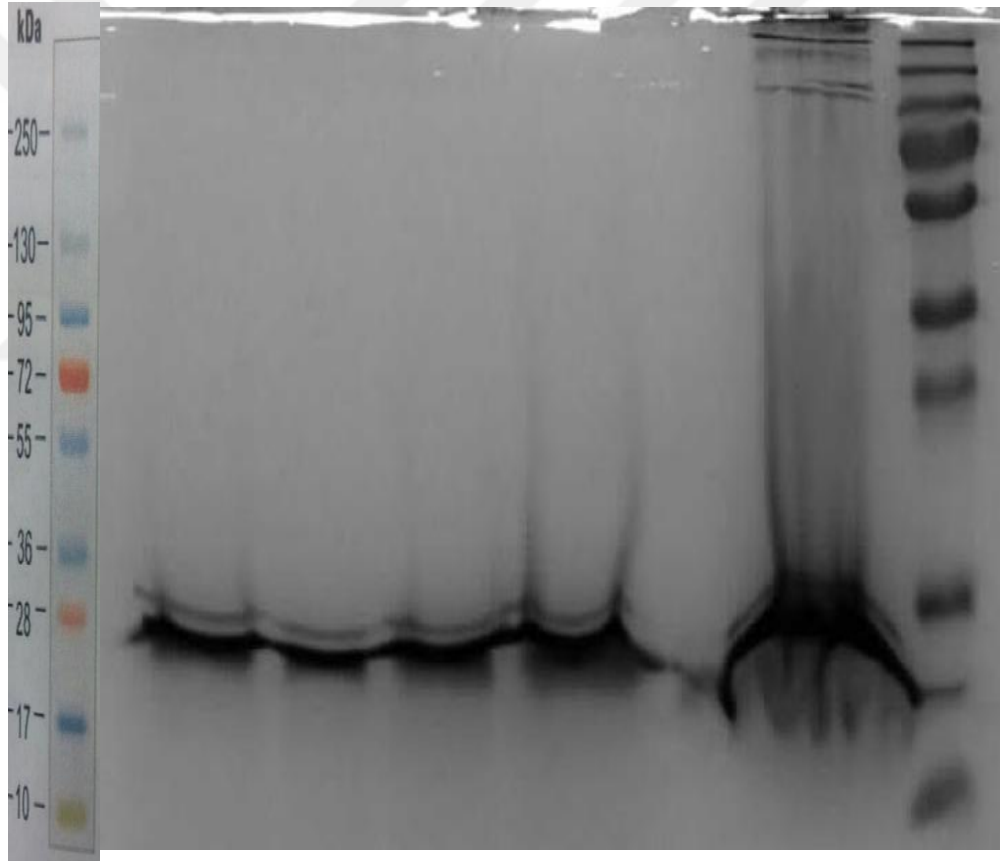


Şekil 3.26: Rekombinant BL21 suşunun kolonileri.

3.12 Protein Saflık Tayinlerinin Sonuçları

3.12.1 SDS- Page Sonucu

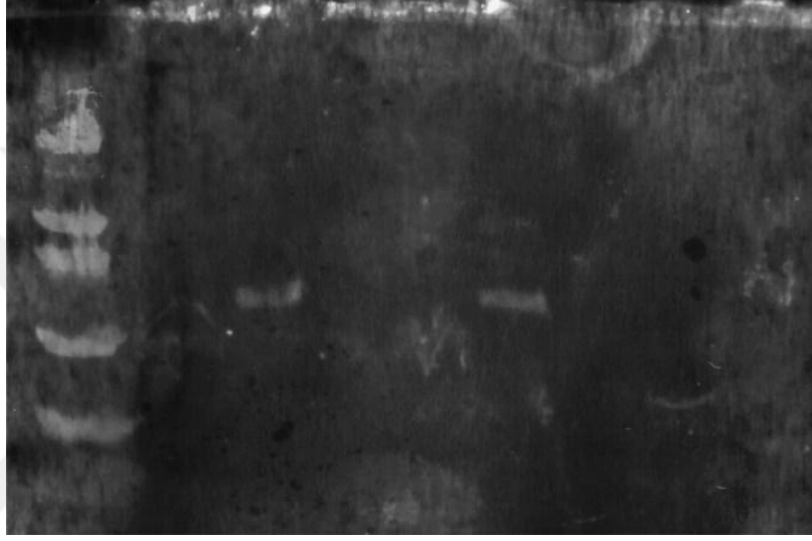
Şekil 3.27 üzerinde gösterilen sonuçta, jel üzerinde yer alan protein marker (belirteç) bölgesinde ki 10 kDa olarak belirlenmiş olan bölgenin hemen üst kısmındaki çizgi 17 kDa'ı belirtmemektedir. Bu esasında bir lekedir (smear). Durum bu şartlar altında iken lizise edilen proteinimizin sds page ölçümleri yapıldı. İstediğimiz protein olduğunu bize düşündüren yaklaşık 18 kDa'luk bölge de keşfedildi.



