

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

**ZEYTİN TAHMİNİ bZIP TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gamze YENER**

**Balıkesir, Eylül-2011**

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

ZEYTİN TAHMİNİ bZIP TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze YENER

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 09 / 09 / 2011

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

Yrd. Doç. Dr. Sakin Vural VARLI (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. İsmet BAŞARAN (BAÜ)

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

Balıkesir, Eylül- 2011

Bu tez çalışması TUBİTAK tarafından 110O108 nolu proje ile desteklenmektedir.

## ÖZET

### ZEYTİN TAHMİNİ bZIP TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYON

Gamze YENER

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada zeytin (*Olea europaea* L.) meyveli yapraklarına ait cDNA kütüphanesinden izole edilen bir cDNA molekülünün analizinin yapılması hedeflenmiştir. NCBI veri tabanından yararlanılarak bu cDNA'nın pirinç, soya fasulyesi, biber, tütün, havuç gibi bitkilerde bZIP (bazik lörin fermuarı) transkripsiyon faktörüyle yüksek benzeşme gösterdiği tespit edilmiştir ve zeytin tahmini bZIP (ztbZIP) geni adı verilmiştir.

Plazmit insertlerinin dizilenmesi sonucu elde edilen dijital dosyalar BioEdit, FinchTV gibi programlarla analiz edilmiştir. Bu tahmini genin zeytinin farklı dönemlere ait dokularındaki sentezlenme durumu (ekspresyon profili), intron sayısı ve intron uzunluklarını tespit etmek için PCR primerleri tasarlanmıştır. Promotör bölgesinin dizisini çıkarmak amacıyla da TAIL-PCR primerleri tasarlanmıştır. Klonlama için gerekli olan ekspresyon primerleri dizayn edilmiştir.

BioEdit programıyla nükleotit kompozisyonunun analizi sonucu 780 nükleotit uzunluğunda mRNA'ya sahip olduğu bulunmuştur. Aminoasit kompozisyonunun analizinde ise 149 aminoasit kodladığı ve 16609.51 Dalton olduğu, serin, arjinin ve lizin aminoasit oranının yüksek olduğu halde sistein aminoasitinin hiç bulunmadığı tespit edilmiştir. Polimorfizm tespiti için 18 farklı zeytin bitkisinin DNA'larıyla PCR yapılmıştır. Çakır ve Memecik çeşitlerinin 141. nükleotidlerinde tek nükleotid değişikliğine rastlanmıştır. İtron analizi çalışması sonucu ztbZIP geninde introna rastlanmamıştır. Tahmini promotör bölgesinde yaklaşık 500 nükleotid tespit edilmiştir. Enzim aktivite ölçümünün ilk aşaması olarak gen pPICZαC ekspresyon vektörüne klonlanmıştır.

Bu çalışmayla zeytinde bulunan bZIP geninin moleküler analizi ilk kez yapılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin/ bZIP transkripsiyon faktörü/ intron analizi/ promotör/ polimorfizm/ biyoinformatik analiz.

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIVE PUTATIVE bZIP TRANSCRIPTION FACTOR**

**Gamze YENER**

**Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology**

**(M.Sc. Thesis / Advisor: Assist. Prof. Dr. Ekrem DÜNDAR)**

**Balikesir-Turkey-2011**

In this study, a cDNA molecule isolated from fruited olive (*Olea europaea* L.) leaves has been analyzed. BLAST analysis of the cDNA sequence in NCBI databases revealed it has homology to bZIP (basic leucine zipper) gene of rice, soy bean, pepper, tobacco and carrot. Therefore the cDNA has been named putative olive bZIP (ztbZIP) gene.

Plasmid insert sequences were obtained in digital format and analysed using programs such as BioEdit and FinchTV. Spatial and temporal expression patterns of ztbZIP were determined using real – time PCR. The number of introns and intron lengths were determined using PCR primers designed for that purpose. Part of the putative promoter region was determined using TAIL-PCR. Cloning primers to transfer ztbZIP into an expression vector were also designed.

Analysis with BioEdit program revealed ztbZIP codes 149 amino acids, it is 16609.51 Daltons, and it contains high rate of arginine, serine and lysine but no cysteine. Polymorphism analysis using 18 different olive cultivars revealed only two varieties (Cakir and Memecik) had single nucleotide polymorphisms. Intron analysis revealed ztbZIP had no introns. About 500 nucleotide long region of the putative promoter has been sequenced. The first phase of the measurement of enzyme activity of the putative gene (cloning into expression vector pPICZ $\alpha$ C) was carried out.

In this study, molecular characterization of olive putative bZIP gene was conducted for the first time.

**KEYWORDS:** Olive/ bZIP transcription factor/ intron analysis/ promoter/ polymorphism/ bioinformatic analysis.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ANAHTAR KELİMELER</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>KEYWORDS</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Transkripsiyon Faktörleri.....	<b>2</b>
1.1.1 Ökaryotik Transkripsiyon Faktörleri.....	<b>2</b>
1.1.1.1 Heliks-Dönüş-Heliks Domeni .....	<b>3</b>
1.1.1.2 Çinko Parmak Domeni .....	<b>4</b>
1.1.1.3 Bazik Lösin Fermuar Domeni .....	<b>6</b>
1.1.1.3.1 Bazik Domen.....	<b>7</b>
1.1.1.3.2 Dimerizasyon Domenleri .....	<b>7</b>
1.1.1.3.2.1 Lösin Fermuarı .....	<b>7</b>
1.1.1.3.2.2 Heliks-İlmek-Heliks Domeni (HLH) .....	<b>7</b>
1.2 bZIP Transkripsiyon Faktörünün Sınıflandırılması .....	<b>8</b>
1.3 bZIP Transkripsiyon Faktörünün Yeşil Bitkilerdeki Rolü.....	<b>11</b>

1.4 bZIP G-kutusu ve C-kutusu .....	11
1.5 bZIP'in DNA Bağlama bölgesindeki Serin Rezidülerinin Rolü .....	12
<b>2. MATERYAL-METOD .....</b>	<b>14</b>
2.1 Genin Biyoinformatik Analizi .....	14
2.1.1 NCBI Veri Bankasında Genin BLAST Analizi .....	14
2.1.2 bZIP Geninin Açık Okuma Çerçevesinin Belirlenmesi .....	17
2.1.3 Nükleotid ve Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması.....	18
2.1.4 Bazik Domen ve Lösin Fermuar Domeninin Belirlenmesi.....	19
2.2 İtron Analizi.....	19
2.2.1 Primerlerin Dizayn Edilmesi.....	20
2.2.2 Primerler İçin Çalışma Solüsyonu Hazırlanması .....	21
2.2.3 Genomik DNA İzolasyonu.....	21
2.2.4 PCR Bileşenlerinin Hazırlanması ve PCR Döngüleri.....	23
2.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi .....	24
2.3 bZIP Transkripsiyon Faktörünün Promotör Analizi .....	25
2.3.1 Thermal Asymmetric InterLaced PCR (TAIL-PCR) için Primerler .....	25
2.3.2 TAIL-PCR Döngüleri ve Bileşenleri .....	26
2.4 Polimorfizm Analizi.....	29
2.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	30
2.5.1 RNA İzolasyonu.....	31
2.5.2 Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	33
2.5.3 Real-Time PCR.....	33
2.5.3.1 Real-Time PCR Plate'inin Hazırlanması .....	34
2.6 ZtbZIP'in <i>Pichia</i> Ekspresyon Vektörüne Klonlanması .....	34
2.6.1 cDNA'nın Çoğaltılması .....	34
2.6.2 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	35
2.6.3 Ekspresyon Primerlerinin Dizaynı .....	36
2.6.4 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim .....	37
2.6.5 Ligasyon.....	37

2.6.6 Transformasyon .....	37
2.6.7 Zeozin ve LB Besiyerinin Hazırlanması .....	38
2.6.8 Kompetan Hücre Hazırlanması .....	39
2.6.9 Koloni Tarama .....	40
2.6.10 Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu .....	41
2.6.11 Klonlamanın Kontrolü .....	42
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>43</b>
3.1 Tahmini ZtbZIP Transkripsiyon Faktörünün Biyoinformatik Analizi .....	43
3.1.1 NCBI Veri Bankasında Genin BLAST Analizi .....	43
3.1.2 bZIP Geninin Açık Okuma Çerçevesinin Belirlenmesi .....	43
3.1.3 Nükleotid ve Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması .....	45
3.1.4 Bazik Domen ve Lösin Fermuar Domeninin Belirlenmesi .....	47
3.2 İntron Analizi .....	48
3.3 ZtbZIP Transkripsiyon Faktörünün Promotör Analizi .....	49
3.4 Polimorfizm Analizi .....	50
3.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Verileri .....	52
3.6 ZtbZIP'in <i>Pichia</i> Ekspresyon Vektörüne Klonlanmasının Verileri .....	53
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>55</b>
<b>KAYNAKÇA</b> .....	<b>58</b>

## KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
<b>AFLP</b>	Amplifiye parça uzunluk polimorfizmi
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	Baz çifti
<b>bZIP</b>	Bazik lösün fermuarı
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosid trifosfat
<b>DEPC</b>	Dietilpirokarbonat
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EtBr</b>	Etidyum bromür
<b>gDNA</b>	Genomik DNA
<b>Kb</b>	Kilo baz
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>RAPD</b>	Rastgele arttırılmış polimorfik DNA
<b>SNP</b>	Tek nükleotid değişikliği
<b>SSR</b>	Basit tekrarlı dizi
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris borat etilendiamintetraasetikasit
<b>TE</b>	Tris-EDTA

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1	Heliks-dönüş-heliks yapıları.....	4
Şekil 1.2	Sistein ve histidin amino asitlerine Zn atomunun bağlı olduğu bir çinko parmak yapısı.....	5
Şekil 1.3	bZIP proteininin bazik domen dimeri ve lösin fermuarı .....	6
Şekil 2.1	NCBI Ana Sayfa Sağ Menü .....	15
Şekil 2.2	NCBI BLAST ile Genin Analiz Sayfası .....	15
Şekil 2.3	Genin NCBI BLAST sonuç sayfası .....	16
Şekil 2.4	BioEdit programında ORF'un bulunması için yapılan işlem sırası.....	17
Şekil 2.5	BioEdit programında nükleotid kompozisyonunu bulmak için yapılan işlem sırası.....	18
Şekil 2.6	bZIP geninin amino asit kompozisyonunu bulmak için yapılan işlem sırası.....	19
Şekil 2.7	Primer dizayn ederken izlenen basamaklar.....	20
Şekil 2.8	TAIL primerleri ve AD primerin şekilsel gösterimi.....	26
Şekil 2.9	Kramotogramların sağlamlığının kontrolünün yapıldığı FinchTV programı.....	30
Şekil 2.10	On iki ay boyunca örnek toplanan var ve yok yılına ait zeytin ağaçları.....	31
Şekil 2.11	pPICZαC vektörü dizisi üzerindeki ZtbZIP ile uyumlu restriksiyon enzimleri... 36	
Şekil 3.1	Genin NCBI veri tabanı sonucu tahmini bZIP transkripsiyon faktörüyle benzeşmesi.....	44
Şekil 3.2	ZtbZIP transkripsiyon faktörüne ait ORF.....	44
Şekil 3.3	ZtbZIP nükleotid dizisinin başlangıç ve sonlanma kodonlarının yerleri.....	45
Şekil 3.4	ZtbZIP'in BioEdit programında nükleotid kompozisyonun yüzde değerleri.....	46
Şekil 3.5	ZtbZIP'in BioEdit programında amino asit kompozisyonunun yüzde değerleri... 46	
Şekil 3.6	ZtbZIP transkripsiyon faktörünün bazik ve lösin fermuar bölgeleri.....	47

Şekil 3.7 Bazik bölgede bulunan kuvvetli bazik amino asitler ve serin rezidülerinin dizi üzerindeki yerleri.....	47
Şekil 3.8 ZtbZIP'in gDNA ve cDNA'sına ait jel görüntüsü.....	48
Şekil 3.9 ZtbZIP'in BioEdit programında gDNA ve cDNA dizilerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 3.10 ZtbZIP geninin promotör analizi için yapılan Tail-3 PCR ürünlerinin jel görüntüleri.....	49
Şekil 3.11 Promotöre ait 520 nükleotidlik bölge ve C-kutusu.....	49
Şekil 3.12 Zeytin tahmini bZIP (ztbZIP) geninin bazı zeytin çeşitlerinin genomik DNA örneklerinden PCR ile çoğaltılması.....	50
Şekil 3.13 Çakır ve Memecik'teki SNP.....	51
Şekil 3.14 Çakır ve Memecik'in FinchTV'de kromatogram kontrolü.....	51
Şekil 3.15 Çakır ve Memecik'teki SNP'nin amino asit değişikliği gerçekleştirilmesi.....	52
Şekil 3.16 Zeytin dokusal örneklerinin ekspresyon oran grafiği.....	52
Şekil 3.17 Zeytin yapraklarının 12 aya ait var ve yok yılı örneklerinin ekspresyon oran grafiği.....	53
Şekil 3.18 Genin ekspresyon vektörüne klonlama aşamaları ve transformasyon sonuçları.....	54
Şekil 3.19 Koloni tarama sonucunu jel görüntüsü, kromatogramdaki piklerin sağlamlığı ve koloni dizisiyle ZtbZIP dizisinin karşılaştırılmış hali.....	54

## TABLO LİSTESİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Adı</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1.1	bZIP transkripsiyon faktörlerinin sınıflandırılması .....	8
Tablo 2.1	Primer Çalışma Solüsyonu Hazırlama .....	21
Tablo 2.2	PCR Koşulları .....	23
Tablo 2.3	PCR Reaksiyon Karışımı ve Bileşenlerin Yoğunlukları .....	24
Tablo 2.4	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri .....	25
Tablo 2.5	TAIL-PCR Primerleri ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması .....	26
Tablo 2.6	TAIL PCR Döngü Koşulları .....	27
Tablo 2.7	Tail PCR Reaksiyon Karışımları .....	28
Tablo 2.8	Var ve yok yılı örneklerin toplanma tarihi ve hava durumu .....	32
Tablo 2.9	Real Time PCR’da Kullanılan Primerler .....	33
Tablo 2.10	Real Time PCR Döngü Koşulları .....	34
Tablo 2.11	LB Besiyerlerinin Hazırlanması .....	38
Tablo 2.12	Koloni PCR Koşulları .....	40
Tablo 2.13	Koloni PCR Karışımı .....	41
Tablo 2.14	AOX Primerleri .....	41

## ÖNSÖZ

Büyük bir heyecanla başladığım yüksek lisans çalışmamı bitirmenin verdiği mutluluktan öte, bilimin içinde yer alabilmenin ve bilime bir şeyler katabilmenin sevinci içerisindeyim. Yüksek lisans sadece bilimsel anlamda değil, hayata dair bakış açımın da değişmesini sağladı. Keşke yapmasaydım yerine iyi ki yapmışım diyorum.

Çalışmalarım boyunca verdiği bilimsel bilgilerden, her türlü sorunumuzla ilgilenebilmek için kendi vaktini bizlere ayırmasından, faydalı birer birey olabilmemiz için bizleri yüreklendirmesinden dolayı kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum danışman hocam Yrd. Doç Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Ders aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Doç. Dr. Yusuf TURAN ve Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a,

Çalışmalarımızda yardımlarını bizlerden esirgemeyen, laboratuvar ekibi Arş Gör. Görkem Deniz SÖNMEZ, Öznur SUAKAR, Şakir AKGÜN ve dönem arkadaşlarım olan Gülçin ÇETİN, Şenay SÜNGÜ ve Zeynep KARABAŞ'a,

Fakültede ve dışında her türlü sıkıntımızda, sevincimizde beraber olduğumuz canım arkadaşım Müslime YAVUZ'a,

Toplanan zeytin örneklerinin -80 °C dolabına getirilmesine kadar geçen süre içinde örnekleri nukleazlardan korumak için kullanılan sıvı azotu temin etmemizi sağlayan ve bizleri her zaman güler yüzle karşılayan 'Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği' kurumunun müdürü/ müdür yardımcısı Hasan DERTLİ/ Mustafa YILDIRIM'a,

Benim bugünlere gelmemin tek sebebi olan, maddi ve manevi desteklerini her an hissettiğim canım annem ve canım babam'a ,

Agucuklarıyla, gülüşleriyle tez yazma aşamasındaki sıkıntılarımı unutturan biricik yiğenim Hüma Beren'e,

Destegi ni hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan müstakbel eşim Ahmet ŞAHAN'a,

**Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.**

**Balıkesir, 2011**

**Gamze YENER**

## 1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europae* L.) Oleaceae familyasından bir meyve ağacıdır. Zeytinin yağından, meyvesinden ve odunundan çok eski zamanlardan beri yararlanılmaktadır. Ekonomik verime uzun sürede ulaşan, uzun ömürlü bir bitkidir. Zeytin ağaçlarından en fazla verim yazların sıcak, kışların ılıman olduğu iklimde alınmaktadır. Diğer bitkilerle karşılaştırıldığında kuraklık ve tuz stresine karşı oldukça dayanıklıdır.

Zeytin, genetiğinden gelen özelliği nedeniyle alternans (bir yıl çok ürün, bir yıl az ürün) göstermektedir [1]. Buna 'var yılı yok yılı döngüsü' de denilmektedir. Bu döngü üretimde iniş-çıkışlara neden olmaktadır. Yok yıllarının genel kuraklığa ve elverişsiz hava koşullarına rastladığı yıllarda zeytin üretimindeki düşüş daha belirgin olmaktadır.

Türkiye, zeytin için gen merkezlerinden biridir [2]. Zeytin, tüm ülke çapında geniş yayılış gösteren çeşitliliğe sahiptir. Ancak, bu çeşitlerin belirlenmesi fenotipik karakterlerine göre yapılmıştır. Yanlış sınıflandırmaların üstesinden gelebilmek için son yıllarda genetik karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır. RAPD, AFLP, SSR ve SNP gibi güncel moleküler yöntemlerle çeşit içi ve çeşitler arası varyasyonların değerlendirilmesiyle; gerçek çeşit sayıları tespit edilebilmektedir [3].

Ülkemizde son dönemde alt yapıda sağlanan gelişmelerle, laboratuvar düzeyinde ileri moleküler tekniklerin uygulanma imkânlarının sağlanması, genetik ve ıslah çalışmalarına yeni ve teknolojik bir boyut kazandırmıştır. Bitki ıslahının en önemli ilkesi yüksek verimli, abiyotik (tuzluluk, kuraklık, sıcaklık gibi) ve biyotik (fungal ve bakterial) stres faktörlerine karşı dayanıklı, istikrarlı bitki çeşitlerinin geliştirilmesidir. Oldukça uzun zaman, para ve iş gücü gerektiren bu ıslah çalışmaları, değişen ekolojik şartlar ve tüketici istekleri nedeni ile süreklilik gösterir.

Çevresel koşullardan etkilenmeyen genotipik özellikleri bilinen bitkiler ile ıslah çalışmalarının yapılması, günümüz modern moleküler tekniklerin kullanımını ile mümkün olmakta ve kaçınılmaz hale gelmektedir.

## **1.1 Transkripsiyon Faktörleri**

Transkripsiyon faktörleri DNA'daki genetik bilginin okunup ifade edilmesinde görev alan protein gruplarından biridir. Bunlar diziyeye özgün DNA bağlanma proteini olarak da adlandırılırlar [4,5]. DNA'ya bağlanırlar ve gen transkripsiyonunun artması veya azalmasına yol açarlar. Transkripsiyon faktörleri tek başına veya bir komplekste yer alan başka proteinlerle beraber, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonunu ya (bir aktivatör olarak) kolaylaştırırlar veya (bir repressör olarak) engellerler [6-8]. Bu bakımdan pek çok önemli hücrenel süreçte hayati bir konuma sahiptirler.

