

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

ZEYTİN TAHMİNİ DNAJ GENİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şenay SÜNGÜ

Balıkesir, Temmuz – 2011

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

**ZEYTİN TAHMİNİ DNAJ GENİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şenay SÜNGÜ

Balıkesir, Temmuz – 2011

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

ZEYTİN TAHMİNİ DNAJ GENİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şenay SÜNGÜ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 15 / 07 / 2011

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (Danışman-BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK (BAÜ)

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

Balıkesir, Temmuz – 2011

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 106O616 ve 110O108 no.lu projeler ile ve Balıkesir Üniversitesi tarafından 2011 – 15 no.lu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

ZEYTİN TAHMİNİ *DNAJ* GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Şenay SÜNGÜ
Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada zeytin bitkisinde (*Olea europaea* L.) kasım ayı meyveli yapraklardan oluşturulmuş cDNA kütüphanesinden izole edilen tahmini *DnaJ* geninin moleküler analizi yapıldı. Gen, çeşitli biyoinformatik araçlar yardımıyla analiz edilerek nükleotid ve aminoasit kompozisyonları ve açık okuma çerçevesi belirlendi. Ayrıca proteinin korunmuş bölgeleri ile hücre içerisindeki lokalizasyonu tahmin edildi. İntron bölgelerinin tespiti amacıyla değişik primer kombinasyonları kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Polimorfizm analizi için zeytin çeşitlerine ait yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden toplandı ve özgül primerlerle PCR yapıldı. Var yılı ve yok yılı olarak isimlendirilmiş zeytin ağaçlarından 12 ay boyunca doku örnekleri toplandı. Dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesini belirlemek amacıyla çeşitlerden RNA izole edilerek anlık gösterimli (real - time) PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Analizler sonucunda tahmini *DnaJ* geninin 433 aminoasit uzunluğunda bir protein kodladığı tespit edildi. Bu genin kodladığı proteinin yüksek oranda serin ve glisin aminoasitleri ihtiva ettiği görüldü. İntron analizi sonucunda biri yaklaşık 1 kb diğeri de yaklaşık 2 kb büyüklüğünde 2 intron tespit edildi. 400 bç'lik bölgede çok sayıda tek nükleotid polimorfizmlerine rastlandı. Özellikle Koroneiki, Samanlı, Edincik su, Karamürsel Su, Çakır çeşitlerinde SNP'lerin bulunduğu bölgede heterozigot noktalar tespit edildi. Anlık gösterimli (real – time) PCR analizleri zeytin *DnaJ* geninin soğuk stresinde görevli olabileceği sonucunu işaret etmektedir. Yaprak, çiçek, tomurcuk ve sürgün gibi dokularda *DnaJ* geni ifade seviyeleri arasında belirgin bir farklılığa rastlanmazken meyve dokusundaki analizlerde ise çok daha yüksek seviyelerde mRNA sentezinin olduğu ve meyve olgunlaştıkça mRNA miktarının arttığı tespit edildi.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Zeytin, DnaJ, ısı şoku proteini, intron, anlık gösterimli (real – time) PCR, polimorfizm analizi, SNP.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIVE PUTATIF DNAJ GENE

Şenay SÜNGÜ
Balıkesir University, Institute of Science, Biology

MSc Thesis / Supervisor: Assistant Prof. Dr. Ekrem DÜNDAR

Balıkesir – Turkey, 2011

In this study, molecular and physiological analysis of olive putative *DnaJ* gene isolated from cDNA library which has been generated from olive plant's (*Olea europaea* L.) leaves in November were studied. The putative gene was analyzed with many bioinformatics tools. The nucleotide, amino acid compositions, and the open reading frame were determined. In addition, the localization of the protein in a cell, and conserved domains have been estimated. PCR reactions were carried out using different primer combinations in order to determine intron regions. Leaf samples of olive cultivars were collected from Edremit Olive Tree Breeding Station, and PCR was performed with the specific primers for polymorphism analysis. Tissue samples were collected from olive trees that were identified as “off year” and “on year” for 12 months. RNAs were isolated from olive tissues and real - time PCR analyses were performed in order to determine the level of spatial and temporal expression. As a result of the analyses, it was determined that *DnaJ* gene encodes a protein which is 433 amino acid - long. The putative protein contains a great number of glycine and serine amino acids. In intron analysis, at least two introns (one 1 kb and one around 2 kb) were found. A large number of single nucleotide polymorphisms were found in a 400 bp region. Especially, Koroneiki, Samanlı, Edincik Su, Karamürsel Su and Çakır cultivars have heterozygous SNPs. Real - time analysis suggested that the olive *DnaJ* gene could be responsible for cold stress response. Between *DnaJ* gene expression levels of leaves, flowers, buds, and shoot tissues no significant difference was observed. According to the fruit tissue analysis, gene expression was much higher than the other tissues and it increased as the fruit matured.

KEYWORDS: *Olea*, DnaJ, heat shock protein, intron, real – time PCR, polymorphism analysis, SNP.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Proteinlerin Katlanması ve Yığılması	1
1.2 Isı Şoku Proteinleri	2
1.2.1 Hsp70 Ailesi	3
1.2.2 Şaperoninler (Hsp60)	6
1.2.3 Hsp90 Ailesi	8
1.2.4 Hsp100 / Clp Ailesi	10
1.2.5 Küçük Hsp Ailesi	11
1.3 Hsp / Şaperon Ağı	12
1.4 Hsp / Şaperonlar ve Diğer Stres Cevabı Mekanizmaları	15
1.5 Küçük Isı Şoku Proteinleri Hsp40'ın Yapısı ve İşlevi	16
1.5.1 Hsp40 Protein J – Domain Yapısı	18
1.5.2 Tip I ve Tip II Hsp40 Üyeleri Peptid Bağlanma Fragmentleri	19
1.6 Hsp40 Protein ve Substrat Polipeptid Etkileşimi	21
1.7 Hsp40 – Hsp70 Şaperon Sistemi	21
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Biyoinformatik Analiz	23
2.2 Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	24
2.3 Polimorfizm Çalışmaları İçin Bitki Materyali Toplama	25
2.4 DNA İzolasyonu	25
2.5 Primer Dizaynı ve Sulandırması	26
2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
2.7 Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.8 Anlık Gösterimli (Real – Time) PCR İçin Bitki Materyali Toplama	30
2.9 RNA İzolasyonu	31
2.10 DEPC'li Su Hazırlama	32
2.11 Reverse Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	34
2.12 Anlık Gösterimli (Real – Time) PCR	34
2.13 Standart Eğrinin Oluşturulması	36

2.14 Zeytin <i>DnaJ</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	37
2.14.1 Lauria Bertani (LB) ve Lauria Bertani Agar Hazırlanması	37
2.14.2 Kompetant Hücre Hazırlanması	37
2.14.3 Genin PCR İle Çoğaltılması	38
2.14.4 Zeytin <i>DnaJ</i> Geni ve <i>pPICZαC</i> Ekspresyon Vektörü'nün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi	39
2.14.5 Zeytin <i>DnaJ</i> Geni'nin <i>pPICZαC</i> Ekspresyon Vektörü'ne Ligasyonu	40
2.14.6 Rekombinant Ekspresyon Vektörü'nün <i>E. coli</i> DH10B Suşu Kompetant Hücresine Transformasyonu	41
2.14.7 Rekombinat Kolonilerin Tespiti: Koloni PCR	41
2.14.8 Rekombinant <i>pPICZαC</i> Vektör'ün İzolasyonu	42
3. BULGULAR	43
3.1 Genomik DNA İzolasyonu ve PCR	43
3.2 İntron Tespiti	44
3.3 Polimorfizm Analizi	46
3.4 Biyoinformatik Analiz	50
3.4.1 NCBI (National Center For Biotechnology Information)	50
3.4.2 BioEdit Programı	53
3.4.3 ExPASy	56
3.5 Dokusal ve Zamansal Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	58
3.6 Ekspresyon Vektörü <i>pPICZαC</i> 'ye Klonlama	61
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
5. KAYNAKLAR	70

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Hsp70 proteinlerinin korunmuş bölgeleri	4
Şekil 1.2	Stres cevabında ısı şoku proteinleri	14
Şekil 1.3	Hsp40 protein çeşitleri ve korunmuş bölgeleri.	17
Şekil 1.4	Hsp40 proteinine ait J - domain yapısı	19
Şekil 1.5	Maya tip II Hsp40 Sis1 proteinine ait peptid bağlanma fragmentinin kristal yapısı	20
Şekil 1.6	Hsp40 - Hsp70 şaperon sistemi	22
Şekil 2.1	Dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan “var yılı” ve “yok yılı” ağaçları	31
Şekil 2.2	Zeytin bitkisine ait farklı dokulardan örnek toplanması	31
Şekil 3.1	Genomik DNA örneklerine ait agaroz jel görüntüsü	43
Şekil 3.2	Genomik DNA ve cDNA'dan çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 3.3	İntron tespitinde farklı primer kombinasyonları kullanılarak elde edilen PCR ürünleri	45
Şekil 3.4	İntron analizinde kullanılan primerlerin yerleşimi ve intron bölgeleri	46
Şekil 3.5	Zeytin çeşitlerine ait PCR ürünleri.	47
Şekil 3.6	Çakır çeşitine ait kromotoğramdaki heterozigot bölgeler	48
Şekil 3.7	Zeytin çeşitlerine ait neighbour - joining filogenetik ağaç	50
Şekil 3.8	Ck17 - 90 klonunun BLAST analizi	51
Şekil 3.9	BLAST ile tespit edilen benzer kayıtlar	51
Şekil 3.10	Farklı türlere ait DnaJ proteinlerinin korunmuş bölgeleri	52
Şekil 3.11	Ck17 - 90 klonunun nükleotid kompozisyonu	53
Şekil 3.12	Zeytin DnaJ proteinine ait aminoasit dizisi	54
Şekil 3.13	DnaJ proteinin aminoasit kompozisyonu	54
Şekil 3.14	Çeşitli bitki türlerinde mevcut DnaJ protein peptid bağlanma fragmentini oluşturan aminoasit dizileri	55
Şekil 3.15	Proteinin hücre içi yerleşimi	56
Şekil 3.16	J-protein sinyal peptid analizi	57
Şekil 3.17	DnaJ proteinin hücre içi lokalizasyonu	57
Şekil 3.18	Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 3.19	Anlık gösterimli PCR analizlerinde kullanılan standart eğri	59
Şekil 3.20	Zamansal ekspresyon grafiği	60
Şekil 3.21	Dokusal ekspresyon grafiği	60
Şekil 3.22	Farklı meyve dokularında <i>DnaJ</i> ekspresyon seviyesi	61
Şekil 3.23	Ligasyon ürünleri ve kontrolleri	62
Şekil 3.24	Rekombinant plazmitleri içeren kolonilere ait petri görüntüsü	63
Şekil 3.25	Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	64
Şekil 3.26	Rekombinant plazmitin dizileme ile doğrulanması	64
Şekil 3.27	Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	65

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2. 1	Toplanan zeytin çeşitleri	25
Tablo 2.2	PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri.	27
Tablo 2.3	Primer çalışma solüsyonlarının hazırlanması	27
Tablo 2.4	PCR komponentleri, kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları	28
Tablo 2.5	PCR döngü koşulları	28
Tablo 2.6	Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler	30
Tablo 2.7	Ekspresyon seviyelerini belirlemek için toplanan örnekler	33
Tablo 2.8	RT - PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler, konsantrasyonları ve PCR döngü koşulları	34
Tablo 2.9	Anlık gösterimli (Real – time) PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları	35
Tablo 2.10	Anlık gösterimli (Real – time) PCR döngü koşulları	35
Tablo 2.11	<i>DnaJ</i> genine ait dilüsyon serileri	36
Tablo 2.12	Lauria Bertani sıvı ve agar besi yeri bileşenleri	37
Tablo 2.13	PCR döngü koşulları	39
Tablo 2.14	FastDigest çiftli kesim komponentleri ve miktarları	40
Tablo 3.1	Zeytin çeşitlerindeki SNP noktaları ve heterozigot bölgeler	48

KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
ACD:	α -kristallin
ADP:	Adenozin difosfat
Ala:	Alanin
Arg:	Arjinin
Asp:	Asparajin
ATP:	Adenozin trifosfat
bp:	Base pair (Baz çifti)
CCH:	Sitoplazmik şaperon heretokompleksi
cDNA:	Complementary DNA (Komplementer DNA)
Cpn:	Şaperon
Cys (C):	Sistein
DEPC:	Dietilpirokarbonat
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksiribonükleosid trifosfat
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
EtBr:	Etidyum bromid
gDNA:	Genomik DNA
Gly:	Glisin
Hip:	Hsp70 etkileşimli protein
His:	Histidin
Hop:	Hsp70/Hsp90 organizasyon proteini
HSF:	Isı şoku faktörleri
Hsp:	Isı şoku proteinleri
Kb:	Kilo baz
LB:	Lauria Bertani
Lys:	Lizin
Met:	Metiyonin
NADH:	Nikotiamit adenin dinükleotid
NADPH:	Nikotiamit adenin dinükleotid fosfat
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pro:	Prolin
PSI:	Photosystem (Fotosistem) 1
PSII:	Photosystem (Fotosistem) 2
RNA:	Ribonükleik asit
RT-PCR:	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
sHsp:	Küçük ısı şoku proteini
SNP:	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

Taq: *Thermus aquaticus*
TBE: Tris borat etilendiamintetraasetikasit
Trp: Triptofan
UPR: Katlanmış protein cevabı
UV: Ultraviyole
Val: Valin

ÖNSÖZ

Hayatım boyunca aldığım bütün kararlarda daima yanımda olan, karşılıksız ve sonsuz desteklerinden dolayı elde ettiğim her başarıda en büyük pay sahibi olduğumu düşündüğüm değerli aileme ve Kubilay ŞEKER'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca, deneyimleriyle beni yönlendiren, değerli zamanını ayıran, her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yard. Doç Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkürlerimi sunarım.

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

Ders ve deney aşamalarında deneyimlerinden ve engin bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, ve Yard. Doç. Dr. Fatih ÇOŞKUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel aşamada her türlü desteği esirgemeyen değerli hocalarım Araş. Gör. Görkem Deniz SÖNMEZ, Araş. Gör. Meltem ALPER ve Araş. Gör. Sümeyye AYDOĞAN, Öznur SUAKAR ve Şakir AKGÜN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda beraber olduğumuz başta grup arkadaşlarım Gülçin ÇETİN; Zeynep KARABAŞ, Müslime YAVUZ, Gamze YENER olmak üzere bütün çalışma arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

Toplanan zeytin örneklerinin -80 °C dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde nukleazlardan korumak için kullanılan sıvı azotun temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği Müdürü Hasan DERTLİ'ye teşekkür ederim.

Balıkesir, 2011

Şenay SÜNGÜ

1. GİRİŞ

Genom projesi biyolojik araştırmaların rotasının farklı bir yöne kaymasına sebep oldu. Bu alanda genomik, genomla ilgili araştırmalar, proteomik, organizmadaki proteinlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, biyoinformatik, biyolojik bilgilerin toplanması ve yorumlanması gibi yeni terimler ortaya çıktı [1]. Fakat genlerin nükleotid dizisine ait bilgiyi elde etmek genom projesinin son basamağı değildi. Bir sonraki adım dizisi belirlenen bu genlerin şifrelediği proteinlerin tanımlanması, fizyolojik önemlerinin ve biyolojik işlevlerinin keşfinin de dâhil olduğu oldukça geniş alanı kapsamaktadır [2].

1.1 Proteinlerin Katlanması ve Yığılması

Protein katlanması neredeyse son 50 yıldır çalışılıyor olmasına rağmen yeni sentezlenen polipeptide ait üç boyutlu işlevsel yapının nasıl belirlendiği biyolojide en önemli problemlerden birini oluşturmaktadır. Anfinsen'in 1972'de Nobel ödülünü almasına yol açan in vitro protein katlanması çalışmaları, birincil yapıdaki aminoasit dizisinin üç boyutlu yapının oluşturulması için gerekli bilgiyi taşıdığını göstermiştir [3]. Bu çalışmalar genellikle düşük sıcaklık, yüksek protein dilüsyonları gibi protein yığılmasını engelleyen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. Fakat hücre ortamında sıcaklık ve pH koşulları, tuz konsantrasyonu ve özellikle toplam protein yoğunluğu gibi koşullar doğru protein yapısının oluşturulmasını sağlayan fizyolojik yollarla yarışma içerisindedir. Ayrıca translasyon polizom denilen pek çok ribozomun aynı mRNA üzerinde Gerçek zamanlı ilerlemesi sonucu yeni sentezlenmiş polipeptidlerin yoğunlaşması ile lokal kümelenmeye eğilimi artmaktadır [4]. Bütün bu istenmeyen koşullarla başa çıkabilmek için hücreler

moleküler şaperon adı verilen, yeni sentezlenmiş ya da stres koşulları sonucunda denatüre olmuş proteinlerin fonksiyonel üç boyutlu yapılarına kavuşmasına yardım eden enzim setlerini geliştirmişlerdir [5, 6].

1.2 Isı Şoku Proteinleri

Ekstrem sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, kimyasal toksisite, oksidatif stres gibi abiyotik stres koşulları ciddi çevresel tehditlere sebep olmaktadır. Dünya çapında abiyotik stres başlıca ürün kaybına ve mahsülde %50'den fazla verim düşmesine yol açan birincil faktörlerdendir. Bu nedenle stres cevabında ve stres toleransında rol alan moleküler mekanizmayı açıklamak oldukça önemlidir [7].

Çiçekli bitkiler gibi kompleks ökaryotlarda, tek bir hücrede yaklaşık 5×10^4 gen seçici olarak ifade edilmektedir [8]. Bütün bu genlerin protein ürünleri hücre işlevini belirlemektedir. Normal gelişim koşulları altında ya da stres sonrasında denatüre olmuş proteinlerin kaderi Hsp / şaperon mekanizması tarafından belirlenmektedir. Fakat bu mekanizma ile ilgili pek çok soru hala yanıtlanamamıştır. Örneğin hücre içerisindeki kalabalık çevrede şaperon proteinleri kendine özgü substratını nasıl tanıyabilmektedir? Denatüre olmuş bir proteinin katlanmasına ya da bozunması için hazırlanması sonucuna bu şaperon proteinler nasıl ve ne zaman karar vermektedir? Hsp / şaperon ağının merkezinde bir belirleyici faktör var mıdır [9]?

Pek çok protein grubunun şaperon aktivitesi tanımlanmıştır. Dahası çoğu moleküler şaperon stres proteinleridir ve orijinal olarak ısı şoku proteini olarak tanımlanmışlardır. Bu nedenle bütün bu grup proteinler ısı şoku proteini olarak isimlendirilmişlerdir. Ancak bu yardımcı moleküller sadece ekstrem sıcaklık stresinde değil su stresi, tuzluluk, ozmotik stres, soğuk stresi ve oksidatif stres gibi koşullara karşı cevapta da rol almaktadır [10].

Isı şoku proteinleri ile ilgili yapılan pek çok araştırma iyon taşınması, serbest radikallerin yok edilmesi, ileri embriyogenezde transkripsiyonel kontrolde görev alan protein ve faktörleri içeren temel mekanizmaların aydınlatılmasına adanmıştır [7]. Ancak sHsp'ler hariç bitkilerde abiyotik strese cevapta rol alan diğer Hsp'lerle ilgili çalışmalar nispeten sınırlıdır [11].

Hsp'ler 5 temel aile içerisinde toplanmaktadır. Bunlar Hsp70 (DnaK) ailesi, şaperoninler (GroEL ve Hsp60), Hsp90 ailesi, Hsp100 / Clp ailesi ve küçük Hsp ailesidir. Bu ana ailelerin yanında protein disülfid izomeraz ve endoplazmik retikulumda protein katlanmasında görev yapan calnexin / calreticulin gibi bazı proteinler de şaperon aktivitesine sahiptirler. Farklı sınıf şaperon proteinler farklı substrat proteinlere özgülük gösterir. Bu sınıflardan en iyi çalışılmış olanları Hsp70 ve şaperoninlerdir [9].

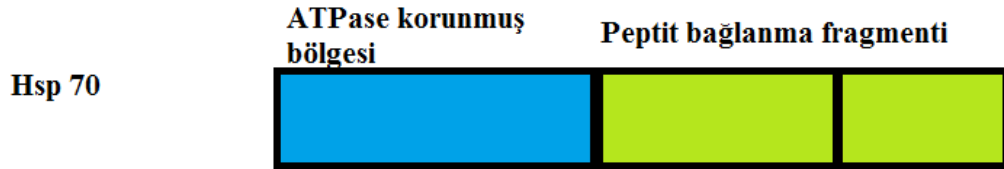
1.2.1 Hsp70 Ailesi

Hsp70 proteinleri, yardımcı şaperon proteinlerle beraber (DnaJ / Hsp40, GrpE) hemen hemen bütün hücrel kompartmanlarda protein katlanma sürecinin büyük bölümünde etkili olan hücrel mekanizmayı düzenler. Hsp70'ler normal koşullarda ya da stres altında olgun olmayan proteinlerin katlanmasına yardım etmede ve proteinlerin kümelenmesini engellemede temel fonksiyona sahiptirler [5, 12]. Ayrıca membranlar arasına ya da hücrel kompartmanlara protein taşınmasında ve lizozom ile proteozomlara yönlendirilmesiyle kararsız proteinlerin degradasyonunun gerçekleştirilmesi süreçlerinde rol almaktadırlar [5].

Hsp70 ailesinin bazı üyeleri konstitütif olarak ifade edilirler. Dolayısıyla yeni sentezlenmiş polipeptidlerin katlanmasına ve bu proteinlerin görev alacakları

hücrel bölgelere taşınmasına yardımcı olurlar. Diğer üyeler ise sadece organizma çeşitli çevresel saldırılara maruz kaldığında sentezlenmektedir. Bu nedenle proteolitik degradasyon veya degrades olmuş proteinlerin geri katlanmaları süreçlerine dâhil edilmektedirler. Bunlara ek olarak bazı Hsp70 üyeleri düzenleyici proteinlerin biyolojik aktivitelerini kontrol etmede görevlidirler ve transkripsiyona müdahale eden ısı şoku faktörlerinin negatif baskılayıcıları olarak çalışırlar [5, 12, 13].

Protein yapısına baktığımızda Hsp70 proteinleri, yüksek oranda korunmuş N - terminal ATPaz domaini ve C - terminal peptid bağlanma domaininden oluşmaktadır (Şekil 1.1). Peptid bağlanma - salınma döngüsü destekçi sistem ile birlikte Hsp70 proteinin içsel ATPaz aktivitesi ile bağıntılıdır [14].



Şekil 1.1 Hsp70 proteinlerinin korunmuş bölgeleri [15]

Hsp70 ailesi üyeleri, *Escherichia coli* Homoloğu *DnaK* ve ökaryotik Hsp70'ler arasında yaklaşık %50 benzerlikle diğer Hsp'lere kıyasla en yüksek oranda korunmuş proteinler olarak belirlenmektedir. Bitki stoplazmik stres70 proteinleri, memeli izologları ile daha yakın ilişkili iken mitokondriyal ve plastidik proteinler prokaryotik stres70'lere benzemektedir [8]. Ancak fonksiyonel özellikleri ve yapı benzerliklerine göre çeşitli protein setleri (memeli sitosolik Hsp110, maya

SSE proteinleri ve onların ER'deki kopyaları ve Grp170 memeli ortologları gibi) Hsp70 proteinlerinin alt ailesi olarak tanımlanmaktadır [16-19]. Her bir Hsp70 protein grubunun görevleri, lokalize oldukları hücrel kompartmanlara [12, 13], farklı gelişim seviyelerindeki ifade farklılıklarına [20] ya da Hsp70'in ilişkili olduğu protein setleri ile özgül etkileşimlerine bağlı olarak belirlenir [21]. Örneğin sitosolik Hsp70, protein yığılmasını engeller ve yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasına yardım ederken ER Bip protein, mitokondriyal ve kloroplastik Hsp70 proteinleri, öncül proteinlerin taşınmasında görevlidir [9].

Bitkilerde farklı türlerden pek çok Hsp70 proteinleri tanımlanmıştır [22, 23]. *Arabidopsis* genomunda Hsp70 ailesi üyelerini kodlayan en az 18 farklı gen bulunmuştur [20, 24]. Bunlardan 14'ü DnaK alt ailesine, 4'ü ise Hsp110 / SSE alt ailesine dâhildir. Ispanak genomunda ise en az 12 Hsp70 üyesi bulunmuştur. *Arabidopsis* ve ıspanakta yapılan ekspresyon analizleri; sıcaklık, soğuk, kuraklık, kimyasal ve diğer koşullar gibi çeşitli çevresel stres koşullarına karşı hücrel cevabın oluşmasında Hsp70 ifadesinin gerçekleştiğini göstermektedir [20, 24, 25].

