

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



**ZEYTİN ALDOLAZ VE ÖKARYOTİK TRANSLASYON
BAŞLATMA FAKTÖRÜ 4E GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE ALTUNOK

BALIKESİR, HAZİRAN – 2016

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



**ZEYTİN ALDOLAZ VE ÖKARYOTİK TRANSLASYON
BAŞLATMA FAKTÖRÜ 4E GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE ALTUNOK

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Yard. Doç. Dr. Gökhan KARAKÜLAH

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sümeyye ALTUNOK tarafından hazırlanan “ZEYTİN ALDOLAZ VE ÖKARYOTİK TRANSLASYON BAŞLATMA FAKTÖRÜ 4E GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 14.06.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR



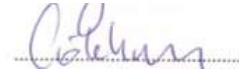
Üye

Doç. Dr. Fatih COŞKUN



Üye

Yard. Doç. Dr. Gökhan KARAKÜLAH



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016 / 138 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ZEYTİN ALDOLAZ VE ÖKARYOTİK TRANSLASYON BAŞLATMA FAKTÖRÜ
4E GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SÜMEYYE ALTUNOK
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)**

BALIKESİR, HAZİRAN – 2016

Zeytin (*Olea europaea* L.); *Oleaceae* familyasına ait, Akdeniz iklimine özgü, her dem yeşil ve uzun ömürlü, ekonomik değeri yüksek bir ağaç türüdür. Zeytin genlerinin ve bu genlerin işlevlerinin bilinmesini amaçlayan bir hedef doğrultusunda başlatılan bu çalışmada fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz geninin ve ökaryotik translasyon başlatma faktörünün moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Genden protein elde edilirken Real-time PCR, klonlama, transformasyon, SDS-PAGE, Western Blot, Ni-NTA saflaştırma yöntemleri kullanılmıştır. Biyoinformatik analizler için ise; nükleotid ve protein BLAST (NCBI), BioEdit, ExPASy, FinchTV, CLC Genomics Workbench, Primer3, SOSUI, SignalP ve TMHMM programları kullanılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda *OeFBPA*'nın; 314 aminoasitten oluştuğu ve en çok glisin aminoasitini içerdiği, 34 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu, hidrofobik bir protein olduğu, optimum pH değeri 7.94 olan ve *OeEIF*'in 245 aminoasitten oluştuğu ve en çok glutamik asit ve lizin aminoasitlerini içerdiği, 27 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu, hidrofobik bir protein olduğu, optimum pH değeri 5 olduğu tespit edilmiştir. Dokusal ifade analizlerine göre *OeFBPA*'nın GAPDH'e göre en fazla çiçekte ifade olduğu ve "var yılı" yaprak ve pediselde de fazla oranda sentezlendiği görüldü. *OeEIF*'in ubiquitine göre en fazla "var yılı" yaprakta ifade olduğu görüldü.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin (*Olea europaea* L.), Fruktoz bisfosfat aldolaz, *FBPA*, Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E, *eEIF4E*.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIVE ALDOLASE AND EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E GENE

MSC THESIS

SÜMEYYE ALTUNOK

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. EKREM DÜNDAR

BALIKESİR, JUNE 2016

Olive (*Olea europaea* L.) is a fruit tree which belongs to the *Oleaceae* family. It's specific to the Mediterranean climate, evergreen, long-lasting and it has high a economic value. In this study, molecular characterizations of fructose 1,6-bisphosphate aldolase and eukaryotic translation initiation factor were aimed. To produce protein from the genes the following purification methods were used: Real-time PCR, cloning, transformation, SDS-PAGE, Western Blot, Ni-NTA. And for bioinformatics analysis; nucleotide and protein BLAST (NCBI), BioEdit, ExPASy, FinchTV, CLC Genomics Workbench, Primer3, SOSUI, SignalP and TMHMM. Bioinformatic analyses for OeFBPA revealed the following results: it's 314 amino acids long (it contains 314 aminoacids) and contains mostly glycine (rich in glycine). Its molecular mass is 34 kDa, it's an hydrophilic protein and it's optimum pH value is 7.94 pH. Bioinformatics analysis for *OeEIF* revealed it had 245 amino acids (it contains 245 aminoacids) and it was rich in glutamic acid and lysine. *OeEIF*'s molecular mass was calculated as 27 kDa. It was predicted as an hydrophilic protein and its optimum pH value appeared 5. The spatial expression results revealed *OeIF4E* expressed about 30 fold more than the housekeeping gene (ubiquitin) in leaves. Comparing the "on year" and "off year" leaves, the gene appeared to express more in "on year" leaves suggesting a role in nutrition supply for fruit formation and / or fruit development.

KEYWORDS: Olive (*Olea europaea* L.), Fructose bisphosphate aldolase, *FBPA*, Eucaryotic translation initiation factor 4E, *eIF4E*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Zeytin (<i>Olea europaea</i> L.).....	1
1.2 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolaz (<i>FBPA</i>).....	2
1.2.1 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Biyokimyası	2
1.2.2 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Sınıflandırılması.....	6
1.2.3 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Katalizleme Mekanizması.....	7
1.2.4 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Substrat Özgüllüğü.....	9
1.2.5 Bitki Fruktoz 1,6-Bifosfat Aldolazın Bitkiler İçin Önemi.....	9
1.3 Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E	11
1.3.1 Ökaryotik Translasyon Başlatmanın Düzenlenmesi.....	11
1.3.2 Şapka yapısı bağımlı Başlatma Mekanizması	13
1.3.3 Başlama Kodonu Seçimini Düzenleyen Faktörler	13
1.3.4 43S PIC Bağlanmasını Düzenleyen Faktörler	15
1.3.5 Alt ünite Katılmasını Düzenleyen Faktörler.....	17
1.3.6 Bakteri ve Ökaryotlarda Başlatma Mekanizması	17
1.3.7 İçsel Başlatma Mekanizması	20
1.3.8 uORF'lar ile Translasyonel Kontrol ve eIF2 Fosforilasyonu	21
1.3.9 Şapka yapısı Tanıma İşlemiyle Translasyonel Kontrol	23
1.3.10 miRNA'lar tarafından Translasyonel Kontrol	24
1.3.1 Morfojen Hedefi Kapalı-Halka Oluşumu	26
1.3.2 43S PIC'ler, Tarama ve Alt ünite Katılması.....	27
1.3.3 Hastalıklarda Translasyonel Kontrol	29
2. MATERYAL VE METOD.....	33
2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	33
2.2 Kullanılan Cam ve Plastik malzemelerin Hazırlanması.....	33
2.3 Bitki Materyali Toplama	33
2.4 Biyoinformatik Analiz.....	34
2.5 Genomik DNA İzolasyonu	35
2.6 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması	36
2.7 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	37
2.8 Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
2.9 RNA İzolasyonu	39
2.9.1 RNA Örneklerinin DNaz I ile Muamele Edilmesi.....	39
2.10 cDNA Sentezi.....	40
2.11 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR).....	41
2.12 Bakteri Kompetent Hücresinin Hazırlanması.....	41
2.13 Plazmit Stoklarının Hazırlanması.....	42
2.14 Klonlama	42

2.14.1	Kültür Ortamlarının Hazırlanması	42
2.14.2	Jelden Kazanım	43
2.14.3	PCR Pürifikasyonu	43
2.15	Transformasyon	44
2.15.1	Çoğaltma Suşuna Transformasyon	44
2.15.2	Koloni PCR ve Koloni Taraması	44
2.15.3	Sulandırma Örneğinin LB Broth Besiyerine Ekilmesi	45
2.15.4	Plazmit DNA izolasyonu (GeneJet Plasmid Miniprep Kit)	45
2.15.5	Spektrometreyle Miktar Ölçümü	46
2.15.6	Ekspresyon Suşuna Transformasyon	46
2.16	Hücreleri Çöktürme ve Lizis	47
2.16.1	Protamin Sülfat Hazırlanması	47
2.17	SDS-PAGE	48
2.17.1	Gerekli Kimyasalların Hazırlanması	48
2.17.1.1	Amonyum Persülfat (APS) Hazırlama	48
2.17.1.2	%15'lik Ayrırma Jeli Hazırlama	48
2.17.2	Yığılma Jelinin Hazırlanması	48
2.17.3	Yürütme Tamponunu Hazırlanması	49
2.17.4	Yükleme için Örnek Hazırlama	49
2.17.5	SDS Jeline Örnek Yüklenmesi ve Örneklerin Yürütülmesi	50
2.17.6	SDS Jelinin Boyanması	50
2.17.6.1	Commasie Blue Boyası ile Boyama	50
2.17.6.2	Gümüş boya ile Boyama	50
2.18	Western Blot	51
2.18.1	Gerekli Kimyasalların Hazırlanması	51
2.18.2	Western Blot Basamağı	52
2.19	Ni-NTA Kolon ile Saflaştırma	53
3.	BULGULAR.....	54
3.1	Biyoinformatik Analiz	54
3.2	Polimorfizm Analizi	68
3.3	Gerçek Zamanlı PCR Analizi (Real-Time PCR)	70
3.3.1	Real-Time PCR ile Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi	70
3.4	Proteinin <i>E. coli</i> 'ye Klonlanma ve Transformasyon Çalışmaları	72
3.5	SDS-PAGE Jel Elektroforezi	75
3.5.1	Commasie Blue ile Boyama	75
3.5.2	Gümüş Boyama ile Boyama	76
3.6	Western Blot Analizi	76
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
5.	KAYNAKLAR.....	82
6.	EKLER.....	102

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Glikoliz.....	3
Şekil 1.2: Fruktozun metabolizması	3
Şekil 1.3: <i>FBPA</i> ’nın DHAP ve G3P’a parçalanması.....	4
Şekil 1.4: Bifonksiyonel <i>FBPA</i> aldolaz/fosfataz reaksiyonları	5
Şekil 1.5: Fruktoz 1,6-bifosfat aldolazın 2 aktif bölgesi	5
Şekil 1.6: Sınıf I ve II aldolazların 3 boyutlu genel yapısı.	7
Şekil 1.7: Aktif bölgeye bağlı olan substrat ile <i>FBPA</i> glikolitik enzimi [25].....	8
Şekil 1.8: Aktif bölgenin 3 boyutlu yapısı [25].	8
Şekil 1.9: <i>FBP</i> aldolaz/fosfatazı aktif merkezi [4].	8
Şekil 1.10: Ökaryotik şapka yapısı bağımlı translasyon başlatma	12
Şekil 1.11: mRNA ile ilişkili PIC bağlanması, taranması ve AUG tanınması .	14
Şekil 1.12: CrPV IRES ve bakteriyel başlatma kompleksinin yapıları	19
Şekil 1.13: 3’ UTR’ler yoluyla translasyonel kontrolü	26
Şekil 3.1: <i>OeFBPA</i> geninin gDNA’sının NCBI BLAST analizi.....	55
Şekil 3.2: <i>OeFBPA</i> geninin cDNA’sının NCBI BLAST analizi.	55
Şekil 3.3: <i>OeEIF 4E</i> geninin cDNA’sının NCBI BLAST.....	56
Şekil 3.4: <i>OeFBPA</i> proteininin NCBI BLAST analizi (blastp).....	57
Şekil 3.5: <i>OeEIF 4E</i> proteininin NCBI BLAST analizi (blastp).....	57
Şekil 3.6: <i>OeFBPA</i> geninin nükleotid kompozisyonu (BioEdit).....	58
Şekil 3.7: <i>OeFBPA</i> geninin aminoasit kompozisyonu (BioEdit).	58
Şekil 3.8: <i>OeFBPA</i> geninin Kyte&Doolittle hidrofobisite grafiği (BioEdit). ...	59
Şekil 3.9: <i>OeEIF 4E</i> geninin nükleotid kompozisyonu (BioEdit).....	59
Şekil 3.10: <i>OeEIF 4E</i> geninin aminoasit kompozisyonu (BioEdit).	60
Şekil 3.11: <i>OeEIF 4E</i> geninin Kyte&Doolittle hidrofobisite grafiği (BioEdit).60	
Şekil 3.12: <i>OeFBPA</i> proteininin aminoasit dizisi, M_a ’sı ve pI ’sı.	61
Şekil 3.13: <i>OeEIF 4E</i> proteininin aminoasit dizisi, M_a ’sı ve pI ’sı.	61
Şekil 3.14: <i>OeFBPA</i> proteininin 3 boyutlu yapısı	62
Şekil 3.15: <i>OeEIF 4E</i> proteininin 3 boyutlu yapısı	62
Şekil 3.16: <i>OeFBPA</i> ve <i>OeEIF 4E</i> proteinlerinin SOSUI sinyal peptit analizi.63	
Şekil 3.17: <i>OeFBPA</i> proteininin yerleşiminin belirlenmesi (TargetP).	63
Şekil 3.18: <i>OeEIF 4E</i> proteininin yerleşiminin belirlenmesi (TargetP).	63
Şekil 3.19: <i>OeEIF 4E</i> geminin promotör bölgesinin tespiti	64
Şekil 3.20: <i>OeFBPA</i> geminin promotör bölgesinin tespiti	65
Şekil 3.21: <i>OeFBPA</i> geminin tahmini hücre içi yerleşimi.	65
Şekil 3.22: <i>OeEIF 4E</i> geminin tahmini hücre içi yerleşimi.....	66
Şekil 3.23: <i>OeFBPA</i> geminin sinyal peptit analizi.	66
Şekil 3.24: <i>OeEIF 4E</i> geminin sinyal peptit analizi.	67
Şekil 3.25: <i>OeFBPA</i> geminin transmembran protein analizi.	67
Şekil 3.26: <i>OeFBPA</i> geminin transmembran protein analizi.	68
Şekil 3.27: <i>OeFBPA</i> geminin polimorfizm analizinin jel görüntüsü.....	69
Şekil 3.28: Zeytin çeşitlerine ait nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.	69
Şekil 3.29: <i>OeFBPA</i> geninin polimorfizminin belirlenmesi.....	70
Şekil 3.30: <i>OeFBPA</i> geninin RT-PCR ile kopya sayısını belirten grafik.....	71
Şekil 3.31: <i>OeEIF 4E</i> geninin RT-PCR ile kopya sayısını belirten grafik.....	71
Şekil 3.32: <i>OeFBPA</i> geninin DH10B suşuna transformasyonu.	72

Şekil 3.33: <i>OeEIF</i> geninin DH10B suşuna transformasyon sonucu.	72
Şekil 3.34: <i>OeFBPA</i> ve <i>OeEIF 4E</i> geninin plazmit izolasyonu önkültürü.	73
Şekil 3.35: <i>OeFBPA</i> geninin koloni PCR sonucu.	73
Şekil 3.36: <i>OeFBPA</i> ve <i>OeEIF</i> plazmitlerinin jel görüntüsü	73
Şekil 3.37: <i>OeFBPA</i> geninin BL21 suşuna transformasyonu.....	74
Şekil 3.38: <i>OeEIF4E</i> geninin Rozetta kompetan hücrelerine transformasyonu.	74
Şekil 3.39: <i>OeFBPA</i> geninin Rozetta kompetan hücrelerine transformasyonu.	75
Şekil 3.40: <i>OeFBPA</i> proteininin SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü.	75
Şekil 3.41: <i>OeFBPA</i> proteinin gümüş boyama görüntüsü.....	76
Şekil 3.42: <i>OeFBPA</i> ve <i>OeEIF 4E</i> genlerinin Western Blot analizi.	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Polimorfizm için kullanılan izole edilen zeytin genomik DNA'ları	36
Tablo 2.2: Çalışmalarda kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri.....	37
Tablo 2.3: Agaroz jel elektroforezi çözeltileri ve komponentlerin miktarları .	39
Tablo 2.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler.....	39
Tablo 2.5: Dokusal Real-Time analizi için RNA örnekleri	40
Tablo 2.6: RT-PCR'da kullanılan normalizatör genlerin primerleri.....	41

SEMBOL LİSTESİ

Bp	:	Baz Çifti
kDa	:	Kilo Dalton
RNA	:	Ribonükleik Asit
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik Asit
tRNA	:	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
gDNA	:	Genomik DNA
cDNA	:	Komplementer DNA
dNTP	:	Dinükleotit trifosfat
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
TAE	:	Tris-asetat
IPTG	:	İsopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
NH₄SO₄	:	Amonyum Sülfat
TBE	:	Tris-borat
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TE	:	Tris-EDTA
Tm	:	Erime Sıcaklığı
TBS	:	Tris-Tamponlu Tuz
FBPA	:	Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolaz
OeFBPA	:	Zeytin Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolaz
eIF4E	:	Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E
OeEIF 4E	:	Zeytin Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olan bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında tez danışmanım Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR ile birlikte yürütülmüştür.