### **1.1.1 Ökaryotik Transkripsiyon Faktörleri**

Prokaryot ve ökaryot hücreler metabolik faaliyetlerini çeşitli mekanizmalar aracılığı ile düzenleyebilmektedirler. Düzenleyici mekanizmalar, etkilerini genelde gen faaliyeti üzerinde göstermekte olup bu etkilerde birçok protein anahtar rolü oynamaktadır. Gen faaliyeti esasen transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir. Bilindiği gibi prokaryotlarda birçok gen operon adı verilen birimlerde kümelenmiştir. Operonlardaki genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesi, aktivatör proteinler tarafından aktifleştirmek, repressör proteinler tarafından ise engellenmek suretiyle sağlanmaktadır [9]. Ökaryotlardaki gen faaliyeti de çoğunlukla transkripsiyon düzeyinde kontrol edilmektedir [10,11]. Ancak ökaryot kromozomları prokaryot kromozomlarına göre hem daha büyük bir yapıya hem de daha yüksek bir yapısal organizasyon derecesine sahiptirler. Maya, meyve sineği ve insan genomu, *Escherichia coli* genomuna göre sırasıyla 4, 40 ve 1000 misli daha fazla DNA içermektedir. Bu fazlalık ökaryotlara, prokaryotlarda bulunmayan potansiyeller kazandırdığı gibi bunlardaki replikasyon ve gen faaliyeti olaylarına da

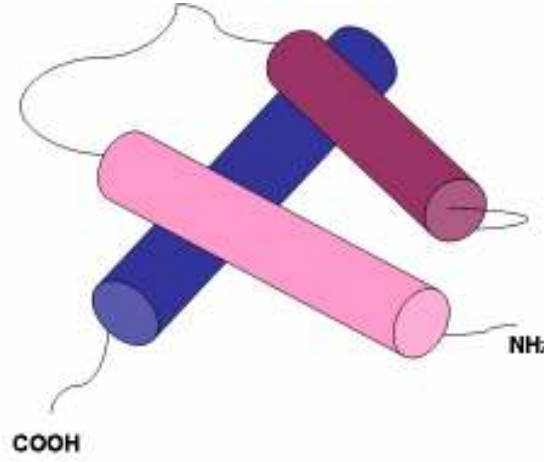
yeni boyutlar getirmiştir [10,12,13]. Ökaryot kromozomlarındaki bazı özel genlerin faaliyeti, transkripsiyon faktörlerine bağlıdır. Örneğin 5S ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonu, DNA'daki oluklara uyan ve çoklu metal bağlayıcı uzantılara sahip proteinlerin promotör bölgesine bağlanmasına bağlıdır [14,15].

Gen faaliyetlerinin kontrolünde rol oynayan proteinlerin aktifliği allosterik değişimler ve tersinir kovalent etkileşimler ile kontrol edilmektedir. Bu proteinler DNA'yı büyük ölçüde diğer proteinleri tanıdıkları gibi tanımaktadırlar. Bunlar öncelikle etkileşecekleri yüzey ile uygunluk gösteren bir üçüncül yapı oluşturmakta ve daha sonra geniş bir yüzeyde çok sayıda atomik etkileşimi sağlayabilecek yakınlıktaki bir mesafeye ulaşmaktadırlar [13,16]. Protein ve DNA'nın birbirini tanması, bir proteinin diğer proteini tanmasında olduğu gibi hidrojen bağları, iyonik ve hidrofob etkileşimler aracılığı ile olmaktadır [17]. Protein ve DNA arasındaki etkileşimin spesifikliğı ile ilgili problemler, büyük ölçüde X ışını kırınımı çalışmaları ile çözümlenmiştir. Bu çalışmalar, proteinlerin DNA'yı ortak yapısal motifler aracılığı ile tanıdıklarını ve bu tanımada simetrik bir uygunluğun da sözkonusu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Gerek prokaryotlar gerekse ökaryotlarda transkripsiyonu düzenleyen proteinlerde saptanan ortak yapısal motifler heliks–dönüş–heliks, çinko parmağı ve lösin fermuarı olmak üzere üç grup altında toplanabilir [18-20]. Bu faktörler transkripsiyonun etkinliğini artırır. Genlerin ne zaman ve nerede ifade olacağını ve transkripsiyonun hızını kontrol ederler. Bunlara gerçek aktivatör transkripsiyon faktörleri de denir. Bunlar en az iki işlevsel bölgesi olan proteinlerdir. DNA'ya bağlanma bölgeleri enhansırda bulunan özgül DNA dizisine bağlanır. Diğer bölgesi ise RNA polimeraza ya da promotordaki diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanır. Bu sınıflandırma henüz son sınıflandırma değildir ve şüphesiz ki yeni faktörler ortaya çıkarıldıkça yeni gruplar oluşacaktır.

#### **1.1.1.1 Heliks-Dönüş-Heliks Domeni**

Bu domen, homeokutusu adı verilen sekans tarafından şifrelenen 60 amino asit homeodomeni içeren tipik bir DNA-bağlanma proteindir. *Drosophila Antennapedia* transkripsiyon faktöründeki bu domen, heliks II ve III'ün birbirine dik açıda ve birbirinden karakteristik  $\beta$ -dönüşü ile ayrılan dört  $\alpha$ -heliksten meydana

gelmiştir (Şekil 1.1). Tipik heliks-dönüş-heliks  $\lambda$  fajı cro baskılayıcısı gibi bakteriyofaj DNA bağlanma proteinlerinde, lac ve trp baskılayıcılarında ve cAMP represör proteininde bulunmaktadır. Tanıyıcı heliks olarak bilinen bir heliks, DNA'nın büyük oluğuna bir parçasını uzatır ve DNA ile temas kurar, dolayısıyla domen bağlanır. İki homeodomen faktörünün tanıma heliksleri değiştirilebilir. Bu, bunların DNA bağlanma özgüllüklerinin yer değiştirmesine neden olur. Aslında, bu ilişkinin özgünlüğü sadece bir amino asit değişiminin DNA-bağlanma özgüllüklerini değiştirmesi ile gösterilmiştir [21].

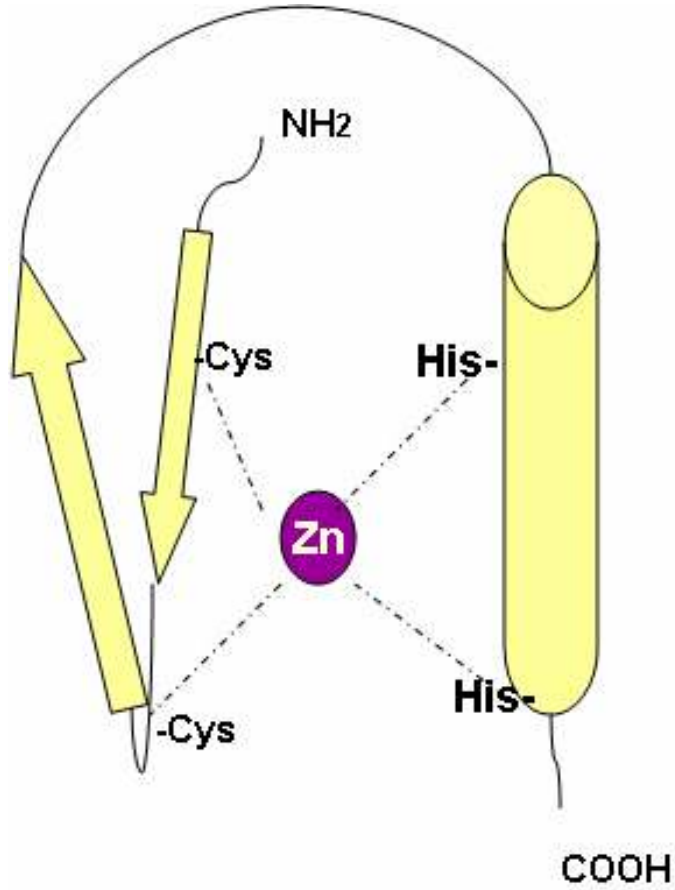


**Şekil 1.1** Heliks-dönüş-heliks yapısı. (referans [22] 'den esinlenilmiştir.)  
(proteininin  $\alpha$ -sarmal yapılarının oluşturduğu üç düzlem)

#### 1.1.1.2 Çinko Parmak Domeni

Ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin yapısal bakımdan ana ailesini oluşturan çinko parmaklar, gen regülasyonuna pek çok yönden katılırlar. Bu domen iki formda bulunur. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak, bir çinko iyonunu tetrahedral olarak koordine eden iki sistein ve iki histidin tarafından sabitlenmiş on iki amino asitlik bir ilmeğe sahiptir [21]. Bu motif, iki  $\beta$  zincirinin ve DNA'nın büyük oluğuna bağlanan bir  $\alpha$ -heliksin sıkışmasıyla yoğun bir yapıya katlanır.  $\alpha$ -helikal bölge, DNA ile temas kurma görevi yapan korunmuş bazik amino asitler içerir (Şekil 1.2). Bu yapı, RNA Pol III transkripsiyon faktörü TFIIIA'da dokuz defa tekrar eder. Aynı zamanda

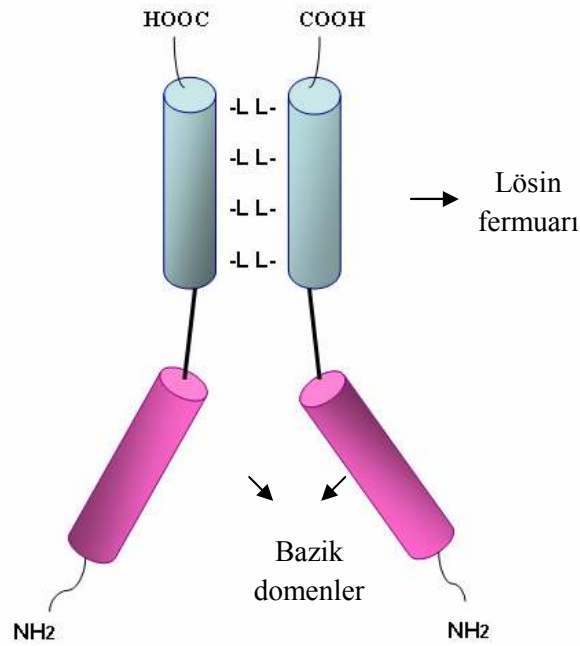
transkripsiyon faktör SP1 yapısında da bulunur. Genellikle DNA'ya bağlanmak için üç ve ya daha fazla C2H2 çinko parmaklara ihtiyaç duyulur. Çinko iyonunun dört sistein tarafından koordine edildiği bir başka motif, yüzden fazla steroid hormon reseptörü transkripsiyon faktöründe meydana gelir. Bu faktörler, her monomerin iki C4 'çinko parmak' motifi bulundurduğu homo- veya hetero- dimerlerden meydana gelir. Bu iki motifin, çinko tarafından sağlamlaştırılan daha kompleks bir yapıya büründüğü bilinmektedir. Bu yapı, heliks-dönüş-heliks proteinlerini hatırlatır tarzda, ardışık olarak DNA'nın büyük oluklarına her monomerden bir  $\alpha$ -heliksi araya eklenerek DNA'ya bağlanır.



**Şekil 1.2** Sistein ve histidin amino asitlerine Zn atomunun bağlı olduğu bir çinko parmak yapısı (referans [21] 'den esinlenilmiştir.).

### 1.1.1.3 Bazik Lösin Fermuar Domeni

Üçüncü tip DNA bağlanma domeni, bazik lösin fermuarıdır (basic leucine zipper, bZIP). Bu DNA bağlanma domeni, protein-protein dimerinin oluşumuna izin veren ikinci bir domen olan lösin fermuarına bitişiktir. Lösin fermuarının yapısı, ilk defa sıçan karaciğeri hücrelerine ait bir çekirdek proteininde otuz beş amino asitlik bir dizi olarak saptanmıştır [22]. Bu dizide dört lösin amino asiti birbirinden yedi aminoasitle ayrılmıştır ve bu bölgenin iki yanında bazik amino asitler bulunmaktadır. Lösin amino asitinin bulunduğu bölge bir sarmal yapı oluşturur ve sarmalların her bir dönüşünde lösin çıkıntıları görülür. Bu şekilde iki molekül bir araya gelince, lösinler bir fermuar gibi birleşirler, başka bir deyişle iki molekül, “lösin fermuarı” ile bir arada tutulur (Şekil 1.3). Dimer yapısında, fermuar kısma komşu olan iki bazik  $\alpha$ -sarmal bölgesi bulunur. Bu bölge, DNA'daki fosfat gruplarına ve özgül bazlara bağlanarak dimerin DNA üzerinde bir makas gibi görünmesine neden olur.



Şekil 1.3 bZIP proteininin bazik domen dimeri ve lösin fermuarı (referans [21] ‘den esinlenilmiştir.).

### **1.1.1.3.1 Bazik Domen**

Bazik domen, birçok DNA bağlanma proteininde bulunur ve genelde lösün fermuarı veya heliks-ilmek-heliks (HLH) motifi dimerizasyon domenlerinden biri veya diğeri ile beraberdir. Bunlar, bazik lösün fermuarı veya bazik HLH proteinleri olarak adlandırılır. Proteinlerin dimerizasyonu iki bazik domeni bir araya getirir ki bundan sonra DNA ile temas kurabilir [21].

### **1.1.1.3.2 Dimerizasyon Domenleri**

#### **1.1.1.3.2.1 Lösün Fermuarı**

Lösün fermuar proteinleri, genelde DNA-bağlanma domeninin C-ucu bölgesinde her yedi pozisyonda hidrofobik bir lösine sahiptir. Bu,  $\alpha$  -heliksin bir yüzeyinde her ikinci dönüşte lösün gelmesiyle hidrofobik yan yüzey oluşur. Bu yan yüzeylerin etkileşim yolu ile iki monomerik protein dimerize olur ve spiral yapı oluşur [21]. bZIP transkripsiyon faktörleri, lösün fermuarı için N-ucu bazik olan DNA bağlanma domeni bulundururlar. Bu lösün fermuarı  $\alpha$ -helikal C-ucu domeninden devam eden  $\alpha$ -heliks üzerinde bulunur. Her heliksin N-ucu bazik domenleri simetrik bir yapı oluşturur.

#### **1.1.1.3.2.2 Heliks-İlmek-Heliks Domeni (HLH)**

Bu domenin genel yapısı, her bir monomerik proteinde iki  $\alpha$ -heliksi ayıran polipeptit zincirin helikal olmayan ilmeği istisna tutulursa, lösün fermuarı ile benzerdir.  $\alpha$ -heliks C-ucunun bir kenarındaki hidrofobik çıkıntılar dimerizasyona imkân sağlar [23]. Lösün fermuarı ile birlikte, HLH motifi genelde DNA'ya bağlanmak için dimerizasyona ihtiyaç duyan bazik domenin bitişiğinde bulunur. Heterodimerlerin oluşumundaki bZIP proteinleri ve bazik HLH proteinleri, transkripsiyon faktörün çeşitliliğine ve kompleksliğine imkân tanır.

## 1.2 bZIP Transkripsiyon Faktörlerinin Sınıflandırılması

Transkripsiyon faktörleri çoğu zaman DNA bağlanma bölgelerindeki benzerliğe göre sınıflandırılır [24-25].

Bazik bölge üst sınıfında bulunan bazik lösin fermuarı altı aileden oluşmaktadır. bZIP sınıfında yer alan aileler AP-1, CREB, C/EBP, bZIP/PAR, bitki G-kutusuna bağlanan faktörler, sade ZIP olarak bilinmektedir. Bu ailelerde alt ailelere ayrılmaktadır (Tablo 1.1).

**Tablo 1.1** bZIP transkripsiyon faktörlerinin sınıflandırılması. (referans [67]'dan esinlenilmiştir.)

Üst sınıf	Sınıf	Aile	Alt aile
Bazik domen	Bazik Lösin Fermuarı (bZIP)	AP-1	Jun Fos Maf NF-E2 Fungal AP-1 faktör CRE-BP/ATF
		CREB	CREB ATF-1 CREM BBF-2 dCREB2 SKO1 HAC1 Pcr1
		C/EBP-like faktör	C/EBP alfa C/EBP beta C/EBP gamma C/EBP delta C/EBP epsilon CHOP-10 Slbo AcC/EBP

Tablo 1.1 'in devamı

Üst sınıf	sınıf	Aile	Alt aile
Bazik domen	Bazik Lösin Fermuarı (bZIP)	bZIP/PAR	DBP VBP Hlf TEF
		Bitki G-kutusu bağlanma faktörü	CPRF-2 EmBP-1 HBP-1a TGA1a TGA1b
		Sade ZIP	SWI6 SWI4 STE4 IREBF-1 GCF

DNA'ya bağlanmayı sağlayan motiflerin varlığı, memelilerdeki çeşitli onkogen ürünleri (FOS, MYC, JUN) ile mayada bulunan ve DNA'yı sekansa özgü bir şekilde tanıyan bir proteinin (GCN4) amino asit sekans benzerliklerinin karşılaştırılması sırasında ortaya çıkarılmıştır [26-27]. Bu sekans karşılaştırma çalışmaları sonucunda C/EBP olarak tanımlanan bir protein saptanmıştır. Sıçan karaciğerinden elde edilen bu protein ısıya dayanıklı bir çekirdek proteindir. C/EBP 'yi kodlayan genin klonlanıp sekanslanması, bunun DNA'ya bağlanıcı bölgesindeki amino asit sekansının FOS, MYC ve JUN gibi şekil değiştirici (onkogen) proteinler ile açık bir benzerlik gösterdiğini anlamayı sağlamıştır [26].

C/EBP'nin DNA'ya bağlanan bölgesinin yaklaşık yarısına eşit olan ve 35 amino asit kökü içeren kısmında, yedili bir lösin tekrarı bulunmaktadır. Bu yapıda, düzenli bir diziliş gösteren zıt yüklü amino asitler de fazla miktarda bulunmaktadır.

Bu zıt yüklü amino asitler, heliks içi çiftlerin meydana gelişini sağlamaktadır . Bu özelliklerin tümü FOS, MYC, JUN ve GCN4 proteinleri için de geçerlidir.

Heliks içi çift oluşturma yeteneği, heliksin kararlılığına katkıda bulunmaktadır. Bu yapıya sarılan heliks yapısı adı da verilmektedir. Düzenleyici proteinlerde saptanan bu yapıyı keratinlerde, laminlerde ve miyozinin ağır zincirinin kuyruğundaki dördüncül yapıda da görmek mümkündür [28]. Bu benzerlik, bu sınıf polipeptidlerin lösün tekrar heliksi ile dimerleşebilecekleri varsayımına neden olmuştur. Daha sonra C/EBP ve bununla akraba proteinlerin iç yüzey dimerleşmesinin lösine bağlı olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber, lösün fermuarı, C/EBP'nin DNA ile sekansa özgü tarzda etkileşimi için ihtiyaç duyulan tek faktör değildir. Çalışmalar lösün tekrarının amino ucuna doğru yerleşmiş 30 amino asit kökü içeren bir parçasının, proteinin DNA'ya bağlanması sırasında değişmeden kaldığını ortaya çıkarmıştır [10,28]. Bu parçadaki amino asitlerin çoğu bazik karakterli olup C/EBP'nin 35 amino asitlik bölgesindeki bazik amino asit kökleri ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Böylece helikslerarası dimerleşme iki alt birimdeki bazik karakterli bölgelerin yardımı ve lösün fermuarı tarafından gerçekleştirilmekte ve bu yolla protein DNA'ya bağlanmaktadır. Örneğin FOS proteini DNA'ya yalnız başına bağlanamadığı halde JUN ile birleştiği zaman bağlanabilmektedir. Bu durum FOS/JUN birleşmesinin, bunların yapılarındaki lösün fermuarı ile gerçekleştiğini göstermektedir [27].