Bitkilerde stres koşulları altında Hsp70 işlevinin hücrel mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Tütün'de yapılan çalışmalar, protoplastta BiP'in aşırı ekspresyonu [26] UPR - uyarıcı genlerin indüksiyonunu engellediği ve tunikamisin (kuvvetli katlanmamış protein cevabı aktivatörü) uyarıcı stres koşullarına karşı hücrel cevabı arttırdığı gözlenmiştir [27]. Bu durum BiP proteininin strese karşı doğrudan hücreyi koruduğunu işaret etmektedir. Bu sonuç su stresi ve tunikamisine maruz kalmayı takiben tütün bitkisinde BiP'in aşırı ifadesi ve baskılanması tarafından doğrulanmıştır. Beklendiği gibi daha yüksek BiP seviyeli tütün bitkileri kontrol bitkilere kıyasla kuraklık ve tunikamisin stresine karşı daha dayanıklıdır [28]. Dolayısıyla bitki BiP proteini stres koşullarında katlanmamış protein cevabında gereklidir. Çeşitli Hsp70 şaperon üyelerinin plazmodezma yoluyla virüs ve proteinlerin hücreden hücreye hareketinde olduğu gibi kloroplast ve mitokondriye [29] protein taşınmasında gerekli olduğu rapor edilmiştir [30].

Xiao-Ping Zhang ve Elzbieta Glaser, Hsp70 moleküler şaperonu ile bitki kloroplast ve mitokondri sinyal peptidin etkileşimine ait bir model sunmuşlardır [31]. Diğer şaperonlarla işbirlikli çalışmada (çözünür asidik protein grubuna dâhil olan ve sinyal aktarım yollarının bileşenleri arasındaki etkileşimi düzenleyen proteinler) Sitosolik Hsp70 proteinleri, mitokondri ve kloroplast öncül proteinleri ile etkileşime girer, onları açık konformasyonda tutarak taşınmaya uyumlu hale getirir. Hsp70'ler öncül proteinlerin membran içerisinden taşınmasında motor olarak kullanılabilir. kullanılabilmektedir.

Genel şaperon işlevlerine ek olarak Hsp70'ler diğer stres ilişkili genlerin ifadesinde düzenleyici faktör olarak görev alırlar [32]. Isı şoku cevabında Hsp70 ve HSF arasındaki etkileşim HSF arabuluculu transkripsiyonel aktivasyonda negatif düzenleyici mekanizma olarak önerilir [33]. Bu etkileşim, trimerizasyonu ve HSF'nin HSE'ye (ısı şoku elementi) bağlanmasının engeller. Bu sayede ısı şoku genlerinin HSF'leri ile aktivasyonu bloklanır. Ayrıca Hsp70 proteinleri, kinaz A, protein kinaz C ve protein fosfataz gibi sinyal dönüştürücülerin değişiminde gereklidir [34]. Bu açıdan Hsp70 şaperonlar hem stres koşullarında hem de normal gelişim koşullarında sinyal dönüşümünde birçok genin ifadesinin düzenlenmesinde geniş role sahiptir. Maalesef Bitkilerde bu sinyal dönüşüm mekanizması henüz aydınlatılmamıştır [9].

1.2.2 Şaperoninler (Hsp60)

Şaperoninler, (Hsp60, *E. coli* GroEL homologu olan moleküler şaperon sınıfını ifade etmede kullanılan ilk terim) prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondri ve kloroplastlarında bulunan moleküler şaperon sınıfıdır [5, 23]. Şaperoninler iki alt aileye ayrılır. GroE şaperoninler (grup I) bakterilerde, mitokondri ve kloroplastta bulunur. CCT şaperonları (t-kompleks polipeptid [TCP-1] içeren şaperonlar; Grup

II) ise Arkea'da ve ökaryot sitosolünde mevcuttur [35]. Şaperoninler yeni sentezlenmiş veya yeni taşınmış proteinlerin olgun yapılarına kavuşmasında oldukça önemli rollere sahiptirler [12, 14]. Şaperoninlerin yapıları ve işlevleri (özellikle Grup I şaperoninlerde) geniş ölçüde çalışılmıştır [5, 12, 14, 35, 36]. Prokaryotlarda Grup I şaperoninler iki ayrı aileden oluşur, şaperonin 60 (Cpn60) ve yardımcı şaperon olarak şaperonin 10 (Cpn10). Bu proteinler ATP'ye ihtiyaç duymadan bağımsız olarak beraber çalışmaktadır.

Hsp60 proteinleri, eş ya da yakın ilişkili alt ünitelerin döngüsel olarak simetrik bir biçimde arka arkaya yığılmasıyla oluşmuş çift halkalar şeklindedir [14]. Grup I şaperoninler arasında birincil yapının oldukça korunmuş olması sebebiyle organellerde bulunan şaperoninlerin bakteriyel olanlarla benzer işlevlere sahip olduğu kabul edilmektedir. Ancak önceki çalışmalar plastid şaperoninlerini diğer bakteriyel homologlarından ayıran yapısal ve fonksiyonel özelliğe sahip olduğunu göstermiştir [37]. Bitki kloroplast şaperoninleri iki ayrı polipeptidten oluşur. Bunlar sadece %50 aminoasit benzerliği gösteren Cpn60 α ve Cpn60 β 'dir. Kloroplast şaperoninlerini karakterize eden bir diğer farklılık ise yardımcı şaperoninler ile yapısal ilişkileridir [23]. Kloroplast yardımcı şaperoninler, iki adet GroES benzeri bakteriyel Cpn10'un (GroES) yaklaşık iki kat (20kDa) moleküler büyüklüğü olan domainlerden oluşurlar. Çift domainli yardımcı şaperoninlere ilave olarak *Arabidopsis* genomu en az bir normal büyüklükte Cpn10 içerir [38].

Grup I'in tersine Grup II şaperoninler sekiz ya da dokuz halkasal üyeden oluşurlar. Bu üyelerin her biri, birbiri ile ilişkili fakat farklı genler tarafından kodlanmaktadır ve yardımcı şaperonlardan bağımsızdırlar. CCT şaperoninleri aktin ve tübülünlerin katlanmasına yardım ederler [36].

Plastid Cpn60 proteini kodlama potansiyeline sahip olarak yedi *Arabidopsis* genomik dizisi tanımlanmıştır. Bunlardan ikisinin Cpn60 α alt ünitesini, dördünün ise Cpn60 β alt ünitesini kodladığı görülmüştür. Yedinci genomik dizi Cpn60 β alt

ünitesi yalancı genine (pseudo gen) benzemektedir. Dokuz *Arabidopsis* dizisinden ikisi ise CCT - ζ'ya karşılık gelen CCT protein alt üniteleri α, β, γ, δ, ε, ζ, η ve θ'ya benzer proteinleri kodladığı tahmin edilmektedir [38].

Bitki şaperonlerinin işlevsel karakterizasyonu oldukça sınırlıdır. Bu yardımcı proteinlerin Rubisko gibi plastid proteinlerine eşlik etmede önemli olduğuna inanılmaktadır [23, 39]. Mutasyona uğratılmış *Arabidopsis* kloroplast Cpn60α'nin, kloroplast gelişiminde ve daha sonraki seviyede bitki embriyo ve tohum gelişiminde bozukluklara yol açtığı rapor edilmiştir [40]. Antisens Cpn60 β transgenik tütün bitkisi ise gelişimde yavaşlama, çiçeklenmenin gecikmesi, yapraklarda sararma gibi şiddetli fenotipik değişiklikler göstermiştir. LEN1'in (Cpn60'ı kodlayan gen) delesyonu *Arabidopsis*'te hücre ölümünü tetiklemektedir [41]. Mangrov bitkisi *Bruguiera sexangula*'dan CCTα, Grup II şaperonin, *E. coli* transformantlarında tuz ve osmotik strese karşı etkilidir [42].

1.2.3 Hsp90 Ailesi

Hsp90'lar, bilinen substrat proteinlerinin çoğu steroid hormon reseptörleri ve sinyal kinazlar gibi transdüksiyon sinyal proteinleri olmaları yönüyle diğer pek çok şaperon proteinden ayrılırlar [43]. Hsp90'ların temel rolleri protein katlanmasını yönetmektir [12, 44]. Fakat sinyal - transdüksiyon bağlantılarında, hücre döngüsünün kontrolünde, protein degradasyonu ve trafiğinde kritik görev almaktadırlar [45,46]. Ayrıca *Arabidopsis* ve *Drosophila*'da stres adaptasyonu ve morfolojik gelişimde rolleri vardır [47, 48]. Önceki çalışmalar Hsp90'ın 26S proteozomla etkileşime girdiğini ve proteozomun bakım ve montajında birincil rol oynadığını göstermiştir [49]. Hsp90 ATP'ye ihtiyaç duyan moleküler şaperonların ana türlerinden biridir. Total hücre proteinlerinin yaklaşık %1 - 2'sini oluşturmasıyla hücrede en fazla bulunan proteinler arasındadır [12].

Çeşitli bitki türlerinden sitosol, ER ve plastidde lokalize Hsp90 genleri izole edilmiştir. *Arabidopsis* genomunda Hsp90 ailesinin yedi üyesi bulunmaktadır. AtHsp90 - 1, AtHsp90 - 2, AtHsp90 - 3 ve AtHsp90 - 4 sitoplazmik alt aileler iken AtHsp90 - 5, AtHsp90 - 6 ve AtHsp90 - 7'nin ise sırasıyla plastid, mitokondri ve ER'de lokalize olduğu düşünülmektedir [50].

Hsp90 proteinleri pek çok organizmada konstitütif olarak ifade edilmesine rağmen çoğunlukla stres cevabında ekspresyon seviyeleri artmaktadır. *Drosophila*'da genetik mutasyonlarla veya Hsp90 inhibitörü jeldenamisin uygulamalarıyla işlevsel Hsp90 seviyesinin azalması gelişimsel anormallikler ve morfolojik değişikliklere sebep olmaktadır [50, 51].

Hsp90 bağımsız şaperon aktivitesi gösterebilir ancak beraber foldozomları oluşturdukları diğer proteinlerle ya da sitoplazmik şaperon heterokompleksleriyle beraber de aktivite gösterebilirler [44]. Hsp90, hormonsuz reseptörlerle kompleks oluşturmuş en az altı proteinle etkileşir. Bu kompleksin oluşması bir sonraki aşamada hormon bağlanmasını gerektirir. Ligand bağlanması ve CCH'nin (sitoplazmik şaperon hetero kompleks) ayrılmasından sonra hormon bağlı aktif reseptör transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterir. Ligand yokluğunda reseptörler yeni bir döngü başlatmak için Hsp70 ile etkileşirler [44]. CCH'deki yardımcı proteinler; stres70, Hip (Hsp70 etkileşimli protein; p48), Hop (Hsp70 / Hsp90 organizasyon proteini; p60 ya da Sti1p), *DnaJ* homoloğu, katlanma katalizleyici prolil - izomeraz (PPI) ve p23'tür (mayada Sba1p). CCH memeli sistemlerde karakterize edilmesine rağmen bitki hücreleri, *in vitro* memeli glukokortikoid reseptör aktivasyonu yeteneği olan CCH içermektedir. Hsp70, Hsp90 ve FKBP - tip prolil - izomeraz, buğday CCH bileşenleri olarak karakterize edilmiştir [52]. Mısır CCH'nin *DnaJ* homoloğu ve siklofilin - tip prolil - izomeraz içerir. Ancak memeli steroid hormon reseptörlerinin maya ve bitki homoloğu henüz rapor edilmemiştir ve bu hücrelerde CCH fonksiyonu için doğal hedefler henüz bilinmemektedir [8].

1.2.4 Hsp100 / Clp Ailesi

Hsp100 / Clp ailesi çok çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip geniş bir ATPaz süperfamilyasının üyeleridir [53, 54, 56]. Protein yığılması ya da yanlış katlanmasını önleyici şaperon aktivitelerinden ziyade Hsp100 / Clp'ler, protein çözünmesi ve / veya degradasyonunda görevlidir [9].

Hsp100 ailesi ilk olarak üyeleri düzenleyici ATPaz / şaperon (ClpA ve ClpX gibi) ve proteolitik ClpP'den oluşan iki alt üniteli olarak tanımlanmıştır [57]. Bu familya iki ana sınıfa ve bu sınıflar kendi içerisinde sekiz ayrı alt familyaya ayrılmaktadır. Birinci sınıf üyeleri (A - D) iki nükleotid bağlanma domaini (ATP bağlanma domaini) içerirler. İkinci sınıfta ise (M, N, X, Y) [56] sadece bir adet nükleotid bağlanma domaini vardır. Hsp100 / Clp proteinleri tipik olarak hegzamerik halkalardan meydana gelmiştir.

Proteinlerin yığılmadan kurtulması mekanizması bir diğer ATP bağımlı şaperon sistemi olan Hsp70'i gerektirir. Hsp100 / Clp ailesi yığılmış proteinlerin çözünmesini sağlar ve bu proteinlerin Hsp70 sistemi tarafından uygun konformasyonda katlanması için hazırlar [58, 59]. ClpP ile ilişkili olduğunda Hsp100 proteinleri düzenleyici şaperon aktivite gösterirler. Böylelikle ya tam olarak degradasyon sağlayarak [60] ya da katlanmamış olarak salınımını gerçekleştirerek seçilmiş substrat proteinin nihai kaderini etkileyebilirler [61].

Hsp100 / Clp proteinleri *Arabidopsis*, soya fasüyesi, tütün, pirinç, mısır (*Zea mays*), lima fasüyesi (*Phaseolus lunatus*) ve buğday gibi pek çok bitki türünde tanımlanmıştır [42]. Diğer birçok Hsp / şaperonlar gibi, Hsp100 / Clp ailesi bitkilerde konstitütif olarak ifade edilir fakat ekspresyon seviyeleri gelişimsel olarak düzenlenir ve ısı, soğuk, kuraklık, yüksek tuzluluk ve karanlığa bağlı etiolasyon gibi farklı çevresel tehditler tarafından uyarılır [47, 53, 64, 65].

1.2.5 Küçük Hsp Ailesi

sHsp'ler düşük molekül ağırlıklı ısı şoku proteinleridir (12-40 kDa). Bitkilerde diğer Hsp / şaperonlara kıyasla dizi benzerlikleri, hücre içi lokalizasyonları ve işlevleri bakımından daha fazla çeşitlilik göstermektedirler [22, 66]. Hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda ısı ve diğer stres koşullarına karşı hücrel cevabın oluşmasında görevlidirler [23, 66]. α - kristalin (ACD) adı verilen ve omurgalılarda göz merceğinde bulunan α - kristalindeki bir domain ile ilişkili olan C - terminaldeki 90 aminoasit uzunluğundaki yüksek oranda korunmuş bir bölge karakteristik özellikleridir [22, 66]. ACD'ler buğday Hsp16.9'un kristal yapısında ortaya çıkarılmış ve dodekamer çift halkalar olarak şekillenmiş dimerlerin üçlü yapıları şeklinde organize olmuşlardır [67].

sHsp'ler tek başına substrat proteinin katlanmasını gerçekleştirebilme yeteneğine sahip değildirler [68-71]. Bunun yerine muhtemel hidrofobik etkileşimler yoluyla ham proteine bağlanırlar [72]. DnaK sistemi ya da ClpB / DnaK gibi sistemlerde, ATP - bağımlı protein katlanmasının gerçekleşmesi için ham proteini stabilize eder ve protein yığılmasını engellerler [73].

Isı şoku proteinlerinin korunmuş beş ana ailesi arasında (Hsp70, Hsp60, Hsp90, Hsp100 ve sHsp), sHsp'ler bitkiler aleminde en yaygın bulunanlarıdır [22]. Bitkiler her biri farklı hücrel kompartmanda (sitosol, kloroplast, ER ve mitokondri) bulunan proteinleri kodlayan altı adet nükleer çoklu gen ailesi tarafından kodlanmış sHsp'leri sentezlemektedirler [66]. *Arabidopsis*'te hücre içi lokalizasyonlarına ve dizi benzerliklerine göre 13 farklı sHsp, 6 sınıfta toplanmıştır. Ayrıca ACD içeren proteinlerle homolojiye sahip bir ya da daha fazla bölge içeren multidomain proteinlerini kodlayan 6 açık okuma çerçevesi tanımlanmıştır [74]. Bitki sHsp'lerindeki yüksek çeşitlilik muhtemelen bitkilere özgü stres koşullarına karşı moleküler adaptasyonu yansıtmaktadır. Elde edilen son veriler, sHsp'ler ve strese karşı tolerans arasında güçlü bağıntıyı işaret etmektedir. Mısır sHsp'lerinin (msHsp)

kompleks II ile ilişkili enzimleri korumada başarısız olmalarına rağmen NADH: ubikinon oksidoredüktaz aktivitesini (kompleks I) koruyarak tuz stresi süresince mitokondriyel elektron taşınmasını iyileştirdikleri gösterilmiştir [75].

1.3 Hsp / Şaperon Ağı

Stres koşulları süresince pek çok enzim ve protein yapısal ya da fonksiyonel olarak bazı zararlar görmektedir. Bu nedenle proteinleri işlevsel konformasyonlarında tutmak, olgun olmayan proteinlerin kümelenmesini engellemek, denatüre olmuş proteinlerin tekrar üç boyutlu konformasyonel yapılarına kavuşmalarını sağlamak, işlevsel olmayan zararlı polipeptid kalıntılarını ortadan kaldırmak bu koşullar altında hücrenin hayatta kalabilmesi için oldukça önemlidir [9]. Hsp / şaperonların farklı sınıfları hücrel korumada birbirlerinin tamamlayıcısı olarak birlikte çalışmaktadır. Bazı Hsp'ler ise proteinlerin stres koşullarından korunmasında örtüşen görevlere sahiptirler.

Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 proteinleri spesifik substratlarının katlanmasında yardım eden ya da aktivitelerini düzenleyen yardımcı pek çok şaperonla etkileşime girmektedirler [5, 12, 14, 44]. Hsp / şaperonların muhtemel fonksiyonları diğer pek çok organizmada geniş kapsamlı çalışılmış olmasına rağmen bitkilerde bu proteinler hakkında çok az şey bilinmektedir [9]. Stres toleransı kazanmada direkt fonksiyonlarına ek olarak Hsp'ler diğer hücrel mekanizmalarla etkileşime girebilir ve hücrel yıkımı azaltmak amacıyla farklı komponentlerle sinerjik olarak fonksiyon gösterebilirler.

sHsp'ler ham proteine bağlanır ve bu proteinlerin yığılmasını engeller. Böylece bir sonraki aşamada Hsp70 / Hsp100 şaperon ailesi tarafından uygun konformasyonda katlanmasını sağlamak için substrat proteinin depolanmasını sağlarlar (Şekil 1.2). Bu mekanizma *E.coli*'den izole edilen IbpA ve IbpB'de ve *Synechocystis sp.* PCC6803'den izole edilen Hsp16.6'da görülmüştür [73]. Farklı şaperon aileleri arasındaki işbirliği ısıya duyarlı *E.coli* mutantlarında plazmit kontrollü şaperon ekspresyonu kullanılarak doğrulanmıştır [76]. Bir diğer mekanizmada protein kümeleri Hsp100 / Clp ailesi şaperonlar tarafından çözünür ve daha sonra Hsp70 sistemi yardımıyla uygun konformasyonda katlanır. Çözünmüş proteinlerin olgun formlarına kavuşmalarındaki en son basamak ise Hsp60 ailesi (GroEL - GroES) üyeleri tarafından tamamlanabilir [77]. Benzer araştırmalar bitki şaperonları için de rapor edilmiştir. Örneğin (*Pisum sativum*) çam bitkisinden izole edilmiş Hsp18.1, ısı şoku ile denatüre olmuş proteinlere bağlanarak bir sonraki aşamada Hsp70 / Hsp100 kompleksi tarafından uygun konformasyona kavuşmasını sağlamak amacıyla katlanmaya yetenekli hale getirmektedir [68, 73].

1.4 Hsp / Şaperonlar ve Diğer Stres Cevabı Mekanizmaları

Abiyotik stres koşulları fizyoloji, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların dahil olduğu çoklu cevap mekanizmalarını uyarır. Bitkilerde kazanılmış stres cevabı, sıklıkla hücrel yıkımın engellenmesi ve iç dengenin tekrar kurulması için sinerjik ve koordine şekilde çalışan mekanizmaların sonucu olarak ortaya çıkmaktadır [7, 78]. Hsp / şaperonlar hem stres koşullarında hem de normal hücrel gelişim koşullarında oldukça önemli işlevlere sahiptirler. Her geçen gün artan çalışmalar Hsp / şaperonların diğer stres cevabı mekanizmalarıyla etkileşime girdiğini göstermektedir. Osmolitler ve uyumlu çözeltiler, osmotik stres cevabında organizmada biriken düşük molekül ağırlıklı gruplardır. Mayada yapılan bir çalışmada [79] osmolitlerin, denatüre olmuş proteinlerin kümelenmesini engellediği ve bu proteinleri moleküler şaperonlar tarafından tekrar aktive edileceği forma getirdiği tespit edilmiştir. *E. coli*'de çalışılmış osmolitlerin (glisin, betain, gliserol, prolin ve trehaloz) olgun proteinlerin karalılığını arttırarak ve polipeptid katlanmasına yardım ederek kimyasal şaperon görevi yapmaktadır [80]. İlkel kabuklu *Arthemia franciscana*'da trehaloz ve sHsp olan p26 termal stres süresince ve sonrasında sinerjik olarak görev yapmaktadır [81].

Osmolitlere ek olarak Hsp70 ve Hsp90 şaperon ailesi üyelerinin ve yardımcı şaperon proteinlerinin nükleer hormon reseptörleri, tirozin- ve serin / treonin kinazlar, hücre döngüsü ve hücre ölümü düzenleyicileri gibi bazı sinyal molekülleri ile etkileşime girdiği bulunmuştur [82]. Tiyol içeren moleküllerin redoks özellikleri, enzimlerin, reseptörlerin, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi ve yapılarının düzenlenmesinde, protein sentezi ve katlanması gibi hücrel fonksiyonları oldukça önemlidir. Memelilerde sHsp'lerin, stres koşullarına karşı korunmanın yanı sıra hücrel redoks tepkimelerinin düzenlenmesine katkıda bulunarak apoptosiz gibi diğer hücrel fonksiyonların modülasyonunda da görev yaptığı bilinmektedir [83].

Yapılan çalışmaların çoğu bitkiler dışındaki diğer organizmalarda uygulanmış olmasına rağmen aynı mekanizma bitkilerde de çalışılabilir. Örneğin *Arabidopsis*'te

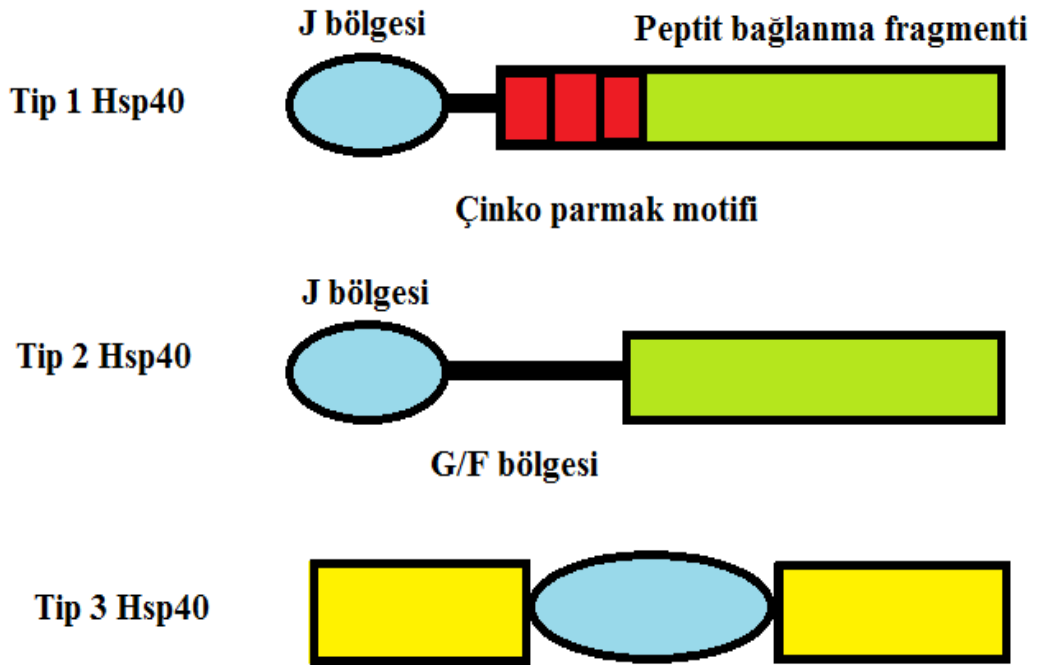
[84] askorbat peroksidaz antioksidantlarının ısı şoku transkripsiyon faktörleri bağımlı ifadesi, HSF'lerin sadece Hsp sentezinde değil ayrıca oksidatif strese antioksidant genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde de gerekli olduğu gösterilmiştir. Dahası *Arabidopsis*'de bazı Hsp genlerinin yüksek ışık altında uyarılması bu proteinlerin şaperon aktivitelerinin yanı sıra oksidatif cevaba dahil olduklarının göstergesidir [9, 85].