Ders ve tez döneminde bütün çalışmalarında benden bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemeyen, mesleğime attığım bu ilk adımda bana çok fazla değer katan danışmanım Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Ders döneminde bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan sayın Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN'e, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a,

Bilgi ve tecrübesini her zaman paylaşan, yardıma ihtiyacım olduğunda rahatlıkla danışabildiğim, laboratuvar malzeme ve ekipmanlarını da esirgemeyen Prof. Dr. Selma SİNAN ve laboratuvar ekibinden Niyazi CÖMERT ve Nil OCAK'a,

Deneylemin son aşamalarında öğrendiğim herşeyi borçlu olduğum, gülyüzü ve sabırla tecrübelerini paylaşan Kimya Bölümü Fizokimya Anabilimdalı Araş. Gör. Dr. Pınar TURAN BEYLİ'ye,

Yüksek lisansa başladığım zamandan bitirmekte olduğum bu zamana kadar öğrendiğim birçok şeyi borçlu olduğum doktora öğrencisi hocam Tuğba AKYÜZ'e,

Her yardıma ihtiyacım olduğunda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, benim için Balıkesir'i sevilen bir yer haline getiren laboratuvar arkadaşlarım Ali Can KAYA'ya, Eda BAKİ'ye, Suna BOZKURT'a,

Lisanstan yüksek lisansın bitimine benimle olan, ev ve laboratuvar arkadaşım, 7 yıllık dostum Büşra BAŞ'a,

Psikolojik olarak zorlandığım son deney zamanlarımda pozitif enerjisiyle yanımda olan ve benim için hayatı katlanılır hale getiren yüksek lisans arkadaşım Ehed Muhammed AYMAZ'a,

Bugüne kadar verdiğim bütün kararlarda olduğu gibi yüksek lisansım boyunca da sorgusuz sualsiz arkamda olan başta babam olmak üzere aileme,

Toplanan zeytin örneklerinin saklanması için kullanan sıvı azotun temin edildiği Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği'ne teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.)

Zeytin (*Olea europaea* L.); meyvesi ve meyve ve çekirdeğinden elde edilen yağı ile ticari açıdan çok değerli bir ağaçtır. Uzun yıllar boyunca yaşayabilen ve kuraklık gibi dış etkenlere dayanıklı olan zeytin ağaçları hem kendiliğinden yetişirken hem de kültür olarak yetiştirilebilmektedir. Alternatif ürün vermeye de (halk arasında var yılı-yok yılı, bir yıl çok ürün verirken takip eden yıl az meyve verme) değerini katlayan bir ağaç türüdür.

Oleacea, dünya çapında yayılmış ve 24 cinste 600 türle temsil edilen bir familyadır. *Oleaceae* familyasında ilk evcilleştirilmiş tarımsal ağaçlardan biri olan zeytin (*Olea europaea* L.) sofralık zeytin ve yemeklik yağ için ağırlıklı olarak yetiştirilmektedir [1].

Bilinen kadarıyla zeytin İspanya, İtalya, Yunanistan, Fransa, Türkiye, Cezayir ve Fas gibi Akdeniz Bölgesinin kıyı bölgelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Zeytin bitkisinin özel iklim istekliliği nedeniyle de zeytin kültür bitkisi olarak yine Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yetiştirilmektedir. Zeytin dünyada yaklaşık 9.8 mil hektar alan kaplayan, en çok yetiştirilen meyve ağacıdır. FAO tarafından yayınlanan istatistiklere göre Türkiye, İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra dünyada 4. büyük zeytinyağı üreticisidir. Türkiye, dünyada siyah zeytinin ilk üreticisidir ve Türkiye'de Gemlik zeytin türü siyah zeytin üretiminin %80'ini karşılamaktadır [1]. Halen dünya üzerinde zeytin ağaçlarının %90'ı bu ülkelerde yer almakta ve yaklaşık 9.984.918 hektar alanda 16.584.919 ton zeytin üretimi yapılmaktadır (FAO, 2013). Dünyada son yıllarda zeytincilik sadece Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerle sınırlı kalmayıp Akdeniz ikliminin görüldüğü bazı ülkelerde de (Arjantin, Şili, Meksika, Peru, Avustralya vb.) yetiştirilmeye başlanmıştır (FAO, 2013, IOC, 2013).

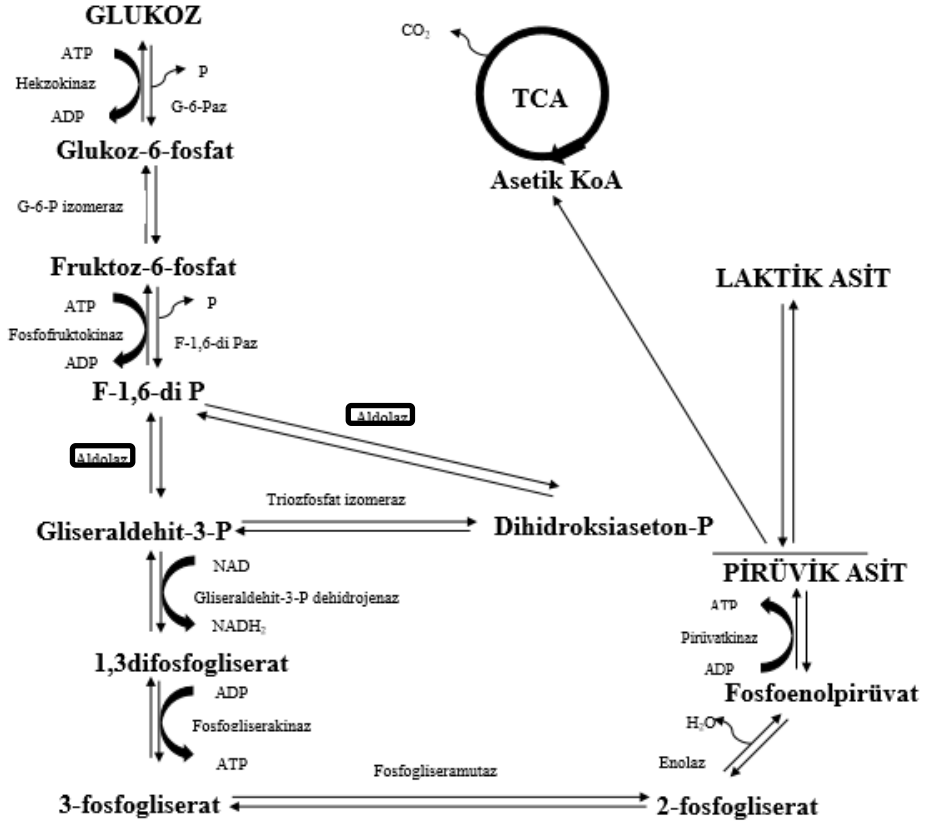
1.2 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolaz (*FBPA*)

1.2.1 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Biyokimyası

Fruktoz 1,6-bisfosfat aldolaz (EC4.1.2.13 *FBPA*) glikoliz/glukoneogenez yolunda veya pentoz fosfat döngüsünde önemli bir enzimdir ve fruktoz 1,6 bifosfatın tersinir olarak dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve 3-fosfat gliseraldehit (G3P) dönüştürülmesini katalizler (Şekil 1.3) [2]; DHAP gliserol sentezi için, tuz stresi altında önemli ozmotik uyumlu bir eriyik için bir ön-madde olarak işlev görür.

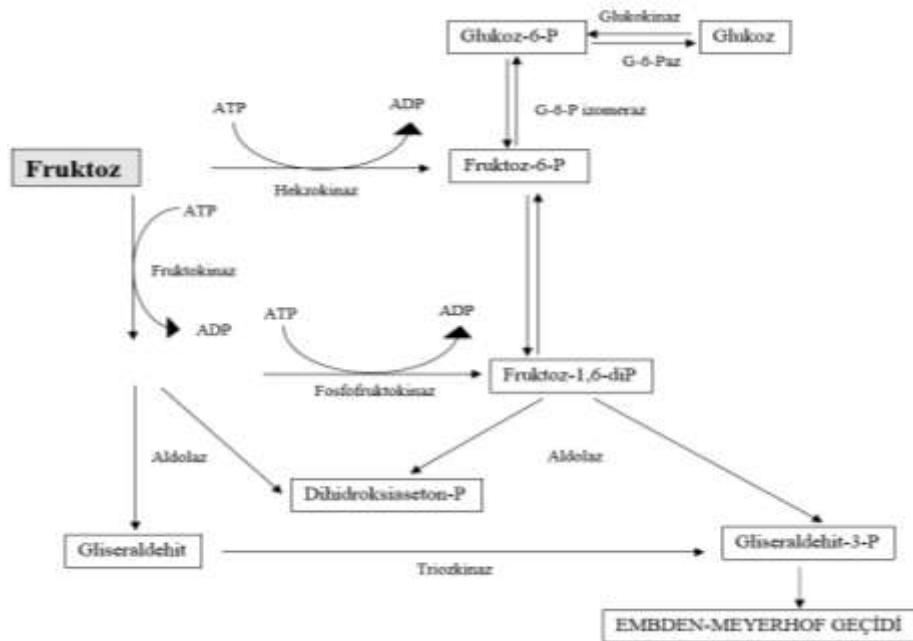
İki evreden oluşan glikolizin (Şekil 1.1) 3. basamağında oluşan fruktoz 1,6 bifosfat aldolaz 4. basamakta ikiye bölerek 3 karbonlu monosakkaritlere (gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfat) parçalanır. Bu yolağa adını veren lizis basamağıdır. Dihidroksiaseton fosfat izomerleşmeyle ikinci gliseraldehit-3-fosfat molekülüne dönüşür. Ancak, aldolazlar sadece bu tepkimeyi gerçekleştirilmeyip ayrıca keto şekerleri de parçalarlar ve aldolazın katalizlediği her tepkimede ürünlerden biri mutlaka dihidroksiaseton fosfat olmaktadır.

Arke fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz/fosfataz (*FBPA/P*) tek bir katalitik domain içeren fakat glukoneogenezin 2 farklı reaksiyonunu kimyasal olarak katalizleyen olağandışı yeni bir bifonksiyonel enzim olarak tanımlanmıştır [3] (Şekil 1.4). Genelde bifonksiyonel enzimler ya 2 farklı katalitik domain ya da substrat özgüllüğü gözetmeyen tek bir domainden ibarettir [4]. Sıradan bifonksiyonel enzimlerin aksine *FBPA/P* sadece bir katalitik domaine sahiptir ve bu tek bir domain glukoneogenezde *FBPA* için DHAP ve G3P'nin aldol yoğunlaşmasını tersine çevirebilme [3] ve fruktoz-6-fosfat (F-6-P) için *FBPA*'nin geri dönüşü olmayan hidrolizi dahil 2 farklı kimyasal reaksiyonu katalizler.



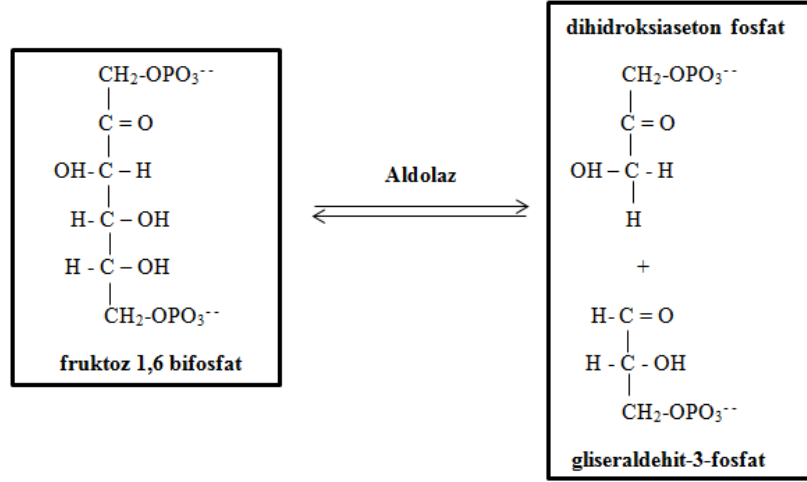
Şekil 1.1: Glikoliz

(Prof. Dr. Tanju Ası'dan esinlenerek çizilmiştir, Tablolarla Biyokimya Cilt II, Ankara 1999.).



Şekil 1.2: Fruktozun metabolizması

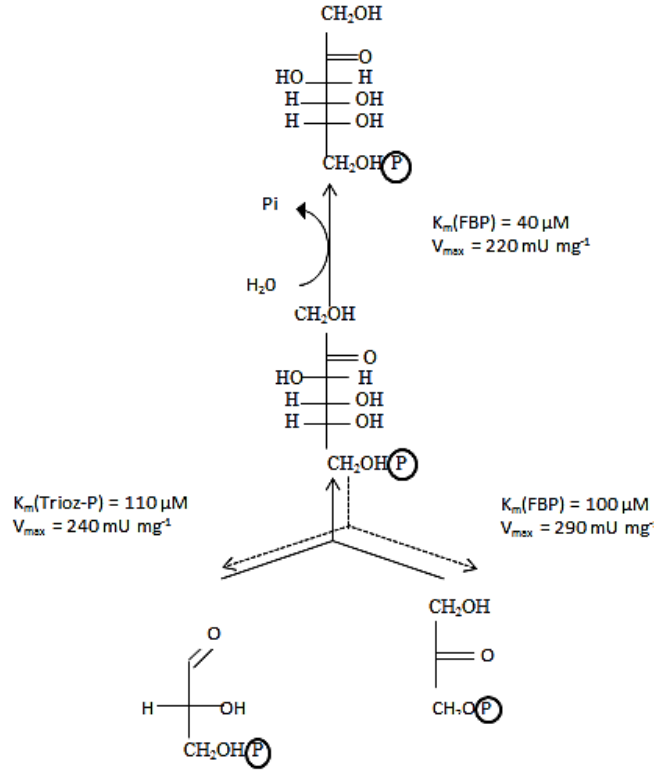
(Prof. Dr. Tanju Ası'dan esinlenerek çizilmiştir, Tablolarla Biyokimya Cilt II, Ankara 1999.).



$$\Delta G = 23,8 \text{ kJ/mol}$$

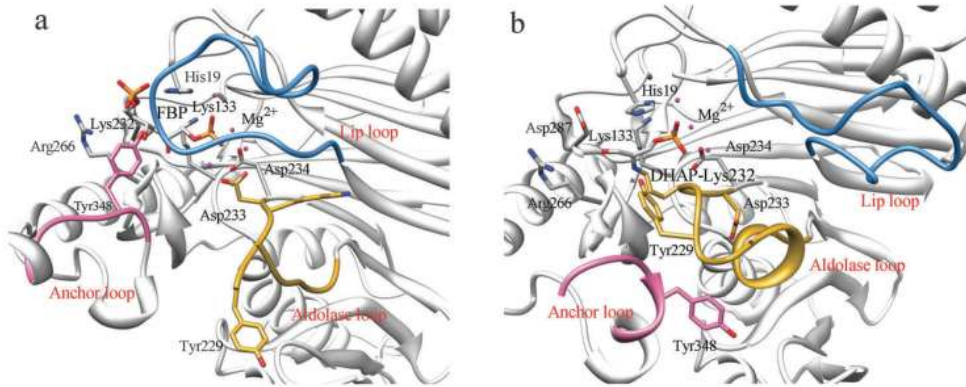
Şekil 1.3: FBPA'nın DHAP ve G3P'a parçalanması.

Fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz tarafından katalizlenen bütün aldol kondenzasyonu tanımlanmıştır. FBPA Sınıf I'in bir ortak özelliği, bir Schiff bazının oluşturulmasıyla ara reaksiyonu stabilize etmek için, lizin aktif bölgesinin kullanılmış olmasıdır. Çinko iyonu FBPA Sınıf II'de kataliz sırasında ketoz substratının karbonil bağını polarize etmek için Lewis asiti olarak davranır. Şekil 1.5'te bir FBPA molekülü ve 4 Mg^{2+} iyonundan oluşan FBPA kompleksi [5] ve 3 Mg^{2+} iyonunu kordine eden DHAP fosfat grubundaki FBPA formunu temsil eden DHAP-Schiff bazı ara hali rapor edilmiştir [6].



Şekil 1.4: Bifonksiyonel *FBPA* aldolaz/fosfataz reaksiyonları

(Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme, 2010; 464: 1077-1081, makalesinden esinlenerek çizilmiştir.).



Şekil 1.5: Fruktöz 1,6-bifosfat aldolazın 2 aktif bölgesi

(a) Fruktöz 1,6-bifosfat kompleksi, (b) DHAP- Schiff base kompleksi [9].

Arke *FBPA/P* ilk olarak 2002'de bulundu ve sınıf 5 *FBPaz* olarak tanımlandı [7], sonra 1.8 Å çözünürlükte *Sulfolobus tokodaii* *FBPaz* formunun kristal yapısı Fushinobu and Nishimasu tarafından belirlendi [8]. Kristal yapıdan aktif bölge Şekil 1.5 (a)'da gösterilmiştir, *FBPA* molekülü ve 4 Mg^{2+} iyonu *FBPA/P* ile kompleksinde vardır. Son zamana kadar, 3 Mg^{2+} iyonunu koordine eden DHAP fosfat grubundaki *FBP* aldolazları (*FBPA*) temsil eden DHPA-Schiff bazında *Sulfolobus tokodaii*'nin kristal yapısı rapor edilmiştir (Şekil 1.5 (b) [9].