HeLa hücre kültürü özütünden elde edilen ve DNA ile sekansa özgü bir şekilde etkileşebilen bir protein ise AP1 proteindir. Bu protein, SV40 virüsünün zenginleştiricisi ile etkileşebilen bir HeLa transkripsiyon faktörüdür. Lösün fermuarı yapısı gösteren AP1, bir protoonkogen proteini olan FOS ile yapısal benzerliğe sahiptir. Yapılan çalışmalar, AP1'in ancak FOS veya diğer bir protoonkogen proteini olan JUN ile birleştiği takdirde DNA'ya bağlanabildiği ortaya çıkarılmıştır [14].

### **1.3 bZIP Transkripsiyon Faktörlerinin Yeşil Bitkilerdeki Rolü**

bZIP transkripsiyon faktörleri tüm ökaryotlarda önemli süreçleri kontrol etmektedirler [29]. Bitkilerde fotomorfogenez, yaprak ve tohum oluşumu, enerji homeostazı, abiyotik ve biyotik stres yanıtları da dahil olmak üzere bir çok gelişimsel ve fizyolojik süreçleri düzenleyici merkezdir. Ayrıca, kuraklık, patojen savunması, dehidrasyon, ışık, oksidatif strese karşı yeşil bitkileri korumaktadır.

Bütün organizmaların büyüme ve gelişmesi gen ekspresyonunun uygun düzenlemesine bağlıdır. Transkripsiyon başlama oranının kontrolünü, gen ekspresyonunu düzenlemede önemli yere sahip olan transkripsiyon faktörleri belirler [29, 30]. Transkripsiyon faktörler, DNA bağlanma ve multimerizasyon domenlerinin bir veya üç boyutlu yapılarının ve proteinlerinin benzerlik ve farklılıklarına göre farklı ailelerde gruplandırılırlar. Yeni transkripsiyon faktörlerinin ortaya çıkması, protein etki alanları ve sıra sapma kombinasyonu amplifikasyonu arasında etkileşimi organizmal karmaşıklığı transkripsiyon faktörlerinin çeşitlenmesi açısından önemli bir itici güç teşkil etmektedir [30]. Bu transkripsiyon faktörleri ve bunlara karşılık gelen fonksiyonların detaylı genetik tarihinin ve çeşitlenmesinin anlaşılması ökaryotlar arasında bulunan biyolojik çeşitliliğin altında yatan transkripsiyonel düzenleyici değişikliklerini veya yeni transkripsiyon faktörleri ortaya çıkarmak için çok önemlidir.

Büyük ölçekli genomik karşılaştırmalar altında Angiosperm transkripsiyon faktörü aileleri hayvan ve mantarlar ile kıyaslandığında, çiçekli bitkilerin genleriyle daha yoğun benzediğini ortaya çıkarır. Ayrıca gen genişleme oranları, transkripsiyon faktörü aileleri arasında değişiklik gösterir. bZIP transkripsiyon faktörü ailesi angiospermlerde ve insanlarda benzer oranda genişlemiştir [31].

### **1.4 bZIP G-kutusu ve C-kutusu**

Bitki bZIP'teki proteinler arasında iki önemli alt G-kutusu (CCACGTGG) veya C-kutusu (TGACGTCA) bağlayıcı proteinlerin DNA bağlayıcı özgülüğü ve onların

temel bölgelerin amino asit dizilerini tespit edilmiştir. Bitki bZIP'teki proteinler ACGT gibi bir çekirdek içeren DNA dizisi motifleri için rahat bir DNA bağlayıcı özgülüğü gösterirler [32]. Bu motifler sayesinde DNA domeni DNA üzerine kolaylıkla bağlanabilmektedir. G-kutusu, in vivo geçici ve transgenik bitki deneylerinde ışık, absisik asit (ABA), abiyotik strese yanıtta ve gen ekspresyonunun düzenlenmesine katılımı kanıtlanmıştır [33].

### **1.5 bZIP'in DNA Bağlama Bölgesindeki Serin Amino Asitlerinin Rolü**

Tersinir fosforilasyon, serin, tirozin ve treonin amino asitleri tarafından gerçekleştirilen translasyon sonrası modifikasyonlardan biridir. Fosforilasyon ile getirilen değişiklikler geçici bir şekilde bir proteinin fonksiyonu tarafından aminoasitler arasındaki itici ve çekici güçleri değiştirerek negatif yüklü bir proteinin allosterik konformasyonunu etkiler. Ayrıca fosforilasyon, DNA gibi makromoleküllerle proteinler arasındaki ilişkiyi etkiler. Özellikle ökaryotlardaki protein kinaz ve fosfatazların birden fazla gen ailesi çeşidini kodlaması bazı amino asitlerin protein fosforilasyonunun kontrolündeki önemini tam olarak desteklemektedir. Transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere farklı protein sınıfları, fosforilasyonla düzenlenir. Transkripsiyonel mekanizmaların çoğu da fosforilasyonla düzenlenir. DNA bağlanma kapasitesi, nükleo-sitoplazmik dağılım ve transaktivasyon örnek olarak verilebilir. Çeşitli ökaryotik organizmaların transkripsiyon faktörlerinin bZIP çoklu gen ailesi üyeleri için fosforilasyon bağımlı modülasyon farklı özellikler göstermektedir [34].

Yüksek korunmuş bölgeler sayesinde DNA'ya bağlanan bazik bölge ve hücre için önemli dimerizasyonda görevli lösin fermuarı olarak transkripsiyon faktörü arasında farklı bir sınıf meydana gelmiştir. bZIP ailesi bitki, hayvan, mantar gibi ökaryot orijinlerde ortaya çıkmıştır [35, 36]. bZIP faktörler türler karşısında, organizma için hayati önem taşıyan farklı süreçlerde yer alırlar. Bitkilerde, ışık, stres ve hormon yanıt yollarına, patojen savunmasına, tohum olgunlaşmasına ve çiçek gelişiminin düzenlenmesine katılırlar [37-39]. Sinyale bağımlı fosforilasyon için pek çok işaret olsa da, oluşumu ile ilgili bZIP faaliyeti için bu translasyonel

değişiklik sonrası fonksiyonel etkileri sınırlıdır. Bir kaç bZIP faktörlerinin hızlı fosforilasyonu, absisik asite (ABA) yanıt ve strese bağlı sinyallere karşı bazı bitkilerde tespit edilmiştir [40-42]. Bu fosforilasyonun ABA duyarlı genlerin transkripsiyonel indüksiyonu için vazgeçilebilir olduğu gösterilmiştir [43]. Ancak, belirli bir fosforilasyon bölgesinin fonksiyonel analizleriyle bZIP faktörünün farklı fonksiyonel bölgelere yerleştirilmiş birden fazla modifiye bölgesini tanımlamayı engellemiştir. Örneğin, iki mısır bZIP faktörlerinin ABA indüklenen fosforilasyonunda biri (EmBP-2) DNA bağlamasında katlanmayı sağlarken diğeri (ZmBZ-1) bu bağın açılmasını sağlamaktadır [44].

Fosforilasyon yoluyla DNA bağlanma kapasitesinin modülasyonu hayvan bZIP faktörleri belirlenmiştir. C/EBP ve C/EBP $\beta$  transkripsiyonel aktiviteleri birkaç serinin fosforilasyonu ile gerçekleşir [45]. Bu serin rezidüleri DNA bağlanma domeninin 19'uncu pozisyonundaki serin amino asitleridir. Hayvan bZIP proteinlerinin kristallografik analizi ile gösterildiği gibi bu pozisyondaki amino asitler DNA ile fiziksel temas sağlar [46, 47]. Benzer şekilde bZIP faktörünün AP-1 ailesinin üyesi BATF, DNA bağlanma domeninin 19'uncu pozisyonundaki Serinin fosforilasyonu ile gerçekleştirmektedir. Mutasyona uğramış BATF (Ser43Asp) ile Jun proteini ile dimerize olarak heterodimer olarak fosforilasyonu gerçekleştirirler [48].

İnsan bZIP transkripsiyon faktörlerinin %35'inde DNA bağlanma domeininin (BDB) 19'uncu pozisyonunun serin içerdiği belirlenmiştir [48]. Amoutzias ve diğerleri (2006), filogenetik analizler birçok omurgalı ve omurgasız türler için genişletmişler ve hayvan bZIP faktörlerin BDB'nin 19'uncu pozisyonunda sistein, serin veya tirozinin yüksek oranda korunduğunu savunmuşlardır [49]. Bu araştırmacılar, fosforilasyon ve redoks kontrolünde protein-DNA ara birimi boyutu kısıtlamaları nedeniyle fonksiyonel nedenlerden dolayı bu aminoasitlerin son derece korunmuş olduğunu önermektedirler.

## **2. MATERYAL-METOD**

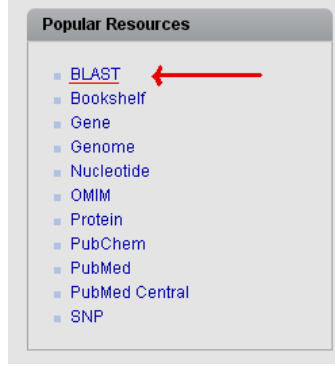
### **2.1 Genin Biyoinformatik Analizi**

Modern biyolojide araştırmacılar için büyük kolaylık sağlayan ve oldukça genç bir bilim dalı olan biyoinformatik son yıllarda hızlı bir şekilde gelişmektedir. Biyoinformatik teknikler biyolojik moleküllerin dizilimlerinin oluşturulması, verilerin analizi, depolanması, üç boyutlu yapılarının tasarlanması, bilgilerin paylaşımına sunulması için bilgisayar üzerinden kullanılmaktadır [51].

#### **2.1.1 NCBI Veri Bankasında Genin BLAST Analizi**

NCBI’da BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi [56], ak111ak148 isimli cDNA’nın nükleotid dizisinin, genomda nerede yer aldığı ve hangi bölgelerle ne kadar benzeştiği bilgilerine ulaşılmasını sağladı.

NCBI ana sayfasında bulunan BLAST (şekil 2.1) seçildiğinde, açılan sayfada üç başlık göze çarpmaktadır. Bunlar; “BLAST Assembled Genomes”, “Basic BLAST” ve “Specialized BLAST”. Basic BLAST başlığındaki “nucleotide blast” opsiyonu seçildi. Ekrana gelen sayfada (şekil 2.2) üstte bulunan pencereye dizi, FASTA formatında girildi ve sayfanın sonunda bulunan “BLAST” butonu tıklandı.



Şekil 2.1 NCBI Ana Sayfa Sağ Menü [56]

Şekil 2.2 NCBI BLAST ile Genin Analiz Sayfası [56]

BLAST analizi yapılan sonuç sayfası dört bölüm içerir. Birinci bölüm; yapılan analiz hakkında, ikinci bölüm ise, ilgilenen dizinin genomdaki yeri ve diğer dizilerle benzerliği hakkında grafik olarak bilgi verir. Üçüncü bölümde; bilgiler liste

şeklinde sıralanırken son bölümde blast analizi yapılan dizinin genomdaki benzerlikleri baz düzeyinde birebir karşılaştırmalı olarak sunulur (Şekil 2.3).

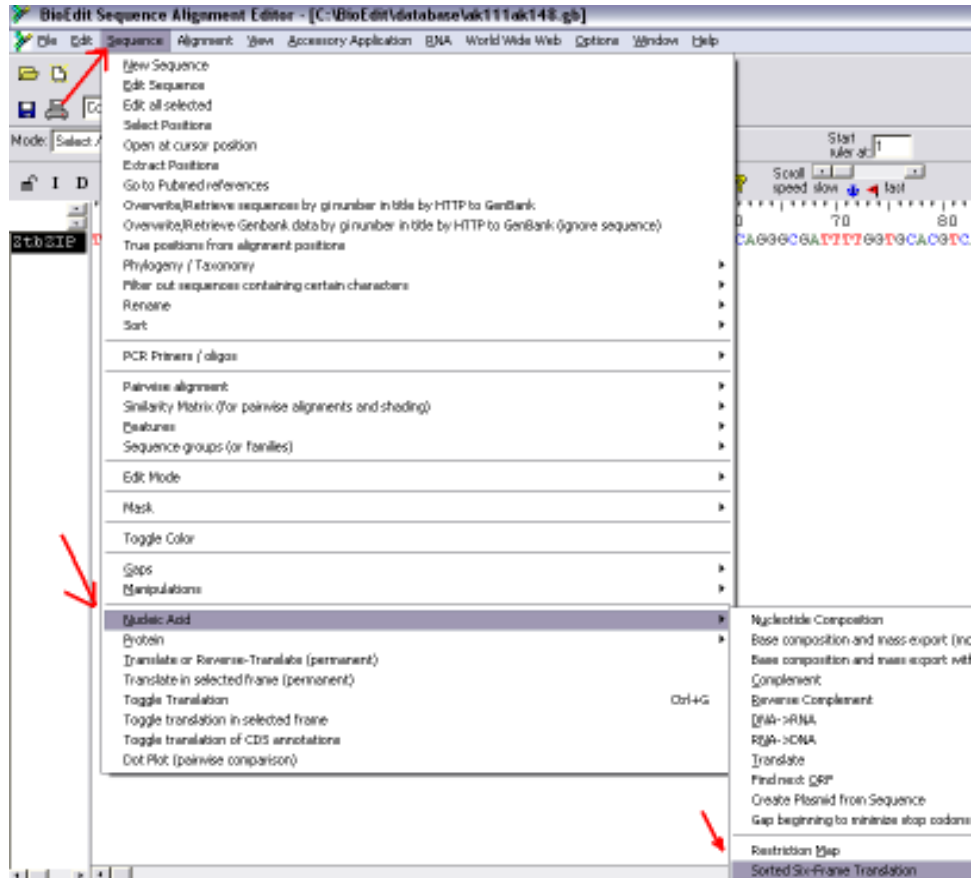


Şekil 2.3 Genin NCBI BLAST sonuç sayfası [56].

## 2.1.2 bZIP Geninin Açık Okuma Çerçevesinin Belirlenmesi

Amino asitleri kodlayan ve proteinleri oluşturan kodonlar serisi açık okuma çerçevesini (ORF) oluşturur [52]. ORF (Open Reading frame) ATG kodonuyla yani Metiyonin amino asitiyle başlar üç farklı stop kodonundan biriyle (TAA, TGA, TAG) sonlanır.

Bulduğumuz dizi acaba protein kodluyor mu?, Kodluyorsa başlangıç kodonu neresi ve ne kadar uzunlukta bir protein kodluyor? Bunların cevabını alabilmek için “BioEdit” programı [57] kullanıldı. ORF’yi bulmak için “BioEdit” programından dizi seçildi. “Sequence” butonu seçilip, “Nucleic acid” seçeneğinden “Sorted Six-Frame Translation” seçilerek ORF’a ulaşıldı.

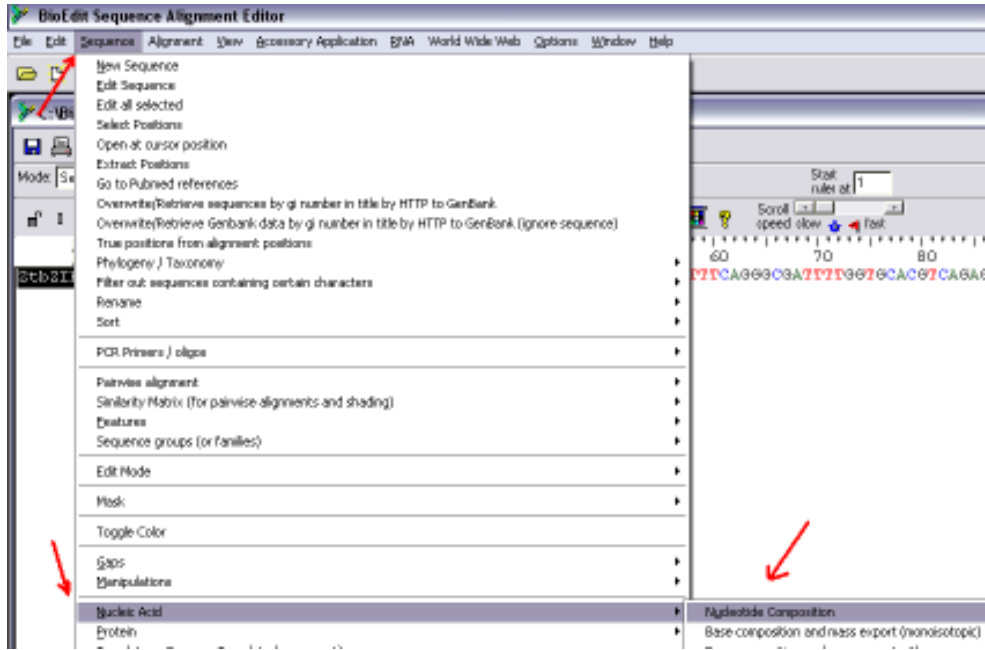


Şekil 2.4 BioEdit programında [57] ORF’un bulunması için yapılan işlem sırası.

Genin doğru okuma çerçevesini bulmak önemlidir. Program, üç ileri üç geriden olmak üzere altı farklı açık okuma çerçevesi verdi. Frame 1, 2, 3 ve Frame -1,-2,-3 olarak görüldü. Bunlardan hangisi doğru ORF olduğunu bulmak için en uzun olanı seçildi.

### 2.1.3 Nükleotid ve Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması

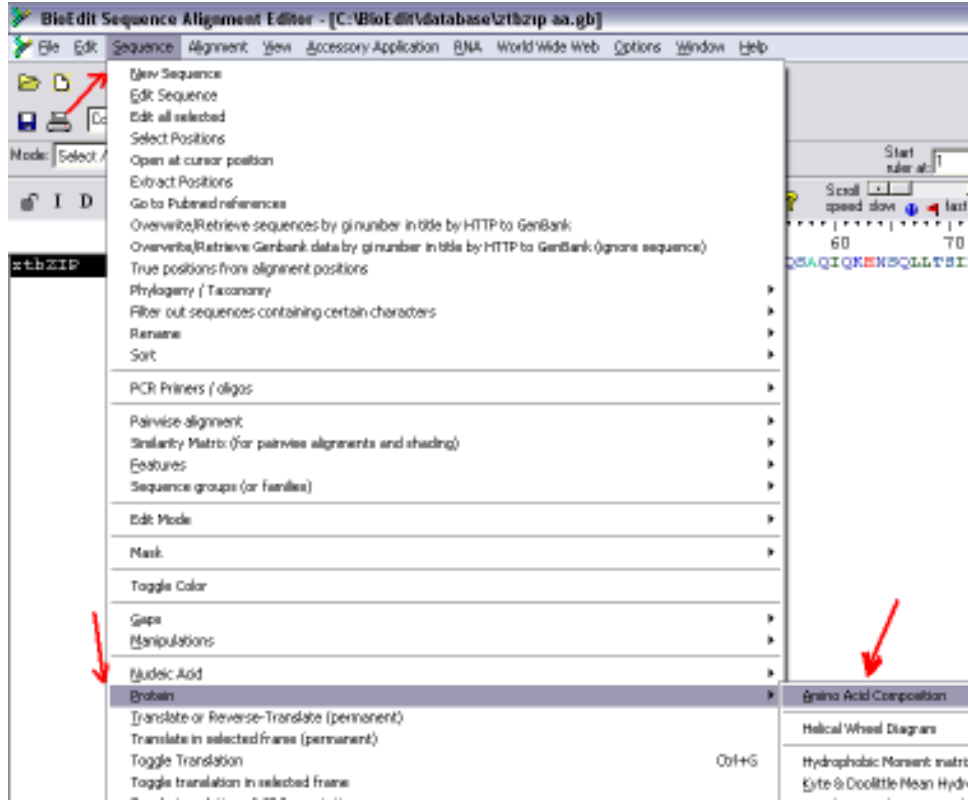
“BioEdit” programı [57] kullanarak adenin, timin, guanin, sitozin bazlarının dizi içerisindeki oranları bulundu. Bunun için “BioEdit” programından dizi seçildi. “Sequence” butonu seçildi ve “Nucleic acid” seçeneğinden “Nucleotide Composition” tıklanarak (Şekil 2.5) sonuca ulaşıldı.