Şekil 3.27: SDS- Page deneyi sonrası elde edilen görüntü.

3.12.2 Western- Blot Analizi Sonuçları

Özel his-tag antikorlar ve blokajlamalar ile western deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 3.28 ve 3.29 üzerimden incelemeye sunuldu. Proteinin yaklaşık 20 kDA ağırlığında bir protein olduğu saptandı. Daha önceden yapılan biyoinformatik çalışmalardan daha farklı bir sonuç elde edildi. Bu sonuçların güvenilirliğini test etmek amacıyla moleküler klonlama etabından başlanılmak üzere tekrar deneyleri yapıldı. Lakin sonuç değişmedi.



Şekil 3.28: Western Blot Deneyi sonucu elde edilen görüntü.



Şekil 3.29: Western Blot Deneyi sonucu elde edilen görüntü.

Şekil 3.29' de Primer 3 ile yapılan klonlama ve protein ifadesi gibi çalışmalar sonucu elde edilen proteinle yapılan western- blott deneyi görüntüsü de verildi.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir önceki bulgular bölümünde elde ettiğimiz sonuçlardaki veriler neticesinde tartışma ve sonuç kısmını oluşturmaktayız. Elimizdeki tam uzunluktaki, 1608 nükleotitten oluşan, en fazla yaklaşık 331 aminoasiti kodlaması beklenen, 3' bölgesinde konumlanmış olan 18 nukleotid poli A kuyruğu içeren dk29 gen dizisinin, 5' ve 3' uçlarından olması şartıyla, yaklaşık 1300 nt bölgesi gene özgü tasarlanan primerlerle çoğaltılıp dizi analizleri 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 sağlandı. Yapılan western blot ve sds page deneyleri sonucunda 1300 nt olarak klonlanılan ve *E.coli*'de ifadesini sağlanan genin yaklaşık 20kDA ağırlığında bir bölümü ortaya çıkartılmıştır. Bu duruma zıt olarak yapılan biyoinformatik çalışmalarda 37- 40 kDA ağırlığında bir protein tespit edeceğimiz umuldu. Fakat 2. antikorlama işlemi yani Ant- i WD40 Antibody'si ile antikorlama yapılmamasından kaynaklandı düşünülen bu durum için sadece 1. antikorun hedef histidin kuyruğuna yapıştığı için sadece bu bölgeyi görünür kıldığı düşünüldü. Başka bir yorumda yapılması gerekirse, ökaryot ganomunda yer alan genin, ifadesinin prokaryot bir canlıdan elde edilmesinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan biyoinformatik analizler ve dizi analizleriyle genimizin açık okuma çerçevesi bulma, protein yapısı, nükleotid ve aminoasit diyagramı gibi birçok faydalı araştırmalarda yapıldı. Bunların içinden protein yapısı araştırmaları neticesinde genin ve proteinin yapısı hakkında çok önemli veriler edindik, bu veriler şöyledir, yaklaşık 331 aminoasiti kodlayan cDNA dizimizin protein yapısında 2 adet WD40 tekrarı motifi içerdiği ve aminoasit asit diyagramında Serin aminoasiti gibi hidrofilik bir aminoasitin fazla çıkmasından ötürü genin enzim yapısında, bir integral membran protein motifinde içerdiği ortaya çıkartıldı. Elde edilen bu veriyi ispatlarcasına Arabidopsis ve pirinç üzerinde yapılan bir çalışmada 15 arabidopsis, 9 pirinç DWD proteinlerinin yapısında ekstradan 2'si Arabidopsis, 1'i pirinçte olmak üzere DWD motifinden başka ekstra bir LisH motifine rastlanmıştır. Bu motifinde

mikrotübüllerin dimerizasyonuna yardım ettiği ve dolayısıyla WD domaininde mikrotübül oluşumuna yardım edebileceği ve yine aynı çalışma üzerinde 5'i Arabidopsis 4'ü pirinçte olmak üzere DWD proteinine ek olarak Serine/Threonine Protein Kinase Domainine rastlanılmıştır [30].