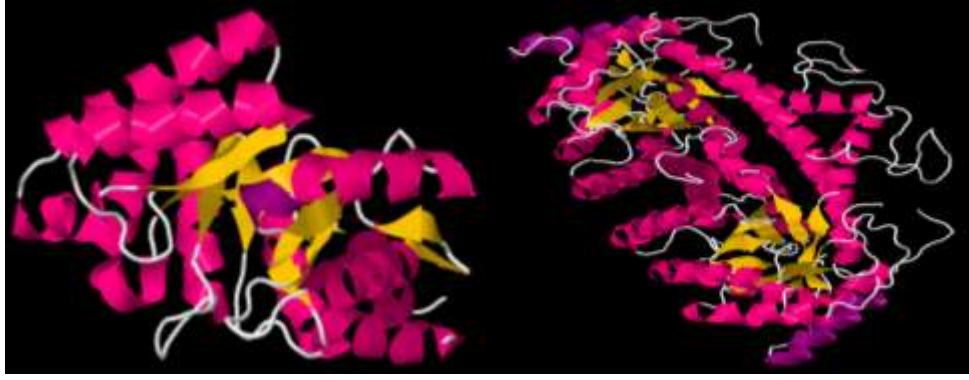
1.2.2 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Sınıflandırılması

Mekanik olarak iki formu bilinen aldolazlarının birinci sınıfına yüksek organizmaların aldolazları girmektedir ve çeşitli hayvanların Sınıf I enzimleri de detaylı olarak analiz edilmiştir [10]. Sınıf I aldolazların aksine Sınıf II *FBP* aldolazlar aktiviteleri için bir çift değerlikli metal katyonu gerektiren metalloenzimlerdir ve bakteri, maya, mantar ve bazı yeşil alglerde bulunmuşlardır [11]. İlginç bir şekilde aldolazların kataliz için gerekli olandan çok daha yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde bulunması, onların birincil işleviyle ilişkisiz diğer hücresel aktivitelerde bulunabileceğini de düşündürmektedir [12].

Sınıf I aldolazlar (*FBPA* I) başlıca hayvanlar, bitkiler, protozoanlar ve algler gibi yüksek yapılı organizmalarda bulunurken bazen bakteri ve arkelerde de bulunur [13-15]. *FBPA* I'in çeşitli kristal yapısı saptanmıştır [16, 17].

Bitkilerde, *FBPA*'ların iki izoformunun kısmen homolog genler tarafından kodlandığı tanımlanmıştır [18]; tip I ve II *FBPA*'lar çeşitli enzim aktivitesi ve konfirügasyonu ile farklı yapıya sahiptir ve ya kloroplast ya da sitozolde lokalize olmuştur [19, 20]. Sonuç olarak, stres ve işleve tepki de farklıdır.

FBPA I'lerin yaygın bir özelliği Schiff bazı oluşmasıyla reaksiyonu stabilize etmek için lizin aktif bölge kullanmalarıdır. Sınıf II *FBPA*'lar genellikle çinko gibi katı bir şekilde iki değerlikli metal iyonu gerektiren bakteri ve mantarlarda var olurlar [5, 21]. Çinko iyonu kataliz esnasında ketoz substratının karbonil bağı polarize etmek için Lewis asidi olarak hareket eder. *FBPA* I ve *FBPA* II %15 sekans benzerliği paylaşır [17, 21, 22].

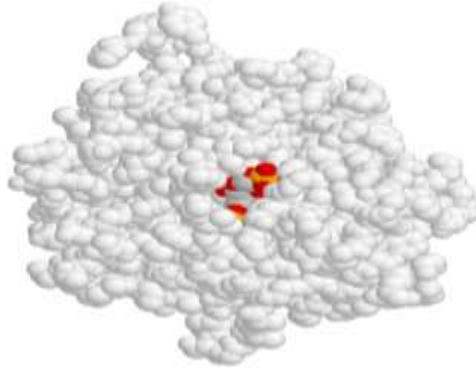


Şekil 1.6: Sınıf I ve II aldolazların 3 boyutlu genel yapısı.

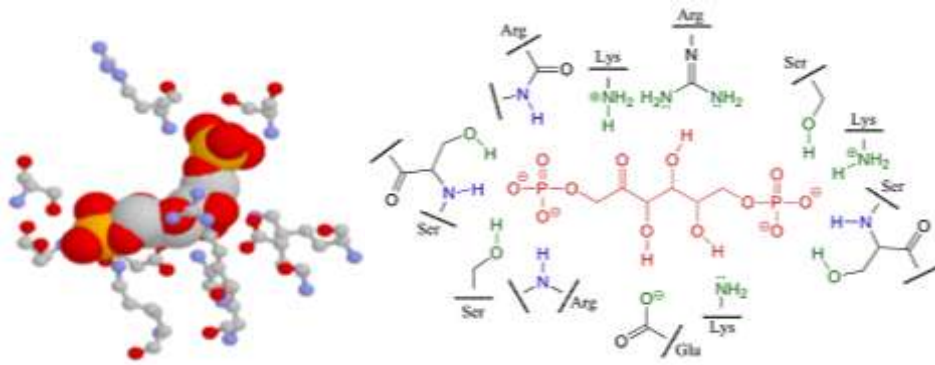
392 aminoasit kodladığı tahmin edilen *Camellia oleifera* FBPA I'in (*CoFBPAI*) hesaplanan moleküler ağırlığı 42.72 kDa'dur [23].

1.2.3 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Katalizleme Mekanizması

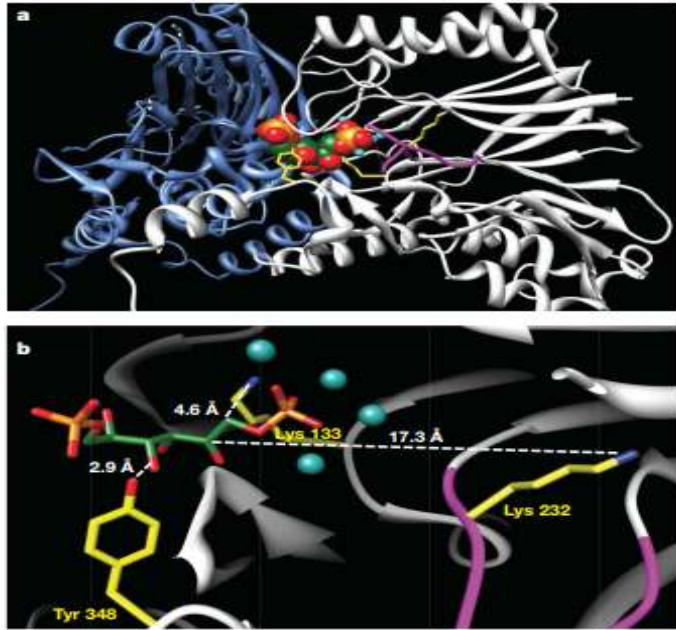
Aktif bölgeye bağlı olan substrat ile FBPA glikolitik enzimi Şekil 1.7'te gösterilmektedir. Substrat aktif bölgeye bağlandığında çok sayıda kovalent olmayan etkileşimler aktif bölge hattındaki aminoasit kalıntılarıyla oluşurlar. Aktif bölgenin şekli ve enzim-substrat etkileşimleri substratın bağlanması sonucu, substrat-enzim çifti özeldir, aktif bölge uygun bir substrat için evrim geçirir ve belirli bir reaksiyonu katalizler. Diğer moleküller bu aktif bölgeye neredeyse fruktoz 1,6-bifosfat kadar uymaz. Şekilde substrat ve aktif bölge aminoasitleri arasında olan spesifik hidrojen bağlayıcı etkileşimlerin bazılarını gösteren aynı aktif bölgeden 2 yakın çekim vardır. Şekil 1.8, kristal yapı verilerinden doğrudan oluşturulan 3 boyutlu yapıdır. Aktif bölge aminoasitleri 'top ve sopa' stilinde gösterilirken substrat 'boşluk doldurma' şeklinde gösterilmiştir. Hidrojenler ise gösterilmemiştir. Renk düzeninde karbon gri, oksijen kırmızı, azot mavi ve fosfor turuncu renkle gösterilmiştir [24].



Şekil 1.7: Aktif bölgeye bağlı olan substrat ile FBPA glikolitik enzimi [25].



Şekil 1.8: Aktif bölgenin 3 boyutlu yapısı [25].



Şekil 1.9: FBP aldolaz/fosfatızı aktif merkezi [4].

a. Substrat bağlanması için alt ünitelerin etkileşimi. b. Aktif bölge. Kataliz için gerekli olduğu kabul edilen son derece korunmuş lizin ve tirozin kalıntıları sarıyla vurgulanır. DHAP ile uzaktaki Lys 232 Schiff bazı oluşturmak için tepkimeye girer. Bu belli ki enzimin konformasyonel değişikliği için gereklidir. C1 fosfat grubu daha sonraki fosfat reaksiyonunu teşvik etmek için 4 Mg iyonu (mavi) tarafından çevrilmiştir. Karbon, yeşil; Oksijen, kırmızı; Fosfat, turuncu; Azot, koyu mavi; Esnek halka, mor [4].

1.2.4 Fruktoz 1,6-bifosfat Aldolazın Substrat Özgüllüğü

G3P'nin bağlanmasında önemli aminoasit kalıntıları olan Asn35, Ser61 ve Lys325 katalizde önemli olarak tanımlanmıştır. *FBPA*'nın X-ray yapısı ve çoklu sekans hizalaması kullanılarak aktif bölgenin yakınında yüksek ölçüde korunmuş birkaç aminoasit kalıntısı tanımlanmıştır. Bu aminoasit kalıntıları potansiyel olarak substrat tanımada önemli olabilir. İlginç olarak, aktif bölgede çoklu değişiklikler yapmasına rağmen *FBPA* aktivitesi kaldırıldığında özgüllükte anahtar olmadığı elde edilmiştir. Bu, enzimlerin bu ailede enzim katalizinin karmaşıklığını vurgulamaktadır [5].

1.2.5 Bitki Fruktoz 1,6-Bifosfat Aldolazın Bitkiler İçin Önemi

Aldolazın aşırı ifadesini araştırmak için yapılan transgenik bitkilerde yabancı tiplere göre 1.4-1.9 kat daha yüksek aldolaz aktivitesine rastlanmıştır. Bu artış transgenik bitkilerde fotosentetik CO₂ fiksasyonunun 1.5 kat yükselişiyle ilişkilidir. Artan plastid aldolazı 3-fosfoglisieratta azalmayla ve ribulaz 1.5-bifosfatta artışla sonuçlanmıştır. Birlikte ele alındığında bu sonuçlar, aldolazın aşırı ifadesi ribuloz 1.5-bifosfatın yenilenmesini uyarır ve CO₂ fiksasyonunu teşvik ettiğini düşündürmektedir. Bu artan fotosentez hızı aldolazın aşırı ifade olduğu bitkilerde artmış büyüme ve biyokütle veriminden sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır [25].

FBPA ve onun genleri *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Pisum sativum* ve *Oryza sativa* gibi bitki türlerinde yaygın olarak çalışılmıştır [20, 26, 27]. Buna ek olarak *FBPA*'lar ıspanak, buğday, pirinç, mısır ve diğer bitkilerden başarılı bir şekilde arındırılmıştır [28-32].

Plastid *FBPA* iki homolog genlerinin organ özgül ifade göstermesine rağmen *Nicotiana* bitkilerinde, tuz stresine onların cevapları farklıydı [33]. 6 veya 48 saat boyunca, 150 mM NaCl'ye maruz kalmış *Arabidopsis* kökleri karşılaştırmalı proteomik analizi *FBPA* ekspresyonunda önemli derecede bir artış göstermiştir [34]. Benzer sonuçlar tuz stresine maruz kalmış *Arabidopsis* hücre süspansiyonları ile de elde edilmiştir [35]. İlginç bir şekilde *Nicotiana*'ya *Dunaliella*'dan *FBPA* geninin transferi tuz toleranslı transgenik bitkilerde sonuçlandırılmıştır [36]. Benzer bir şekilde tütün bitkilerinde *A. thaliana* kloroplast *FBPA*'sının aşırı ekspresyonu 1.4-1.9 kat daha fazla biyokütle ile sonuçlanmıştır, özellikle de yüksek CO₂ konsantrasyonu altında [25].

Camellia oleifera FBPAI (CoFBPAI) Real-time PCR analizleri *CoFBPAI* geninin zayıf köklerde ve gövdede güçlü bir şekilde ifade olduğunu ve yüksek tuz stresine bırakılmadan önce bir eşik değeriyle uyarıldığını göstermiştir (12 g L⁻¹ NaCl). Rekombinant *CoFBPAI*'nin aşırı ifadesi NaCl olmayan ortama göre düşük tuz konsantrasyonlarında büyümenin daha iyi olduğu transgenik *Brassica napus* bitkilerinde tuzluluğa tolerans ile sonuçlanmıştır. Tüm tuz konsantrasyonlarında transgenik bitkilerin yabancıl tip bitkilerle karşılaştırıldığında büyüme parametreleri (gövde ve kök uzunluğu ve çimlenme hızları) gelişmiştir. Bu bulgular *CoFBPAI* tuz stresi koşullarında *C. oleifera* hayatta kalabilme yeteneğini geliştirmede ve tuz stres yanıtında çok önemli roller oynadığını göstermektedir [23].

1.3 Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 4E

1.3.1 Ökaryotik Translasyon Başlatmanın Düzenlenmesi

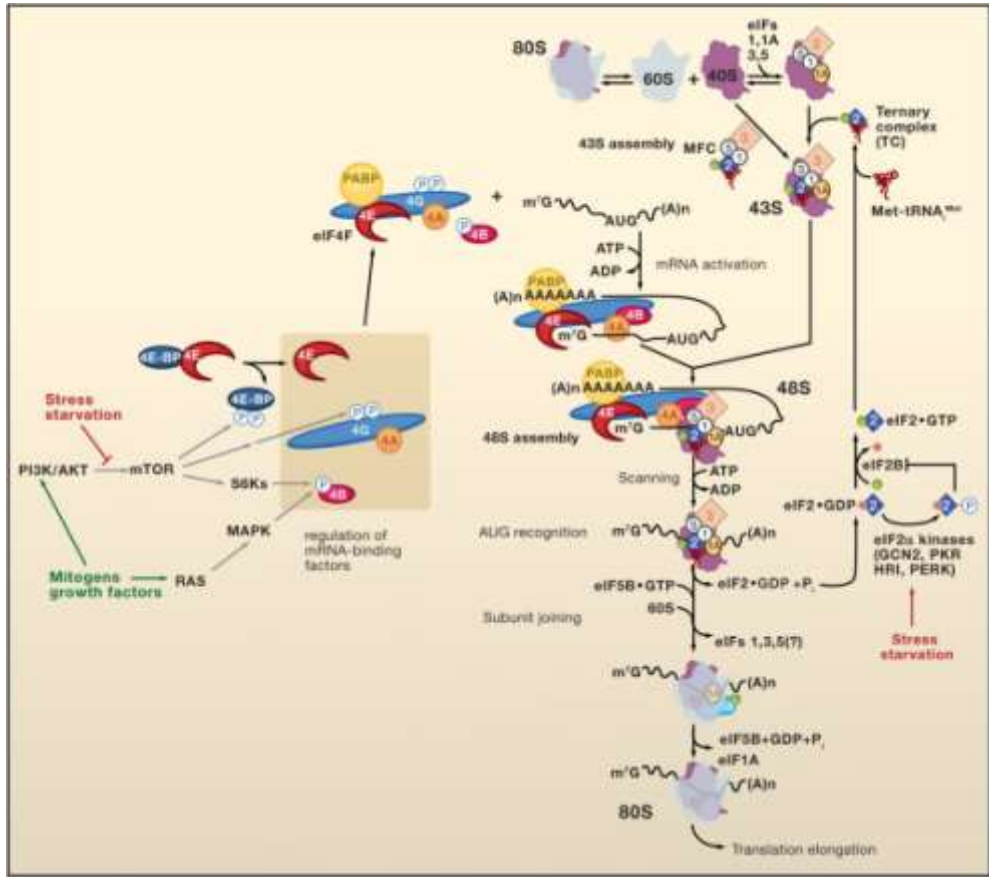
Ökaryotik hücrelerde translasyonel kontrol besin maddesinden yoksun kalma ve stres, gelişme ve farklılaşma, sinir sistemi işlevleri, yaşlanma ve hastalık esnasında gen düzenlenmesi için önemlidir.

Gen ekspresyonu mRNA'ların translasyonu dahil çoklu seviyelerde düzenlenir. Transkripsiyonel düzenleme ile karşılaştırıldığında mevcut mRNA'ların translasyonel kontrolü kodlanan proteinlerin hücresel konsantrasyonlarında çok hızlı değişikliklere izin verir ve bu nedenle, hücre psikolojisi ya da akıbetinde birçok kalıcı değişikliği modellenmesine ek olarak homeostazı devam ettirmek için kullanılabilir.