Şekil 2.5 BioEdit programında [57] nükleotid kompozisyonunu bulmak için yapılan işlem sırası.

Amino asit kompozisyonu ise yirmi aminoasitin ne oranda bulunduğunu hangi aminoasitin fazla hangisinin az olduğunu yada hangi amino asitin var-yok olduğunu gösterdi. Bu oranlara bakarak proteinin hücre içerisindeki konumu hakkında bilgi edinildi. Bu veriye ulaşmak için aminoasit dizisi kullanıldı. “Sequence” seçeneği

seçilip, “Protein” seçeneğinden “Amino acid composition” ‘dan (Şekil 2.6) sonuca ulaşıldı.



Şekil 2.6 bZIP geninin amino asit kompozisyonunu bulmak için yapılan işlem sırası.

#### 2.1.4 Bazık Domen ve Lösin Fermuar Domeninin Belirlenmesi

ZtbZIP transkripsiyon faktörüne ait DNA bağlanma bölgesi yani bazık bölge ve lösin fermuar bölgesinin yerleri nükleotid dizisi üzerinde belirlendi. DNA bağlanma bölgesinde bulunan serin rezidülerinin yerleri tespit edildi.

#### 2.2 İntron Analizi

ZtbZIP transkripsiyon faktöründeki intron varlığı ya da yokluğunun tespiti için ilk olarak primer dizaynedildi ve gDNA ve cDNA izolasyonları yapılarak PCR ile

gen bölgesi çoğaltıldı. Agoroz jel elektroforezinde yürütülerek bant büyüklüklerine bakıldı. PCR ürünleri dizilemeye gönderilerek intron analizi NCBI kullanarak yapıldı.

## 2.2.1 Primerlerin Dizayn Edilmesi

Primerler, Primer 3 (version 0.4.0) programında dizaynedildi [53]. Dizi FASTA formatta programa girildi. Programın “target“ kısmına “101, 446” (bu aralıklarda primer istendiği için) komutları girildi. “General primer Picking Conditions” bölümündeki “Primer Size” bölümündeki değerler minimum 22, optimum 27 ve maksimum 32 olarak ayarlandı. “Pick primers” butonuna basarak işlem gerçekleştirildi (Şekil 2.7).

The screenshot shows the Primer3 web interface. At the top, it says "Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence." Below this, there is a text area for pasting the source sequence. A red arrow points to this area with the label "1. Adım Diziyi gir". Below the text area, there are three checkboxes: "Pick left primer, or use left primer below", "Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below", and "Pick right primer, or use right primer below". A red arrow points to the "Pick left primer" checkbox with the label "4. adım". Below these checkboxes are two buttons: "Pick Primers" and "Reset Form". Below the buttons, there is a "Sequence Id" field with the value "101,446" and a description: "A string to identify your sequence." A red arrow points to this field with the label "2. adım". Below the "Sequence Id" field, there is a "Target" field with the value "101,446" and a description: "E.g. 30,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 30 and 51. Or mark the source sequence with [...] Excluded Regions: E.g. 401,7-68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [...] Product Size Ranges: 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000". Below the "Product Size Ranges" field, there are several input fields for "Number To Return", "Max 3' Stability", "Max Repeat Mispairing", "Min Repeat Mispairing", "Max Template Mispairing", and "Min Template Mispairing". Below these fields, there are two buttons: "Pick Primers" and "Reset Form". Below the buttons, there is a "General Primer Picking Conditions" section. A red arrow points to this section with the label "3. adım". In this section, there are input fields for "Primer Size" (Min: 22, Opt: 27, Max: 32), "Primer Tm" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0), "Product Tm" (Min: , Opt: , Max: ), "Max Tm Difference" (100.0), and a dropdown menu for "Table of thermodynamic parameters" (Bresler et al. 1986).

Şekil 2.7 Primer dizayn ederken izlenen basamaklar.

Sol primerin dizisi 5'- ATTATATTCAAATGGGTTCTTCTAGTGG-3', sağ primerin dizisi ise 5'-ACAATAAGACAAATCTCTCTACTCGTTG-3' olarak belirlendi. Primerlerin erime sıcaklıkları yani tm dereceleri sırayla 60.24 °C ve 59.72 °C'dir.

### 2.2.2 Primerler İçin Çalışma Solüsyonu Hazırlanması

Primerleri -20 °C dolabından çıkartıp yaklaşık 15 saniye 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Amaç tüp içine yayılmış olan primerlerin dipte toplanmasını sağlamaktı. 1 mL TE eklenerek 2 dakika alt-üst edildikten sonra 15 saniye vorteks yapılarak sulandırıldı ve çalışma solüsyonu yapmak için hazır hale getirildi.

1 mL TE içinde sulandırılmış primerlerden 200 µL'lik 5µM çalışma solusyonları Tablo 2.1'de gösterilen konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı. Son hacmi 25 µL olan PCR reaksiyonu için 2.5 µL primer eklendi.

**Tablo 2.1** Primer Çalışma Solüsyonu Hazırlama.

<b><u>Primerler</u></b>	<b><u>Molaritesi</u></b>	<b><u>Çalışma Solüsyonları</u></b>
<b>Sol Primer</b>	27.2 µM	36.76 µL primer + 163.27 µL TE
<b>Sağ Primer</b>	31.6 µM	31.64 µL primer + 168.36 µL TE

### 2.2.3 Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma için kullanılacak zeytin yaprak ve meyve örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu'nun zeytin bahçesinden toplandı. Örneklerin laboratuara getirilmesinde kullanılan sıvı azot ise "Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri

Birliği’’ kurumundan temin edildi. Sıvı azot içerisinde getirilen örnekler izolasyon yapılıncaya kadar -80  C dolaplarında tutuldu.

Genomik DNA izolasyonu için ‘GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit’ (Sigma, Almanya) rn kullanıldı. Kullanılan kite göre izolasyon özetle Şu Şekilde yapıldı:

Yaprak rnekleri porselen havanlarda sıvı azot içerisinde ezildi ve ependorf tüpüne 100 mg olacak Şekilde alındı. Bir süre sıvı azotun tüpten uzaklaŐması beklendi.

Ependorf tüpüne 350  L lizis solüsyonu ‘‘Part A’’ eklendi ve örneğin tümüyle temas etmesi sağlandı. Bu solüsyon hücrelerin lizis olmasını sağladı. Hemen ardından 50  L ‘‘Part B’’ lizis solüsyonu eklendi. Ependorflar daha önceden 65  C’ye ayarlanan su banyosuna konuldu ve on dakika inkübe edildi. Su banyosuna koymadan önce bazı durumlarda RNA kirliliğine karşı lizis karışımı içerisine RNase A eklendi. On dakika sonunda artıkları çöktürmek için karıŐıma 130  L çöktürme solüsyonu eklendi ve 15000 X g’de beş dakika santrifüj edildi (Hücresel artıklar, proteinler ve polisakkaritler bu sayede ktrld). Santrifüjden sonra süpernatant, kit içerisinde bulunan mavi kolonlu toplama tüpüne aktarıldı. Bir dakika 15000 X g’de santrifüj edildi. Böylece hücresel atıklar tamamıyla uzaklaştırıldı. Filtre atıldı ve içerisinde sıvının olduğu toplama tüpü ile devam edildi. Bu sıvı içerisine 700  L bağlama solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı.

Bağlama kolonlarının hazırlanması için kırmızı renkli insrtler toplama kolonlarına yerleştirildi, 500  L kolon hazırlama solüsyonu eklendi ve bir dakika 12000 X g’de santrifüj yapıldı. Daha önce elde edilen sıvı bu kolona yüklendi. Bu kolon en fazla 700  L alır. Eldeki sıvı bu miktardan fazla olduğu için bundan sonraki işlem iki kerede yapıldı. Bir dakika 15000 X g’de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Bundan sonra yıkama iŐlemine geçildi. Kit içerisindeki yıkama solüsyonu kullanılmadan önce içerisine etanol ilavesi yapıldı. 500  L kolona ilave edildi ve bir dakika 15000 X

g'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.

Kolona ikinci yıkama işlemi için 500 µL yıkama solüsyonu ilave edildikten sonra üç dakika 15000 X g'de santrifüj yapıldı. Filtre 2 mL'lik yeni bir ependorf tüpüne alındı. Bu aşamadan son hacim 50 µL olacak şekilde elüsyon işlemlerine başlandı. Elüsyon solüsyonu daha önce su banyosunda 65 °C'de ön ısıtmaya tabi tutuldu. Önce 30 µL elüsyon çözeltisi eklendi ve yedi dakika beklendikten sonra bir dakika, 15000 X g'de santrifüj yapıldı. Daha sonra 20 µL elüsyon çözeltisi eklenerek yine yedi dakika bekletildi ve bir dakika, 15000 X g'de santrifüj yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de dolapta saklandı.

#### 2.2.4 PCR Bileşenlerinin Hazırlanması ve PCR Döngüleri

Genomik DNA (gDNA) ve komplementer DNA (cDNA) örneklerinin PCR'da oluşturacakları bant büyüklüklerinin karşılaştırılıp dizileme sonuçlarının değerlendirilmesiyle gen içerisinde intron olup olmadığı bilgisine ulaşmak için, cDNA kütüphanesinden seçilen zeytin tahmini bZIP (ZtbZIP) transkripsiyon faktörünün cDNA'sı ile zeytin yapraklarından elde edilen gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak Tablo 2.2'de belirtilen PCR koşulları ve Tablo 2.3'deki PCR karşımı ile belirtilen primerler kullanılarak çoğaltma yapıldı.

**Tablo 2.2** PCR Koşulları

<i>Döngü isimleri</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Zaman</i>	<i>Devir</i>
<b>Kapak ısıtma</b>	105 °C	1 dakika	-
<b>1- Ön Isıtma</b>	94 °C	5 dakika	1
<b>2- Ayrılma</b>	94 °C	30 saniye	35
<b>3- Bağlanma</b>	50 °C	45 saniye	
<b>4- Uzama</b>	72 °C	2 dakika	
<b>5- Son Uzama</b>	72 °C	7 dakika	1

**Tablo 2.3** PCR Reaksiyon Karışımı ve Bileşenlerin Yoğunlukları

<b>Bileşen İsmi</b>	<b>Reaksiyon İçin Kullanılan Miktar (25 µL Toplam Hacim için)</b>	<b>Yoğunluk</b>
Tampon	2.5 µL	10X
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL	25 Mm
Sağ Primer	2.5 µL	27.2 µM
Sol Primer	2.5 µL	31.6 µM
DMSO	2 µL	-
dNTP karışım	2.5 µL	10 mM
Kalıp	1 µL	-
Taq. Pol.	0.5 µL	5 u / µL
Nükleazlardan arındırılmış su	10 µL	-

### 2.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Zeytinden elde edilen gDNA ve cDNA PCR sonuçlarını %0.8'lik konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. Jeli hazırlamak için 0.4 gr agoroz (Sigma, Almanya) tartıldı ve üzerine 50 mL 0.5 X'lik TBE ilave edilerek mikrodalga fırında çözelti hazırlandı. Çözelti soğutuldu, içerisine 0.5 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edildi ve içerisine tarakların yerleştirildiği elektrofrez kasetine döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı, kuyucuklar yüklemeye hazır hale getirildi. Kaset elektrofrez tankına yerleştirildi ve jelin üzerini kapatıncaya kadar elektrik akımını iletici olarak kullanılan 0.5 X'lik TBE (Tris-Borik-EDTA) ilave edildi. TBE için gerekli olan Tris bazı (Sigma, Almanya) firmasından, Borik Asit AppliChem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. Bu çözeltiler ve kompozisyonları Tablo 2. 4'te verilmiştir. Örnekler 1 (6 X) boya:5 örnek karışımı şeklinde kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık belirteci olan markır yüklendi. 100 V (volt) elektrik

verilerek 45 dakika yürütüldü. Jel 45 dakika sonunda Transilluminatör UV cihazında gözlendi ve görüntü bu cihazda fotoğraflandı.

**Tablo 2.4** Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri

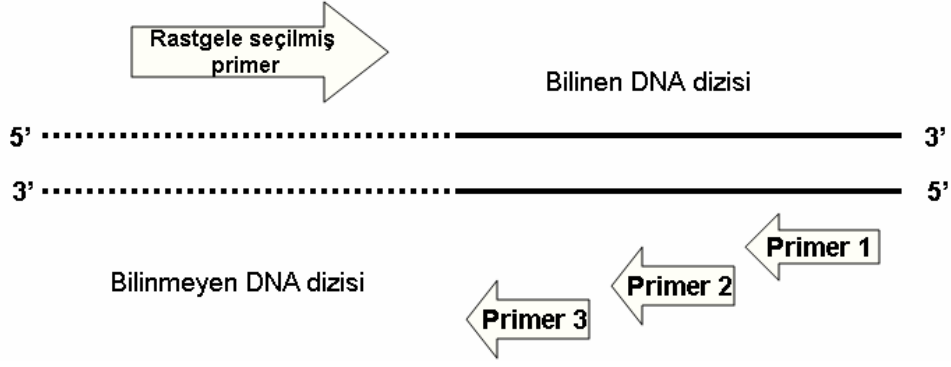
<b>Çözelti</b>	<b>Kompozisyonu (0.5 L için)</b>
<b>5X TBE</b>	27 g Tris-baz 13.75 g Borik asit 10 mL, 0.5 M, pH 8 EDTA
<b>Yükleme Boyası</b>	GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0313)

### **2.3 bZIP Transkripsiyon Faktörünün Promotör Analizi**

Transkripsiyonun başlamasını ve düzenlenmesini sağlayan genin 5' bölgesinde bulunan promotör bölgesinin tespiti için TAIL-PCR tekniği [58] kullanıldı.

#### **2.3.1 Thermal Asymmetric InterLaced PCR (TAIL-PCR) için Primerler**

TAIL-PCR tekniği [58] genin 5' bölgesine rastgele bağlanan 5 ayrı AD primeri (arbitrary primer) ve AD karışımı (5 primerin eşit oranlarda karıştırılmasıyla oluşturuldu.) kullanıldı. Dizinin 5' ucuna yakın olacak şekilde birbiri ardına (Şekil 2.8) 3 ayrı sol primer, "Primer 3"[53] programında tasarlandı (Tablo 2. 5). Primerler sulandırılmış olarak alındı ve istenilen yoğunluklarda çalışma solusyonları hazırlandı.



**Şekil.2.8** TAIL primerleri ve AD primerin şekilsel gösterimi.

**Tablo 2.5** TAIL-PCR Primerleri ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

Primer Adı- Dizisi	Yoğunluk	Çalışma Solüsyonu
AD <sub>1</sub> : 5'-NTCGASTWTSGWGTT-3' [58]	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD <sub>2</sub> : 5'-NGTCGASWGANAWGAA-3' [58]	10 Mm	80 µL TE + 20 µL Primer
AD <sub>2a</sub> : 5'-STTGNTASTNCTNTGC-3' [58]	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD <sub>3</sub> : 5'-WGTGNAGWANCANAGA-3' [58]	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
AD <sub>5</sub> : 5'-WCAGNTGWTNGTNCTG-3' [58]	10 mM	80 µL TE + 20 µL Primer
Tail <sub>1</sub> :5'-CTTTTCTTTGATCCATCAGATCTTC-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer
Tail <sub>2</sub> :5'-AGAATCTGTGAAGACCCTGAAGAGTT-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer
Tail <sub>3</sub> :5'CCACTAGAAGAACCCATTTGAATATAA-3'	5 mM	90 µL TE + 10 µL Primer

### 2.3.2 TAIL-PCR Döngüleri ve Bileşenleri

Tail-1, Tail-2 ve Tail-3 adını verdiğimiz 3 ayrı PCR koşulu uygulandı (Tablo 2.6) Tail-1 için kalıp olarak bölüm 2.2.3'te bahsedildiği gibi izole edilen DNA

örnekleri kullanıldı. Tail-1 PCR sonucu oluşan ürünler 1/40 sulandırılıp bundan Tail-2 için 1 µL kullanıldı. Tail-2 PCR ürünleri 1/10 sulandırıldı ve bundan Tail-3 PCR için 1 µL kullanıldı. Kalıp DNA ve AD primerleri sırayla PCR tüplerine dağıtıldı. PCR reaksiyon karışımı hazırlandı, tüplere paylaştırıldı (Tablo 2.7). PCR sonrasında örnekler 2.2.5'te anlatıldığı gibi jelde yürütüldü ve görüntü fotoğraflandı.

**Tablo 2.6 TAIL PCR Döngü Koşulları**

Sıcaklık	Süre	Döngü
<b><u>TAIL-1 PCR Döngüleri</u></b>		
94 °C	1 dakika	5
60 °C	2 dakika	
72 °C	3 dakika	
94 °C	1 dakika	1
25 °C	2 dakika	
72 °C	3 dakika	
94 °C	1 dakika	17
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
45 °C	2.5 dakika	1
72 °C	3.5 dakika	
72 °C	7 dakika	

Tablo 2.6'nın Devamı

<b><u>TAIL-2 PCR Döngüleri</u></b>		
94 °C	1 dakika	12
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
60 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
94 °C	1 dakika	
45 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dak	
72 °C	1 dakika	
<b><u>TAIL-3 PCR Döngüleri</u></b>		
94 °C	1 dakika	20
45 °C	2.5 dakika	
72 °C	3.5 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Tablo 2.7 Tail PCR Reaksiyon Karışımları

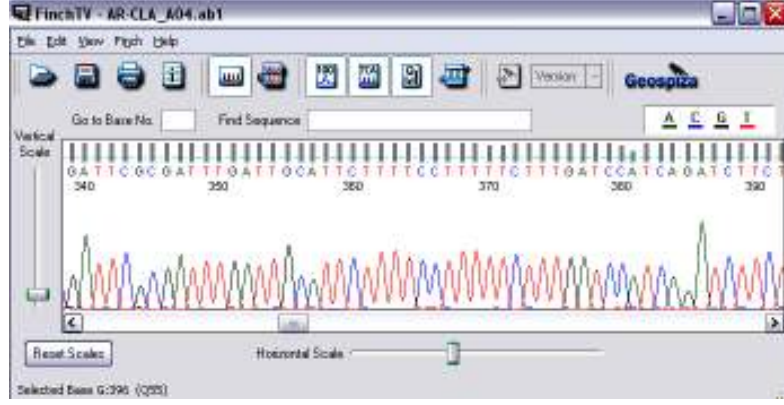
<b>Bileşen İsmi</b>	<b>Miktar</b>
<b>TAIL-1 (Toplam Hacim 20 µL)</b>	
Tampon	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
AD primer	5 µL
T1 Primer	1 µL
DMSO	1 µL
dNTP karışım	0.5 µL (10 mM)
Kalıp	1 µL
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 µL

Tablo 2.7'nin Devamı

TAIL-2 (Toplam Hacim 25 $\mu$ L )	
Tampon	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ L
AD primer	5 $\mu$ L
T2 Primer	1 $\mu$ L
DMSO	1 $\mu$ L
dNTP karışım	0.5 $\mu$ L (10 mM)
Kalıp	1 $\mu$ L
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 $\mu$ L
Nükleazlardan arındırılmış su	12 $\mu$ L
TAIL-3 (Toplam Hacim 50 $\mu$ L)	
Tampon	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ L
AD primer	10 $\mu$ L
T3 Primer	2 $\mu$ L
DMSO	3 $\mu$ L
dNTP karışım	1 $\mu$ L (10mM)
Kalıp	1 $\mu$ L
Taq Pol (Rec, Fermentas)	0.5 $\mu$ L
Nükleazlardan arındırılmış su	24.5 $\mu$ L

#### 2.4 Polimorfizm Analizi

Polimorfizm tespiti içinde 24 farklı zeytin bitkisinin DNA'larıyla PCR yapıldı ve dizilemeye gönderildi. Bunlardan 18'inin kromotogramları sağlandı. Kromotogramın sağlamlığı FinchTV programıyla (şekil 2.9) tespit edildi. Bioedit programında kendi dizimle diğer 18 örneği karşılaştırılması sonucunda polimorfizm olup olmadığı varsa nerelerde olduğu tespit edildi.