1.5 Küçük Isı Şoku Proteinleri Hsp40'ların Yapısı ve İşlevi

Hsp40'lar, polipeptid konformasyonlarının düzenlenmesinde görevli küçük ısı şoku proteinlerinin yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığa sahip alt ünitesidir. Normal gelişim sıcaklıklarında (37 °C) DnaJ proteini hücrenin tüm kompartmanlarında düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Fakat ısı şoku durumunda molekülün sentezi artmakta ve bazı DnaJ proteinleri çekirdeğe yerleşmektedir. Isı şoku uyarımlı relokalizasyon özelliği Hsp70 ve Hsp26 proteinlerinde de gözlenmektedir. Bu nedenle DnaJ benzeri proteinler Hsp70 proteinlerin çekirdekte salınımını gerçekleştirmektedirler. Bir diğer muhtemel görevi ise çekirdek bileşenlerine bağlanarak onları yığılma ve denatürasyona karşı korumaktır. [86]

DnaJ proteinleri çok çeşitli üyeleriyle geniş bir aileye sahiptir. Bu çeşitlilik sürekli değişen çevre koşullarına karşı (ısı, sıcaklık, nem gibi) kolay adaptasyonun gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Örneğin mayada 22, insanda 41 ve *Arabidopsis*'te en az 89 adet DnaJ proteini tanımlanmıştır [87]. *Arabidopsis* DnaJ proteinlerinin 26'sının kloroplast hedefli sinyale sahip olduğu tahmin edilmektedir. Fakat bunlardan çok azı karakterize edilmiştir. Yapılan çok az sayıdaki çalışmada kloroplast hedefli DnaJ proteinlerinin polipeptid katlanmasında ve degrades edilmesinde görev aldığı belirtilmiştir. Ayrıca kloroplast hedefli DnaJ proteinlerinin pek çok fonksiyonu ve fizyolojik rolü henüz tam olarak açıklanamamış değildir [88].

Hsp40 protein ailesi üyeleri tip I, tip II ve tip III olarak üç ana grupta sınıflandırılmıştır. Hsp40 proteinlerinin bütün tipleri yaklaşık 70 aminoasit uzunluğunda J - domaini içerirler. J - domaini tip I ve tip II Hsp40 proteinlerinde N - terminalde bulunurken tip III Hsp40 ailesi üyelerinde protein dizisi içerisinde herhangi bir bölgede bulunabilmektedir. J - domain, Hsp70'e ait ATPaz domaini ile etkileşime girerek ATPaz aktivitesini uyarır [15].



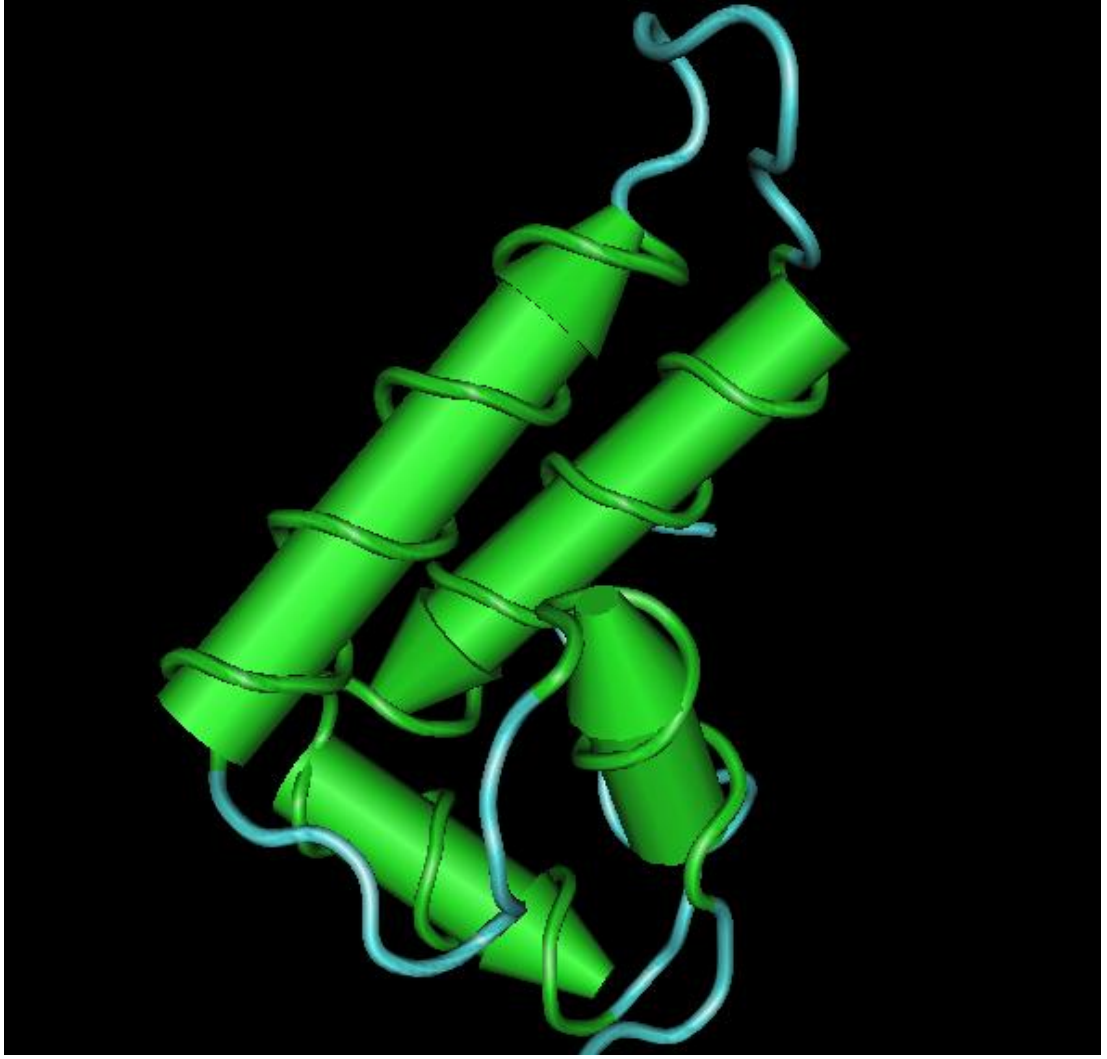
Şekil 1.3 Hsp40 protein çeşitleri ve korunmuş bölgeleri. Şekil 15 nolu referanstan esinlenerek çizilmiştir [15]

Tip I ve tip II Hsp40 proteinleri, C - terminalde lokalize peptid bağlanma domaini içerirler. J - domaini, peptid bağlanma fragmentine tip I ve II'de mevcut Glisin ve Fenilalanince zengin bölge sayesinde bağıntılıdır. Tip I Hsp40 proteinlerini Tip II'den ayıran özellik Tip I'de mevcut olan ve sayısı organizmaya göre değişiklik gösterebilen çinko parmak motifleridir [89-91]. TipIII Hsp40

proteinleri ise proteinin herhangi bir bölgesine yerleşmiş J - domaininden ibarettir [92, 93].

1.5.1 Hsp40 Protein J – Domain Yapısı

İlk çözülen J - domain yapısı *E. coli* Hsp40 DnaJ ve insan Hsp40 Hdj12 ait NMR solüsyon yapılarıdır [94-96]. Bu yapıları *E. coli* Hsc20, maya Pam16 gibi diğer Hsp40 proteinlerinden elde edilen J - domain kristal yapıları takip etmiştir [97-100]. Bu yapılara göre Hsp40 J - domaini, dört adet sarmaldan (I - IV) ve II ile III. sarmallar arasına yerleşmiş olan HIS - PRO - ASP motifinden meydana gelmektedir. Sentetik polipeptidler kullanılarak yapılan bağlanma inhibisyon deneyleri J - domainin N - terminal kısmının (I, II. Sarmal ve HIS – PRO - ASP motif) Hsp70 ATPaz domaini ile etkileşime girdiğini göstermiştir [101].



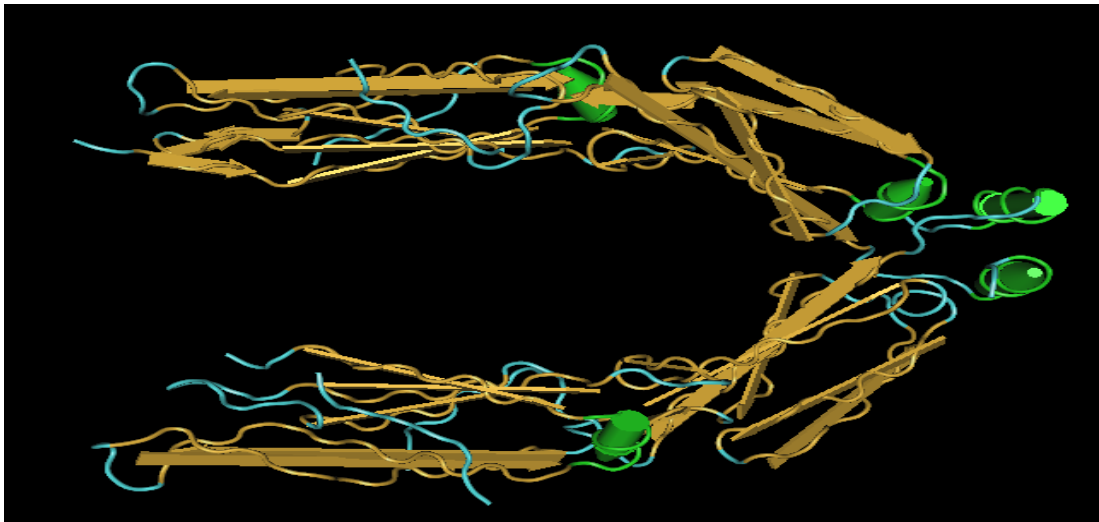
Şekil 1.4 Hsp40 proteinine ait J - domain yapısı [117]

1.5.2 Tip I ve Tip II Hsp40 Üyeleri Peptid Bağlanma Fragmentleri

Tip I ve tip II Hsp40 proteinleri C - terminalde korunmuş peptid bağlanma domaini içermektedir. Bu bölge ile öncül polipeptidler için ATP bağımsız moleküler şaperon aktivitesi gösterebilirler [6, 102]. Tip I ve tip II Hsp40 C - terminal fragmentleri arasındaki temel farklılık Tip I Hsp40 proteinlerinde bulunan çinko parmak motifleridir [103, 104]. Mevcut çinko parmak motifleri sayesinde Maya Hdj1 gibi tip I Hsp40 proteinleri tek başına protein yığılmasını baskılayabilirken tip II Hsp40 proteinleri bu amaç için Hsp70 proteinlerine ihtiyaç duymaktadır [105].

Önceki çalışmalarda *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilmiş tip II Hsp40 proteini Sis1'e ait peptid bağlanma fragmentinin kristal yapısı belirlenmiştir [103]. Bu yapıya göre Sis1 iki adet monomerden meydana gelmiş bir homo - dimer yapısı gösterir. Sis1 monomerleri ikişer adet eş katlanmalara sahip domainden oluşmaktadır. Her domain iki adet β tabaka içerir. Sis1 monomerleri kısa bir C - terminal bölge sayesinde dimerize olurlar. Bu dimerizasyon motifinde meydana gelen delesyonlar şaperon aktivitesinde çeşitli eksikliklere neden olabilmektedir. Sis1 monomerleri, aralarında geniş bir yarık oluşturarak U şeklinde dimerize yapı göstermektedirler. Substrat polipeptide bağlanmada her iki monomerde bulunan domain 1'deki hidrofobik çukurların etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.5) [103].

Saccharomyces cerevisiae'den izole edilen tip I Hsp40 Ydj1'in kristal yapısına bakıldığında peptid bağlanma fragmentinin her bir monomeri üç adet domainden meydana geldiği görülmektedir. Domain I, Domain III ile benzer katlanmalar gösterirken Domain II, iki adet çinko parmak motifi içermektedir. Substrat peptid ile etkileşimin Domain I'de bulunan ekstra β tabaka sayesinde gerçekleştiği sanılmaktadır [106].



Şekil 1.5 Maya tip II Hsp40 Sis1 proteinine ait peptid bağlanma fragmentinin kristal yapısı [117]

1.6 Hsp40 Protein ve Substrat Polipeptid Etkileşimi

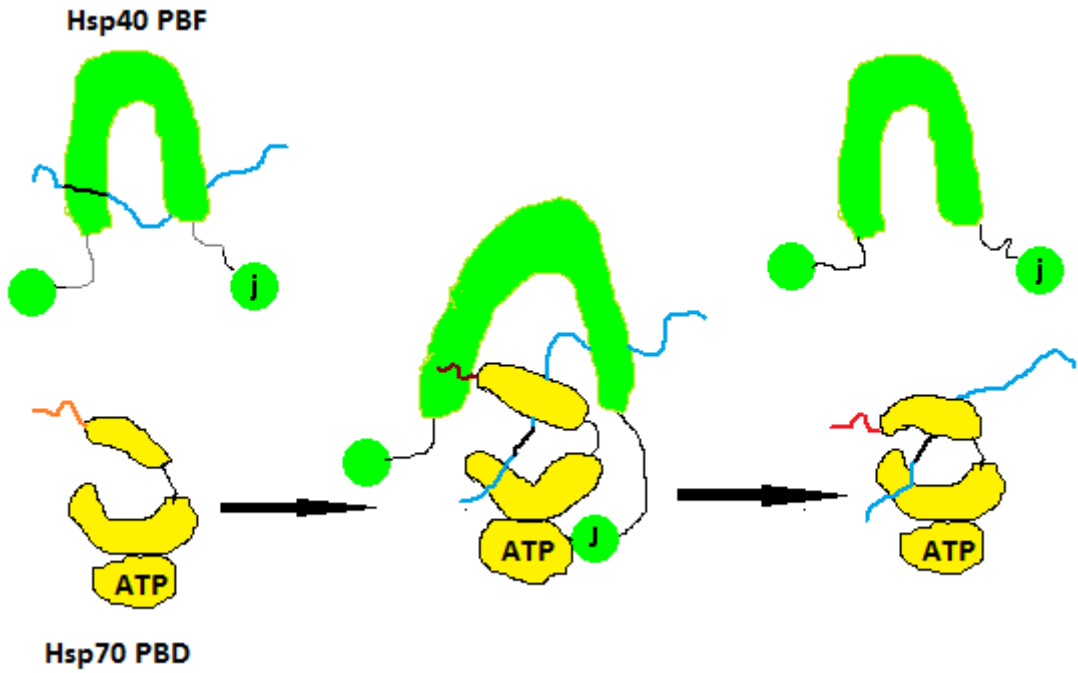
S. cerevisiae'den izole edilmiş tip I Hsp40 Ydj1'in kristal yapısında bağlı substrat peptid GWLYEIS motifi, Ydj1'in peptid bağlanma fragmentinde bulunan β tabakasına anti - paralel konumlanmış bir başka β tabakasını oluşturur. 7 - mer substrat peptid içerisinde altı aminoasit (GWLYEI) Ydj1'e hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Bu altı aminoasit içerisinde lösin aminoasiti temel etkileşimi sağlamaktadır. Bu aminoasitlerdeki hidrofobiklik tip I Hsp40 proteinlerinde oldukça iyi korunmuştur. Bu hidrofobik aminoasitlerde meydana gelen mutasyonlar şaperon aktivitesinde ve substrat polipeptide bağlanma etkinliğinde azalmaya sebep olabilmektedir [107].

1.7 Hsp40 – Hsp70 Şaperon Sistemi

Hsp70 proteinleri bazı Arkea'lar hariç yaşayan tüm organizmalarda mevcuttur [108]. Hsp70 şaperonları, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması, stres sonucunda degrades olmuş proteinlerin tekrar katlanması ve kalitesinin kontrolü, polipeptidlerin zardan taşınması ve protein komplekslerinin oluşturulması ya da ayrıştırılması gibi çeşitli hücrel görevlere sahiptir [109]. Bu süreçte ki ilk adım Hsp70 proteine ait C terminalde bulunan bağlanma yarığında meydana gelen tanıma ve bağlanma reaksiyonlarıdır. Bu amaçla Hsp40 J - domain Hsp70 ATPaz domaine bağlanır. Bu bağlanma Hsp70 proteinin içsel ATPaz aktivitesini uyarır [110]. Molekülün N - terminalindeki ATP hidrolizi, C - terminaldeki peptid bağlanma domaininde konformasyonel değişime neden olur. N - terminal domaine ATP bağlı iken peptid bağlanma domaini substrat polipeptide düşük afinite ile açık konformasyondadır. ATP'nin ADP'ye hidrolizi ile peptid bağlanma domaini substrat polipeptide yüksek ilgiye sahip olduğu kapalı konformasyona geçer [111]. Hsp70'in polipeptid bağlanması veya salınması döngüsünü gerçekleştirebilmesi için ATP - ADP değişiminin meydana gelmesi gereklidir. Hsp70 ATPaz aktivitesi ATP - ADP değişimi ile de düzenlenmektedir. Pek çok prokaryotik Hsp70 proteinde ATP /

ADP değişimi GrpE - tip nukleotid değiştirici faktör tarafından katalizlenir. Fakat bu protein ökaryot organizmalarda mevcut değildir [112].

Hsp40'a ait peptid bağlanma domaini substrat polipeptid ile etkileşime girerek protein yığılmasını baskılar. Hsp40 proteininin substrat polipeptide bağlanmasından sonra bu öncü proteinleri Hsp70'e transfer ettikleri sanılmaktadır [6, 102-104, 113]. Hsp40 proteinleri dimer olarak fonksiyon gösterir ve substrat polipeptide hidrofobik etkileşimler sayesinde bağlanır. Hsp40 proteinin bağlanması substrat polipeptidin Hsp70 proteini tarafından tanınması ve bağlanması için gerekli konformasyonu sağlamaktadır [103, 107, 113].



şekil 1.6 Hsp40 - Hsp70 şaperon sistemi [114]

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Biyoinformatik Analiz

DnaJ geninin ve proteininin özellikleri hakkında bilgi edinmek için çeşitli veri tabanlarındaki programlar kullanıldı.

Zeytin Bitkisine ait cDNA kütüphanesinden alınan *DnaJ* geni nükleotid dizisinin neye benzediğini bulmak için NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [115] programının BLASTn veritabanında nükleotid dizisine benzerlik gösteren farklı bitki türlerine ait kayıtlar belirlendi. cDNA dizisi kullanılarak BioEdit programındaki [116] Sorted Six-Frame Translation fonksiyonu ile DnaJ geninin açık okuma çerçevesi (ORF) ve aminoasit dizisi bulundu. Aminoasit dizi ile NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [115] programının pBLAST sekmesi yardımıyla farklı bitki türlerinden DnaJ proteinlerine ait aminoasit benzerlikleri karşılaştırıldı.

DnaJ proteininin aktif bölgesini ve özelliklerini belirlemek için NCBI veri tabanındaki CDD (Conserved Domain Database) programı [117] kullanıldı. DnaJ proteinin 3 - boyutlu yapısını ve korunmuş domain dizilerini belirlemek için ise Cn3D programından yararlanıldı [118-120].

BioEdit programı [116] yardımıyla zeytin DnaJ cDNA'sına ait nükleotid kompozisyonu ile aminoasit dizisine göre aminoasit kompozisyonu belirlendi. DnaJ geninin hem nükleotid hem de aminoasit dizisine göre zeytin çeşitleri (Tablo 2.1) arasında farklılık gösterip göstermediği araştırıldı. Bunun için DNA izolasyonu yapılan örneklerin REFGEN ticari firmasından (Ankara) gelen dizileme sonuçları BioEdit programında [116] işlenerek karşılaştırıldı ve nükleotid farklılıkları analiz edildi. Zeytin çeşitleri arasındaki akrabalık derecelerini tespit etmek amacıyla BioEdit programı [116] ile hizalanan nükleotid dizisi kullanılarak PAUP programı [121] yardımı ile filogenik ağaç oluşturuldu.

Zeytin DnaJ proteinin translyasyon sonrası özelliklerini anlamak için ExPASy web sayfasındaki (<http://www.expasy.org>) programlar kullanıldı. Predator programı [122] ile DnaJ geninin hücre içi lokalizasyonu tahmin edildi. DnaJ protein transit peptidin olup olmadığını belirlemek için TARGET-P programı [123] kullanıldı. Ayrıca proteinin hücre içi davranışlarının belirlenmesi için aynı sayfada bulunan SOSUI programından yararlanıldı [124].

2.2 Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

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

2.3 Polimorfizm Çalışmaları İçin Bitki Materyali Toplama

Polimorfizm için toplanan zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerine ait yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edildi (Tablo 2.1). Toplanan örnekler sıvı azot içerisinde laboratuara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için - 80 °C dolabına aktarıldı.

2.4 DNA İzolasyonu

DnaJ geni için zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında nükleotid farklılıklarının olup olmadığını anlamak için Tablo 2.1'deki zeytin çeşitlerinden genomik DNA izolasyonunda Sigma firmasına (Taufkirchen, Almanya) ait Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kiti (Katalog No: G2N70-1KT) kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. Elde edilen gDNA'ları kalıp olarak kullanarak gen özgül primerler (*DnaJampF* ve *DnaJrev1*) ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonucunda tek bant elde ettiğimiz örnekler REFGEN (Ankara, Türkiye) isimli ticari firma aracılığıyla dizilendi.

Tablo 2. 1 Toplanan zeytin çeşitleri

1) Ayvalık	2) Gordal
3) Memeli	4) Memecik
5) Domat	6) 0108
7) UB1	8) Hojiblanca
9) Picual	10) İzmir sofralık
11) Kroneiki	12) Hermandos
13) Uslu	14) Kiraz

Tablo 2. 1 (Devam) Toplanan zeytin çeşitleri

15)	Çakır	16)	Verdial
17)	Samanlı	18)	0308
19)	UB10	20)	Negral
21)	UB3	22)	Erkence
23)	Ascolano	24)	Leccino
25)	Gordales	26)	Edincik Su
27)	Karamürsel Su	28)	Cormona

2.5 Primer Dizaynı ve Sulandırması

PCR deneylerimizde kullandığımız genlere özel primerler, Primer3 programı [125] ile dizayn edildi (Tablo 2.2). Bu primerler yerli aracı şirketler yoluyla Integrated DNA Technologies (Leuvene, Belçika) firmasından temin edildi. Liyofilize haldeki primerler laboratuara geldikten sonra yaklaşık 15 saniye 12000 rpm’de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı. 1 mL nükleazlardan arındırılmış su ilavesini takiben 2 dakika alt - üst edildikten sonra 15 saniye vorteks yapıldı. Bu primerleri kullanıma hazır hale getirmek için 200 µL’lik çalışma solüsyonları hazırlandı. Bütün primerlere ait çalışma solüsyonlarının son konsantrasyonu 5 µM olarak ayarlandı. Primerlerin çalışma solüsyonları uygun konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı (Tablo 2.3).

Tablo 2.2 PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri. Altı çizili nükleotitler klonlama amaçlı primer dizilerine eklenen restriksiyon enzimi tanıma nükleotitlerini göstermektedir.

Primerler	Nükleotid dizileri (5'-3')	Tm
DnaJEcoR	CTTCAGTGAATTC <u>CAATGG</u> CAA	56.6 °C
DnaJXba	CATCGATGTCTAGAGCGTAATAGAAAA	54.8 °C
DnaJampF	AATCATACCTTGTGGAAGTACATGG	54.8 °C
DnaJampR	CTACAGTTGTAAGCAACACAGCATC	56.2 °C
DnaJrtF	ATGCTGAAGAGAAGTTTAAGG	54.7 °C
DnajrtR	TCAAATAATGACTCAAATAGATCAAAGG	52 °C
DnaJintF	AACTACCATCCTGATGTGAAC	54.4 °C
DnaJintR	ACTGGTCTCCCCTCATATTTCT	55.6 °C
DnaJrev1	CCAAGCACAGTATAGTAATCT	56 °C
DnaJrev2	TGAGTTATTGTATGATCCCAAT	52.3 °C
DnaJint2F	CTATACTGTGCTTGGTGTGTC	55.2 °C
Dnajint2R	TCAAATAATGACTCAAATAGAT	52.0 °C

Tablo 2.3 Primer çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Primerler	Molaritesi	Çalışma solüsyonu (200 µL)
DnaJEcoR	5 µM	26.3 µL (38.1nm) primer + 173.7 µL distile su
DnaJXba	5 µM	39.5 µL (25.3nm) primer + 160.5 µL distile su
DnaJampF	5 µM	35.6 µL (28.1 nm) primer + 164.4 µL distile su
DnaJampR	5 µM	33.3 µL (30 nm) primer + 166.7 µL distile su
DnaJrtF	5 µM	40.2 µL (24.9 nm) primer + 159.8 µL distile su
DnajrtR	5 µM	35.7 µL (28 nm) primer + 164.3 µL distile su
DnaJintF	5 µM	10 µL (100 µM) primer + 190 µL distile su
DnaJintR	5 µM	10 µL (100 µM) primer + 190 µL distile su
DnaJrev1	5 µM	10 µL (100 µM) primer + 190 µL distile su
DnaJrev2	5 µM	10 µL (100 mM) primer + 190 µL distile su
DnaJint2F	5 µM	32 µL (31.3 nm) primer + 168 µL distile su
Dnajint2R	5 µM	33.4 µL (29.9 nm) primer + 166.6 µL distile su

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonları 50 µL'lik toplam hacim içerisinde gerekli komponentler belirli miktarlarda eklenerek (Tablo 2.4) uygun PCR programında gerçekleştirildi (Tablo 2.5). Özellikle gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı polimorfizm analizi ve intron tespiti için yapılan PCR reaksiyonlarında standart komponentlerin haricinde DMSO (dimetilsülfoksit) eklenmesinin verimi arttırdığı görüldü. PCR programında eşleşme basamağı sıcaklığı primerlerin ortak çalıştığı sıcaklık belirlenerek yapıldı.