Translasyon süreci başlama, uzama, sonlanma ve ribozom geri dönüşümü olarak ayrılabilir. Başlama kodonunun seçim mekanizması bakteri ve ökaryotlar arasında temel olarak farklılık gösterir. Bakterilerde Shine-Dalgarno (SD) sekansı baz eşleşmesi mRNA'nın başlama bölgesine doğrudan 30S ribozomal alt ünitenin çalıştırdığı 16S rRNA'da tamamlayıcı anti-SD ile başlama kodonunun hemen üstünde yerleşme gösterir. Bu nedenle bakteride çoğu translasyonel kontrol SD sekansının erişebilirliğini modüle etmeyi içerir.

Ökaryotlarda aksine başlama kodonu genellikle AUG için 5' translasyona uğramamış bölgenin (5' UTR) taranması ve 5' ucuna yakın mRNA'ya bağlandığı ön-başlatma kompleksinde (PIC) Met-tRNA_i ile yüklü olan küçük ribozomal alt ünitenin (40S) tarama mekanizması tarafından tanımlanır. Sonuç olarak tek dizili formunda 5' UTR ile etkileşim içinde olduğundan ribozomların yeteneklerini engelleyen RNA yapıları başlatmanın etkisini azaltır. AUG kodonlarının 5' UTR bölgelerindeki tuzağı ayrıca doğrudan başlatma kodonunun tanınmasını engelleyen bir araç olarak ribozomların taranmasını durdurabilir. mRNA 3' ucunda poliA kuyruğu ya da 5' ucunda m⁷G (7-metilguanozin) şapka yapısını tanıyan ökaryotik başlatma faktörleri (*eIF*) tarafından bağlanarak PIC için aktive edilir. Bu aktivasyon süreci açlık ya da stres koşulları altında çoğu mRNA için translasyonu azaltmak için

bu *eIF*'lerin inaktivasyonu tarafından azaltılarak düzenlenebilir. Aynı strateji sekansa özgü RNA'ya bağlanan proteinler ya da genellikle mRNA için *eIF*-inhibitör faktörlerini çalıştıran ve 3' UTR'ye bağlanan mikroRNA (miRNA) RNP'ler (Ribonükleoprotein) tarafından kullanılır. Ökaryotik mRNA'ların bir alt kümesi özelleşmiş sekanslar yoluyla tarama işleminden kaçabilir, bunlar analog olarak tutum sergilemede başlama kodonu için PIC'e çalışan iç ribozom giriş bölgeleri (IRES) olarak adlandırılır, fakat genellikle bakteride SD/anti-SD etkileşiminden daha karışıktır. IRES elementlerinin kullanımı viral mRNA'larda yaygındır ve mRNA alımı ya da taraması için gerekli olan *eIF*'ler enfekte hücrelerde inhibe olduğu zaman devam etmek için onların translasyonuna izin verir. Translasyon başlamanın bloke edilmesi için bir başka önemli bir mekanizma da 40S alt ünite için Met-tRNAi'nin alımını uyaran *eIF*'lerin aktivitelerinin azaltılmasıdır.



Şekil 1.10: Ökaryotik şapka yapısı bağımlı translasyon başlatma

(Yazarların ve derginin izniyle Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets, 2009; 136(4): 731–745, makalesinden alınmıştır.).

1.3.2 Şapka yapısı bağımlı Başlatma Mekanizması

Başlama yolağı Met-tRNAi'nin antikodonuyla baz eşleşmesi ribozomun şifre çözen bölgesi P'de (peptidil) mRNA'nın AUG başlama kodonunun yerini belirleyen reaksiyonların bir setinden oluşmuştur (Şekil 1.10). Met-tRNAi ve *I*, *IA*, 2, 3 ve 5 *eIF*'leri içeren önceden birleştirilmiş 43S PIC-*eIF4F* kompleksinde *eIF4A* ve *eIF4G* ve onların partneri şapka bağlama faktörü *eIF4E* tarafından kolaylaştırılan mRNA'nın şapkalı 5' ucunu çalıştırır. PIC sonra Met-tRNAi'nin antikodonunu tamamlayıcılık için P-bölgesine girdikçe art arda tripletlerin denetlemesini akış yönünde tarar. Met-tRNAi *eIF2*'nin GTP'ye bağlı formu ve taramasının AUG başlama kodonu ile mükemmel bir eşleşme ve *eIF2*/GTP/Met-tRNAi (TC) tutuklanmasını tetikleyen üçlü bileşenli kompleksinde GTP'nin geri dönüşümsüz hidrolizi tarafından demirlenir. *eIF2*-GDP ve diğer *eIF*'lerin alınımıyla büyük alt ünite (60S) ilk peptit bağıntı sentezler ve A (aminoasit) bölge içinde uygun aminoasit-tRNA'nın kabulü için hazır 80S başlama kompleksine katılır [37].

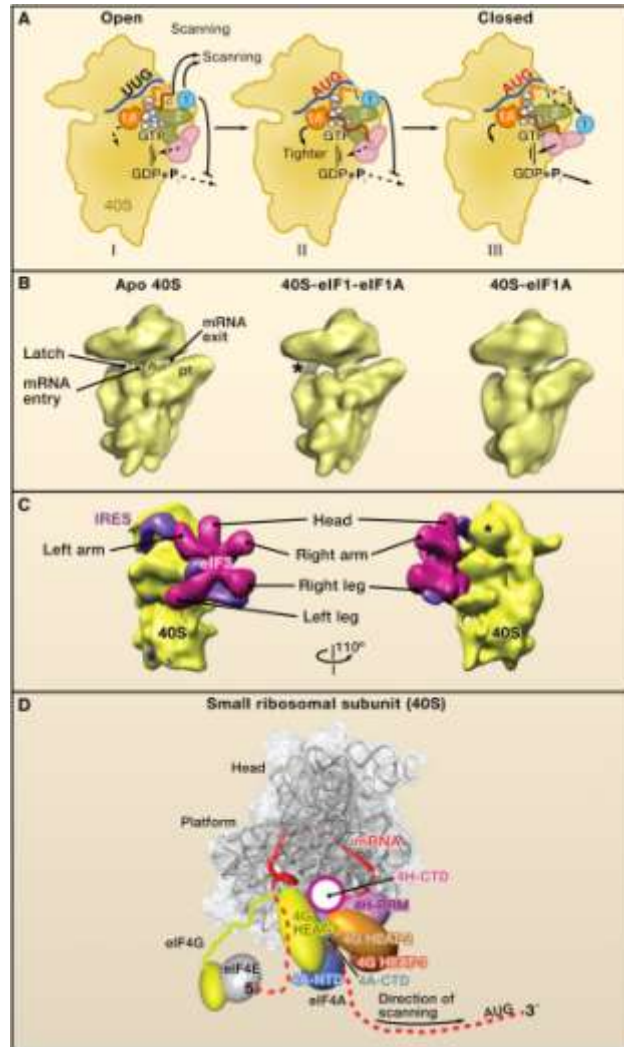
1.3.3 Başlama Kodonu Seçimini Düzenleyen Faktörler

Tarama esnasında AUG kodonunun seçiminin moleküler temelini aydınlatmada heyecan verici ilerleme vardır. Sulandırılmış sistemdeki çalışma *eIF1*'in *eIF4F*'nin helikaz alt ünitesi *eIF4A* tarafından ATP hidrolizi olmaksızın yapısal olmayan mRNA ortaya çıkararak 5' UTR'de yakın akraba başlama kodonları vasıtasıyla 5' ucundan taramayı teşvik etmek için *eIF1A* ile iş birliği yaptığını gösterdi [38]. Bu, 40S alt ünitenin mRNA bağlanma yarığının açık konformasyonuna istikrar kazandırarak AUG olmayan kodonlar P bölgesini işgal ettiği zaman *eIF*'nin taramayı teşvik ettiğini belirledi [39] (Şekil 1.11 A ve B).

eIF1 ayrıca AUG olmayan kodonların PIC taramasında *eIF2*-GDP-Pi'den Pi'nin salınımını tarama esnasında bloke etmesiyle kısmen hidrolize olmuştur. Bu önlem fonksiyonları *eIF1* P-bölgesinin yakınında yerleşmesinden ayrıldığı zaman AUG kodonunda nötralize edildi [40, 41].

Sürekli olarak *eIF1* mutasyonları gevşek bağlılık gösteren maya mutantlarında (Sui) *eIF1*'in aşırı ekspresyonu UUG başlatmasını baskılamasına rağmen erken *eIF1* ayrılmasına izin vererek yakın başlatma kodonlarında başlamayı artırdı [42].

eIF1A A-bölgesini işgal ettiği düşünüldü, ayrıca başlatma kodonu seçimini düzenledi. Onun N-terminal uzantısının AUG kodonlarında *eIF1*'in salınımını teşvik etmesinin ve taramanın tutuklanmasının tam tersi yönde hareket etmesine rağmen onun C-terminal bölgesi AUG olmayan kodonlarda devam eden taramayı teşvik etti [43] (Şekil 1.11 A).



Şekil 1.11: mRNA ile ilişkili PIC bağlanması, taraması ve AUG tanınması

(Yazarların ve derginin izniyle Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets, 2009; 136(4): 731–745, makalesinden alınmıştır.).

1.3.4 43S PIC Bağlanması Düzenleyen Faktörler

Ökaryotik PIC'lerin birleşmesi ve fonksiyonunun çoklu alt ünite faktörü *eIF3*, *eIF5*, *eIF1* ve TC ile karşılaştırıldığında mayada çoklu faktör kompleksi (MFC) olarak adlandırılmış yüksek değer kompleksinin oluşumuyla arttığı görülmektedir. 40S alt ünitenin eritici maddeye maruz kalmış arka tarafında çoklu bölgeler ile [44-46] (Şekil 1.11) ve diğer bütün MFC bileşenleri ile *eIF3* etkileşime girer [47], muhtemelen PIC birleşmesini desteklemeye olan kabiliyetinin altını çizmek için. *eIF3* ayrıca mRNA'ya 43S PIC alınımında anahtar bir rol oynar [47], muhtemelen 40S alt ünitenin çıkış kanalından ortaya çıkar gibi mRNA ile etkileşime girdiği için [44]. En azından memelilerde *eIF3* ayrıca *eIF4G* ile etkileşerek mRNA'ya bir protein köprüsü oluşturur [37] (Şekil 1.10). İlginç bir şekilde, *eIF3* j-alt birimi A-bölgesinin ve 40S alt ünitesinin mRNA giriş kanalının yakınına bağlanır ve TC'nin yokluğunda mRNA bağlanmasını engeller, tahminen TC yüklenmesinin mRNA'ya 40S bağlanmasından önce gelmesini sağlamak için [48]. 5' UTR'de ikincil yapı içeren mRNA'lar ATP ve sonraki tarama için ve şapka yapısında (cap) 43S PIC'nin bağlanmasını sağlamak için helikaz aktivitesi gerektirirler.

Yapılandırılmış β -globin mRNA lideri boyunca taramayı teşvik etmek için *eIF4F*'nin yeteneği in vitroda yeniden düzenlenmiştir [38]. Yüksek çözünürlüklü yapılar şapka yapısı için *eIF4E*'nin afinitesini artıran *eIF4G*'nin bir segmentine bağlı *eIF4E* için [49] ve şapka yapısına bağlı *eIF4E* için [37] çözülmüştür. *eIF4G*'nin bağlanması ATP'ye bağımlı helikaz aktivitesi için gerekli olan yönelimde DEAD kutu motifi hizalamaya ve *eIF4A*'nın 2 lobunu birlikte tutmaya yardımcı olur [50]. *eIF3-eIF4G-40S* kompleksinin kriyo-EM modeli 40S alt ünitenin çözücü tarafında mRNA çıkış kanalının yakınında *eIF4G*'yi yerleştirir [45]. Merak uyandıran yeni yapısal model *eIF4G*'nin şifre çözme bölgelerinde yerleşmiş nükleotidlerinin hem aşağı hem de yukarı akışta mRNA sekanslarıyla etkileşime girmesini ve PIC taramasından daha öncesinde açılan ikincil yapıda onun varsayılan rolü için mRNA giriş kanalında *eIF4G* konumlandırılmasını düşündürür [51] (Şekil 1.11).

Son zamanlarda memeli DExH kutusu proteini DHX29'un in vitroda yeniden kurulmuş bir sistemde yüksek yapılı 5' UTR'ler boyunca tarama için gerekli olduğu ve DHX29'un taramanın ilerleyiciliğini artırmak için mRNA giriş kanalının konformasyonunu etkileyebileceği ve de 40S ribozomu kapladığı gösterilmiştir [52]. Hücrelerde DHX29'un son darbesi polizom ayrışmasına neden olarak translasyon başlamasını inhibe eder [53].

PoliA bağlama proteininin (PABP) yeteneği *eIF4G* ile etkileşime girmek için kapalı halkada poliA kuyruğu ve şapka yapısına bağlanarak mRNA'nın sirkülasyonuna aracılık edebilir olmasıdır (Şekil 1.10). Bu özelliğin 43S PIC'e mRNA bağlanmasını uyarmak için PABP'nin özelliğini vurguladığı düşünülmektedir [37], en azından kısmen mRNA'nın şapkalı 5' ucuna *eIF4F* bağlanmasını artırarak [54]. Kapalı halka oluşumu sonra sonlandırma ribozomları tarafından yeniden başlamayı kolaylaştırabilir ve polipeptit salınım faktörleri eRF1 ve eRF3 ile etkileşime giren PABP'ne kanıt olmuştur. Şaşırtıcı bir şekilde, bu son etkileşim ayrıca önceki sulandırma olayı bağımsız bir şekilde in vitroda başlatma kompleksi (IC) oluşumunu uyarır [55]. PABP ayrıca 60S alt ünitenin katılmasını uyarır ve mayadan bulgular poliA kuyruğunun alt üniteye katılma faktörü *eIF5B* üzerine 2 RNA helikazın inhibitör etkilerini engellemesi gerekli olduğunu düşündürür [56]. Bunların hepsi *Xenopus oocytes*'te etkisiz olgun mRNA'ların translasyonunu aktive eden sitoplazmik poliA polimeraz GLD2 tarafından poliA kuyruk uzunluğunun niçin artırıldığına açıklanmasına yardımcı olmaktadır. Aslında, poliA kuyruk uzunluğu ikisi de CPE bağlama proteini (CPEB) olarak 3' UTR'de cis hareket eden poliadenilasyon elementi (CPE) olarak çalıştırılan poliA ribonükleaz (PARN) ve GLD2'nin aktivitelerine karşı dinamik olarak düzenlenmektedir [57].

eIF1, *1A* ve *3*; 43S ön başlatma kompleksinin (PIC) birleşmesi, üçlü kompleks (*eIF2*-GTP-Met-tRNA_i) ve *eIF5* ile birlikte 80S ribozomların ayrılmasını teşvik eder. Mayada, bu *eIF*'ler 40S ribozomal alt ünite bağlanabildiği çoklu faktör kompleksi (MFC) oluşturur. Sirküler hazırlayan mRNA, poliA kuyruğuna PABP ve şapka yapısına *eIF4F*'nin (*eIF4E-eIF4G-eIF4A*) bağlanmasıyla mRNA aktive olur. 43S PIC, *eIF4G/eIF4B* ile *eIF3/eIF5*'in etkileşimlerine imkan sağlayan şapka yapısının yakınına bağlanır ve *eIF2*-GDP-Pi üçlü kompleksinde *eIF2*'ye bağlı GTP'nin kısmi hidroliziyle ATP bağımlı reaksiyonda AUG kodonu için önder olarak

tarama yapar. AUG'nin tanınması Pi ve *eIF2*-GDP'nin salınımına izin vererek 40S platformundan *eIF1* ayrışmasını tetikler. Diğer *eIF*'lerin salınımıyla 60S alt ünitesinin katılması, *eIF5B*-GTP tarafından katalizlenir ve GTP hidrolizi son 80S başlatma kompleksine cevap vermek için *eIF1A* ve *eIF5B*-GDP'nin salınımını tetikler.

1.3.5 Alt ünite Katılmasını Düzenleyen Faktörler

60S alt ünite katalizlenmesinde *eIF5B*'nin rolünün keşfi ve ikinci GTP hidroliz reaksiyonu ökaryotik başlatma yolağının sonunda önemli bir ilerleme olmuştur [37] (Şekil 1.10).