Elde edilen bu bilgiler aynı zamanda nükleotid blast ve protein blast sonuçlarında meydana gelen karışık durumda çözümünü vermektedir. Blast sonuçlarını bir kez daha açıklamamız gerekirse, BlastN sonucunda gen dizimizin Nicotiana (Tütün) bitkisinde “Guanin Nükleotidi Taşıyan Proteini” kodlayan gene yine aynı bitkide “Miyozin Ağır Zincir Kinaz B” kodlayan gene, “WD40Tekrarı İçeren F- Box Proteinine” benzerlik gösterdiği ama bil hassa da en çok Susam (Sesamum) Bitkisinde “E3 Ubiquitin Ligaz Genine” ve aynı oranda “WD40Tekrarları İçeren Genlere” benzer çıktığını hemen hatırlayacağız. Dahası konuyla ilgili olarak yapılan bir araştırmaya göre insan WD40 domainlerinde başka hiçbir domaine rastlanmamış olmakla birlikte, bitkilerdeki her WD40domaini mutlaka F- Box ve SOCSdomainleriyle birlikte tespit edilmiştir [43]. Dokusal ve Zamansal İfade seviyelerini incelendiğinde, karakterize edilen genin, ubiquitin genine oranla, ham meyve ve çiçek gibi dokuların, yaprak ve tomurcuk dokularına oranla ifade seviyelerinin düşük çıkmasıyla, başka bir makalede ispat edilene göre bitkisel organların dokularının oluşumu sırasında (kök, gövde, tohum, solgun yaprak) ifade seviyelerinin arttığını, erkek organ, ovaryum, ham meyve gibi organlarının dokularına oranla ifadesini azalması durumu [9] deneylerle elde edilen verilerle benzer sonuçlar içermektedir. Bu da karakterize edilen genin ifadesininWD40 tekrarı içeren bir protein olma olasılığını arttıran bir başka belge olarak kaydedilmiştir. WD40tekrarları ve Ubiquitinler arası reseptör ilişkisi, meyve oluşumu ve tozlaşma gibi konuları içinde kapsayan Kendine- Uyuşmazlık Mekanizmalarındaki görevi ise araştırılmaya değerdir. Daha ileri bir tarihte de bu konu üzerine çalışma tasarlanılmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E.J., “The Wd Repeat: a common architecture for diverse function”, *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 181-185, 1999.
- [2] Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M., and Assmann, S.M., “Plantheterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants”, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 719- 731, 2004.
- [3] Van Nocker, S., and Ludwig, P., “The WD-repeat protein super family in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function”, *BMC Genomics*, 4(1), 50, 2003.
- [4] Mishra, A.K., Puranik, S., Bahadur, R.P., Prasad, M., “The DNA-binding activity of an AP2 protein is involved in transcriptional regulation of a stressresponsive gene, SiWD40, in foxtail millet”, *Genomics*, 100, 252- 63, 2012.
- [5] Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., Zheng, N., “Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery”, *Nature*, 443, 590- 593, 2006.
- [6] Hu, J., Mc Call, C.M., Ohta, T., Xiong, Y., “Targeted ubiquination of CDT1 by the DDB1- CUL4A- ROC1 ligase in response to DNA damage”, *Nature Cell Biology*,6, 1003- 1009, 2004.
- [7] Jae- Hoon Lee, William Terzaghi, Giuliana Gusmaroli, Jean- Benoit F. Charron, Hye- Jin Yoon, Haodong Chen, Yizhou Joseph He, Yue Xiong, Xing Wang Deng, “Chracterization of Arabidopsis and Rice DWD Proteins and Their Roles as Substrate Receptors for CUL4- RING- E3 Ubiquitin Ligases”, *Plant Cell*, 20, 152- 167, 2008.

- [8] Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H.P., Krajinski, F., “Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*”, *Plant Molecular Biology*, 50, 109, 2004.
- [9] Kumar, S., Jordan, M.C., Datla, R., Cloutier, S., “The *LuWD40-1* Gene Encoding WD Repeat Protein Regulates Growth and Pollen Viability in Flax (*linum Usitatissimum*)”, *PLoS ONE* 8 (7), e69124, 2013.
- [10] Han, M.J., Jung, K.H., Yi, G., Lee, D.Y., An, G., “Rice Immature Pollen 1 (RIP1) is a regulator of late pollen development”, *Plant and Cell Physiology*, 47(11), 1457- 1472.
- [11] Hochstrasser, M., “Ubiquitin-dependent protein degradation”, *Annual Review of Genetics*, 30, 405- 439, 1996.
- [12] Moon, J., Parry, G., Estelle, M., “The ubiquitin-proteasome pathway and plant development”, *The Plant Cell*, 16, 3181- 3195, 2004.
- [13] Stone, S.L., “The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling”. *Frontiers in Plant Science*, 5, 135, 2014.
- [14] Smalle, J., Vierstra, R.D., “The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway”, *The Annual Review of Plant Biology*, 55, 555- 559, 2004.
- [15] Muckhopadhyay, D., Riezman, H., “Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling”, *Science*, 315, 201- 205, 2007.
- [16] Vierstra, R.D., “The ubiquitin/26S proteasome system at the nexus of plant biology”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 385- 397, 2009.
- [17] Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., Goring, D.R., “ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen”, *The Plant Cell*, 15(4), 885- 898, 2003.
- [18] De Nettancourt, D., “Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants”, *Springer*, 2001.