Tablo 2.4 PCR komponentleri, kullanılan miktarlar ve konsantrasyonları

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

Tablo 2.5 PCR döngü koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön ısıtma	95 °C	1 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35
Eşleşme	53 °C	45 saniye	
Sentez	72 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	5 dakika	1
Saklama	4 °C	10 dakika	-

2.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen Atto marka (Tokyo, Japonya) elektroforez sistemi kullanıldı. Elektroforezde gerekli agaroz (Katalog No: A9539-100G), Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasından temin edilirken, TBE tampon çözelti için gerekli olan Tris - base (Katalog No: 0826-500G) Amresco (Solon, OH) firmasından, borik asit (Katalog No: A0768,1000) ve EDTA (Katalog No: A5097,0250) Applichem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. TBE tampon çözeltisi hazırlamak için kullanılan bu bileşenlerin miktarları Tablo 2.6'da gösterilmiştir. Zeytinden izole edilen gDNA ve RNA'lar ile PCR örneklerinin yüklenmesi için %0.8'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla 0.4 g agaroz tartıldı ve 50 mL TBE (0.5 X) tampon çözeltisi içerisine eklendi ve mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışımın yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuması için beklenen sürede elektroforez tankı ve taraklar DEPC'li su ile yıkandı (özellikle RNA örnekleri için). Soğuyan karışımın içerisine 0.5 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek, önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çekilerek çıkartıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektroforez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar TBE (0.5 X) tampon çözeltisi ile dolduruldu. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belirlenmiş DNA standardı, Fermentas (Vilnius, Litvanya) GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333) yüklendi. gDNA örnekleri için 5 µL gDNA'ya 1 µL 6 X yükleme boyası ilave edilerek kuyucuklara yüklendi. Örnekler 120 V voltaj verilerek yaklaşık 35 dakika yürütüldü. DNA bantları, UV görüntüleme cihazında gözlendi ve fotoğrafları çekildi. RNA örnekleri 3 µL RNA kalıbı, 2 µL distile su ve 1 µL 6 X yükleme boyası eklenerek agaroz jele yüklendi.

Tablo 2.6 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler

Çözeltiler	Kompozisyonu (1L için)
TBE (5 X) Tampon Çözeltisi	54 g Trizma –baz (Tris – base)
	27.5 g Borik Asit
	20 mL 0,5 M EDTA (pH:8)
TBE (0.5 X) Tampon Çözeltisi	100 mL TBE (5 X)
	900 mL distile su
Yükleme boyası	Fermentas GeneRuler™ DNA Ladders (Katalog No: SM0313)
Marker	Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333)

2.8 Anlık Gösterimli (Real – time) PCR İçin Bitki Materyali Toplama

Balıkesir merkezindeki Şekil 2.1’de “var yılı” ve “yok yılı” olarak isimlendirilmiş zeytin ağaçlarından genin dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesini belirlemek için çeşitli doku örnekleri toplandı. “Var yılı” ve “yok yılı” isimlendirmesi, zeytin bitkisinin sırasıyla çok meyveli ve az meyveli durumunu ifade etmektedir. 12 ay boyunca örnek toplama günlerine ait sıcaklık ve nem değerleri kaydedildi (Tablo 2.7). Toplanan örnekler Balıkesir ili damızlık sığır yetiştiriciliği birliğinden temin edilen sıvı azot ile laboratuara getirilerek - 80’ °C’de muhafaza edildi.



Şekil 2.1 Dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan “var yılı” ve “yok yılı” ağaçları



Şekil 2.2 Zeytin bitkisine ait farklı dokulardan örnek toplanması

2.9 RNA İzolasyonu

DnaJ geninin zamansal ve dokusal ekspresyon seviyelerini belirlemek için 12 ay boyunca toplanan “var yılı” ve “yok yılı” zeytin ağaçları örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı (Tablo 2.7). Bu amaçla - 80 °C dolabında saklanan örnekler sıvı azot içerisinde tutularak mekanik parçalama için havanda toz haline getirildi. Ezilen örneklerden RNA izole etmek için Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait

Spectrum Plant Total RNA Kiti (Katalog No: STRN50-1KT) kullanıldı. İzolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. Zeytin bitkisi yaprak örneklerinde izolasyon oldukça başarılı iken meyve dokuları ile yapılan izolasyonlar başarısız olduğu görüldü. Bu nedenle meyve örnekleri için Qiagen firmasına (Qiagen, Hilden, Almanya) ait RNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 74904) kullanıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı. RNA örnekleri, gDNA'dan arındırılarak saf RNA örnekleri elde etmek için DNaz ile muamele edildi. Sigma (Taufkirchen, Almanya) marka RNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilen RNA örnekleri, Sigma firmasına (Taufkirchen, Almanya) ait On-Column DNase I Digestion Set (Katalog No: DNASE70-1SET) ile Qiagen (Hilden, Almanya) marka RNA izolasyon kiti ile izole edilen meyve RNA örnekleri ise Qiagen firmasına (Hilden, Almanya) ait On-Column DNase Digestion with the RNase-Free Dnase Enzyme kiti (Katalog No: 79254) ile saflaştırıldı ve işlem protokollerine uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların verimlerini ölçmek için yukarıda belirtilen şekilde agaroz jel elektroforezi uygulandı. Son olarak UV'de görüntülenerek fotoğraflandı.

2.10 DEPC'li Su Hazırlama

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

Tablo 2.7 Ekspresyon seviyelerini belirlemek için toplanan örnekler

Tarih	Sıcaklık Ortalama	Nem Ortalama	Örnekler
19.08.2010	27 °C	%55	Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
22.09.2010	20 °C	%61	Olgunlaşmamış meyve (1.Ağaç)
			Olgunlaşmış meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (1.Ağaç)
			Olgunlaşmamış meyve (2.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
19.10.2010	20 °C	%71	Yaprak (1.Ağaç)
			Pedisel (1.Ağaç)
			Meyve
			Yaprak (2.Ağaç)
22.11.2010	7 °C	%84	Yaprak (1.Ağaç)
			Meyve (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
20.12.2011	11 °C	%72	Yaprak (1.Ağaç)
			Meyva (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
19.01.2011	2 °C	%81	Yaprak (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Yaprak (3.Ağaç)
21.02.2011	6 °C	%63	Yaprak (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
16.03.2011	12 °C	%41	Yaprak (1.Ağaç)
			Yaprak (2.Ağaç)
			Sürgün(3.Ağaç)

2.11 Reverse Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR, Fermentas firmasına (Vilnius, Litvanya) ait RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (katalog no: K1622) kullanılarak yapıldı ve reaksiyon için kit protokolü takip edildi. PCR reaksiyonları, 20 µL'lik toplam hacim içerisinde Tablo 2.8'deki komponentler belirtilen miktarlarda eklenerek gerçekleştirildi.

Tablo 2.8 RT - PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler, konsantrasyonları ve PCR döngü koşulları

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

2.12 Anlık Gösterimli (Real – time) PCR

Zeytin bitkisine ait çeşitli dokulardan izole ettiğimiz RNA örneklerinden RT - PCR ile elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve anlık gösterimli (Real - time) PCR, Bioneer firmasına (Seoul, Korea) ait GreenStar qPCR PreMix (Katalog No: K-6210) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Anlık gösterimli PCR için gerekli malzemeler, kitin kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde ilave edilerek Tablo 2.10'daki döngü koşullarında, Bioneer markalı anlık gösterimli PCR cihazı ile gerçekleştirildi. Anlık gösterimli PCR reaksiyonları, her bir cDNA örneği için, hem

zeytin *DnaJ* geni hem de normalizör gen *GAPDH*'e (GenBank erişim no: 154260889) ait özgül primerler kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

Tablo 2.9 Anlık gösterimli (Real – time) PCR reaksiyonlarında kullanılan komponentler ve konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar	Konsantrasyon
cDNA Kalıp	1 µL	-
Primer L	1 µL	5 µM
Primer R	1 µL	5 µM
DEPC'li su	17 µL	-
GreenStar qPCR PreMix	-	-

Tablo 2.10 Anlık gösterimli (Real – time) PCR döngü koşulları

Basamak	Fonksiyon	Sıcaklık	Zaman	Tekrar
Basamak	İnkübasyon	95 °C	5 dakika	-
Basamak	İnkübasyon	94 °C	15 saniye	-
Basamak	İnkübasyon	55 °C	15 saniye	-
Basamak	Tarama	-	-	-
Basamak	İnkübasyon	72 °C	15 saniye	-
Basamak	Basamak 2'ye dön	-	-	35
Basamak	İnkübasyon	72 °C	1 dakika	-
Basamak	Ayrılma	70 °C - 94 °C	Her 1 saniyede 1 °C	-

2.13 Standart Eğrinin Oluşturulması

Standart PCR yöntemi ile çoğaltılmış *DnaJ* cDNA'sının konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümler sonucunda 150 ng / µL olarak belirlendi. Standart eğri elde etmek için Tablo 2.11'de gösterilen *DnaJ* PCR ürününe ait seyreltme serileri kullanılarak anlık gösterimli PCR reaksiyonları 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Standart eğriden elde edilen;

$$Y = -0,2824X + 11,4722 \quad (2.1)$$

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

Tablo 2.11 *DnaJ* genine ait dilüsyon serileri

Dilution	ng / µL	g / µL	Baz Çifti	Kopya sayısı / µL
1.00E+00	150	1.5E-07	1367	1.E+11
1.00E+01	15	1.5E-08	1367	1.E+10
1.00E+02	1.5	1.5E-09	1367	1.E+09
1.00E+03	0.15	1.5E-10	1367	1.E+08
1.00E+04	0.015	1.5E-11	1367	1.E+07
1.00E+05	0.0015	1.5E-12	1367	1.E+06
1.00E+06	0.00015	1.5E-13	1367	1.E+05
1.00E+07	0.000015	1.5E-14	1367	1.E+04
1.00E+08	1.5E-06	1.5E-15	1367	1000
1.00E+09	1.5E-07	1.5E-16	1367	100
1.00E+10	1.5E-08	1.5E-17	1367	10

2.14 Zeytin DnaJ Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

2.14.1 Sıvı Lauria Bertani (LB) ve Lauria Bertani Agar Hazırlanması

500 mL Lauria Bertani (LB) veya LB agar hazırlamak için gerekli bileşenler Tablo 2.12’de belirtilen miktarlarda ilave edilerek 500 mL saf su ile çözüldü ve 121 °C ‘de 20 dakika otoklavlandı. 55°C’ye kadar soğutulan besi yerine Invitrogen firmasından (Carlsbad, CA) temin edilen zeozin (Katalog No: R25001) son konsantrasyon 25 µg / mL olacak şekilde eklenerek sıvı veya 25 mL’lik hacimlerde katı besi yerleri hazırlandı.

Tablo 2.12 Lauria Bertani sıvı ve agar besi yeri bileşenleri

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

2.14.2 Kompetan Hücre Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* DH10B ve DH5α suşlarına ait kompetan hücreler kalsiyum - klorür metodu takip edilerek hazırlandı [126]. Bir gece önceden öze ile 5 mL LB besiyerine tek koloni seçilerek ekim yapıldı. Sıvı kültür gece boyunca 210 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Hazırlanan kültür spektrofotometre’de 600 nm dalga boyunda ölçülerek yoğunluğu belirlendi ve optik yoğunluk 600 nm’de (OD₆₀₀) 0.2 olacak şekilde tekrar 40 mL taze LB besiyerine

ekim yapıldı. Optik yoğunluk 600 nm’de 0.4 – 0.6 arasına ulaşınca hücreler 4 °C’de 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 20 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ ilave edilerek çözüldü ve 30 dakika buzda bekletildi. Sonrasında 4°C’de 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti (pellet) 5 mL 0.1 M CaCl₂ ile çözümlenerek 1 - 4 saat arasında buzda bekletildi. 5 mL %40’lık soğuk gliserol ilave edildikten sonra buz üzerinde soğutulmuş ependorflara 50 µL olacak şekilde dağıtıldı ve - 80 °C’de muhafaza edildi.

2.14.3 Genin PCR İle Çoğaltılması

Zeytin *DnaJ* geni restriksiyon endonükleazlar açısından incelendiğinde *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içermediği gözlemlendi. Bu nedenle genin, pPICZαC vektörünün *EcoRI* ve *XbaI* bölgesine klonlanması kararlaştırıldı. Tüm genin PCR’da amplifikasyonu için Primer3 programı [129] yardımıyla uygun primerler dizayn edildi. *ExpEcoR*: (5’-CTTCAGTGAATTCAATGGCAATCATACC-3’) ve *ExpXba*: (5’-TTTTTCTATTACGCTCTAGACATCGATG-3’) primerlerinin 5’uçlarına ilgili restriksiyon endonükleazlar için kesim bölgeleri ilave edildi (altı çizili bölgeler). Zeytin cDNA kütüphanesinde bulunan, Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin ettiğimiz pJET1.2 / blunt (Katalog No: K1231) vektörüne klonlu *DnaJ* genini tam uzunlukta çoğaltmak için PCR reaksiyonu, 25 µL hacimde, 10 X Taq polimeraz tampon çözeltisi, 5’ ve 3’ primer, 2 µL DMSO, 3 µL gDNA ve 5 U / µL Taq polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon, termal cyclus’da Tablo 2.13’deki program kullanılarak yapıldı.

Tablo 2.13 PCR döngü koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön ısıtma	94 °C	5 dakika	1 devir
Denatürasyon	94 °C	45 saniye	35 devir
Primer Bağlanma	50 °C	45 saniye	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1 devir

PCR ürünü, Sigma firmasına (Taufkirchen, Almanya) ait Gen Elute Gel Extraction Kiti (katalog No: NA1111-1KT) ile kullanma kılavuzu takip edilerek saflaştırıldı. Saflaştırılmış PCR ürünü, %0.8'lik agaroz jelde Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333) ile yan yana kuyucuklarda yürütüldü ve miktarı tespit edildi.

2.14.4 Zeytin *DnaJ* Geni ve *pPICZαC* Ekspresyon Vektörünün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi

Zeytin *DnaJ* gen ürününün, Invitrogen (Carlsbad, CA) firmasından temin edilmiş EasySelect *Pichia* Expression Kit (Katalog No: K1740-01) içinde mevcut *pPICZαC* ekspresyon vektörüne uygun çerçevede klonlanabilmesi için gen ürünü ve klonlama vektörü Fermentas firmasından (Vilnius, Litvanya) temin edilen FastDigest® *EcoRI* (Katalog No: FD027) ve FastDigest® *XbaI* (Katalog No: FD0684) restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Komponentler, Tablo 2.14'de belirtilen miktarlarda eklenerek 37 C°'de 30 dakika inkübe edildi. Hem gen ürünü hemde ekspresyon vektörü için reaksiyonlar 30 µL'lik toplam hacimlerde 5 ayrı mikrosantrifüj tüplerinde uygulandı.

FastDigest restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim reaksiyonlarının düşük verimlerde elde edilmesi sebebiyle Bioneer (Seoul, Korea) firmasına ait *EcoRI* (5 U / μ L) (Katalog No: E-1621) ve *XbaI* (5 U / μ L) (Katalog No: E-2151) enzimleri kullanılarak ayrı ayrı kesimler tekrarlandı. Bunun için restriksiyon başına, *DnaJ* PCR ürünü ve ekspresyon vektöründen 1 μ g DNA olacak şekilde kalıp eklenerek 30 μ L toplam hacimde Tablo 2.14’de belirtilen miktardaki bileşenlerle ayrı ayrı 5’er reaksiyon kuruldu. 37 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra toplam hacmin 1 / 10’unu geçmeyecek şekilde 2 μ L (5 U / μ L) restriksiyon enzimi ve 2 μ L 10 X tampon çözeltisi ilave edildi ve nükleaz içermeyen su eklenerek toplam hacim 50 μ L’ye tamamlandı. 37 °C’de bir gece inkübasyonun ardından restriksiyon ürünleri %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden geri kazanılarak saflaştırıldı.

Tablo 2.14 FastDigest çiftli kesim komponentleri ve miktarları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
10X FastDigest tampon çözelti	3 μ L	-
DnaJ PCR ürünü / <i>pPICZαC</i> ekspresyon vektörü	5 μ L	150 ng / μ L
FastDigest <i>EcoRI</i>	1.5 μ L	1 U / μ L
FastDigest <i>XbaI</i>	1.5 μ L	1 U / μ L
Nükleaz İçermeyen Su	19 μ L	-
TOPLAM	30 μ L	-

2.14.5 Zeytin *DnaJ* Geni’nin *pPICZ α C* Ekspresyon Vektörü’ne Ligasyonu

EcoRI ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş zeytin *DnaJ* geni *pPICZ α C* ekspresyon vektörünün aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş klonlama bölgesine ligasyonu toplam 20 μ L hacimde Fermentas (Vilnius, Litvanya) T4 DNA Ligaz, 5 U / μ L

(Katalog No: EL001) kullanılarak yapıldı. Ligasyon reaksiyonu 2 µL T4 DNA Ligaz tampon çözeltisi (10 X'den), 1 µL T4 DNA ligaz (5 U / µL), 3 µL ekspresyon vektörü ve 14 µL gen ürünü kullanılarak 22 °C'de 45 dakika olarak gerçekleştirildi.

2.14.6 Rekombinant Ekspresyon Vektörünün *E. coli* DH10B Suşu Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

Zeytin *DnaJ* genini taşıyan *pPICZαC* vektörü *E. coli* DH10B suşu kompetan hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi [126]. Transformasyon için, 3 µL ligasyon ürünü, - 80 °C dolabında muhafaza edilen 50 µL alıcı hücre içerisine ilave edildikten sonra 30 dakika buzda bekletildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 42 °C'de hazırlanan su banyosunda 1.5 dakika bekletilerek plazmitin hücre içerisine alınması sağlandı. Isı şokunun ardından tüp içerisine 200 µL LB besiyeri (25 µg / mL zeozin içeren sıvı besi yeri) eklendi. Alıcı hücreler iki saat çalkalayıcı inkübatörde bekletildikten sonra 250 µL LB agar katı besi yerine inoküle edildi. Transformasyon ürünlerinin ekildiği petripler 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.14.7 Rekombinat Kolonilerin Tespiti: Koloni PCR

İnokülasyon sonrası petride büyüyen kolonilerden rastgele seçilerek koloni PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Seçilen yüz koloniden her biri, 20 µL distile su içerisinde seyreltildi. Bu seyreltik hücrelerden 3 µL zeozin'li katı besiyerine ekilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. 2 µL'si ise koloni PCR'da kalıp olarak kullanıldı. Koloniler, AOX primerleri kullanılarak yapılan standart PCR

reaksiyonları ile genin varlığı açısından tarandı. PCR ürünleri %0.8 'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

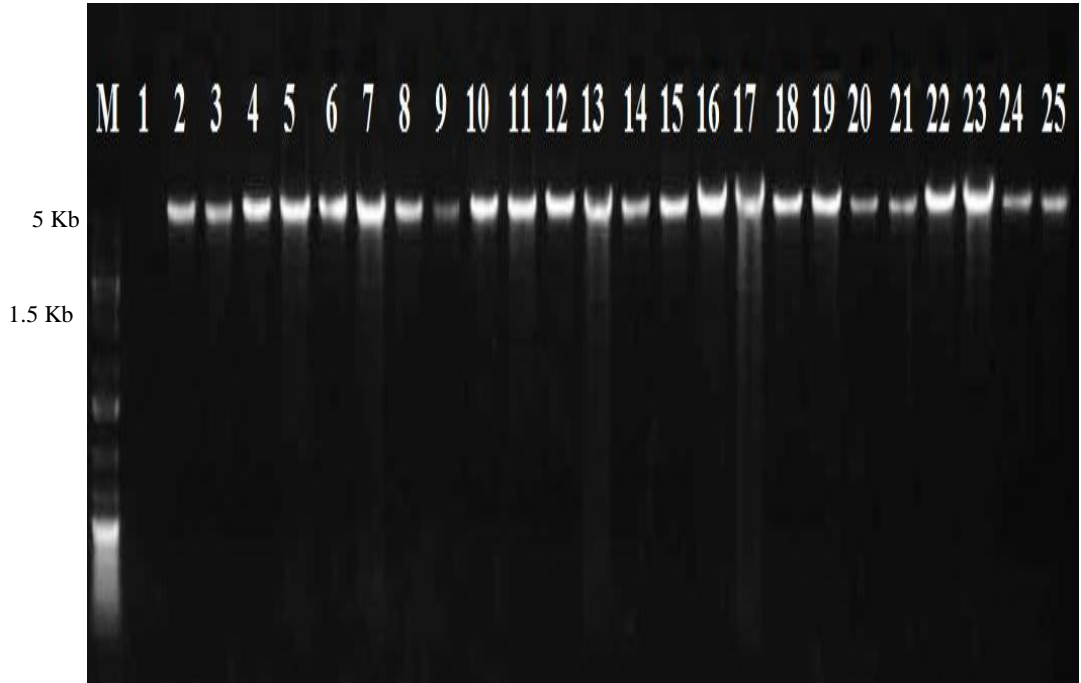
2.14.8 Rekombinant pPICZαC Vektörünün İzolasyonu

Koloni PCR sonucunda rekombinant olduğu düşünülen kolonilerden plazmit DNA'larını izole etmek amacıyla zeozinli (25 µg / mL) LB'ye ekimler yapılarak 37 °C'de bir gece inkübe edildi. Plazmit DNA'sı Sigma firmasına (Taufkirchen, Almanya) ait Gen Elute HP Plazmit Miniprep Kiti (Katalog No: NA0150-1KT) kullanılarak izole edildi. İzolasyonun ardından plazmit DNA ürünleri, klonlamada kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek genin varlığı doğrulandı. Ayrıca izole edilen plazmit DNA'ları REFGEN (Ankara, Türkiye) aracılığıyla dizilendi. Dizileme sonucunda pozitif sonuç veren klonlardan gliserol stoklar hazırlanarak - 80 °C dolabında muhafaza edildi.

3. BULGULAR

3.1 Genomik DNA İzolasyonu ve PCR

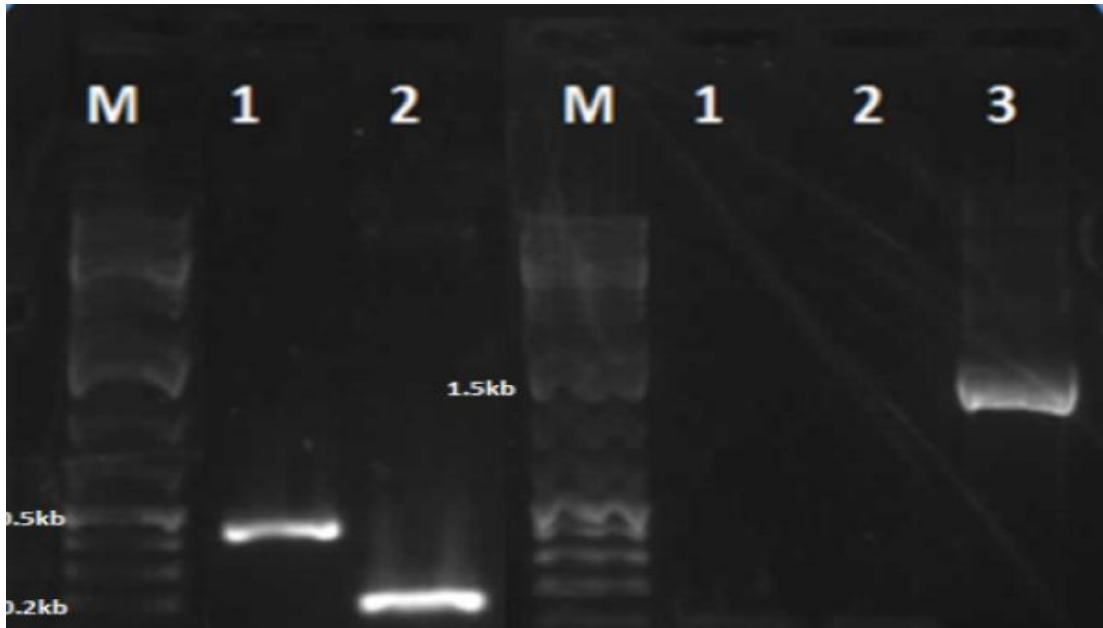
Farklı zeytin çeşitlerinden (bkz. Tablo 2.1) izole edilen gDNA'ların agaroz jel görüntüleri şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Genomik DNA örneklerine ait agaroz jel görüntüsü

3.2 İtron Tespiti

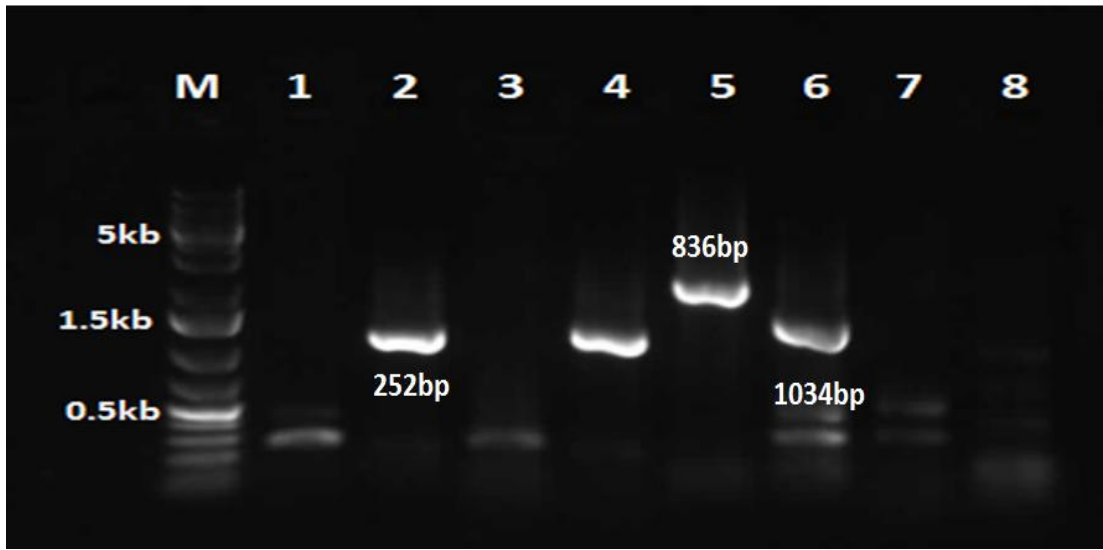
DnaJ geninde intron bölgelerinin olup olmadığını belirlemek için geni tam uzunlukta çoğaltacak primerler (DnaJampF ve DnaJampR) ile hem gDNA'dan hem de cDNA'dan PCR yaptığımızda gDNA kalıplarından *DnaJ* genine ait bantlar elde edilemedi (Şekil 3.2). Fakat cDNA'dan 200 nükleotid çoğaltan primerler ile PCR yapıldığında 500 nükleotidlik bantlar elde edildi. Bu nedenle intron bölgelerinin büyük olduğunu düşünerek genin farklı kısımlarına has primerler dizayn edildi.