**Şekil 2.9** Kromotogramların sağlamlığının kontrolünün yapıldığı FinchTV programı. (Adenini yeşil, sitozini mavi, guanini siyah, timini ise kırmızı renk temsil etmektedir.)

Polimorfizm analizi Arbequin, Ascolana, Carmena, Çakır, Domat, Erkence, Hojiblanca, İzmir sofralık, Kiraz, Memecik, Samanlı, Vertical, UB1, UB10, 0108, 0308 zeytin türleriyle yapıldı. Bölüm 2. 2. 3'te anlatılan DNA izolasyon yöntemiyle yapraktan DNA izolasyonu yapıldı. Tablo 2.1'deki primerlerden yararlanıldı ve Tablo 2.2'deki PCR koşulları ile Tablo 2.3'teki PCR reaksiyon karışımı kullanıldı. PCR ürünleri jelde yürütülüp fotoğraflandı ve daha sonra anlaşmalı ticari firmaya dizilenmek üzere gönderildi. Gelen sonuçlar FinchTV programında kromotogramları kontrol edildikten sonra BioEdit programıyla polimorfizm oranları tespit edildi.

## 2.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

ZtbZIP geninin Real-Time PCR analizi ile yersel ve zamansal olarak ekspresyon seviyeleri çalışılmaya karar verildi. Zamansal analiz için 12ay boyunca belirli aralıklarla gemlik çeşidi zeytinden var ve yok yılına ait örnekler toplandı (Şekil 2.10). Amaç, hangi aylarda ekspresyon seviyesinin arttığını gözlemlemektir. Yersel analizi ise yaprak, sürgün, çiçek, tomurcuk ve meyve örnekleriyle yapıldı. Amacımız bitkinin hangi bölgesinde daha fazla sentezlendiğini bulmaktır.



**Şekil 2.10** On iki ay boyunca örnek toplanan var ve yok yılına ait zeytin ağaçları.

### 2.5.1 RNA İzolasyonu

Real-Time PCR’da kalıp olarak kullanılacak cDNA örneklerini elde etmek için 12 ay boyunca, var yılı ve yok yılı olarak belirlenen iki ağaçtan toplanan yaprak, meyve, sürgün, çiçek ve tomurcuk gibi dokulardan RNA izolasyonu yapıldı.

Örneklerin toplanma tarihi ve hava durumu Tablo 2.8’de görülmektedir. RNA izolasyonu için RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Kit tarifesinin takip edildiği izolasyonda özetle aşağıdaki gibi yapıldı:

Ezilen örnekler (Yaklaşık 100 mg) ependorf tüpüne aktarıldı. Sıvı azotun uçması beklendi. Örnekler erimeden 450 µL merkaptotanol ilave edilmiş RLT tamponu eklendi. Vorteks yapıldı ve örnekler 56 °C’de üç dakika su banyosunda inkübe edildi. Elde edilen karışım lila kolon bulunduran toplama tüpüne aktarıldı ve iki dakika 15000 X g’de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant çökeltiye (pellet) dokunulmadan yeni bir ependorfa alındı. İçerisine kendi hacminin yarısı kadar

%96'lık etanol eklendi ve hemen pipetaj yapıldı. Beklenmeden numune (yaklaşık 650 µL) pembe renkli kolon barındıran toplama tüpüne aktarıldı. 15 saniye 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atıldı. Bu aşamadan sonra DNA kirliliğinden kurtulmak için On-column DNase Digestion kiti (Sigma, Almanya) uygulandı. Bu yöntem özetle şu şekilde yapıldı.

Pembe renkli kolona 350 µL RW1 tamponu eklendi ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirildi. 10 µL DNase I, 70 µL RDD tamponundan oluşan 80 µL'lik DNase stok solüsyonu kolona eklendi ve 20-30 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Ardından 350 µL RW1 tamponu eklendi 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirildi. Bu aşamadan sonra protokole geri dönüldü. Kolona 500 µL RPE tamponu eklendi ve 15 sn 12000 X g'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne geçirilerek 15000 X g'de bir dakika santrifüj edildi. Etanolden uzaklaştırma işleminden sonra kolon 1.5 mL'lik yeni bir toplama tüpüne dikkatlice yerleştirildi. 30 µL RNaz'lerden arındırılmış su, tam kolonun zarına gelecek şekilde eklendi ve 5 dakika inkübe edildikten sonra 12000 X g'de bir dakika santrifüj edildi. Örnekler -20 °C'de saklandı.

**Tablo 2.8** Var ve yok yılı örneklerin toplanma tarihi ve hava durumu

AY	GÜN-YIL	HAVA DURUMU
Nisan (N)	15-2010	19 °C, Güneşli
Mayıs (MY)	14-2010	15 °C, Güneşli
Haziran (H)	17-2010	33 °C, Güneşli
Temmuz (T)	15-2010	37 °C, Güneşli
Ağustos (A)	18-2010	32°C, Güneşli
Eylül (E)	22-2010	28 °C, Güneşli
Ekim (EK)	19-2010	16 °C, Parçalı Bulutlu
Kasım (K)	22-2010	14 °C, Kapalı
Aralık (A)	22-2010	13 °C, Kapalı
Ocak (O)	19-2011	12 °C, Kapalı
Şubat (Ş)	21-2011	10 °C, Az Yağışlı
Mart (M)	16-2011	19 °C, Güneşli

### 2.5.2 Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RNA'dan cDNA elde ederken RT-PCR kullanıldı. RNA örneklerinden cDNA eldesi için RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas katalog no: K1622) kullanıldı. 5 µL total RNA örneğine 1 µL oligo dT, 6 µL nükleazlardan arındırılmış su eklendi ve pipetaj yapılarak 70 °C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra 4 µL 5X reaksiyon tamponu, 1 µL ribonükleaz inhibitörü, 2 µL 10 mM'lık dNTP eklenerek 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Bütün bu işlemlerin sonunda 1 µL revers transkriptaz enzimi eklendi ve 42 °C'de 1 saat inkübe edildi. cDNA örnekleri bu şekilde hazırlanmış oldu.

### 2.5.3 Real-Time PCR

ZtbZIP'in hangi aylarda, hangi dokuda ne kadar sentezlendiğini bulabilmek için Real Time PCR tekniğinden yararlanıldı. Bunun için Light Cycler 480 PCR (Roche, Almanya) cihazı ve LC 480 Sybr Green kiti (Roche, Almanya) kullanıldı. Real-Time PCR primerleri Tablo 2.9'da, Real-Time PCR döngü koşulları Tablo 2.10'da gösterilmiştir.

Real-Time PCR için sağ ve sol primerler Primer 3 [53] programında dizaynedildi. Primerler sulandırılmış olarak alındı. 100 µM'lık stoktan 5 µM'lık çalışma solüsyonu hazırlandı.

**Tablo 2.9** Real Time PCR'da Kullanılan Primerler

Primer Adları	Primerler
Sol Primer	5'- CATTAACATCACCACACAGAATTACAT-3'
Sağ Primer	5'- ACAATAAGACAAATCTCTCTACTCGTTG-3'
GAPDH-Sol	5'- TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3'
GAPDH-Sağ	5'- CGCCCCACTTGATTTTGGA-3'

**Tablo 2. 10** Real Time PCR Döngü Koşulları

DÖNGÜ ADLARI	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
İlk Ayrılma	95 °C	5 dakika	1
Ayrılma	95 °C	20 saniye	40
Bağlanma	50 °C	20 saniye	
Uzama	72 °C	20 saniye	
Erime Eğrisi	95 °C	20 saniye	1
Soğutma	40 °C	30 saniye	1

### 2.5.3.1 Real-Time PCR Plate'inin Hazırlanması

Çalışmada Roche firmasının LightCycler® 480 SW 1.5 cihazına ait 384'lük plateti kullanıldı. Örnekler güvenilirlik açısından 3 tekrarlı olarak platelere konuldu. Deneyde konsantrasyonların karşılaştırılabilmesi açısından konsantrasyonunu bildiğimiz bir numune (plazmit) standart olarak kullanıldı. Standartlar için de her sulandırma basamağı 3 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. Sentez miktarı (ekspresyon) ölçülen genin GAPDH'e (GenBank Erişim No: AM933453) göre kaç kat sentezlendiğini bulabilmek için her örnekten Tablo 2.9'da gösterilen iki farklı primer çiftiyle PCR yapıldı. GAPDH primerleri ile yapılan örnekler de 3 tekrarlı yapıldı.

## 2.6 ZtbZIP'in *Pichia* Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

### 2.6.1 cDNA'nın Çoğaltılması

ZtbZIP cDNA'sı Tablo 2.2'de gösterilen reaksiyon koşullarında ve Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımıyla PCR'ı yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri

ligasyon aşamasında kullanıldı. Bu aşamada kesim bölgelerine uygun bir şekilde dizaynedilen ekspresyon primeri adını verdiğimiz primerler kullanıldı.

Sol primer 5'-ATTATATTCAAATGGGTTCTTCTAGTGG-3', sağ primer 5'-ACAATAAGACAAATCTCTCTACTCGTTG-3' olarak dizayn edildi. Bunlardan 5 µM'lık çalışma solüsyonu hazırlandı. Tablo 2.2'deki PCR koşulları ile Tablo 2.3'teki PCR reaksiyon karışımı kullanıldı.

### 2.6.2 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

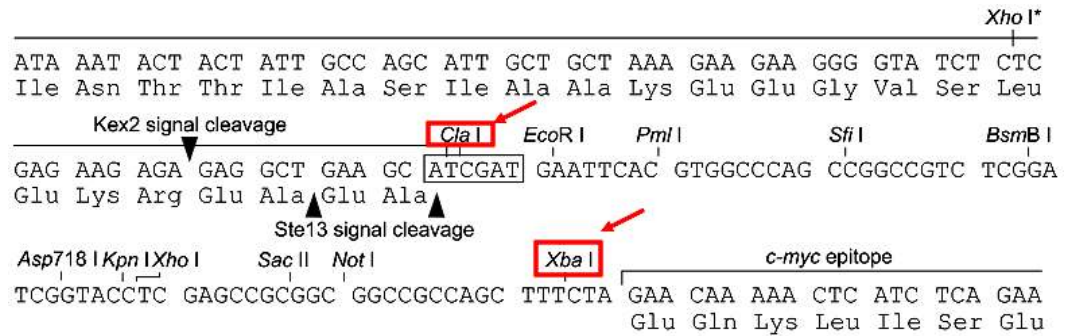
İnsert miktar ve konsatrasyonunu arttırmak için PCR 50 µL'lik hacimde 4 ayrı tüpte yapıldı. PCR sonrasında örnekler 2.2.5'inci bölümde anlatıldığı gibi jelde koşturuldu. İstenilen bantların elde edildiği gözlemlendi ve örnekler jelden geri kazanıldı. Jelden geri kazanma için GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, Almanya) kullanıldı. Kit tarifesinin takip edildiği bu aşama için özetle şu yol takip edildi:

Ependorf tüpleri boşken tartıldı ve çıkan değer not edildi. Jel görüntülemeye elde edilen bantlar kısa sürede, dikkatlice kesilerek ependorf tüplerine koyuldu. Jel ağırlığı tespit edildikten sonra jel ağırlığının üç katı kadar (100 mg jel varsa 300 µL) jel çözücü solüsyon eklendi ve 55 °C'de 10 dakika jel tamamıyla çözünene kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresince her üç dakikada vortex cihazı ile karıştırıldı. Kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi ve 500 µL kolon hazırlama solüsyonu eklenerek 13000 X g'de santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. Çözelti içerisine başlangıçtaki jel miktarı kadar %100 isopropanol eklendi ve homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapıldı. Çözünmüş jel karışımı hazırlanan kolonlara aktarıldı. 13000 X g'de bir dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. 700 µL yıkama solüsyonu eklendi ve bir dakika 13000 X g'de santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı. Kolon toplama tüpüne yerleştirildi ve bir kez de etanolden arındırmak için boş santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 30 µL elüsyon tamponu eklenerek 5 dakika beklendi. Sonrasında 13000g'de 1dakika santrifüj yapıldı. Tekrar 20 µL elüsyon tamponu eklendi ve beş dakika beklendi. 13000 X

g’de bir dakika santrifüj yapıldı. Bu şekilde jelden kazanma 50 µL’lik son hacimle tamamlanmış oldu.

### 2.6.3 Ekspresyon Primerlerinin Dizayını

Klonlama çalışmalarında EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen Cat.no.K1740–01) kullanıldı. Klonlamada, bulundurduğu restriksiyon bölgeleri hedef cDNA dizisi için diğerlerine göre daha uygun olduğundan kit içerisinde bulunan zeozin direnç geni barındıran pPICZαC vektörü (Invitrogen, A.B.D.) kullanıldı. Bu vektör mayada üretilen proteinin hücre dışarısına verilmesini sağlayan α sinyali barındırmaktadır ve içerisine girdiği hücreye zeozin antibiyotigine karşı direnç sağlar. Bu şekilde vektörü alan transformantlar tespit edilir. Primerler içerisinde vektörle uyumlu restriksiyon tanıma bölgeleri düzenlendi. Çerçeve kaymaması için kesim sonrasında vektör ve ZtbZIP dizilerinden gelecek nükleotitler kontrol edildi. Dizinin sol ucunun kesimi için *Cla*I (Fermentas, Litvanya), sağ ucunun kesimi içinse *Xba*I (Fermentas, Litvanya) enzimleri seçildi (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 pPICZαC vektörü dizisi üzerindeki ZtbZIP ile uyumlu restriksiyon enzimleri.

#### 2.6.4 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim

Kesim vektör için 20 µL, cDNA için 30 µL toplam hacimde yapıldı. Vektör kesiminde hazırlanan karışım içerisine 350 ng'lık vektörden toplamda 1µg olabilmesi için 4 µL vektör, 1 µL (1 ünite) *ClaI* enzimi, 1 µL (1 ünite) *XbaI* enzimi, 2 µL 10X tampon ve 12 µL su; cDNA kesiminde hazırlanan karışım içerisine 200 ng'lık cDNA'dan toplamda 1 µg olabilmesi için 5 µL, 1.5 µL (1.5 ünite) *Cla I* enzimi, 1.5 µL (1.5 ünite) *XbaI* enzimi, 3 µL 10X tampon ve 19 µL su koyuldu. 37 °C'de 1 saat etüvde inkübe edildi. Kesimden sonra 2. 6. 1'inci bölümde anlatıldığı gibi saflaştırma yapıldı. Kesilmiş vektör jele yüklenerek geri kazanıldı, cDNA ise jele yüklenmeden saflaştırıldı. cDNA enzim ve diğer bileşenlerden ayırmak için saflaştırıldı.

#### 2.6.5 Ligasyon

Restriksiyon enzimleriyle kesilen gen ve ekspresyon vektörü T4 DNA Ligaz (5 U / µL, Fermentas, Litvanya) enzimi ile 22 °C'de, 45 dakika ligasyona bırakıldı. Enzimin kullanım talimatına göre karışım, 100 ng (1 µL ) vektör, 3 katı olacak şekilde 300 ng (10 µL) insert, 2 µL 10X tampon, 1 µL (1/5 sulandırılmış, 1 ünite) T4 DNA ligaz enzimi, 6 µL su katılarak toplam 20 µL hacimde hazırlandı.

#### 2.6.6 Transformasyon

Ligasyon ürününün 5 µL'si toplam hacmin 1/10 miktarı olacak şekilde 50 µL'lik *E.coli* DH10B suşuna transforme edildi. Transformasyonda şu yol takip edildi: -80 °C dolabından buza transfer edilen kompetan hücreler (50 µL ) içerisine 5 µL'lik ligasyon ürünü eklendi ve karışım 20 dakika buzda bekletildi. Sonrasında 42 °C'de 1.5 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra tekrar 2 dakika buzda bekletildi (Bu aşamalar sırasında çok hızlı olundu.). 55 µL'lik bu karışım 950 µL'lik sıvı LB besiyerine aktarıldı ve 1.5 saat, 37 °C'de, 240 rpm'de etüvde çalkalandı. 1.5 saat

sonunda 1 mL inokülasyon ürünü 500 µL, 250 µL ve 250 µL olarak zeozin antibiyotiği bulunduran 3 adet petriye yayıldı.

Transformasyon işleminin başarılı olup olmadığını anlayabilmek için ligasyon ürünü ile birlikte 0.5 µL boş halkasal vektör (50 ng) de kompetana transforme edildi. Kompetan canlılığı sadece kompetanın zeozinsiz petriye ekilmesiyle test edildi. Boş hücreler aynı zamanda zeozin yeterlilik testi için zeozinli petriye ekildi. Başarılı transformasyonlarda zeozinli petriye ekilen boş hücreler ölürken antibiyotiksiz ortamda çok fazla üreme gözlemlendi. Boş (insertsüz) vektör zeozinli ortamda çok fazla koloni oluşturdu. Ligasyon başarılı olduğunda zeozinli petrilerde üreme gözlemlendi.

#### 2.6.7 Zeozin ve LB Besiyerinin Hazırlanması

Kit içerisindeki 100 mg'lık zeozinden deneylerde 25 µg / µL'lik zeozin kullanabilmek için 250 µL zeozin alındı ve 750 µL su ile çözelti oluşturuldu. Bu çalışma solüsyonundan LB içine bire bir konuldu (500 µL LB'ye 500 µL zeozin). LB besiyerlerinin hazırlanması Tablo 2.11'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.11** LB Besiyerlerinin Hazırlanması

<b>Sıvı LB Besiyeri (500 mL)</b>	
<b>Tripton</b>	5 g
<b>Maya Ekstraktı</b>	2.5 g
<b>NaCl</b>	5 g
<b>LB Agar (500 mL)</b>	
<b>Tripton</b>	5 g
<b>Maya Ekstraktı</b>	2.5 g

Tablo 2.11'in devamı

<b>NaCl</b>	5 g
<b>Agar</b>	7.5 g
<b>Zeozinli Sıvı LB (500 mL)</b>	
<b>Tripton</b>	5 g
<b>Maya Ekstraktı</b>	2.5 g
<b>NaCl</b>	5 g
<b>Zeozin (İnvitrogen)</b>	500 µL
<b>Zeozinli LB Agar (500 mL)</b>	
<b>Tripton</b>	5 g
<b>Maya Ekstraktı</b>	2.5 g
<b>NaCl</b>	5 g
<b>Agar</b>	7.5
<b>Zeozin</b>	500 µL

### 2.6.8 Kompetan Hücre Hazırlanması

Kompetan hale getirilecek *E.coli* (DH10B) hücreleri LB agar petrilere yayıldı. 37 °C'de bir gece inkübe edildi ve tek koloni düşürüldü. Tek koloni sıyrılarak 10 mL sıvı LB'de bir gece inoküle edildi. 250 mL'lik erlen içerisine 100 mL'lik LB koyuldu. Daha önce hazırladığımız ön kültürden buraya 5 mL eklendi. 37 °C'de yaklaşık 4–6 saat kadar inkübe edildi (OD<sub>600</sub> 0.6 – 1 olana kadar). İnoküle edilen 100 mL'lik bakteri kültürü 50 mL'lik 2 falkona bölündü. 3000 rpm'de, 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Başlangıç hacminin yarısı kadar

(25 mL) soğuk (kullanılmadan önce buzda bekletildi) 0.1 M CaCl<sub>2</sub> eklendi. Pipetajla dipteki çökelti çözüldü. 25 dakika buzda bekletildi. Bu işlemlerden sonra 3000 rpm'de, 5 dakika 4 °C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra başlangıç hacminin 1/10'u kadar (5 mL) soğuk, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> eklendi. Pipetajla çökelti çözüldü. Hazırlanan kompetan hücre çözeltisi ependorflara, tek kullanımlık olması için 50 µL'lik miktarlarda paylaştırıldı.