- [19] Ghassem Tehrani, Susan K., Brown, “Pollen-incompatibility and self-fertility insweet cherry”, *Plant Breeding Reviews*, 9, 1992.
- [20] Ed Newbigin, Marilyn A. Anderson, and Adrienne, E. Clarke, “Gametophytic Self-Incompatibility Systems”, *Plant Cell*, 5, 1315- 1324, 1993.
- [21] Ken-Ichi Kubo, Tetsuyuki Entani, Akie Takara, Ning Wang, Allison M. Fields, Zhihua Hua, Mamiko Toyoda, Shin-Ichi Kawashima, Toshio Ando, Akira Isogai, Teh-Hui Kao, Seiji Takayama, “Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase–Based Self-Incompatibility”, *Science*, 330, 796- 799, 2010.
- [22] Haring, V., Gray, J.E., McClure, A. et al, “Self-incompatibility: a self-recognition system in plants”, *Science*, 250, 937– 941, 1990.
- [23] Sassa, H., Kakui, H., Minamikawa, M., “Pollen-expressed Fbox gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae”, *Sexual Plant Reproduction*, 23, 39– 43, 2010.
- [24] Gao, Z.H., Wang, P.P., Zhuang, W.B., Zhang, Z., “Sequence analysis of new S-RNase and SFB alleles in Japanese apricot (*Prunus mume*)”, *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 751- 762, 2013.
- [25] Brewbaker, James, I., “Pollen Cytology And Self- Incompatibility Systems In Plants”, *Journal of Heredity*, 48, 6, 1957.
- [26] Stein, J., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B., “Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica olearacea*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 8816– 8820, 1991.
- [27] De Graaf, B.H.J., Lee, C., McClure, B., Franklin-Tong, N.V.E., “Cellular mechanisms for pollen tube growth inhibition in gametophytic self-incompatibility”, *Plant Cell Monographs*, 3, 201- 221, 2006.

- [28] Franklin-Tong, N., Franklin, F.C.H., “Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms”, *Trends in Plant Science*, 8, 598–605, 2003.
- [29] Sun, P., Kao, T.H., “Self-incompatibility in *Petunia inflata*: the relationship between a self-incompatibility locus F-box protein and its non-self S-RNases”, *Plant Cell*, 25, 470–485, 2013.
- [30] Adoración Zafra, María Isabel Rodríguez-García, Juan de Dios Alché, “Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development”, *BMC Plant Biology*, 10, 36, 2010.
- [31] Catherine Marie Breton, Daniela Farinelli, Sarfraz Shafiq, John Seymour Heslop-Harrison, Margaret Sedgley, André Jean Bervillé, “The self-incompatibility mating system of the olive (*Olea europaea* L.) functions with dominance between S-alleles”, *Tree genetics and Genomes*, 10, 1055-1067, 2014.
- [32] Qiagen Corp., “DNeasy Plant Handbook”, *Qiagen DNeasy*, 2013.
- [33] Qiagen Corp., “RNeasy Mini Handbook - (EN)”, *Qiagen DNeasy*, 2013.
- [34] Thermo Fisher Scientific Inc., “User Guide: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 20 rxns”, *Thermo Fisher Scientific User Guide*, 2015.
- [35] Ekrem Dündar, Öznur Suakar, “Mining olive genome through library sequencing and bioinformatics: Novel sequences and new microsatellites”, *African Journal Of Biotechnology*, 9(17), 2499-2509, 2010.
- [36] Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., “Primer3 - new capabilities and interfaces”, 40 (15), 115, 2012.
- [37] “ExpASy SIB Bioinformatics Resource Portal”, SIB Swiss Institute of Bioinformatics.
- [38] U.S. National of Medicine, [Çevrimiçi], Available, 2014.
- [39] Tom, H., “Bioedit Sequence Alignment Editor”, *Ibis Biosciences*, 41: 95-98, 1999.

- [40] Thermo Scientific Inc., “aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System, User guide: aLICator LIC Cloning and ExpressionKit 1 (untagged) Handbook”, *Thermos Fisher Scientific User Guide*, 2015.
- [41] Machery and Nagel Comp., “PCR Clean Up and, Extraction User manual”, *Macherey- Nagel*, 2014.
- [42] Thermo Scientific Inc., “Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit”, *Thermos Fisher Scientific*, 2015.
- [43] He, Y.J., Mc Call, C.M., Hu, J., Zeng, Y., Xiong, Y., “DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4- ROC1 ubiquitin ligases”, *Genes and Development*, 20, 2949- 2954, 2006.