1.3.6 Bakteri ve Ökaryotlarda Başlatma Mekanizması

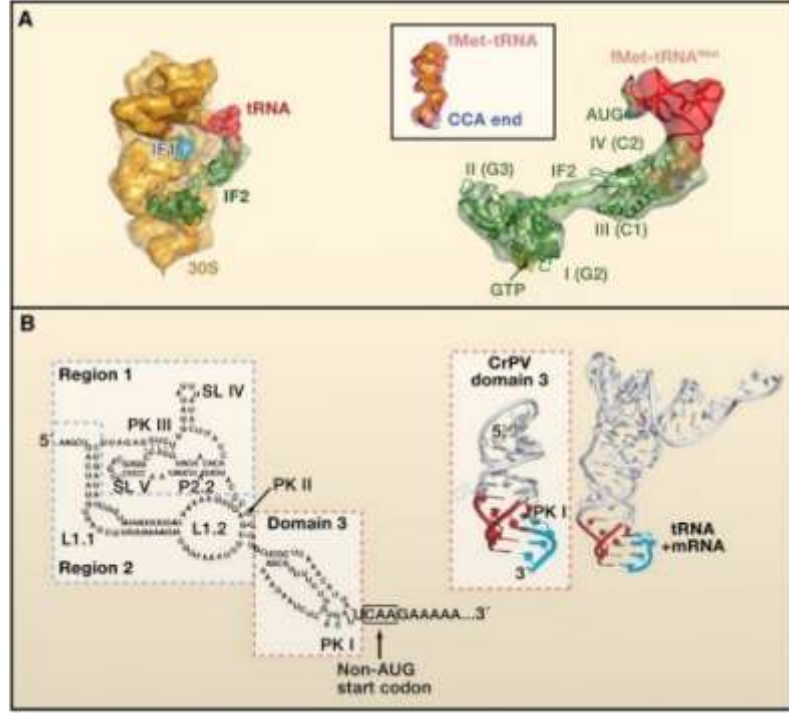
AUG'nin seçim mekanizmasının bakteri ve ökaryotlarda temel olarak farklılık göstermesine rağmen bu iki domain arasında başlatmanın önemli yapısal ve mekenistik özellikleri korunmuştur. Kristal yapıları üzerine heyecan verici ilerleme, *eIF1A*'nın C-terminal ucunun hem başlatma kompleksinden *eIF5B* salınımını tetikleyen GTP hidrolizi hem de alt ünitenin katılmasını uyarır [58, 59]. *eIF1A* ile olan etkileşimi *eIF5B* sırasında alt ünite katılması için 48S PIC'ne *eIF5B* çalışmasına yardım eder, o halde ilk aminoaçil-tRNA için A bölgesini açmak için 80S başlatma kompleksinden *eIF1A*'nın salınımını teşvik eder [60]. Bu, *eIF1A*'nın mRNA'ya bağlı bakteriyel 70S ribozom boyunca mevcut olduğu anlamına gelir ve tRNA'lar mRNA'nın yolunun atomik detayları sağlanmıştır ve kontaklar şifre çözme bölgelerinde tRNA'larla sağlanmıştır [61, 62]. Ökaryotik ribozomlar için hiçbir kristal yapının var olmamasına rağmen ayrıntılı moleküler model 80S ribozomun cryo-EM yoğunluk haritası içine ribozomal proteinler ve bakteriyel rRNA'nın homolog bölgelerinin kenetlenmesiyle üretilmiştir [38, 43]. *IF2* ve *eIF5B* PIC'ne büyük alt ünitenin katılmasıyla katalize olan GTPazlar ile yapısal olarak benzerlik gösterir ve her ikisi de başlatma kompleksinden son salınım için GTP hidrolizine bağlıdır [37, 59]. *eIF1* ve *eIF3*'ün 70S ribozomlarında güçlü benzerlik gösterir, şifre çözme bölgeleri ve mRNA bağlanma yarığı içeren ara alt ünite alanı dahil [63].

Gerçekten de yeniden oluşturulmuş memeli 48S PIC'lerinde mRNA'ların ikame edilmiş UV çapraz bağlama bakteriyel 70S kompleksinde mRNA yoluyla birçok benzerliği ortaya koydu [44]. Dahası, ökaryotik PIC'lerde fonksiyonel olarak korunan 70S komplekslerinde tRNA P bölgesiyle belirli rRNA iletişimleri genetik kanıttır [64].

Bakterilerde, sadece 3 tek polipeptit başlatma faktörü, *IF1*, *IF2* ve *IF3* P bölgesinde AUG kodonuna bağlı formüle edilmiş Met-tRNAi ile 30S IC'nin birleşmesi uyarmak için gereklidir. *IF1* ve *IF3* Met-tRNAi'nin pahasına yakın akraba uzayan tRNA'ların bağlanması istikrarsızlaşarak başlatma doğruluğunu teşvik eder [65]. 30S IC'nin son cryo-EM modeli ile translasyon başlatma kompleksinin şimdiye kadar en ayrıntılı yapısal görünümü elde edilmiştir. Bu, P bölgesine bağlı Met-tRNAi'nin benzer bir şekilde bağlanmış *IF2* A bölgesine bağlı *IF1* ve ribozoma bağımlı diğer GTPazları göstermiştir (Şekil 1.12). İlginç bir şekilde, *IF2*'nin 50S alt ünite katılmasına kadar Met-tRNAi'nin bağlanmasının nasıl stabilize olduğunu açıklayan Met-tRNAi'nin sonunu kabul eden alıcıyla *IF*'nin domain 4 ile etkileşimini görülmüştür [66].

3 bakteriyel *IF* ökaryot ve arkelerde yapısal ve fonksiyonel benzerliklere sahiptir. Bu nedenle *eIF1A* *IF1* ile *IF1* için tanımlandığı gibi muhtemelen A bölgesini işgal eden küresel domani paylaşır, fakat *eIF1A* ek olarak yapısal olarak çalıştırılmayla ilişkisi olmayan onun ökaryotiklere spesifik fonksiyonları için gerekli olan N- ve C-terminal segmentleri içermektedir, onların her ikisi de P bölgesi yakınlarında küçük alt üniteyi bağlarlar ve geri çevrilen AUG olmayanlarda (*eIF1*) ya da başlatıcı olmayan tRNA'larda (*IF3*) benzer olarak işlev gösterir.

IF3 ve *eIF1* in vitroda birbirlerinin yerine geçebilirler, onlar P bölgesinde kodon-antikodon eşleşmesine göre PIC'de benzer konformasyonel değişiklikler ortaya çıkardığını gösterirler [67]. *eIF1* için tanımlanan bulgulara benzer, yeniden yapılandırılmış bakteriyel 30S başlatma kompleksinden *IF3*'ün ayrışması uygun bir SD/anti-SD etkileşimiyle AUG tarafından hızlandırılır. Dahası, *IF1* bu mRNA sinyalleri bulunmadığı zaman 30S'in IC'ye alt ünite katılmasını inhibe eder [68].



Şekil 1.12: CrPV IRES ve bakteriyel başlatma kompleksinin yapıları

(Yazarların ve derginin izniyle Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets, 2009; 136(4): 731–745, makalesinden alınmıştır.).

(A) Küçük ribozomal alt ünite, mRNA, Met-tRNA^{fMet}, IF1 ve GTP bağımlı IF2 ile *Thermus thermophilus*'dan elde edilen 30S başlatma kompleksinin Cryo-EM modeli [66]. (B) *Dicistroviridae* intergenik bölge IRES'lerinin yapıları. (Soldaki) *Plautia stali* bağırsak virüsü (PSIV) 3 yalancı-knot (PK), 2 korunmuş kök halkası (SL) ve IRES'lerin önemli bileşenleri olarak AUG olmayan başlama içeren kodonu intergenik bölgesi ikincil yapısı. (Sağdaki) Cırcırböceği felç virüsü IRES'lerinin (kutulu) domain 3'ünün kristal yapıları ve bakteriyel 70S kompleksinde P bölgesi tRNA-mRNA etkileşimi (mRNA kodonu mavi, antikodon halkası kırmızı olarak gösterilmiştir [69]).

1.3.7 İçsel Başlatma Mekanizması

Bazı istisnai mRNA'lar, özellikle virüslerde, geleneksel tarama mekanizmasına uğramazlar. Pikornavirüslerde IRES'ler, ilk olarak keşfedildi, genellikle *eIF4E* gerektirmez fakat diğer *eIF*'lerin tümü 40S alt ünitenin çalışması için gereklidir [70]. Bu IRES'ler uzun, oldukça yapılandırılmış sekans elementlerdir (Şekil 1.12) ve muhtemelen aktif konformasyonlarına istikrar kazandıran PTB, ITAF45 ya da La otojen bağlama proteinleri sistemi polipirimidin içeren nankanonikal IRES trans aktifleştirici faktörler (ITAF'lar) tarafından uyarılır.

Hepatit C virüsünün (HCV) IRES'leri 40S'e doğrudan bağlanmak için *eIF4F*'den tamamen vazgeçer ve alt ünitenin katılması için uygun bir 48S PIC üretir ve IRES başlatma kodonuyla tRNA_i eşleşmesine sadece *eIF3* ve ya *eIF2/eIF5* ya *eIF5B* [71, 72]. Cryo-EM analizi HCV IRES'lerin *eIF1* ve *eIF1A* tarafından animsıtılan bu benzer mRNA giriş kanalının açılması ve baş rotasyon dahil ve E çıkış bölgesinin yakınında doman II ile etkileşen alt ünitenin arka tarafındaki 40S ve *eIF3* arasında bağlantı sağladığını ortaya koymuştur (Şekil 1.11) [41, 70]. Domain II ayrıca TC (başlatmanın *eIF2* bağımlı modu) ve alt ünite katılması [70-72] vasıtasıyla *eIF5* bağımlı GTP hidrolizi için çok önemlidir, ayrıca kanonik başlatma yolunda mükemmel kodon-antikodon eşleşmesi tarafından ortaya çıkarılan konformasyonel değişim/değişikliği de kolaylaştırır. IRES elementleri, P bölgesinde yüklü tRNA yerleşiminde *eIF*'lerin fonksiyonunu gerçekleştirir ve manipüle edilmiş ribozom konformasyonu bütün *eIF*'lerden hatta Met-tRNA_i'den vazgeçen cırcırböceği felç virüsü (CrPV) IRES'e aşırı bir şekilde sempati duyar [70]. Bu IRES, P bölgesi içinde GCU üçlüsünün şifre çözen alanil-tRNA bir yalancı translokasyon olayı hamlelerinden sonra translasyonun başladığı A bölgesinde GCU üçlüsünü yerleştiren şifre çözme merkezini işgal eder [73] ve 40S ve 60S komponentleri iletişimine yalancı düğüm farklı domainleri kullanır [70, 74]. Dikkate değer derecede IRES domanı AUG başlama kodonu ve tRNA_i'nin antikodon kök halkası kesinlikle P bölgesi taklitçilerini işgal eder [75] (Şekil 1.12). Hüresel IRES'lerin araştırması ve IRES fonksiyonunda kuralsız ITAF'ların dahil olması şimdiye kadar mekanizma ve yapının şaşırtıcı çeşitliliğine sahiptir [76]. Bu nedenle IRES aktivitesi PABP ve rRNA ile eşleşen SD benzeri sekansların [77] yetenekli sekanslarını bağlayan poliA kanalları [78], ITAF PTB bağlayan polipirimidin sekansları için tanımlanmıştır [79].

1.3.8 uORF'lar ile Translasyonel Kontrol ve eIF2 Fosforilasyonu

Stres esnasında translasyonel kontrolün anahtar mekanizmalarından biri olan TC birleşmesinin azalması, *eIF2B* ve 5-alt ünite GEF'in (guanin nükleotid değişim faktörü) rekabetçi inhibitörün içinde *eIF2*-GDP'ye dönüştürülen onun alt ünitesinin Ser51 üzerine *eIF2*'nin fosforilasyonudur. Dikkate değer olarak, *eIF2B*'nin bir alt ünitesinin (ϵ) sadece küçük bir kısmı GEF fonksiyonu için yeterlidir [80] ve geri kalan alt ünitelerden 3 tanesi GEF fonksiyonunu inhibe eden fosforillenmiş *eIF2 α* için bir bağlanma bölgesi sağlar [47].

Genel başlatmanın azaltılmasına ek olarak, *eIF2* (αP) paradoksal biçimde GCN4 ORF'ta yeniden başlatılmada 4 uORF'un inhibitör etkisini aşarak maya transkripsiyonel aktivatörü GCN4'ün translasyonuna neden olur. En çok 5' uORF'un (uORF1) translasyonundan sonra post-sonlandırma 40S alt üniteler TC'ye yeniden bağlanmadan sonra uORF 2.3 ya da 4'te aşağı akışta yeniden başlatılır ve tarama devam edebilir. Bu uORF'larda sonlanmadan sonra tarama devam etmez. TC seviyeleri GCN2'den (aminoasit yetersizliği tarafından aktive edilen) *eIF2 α* fosforilasyonu tarafından azaltıldığı zaman 40S alt ünitelerin post-sonlanmasının bir orantısı uORF 2-4'ü atladıktan sonra sadece TC'ye yeniden bağlanır ve GCN4 başlama kodunu yerinde tekrar başlatılır ve GCN4 bu nedenle aminoasit biyosentezini transkripsiyonel olarak aktive eder [47]. Negatif geri besleme sağlamak için *eIF2* (αP) fosfatazın (GADD34) düzenleyici alt ünitesi dahil stres cevap genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olan esas olarak benzer tekrar başlatma mekanizması vasıtasıyla ATF4 mRNA'nın translasyonu memeli hücrelerinde *eIF2* (αP) tarafından yukarı tarafa doğru regüle olmaktadır [81, 82].

Memelilerde 4 farklı *eIF2 α* kinaz farklı stresler tarafından aktive olur: PKR (virüs enfeksiyonlarında çift zincirli RNA), PERK (ER'de katlanmamış proteinler), HRI (heme eksikliği) ve GCN2 (aminoasit açlığı); *eIF2 α* 'da benzer atık madde fosforlanır ve dolayısıyla spesifik transkripsiyon faktörlerinin translasyonel indüksiyon ve genel translasyonun aşağı tarafa doğru regülasyonu dahil benzer entegre stres cevabı ortaya çıkarır [81]. *eIF2 α* 'ya bağlı PKR insan kinazının kristal yapısı *eIF2 α* kinazların substrat özgülüğünü açıklayan Ser51'den uzak *eIF2 α* 'nın bir

segmentiyle G-heliks kinaz domainin (KD) yeni bir etkileşimini ortaya koymaktadır [83].

GCN4'lerin uORF2'sinin anahtar bir özelliği uORF'un hem 3' hem de 5'enhansır sekansları ve onun kısa uzunluğuna (3 kodon) bağlı post-sonlanma 40S alt üniteleri vasıtasıyla tekrar başlatmanın yüksek bir frekansına izin verme yeteneğidir. mRNA üzerinde post-sonlanma 40S alt ünitenin alıkonmasına teşvik etmek için muhtemelen mRNA çıkış porundan çıktığı için *eIF3a*-NTD (N-terminal domain) ile 5' enhansır sekansları etkileşimine bir kanıt vardır [84].

eIF3 ve ayrıca *eIF4G*'nin sonlanmayı takiben yenilenmiş tarama için mevcut olmaları küçük uORF'ların uzaması esnasında büyük ihtimalle ribozom üzerinde tutulur. *eIF3* ayrıca uORF'un 3' ucunda bir sekansa bağlanma vasıtasıyla kedigillerin kalisivirüsünün (FCV) bir polisistronik mRNA'sında uzun uORF'ların translasyonundan sonra tekrar başlatmayı uyarır [85]. *eIF3* ayrıca bitkilerde tekrar başlatma faktörü olarak tanımlanmıştır [86] ve karnabahar mozaik virüsünün polisistronik mRNA'lar üzerine etkisine imkan sağlayan TAV proteinini (transaktivatör/viroplazma) hedefler [87]. İlginç bir şekilde, ribozom geri dönüştürülmesi in vitroda yeniden yapılandırıldığı zaman polipeptit sonlanmasını takiben post-sonlanma ribozomlarından 60S ünitelerin ayrışmasını içermektedir [88]. Bu nedenle *eIF3*-40S kompleksleri kaldığı yerden devam eden tekrar başlatma ve taramayı kolaylaştırmak için FCV uORF'ta henüz uyarıcı yukarı akış elementlerine tekrar bağlanabilir dur kodonundan salındı.

Tamamen farklı olarak başka bir dikkati çeken de, uORF'lar vasıtasıyla translasyonel kontrolün mekanizması uORF tarafından kodlanan zayıflatıcı peptitin aminoasit sekansı tarafından bir manada dikte edilmiş uORF translasyona uğrarken durdurulan 80S ribozom vasıtasıyla üretilen PIC'ler taramaya bir barikat içerirler. *Sitomegalovirus* U4 geninin translasyonunu engelleyen uORF dur kodonunda ribozomu durdurur ve polipeptit hidrolizini engellemek için eRF1 salınım faktörü ile uORF kodlayan peptidil-tRNA etkileşime girer [89].

Maya CPA1'inin (arjininin biyosentetik enzimini kodlar) uORF translasyon kontrolünün dur kodonunda durdurulması arjinine bağılıdır ve ilginç bir şekilde durdurulmuş ribozom aktiviteleri anlamsız kaynaklı CPA1 mRNA seviyelerinin de azalması için parçalanır [90].