Şekil 3.2 Genomik DNA ve cDNA'dan çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

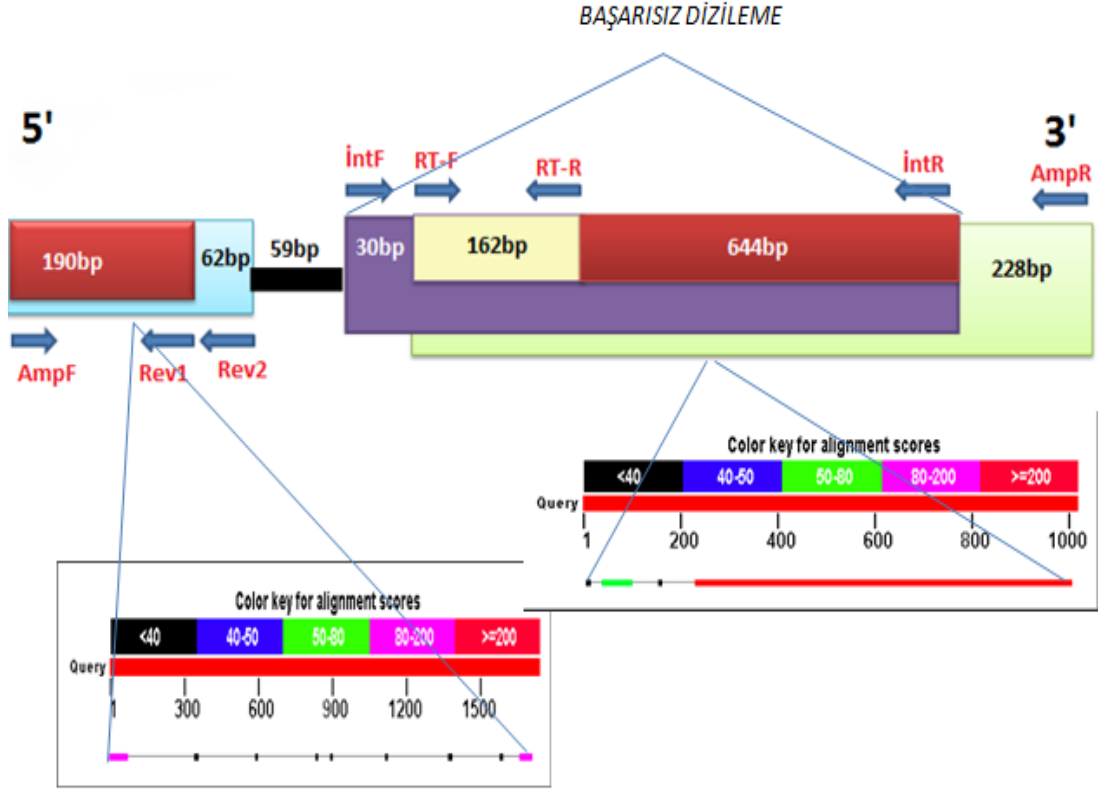
Şekil 3.4 'de genin farklı bölgelerini çoğaltan primer çiftleri gösterilmiştir. Bu primerler geni 5' uçtan 200 - 250 nükleotid çoğaltacak geri primerler, ortadan yaklaşık 160 nükleotidlik bölgeyi çoğaltması beklenen primer çiftleri ve 3' uca yakın

850 nükleotid çoğaltan özgül primerler şeklindedir. Değişik primer kombinasyonları ile PCR sonucunda cDNA'ya göre 5'uctan 200 – 250 nükleotitlik bir bölgeyi çoğaltan DnaJampF-DnaJrev1 primerleri ile genomik DNA'dan yaklaşık 1000 - 1500 baz çifti büyüklüğünde DNA bantları elde edildi. Aynı şekilde genin ortasından 800 nükleotitlik kısmı çoğaltacak şekilde tasarlanan primerler ile 2 - 3 kb'lık ürünler elde edildi. DnaJrtF - DnaJampR primer çiftleri ise beklenen büyüklükte bantlar verdi.



Şekil 3.3 İntron tespitinde farklı primer kombinasyonları kullanılarak elde edilen PCR ürünleri 1.DnaJEcoR - DnaJrev1, 2. DnaJEcoR - DnaJrev2, 3. DnaJampF - DnaJrev1, 4. DnaJampF - DnaJrev2, 5. DnajintF - DnajintR, 6. DnaJrtF - DnaJampR, 7. DnaJampF - DnaJrtR, 8. DnaJampF – DnaJampR

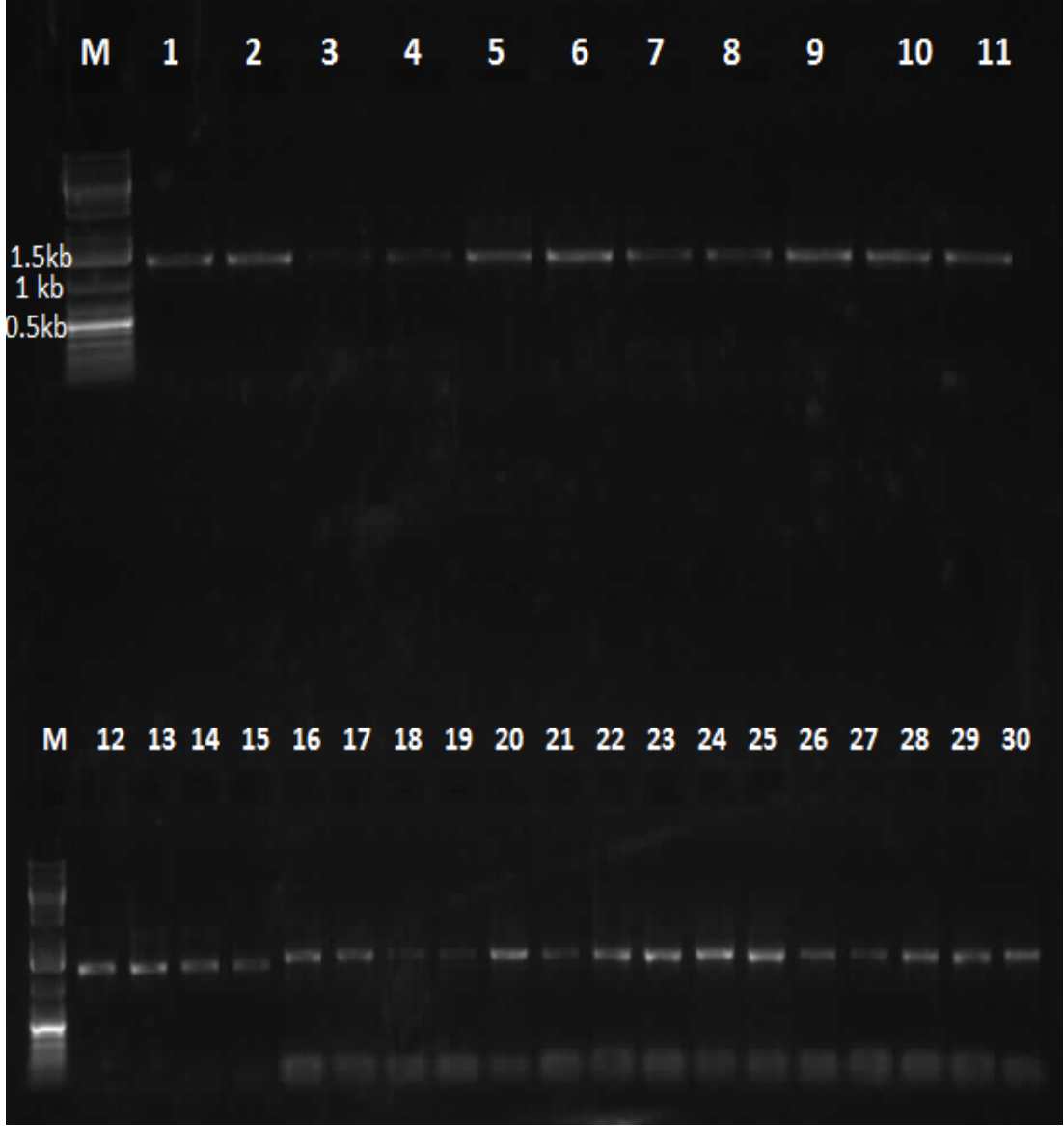
Bu analizler sonucunda intron bölgeleri içerdiği sanılan bantlar dizilendi. Dizileme sonuçları şekil 3.4'de gösterilmektedir. Buna göre, genin 5'uçuna yakın bölgede yaklaşık 1 kb büyüklüğünde intron dizisi belirlendi. 3'uçtan 1000 nükleotid'lik bir bölgenin dizileme sonuçlarında ise yaklaşık 100 bç'lik intron dizisi tespit edildi. Diğer bölgenin 2 - 3 kb büyüklüğünde olması sebebiyle dizileme sonuçları verimli olarak elde edilemedi. Fakat jel görüntülerine dayanarak bu bölgenin yaklaşık 1,5 - 2 kb'lık intron dizisi ihtiva ettiği düşünülmektedir.



Şekil 3.4 İntron analizinde kullanılan primerlerin yerleşimi ve intron bölgeleri

3.3 Polimorfizm Analizi

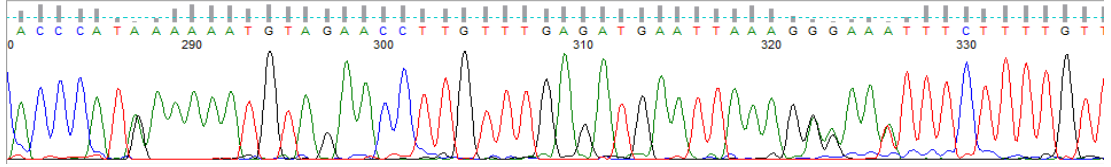
Şekil 3.5’de, zeytin çeşitleri arasında polimorfizm olup olmadığını araştırmak amacıyla gerçekleştirilen PCR ürünleri gösterilmektedir. Polimorfizm tespiti için her bir çeşitten gene has intron - ekzon bölgesi, intron analizinde de kullanılmış DnaJampF-DnaJrev1 primerleri ile çoğaltıldı.



Şekil 3.5 Zeytin çeşitlerine ait PCR ürünleri. 1.Ascolano, 2. Çakır, 3.Memecik, 4. Gordales, 5. Edincik Su, 6. Negral, 7. UB1, 8. Hojiblanca, 9. Erkence, 10. Ayvalık, 11. 0308, 12. Karamürsel Su, 13. İzmir Sofralık, 14. Samanlı, 15. 0108, 16. UB10, 17. UB3, 18. Hermandos, 19. Cormona, 20. Memeli, 21. Leccino, 22. Kiraz, 23. Domat, 24. Picual, 25. Uslu, 26. Koroneiki, 27. Gordal, 28, Verdial, 29, Kasım var, 30. Gemlik

Çeşitlere ait nükleotid dizileri BioEdit programı [116] ile hizalandı. Dizileme sonuçlarına göre 400 bç'lik bir bölgede 10 adet tek nükleotid polimorfizmlerine rastlanmıştır (Tablo 3.1). Ayrıca Koroneiki, Çakır, Edincik Su, Gordales, Negral, Erkence, Samanlı, Memecik ve Karamürsel Su, Domat gibi çeşitlerdeki pek çok heterozigot bölge tespit edilmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 3.6).

Çeşitler arasında akrabalık ilişkilerini gözlemlemek için PAUP programı [121] yardımıyla filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 3.7).



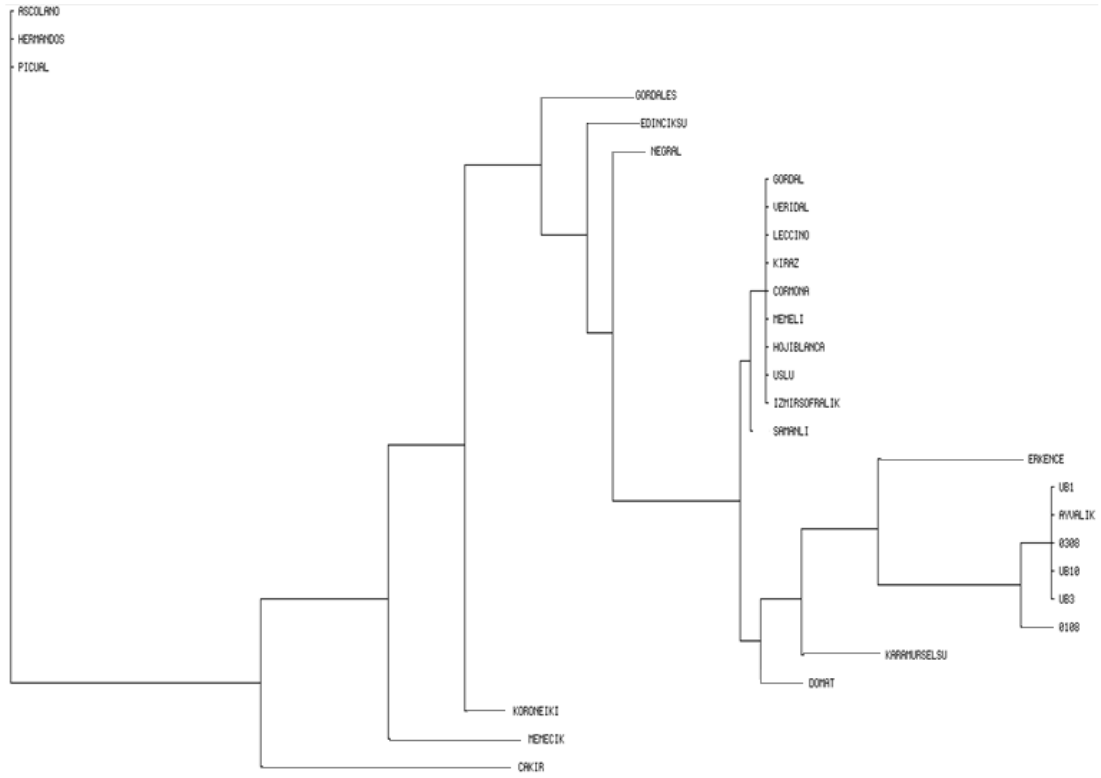
Şekil 3. 6 Çakır çeşitine ait kromotogramdaki heterozigot bölgeler

Tablo 3. 1 Zeytin çeşitlerindeki SNP noktaları ve heterozigot bölgeler

Zeytin Çeşitleri	Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) Noktaları									
	100	161	261	292	327	328	331	351	412	433
Ascolano	T	A	T	A	G	G	A	G	A	G
Çakır	T	W (A/T)	K (G/T)	R (G/A)	R (G/A)	R (G/A)	W (A/T)	R (G/A)	R (G/A)	G
Memecik	T	W (A/T)	K (G/T)	R (G/A)	R (G/A)	R (G/A)	W (A/T)	R (G/A)	R (G/A)	G
Gordales	Y (C/T)	W (A/T)	K (G/T)	A	R (G/A)	R (G/A)	A	R (G/A)	R (G/A)	S (G/C)
Edincik Su	Y (C/T)	W (A/T)	K (G/T)	A	R (G/A)	R (G/A)	A	R (G/A)	R (G/A)	S (G/C)
Negral	Y (C/T)	W (A/T)	K (G/T)	A	R (G/A)	R (G/A)	A	R (G/A)	R (G/A)	S (G/C)
UB1	T	T	G	G	A	A	T	A	G	G
Hojiblanca	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Erkence	Y (C/T)	T	G	R (G/A)	A	A	W (A/T)	A	G	S (G/C)

Tablo 3. 1 (Devam) Zeytin çeşitlerindeki SNP noktaları ve heterozigot bölgeler

Ayvalık	T	T	G	G	A	A	T	A	G	G
0308	T	T	G	G	A	A	T	A	G	G
Karamürsel Su	Y (C/T)	T	G	R (G/A)	A	A	W (A/T)	A	G	S (G/C)
İzmir Sofralık	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Samanlı	Y (C/T)	T	G	R (G/A)	A	A	W (A/T)	A	G	C
0108	T	T	G	G	A	A	T	A	G	S (G/C)
UB10	T	T	G	G	A	A	T	A	G	G
UB3	T	T	G	G	A	A	T	G	G	G
Hermantos	T	A	T	A	G	G	A	A	A	G
Cormona	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Memeli	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Leccino	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Kiraz	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Domat	Y (C/T)	T	G	R (G/A)	A	A	W (A/T)	A	G	S (G/C)
Picual	T	A	T	A	G	G	A	G	A	G
Uslu	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Koroneiki	T	W (A/T)	K (G/T)	R (G/A)	R (G/A)	R (G/A)	W (A/T)	A	R (G/A)	G
Gordal	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C
Verdial	C	T	G	A	A	A	A	A	G	C

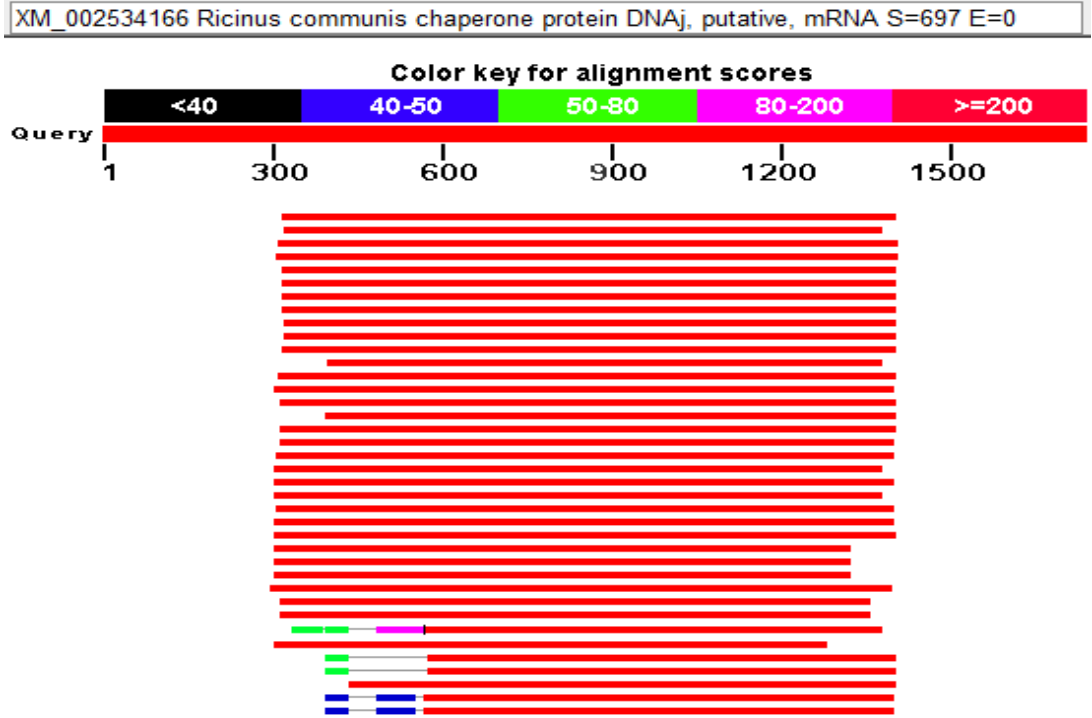


Şekil 3.7 Zeytin çeşitlerine ait neighbour - joining filogenetik ağaç

3.4 Biyoinformatik Analiz

3.4.1 BLAST Analizi

Zeytin cDNA kütüphanesinde mevcut ck17 - 90 olarak isimlendirilmiş klonun NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı [115] nBLAST sekmesi ile yapılan analizin sonuçları Şekil 3.8’ ve Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Ck17 - 90 klonunun BLAST analizi

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XM_002534166.1	Ricinus communis chaperone protein DNAj, putative, mRNA	697	697	62%	0.0	74%
XM_002274313.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100268135	686	686	60%	0.0	74%
XM_002310518.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	679	679	62%	0.0	74%
XM_002307039.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	668	668	63%	0.0	74%
AK243178.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA, clone: J100036P15, full in	619	619	62%	2e-173	73%
NM_001061765.1	Oryza sativa Japonica Group Os05g0334400 (Os05g0334400)	619	619	62%	2e-173	73%
NM_001061762.1	Oryza sativa Japonica Group Os05g0333500 (Os05g0333500)	619	619	62%	2e-173	73%
AK101370.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J033035M17, full in	619	619	62%	2e-173	73%
AK362253.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein,	618	618	62%	5e-173	73%
AK249123.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf17a20, mf	618	618	62%	5e-173	73%
AB055405.1	Oryza sativa mRNA for DNAJ homologue, complete cds	607	607	62%	1e-169	73%
XM_002268080.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100257396	603	603	56%	1e-168	73%
XM_002443664.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	574	574	62%	6e-160	72%
XM_002878567.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata DNAJ heat shock family prote	556	556	63%	2e-154	71%

Şekil 3.9 BLAST ile tespit edilen benzer kayıtlar

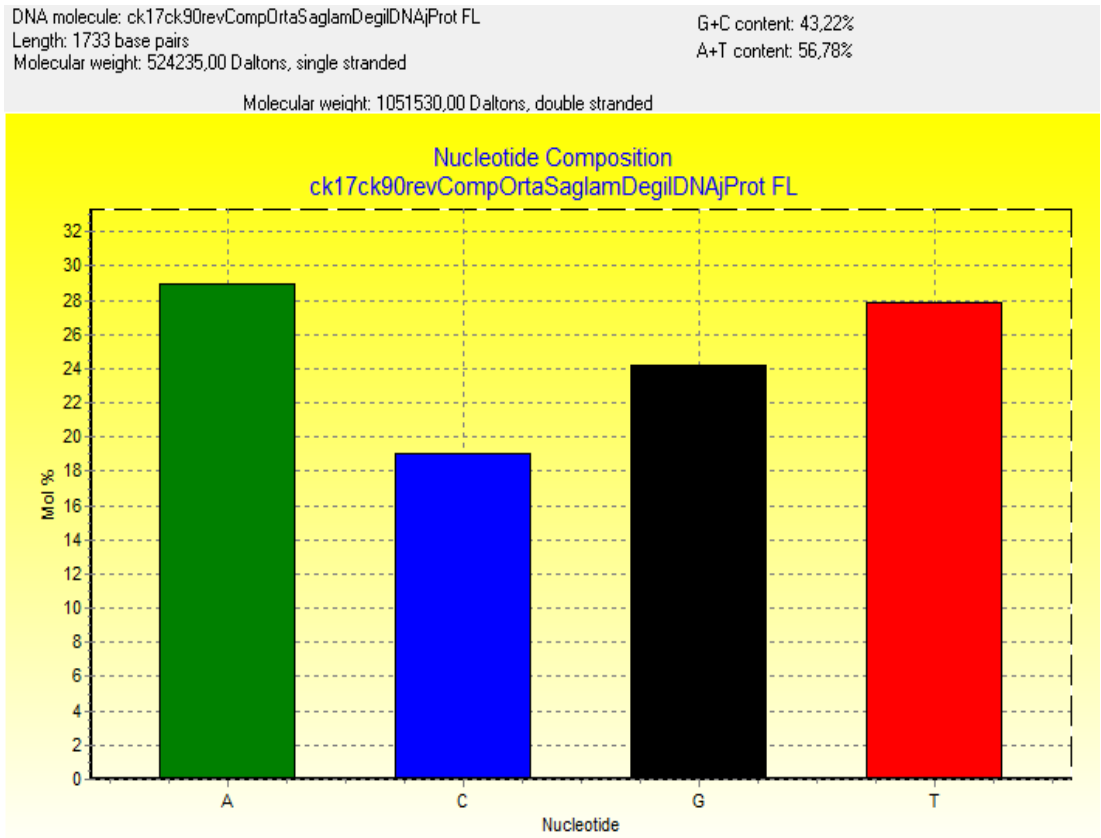
Bu sonuçlara göre ck17 - 90 klonunun yüksek oranda *DnaJ* genine benzediği tespit edildi. NCBI, pBLAST sekmesi ile yapılan analizin sonuçlarında ise gen ürününün hangi aileye ait olduğu belirlenmiş ve korunmuş bölgeleri gösterilmiştir.(Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Farklı türlere ait DnaJ proteinlerinin korunmuş bölgeleri

3.4.2 BioEdit Programı ile Yapılan Analizler

Tahmini *DnaJ* geninin nükleotid kompozisyonu şekil 3.11’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre G - C içeriğinin %43.22, A - T yoğunluğunun ise %56.78 oranında olduğu görülmektedir.