### 2.6.9 Koloni Tarama

Transformasyon sonrası oluşan kolonilere pipet ucu değdirildi ve her biri 10 µL su ile karıştırıldı. Her örnekten 1 µL kalıp ligasyonun başarılı olup olmadığını anlayabilmek için koloni PCR'da kullanıldı (Tablo 2. 12).

Koloni PCR için vektöre ait AOX-3' ve AOX-5' primerleri sulandırılmış olarak (100 µM) sipariş edildi ve bunlardan 5 µM'lık çalışma solüsyonları hazırlandı (Tablo 2.14). Koloni PCR karışımı Tablo 2.13'da gösterilmektedir. PCR sonrasında örnekler 2.2.5'inci bölümde anlatıldığı gibi jelde koşturuldu ve jel görüntüsü fotoğraflandı.

**Tablo 2.12** Koloni PCR Koşulları

Döngü İsmi	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Ayrılma	95 °C	2 dakika	1
Ayrılma	94 °C	1 dakika	40
Bağlanma	55°C	1 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1

**Tablo 2.13** Koloni PCR Karışımı

<b>Bileşen İsmi</b>	<b>Reaksiyon İçin Kullanılan Miktar (25 µL Toplam Hacim için)</b>
Tampon	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
AOX-3'	0.5 µL
AOX-5'	0.5 µL
dNTP karışım ( 10 mM)	0.4 µL
Kalıp	1 µL
Taq Pol (Fermentas, Litvanya)	0.5 µL
Nükleazlardan arındırılmış su	18.1 µL

**Tablo 2.14** AOX Primerleri

<b>Primer İsmi</b>	<b>Nükleotit Dizisi</b>
<b>AOX-3'</b>	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
<b>AOX-5'</b>	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3

### **2.6.10 Rekombinant Kolonilerden Plazmit İzolasyonu**

Koloni PCR ile başarılı ligasyon ürününü aldığını tespit ettiğimiz hücrelerin oluşturduğu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Bunun için koloni sayısınınca falkonlara 5'er mL zeozinli LB besiyeri koyuldu ve kolonilerden koloni sayısına göre işaretlenen falkonlara inokülasyon yapıldı. 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün plazmit izolasyonu GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bu kite göre izlenen yol özetle şöyle yapıldı:

5 mL'lik kültürden 850 µL alınarak 150 µL gliserolle karıştırıldı, gerektiğinde kültür hazırlayabilmek için oluşturulan gliserol stok -80 °C dolabına kaldırıldı. Kültürün artan kısmı 2 mL'lik 2 ependorfa paylaştırıldı ve 15000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı, bakteri pelletine 200 µL süspansiyon solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı. Sonrasında 200 µL lizis solüsyonu eklendi ve hemen 6 – 8 kez pipetaj yapıldı. Daha sonra 350 µL nötralize edici solüsyon eklendi ve ependorf hafifçe 4 – 6 kez ters düz edildi. 15000 X g'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Süpernatant kolonlara aktarılmadan önce kolonlara 500 µL kolon hazırlama solüsyonu eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Hazır hale gelince süpernatant kolonlara eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. 750 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki sıvı atıldı ve kolon yerleştirilerek bir kez daha bu sefer 15000 X g'de etanolü tamamıyla uzaklaştırabilmek için santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 30 µL elüsyon tamponu eklendi. 5 dakika beklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Tekrar 20 µL elüsyon tamponu eklendi, 5 dakika beklendi ve 12000 X g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Hazırlanan plazmitler - 20 °C'de saklandı.

### **2.6.11 Klonlamanın Kontrolü**

Klonlama olup olmadığını teyit edebilmek için vektör aynı enzimlerle (*Cla*I, *Xba*I) kesime tabi tutuldu. Kesim 30 µL toplam hacimde yapıldı. Karışım 3 µL tampon, 1 µL *Cla*I enzimi, 1 µL *Xba*I enzimi, 1 µg rekombinant vektör (7 µL) ve 18 µL su olacak şekilde hazırlandı. 37 °C'de 1 saat etüvde inkübe edildi. Bölüm 2. 2. 5'te anlatıldığı gibi jelde yürütüldü ve fotoğraflandı.

### **3. BULGULAR**

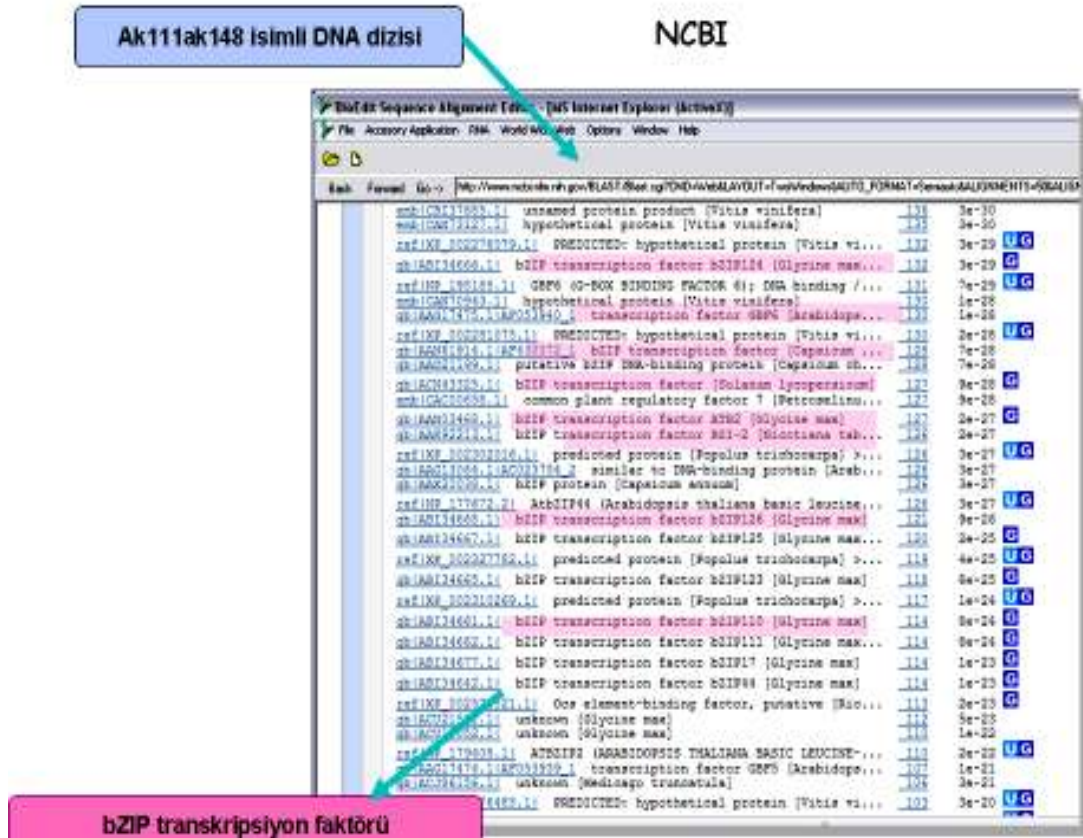
#### **3.1 Tahmini ZtbZIP Transkripsiyon Faktörünün Biyoinformatik Analizi**

##### **3.1.1 NCBI Veri Bankasında Genin BLAST Analizi**

Daha önceki zeytin kütüphanesi çalışmasında elde edilen genlerden ak111ak148 isimli genle çalışmaya karar verildi. İlk olarak NCBI veri tabanında bu genin neye benzediğini bulundu. Pirinç, soya fasulyesi, biber, tütün, havuç bitkilerindeki bZIP transkripsiyon faktörüyle yüksek benzeşme göstermesi (Şekil 3.1) ile genimize tahmini zeytin bZIP geni olduğuna karar verildi.

##### **3.1.2 bZIP Geninin Açık Okuma Çerçevesinin Belirlenmesi**

BioEdit programı [57] kullanılarak dizinin ORF'si bulundu. Protein metiyonin aminoasit ile başlayan 149 amino asitten oluşmaktadır (Şekil 3.2). 780 nükleotid uzunluğundaki dizinin başlangıç kodonu 101'inci ATG nükleotidden başlamaktayken TAT sonlanma kodonuyla 547'inci nükleotidde sona ermektedir (Şekil 3.3). Başlangıç kodonundan önce 100 nükleotitlik bir 5' UTR (Translasyona dahil olmayan bölge) ve 547'den 780'e kadar 3' UTR bölgesine sahiptir.



Şekil 3.1 Genin NCBI veri tabanı sonucu tahmini bZIP transkripsiyon faktörüyle ile benzeşmesi [56].

**ZtbZIP: 101 ile 547: Frame 2 149 aa**

MGSSSGNSSGSSQILNSGSEEDLMDQRKRKRMQSNRESAKRSMRK  
 QKHLDELTAQSAQIQKENSQLLTSINITTQNYMNEAENSVIRAWITE  
 LSQRLQSLNEIATAAGGGGATTNNWAEESFMNPWNLMYFSQQPIV  
 ASSPGAFNY

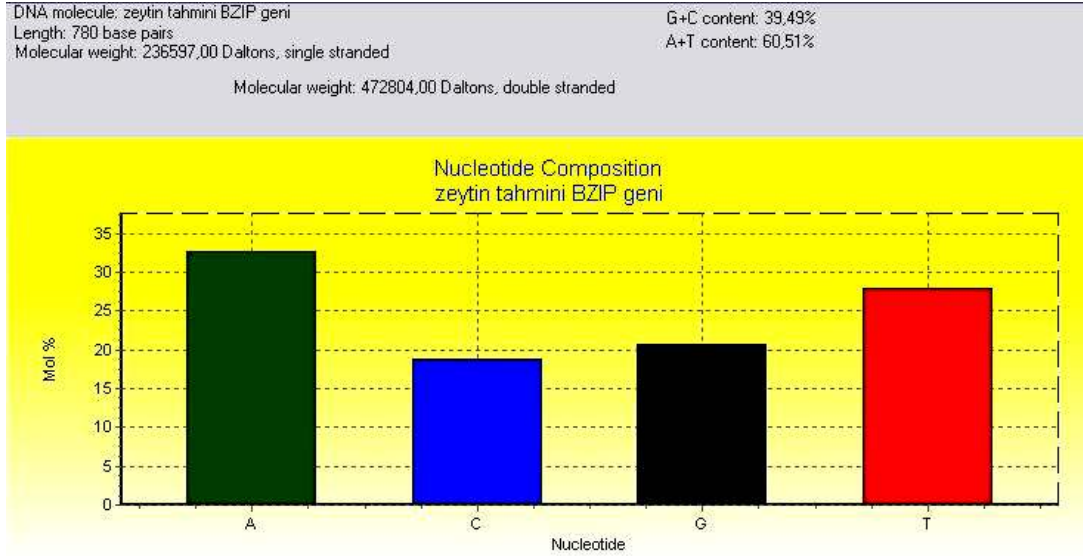
Şekil 3.2 ZtbZIP transkripsiyon faktörüne ait ORF.

```
TCTTCTAGAAaGaTGTCAAaGTTTGGCATCGAGAGTTACCAGATTTCATAAAGG
ATTTTCAGGGCGATTTTGGTGCACGTCAGAGCCGATTATATTCAAATGGGTTCT
TCTAGTGGCAACTCTTCAGGGTCTTCACAGATTCTGAATTCAGGTTCTGAAGAA
GATCTGATGGATCAAAGAAAAAGGAAAAGAATGCAATCAAATCGCGAATCGGC
AAAACGATCCCGAATGAGAAAACAGAAGCATTGGACGAATTAACAGCCCAAT
CGGCTCAAATTCAGAAGGAAAACAGCCAACTTCTCACAAGCATTAACATCACC
ACACAGAATTACATGAATATTGAGGCTGAAAATTCTGTCATAAGGGCTTGGATT
ACGGAACTTAGCCAAAGATTACAGTCCCTGAATGAAATCATCGCCACCGCCGC
GGGAGGAGGAGGCGCCACCACCAACAACACTGGGCGGAGGAATCTTTCATGAATC
CATGGAACTTAATGTACTTTAGCCAACAGCCCATCGTGGCATCATCTCCTGGTG
CATTTAATTATTGATCAACAGCTTGAGAAAATTGTGTGGTGAGATCTGCATTCA
Stop Kodonu
ACGAGTAGAGAGATTTGTCTTATTGTCTCATTATTTAACTACTTTTTCTATGATG
TTCTGTGTTTCGTGCGTGTATTGTAATAAAATATGTTCTTGGTATGTAGATGAGTAA
ATATCGATAATAAATGAATAAATATGTATGTAATTCTCCTTTTTAAAAAAAAAAA
TCTTGCTGAAAAACTCGAGCCATCCG
```

**Şekil 3.3** ZtbZIP nükleotid dizisinin başlangıç ve sonlanma kodonlarının yerleri.

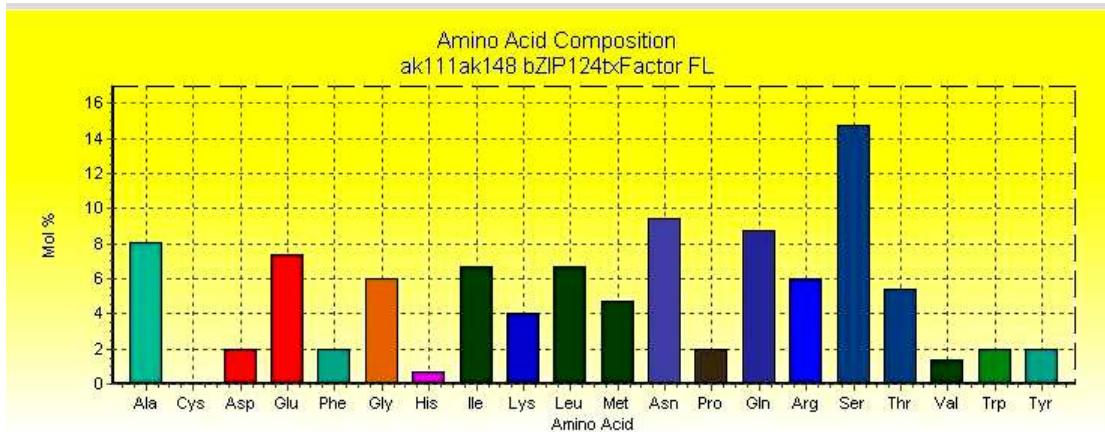
### 3.1.3 Nükleotid ve Amino Asit Kompozisyonunun Bulunması

BioEdit programında [57] nükleotid kompozisyonuna bakıldığında tek zincirinin moleküler ağırlığı 236597 Dalton bulundu. Adenin %32.6, Sitozin %18.85, Guanin %20.64, Timin %27.82 oranında bulundu. G+C içeriği %39.49 iken A+T içeriği %60.51 olarak bulundu (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 ZtbZIP'in BioEdit programında [57] nükleotid kompozisyonunun yüzde değerleri.

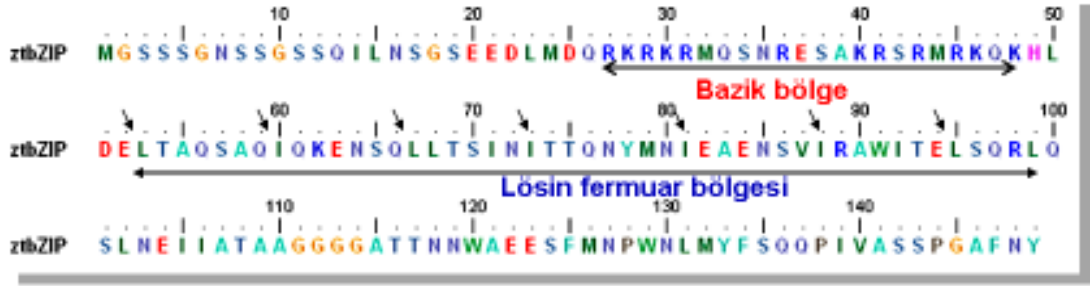
Aminoasit kompozisyonu ise 149 aa oluşmakta ve 20 çeşit aa'in dizideki dağılım yüzdeleri şekil 3.5'te gösterildi. Serin, asparjin, glutamin, treonin polar yüksüz aminoasit değerleri yüksektir. Sistein aminoasiti ise hiç bulunmadığı tespit edildi.



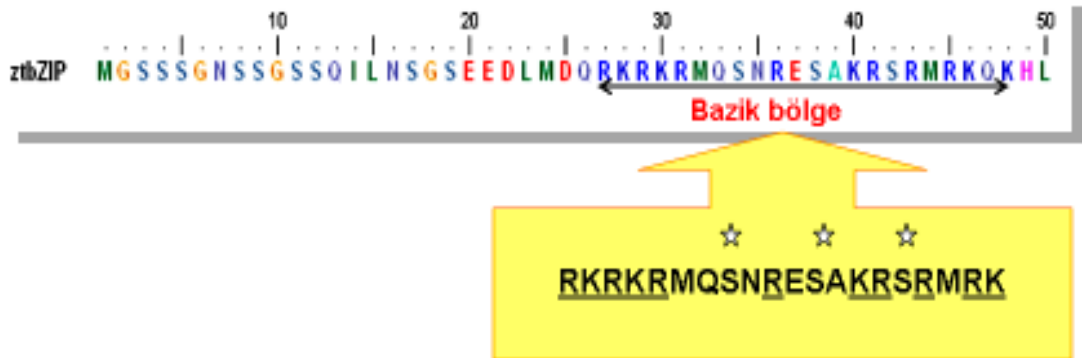
Şekil 3.5 ZtbZIP'in BioEdit programında [57] amino asit kompozisyonunun yüzde değerleri.

### 3.1.4 Bazık Domen ve Lösın Fermuar Domeninin Belirlenmesi

ZtbZIP transkripsiyon faktörü iki alt domeinden oluşmaktadır. Bu domenler bölüm 1.1.1.3'te bahsedildiği gibi bazık bölge ve lösın fermuar bölgesinden oluşmaktadır. Lösın bölgesinde ise her yedi amino asitte bir lösın veya izolösın aminoasitine rastlandı (Şekil 3.6). Bazık bölge isminden de anlaşılın kuvvetli bazık amino asitlerden oluştuğu ve yine bu bölgede DNA ile fosfodiester bağı yapan serin rezidülerinin yerleri tespit edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 ZtbZIP transkripsiyon faktörünün bazık ve lösın fermuar bölgeleri.

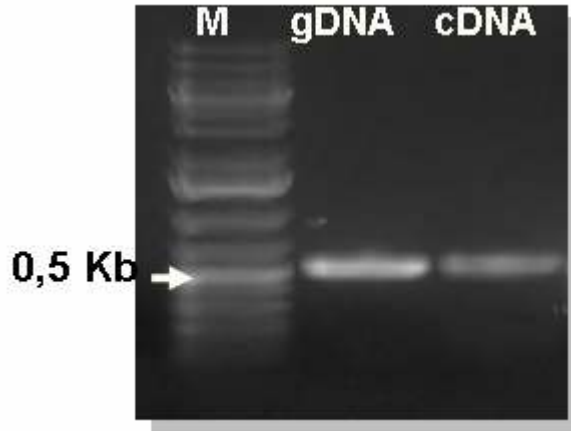


Şekil 3.7 Bazık bölgede bulunan kuvvetli bazık amino asitler ve serin rezidülerinin dizi üzerindeki yerleri.