1.3.9 Şapka yapısı Tanıma İşlemiyle Translasyonel Kontrol

İkincisi yaygın olarak translasyon başlatmanın oranı kontrol etmek için ökaryotlarda kullanılan mekanizmanın *eIF4F* vasıtasıyla mRNA 5'-şapka yapısı tanıma işlemi içermektedir. Şapka yapısına *eIF4F*'nin bağlanması *eIF4E* homologu 4E-HP tarafından engellenebilir. *eIF4G* ve *eIF4E* arasındaki etkileşim *eIF4F* kompleksinde *eIF4E* bağlama proteinleri olarak adlandırılan protein ailesinin üyeleri (4E-BP) tarafından inhibe edilir (Şekil 1.10) [91]. 4E-BP'ler *eIF4E* bağlanma bölgesi için *eIF4G* ile yarışır [97]. Sonuç olarak 4E-BP'ler şapka yapısına bağımlı translasyonu inhibe eder, fakat IRES bağımlı translasyonu değil. *eIF4E*'ye 4E-BP bağlanması fosforilasyon tarafından kontrol edilir. 4E-BP'lerin fosforilasyonunun *eIF4E* ile onların etkileşiminin azalmasına rağmen *eIF4E* ile hipofosforlaştırılmış 4E-BP'ler *eIF4E*'ye güçlü bir şekilde bağlanır [91].

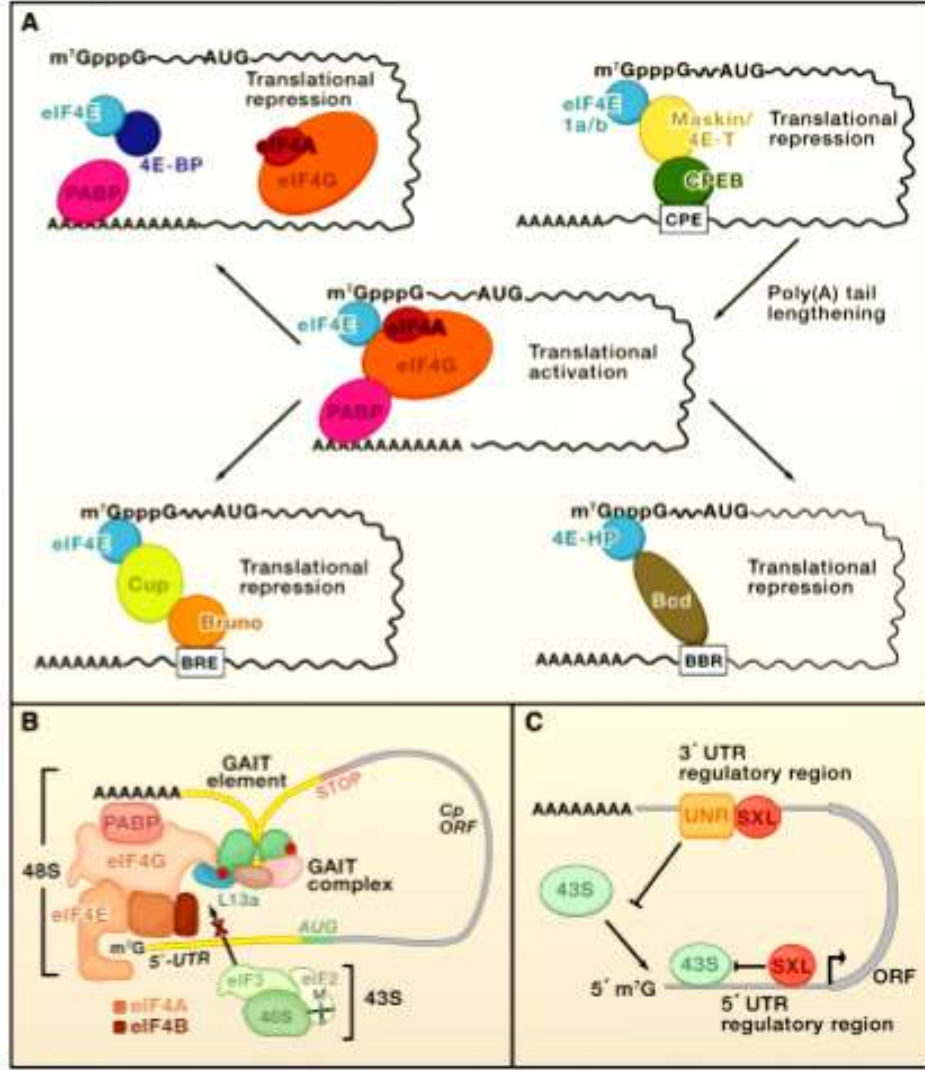
4E-BP'leri fosforilize eden bir kinaz mTOR'dur (memeli rapamisin hedefi). mTOR PI3K/Akt sinyal yolunda Ser/Thr aşağı akıştıdır ve algılar ve hücrelerin oksijen ve enerji durumu, aminoasit mevcudiyeti ve hücre dışı uyarıcılardan sinyalleri birleştirir (Şekil 1.10). mTOR doğrudan ve dolaylı olarak *eIF4G* dahil ökaryotik uzatma faktörü-2 kinaz (eEF2K) ve *eIF3* ile etkileşimi güçlendirmek için Ser422 üzerinde *eIF4B*'yi fosforile eden S6 kinazların (S6K) translasyonu ile ilgili olan birkaç substratın fosforilasyonundan sorumludur [92]. S6K'lar ayrıca *eIF4A* aktivitesini baskılayan ve bağlanan tümör baskılayıcı olan Pdc4'ü fosforile eder [99]. Pdc4'ün fosforilasyonu proteozom vasıtasıyla onun bozulması ve ubikuitin eklemesine yol açar [100]. Diğer başka bir hücrel sinyal yolu kuvvetle translasyonu etkileyen RasMAPK yoludur. *eIF4E* ve *eIF4B*'nin fosforilasyonundan sorumludur. *eIF4B* fosforilasyonu S6K tarafından fosforile edilen Ser422'de meydana gelir [92].

1.3.10 miRNA'lar tarafından Translasyonel Kontrol

MikroRNA'lar (miRNA) transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonu ve fonksiyonunun ana düzenleyicileri olan kısa oligonükleotitlerdir (22 nt) [93]. 1000 miRNA vardır ve her biri 10 mRNA kontrol ettiği için insan genomunun yaklaşık olarak yarısının miRNA'lar tarafından kontrol edildiği tahmin edilmektedir. Onun birincil transkript öncüsü işlem gördükten sonra bir miRNA daha sonra spesifik mRNA'lardan protein ekspresyonunu hedefleyen ve inhibe eden RNA tarafından uyarılmış susturma kompleksi (RISC) olarak bahsedilen bir protein kompleksi içine yüklenir [94-96].

mRNA fonksiyonun özgülüğü, özgül mRNA'ların 3' UTR'lerin içinde miRNA tamamlayıcı lokalize olmuş hedef bölgelere miRNA'ya yüklü RISC'in doğrudan baz eşleşmesi doğrultusunda saptanır [97]. Hem in vitro hem de in vivo çalışmaların çoğunda miRNA'ların ya translasyonu inhibe ettiği ya mRNA'nın istikrarını bozduğu ya da her ikisini de yaptığı birçok faktöre bağlı olarak kanıtlanmıştır. Hücrelerdeki çalışmalar mRNA bozulması, yeni oluşan proteinin proteolizi ya da başlatma ya da uzama seviyelerinde translasyonel baskılamanın mekanizması ile ilgili farklı sonuçlara yol açar. Hatta bu çalışmaların sonuca bağlanması inhibisyon translasyon başlatmanın seviyelerinde meydana gelir ve *eIF6* vasıtasıyla aracılık etmesine ve diğerlerinde şapka yapısı bağımlı olmasına rağmen *eIF4F* tarafından aracılık ettiği ve translasyon inhibisyonun şapka bağımlı olduğu bazı çalışmalarda veri anlaşmazlığına düşmüştür [98]. *eIF6* faktörü 60A alt üniteye bağlanır ve bu şekilde ribozomal alt ünite katılmasıyla regüle olur, fakat gene translasyon başlatması in vivo bir rolü için kanıt elde edilmiştir [99]. Hücrelerde çalışmalardan elde edilen kıyaslanamaz sonuçların aksine in vitro deneylerinde *Drosophila* ya da memeli embriyolarından hazırlanan hücresiz translasyon ekstraktlerinde miRNA'ların IRES'in aracılık yaptığı translasyon değil ama şapka yapısı bağımlı translasyonu baskıladığı tamamen gösterilmiştir [100]. Son olarak rapor edilen RISC'in çekirdek bir bileşeni olan Argonaut proteini şapka yapısı bağımlı translasyonun inhibisyonu için mekanistik bir açıklama potansiyel olarak sağlanabilir bağlanma için *eIF4E* ile yarışır ve şapka yapısına doğrudan bağlanır [101]. Bu, Bicoid ve d4E-HP vasıtasıyla kaudal genlerin baskılanmasına benzeyecektir (Şekil 1.13). Fakat, daha yeni çalışmalar [102] bu sonuca meydan

okur. Şaşırtıcı bir şekilde, miRNA'ların ayrıca hücreler hareketsizliğe girdiği zaman translasyonun inhibe olmasından ziyade uyardığı rapor edilmiştir [103]. Bu koşullar altında, iki RISC ile ilişkili protein (FXR2 ve Argonaut 2) mRNA 3' UTR bölgesine bağlanır ve translasyonu uyarır. Bu nedenle hücre döngüsüne bağımlı bir şekilde özgül mRNA'ların translasyonunun aktivatör ya da inhibitör gibi miRNA fonksiyonu mümkündür. Bileşenlerin tümünün *Saccharomyces cerevisiae*'de ilk olarak karakterize edilen ve bazen bozulmuş ve translasyon mekanizmasından ayrılan mRNA'ların olduğu bölgeler olarak düşünülen P kitlelerinde mRNA ekspresyon konsantrasyonunun miRNA aracılı baskılamasında içermesi çarpıcıdır [104]. P kitleleri 5'-3' ekzonükleazlar ve şapka yapısını bozan enzimler gibi mRNA küçültme mekanizmasının bileşenlerini içerir. Ago proteinleri GW182 ve Rck/p54 proteinleri ile ilişkilidir ve miRNA aracılı baskılamada P kitlelerinin bir rol oynadığı tahmin edilen P kitlelerinde miRNA'ların baskıladığı mRNA'lar mevcuttur. Sitoplazmik kitlenin diğer bir tipi bastırılmış mRNA'ların translasyon inhibisyonuna ya da çeşitli stres koşullarına cevap biriktiren stres granülleri olduğunu içerir [105]. Ago proteinlerinin stres granüllerinde miRNA ve diğer hedef mRNA'ları biriktirdiği gösterilmiştir [106]. P kitlelerinin aksine stres granüllerine Ago proteinlerinin lokalizasyonu miRNA bağımlıdır. Bu nedenle stres granülleri translasyonun miRNA aracılı düzenlenmesinde P kitleleriyle birlikte fonksiyon gösterebilir. Bazı çalışmalar stres ve P kitlelerinin ilişkisini göstermesi ve stres granülleri ve P kitleleri arasında materyalin alışverişinin olasılığını önermesi dikkat çekicidir [105].



Şekil 1.13: 3' UTR'ler yoluyla translasyonel kontrolü

(Yazarların ve derginin izniyle Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets, 2009; 136(4): 731–745, makalesinden alınmıştır.)

1.3.1 Morfojen Hedefi Kapalı-Halka Oluşumu

Transkripsiyonel aktivite düşük olduğu için RNA bağlanması vasıtasıyla mesaja özgü translasyonel kontrol ayrıca gene ekspresyonunun en önemli belirleyicisinin olduğu embriyogenezin erken evrelerinde kritik bir rol oynar. *Drosophila*'da çoğunun çalışıldığı translasyonel kontrolün embriyonik desenleri tanımlamak için sitoplazmanın farklı bölgeleri için hedeflenen morfojenin ekspresyonu üzerine güç sarfeder. Translasyonel düzenleme Bicoid ve Nanos dahil morfojenin lokalizasyonunda merkezi bir rol oynar [107]. Bu morfojenezi

kodlayan mRNA'lar önden arkaya ya da arkadan öne embriyonun karşısında kodlanan proteinlerin konsantrasyon değişimlerini kuran embriyonun karşı kutuplarına lokalize olmuşlardır. Bicoid ve Nanos proteinleri embriyoda eşit oranda dağıtılmış diğer morfojenleri kodlayan mRNA'ların translasyonunu baskılamak için sitoplazmada işlev görür. Bicoid mRNA'nın 5' ucunda *eIF4E* ilişkili proteine (d4E-HP) ve embriyonun kaudalının 3' UTR'ye eş zamanlı olarak bağlanarak embriyonun ön kısmında kaudal embriyonun translasyonunu baskılar (Şekil 1.13) [108]. *eIF4E*'nin aksine d4E-HP *eIF4G* ile etkileşmez ve bu nedenle *eIF4F*'nini birleşmesini engeller ve 43S PIC'in çalışmasına eşlik eder. Benzer şekilde d4E-HP arka kısımda onun translasyonunu inhibe etmek için mRNA kamburunun 3' UTR'sinde Nanos içeren bir protein kompleksine bağlanır [108]. Yukarıdaki mekanizma *eIF4E*'ye bağlanan Maskin boyunca CPEB vasıtasıyla translasyonun inhibisyonu için *Xenopus oocytes*'te çalışmalardan orjinal bir şekilde önerilene benzerdir [109] (Şekil 1.13). Erken oogenezde Maskin mevcut olduğu zaman farklı bir mekanizma 4E-T (4E taşıyıcısı) boyunca *eIF4E1b*'ye (*eIF4E*'nin bir homologu) bağlanan CPEB maternal mRNA'ların translasyonunu susturmak için çalışır (Şekil 1.13) [110]. Bir *eIF4E* bağlama proteini olan Cup Smaug vasıtasıyla nanos mRNA'yı [111] ve Bruno vasıtasıyla oskar mRNA'yı çalıştırır [112, 113]. Her iki durumda da Cup *eIF4E* bağlanması için *eIF4G* ile yarışarak ribozoma mRNA'nın çalıştırılmasını inhibe eder. Embriyonun arka kutbu dışında oskar ve nanos mRNA'nın translasyonel baskılanması bu mRNA'ların etkisiz olması için lokalizasyon mekanizması gibi onların kodladığı morfojenin hedeflenmesini desteklemek için esastır [114, 115]. Geniş susturma mRNP'leri [112, 113] ya da spesifik hedef mRNA'lara CCR4 deadenilaz kompleksini çalıştırmayı [116-118] içeren transkripsiyonel baskılama mekanizması ayrıca gelişme ve embriyonik desenlemeye önemli katkı sağlar. Bu mekanizmalar karbon açlığı esnasında mayada Dhh1/Pat1 baskı genel mekanizmasına benzer olabilir [104].

1.3.2 43S PIC'ler, Tarama ve Alt ünite Katılması

Morfojen hedefleme sadece translasyonel baskılama gerekmez ayrıca mekanizmalar mekansal domain yaklaşımında translasyon aktive olur ve baskılamayı azaltır. Oskar Smaug ile onun ilişkisini önleyerek nanos mRNA'ların yeniden

tutulmasına katkı sağlar [119]. Gelişen oositin ön sırt korteksinde grk mRNA translasyonunun aktivasyonu geniş sitoplazmik protein Encore ile ilişkisinde poliA bağlama proteini 55D (PABP55D) tarafından aracılık eder [120]. Vasa (Vas) *eIF5B*'ye bağlanan ve arka kısma oogenez esnasında lokalize olan DEAD kutusu helikazıdır [121]. *eIF5B* bağlanması için özel olarak anlaşmaya varan Vas'ın sadece bir formunun (VasD617) ekspre olduğu oositlerde ayrıca bir etki gözlenmiştir (vas boş oositlerindeki translasyonunu büyük ölçüde azaltan) [122]. Bu sonuçlar muhtemelen 48S PIC'e 60S alt ünitenin katılmasını uyarmak için muhtemelen Vas'ın *eIF5B*'yi çalıştıran grk gibi spesifik mRNA'lar düzenlenmesi hipotezine izin verir. 60S alt ünite katılmasının adımını hedefleyen mesaja özgü baskılamanın başka örnekleri vardır. Nörit büyüme kolonilerinin ya da fibroblastların önde olan kenarına lokalize olmuş mRNA için önemli olan ve aktin mRNA'nın 3' UTR'ye bağlanan ZBP1 (zipkod bağlama proteini 1) onun taşınması esnasında mRNA'nın translasyonunu engeller. ZBP1 43S PIC'e 60S'in katılmasını engeller [123]. 60S katılmasının inhibisyonu mRNA'nın 3' UTR'ye E1 ve hnPNP'lerin bağlanmasıyla eritroit ön madde hücrelerinde 15-lipoksijenazın (LOX) kontrolünde de belgelenmiştir [124]. *Drosophila*'da dozaj telafisi erkek ve dişilerde X bağlantılı genlerin ekspresyonunu eşitler ve erkeklere özgü öldürücü 2 (MSL-2) protein içerir. Dozaj telafisi 2 mekanizmanın (SXL RNA bağlama proteinleriyle (UNR) birlikte MSL-2 mRNA'sının 3' UTR'ye bağlanır ve SXL 5' UTR'ye bağlanmayı engellerken mRNA'ya 43S PIC'in çalışmasını engeller.) birleşmesiyle sadece dişilerde ekspre olan eşey ödürücü protein (SXL) ile MSL-2 mRNA'nın translasyonel baskılamasıyla dişilerde elenir [125] (Şekil 1.13). Seruloplamin ya da vasküler endotel büyüme faktörü A'yı (VEGF) kodlayanlar gibi inflamatuvar genler için mRNA transkriptleri translasyonun IFN γ -aktive inhibitörü olarak isimlendirilmiş heteromerik bir kompleksine (GAIT) bağlı olan 3' UTR boyunca interferon- γ (IFN γ) tarafından translasyonel olarak baskılanmıştır [126]. GAIT gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), NS-1 ilişkili protein-1 (NSAP1), glutamil-, prolil-tRNA sentetaz ve 6S alt ünite proteini L13a'dan oluşur. IFN γ GAIT kompleksinin birleşmesi ve 60S ribozomal alt üniteden onun salınmasına yol açan L13a'nın fosforilasyonunu indükler. Hedef mRNA'ya bağımlı komplekste fosforlanmış L13a *eIF4*'ye bağlanır ve 43S PIC çalışmasını inhibe etmek için *eIF3-eIF4G* etkileşimini engeller (Şekil 1.13). Son zamanlarda fermuar etkileşimli protein kinazın (ZIPK) tek bölgede L13a'nın fosforillendiği ve o halde ölümle ilişkili protein kinaz-1 ve ikinci bir IFN

kaynaklı kinazın fosforilasyonu ile aktive olur [127]. Translasyonel kontrol ayrıca yetişkin hücre soylarının içindeki embriyonik kök hücrelerinin (ESC) farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Embriyoid bedenler içindeki ESC'lerin farklılaşması esnasında mRNA'ya ribozom çalışmasında çarpıcı bir artış gösterilmiştir [128]. mTOR inhibitörü rapamisin embriyoid gövde büyümesi ve 4E-BP1 fosforilasyonunu engellediği için mTOR sinyal yoluyla ESC farklılaşması esnasında 4E-BP1'in artan fosforilasyonu ile açıklanır.