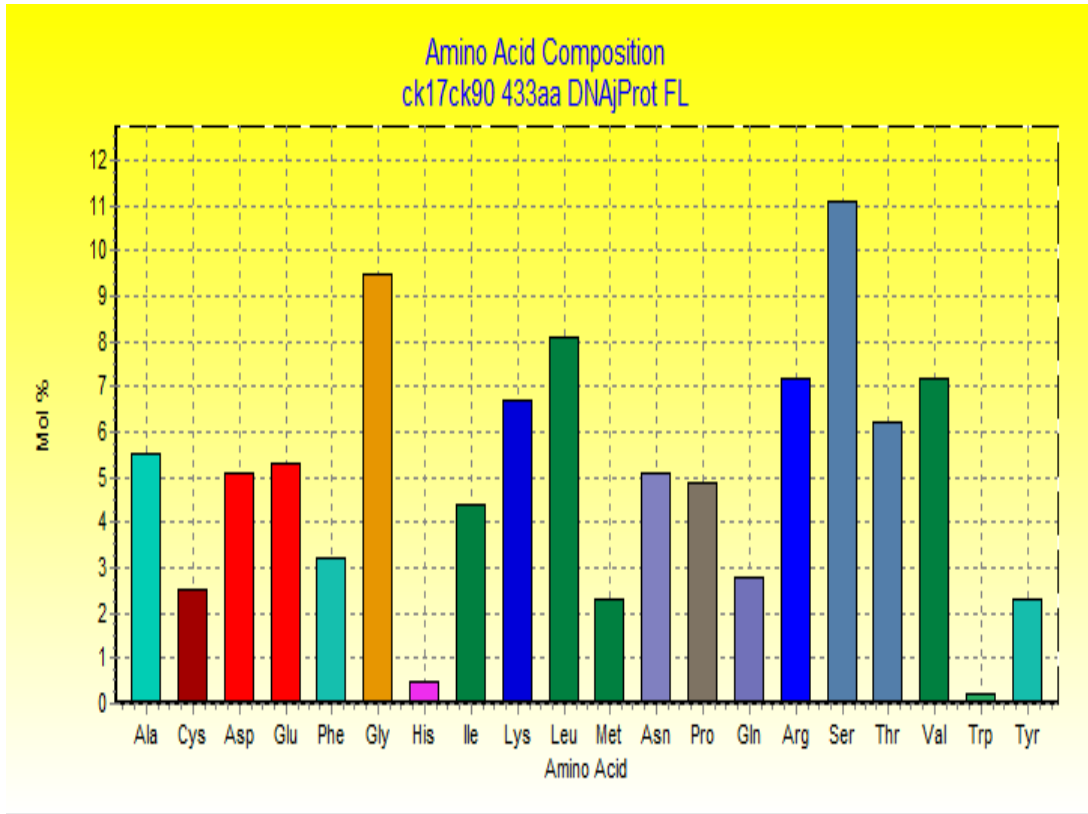
Şekil 3.11 Ck17 - 90 klonunun nükleotid kompozisyonu

Şekil 3.12, Zeytin *DnaJ* geni cDNA dizisinin açık okuma çerçevesini (ORF) göstermektedir. Buna göre, zeytin tahmini *DnaJ* geni 433 aminoasit uzunluğunda bir proteine dönüşmektedir. Aminoasit kompozisyonu Şekil 3.13’de gösterildiği gibidir.

>ck17ck90: 101 to 1399: Frame 2 433 aa

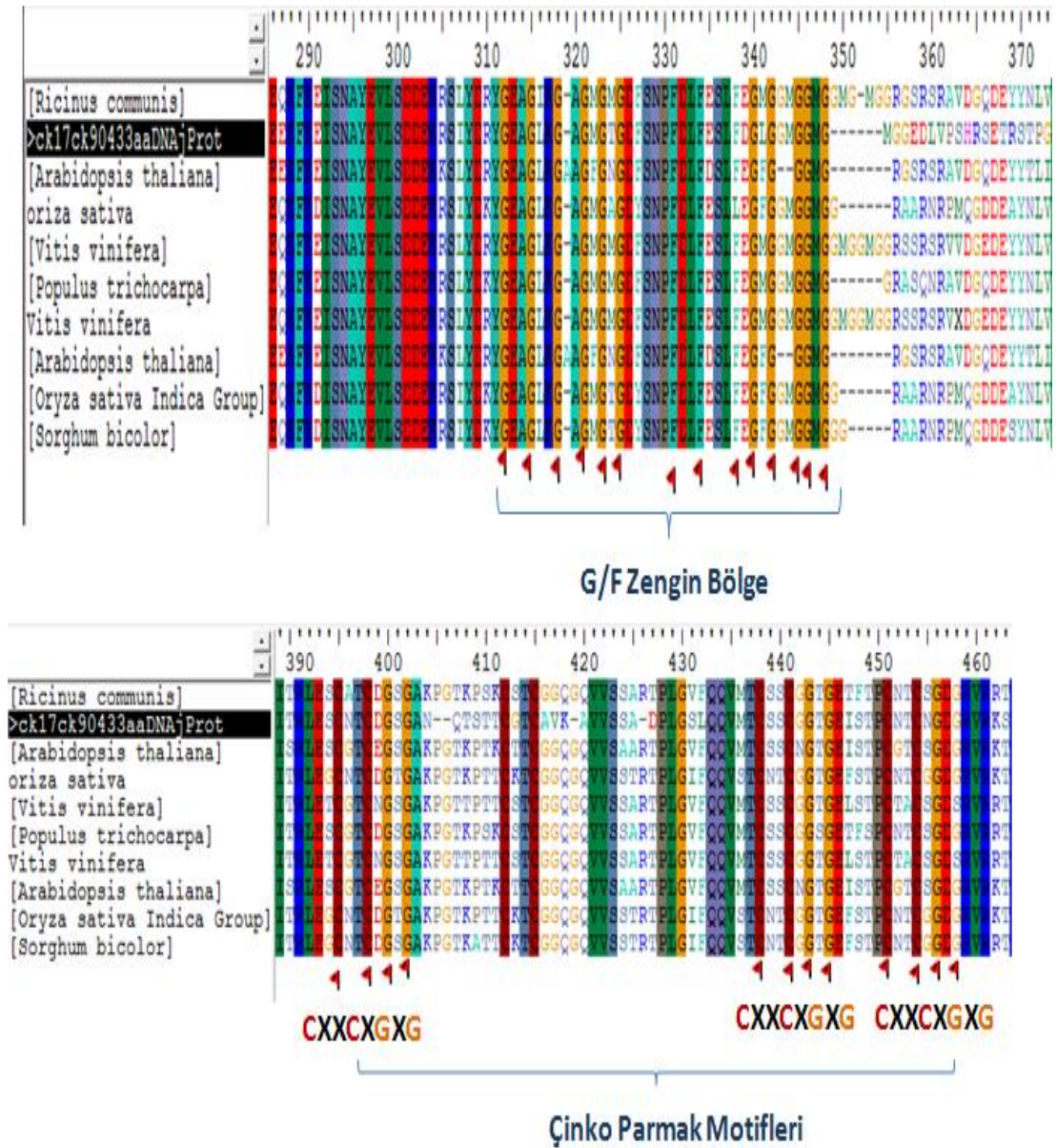
MAIIPCSTWGVQPQFMSRSFIINKFSTSPLCFSSRIRALSSPSTFLSQKLSALFRLGSYNNSRQQQRTRLVVRADRDYTVLGVSKNASKSEIKSAYRKLARNYHPDWNKE
PNAEEKFKELISWAYEVLSDDEKRSIYDRYGEAGLKGAGMGTGDFSNPFDLFESLFDGLGGMGMGMGEDLVPSHRSETRSTPGLNFKAEVFGVEKEIEITRLESCNTCDGSGA
NQTSTTCGTCVAVVSSADPLGSLQQVMTCSSCGGTGEISTPCNTCNGDGRVRSKRISLKVPAQVDSGSRLVRSEGNAGRRGGPPGDLFVSIIVLADFVLRDDTNILYTC
KVSIVDAILGTSLKVPTVDGMVDLKIIPPQTQNTLLVMAKKGVPFLNKRMRGDQLVKVQVQIPKRLSTEERKLEELIANLNKAKTANSSR

Şekil 3.12 Zeytin DnaJ proteinine ait aminoasit dizisi



Şekil 3.13 DnaJ proteinin aminoasit kompozisyonu

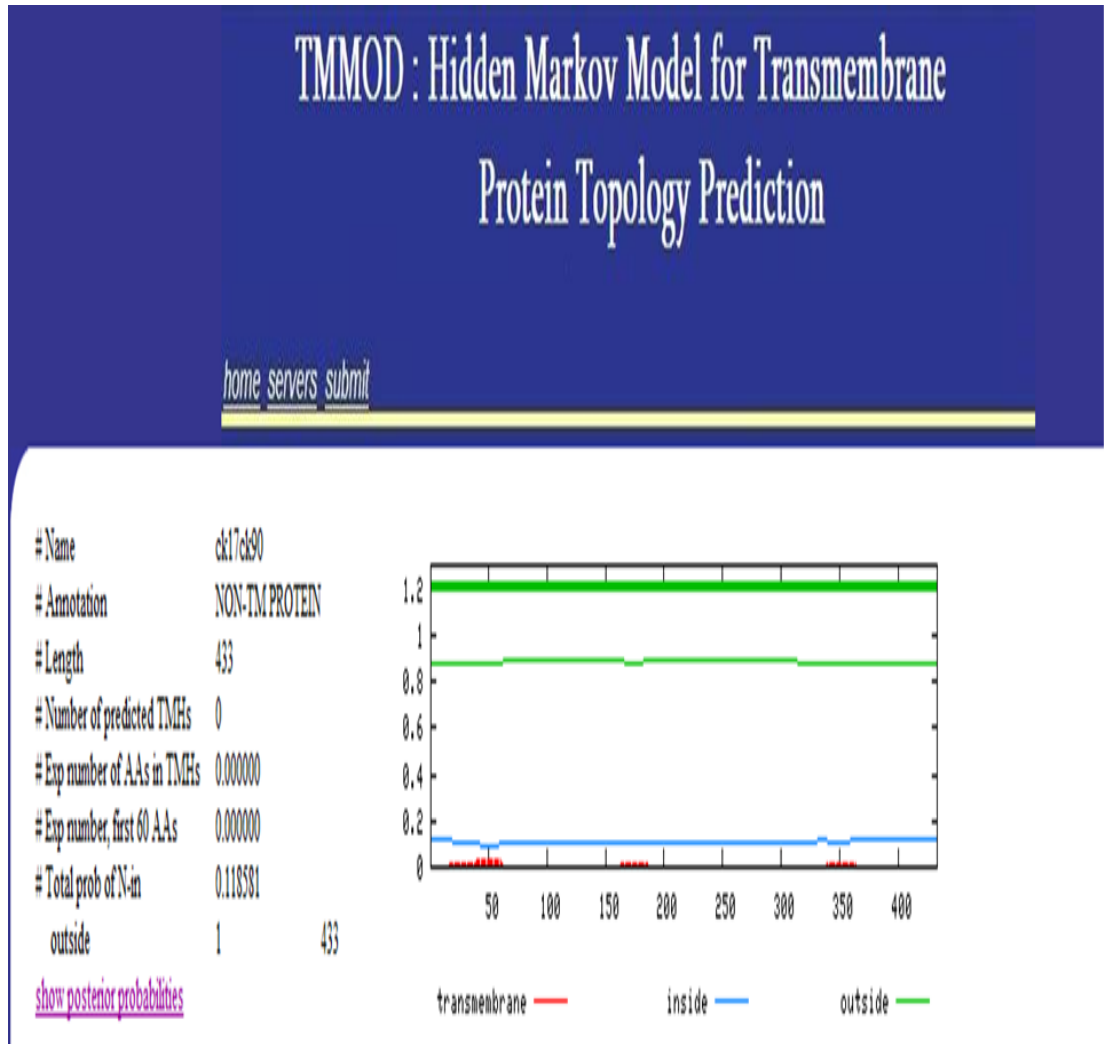
Farklı bitki türlerine ait DnaJ proteinlerinin hizalanması sonucunda J - domainini takip eden glisin / fenilalanin'ce zengin bölge ile proteinin peptid bağlanma fragmentinde mevcut çinko parmak motifleri Şekil 3.14 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.14 Çeşitli bitki türlerinde mevcut DnaJ protein peptid bağlanma fragmentini oluşturan aminoasit dizileri

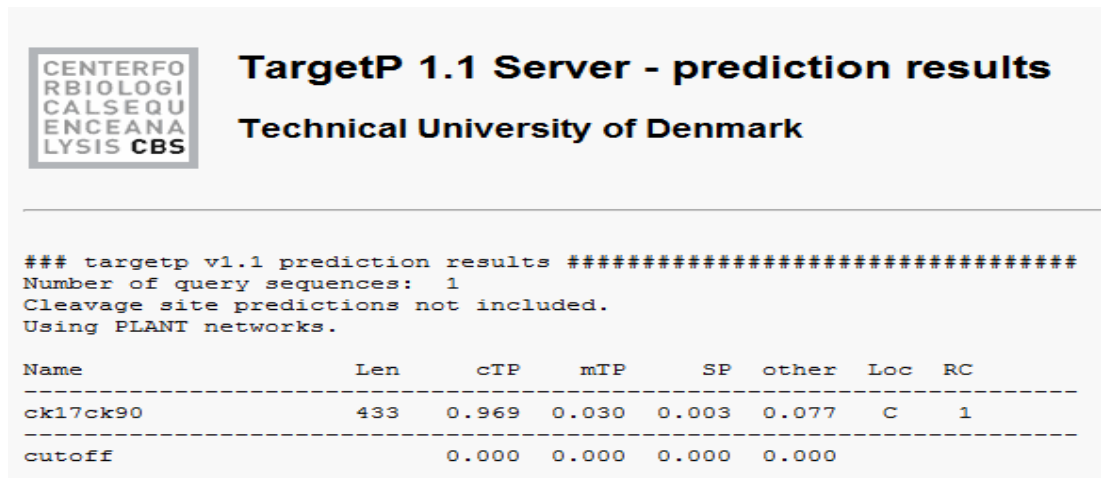
3.4.3 ExPASy Analizleri

Şekil 3.15, aminoasit dizisinin TMMOD Protein Topoloji Prediction programındaki analiz sonuçlarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre DnaJ gen ürününün transmembran proteini olmadığı tahmin edilmektedir.



Şekil 3.15 Proteinin hücre içi yerleşimi

TARGET - P programı analizlerde cTP ile gösterilen veri proteinin kloroplast transit peptid ihtiva ettiğini göstermektedir. RC ifade edilen kısım analizin güvenilirliğini ölçmektedir. 1'den 5'e kadar derecelendirilmiş ölçekte değer düştükçe güvenilirlik artmaktadır. Şekil 3.16' da görülen RC 1 değeri, analizin %80'den fazla güvenilir olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca bu sonuçlar ExPASy web sayfasında mevcut farklı programlar ile desteklenmiştir (Şekil 3.17).



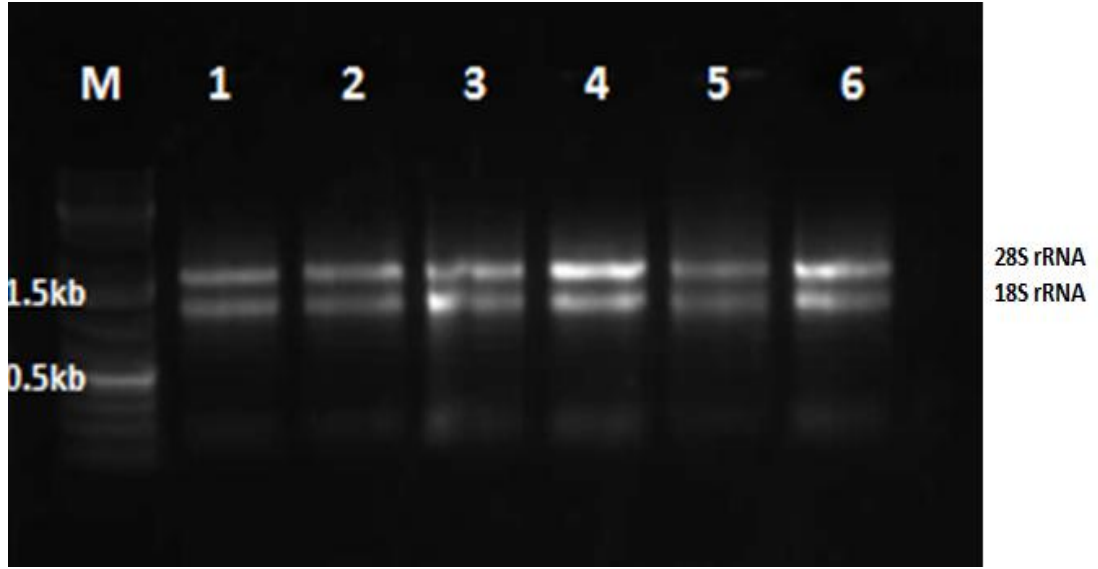
Şekil 3.16 J-protein sinyal peptid analizi

Location	Probability of Location
Chloroplast	97.2 %
Mitochondrion	2.7 %
Cytoplasm	0.0 %
Nucleus	0.0 %
Secreted pathway	0.0 %

Şekil 3.17 DnaJ proteinin hücre içi lokalizasyonu

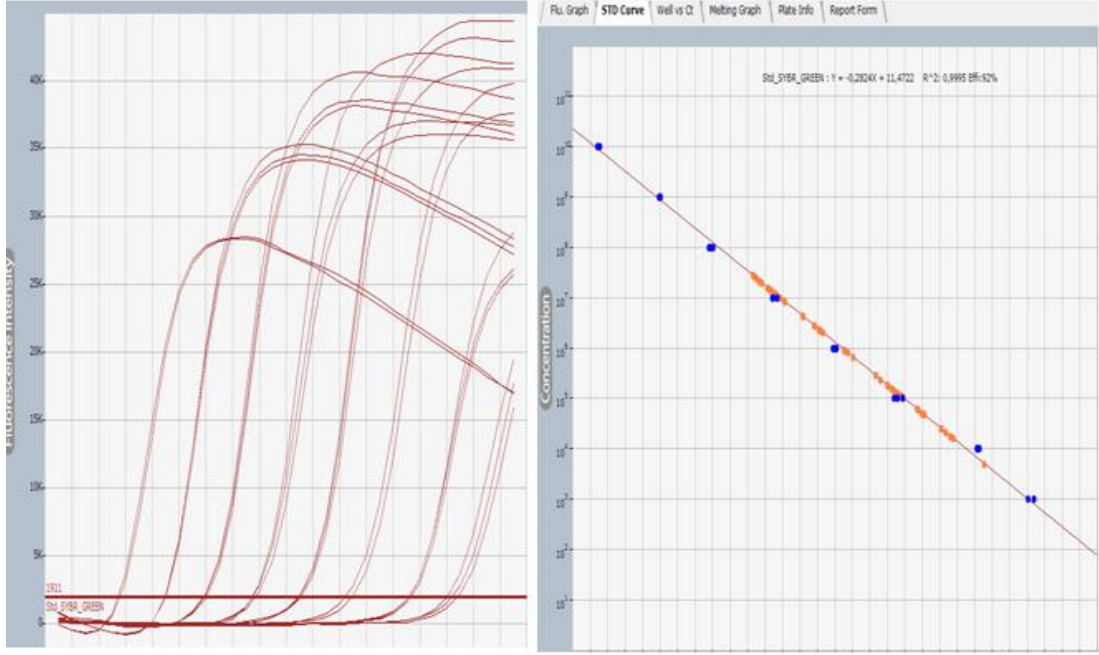
3.5 Dokusal ve Zamansal Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

DnaJ geninin dokusal ve zamansal ekspresyon seviyelerinin tespiti için farklı dokulardan (bkz. Tablo 2.7) izole edilmiş RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.18 Toplam RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

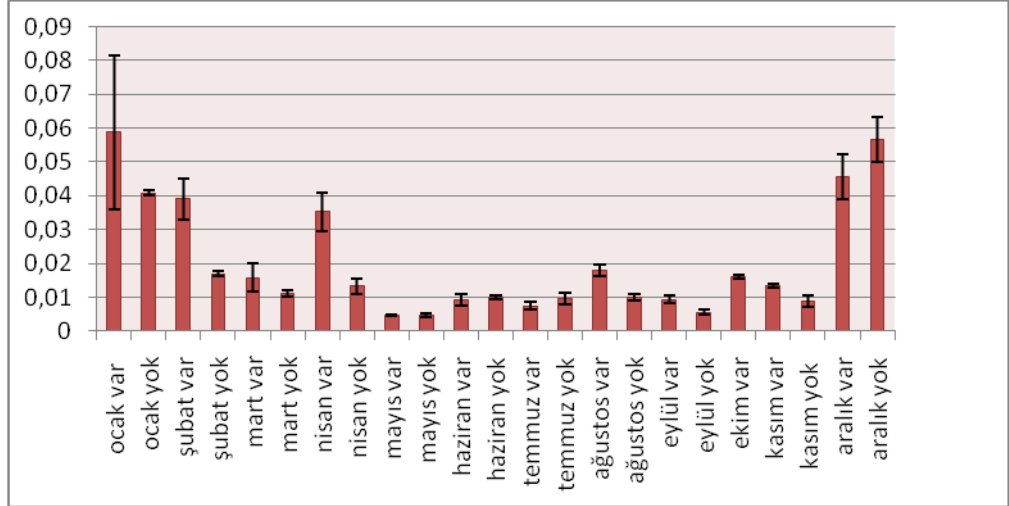
Standart eğri, konsantrasyonu bilinen dilüsyon serilerini kullanarak 3 tekrarlı çalışılan standartlara ait anlamlı gösterimli PCR sonucunda elde edilmiştir. (Şekil 3.19)



Şekil 3.19 Anlık gösterimli PCR analizlerinde kullanılan standart eğri

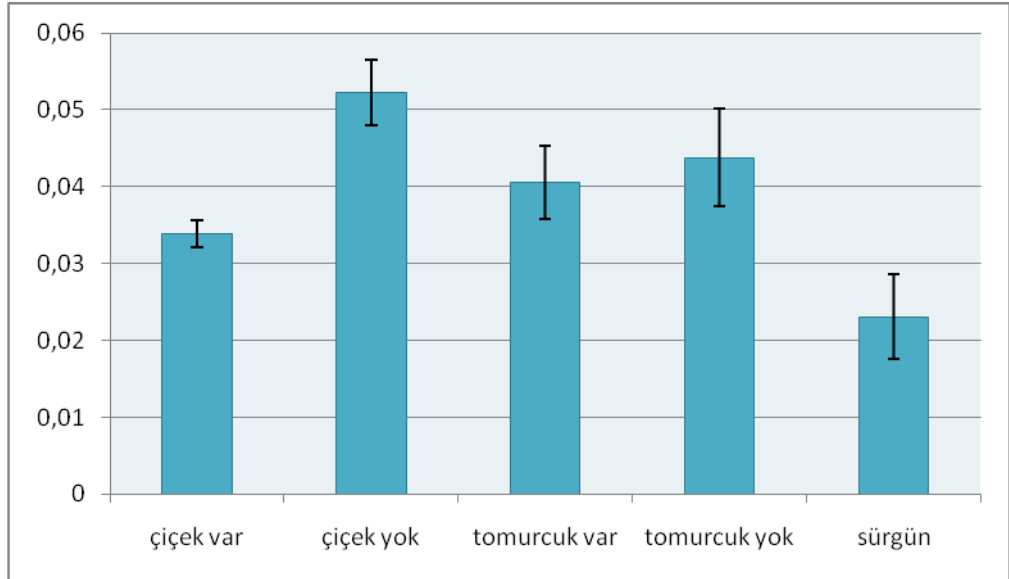
12 ayda “var yılı” ve “yok yılı” ağaçlarından örnekler toplanmış ve anlık gösterimli PCR sonucunda standart eğri baz alınarak normalizör gen GAPDH ile birlikte konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Aşağıdaki grafikler, zeytin bitkisinde konstitütif olarak ifade edilen normalizör gen GAPDH’e göre farklı ay ve dokularda değişiklik göstermiş *DnaJ* mRNA düzeylerini göstermektedir.