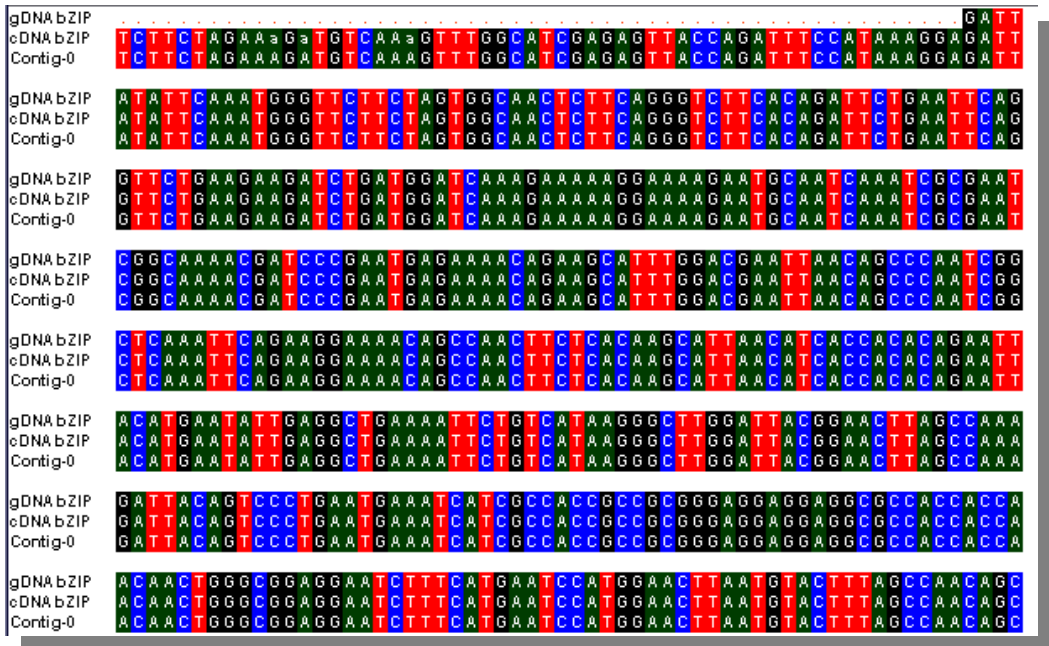
(Yıldızla belirtilen yer serin amino asitlerini, altı çizili olanlar ise kuvvetli bazlar olan arjinin ve lizin amino asitlerini göstermektedir.)

### 3.2 İtron Analizi

ZtbZIP transripsiyon faktöründeki intron varlığı ya da yokluğunun tespiti için gDNA ve cDNA PCR ürünlerini agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek yaklaşık 600 nükleotidlik bant büyüklüğü gözlemlendi (Şekil 3.8). Dizilemeye gönderilen PCR ürünleri sonuçları BioEdit programında [57] incelendiğinde gende intron olmadığı tespit edildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.8 ZtbZIP'in gDNA ve cDNA'sına ait jel görüntüsü. (Bant büyüklükleri eşit ve yaklaşık 600 nükleotiddir. M-marker)



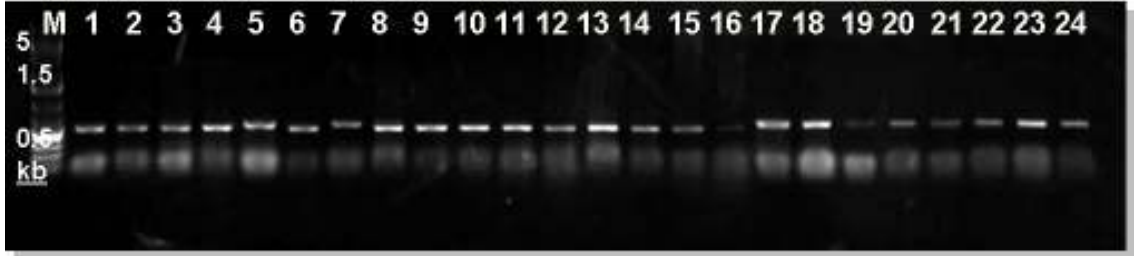
Şekil 3.9 ZtbZIP'in BioEdit programında gDNA ve cDNA dizilerinin karşılaştırılması.



### 3.4 Polimorfizm Analizi

Polimorfizm tespiti içinde 24 farklı zeytin bitkisinin DNA'larıyla PCR yapıldı, jelde görüntülendi (Şekil 3.12) ve dizilemeye gönderildi. Bunlardan 18'inin kromatogramları sağlandı. BioEdit programında [57] kendi dizimle diğer 18 örneğin karşılaştırılması sonucunda Çakır ve Memecik çeşitlerinin 141. nükleotidlerinde tek nükleotid değişikliğine rastlandı (Şekil 3.13). Çakır ve Memecik'in kromatogramlarına bakılarak doğruluğu teyit edildi (Şekil 3.14). Çakır ve Memecik'teki guanin nükleotidin piklerinin sağlam olduğu görüldü.

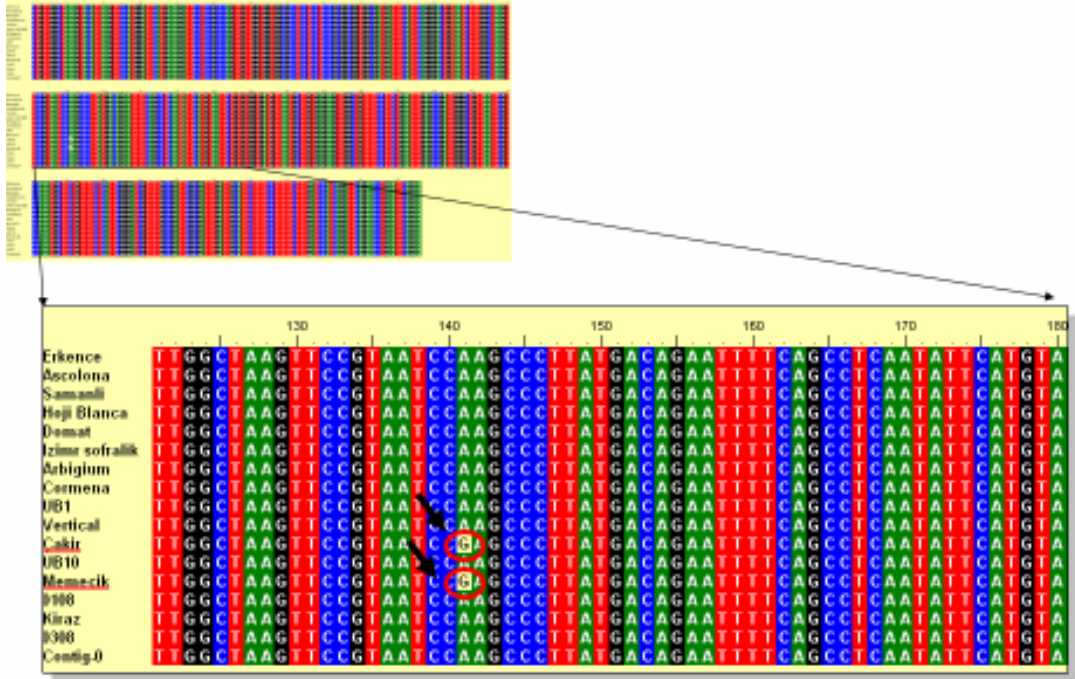
“Bu nükleotid değişikliği acaba amino asit değişikliğine de neden oluyor mu?” diye bakıldığında; Zeytin çeşitlerinin genelinde triptofan (W) amino asidi varken Çakır ve Memecik çeşitlerinde arjinin (R) amino asidine rastlandı (Şekil 3.15).



**Şekil 3.12** Zeytin tahmini bZIP (ztbZIP) geninin bazı zeytin çeşitlerinin genomik DNA örneklerinden PCR ile çoğaltılması.

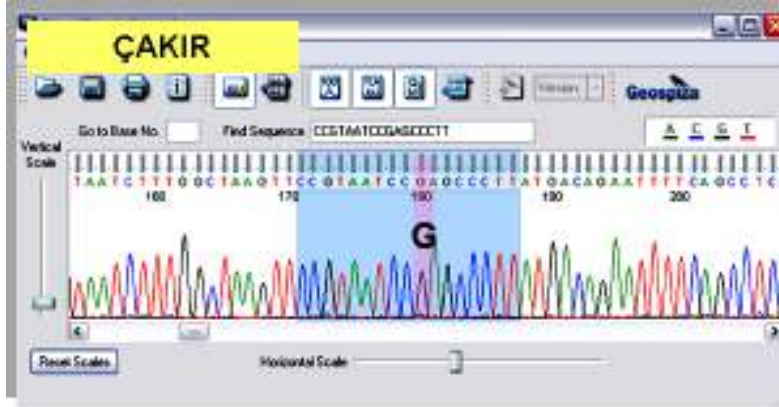
M. Belirteç, 1. Arbequin, 2. Hojiblanca, 3. Carmena, 4. UB1, 5. UB3, 6. UB10, 7. UB10(2), 8. Ascolana, 9. 0308, 10. 0108, 11. Samanlı, 12. Erkence, 13. Gordales, 14. Verdial, 15. İzmir sofralık, 16. Domat, 17. Memecik, 18. Çakır, 19. Karamürsel su, 20. Edincik su, 21. 0308(2), 22. 0108(2) 23. Kiraz 24. Uslu

PCR, tahmini zeytin bZIP geninin cDNA'sının tamamını (yaklaşık 600nt) çoğaltmak üzere tasarlanmış primerle yapıldı. (Sol primer: 5'-TAATTTAAAATGGAGATACTGAAAACAGC-3', sağ primer: 5'-AGAGAGAATGCATAACAACATACGATAA-3').

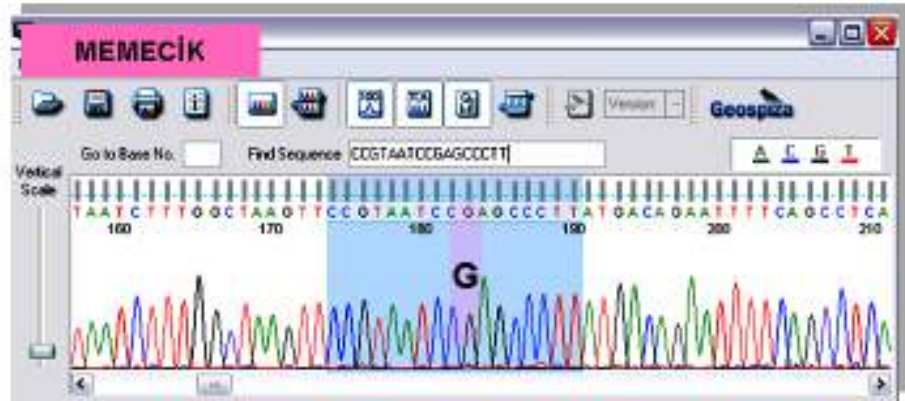


Şekil 3.13 Çakır ve Memecik'teki SNP (tek nükleotid değişikliği).

A)

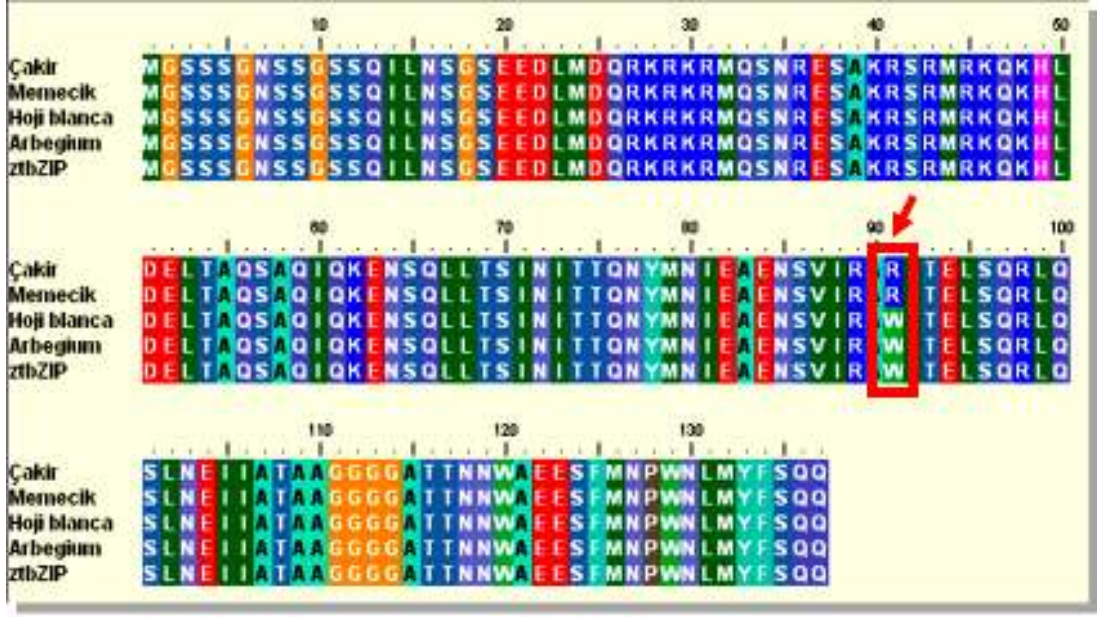


B)



Şekil 3.14 Çakır ve Memecik'in FinchTV'de kromatogram kontrolü.

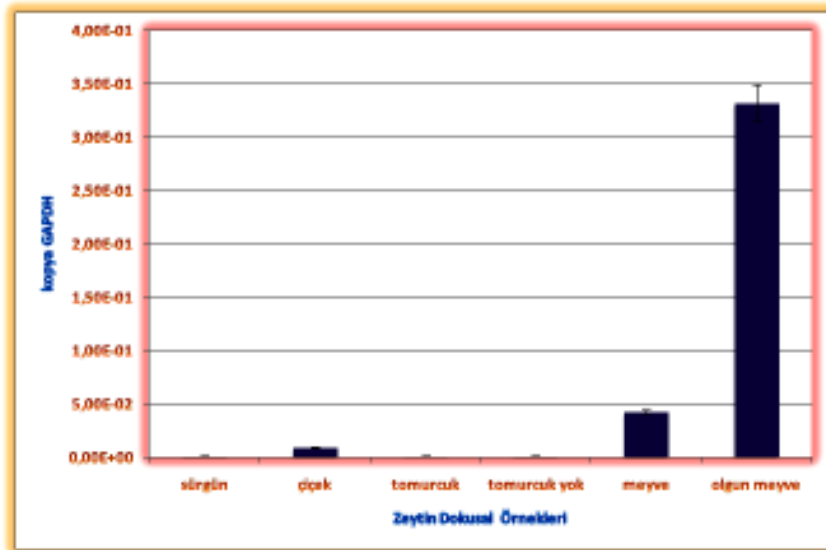
- A) Çakır'ın kromatogramına bakıldığında guanin pikinin sağlam olduğu görülmekte,  
 B) Memecik'in kromatogramına bakıldığında guanin pikinin sağlam olduğu görülüyor.



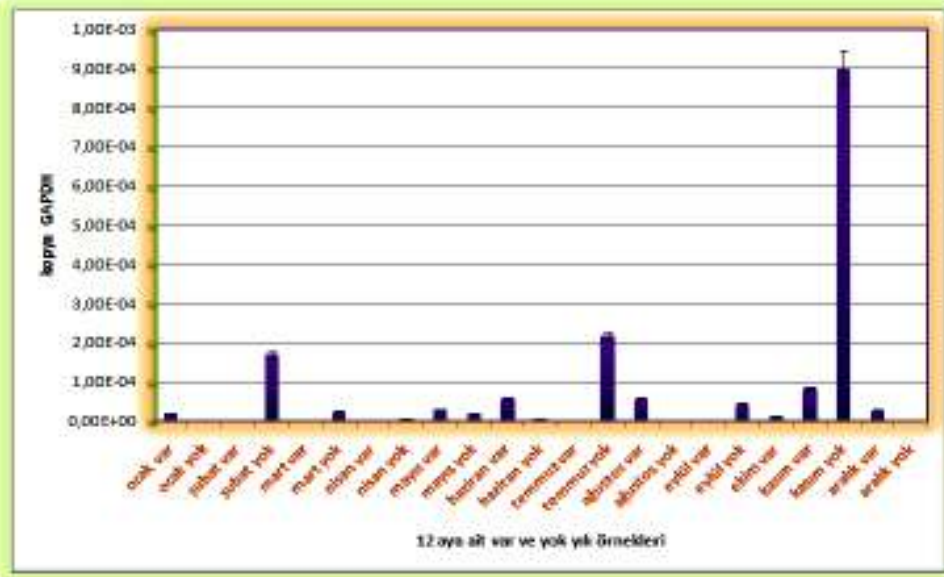
Şekil 3.15 Çakır ve Memecik'teki SNP'nin amino asit değişikliği gerçekleşmesi. Zeytin çeşitlerinin genelinde Triptofan (W) aa. varken Çakır ve Memecik çeşitlerinde Arjinin (R) aa. bulunmaktadır.

### 3.5 Zamansal ve Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Verileri

Tablo 2.8'de görülen örneklerin cDNA örnekleri ile yapılan Real-Time PCR sonuçları dokusal (Şekil 3.15) ve zamansal ekspresyon analizi (Şekil 3.16) olarak grafiklerde gösterilmektedir.



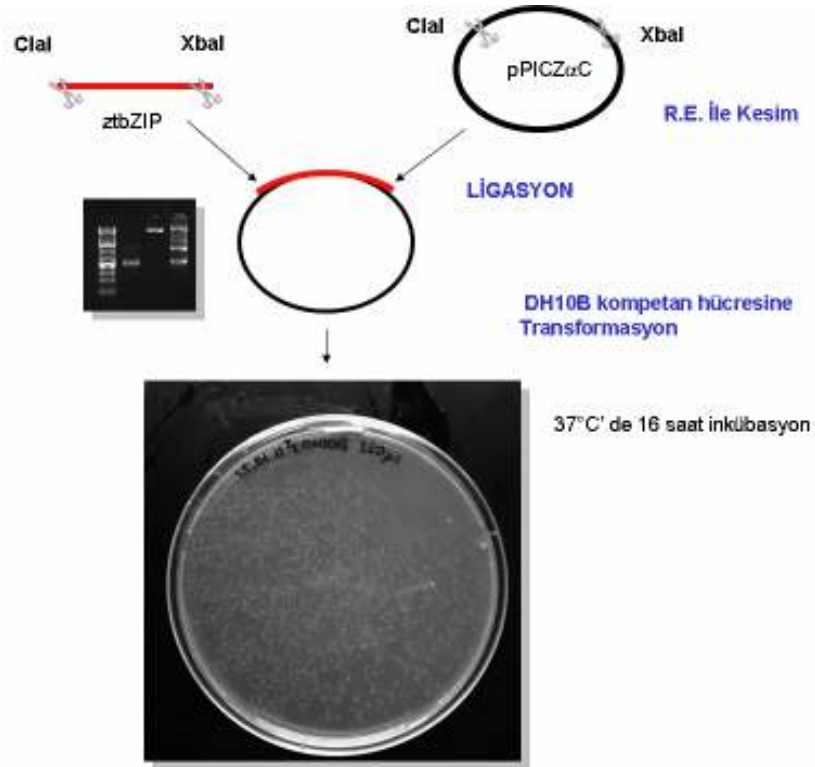
Şekil 3.16 Zeytin tahmini bZIP geninin dokusal mRNA seviyeleri.