1.3.3 Hastalıklarda Translasyonel Kontrol

Translasyon mekanizmasının bileşenlerinin anormal fonksiyonu belli kanserler ve metabolik bozukluklar dahil çeşitli insan hastalıklarının altını çizmektedir. Birçok kanser hücre büyüme ve üremesini kontrol eden sinyalleşme yollarının bozulmasına neden olur. Bu yollar ayrıca translasyonu da etkiler. Kanser tRNA'lar, translasyon düzenleme faktörleri, başlatma faktörlerinin aktivitesi ve miktarında anormal değişikliklerle ilişkilidir. Buna ek olarak birçok kanser tipinde ribozomal alt ünitenin ve hızlandırılmış ribozom biyogenezi miktarında bir artış vardır [129]. Kanser ve ekspresyonun seviyeleri arasındaki güçlü bir nedensel ilişki farede tümörler ve doku kültüründe fare ve insan hücrelerinin malign dönüşümüne sebep olan aşırı ekspresyonun *eIF4E*'si için kurulmuştur [129]. Birçok kanserde *eIF4E*'nin miktarı artmıştır ve *eIF4E* bolluğu hücrelerde ya da onun 4E-BP tarafından baskılanan aktivitesinde siRNA tarafından azaltıldığı zaman Ras- ya da Src- onkogen fenotipi normale dönüştürür. Aynı şekilde, *eIF4E*'ye antisens oligonükleotitler hiçbir zararlı etkiye neden olmayan farede tümör büyümesini inhibe ederler [130]. Dahası 4E-BP1'in fosforilasyon durumu ve miktarı çocukluk rabdomiyosarkomu ve yumurtalık ve meme kanserleri için tahmini hayatta kalma sonucu bulunmuştur. Bu nedenle 4E-BP1 seviyeleri yüksek olduğu ya da hipofosforile olduğu zaman hayatta kalma için öngörü iyidir [131]. *eIF4E*'nin dönüştürücü aktivitesi düzenleyen büyüme, üreme ve apoptoziste mRNA kodlayan proteinlerin bir alt kümesinin translasyonunu teşvik etmek için onun yeteneği tarafından açıklanabilir [132, 133]. Ser/Thr kinaz Mnk ile *eIF4E*'nin fosforilasyonu transformasyon ve onkogeniklik için önemlidir. *eIF4E*'nin Ser209Ala mutanı NIH 3T3 kültürlü hücreleri dönüşümünü yapamaz [134]. Ayrıca B hücre lenfoma modeli

farede *eIF4E*'nin onkogenik aktivitesi için Ser209'un gerekli olduğunu kanıtlamışlardır [135]. Bu çalışma ayrıca apoptozu baskılayarak tümörigeneze neden olan fosforlanmış *eIF4E*'nin önemli bir mekanizmasıyla sonuçlanmıştır. İlginç bir şekilde fosforlanmış *eIF4E*'nin hedeflerinden biri tümörigenezi teşvik eden antiapoptotik protein Mcl-1'dir. Son çalışmalar tümörigenezde önemli bir rol oynayan hücrelerde şapka yapısı bağımlı ve IRES bağımlı translasyon arasında bir denge olduğunu gösterdi. In vitroda şapka yapısı bağımlı translasyonun inhibisyonu IRES bağımlı translasyonda bir artışa neden olur [136]. Tümör baskılayıcı 14-3-3 σ yükseltilmiş IRES bağımlı translasyonda sonuçlanması umulan çeşitli başlatma faktörlerine onun bağlanması boyunca mitoz esnasında şapka yapısı bağımlı translasyonu inhibe eder [137]. 14-3-3 σ 'in yetersiz olduğu hücrelerde şapka yapısı bağımlı translasyon baskılanmamıştır ve sonuç olarak bozulmuş tümörigenez, anöploidi ve sitokineze neden olan siklin bağımlı kinaz Cdk11 (p58 PITSLRE) için mRNA'nın IRES bağımlı translasyonu azaltılır [137]. Aynı şekilde Myc onkogenin aktivasyonunun IRES bağımlı translasyonun giderlerinde şapka yapısı translasyonda bir artışa neden olduğu ve bu nedenle tümörigenezde sonuçlanan Cdk11 seviyelerinde bir azalma olduğu gösterilmiştir [138]. Şapka bağımlı mRNA translasyonundan şapka bağımsız mRNA translasyonuna bir anahtar ileri meme kanserinde hipoksi kaynaklıdır ve tümörün hayatta kalması-ilerlemesi ve anjiogenezi teşvik etmek için gereklidir [139]. Bu anahtar şapka bağımlı translasyonun inhibisyonunda sonuçlanan 4E-BP1'in aşırı ekspresyonuna sebep olur, fakat hipoksik koşullar altında büyüme için gerekli olan HIF1 α , VEGF ve Bcl2 gibi protein kodlayan IRES'leri içeren mRNA'nın translasyonu güçlendirilmiştir. Translasyonel düzenleyici proteinler obezite gibi metabolik hastalıklarda onların fonksiyon sonuçlarında bozukluğu ve metabolizmayı kontrol eder. *eIF2* fosforilasyonu endoplazmik retikulumun homeostazında kritik bir rol oynar [140]. *eIF2*'nin Ser51Ala (S51A) mutasyonu için knockin fare ciddi bir hipoglisemiden acı çeker ve doğumundan kısa bir süre sonra ölür. S51A mutasyon için fare heterozigozu yüksek yağ içerikli diyete duyarlıdır ve artan vücut ağırlığı, hiperlipidemi, glikoz tahammülsüzlüğü gösterir. Bu tip 2 diyabet benzeri fenotip büyük ölçüde lipid metabolizması ve pankreatik β hücre fonksiyonunda bozukluklara neden olur. Benzer şekilde farede ve insanda PERK'in delesyonu doğum ve şeker hastalığından sonra hücre yıkımı ile sonuçlanır. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun hedefleri aşağı akışta olan 4E-BP'ler ve S6K'lar ayrıca metabolizmayı kontrol eder. 4E-BP'lerin

fosforilasyonunun sonucu olarak mTOR'un aktivasyonu güçlendirilmiş translasyon boyunca kısmen anabolik süreçleri teşvik eder. Dolayısıyla fare 4E-BP'leri ya da S6K'larının yetersizliği değiştirilmiş metabolizma gösterir. Fare 4E-BP1 ve 4E-BP2'sinin ikisi de yüksek yağ içeren diyetle aşırı duyarlıdır ve obez hale gelir. Buna ek olarak onlar glikoza tahammülsüz ve insüline duyarsız bir fenotip gösterir [141]. Fare S6K1 eksikliği yaş ve diyetle bağlı obeziteye dirençlidir ve insülin duyarlılığında bir artış sergiler [142]. Translasyon kontrol öğrenme ve hafızada önemli bir rol oynadığı için belli kırılmalı X mental gecikme sendromu (FMR) gibi nöropsikiyatrik rahatsızlıklarda sezilmiş durumdadır. Bu bozukluk, bu hastalığın azalmış miktarlarında üretilen ya da mutasyona uğratılan FMR proteindeki (FMRP) değişikliklere neden olmaktadır. FMRP sinaptik plastisitede ürünleri kritik rollere sahip mRNA'ların translasyonunu normal olarak inhibe eden bir RNA bağlama proteindir. Bu nedenle FMRP'nin mutasyonu ya da azaltılmış ekspresyonu aşırı sinaptik plastisitede sonuçlanır. Birkaç çelişkili modelin FMRP tarafından baskılanan translasyonel mekanizmayı [143] açıklamak için ileri sürülmesine rağmen CYFIP1 (sitoplazmik FMRP ile etkileşen protein 1) yoluyla FMRP'nin *eIF4E*'ye bağlanması son zamanlarda rapor edilmiştir, bu nedenle *eIF4G*'nin yer değiştirmesi ve sonuç olarak translasyonun inhibisyonu [144]. Bu moleküler mekanizma mRNA'nın 3' ve 5' uçlarının bağlanması boyunca spesifik translasyonel baskılamanın kurulan modeline uyar (Şekil 1.13). Virüsler kendi proteinleri sentezlemek için konak translasyonel aparata bağlıdır. Onlar translasyonun seviyelerinde hareket eden konak savunma mekanizmasını etkisiz hale getirmek için ve hücresel translasyon makinesine erişmek için elde edilen karmaşık stratejiler evrimleşmiş durumdadır. Virüsler ayrıca translasyon başlatma faktörlerinin aktivitesi ve fosforilasyonu kontrol eden selüler sinyal transdüksiyon yolunu da manipüle eder. Birçok virüs, fakat hepsi değil, onların kendi replikasyonunu teşvik etmek için konak protein sentezini kapatır ve antiviral bir cevap birleştirmeden konağın doğuştan immün savunmasını muhtemelen önler. Konak protein sentezinin mekanizmasının kapatılması onun poliovirüs ve akrabaları için özellikle belirgindir. Viral mRNA translasyonunun IRES'lerin kullanımı boyunca kesilmeden devam ederken bu virüsler seçici olarak *eIF4G*'nin dilinimiyle hücresel mRNA'ların şapka yapısı bağımlı translasyonunu inhibe eder. Şaşırtıcı bir şekilde büyük DNA virüsleri (Herpeks simleks ve Vaccina virüsleri) *eIF4F* birleşmesini uyararak konak protein sentezini durdurur ve sonuç olarak translasyonu güçlendirir. Bu hareketsiz hücrelerde akut virüs repliasyonu için

önemlidir ve ayrıca latent enfeksiyonların tekrar aktivasyonunu da gözlemler [145]. *eIF4F* birleşmesinin uyarılması farklı mekanizmalar boyunca 4E-BP'lerin fosforilasyonunda sonuçlanan PI3K/Akt/mTOR yolunun kısmen aktivasyonuna neden olmaktadır [146]. Buna ek olarak *Herpes simplex* virüsünün *eIF4G*'ye bağlanan ICP6'sı gibi viral gen ürünleri *eIF4F* birleşmesini güçlendirir [79]. Son olarak, Vaccina virüsü *eIF4F* birleşmesini teşvik eder ve ayrıca etkin bir şekilde onların yerel konsantrasyonunu artan sitoplazmik replikasyon kompartımanı için başlatma faktörlerini çalıştırır [147, 148]. İlginç bir şekilde DNA için konak protein sentezi kapatılması konak hücre splayının inhibisyonu ve güçlendirilmiş geniş çaplı mRNA hacmi dahil metabolizmasında değişiklikler yoluyla meydana gelir [149]. SV40, *Herpes simplex* ve *sitomegalovirüs* gibi DNA virüsleri ayrıca apoptozis için gerekli olan hücresel mRNA'ların translasyonunu inhibe eden kodlanmış viral mRNA'ları kullanarak konak mRNA'ların seçimi translasyonunu etkisiz hale getirir [150]. Yaşlanma azalan protein senteziyle ilişkilidir [151]. *Caenorhabditis elegans* nematodundaki çalışmalar *eIF4E* ve *eIF4G* ya da ömrünü uzatan onların düşük seviyeleri dahil eIF4F kompleksinin çeşitli bileşenlerinin inhibisyonunu gösterdi [152-156].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygun saflıktadır. Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler Sigma, Fermentas, Qiagen, MERCK, Amresco, Fisher, Applichem gibi firmalardan yerli aracı kuruluşlar yoluyla elde edildi.

2.2 Kullanılan Cam ve Plastik malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, ısıya dayanıklı cam malzemeler deneysel aşamalardan önce 20 dakika 121 °C’de ve 1 atm basınçta otoklavlanarak steril edildi. Otoklavlanan malzemeler kullanılmadan önce 80 °C sıcaklıkta 1 gece bekletilerek kurutuldu.

2.3 Bitki Materyali Toplama

Zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinin yaprak ve meyve örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu’nun zeytin bahçesinden temin edildi. Toplanan örnekler Balıkesir Üniversitesi Merkez Laboratuvarı’ndan temin edilen sıvı azot içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 °C dolabına yerleştirildi.

Balıkesir’de yetişen “var yılı” ve “yok yılı” olarak belirlenen zeytin ağaçlarından, *FBPA* ve *eIF 4E* genlerinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yaprak örnekleri toplandı. “var yılı” ifadesi zeytinin çok meyveli oluşunu ifade ederken “yok yılı” zeytinin az meyveli oluşunu ifade etmektedir. 12 ay boyunca bu ağaçlardandoku örnekleri toplandı. Her örnek toplamada; tarih, toplanan doku örnekleri ve toplanıldığı ağaç hakkındaki bilgiler not edildi. Toplanan örnekler, sıvı

azot içerisinde laboratuvara getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 °C dolabına yerleştirildi.

2.4 Biyoinformatik Analiz

Çeşitli veritabanları ve biyoinformatik araçlar kullanılarak tahmini zeytin *FBPA* ve *eIF 4E* geni ve proteini hakkında bilgi toplandı.

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önceden oluşturulan cDNA kütüphanesinden elde edilen tahmini zeytin *FBPA* ve *eIF 4E* gen dizilerinin hangi canlılara benzerlik gösterdiği NCBI BLAST'tan (Basic Local Alignment Search Tool) nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla bulundu. Gen dizisinin veritabanında gösterdiği benzerliklerle tahmini bir cDNA oluşturuldu. BioEdit programının Sorted Six - Frame Translation sekmesi kullanılarak tahmini cDNA'nın açık okuma çerçevesi (ORF) ve böylece kodladığı aminoasit dizisi belirlendi ve bu dizinin NCBI BLAST'tan pBLAST (Protein Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla veritabanındaki hangi proteinlere benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Tahmini zeytin *FBPA* ve *eIF 4E* proteinlerinin aktif bölgesi ve bu bölgenin özelliği NCBI veritabanındaki CDD (Conserved Domain Database) programıyla belirlendi. Proteinin 3 boyutlu yapısı ve domainlerinin dizileri ise Cn3D programıyla tespit edildi.

Tahmini zeytin *FBPA* ve *eIF 4E* genlerinin tahmini cDNA dizisinin nükleotit kompozisyonu ve amino asit dizisine ait amino asit kompozisyonu BioEdit programıyla belirlendi. Tahmini zeytin *FBPA* ve *eIF 4E* proteinlerinin nükleotit dizisine göre zeytin çeşitleri arasında farklılık gösterip göstermediği (Polimorfizm Analizi) belirlendi. Bunun için DNA izolasyonu yapılan zeytin örnekleriyle 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PCR/PZR) gerçekleştirildi ve dizileme için Ligand Biyoteknoloji ticari firmasına (Ligand Biyoteknoloji, İzmir, Türkiye) gönderildi. Gelen dizileme sonuçları FinchTV yardımıyla açıldı, BioEdit programına kaydedilerek hizalandı ve karşılaştırılarak analiz edildi.