K
A
T
G
A
P
D
H

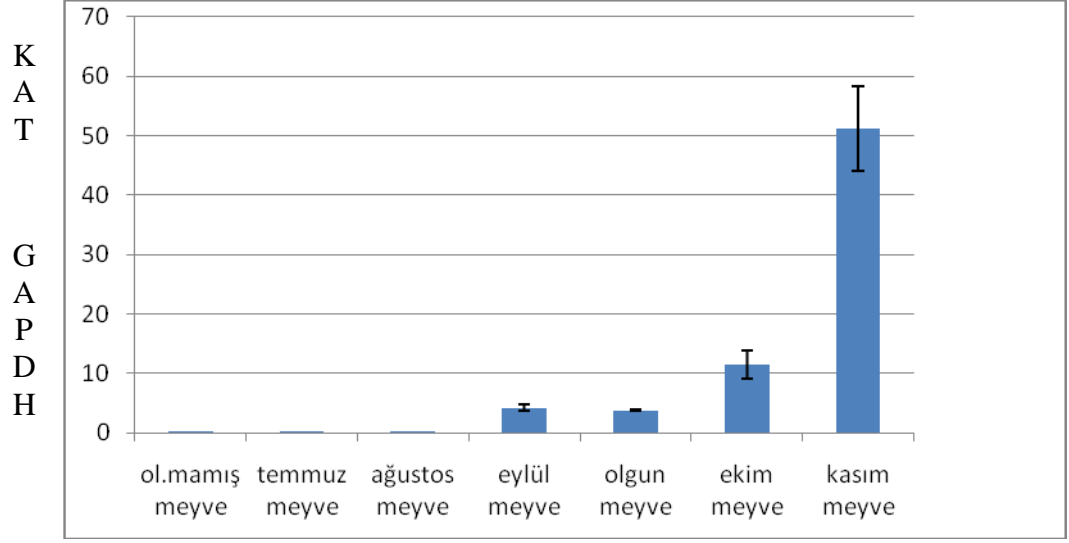


Şekil 3.20 Zamansal ekspresyon grafiği

K
A
T
G
A
P
D
H



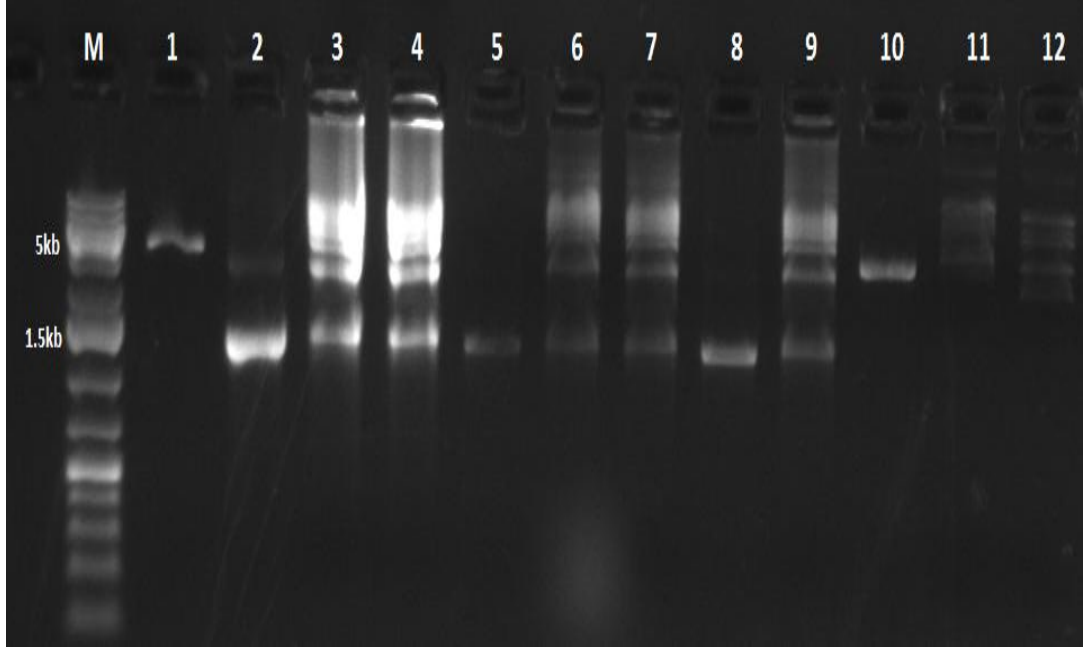
Şekil 3.21 Dokusal ekspresyon grafiği



Şekil 3.22 Farklı meyve dokularında *DnaJ* ekspresyon seviyesi

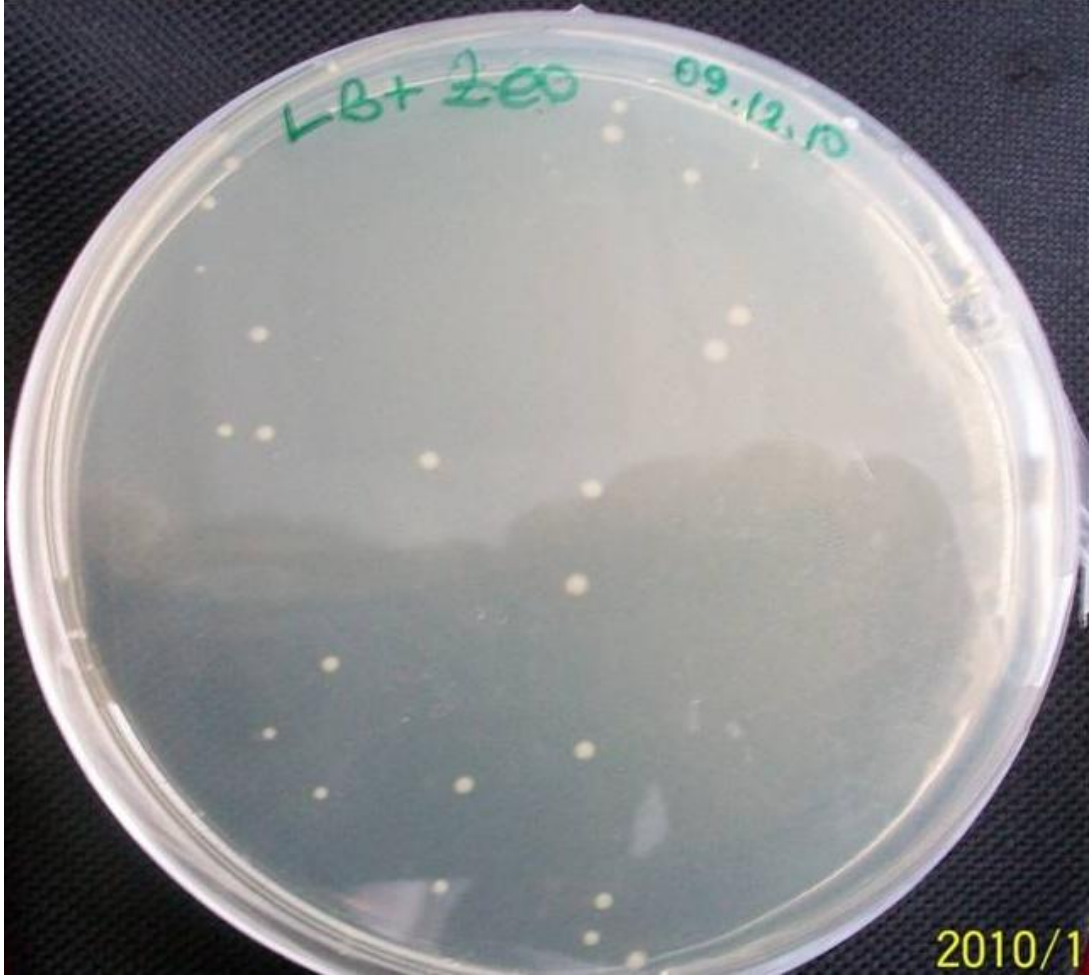
3.6 Ekspresyon Vektörü pPICZαC'ye Klonlama

Biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarının ilk basamağı *DnaJ* geninin pPICZαC ifade vektörüne klonlanmasıdır. Şekil 3.23'de bu amaçla gerçekleştirilen ligasyon sonuçları görülmektedir.



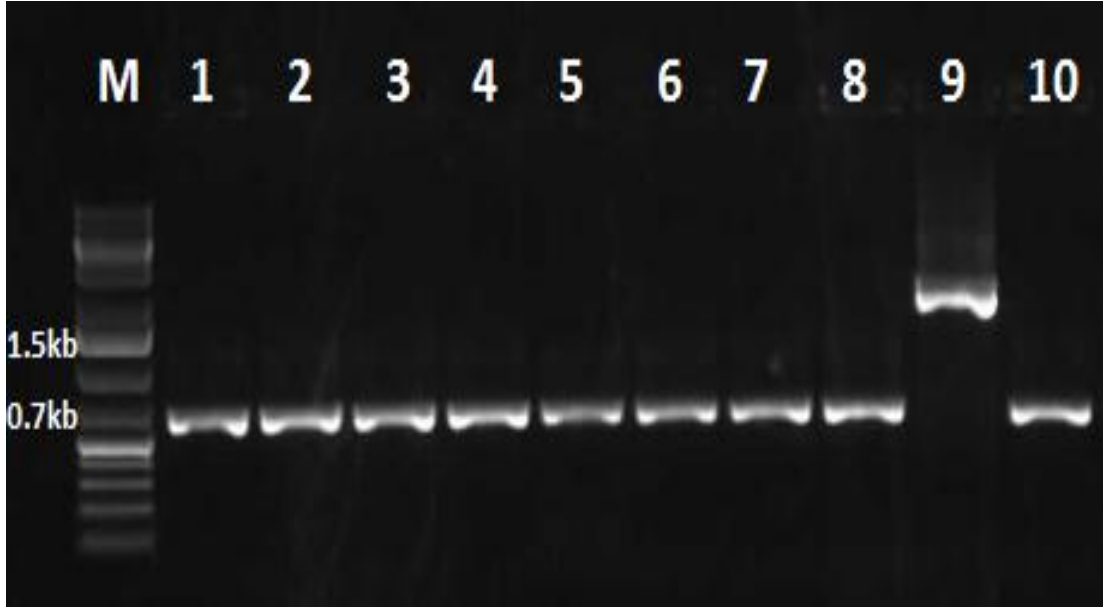
Şekil 3.23 Ligasyon ürünleri ve kontrolleri

Geni taşıyan *pPICZ α C* ekspresyon vektörünün *E.coli* DH10B suşuna transforme edilmiş ve kompatan hücreler zeozin'li LB katı besiyerine ekilmiştir. Şekil 3.24 inkübasyonu takiben oluşan kolonileri göstermektedir.

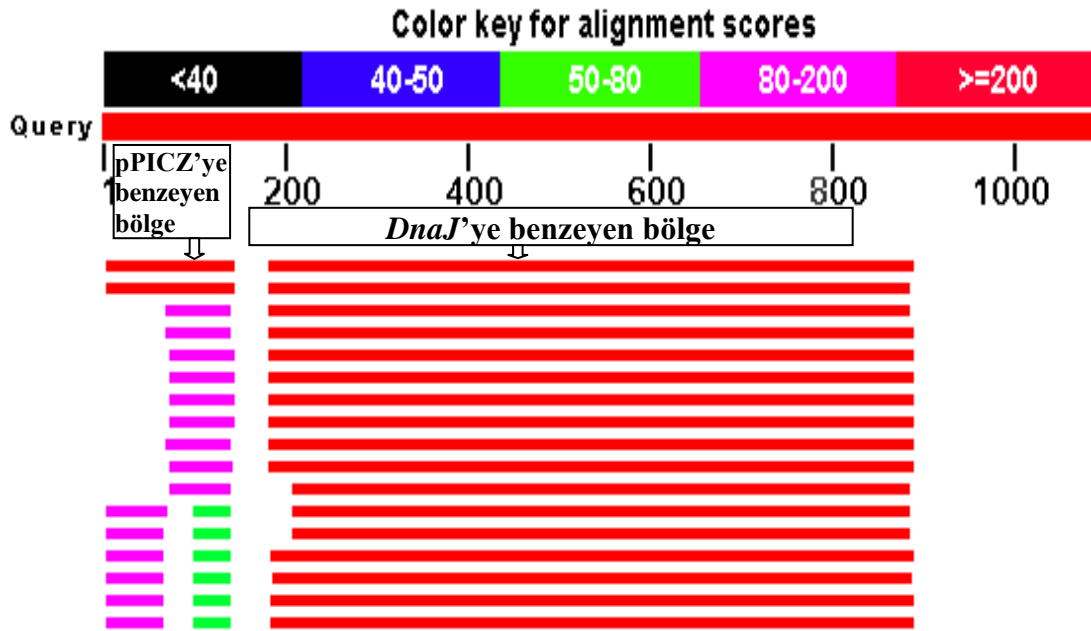


Şekil 3.24 Rekombinant plazmitleri içeren kolonilere ait petri görüntüsü

Geni taşıyan rekombinant kolonileri belirlemek amacıyla rastgele seçilen kolonilerden AOX primerleri ile PCR yapıldı. Şekil 3.25’de 10 farklı koloniden elde edilen PCR sonuçları verilmiştir. 9. koloni hariç diğer bantlarda boş vektördeki 600 bp’lik AOX bölgesinin çoğaldığı görülmektedir. *pPICZ α C* klonlama bölgesinde bulunan alkol oksidaz (AOX) içerisine klonlandığı düşünülen gene ait 9. bant ise yaklaşık 2 kb büyüklüğündedir.

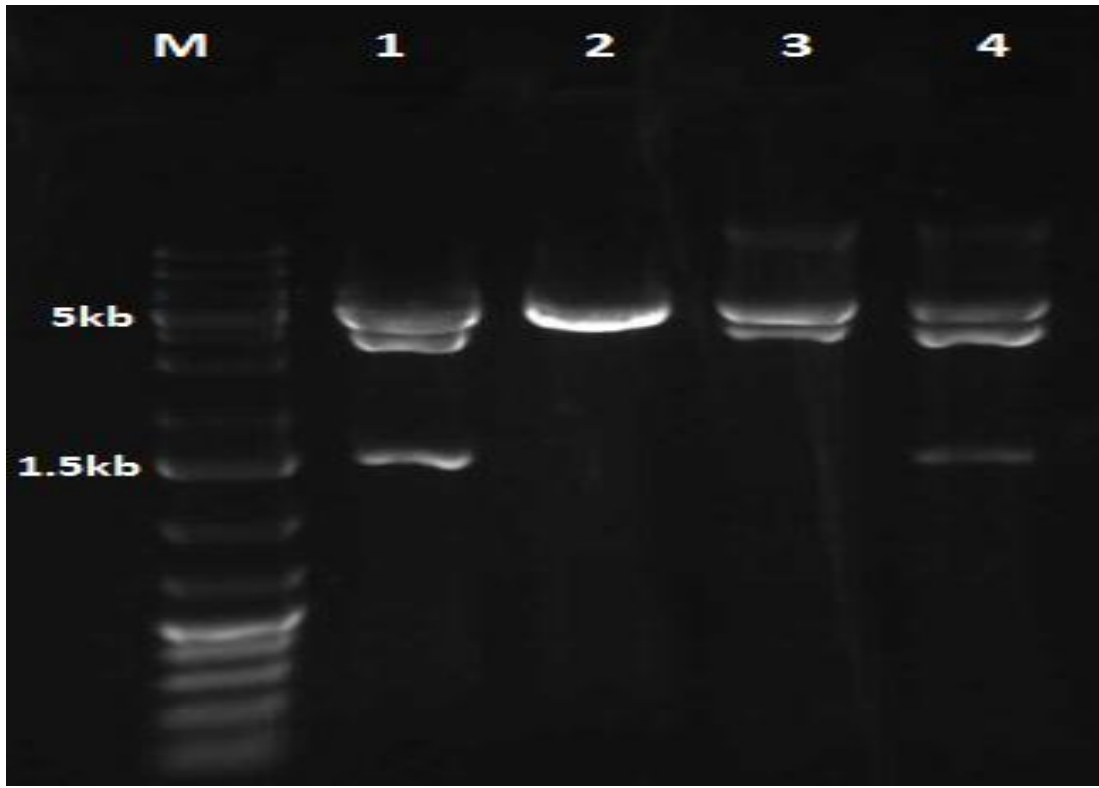


Şekil 3.25 Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 3.26 Rekombinant plazmitin dizileme ile doğrulanması

9. koloniden plazmit izole edilerek restriksiyon kesimi ile klonlamann başarılı olup olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 3.27’de restriksiyon kesim sonucunda gene ait olduğu düşünölen ve yaklaşık 1.5 kb’a karşılık gelen bölgede bantlar olduğu görölmektedir. Bu sonuçlar *DnaJ* klonlu vektörün dizilenmesi ile elde edilen veriler tarafından desteklenmektedir (Şekil 3.26).



Şekil 3.27 Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkilerde sıcaklık, tuzluluk, kimyasal toksitite, oksidatif stres gibi etkenler ciddi tehlikelere sebep olmaktadır. Bu çevresel etkenler dünya çapında %50'ye varan ürün kayıplarına yol açmaktadır. Bitkiler bütün bu olumsuz koşullarla başa çıkabilmek için çeşitli adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Isı şoku proteinleri adı verilen yardımcı moleküller polipeptidlerin özgül fonksiyonel konformasyonlarına kavuşması, yanlış katlanmış proteinlerin degrede edilmesi, hücre içerisine taşınmasının yanı sıra ısı toksik maddeler ile azot ve su eksikliği gibi pek çok abiyotik stres koşullarına karşı hücrel cevabın oluşturulmasında görevlidir [108].

Zeytin (*Olea europaea* L.), odunu ve meyvelerinin yanı sıra, yağından kozmetik sanayi ve tıp başta olmak üzere pek çok endüstriyel alanda faydalanılması sebebiyle yüksek ekonomik değere sahip bir bitki türüdür. Bir tarım ülkesi olan Türkiye'de de Akdeniz ve Ege başta olmak üzere çeşitli bölgelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu nedenle, zeytine 500 - 1000 yıl yaşayabilme yeteneği kazandıran abiyotik stres toleransında rol alan mekanizmanın aydınlatılması oldukça önemlidir.

Isı şoku proteinleri *E. coli* ve mayadan insana prokaryot ve ökaryot pek çok organizmada çalışılmasına rağmen yüksek bitkilerde nispeten sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır.

Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda (daha önce laboratuvarımızda yapılmış olan) kısım "var yılı" cDNA kütüphanesinden elde edilen

ck17 - 90 isimli klonun *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis lyrata* gibi bitkilerdeki *DnaJ* genleriyle yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çeşitli programlar yardımıyla genin sentezlediği proteinin 433 aminoasit uzunluğunda olduğu görülmüştür. Literatürde J - proteinin çeşitli işlevlerinden dolayı hücre içerisinde kloroplast, mitokondri, ER gibi farklı organellerde lokalize olduğu belirtilmiştir [9]. Aminoasit kompozisyonuna bakıldığında serin ve glisin gibi hidrofilik aminoasitlerin yanı sıra lösin ile valin gibi hidrofobik aminoasitlerin nispeten fazla olmasına bağlı olarak iki olasılık ön plana çıkmaktadır. Bunlardan ilki zeytin *DnaJ* proteinin bir membran proteini olabileceğidir. Diğer ihtimal ise bu proteinin hücre içerisinde, hidrofobik aminoasitlerin molekülün merkezinde yerleşmiş kor bölgesini oluşturduğu, hidrofilik aminoasitlerin ise yüzeyde bulunduğu, globüler bir protein olarak davranmasıdır. Nükleotid ve aminoasit dizileri kullanılarak çeşitli programlar yardımıyla gerçekleştirilen analizlerde *DnaJ* proteinin kloroplast stromasında çözülmüş globüler bir protein olabileceği tahmin edilmiştir. *Arabidopsis* ve *Chlamydomonas reinhardtii* gibi organizmalarda yapılan çalışmalarda kloroplast stroma ve tillakoid zarlarında *DnaJ* proteinlerine rastlanması [9, 108], elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Gen bankasından elde edilen farklı bitki türlerine ait J - proteinlerinin aminoasit dizileri hizalandığında kırmızı bayraklarla işaretlenen alanda çinko parmak motifleri görülmektedir (Şekil 3.14). Burada ilginç olan nokta, diğer bitki türlerine ait peptid bağlanma fragmentleri dört adet çinko parmak motifi içerirken zeytin bitkisinde üçüncü çinko parmak motifinin bozulmuş olmasıdır. Bir başka ifade ile diğer bitkilerde 4 adet çinko parmak motifi mevcut iken zeytin J-proteini 3 tane motife sahiptir. Tip I *DnaJ* proteinlerini diğer tiplerden ayıran özellik C - terminal peptid bağlanma fragmentlerinde bulunan çinko parmak motifleridir. Bu nedenle zeytin J - proteininin Tip I grubuna dahil olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bu sonuçlar, zeytin tahmini J - proteinin Hsp70'den farklı şaperon aktivitesine sahip olma ihtimalini düşündürmektedir.

İntron bölgelerinin tespiti amacıyla değişik primer kombinasyonları kullanılarak yapılan PCR sonucunda bu genin toplamda yaklaşık 3 kb büyüklüğünde en az 2 introna sahip olduğu tespit edilmiştir. Genin 5' ucuna yakın bölgede yerleşmiş olan 1 kb büyüklüğündeki intron dizilenmiştir. Fakat 3' uca yaklaşık 1000 nükleotid uzaklıktaki intron ise 2 kb'a yakın olması nedeniyle henüz dizilenememiştir. Ancak zeytin *DnaJ* geninin laboratuvarımızda çalışılan 8 farklı gene kıyasla en büyük intronu içerdiği görülmüştür.

Çalışmaların diğer bir basamağı zeytin çeşitleri arasında polimorfizm olup olmadığını araştırmaktır. 30 farklı çeşitten izole edilmiş gDNA'lardan PCR ile çoğaltılan intron bölgeleri SNP analizlerinde kullanılmıştır. Dizileme sonuçlarına göre 400 bç'lik intron bölgesinde çok sayıda tek nükleotid polimorfizmlerine rastlandı. Özellikle Koroneiki, Samanlı, Edincik Su, Karamürsel Su, Çakır çeşitlerinde SNP'lerin bulunduğu bölgede çok sayıda heterozigot nokta tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda *DnaJ* geninin konstitütif ifadesi, proteininin yüksek oranda korunmuş J - domainin yanı sıra çeşitli uzunluklarda az korunmuş C - terminal domaine sahip olması sebepleri ile prokaryotlarda yakın türleri birbirinden ayırmada 16S'lik rRNA genine alternatif filogenetik markır olarak kullanıldığı bilinmektedir [127]. Bitkiler aleminde ise, çoğunlukla 28, 18 ve 5,8S rRNA genleri arasına yerleşmiş ITS bölgeleri bu amaçla kullanılmaktadır [127]. Zeytinde olduğu gibi genin korunmuş J - domainini kodlayan nükleotidler arasındaki polimorfik intron bölgeleri, bu genin bitkiler aleminde de filogenetik markır olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Fakat bu konuda kesin verilere sahip olmak için daha fazla çeşit üzerinde genin farklı bölgelerine ait detaylı çalışmalar yapılması gereklidir.

Zeytin *DnaJ* geninin dokusal ve zamansal ekspresyon seviyesindeki değişmelere bağlı olarak proteinin fonksiyonu hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla anlık gösterimli PCR alışmaları gerçekleştirilmiştir. 12 ay boyunca “var yılı” ve “yok yılı” ağaçlarına ait yaprak dokularındaki ekspresyon analizlerinde Aralık ve Ocak aylarında gen ifadesinin arttığı gözlenmektedir (şekil 3.20). Isı şoku proteinlerinin sadece ekstrem sıcaklık stresinde değil aynı zamanda su stresi, tuzluluk, soğuk stresi ve oksidatif stres gibi koşullarda da görev aldığı bilinmektedir [9]. Her ne kadar meyvedeki mRNA seviyelerinin çok altında olsa da anlık gösterimli PCR analizlerimiz zeytin *DnaJ* geninin soğuk stresinde daha fazla sentezlendiği sonucunu işaret etmektedir (şekil 3.20). Yaprak, iek, tomurcuk ve sürgün gibi dokularda ise *DnaJ* ifade seviyeleri arasında belirgin bir farklılığa rastlanmazken (şekil 3.21) meyve dokusundaki analizlerde, mRNA seviyesinin çok yüksek olduğu ve meyve olgunlaşması ile *DnaJ* mRNA ifadesi arasında pozitif korelasyon olduğu göze çarpmaktadır. Özellikle kasım ayında toplanmış olgun meyve örneklerinin gen ifadesi oldukça yüksektir (şekil 3.22).

5. KAYNAKLAR

- [1] Bouchez, D. and Höfte, H., "Functional Genomics in Plants", *Plant Physiol.*, **118**, (1998) 725-732.
- [2] Bork, P., Dandekar, T., Diaz-Lazcoz, Y., Eisenhaber, F., Huynen, M., and Yuan, Y., "Predicting Function: From Genes to Genomes", *J. Mol. Biol.*, **283**, (1998) 707-725.
- [3] Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M., "Converging Concepts of Protein Folding in Vitro and in Vivo", *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**, (2009) 574 - 581.
- [4] Reißmann, S., Mechanism of Action of Group II Chaperonins: Impact of the Built-in Lid on the Conformational Cycle, Published PhD Thesis, Stanford University California. (2007).
- [5] Hartl, F.U., "Molecular Chaperones in Cellular Protein Folding", *Nature*, **381**, (1996) 571-9.
- [6] Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M., "Molecular Chaperones in the Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein", *Science*, **295**, (2002) 1852-8.
- [7] Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A., "Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance", *Planta*, **218**, (2003) 1-14.
- [8] Miernyk, J.A., "Protein Folding in the Plant Cell", *Plant Physiology*, **121**, (1999) 695-703.
- [9] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A., "Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response", *Trends in Plant Science*, **9**, (2004) 1360-1385.
- [10] Lindquist, S., "The Heat-Shock Response", *Annual Review of Biochemistry*, **55**, (1986) 1151-1191.