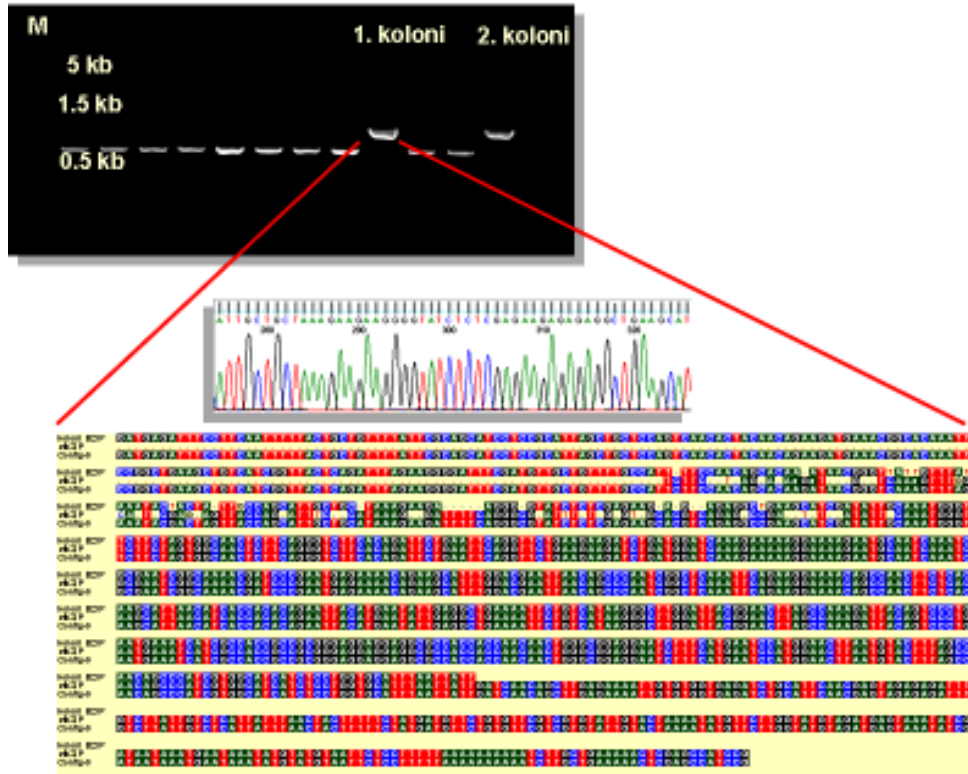
Şekil 3.17 Zeytin tahmini bZIP geninin yapraklardaki zamansal mRNA seviyeleri.

### 3.6 ZtbZIP'in *Pichia* Ekspresyon Vektörüne Klonlanmasının Verileri

Genin pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörüne klonlanması aşamaları ve transformasyon sonuçları şekil 3.17’te gösterildi. Zeozinli petrielerde üreyen koloniler taranarak 2 kolonide rekombinant DNA’ya ulaşıldı. Bu koloniler dizilemeye gönderildi, dizleme sonuçlarının kromatogramları kontrol edilerek BioEdit programında ZtbZIP geniyle karşılaştırarak doğruluğu teyid edildi (Şekil 3.18). Böylece pPICZ $\alpha$ C ekspresyon vektörüne klonlama başarıyla gerçekleşmiş oldu.



Şekil 3.18 Genin ekspresyon vektörüne klonlama aşamaları ve transformasyon sonuçları.



Şekil 3.19 Koloni tarama sonucunu jel görüntüsü, kromatogramdaki piklerin sağlamlığı ve koloni dizisiyle ZtbZIP dizisinin karşılaştırılmış hali.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genin tahmini ZtbZIP transkripsiyon faktörü olduğuna NCBI veri tabanındaki [56] BLAST analizi sonucunda karar verildi. Araştırma bZIP transkripsiyon faktörü üzerine yoğunlaştı. 149 amino asitlik bir protein kodladığı, ORF analizi sonucunda bulundu. Bu bilgi karakterizasyon ve klonlama için önemlidir. Amino asit kompozisyonuna bakıldığında serin ve treonin aminoasitlerinin yüksek oranda bulunması bu transkripsiyon faktörü aday geninin oksijen köprüleriyle farklı ko-faktörleri bağlayabileceğini düşündürmektedir. Ökörtotik proteinlerde fosforilasyon genelde serin, treonin ve tirozin rezidülerinde oluşmaktadır [59, 60]. Serin amino asitinin katalitik fonksiyonların yerine getirilmesinde çok önemli rolleri bulunmaktadır. Ayrıca serin rezidüleri bazik bölgede olduğundan ve bu bölgenin DNA'ya bağlanmasında rol oynarlar. İzolösinin lösün ile benzer oranda varolması lösün fermuar bölgesindeki lösünle aynı görevi yapabileceğini göstermektedir [61].

ZtbZIP transkripsiyon faktörünün bazik bölgesinin ve lösün fermuar bölgesinin amino asit dizisi şekil 3.6'da gösterilmiştir. Bazik bölge, arjinin (R) ve lizin (K) gibi bazik amino asitleri yoğun olarak bulundurmaktadır ve hidrofilik amino asitler arasında bulunan serin fosforilasyon için gerekli amino asit rolünü üstlenmektedir (Şekil 3.7). Lösün fermuar bölgesinde, lösün ve diğer hidrofobik aminoasit olan izolösün yer alabilmektedir. İzolösün de lösün gibi dimerizasyon için gerekli olan hidrofobik yan yüz oluşmaktadır [61].

Genomik DNA ve cDNA ile yapılan analizler sonucunda genin intron içermediği belirlendi. Literatür araştırmalarında bazı bitkilerin bZIP geninde introna rastlanırken bazılarında intron olmadığı görülmüş ve sonucun olağan olduğu düşünülmüştür.

Promotör bölgesinin bulunmasına yönelik TAIL-PCR analizi kullanıldı ve tekrarlayan çalışmalarla genin 5' ucundan 1500 bazlık bant elde edildi. Bu bant Tail3 ve AD2 primerleriyle dizilemeye gönderildi. Dizileme Tail3 primeriyle tek taraflı okumada başarılı oldu. AD2 primeriyle dizileme başarısız oldu. Tek taraflı dizileme sonucu genin 5' ucundan tahmini promotörün 520 nükleotitlik bölgesine ulaşıldı. Dizinin yaklaşık -20'nci bölgesinde tahmini C kutusu (CACGTC) bulundu. Bununla ilgili bilgi bölüm 1.4'te verilmiştir. C kutusu promotör bölgesinin DNA'ya tutunmasını sağlayan tanıma bölgeleridir [63]. AD2 primeriyle dizileme sonucu elde edilemediği için bundan sonraki aşamada saflaştırılmış PCR ürününün bir dizileme vektörüne klonlanıp okutulması planlanmıştır.

Polimorfizm analizi Arbequin, Ascolona, Carmena, Çakır, Domat, Erkence, Hojiblanca, İzmir Sofralık, Kiraz, Memecik, Samanlı, Verdial, UB1, UB10, 0108 ve 0308 isimli 18 farklı zeytin çeşidiyle yapılmıştır. Çalışma sonucunda BioEdit programında [57] ztbZIP ile diğer 18 örneğin karşılaştırılması sonucunda Çakır ve Memecik çeşitlerinin 141. nükleotidlerinde tek nükleotid değişikliğine rastlandı (Şekil 3.13). Çakır ve Memecik'in kromatogramlarına bakılarak doğruluğu teyit edildi (Şekil 3.14). Çakır ve Memecikteki guanin nükleotidin piklerinin sağlam olduğu görüldü. 'Bu nükleotid değişikliği acaba amino asit değişikliğine de neden oluyor mu' diye bakıldığında; zeytin çeşitlerinin genelinde triptofan (W) amino asidi varken Çakır ve Memecik çeşitlerinde arjinin (R) amino asidine rastlandı (Şekil 3.15). Triptofan, bitkilerde çiçeklerin açılması tozlanma ve döllemeyi sağlayan önemli moleküllerin öncü maddesidir [62]. Arjinin ise hidrofilik bir amino asittir ve büyüme hormonunu uyarmaktadır. Bu farklılaşmanın Çakır ve Memecikte fizyolojik bir değişikliğe neden olup olmadığı bir soru işareti oluşturmakta ve ileride yapılacak olan çalışmalarda araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

bZIP transkripsiyon faktörleri ile yoğun olarak çalışılmış ve bu genin; yaprak gelişimi, çiçek gelişimi, tohum gen ekspresyonu, ABA'ya (absisikasite) cevap verme ve giberillin biyosentezi, patojen savunma, ışık ve stres sinyalizasyonu gibi birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur [54, 64, 65]. Bu bilgiler ışığında ztbZIP geninin real - time PCR analizi ile yersel ve zamansal olarak ekspresyon seviyeleri çalışıldı. Zamansal analiz için 12 ay boyunca belirli

aralıklarla Ayvalık zeytin çeşidinden “var” ve “yok” yılına ait örnekler toplandı. Dokusal analizi ise yaprak, sürgün, çiçek, tomurcuk ve meyve örnekleriyle yapıldı. Sonuçlara bakıldığında dokusal analizde en fazla sentezlendiği organ olgun meyve olarak görülmektedir. Mısırdaki yapılan organsal ekspresyon analizinde ise seviye en yüksek yaprakta olduğu görülmektedir [66]. Zeytinde olgun meyvede yüksek seviyede çıkması bu organda görev yapıyor olabileceğini göstermektedir. Zamansal analiz verilerine bakıldığında sonuç şaşırtıcı çıkmıştır. Temmuz var yılına ait bir cDNA kütüphanesinden elde edilmiş olmasından dolayı ekspresyon seviyesinin bu ayda yüksek çıkması beklenmekteydi. Şubat, temmuz ve kasım aylarında yok yılına ait yaprak örneklerinde seviye diğer aylara kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu ekspresyon seviyelerinin farklı olması gen sentezinin ağaçların “var” yılında veya “yok” yılında olmalarıyla ilgili olmadığını, sentez farkının daha başka biyotik ve / veya abiyotik faktörlere bağlı olabileceğini göstermektedir.

ZtbZIP’in enzim aktivitesinin ölçümü çalışması, genin pPICZαC ekspresyon vektörüne (Invitrogen, ABD) klonlanması aşamasına kadar geldi. Bundan sonraki aşamada rekombinant vektör kullanılarak büyük miktarlarda plazmit izolasyonu yapılacak, vektör uygun enzim ile kesilerek maya kompetan hücrelerine transforme edilecek ve kesik vektörün maya genomuna entegre olması sağlanacaktır. Bunun sonucunda protein elde edilecek ve proteinin aktivitesine bakılacaktır.

## KAYNAKÇA

- [1] Çolakoğlu, C. ve Tunalıoğlu, R., “Aydın ilinde zeytin üretimi ile iklim verimleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi”, *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*; **7/1** (2010) 71 – 77.
- [2] Akkale, C., Tanyolac, B., “ SNP analysis in Turkish olive genbank resources”, Town and Country Conversion Center, San Diego, CA, January, (2010) 9-13.
- [3] Tanyolaç, B., “Uzaktan Algılama Tekniği İle Zeytin Ağaç Envanterinin Çıkartılması, Zeytin Çeşitlerinin Ve Yağlarının DNA markörleri Yardımıyla Karakterizasyonu ve Kayıt Altına Alınması” TÜBİTAK 108G016 Nolu Proje Gelişme Raporu (2009).
- [4] Latchman, DS. "Transcription factors: an overview" *.Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29 /12** (1997) 1305-12.
- [5] Karin, M. "Too many transcription factors: positive and negative interactions". *New Biol.*, **2 /2** (1990) 126-31.
- [6] Roeder, RG. "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II". *Trends Biochem. Sci.* **21/9** (1996) 327-35.
- [7] Nikolov, DB., Burley, SK., "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94/1** (1997) 15-22.
- [8] Lee, TI., Young, RA., "Transcription of eukaryotic protein-coding genes". *Annu. Rev. Genet.*, **34** (2000) 77–137.

- [9] Marians, K.J., "Prokaryotic DNA Replication." *Annu. Rev. Biochem* **61** (1992) 673–719.
- [10] Coverley, D., Laskey, R.A., "Regulation of eukaryotic DNA replication." *Annu. Rev. Biochem.*, **63** (1994) 745–76.
- [11] Moss, B., "Regulation of Vaccinia virus Transcription." *Annu. Rev. Biochem.*, **59** (1990) 661–88.
- [12] Stryer, L., *Biochemistry*, W.H. Freeman Company/New York. Third Ed. (1988).
- [13] Van Holde, K.E, *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. (1990).
- [14] Pabo, C.O., "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition." *Annu. Rev. Biochem* **61** (1992) 1053–95.
- [15] Fairall, L., Rhodes, D., Klug, A., "Mapping of the sites of Protection on a 5 S RNA Gene by the Xenopus Transcription Factor IIIA, A model for the Interaction." *J. Mol. Biol.* **192** (1986) 577–591.
- [16] Pabo, C.O., "Protein–DNA Recognition." *Annu. Rev. Biochem.* **53** (1984) 293–321.
- [17] Von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D., McSwiggen, J.A., "Protein–Nucleic acid interactions intranscription: a molecular Analysis." *Annu. Rev. Biochem.* **53** (1984) 389–446.
- [18] Ptashne, M., "A Genetic Switch: Gene Control and Phage  $\lambda$ ." Cambridge, England. Blackwell Scientific and Cell, **128** (1986).

- [19] Harrison, S.C., Aggarwal, A.K., "DNA recognition by proteins with the helix–turn–helix motif." *Annu. Rev. Biochem.* **59** (1990) 933–69.
- [20] Coleman, J.E., "Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins." *Annu. Rev. Biochem.* **61** (1992) 897–946.
- [21] Turner, P. C., McLennan A. G., Bates A. D., White M. R. H., *Moleküler Biyoloji*, ed. Konuk M., Nobel, **228** (2004).
- [22] Klug, W. S., Cummings M. R., *Genetik*, ed. Öner C., Palme, (2003).
- [23] Zipursky, L., Berk, A., Krieger, M., James, E., Harvey, F., Matthew, P., Scott, M., Paul, T., *McGill Lodish 5E Package - Molecular Cell Biology & McGill Activation Code*. San Francisco (1986).
- [24] Stegmaier, P., Kel, AE., Wingender, E., "Systematic DNA-binding domain Classification of transcription factors". *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics* **15 /2** (2004) 276-86.
- [25] Matys, V., Kel-Margoulis, OV., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., Voss, N., Stegmaier, P., Lewicki-Potapov, B., Saxel, H., Kel, AE., Wingender, E., "TRANSFAC<sup>®</sup> and its module TRANSCompel:<sup>®</sup> transcriptional gene regulation in eukaryotes". *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) 108-10.
- [26] Marcu, K.B., Bossone, S.A., Patel, A.J., Myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61** (1992) 809–60.
- [27] Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. The leucine zipper: A Hypothetical structure common to a New Class of DNA–Binding Proteins, *Science*, **240** (1988) 759–1762.

- [28] Johnson, F.F., McKnight, S.L., “Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins.” *Annu. Rev. Biochem.* **58** (1989) 799–839.
- [29] Meshi, T., Iwabuchi, M., Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol* **36** (1995) 1405–1420.
- [30] Warren, A.J., “Eukaryotic transcription factors.” *Curr Opin Struct Biol* **12** (2002) 107–114.
- [31] Deppmann, C.D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., et al. “Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to *Homo sapiens* B-ZIP motifs.” *Nucleic Acids Res* **32** (2004) 3435–3445.
- [32] Izawa, T., Foster, R., Chua, N.H., Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol*, **20/230/4** (1993) 1131-44.
- [33] Siberil, Y., Doireau, P., Gantet, P., Plant bZIP G-box binding factors., *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) 5655–5666.
- [34] Holmberg, C.I., Tran, S.E.F., Eriksson, J.E., Sistonen, L., Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **27** (2002) 19–627.
- [35] Deppmann, C.D., Alvania, R.S., Taparowsky, E.J., Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed interaction networks. *Mol. Biol. Evol.* **23** (2006) 1480–1492.
- [36] Amoutzias, G.D., Robertson, D.L., Van de Peer, Y., Oliver, S.G., Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **33** (2008) 220–229.

- [37] Alonso, R., On˜ate-Sa´nchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., Droge-Laser, W., “Apivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation.” *Plant Cell* **21** (2009) 1747–1761.
- [38] Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., “bZIP transcription factors in Arabidopsis”. *Trends Plant Sci.* **7** (2002) 106–111.
- [39] Schutze, K., Harter, K., Chaban, C., “Post-translational regulation of plant bZIP factors.” *Trends Plant Sci.* **13** (2008) 247–255.
- [40] Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., Hattori, T., “Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors.” *Plant J.* **44** (2005) 939–949.
- [41] Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi Shinozaki, K., “Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid dependent signal transduction pathway under drought and high salinity conditions” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 11632–11637.
- [42] Chae, M.J., Lee, J.S., Nam, M.H., Cho, K., Hong, J.Y., Yi, S.A., Suh, S.C., Yoon, I.S., “A rice dehydration-inducible SNF1 related protein kinase2 phosphorylates an abscisic acid responsive element binding factor and associates with ABA signaling.” *Plant Mol. Biol.* **63** (2001) 151–169.
- [43] Choi, H.I., Park, H.J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.Y., Seo, H.H., Kim, Y.W., Hwang, I., Kim, S.Y., “Arabidopsis calcium dependent protein kinase AtCPK32

interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid responsive gene expression, and modulates its activity.” *Plant Physiol.* **139** (2005) 1750–1761.

[44] Nieva, C., Busk, P.K., Domínguez Puigjaner, E., Lumbreras, V., Testillano, P.S., Risuenõ, M.C., Pagés, M., “Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*.” *Plant Mol. Biol.* **58** (2005) 899–914.

[45] Mahoney, C.W., Shuman, J., McKnight, S.L., Chen, H.C., Huang, K.P., “Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding.” *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 19396–19403.

[46] Miller, M., Shuman, J.D., Sebastian, T., Dauter, Z., Johnson, P.F., “Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha.” *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 15178–15184.

[47] Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M., Hakoshima, T., “Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors.” *Nat. Struct. Biol.* **7** (2000) 889–893.

[48] Deppmann, C.D., Thornton, T.M., Utama, F.E., Taparowsky, E.J., “Phosphorylation of BATF regulates DNA binding: a novel mechanism for AP-1 (activator protein-1) regulation.” *Biochem. J.* **374** (2003) 423–431.

[49] Amoutzias, G.D., Bornberg-Bauer, E., Oliver, S.G., Robertson, D.L., “Reduction/oxidation-phosphorylation control of DNA binding in the bZIP dimerization network”. *BMC Genomics* **7** (2006) 107.

[50] Moll, A., Hildebrandt, A., Lenhof, H.P., Kohlbacher, O., BALL View: a tool for research and education in molecular modeling. *Bioinformatics* **22** (2006) 365–366.

- [51] Luscombe, N.M., Greenbaus, D., Gerstein, M., What is bioinformatics? An introduction and overview Yearbook of Medical Informations, (2001).
- [52] Deonier, Richard; Tavaré S., Waterman M., *Computational Genome Analysis: an introduction. Springer-Verlag*, (2005).
- [53] Rozen, S., Skaletsky, H.J., “Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.” Humana Press, Totowa, NJ, **12** (2000) 365–386.
- [54] Meshi, T., Iwabuchi, M., Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol* **36** (1995) 1405–1420.
- [55] Solida, Y.C.L., Kolattukudy, P.E., “Biosynthesis of cutin. w-hydroxylation of fatty acids by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*.” *Plant Physiol*, **59** (1977) 1116–112.
- [56] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA (2011)
- [57] Hall, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **41** (1999) 95–98.
- [58] Wing, D., Koncz, C. and Schell, J., Conserved function in *Nicotiana tabaccum* of a single *Drosophila hsp70* promoter heat shock element when fused to a minimal T-DNA promoter. *Mol. Gen. Genet.* **219** (1989) 9-16.
- [59] Cozzon, A.J., Protein phosphorylation in prokaryotes *Ann. Rev. Microbiol.* **42** (1988) 97-125.
- [60] Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock A.M., Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **230** (1989) 450-490.

[61] Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L., The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240** (1988) 1759-1764.

[62] Gezerel, Ö., Meyve Ağaçlarının Gübrenmesi ve Sorunları. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı, Çukurova Üniversitesi Pozantı Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ülke Ölçeğinde Meyvecilik Geliştirme Entegre Projesi Eğitim Programı II, Adana, (1998).

[63] Armstrong, G.A., Weisshaar, B., Hahlbrock, K., Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores, *Plant Cell* **4** (1992) 525–537.

[64] Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol* **146** (2008) 333–350.

[65] Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H., Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J* **51** (2007) 897–909.

[66] Zhiwei, J., Yun, L., Yun, Z., Junguang, H., Zuping, C., Guoying, W., Cloning and characterization of a putative transcription factor induced by abiotic stress in *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* Vol. **8/24** 15 December (2009) 6764-6771.

[67] Geffers, R., Wingender, E., Gene regulation controlled by MYB related factors in plants, *Biobase Biological Databases GmbH*, **21** (2000) 38124.