- [11] Hong, S.-W., Lee, U., and Vierling, E., "Arabidopsis Hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures", *Plant Physiology* **132**, (2003) 757-767.
- [12] Frydman, J., "Folding of Newly Translated Proteins in Vivo: The Role of Molecular Chaperones", *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, (2001) 603-647.
- [13] Miernyk, J.A., "The 70 kDa Stress-Related Proteins as Molecular Chaperones", *Trends Plant Sci.*, **2**, (1997) 180-187.
- [14] Bukau, B. and Horwich, A.L., "The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines", *Cell Stress & Chaperones*, **92**, (1998) 351-366.
- [15] Li, J., Qian, X., and Sha, B., "Heat Shock Protein 40: Structural Studies and Their Functional Implications", *Protein Pept. Lett.*, **16**, (2009) 606-612.
- [16] Chena, X., D., E., Oha, H.J., Lee-Yoona, D.S., Liua, X., and Subject, J., "The 170 kDa Glucose Regulated Stress Protein Is a Large Hsp70-, Hsp110-Like Protein of the Endoplasmic Reticulum", *FEBS Lett.*, **380**, (1996) 68-72.
- [17] Hideyukia, M., Takayoshi, K., Hozumia, T., Daib, H., Tokichib, M., and Chikakoa, T., "Isolation and Characterization of Sse1 and Sse2, New Members of the Yeast Hsp70 Multigene Family", *Gene*, **132**, (1993) 57-66.
- [18] Easton, D.P., Kaneko, Y., and Subject, J.R., "The Hsp110 and Grp170 Stress Proteins: Newly Recognized Relatives of the Hsp70s", *Cell Stress Chaperones*, **5**, (2000) 276-290.
- [19] Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., and Subject, J.R., "Identification of a Major Subfamily of Large Hsp70-Like Proteins through the Cloning of the Mammalian 110-kDa Heat Shock Protein", *J. Biol. Chem.*, **270**, (1995) 15725-15733.
- [20] Sung, D.Y., Vierling, E., and Guy, C.L., "Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family", *Plant Physiol.*, **126**, (2001) 789-800.
- [21] May, T. and Soll, J., "14-3-3 Proteins Form a Guidance Complex with Chloroplast Precursor Proteins in Plants", *Plant Cell*, **12**, (2000) 53-64.
- [22] Vierling, E., "The Roles of Heat Shock Proteins in Plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, (1991) 579-620.

- [23] Boston, R.S., Viitanen, P.V., and Vierling, E., "Molecular Chaperones and Protein Folding in Plants", *Plant Mol. Biol.*, **32**, (1996) 191-222.
- [24] Lin, B.-L., Wang, J.-S., Liu, H.-C., Chen, R.-W., Meyer, Y., Barakat, A., and Delseny, M., "Genomic Analysis of the Hsp70 Superfamily in *Arabidopsis Thaliana*", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 201-208.
- [25] Guy, C.L. and Li, Q.B., "The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family", *Plant Cell*, **10**, (1998) 539-556.
- [26] Leborgne-Castel, N., Edith, P.W.M., Doorena, J.-V., Crofts, A.J., and Denecke, J., "Overexpression of Bip in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress", *Plant Cell*, **11**, (1999) 459-470.
- [27] Kaufman, R.J., "Stress Signaling from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: Coordination of Gene Transcriptional and Translational Controls", *Genes Dev.*, **13**, (1999) 1211-1233.
- [28] Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C., and Fontes, E.P.B., "Enhanced Accumulation of Bip in Transgenic Plants Confers Tolerance Towater Stress", *Plant Physiol.*, **126**, (2001) 1042-1054.
- [29] Huang, S., Ratliff, K.S., Schwartz, M.P., Spenner, J.M., and Matouschek, A., "Mitochondrial Unfold Precursor Proteins by Unraveling Themfrom Their N-Termini", *Nat. Struct. Biol.*, **6**, (1999) 1132-1138.
- [30] Aoki, K., Kragler, F., Xoconostle-Cazares, B., and Lucas, W.J., "A Subclass of Plant Heat Shock Cognate 70 Chaperones Carries a Motif That Facilitates Trafficking through Plasmodesmata", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **10**, (2002) 16342-16347.
- [31] Zhang, X.P. and Glaser, E., "Interaction of Plant Mitochondrial and Chloroplast Signal Peptides with the Hsp70 Molecular Chaperone", *Trends Plant Sci.*, **7**, (2002) 14-21.
- [32] Lee, J.H. and Schoffl, F., "An Hsp70 Antisense Gene Affects the Expression of Hsp70/Hsc70, the Regulation of Hsf and the Acquisition of Thermotolerance in Transgenic *Arabidopsis Thaliana*", *Mol. Gen. Genet.*, **252**, (1996) 11-19.

- [33] Kim, B.H. and Schoffl, F., "Interaction between *Arabidopsis* Heat Shock Transcription Factor 1 and 70 kDa Heat Shock Proteins", *J. Exp. Bot.*, **53**, (2002) 371-375.
- [34] Dinga, X.Z., Tsokosa, G.C., and Kiang, J.G., "Overexpression of Hsp-70 Inhibits the Phosphorylation of Hsf1 by Activating Protein Phosphatase and Inhibiting Protein Kinase C Activity", *FASEB J.*, **12**, (1998) 451-459.
- [35] Ranson, N.A., White, H.E., and Saibil, H.R., "Chaperonins", *Biochem. J.*, **333**, (1998) 233-242.
- [36] Gutschea, I., Essena, L.-O., and Baumeister, W., "Group II Chaperonins: New Tric(K)S and Turns of a Protein Folding Machine", *J. Mol. Biol.*, **293**, (1999) 295-312.
- [37] Levy-Rimler, G., Bell, R.E., Ben-Tal, N., and Azem, A., "Type I Chaperonins: Not All Are Created Equal", *FEBS Lett.*, **529**, (2002) 1-5.
- [38] Hill, J.E. and Hemmingsen, S.M., "*Arabidopsis Thaliana* Type I and II Chaperonins", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 190-200.
- [39] Hemmingsen, S.M., Woolford, C., Van Der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and Ellis, J., "Homologous Plant and Bacterial Proteins Chaperone Oligomeric Protein Assembly", *Nature*, **26**, (1988) 330-334.
- [40] Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.J., Zimmerman, J.L., and Goldberg, R.B., "The *Arabidopsis* Embryo Mutant Schlepperless has a Defect in the Chaperonin-60 Gene", *Plant Physiol.*, **126**, (2001) 717-730.
- [41] Zabaleta, E., Oropeza, A., Assad, N., Mandel, A., Salerno, G., and Herrera-Estrella, L., "Antisense Expression of Chaperonin 60b in Transgenic Tobacco Plants Leads to Abnormal Phenotypes and Altered Distribution of Photoassimilates", *Plant J.*, **6**, (1994) 425-432.
- [42] Yamada, A., Sekiguchi, M., Mimura, T., and Ozeki, Y., "The Role of Plant Ccta in Salt- and Osmotic Stress Tolerance", *Plant Cell Physiol.*, **43**, (2002) 1043-1048.
- [43] Young, J.C., Moarefi, I., and Hartl, F.U., "Hsp90: A Specialized but Essential Protein Folding Tool", *J. Cell Biol.*, **154**, (2001) 267-273.
- [44] Buchner, J., "Hsp90 & Co. - a Holding for Folding", *Trends Biochem. Sci.*, **24**, (1999) 136-141.

- [45] Pratta, W.B., Krishnab, P., and Olsen, L.J., "Hsp90-Binding Immunophilins in Plants: The Protein Movers", *Trends Plant Sci.*, **6**, (2001) 54-58.
- [46] Richter, K. and Buchner, J., "Hsp90: Chaperoning Signal Transduction", *J. Cell. Physiol.*, **188**, (2001) 281-290.
- [47] Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S., "Hsp90 as a Capacitor for Phenotypic Variation", *Nature*, **417**, (2002) 618-624.
- [48] Rutherford, S.L. and Lindquist, S., "Hsp90 as a Capacitor for Morphological Evolution", *Nature*, **396**, (1998) 336-342.
- [49] Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K., "The Molecular Chaperone Hsp90 Plays a Role in the Assembly and Maintenance of the 26s Proteasome", *EMBO J.*, **22**, (2003) 3557-3567.
- [50] Krishna, P. and Gloor, G., "The Hsp90 Family of Proteins in *Arabidopsis Thaliana*", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 238-246.
- [51] Milioni, D. and Hatzopoulos, P., "Genomic Organization of Hsp90 Gene Family in *Arabidopsis*", *Plant Mol. Biol.*, **35**, (1997) 955-961.
- [52] Reddy, R.K., Kurek, I., Silverstein, A.M., Chinkers, M., Breiman, A., and Krishna, P., "High-Molecular-Weight Fk506-Binding Proteins are Components of Heat-Shock Protein 90 Heterocomplexes in Wheat Germ Lysate", *Plant Physiol*, **118**, (1998) 1395-1420.
- [53] Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D.R., and Grover, A., "*Arabidopsis thaliana* Hsp100 Proteins: Kith and Kin", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 219-224.
- [54] Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V., "Aaa+: A Class of Chaperone-Like Atpases Associated with the Assembly, Operation and Disassembly of Protein Complexes", *Genome Res.*, **9**, (1999) 27-43.
- [55] Patel, S. and Latterich, M., "The Aaa Team: Related Atpases with Diverse Functions", *Trends Cell Biol.*, **8**, (1998) 65-71.
- [56] Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., and Lindquist, S., "Hsp100/Clp Proteins: A Common Mechanism Explains Diverse Functions", *Trends Biochem. Sci.*, **21**, (1996) 289-296.

- [57] Gotesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Mattick, J.S., Dalrymple, B., Kuramitsu, H., Shiroza, E., Foster, T., Clark, W.P., Ross, B., Squires, C.L. and Maurizi, M.R., "Conservation of the Regulatory Subunit for the Clp Atp-Dependent Protease in Prokaryotes and Eukaryotes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, (1990) 3513-3517.
- [58] Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P.B., Tomoyasu, T., and Bukau, B., "Sequential Mechanism of Solubilization and Refolding of Stable Protein Aggregates by a Bichaperone Network", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, (1999) 13732-13737.
- [59] Goloubinoff, P., Mogk, A., Ben Zvi, A.P., Tomoyasu, T. and Bukau., B., "Sequential Mechanism of Solubilization and Refolding of Stable Protein Aggregates by a Bichaperone Network", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, (1999) 13732-13737.
- [60] Beurona, F., Maurizib, M.R., Belnapa, D.M., Kocsisa, E., Booya, F.P., Kessela, M., and Steven, A.C., "At Sixes and Sevens: Characterization of the Symmetry Mismatch of the Clpap Chaperone-Assisted Protease", *J. Struct. Biol.*, **123**, (1998) 248-259.
- [61] Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D., and Horwich, A.L., "Global Unfolding of a Substrate Protein by the Hsp100 Chaperone Clpa", *Nature*, **401**, (1999) 90-93.
- [62] Keeler, S.J., Boettger, C.M., Haynes, J.G., Kuches, K.A., Johnson, M.M., Thureen, D.L., Keeler, C.L., and Kitto, S.L., "Acquired Thermotolerance and Expression of the Hsp100/Clpb Genes of Lima Bean", *Plant Physiol.*, **123**, (2000) 1121-1132.
- [63] Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermel, S.R., Shinozaki, K., and Clarke, A.K., "Chloroplast and Mitochondrial Proteases in *Arabidopsis*. A Proposed Nomenclature", *Plant Physiol.*, **125**, (2001) 1912-1918.
- [64] Adam, Z. and Clarke, A.K., "Cutting Edge of Chloroplast Proteolysis", *Trends Plant Sci.*, **7**, (2002) 451-456.
- [65] Queitscha, C., Hongb, S.-W., Vierlingb, E., and Lindquist, S., "Heat Stress Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in *Arabidopsis*", *Plant Cell* **12**, (2000) 479-492.
- [66] Waters, E.R., Lee, G.J., and Vierling, E., "Evolution, Structure and Function of the Small Heat Shock Proteins in Plants", *J. Exp. Bot.*, **47**, (1996) 325-338.

- [67] Montfort, R.L.M., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E., "Crystal Structure and Assembly of a Eukaryotic Small Heat Shock Protein", *Nat. Struct. Biol.*, **8**, (2001) 1025-1030.
- [68] Lee, G.J. and Vierling, E., "A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein", *Plant Physiol.*, **122**, (2000) 189-198.
- [69] Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., and Goloubinoff, P., "The Small Heat-Shock Protein Ibpb from *E. Coli* Stabilizes Stress-Denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network", *J. Biol. Chem.*, **273**, (1998) 11032-11037.
- [70] Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E., "A Small Heat Shock Protein Stably Binds Heat-Denatured Model Substrates and Can maintain a Substrate in a Folding Competent State", *EMBO J.*, **16**, (1997) 659-671.
- [71] Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., and Buchner, J., "Binding of Non-Native Protein to Hsp25 During Heat Shock Creates a Reservoir of Folding Intermediates for Reactivation", *EMBO J.*, **16**, (1997) 221-229.
- [72] Reddy, G.B., Das, P.K., Petrash, M.J., and Surewicz, K.W., "Temperature-Dependent Chaperone Activity and Structural Properties of Human Aa- and Ab-Crystallins", *J. Biol. Chem.*, **275**, (2000) 4565-4570.
- [73] Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schönfeld, H.-J., Vierling, E., and Bukau, B., "Refolding of Substrates Bound to Small Hsps Relies on a Disaggregation Reaction Mediated Most Efficiently by Clpb/ Dnak", *J. Biol. Chem.*, **278**, (2003) 31033-31042.
- [74] Scharf, K.-D., Siddique, M., and Vierling, E., "The Expanding Family of *Arabidopsis thaliana* Small Heat Stress Proteins and a New Family of Proteins Containing α -Crystallin Domains (Acid Proteins)", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 225-237.
- [75] Hamilton, E.W. and Heckathorn, S.A., "Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I Is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II Is Protected by Proline and Betaine", *Plant Physiol.*, **126**, (2001) 1266-1274.
- [76] Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., and Bukau, B., "Small Heat Shock Proteins, Clpb and the Dnak System Form a Functional Triade in Reversing Protein Aggregation", *Mol. Microbiol.*, **50**, (2003) 585-595.

- [77] Peres, B.-Z.A. and Goloubinoff, P., "Mechanisms of Disaggregation and Refolding of Stable Protein Aggregates by Molecular Chaperones", *J. Biol. Chem.*, **135**, (2001) 84-93.
- [78] Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A., "Biotechnology of Plant Osmotic Stress Tolerance: Physiological and Molecular Considerations", *Acta Hortic.*, **560**, (2001) 285-292.
- [79] Singer, M.A. and Lindquist, S., "Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding in Vitro and in Vivo", *Mol. Cell*, **1**, (1998) 639-648.
- [80] Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., and Goloubinoff, P., "Chemical Chaperones Regulate Molecularchaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses", *J. Biol. Chem.*, **276**, (2001) 39586-39591.
- [81] Viner, R.I. and Clegg, J.S., "Influence of Trehalose on the Molecular Chaperone Activity of P26, a Small Heat Shock/a-Crystallin Protein", *Cell Stress Chaperones*, **6**, (2001) 126-135.
- [82] Nollen, E.A.A. and Morimoto, R.I., "Chaperoning Signaling Pathways: Molecular Chaperones as Stress-Sensing 'Heat Shock' Proteins", *J. Cell Sci.*, **115**, (2002) 2809-2816.
- [83] Arrigo, A.P., "Small Stress Proteins: Chaperones That Act as Regulators of Intracellular Redox State and Programmed Cell Death", *Biol. Chem.*, **379**, (1998) 19-26.
- [84] Panchuk, I.I., Volkov, R.A., and Schöllf, F., "Heat Stress- and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, **129**, (2002) 838-853.
- [85] Rossel, J.B., Wilson, I.W., and Pogson, B.J., "Global Changes in Gene Expression in Response to High Light in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, **130**, (2002) 1109-1120.
- [86] Caplan, A.J., Cyr, D.M., and Douglas, M.G., "Eukaryotic Homologues of *Escherichia coli* DnaJ: A Diverse Protein Family That Functions with Hsp70 Stress Proteins", *Molecular Biology of the Cell*, **4**, (1993) 555-563.
- [87] Miernyk, J.A., "The J-Domain Proteins of *Arabidopsis thaliana*: An Unexpectedly Large and Diverse Family of Chaperones", *Cell Stress & Chaperones* **6**, (2001) 209-218.

- [88] Liu, C., Willmund, F., Golecki, J.R., Cacaè, S., Heâ, B., Markert, C., and Schroda, M., "The Chloroplast Hsp70b-Cdj2-Cge1 Chaperones Catalyse Assembly and Disassembly of Vipp1 Oligomers in Chlamydomonas", *Plant J* **50**, (2007) 265-277.
- [89] Caplan, A.J., Cyr, D.M., and Douglas, M.G., "Ydj1p Facilitates Polypeptide Translocation across Different Intracellular Membranes by a Conserved Mechanism", *Cell Stress & Chaperones*, **71**, (1992) 1143-1155.
- [90] Cyr, D.M., Langer, T., and Douglas, M.G., "Dnaj-Like Proteins: Molecular Chaperones and Specific Regulators of Hsp70", *Trends Biochem Sci.*, **19**, (1994) 176-181.
- [91] Zhong, T. and Arndt, K.T., "The Yeast Sis1 Protein, a Dnaj Homolog, Is Required for the Initiation of Translation", *Cell Stress & Chaperones*, **73**, (1993) 1175-1186.
- [92] Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D., and Lithgow, T., "The J-Protein Family: Modulating Protein Assembly, Disassembly and Translocation", *EMBO Rep.*, **5**, (2004) 567-571.
- [93] Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S., and Wang, L., "The Diversity of the Dnaj/Hsp40 Family, the Crucial Partners for Hsp70 Chaperones", *Cell Mol Life Sci*, **63**, (2006) 2560-2570.
- [94] Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wuthrich, K., "NMR Structure of the J-Domain and the Gly/Phe-rich Region of the *Escherichia Coli* Dnaj Chaperone", *J. Mol. Biol.*, **260**, (1996) 236-250.
- [95] Qian, Y.Q., Patel, D., Hartl, F.U., and McColl, D.J., "Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of the Human Hsp40 (Hdj-1) J-Domain", *J. Mol. Biol.*, **260**, (1996) 224-235.
- [96] Hill, R.B., Flanagan, J.M., and Prestegard, J.H., "1h and 15n Magnetic Resonance Assignments, Secondary Structure, and Tertiary Fold of *Escherichia Coli* Dnaj(1-78)", *Biochemistry*, **34**, (1995) 5587-5596.
- [97] Mokranjac, D., Bourenkov, G., Hell, K., Neupert, W., and Groll, M., "Structure and Function of Tim14 and Tim16, the J and J-Like Components of the Mitochondrial Protein Import Motor", *Embo J* **25**, (2006) 4675-4685.
- [98] Jiang, J., Taylor, A.B., Prasad, K., Ishikawa-Brush, Y., Hart, P.J., and Lafer, E.M., "Sousa, R. Structure-Function Analysis of the Auxilin J-Domain

- Reveals an Extended Hsc70 Interaction Interface", *Biochemistry*, **42**, (2003) 5748-5753.
- [99] Cupp, J.R. and Vickery, L.E., "Crystal Structure of Hsc20, a J-Type Co-Chaperone from *Escherichia coli*", *J. Mol. Biol.*, **304**, (2000) 835-845.
- [100] Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L., "Not All J Domains Are Created Equal: Implications for the Specificity of Hsp40-Hsp70 Interactions", *Protein Sci*, **14**, (2005) 1697-1709.
- [101] Tsai, J. and Douglas, M.G., "A Conserved Hpd Sequence of the J-Domain Is Necessary for Ydj1 Stimulation of Hsp70 ATPase Activity at a Site Distinct from Substrate Binding", *J. Biol. Chem.*, **271**, (1996) 9347-9354.
- [102] Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., and Hartl, F.U., "Successive Action of DnaK, DnaJ and GroEL Along the Pathway of Chaperone-Mediated Protein Folding", *Nature*, **356**, (1992) 683-689.
- [103] Sha, B., Lee, S., and Cyr, D.M., "The Crystal Structure of the Peptide-Binding Fragment from the Yeast Hsp40 Protein Sis1", *Structure Fold Des.*, **8**, (2000) 799-807.
- [104] Li, J., Qian, X., and Sha, B., "The Crystal Structure of the Yeast Hsp40 Ydj1 Complexed with Its Peptide Substrate", *Structure (Camb)* **11**, (2003) 1475-1483.
- [105] Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U., "Hsp70 and Hsp40 Chaperones can Inhibit Self-Assembly of Polyglutamine Proteins into Amyloid-Like Fibrils", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, (2000) 7841-7846.
- [106] Hu, J., Wu, Y., Li, J., Qian, X., Fu, Z., and Sha, B., "The Crystal Structure of the Putative Peptide-Binding Fragment from the Human Hsp40 Protein Hdj1", *BMC Struct Biol*, **8**, (2008) 3.
- [107] Li, J. and Sha, B., "Structure-Based Mutagenesis Studies of the Peptide Substrate Binding Fragment of Type I Heat-Shock Protein 40", *Biochem. J.*, **386**, (2005) 453-460.
- [108] Dorn, K.V., Willmund, F., Schwarz, C., Henselmann, C., Pohl, T., Hess, B., Veyel, D., Usadel, B., Friedrich, T., Nickelsen, J., and Schroda, M., "Chloroplast DnaJ-Like Proteins 3 and 4 (Cdj3/4) from *Chlamydomonas reinhardtii* Contain Redox-Active Fe-S Clusters and Interact with Stromal Hsp70b", *Biochemistry Journal* **427**, (2010) 205-215.

- [109] Mayer, M.P. and Bukau, B., "Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism", *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, (2005) 670-684.
- [110] Wittung-Stafshede, P., Guidry, J., Horne, B.E., and Landry, S.J., "The J-Domain of Hsp40 Couples Atp Hydrolysis to Substrate Capture in Hsp70", *Biochemistry*, **42**, (2003) 4937-4944.
- [111] Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A., "Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone Dnak", *Science*, **272**, (1996) 1606-1614.
- [112] Harrison, C., "GrpE, a Nucleotide Exchange Factor for Dnak. ", *Cell Stress Chaperones*, **8**, (2003) 218-224.
- [113] Qian, X., Hou, W., Zhengang, L., and Sha, B., "Direct Interactions between Molecular Chaperones Heat-Shock Protein (Hsp) 70 and Hsp40: Yeast Hsp70 Ssa1 Binds the Extreme C-Terminal Region of Yeast Hsp40 Sis1", *Biochem J.*, **361**, (2002) 27-34.
- [114] Li, J., Qian, X. and Sha, B., "Heat Shock Protein 40: Structural Studies and Their Functional Implications", *Protein Pept Lett.*, **16**, (2009) 606-612.
- [115] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J., "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol. Biol.*, **215**, (1990) 403-410.
- [116] Hall, T.A., "Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt", *In Nucl. Acids Symp Ser*, **41**, (1999) 95-98.
- [117] Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., and Bryant, S.H., "Cdd: A Conserved Domain Database for Protein Classification", *Nucleic Acids Res.*, **33**, (2005) 192-196.
- [118] Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C., and Parsons, R., "Germline Mutations of the Pten Gene in Cowden Disease, an Inherited Breast and Thyroid Cancer Syndrome", *Nat Genet.*, **16**, (1997) 64-7.
- [119] Lee, J.H., Yang, H., Georgescu, M.M., Di, C.A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P., "Crystal Structure of the Pten

Tumor Suppressor: Implications for Its Phosphoinositide Phosphatase Activity and Membrane Association", *Cell*, **99**, (1999) 323-34.

- [120] Di, C.A. and Pandolfi, P.P., "The Multiple Roles of Pten in Tumor Suppression", *Cell*, **100**, (2000) 387-90.
- [121] SwoVord, D.L., "Paup* 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)", *In Sinauer Associates, Sunderland*, (2001)
- [122] Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C., "Predotar: A Tool for Rapidly Screening Proteomes for N-Terminal Targeting Sequences", *Proteomics*, **4**, (2004) 1581-1590.
- [123] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and Heijne, G., "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence", *J. Mol. Biol.*, **300**, (2000) 1005-1016.
- [124] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., "Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins", *Bioinformatics*, **14**, (1998) 378-9.
- [125] <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, (06.07.2011).
- [126] Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., "**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**", New York. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
- [127] Ana Alexandre, Marta Laranjo, J. Peter W. Young, and Oliveira., S., "Dnaj Is a Useful Phylogenetic Marker for Alphaproteobacteria", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, (2008) 2839-2849.