Zeytin tahmini *FBPA* ve *eIF 4E* proteinlerinin translasyon sonrası özellikleri (kodladığı aminoasit sayısı, moleküler ağırlığı, izoelektirik noktası (pI), hidrofobosite grafikleri vb.) ExPASy web sayfasındaki (<http://www.ExPASy.org>) programlar aracılığıyla tespit edildi. Zeytin tahmini *FBPA* ve *eIF 4E* proteinlerinin hidrofobik/hidrofilik olduğunun saptanması ve membran/sitoplazmik özellikte olduğunun tahmini amaçlı BioEdit programının ‘Protein’ segmesinden ‘Kyte&Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile’ kullanıldı.

2.5 Genomik DNA İzolasyonu

Tahmini *FBPA* ve *eIF 4E* için tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığının ve zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasında polimorfizmin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amacıyla zeytin çeşitlerinden (Tablo 2.1) gDNA izolasyonu, Qiagen (Venlo, Hollanda) firmasına ait “DNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 69104)” kullanılarak yapıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek gerçekleştirildi.

Elde edilen gDNA örnekleri, kalıp olarak kullanarak gene özgü primerlerle PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri jelde yürütüldü ve görüntüledi. Jelde istenilen büyüklükte çıkmış tek bant olarak elde edilen PCR ürünleri Ligand Biyoteknoloji’ye (İzmir, Türkiye) gönderilerek dizi analizleri yapıldı.

Tablo 2.1: Polimorfizm için kullanılan izole edilen zeytin genomik DNA'ları.

Olea europaea cv. Samanlı
Olea europaea cv. Çakır
Olea europaea cv. Erkence
Olea europaea cv. Karamürselsu
Olea europaea cv. Edinciksu
Olea europaea cv. Ayvalık clone UB1
Olea europaea cv. Ayvalık clone 0308
Olea europaea cv. Ayvalık clone 0108
Olea europaea cv. Leccino
Olea europaea cv. Negral
Olea europaea cv. Gordales
Olea europaea cv. Verdial
Olea europaea cv. Cormana
Olea europaea cv. Uslu
Olea europaea cv. Memeli
Olea europaea cv. Ayvalık clone UB3

2.6 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması

PCR deneylerinde kullanılan spesifik primerler (Tablo 2.2) online “Primer3” programıyla dizayn edildi. Dizayn edilen primerler ‘Macrogen (Korea)’ firmasından temin edildi. Laboratuvara liyofilize halde gelen primerlere üzerlerinde yazan miktar kadar saf su eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu karışımdan steril bir ependorfa 10 µL alındı ve üzeri 90 µL saf suyla 100’e tamamlandı.

Tablo 2.2: Çalışmalarda kullanılan primerler, dizileri ve Tm değerleri.

Primerler	Nükleotid Dizileri (5'-3')	Tm	Kullanım Amacı
<i>FBPA1_F</i>	TCACTTCTTAAGTCATCTCCTGTTCTT	60.22	İntron tespiti
<i>FBPA1_R</i>	CAAATGGTAAGTTTTAGGCGTACC	60.17	İntron tespiti
<i>FBPA2_F</i>	AGACTCTCTACCAATCCACAACAGAT	60.78	İntron tespiti
<i>FBPA2_R</i>	GAGCAGGTTGCTGACTATACTCTCAAC	62.97	İntron tespiti
<i>FBPA3_F</i>	GATATGCTGCCATTCTCAAGTATT	59.92	Polimorfizm
<i>FBPA3_R</i>	GAATGTTTGTTAAGGGCTATGTCTACT	59.49	Polimorfizm
<i>FBPA_RT_F</i>	TCACTTCTTAAGTCATCTCCTGTTCTT	63.7	Real-Time
<i>FBPA_RT_R</i>	CACATATAAATACATACTGCGGTTTTG	62.2	Real-Time
<i>FBPA_A_F</i>	GGTGATGATGATGACAAGATGGATGAATCCAATGCTACCTG	76.9	Klonlama
<i>FBPA_A_R</i>	GGAGATGGGAAGTCATTAGCCTTGGCCCCGAACAAGCAAAGTATCC	79.9	Klonlama
<i>eIF 4E_F</i>	GTTGAAGAAACAGAGAAATCAACTACC	59.99	İntron tespiti
<i>eIF 4E_R</i>	GACTATGACCTTTCCTAAGGGTAAATC	60.04	İntron tespiti
<i>eIF4E_RT_F</i>	TGGAGTGTTTACAATAACATTAACCAA	60.7	Real-Time
<i>eIF4E_RT_R</i>	GTATCAGATTTACCCTTAGGAAAGGTC	65.3	Real-Time
<i>eIF 4E_A_F</i>	GGTGATGATGATGACAAGATGGTTGAAGAACAGAGAAATC	74.9	Klonlama
<i>eIF 4E_A_R</i>	GGAGATGGGAAGTCATTACACCGTGTACTGATTTTTGGCAG	77.9	Klonlama

2.7 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR reaksiyonları; 25 µL'lik toplam hacimde, Tablo 3'te gösterilen gerekli komponentler belirtilen miktarlarda eklenerek uygulandı. Primerlerin ortak çalıştığı sıcaklık belirlenerek oluşturulan manuel PCR 0.4 µL dNTP, 2.5 µL NH₄SO₄, 1.5 µL MgCl₂, 1.5 µL DMSO, 0.3 µL Taq polimeraz, 15.8 µL dH₂O, 1 µL Forward primer, 1 µL Reverse primer ve 1 µL kalıp DNA ile gerçekleştirilirken; mix PCR 12.5 µL mix, 1 µL Forward primer, 1 µL Reverse primer ve 1 µL kalıp DNA ile gerçekleştirildi. PCR'lar, komponentlerin teker teker tüpe ilavesiyle (manuel) veya ticari olarak satılan karışımıyla (mix) gerçekleştirildi.

PCR şartları ise; 1 döngü; (ön ısıtma basamağı) 94 °C 1 dakika, 35 döngü; (denatürasyon basamağı) 94 °C 30 saniye, (primer bağlanması basamağı) 50 °C 1 dakika, sentez basamağı 68 °C 1 dakika, 1 döngü; (uzama basamağı) 68 °C 5 dakika olarak ayarlandı.

2.8 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen “Thermo Scientific” marka (Massachusetts, U.S.A) elektroferez sistemi kullanıldı. Elektroferezde kullanılan “Agaroz (Katalog No: 50004)” Lonza(Darmstadt, Germany) firmasından temin edilirken, TAE tampon çözeltisi için gerekli olan “Tris-base (Katalog No: K41623287 118/K42846187 144)”MERCK (Darmstadt, Germany) firmasından, “Borik Asit (Katalog No: A0768,1000)” AppliChem (Maryland Heights, MO, U.S.A) ve “EDTA (Katalog No: A5097,0250)” ise AppliChem (Darmstadt, Germany) firmasından temin edildi. TAE (5X) tampon çözeltisi oluşturmak için kullanılan bileşenler belirli miktarlarda eklendi (Tablo 2.4). Bu tampon çözeltisinden de elektroferezde kullanmak için, TAE (1X) tampon çözeltisi hazırlandı (Tablo 2.3). Zeytinden izole edilen gDNA (bkz. Tablo 1) ve RNA örneklerini gözlemek için %0.8’lik agaroz jeli hazırlandı. Bunun için 0.8 g agaroz tartıldı ve 100 mL TAE (1X) tampon çözeltisi içerisine eklenip kaynatılarak çözüldü. Karışım soğuyana kadar elektroferez tankı ve taraklar saf suyla yıkanarak steril edildi. Soğuyan karışımın içerisine 150 µL EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek, tarakları önceden yerleştirilen jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektroferez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar TAE (1X) tampon çözeltisi ile dolduruldu. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli bir DNA standartı olan Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilen marker (Katalog No: SM1333) yüklendi (Tablo 2.4). gDNA örnekleri için 5 µL gDNA 1 µL yükleme boyası (Tablo 2.4) karıştırılırken RNA örnekleri için 3 µL RNA kalıbı, 2 µL distile su ve 1 µL yükleme boyası karıştırılarak jeldeki kuyucuklara pipet yardımıyla yüklendi. Örnekler 200 V elektrik akımı verilerek 35 dk. jelde yürütüldü. Yürütülen DNA ve RNA örnekleri UV transillüminatöründe gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.3: Agaroz jel elektroforezi çözeltileri ve komponentlerin miktarları.

Çözeltiler	Kompozisyonu (1 L için)
50X TAE	Tris-Base
	Glasiyel Asetik Asit
	0.5M EDTA (pH 8)
1X TAE	50X TAE
	Distile su

Tablo 2.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler.

Yükleme Boyası	Marker
Fermentas 6X DNA Loading Dye (Katalog No: R0611)	Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Katalog No: SM1333)

TAE tamponundan daha iyi sonuçlar veren TBE tamponu da jel elektroforezi için kullanılmıştır. 5X TBE tamponu 57 gr Tris-base, 27.5 gr borik asit ve 20 mL 0.5 M EDTA kullanılarak hazırlandı. 200 mL 5X TBE tamponu üzerine 800 mL distile su eklenerek 1X TBE tamponu hazırlandı. Her kullanımda 1X TBE tank büyüklüğüne bağlı olarak 0.5X TBE'ye seyreltilerek kullanıldı.

2.9 RNA İzolasyonu

Gerçek zamanlı PCR için gerekli olan cDNA sentezinden önce zeytin çeşitlerinden daha önceden toplanıp uzun süreli muhafaza için -80 °C'de saklanan örneklerden Qiagen (Venlo, Hollanda) firmasına ait "RNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 74904)" kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı ve izolasyon kitin kullanma kılavuzu takip edilerek gerçekleştirildi.

2.9.1 RNA Örneklerinin DNaz I ile Muamele Edilmesi

Total RNA örneklerinden gDNA'nın uzaklaştırılması için toplam hacim 100 µL olacak şekilde 60 µL RNA (~30 ng), 10 µL DNaz I tamponu 10X, 30 µL Dnaz I

enzimi (EN0515, Fermentas, Vilnius, Lithuania) karıştırılarak hazırlandı. 37 °C’de 30 dakika bekletildikten sonra 350 µL RLT tamponu (Qiagen Hilden, Germany, plant RNAeasy izolasyon kitinden) ve 250 µL %96’lık etanol eklendi. 700 µL lik örnek Plant RNAeasy izolasyon kitindeki pembe kolonlara aktarıldı. 8000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 mL’lik koleksiyon tüpüne alındı ve üzerine 500 µL RPE tamponu eklendi. Tekrar 8000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Boş olarak bir kez daha santrifüj edilerek altta kalan döküldü. 1.5 mL’lik ependorflara kolon alındı ve üzerine 50 µL DEPC’li su eklendi. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj ile örnekler hazır hale getirildi.

2.10 cDNA Sentezi

Gerçek zamanlı PCR için RNA örneklerinden (Tablo 2.5) ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (Ipswich, Massachusetts, U.S.A) kullanılarak cDNA sentezlendi ve sentez kitin kullanma klavuzuna göre şu şekilde gerçekleştirildi: 6 µL total RNA 2 µL oligonükleotit eklendi, pipetaj yapıldı ve 70 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra tüpe 10 µL reaksiyon mix ve 2 µL enzim mix eklendi ve pipetaj yapıldı. 42 °C’de 1 saat ve 80 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar bittikten sonra 30 µL distile su eklendi, pipetaj yapıldıktan sonra örnekler hazır hale geldi.

Tablo 2.5: Dokusal Real-Time analizi için RNA örnekleri.

1. ağaç çiçek 14.05.2010
1. ağaç pedisel 19.10.2010
3. ağaç sürgün 14.05.2010
1. ağaç meyve 19.10.2010
1. ağaç tomurcuk 14.05.2010
2. ağaç yaprak 18.08.2010-Yokyıllı yaprak 14.05.2010
1. ağaç yaprak 22.09.2010-Varyıllı yaprak 22.11.2010

2.11 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

Belirlenen zeytin ağaçlarının çeşitli dokularından toplanan doku örneklerinden (bkz. Tablo 2.5) izole edilen RNA örneklerinden ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanıldı. Bunun için Exicycler™ 96 BIONEER cihazı kullanıldı. Reaksiyon hazırlanırken kullanılan tabakalarda bulunan liyofilize halde bulunan içeriğe, 17 µL saf su, 1 µL cDNA kalıbı, 1 µL F primer, 1 µL R primer eklendi. Reaksiyon 95 °C’de 5 dakika; 1 döngü, 94 °C’de 15 saniye; 35 döngü, 55 °C’de 15 saniye, 72 °C’de 15 saniye, 72 °C’de 1 dakika; 1 döngü olacak şekilde Tablo 2’ de belirtilen primerler ile Tablo 7’de belirtilen kontrol primerleri kullanılarak uygulanmıştır. Reaksiyon GAPDH, ubiquitin ve süperoksit dismutaz normalizatör genlerine özgü primerler (bkz. Tablo 2.2) kullanılarak 3’er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.6: RT-PCR’da kullanılan normalizatör genlerin primerleri.

Primer İsmi	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	ACAGCTCCTGGTAAGGGTGA	GGCTTGCGTCAAGAAGTCTC
Ubiquitin	AAGACAATTACCCTTGAAGTTGAGA	CAAAGTGATGGTTTTTCCAGTAAGA
Süperoksit dismutaz	AGATGACTTGGGCAAAGGTG	CAATCCCAATCACACCACAA

2.12 Bakteri Kompetent Hücresinin Hazırlanması

E.coli DH10B (çoğaltma suşu) ve *E. coli* BL21 (ifade suşu) (Invitrogen, Vilnius, CA) bakteri suşları, tek koloni elde edebilmek için antibiyotik içermeyen LB agar besiyerine ekildi veya -80 °C’deki gliserollü stok LB agara besiyerine ekilir. 1 gece 37 °C inkubasyona bırakıldı. 5 mL sıvı LB Broth’a (ampisilin (-)) tek koloniden alınıp inokülasyon yapılarak 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. 80 mL antibiyotik içermeyen LB Broth besiyerine ön kültürden 2 mL inoküle edildi. 37 °C’de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi ve her 2 saatte bir spektrofotometrede absorbans değeri ölçülerek OD₆₀₀ = 0.2 absorbans değerine ulaşması beklendi. OD =

0.2 olduğunda 1M MgCl₂'den 1.6 mL ve 1M glikozdan 888 µL eklendi ve OD = 0.5 olana kadar 37 °C'de çalkalayıcı etüvde inkübasyona devam edildi. Daha sonraki işlemlere buzda devam edildi. OD₆₀₀ = 0.6 olduğunda ise buz içerisinde +4 °C'ye kaldırıldı ve 2 saat beklendi. +4 °C soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra pellet 40 mL tritalasyon tamponda çözüldü. Tampon taze olarak şu şekilde hazırlandı; 1M CaCl₂'den 25 mL, 1 M MnCl₂'den 17 mL ve 1M NaAC'den 10 mL (pH 5.5). Pellet çözülmeye soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı. Pellet üzerine birşey ilave etmeden 1 dk tekrar santrifüj yapıldı ve supernatant tekrar atıldı. Pellet %5'lik gliserol içeren 4 mL tritalasyon tampon (3.4 mL tritalasyon tampon+0.6 mL gliserol) içinde çözdürüldü. Kompetan hücreler, ependorflara 50 µL dağıtılarak kullanılmak üzere - 80 °C'de saklandı.

2.13 Plazmit Stoklarının Hazırlanması

Sıvı kültürde büyüyen plazmitlerden 2 mL'lik ependorflara 500 µL %5'lik gliserol ve 500 µL plazmitlerden alınarak stok hazırlandı ve bu stoklar - 80 °C'de saklandı.

2.14 Klonlama

aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (Thermo Scientific, Katalog No: K1251) kullanılarak prosedüre göre klonlama gerçekleştirildi.

2.14.1 Kültür Ortamlarının Hazırlanması

LB agar, Fisher Scientific marka olup 4 gramının 100 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı ve otoklavladı. Yaklaşık 37 °C'ye kadar soğuduğunda 100 µL 0.1 mg/L ampicilin ilave edilerek eklenerek petrilere döküldü.

2.14.2 Jelden Kazanım

aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2'ye tasarlanan primerle yapılan PCR örneklerinin yaklaşık 20'şer μL tek kuyucuğa olmak üzere örneklerin tamamı jele yüklendi. Normalinden farklı olarak bu elektroforezde geniş taraklar kullanıldı ve markerdan 12 μL jele yüklendi. Jelden kesimi kolaylaştırmak için jelde genler arasında boşluk bırakıldı. Elektroforez şartları ise; 200A, 140V ve 35 dakika. Her gen için 2 temiz ependorf hazırlandı ve UV ışık altında jelden kesim yapıldı. Jelden kazanım için Fermentas GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Katlog No: K0691) kullanıldı. Her ependorfun üzerine 350 μL bağlanma tamponu eklendi. 55 C'de 10 dakika inkübasyonun ardından kitteki mor kolanlardan örnekler geçirildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından kolonun altındaki sıvı atıldı. Mor kolonlar maximum 800 μL örnek alabilir olduğundan örnek bitene kadar kolondan geçirildi. Örnek bittikten sonra kolona 100 Mor kolonlar maximum 800 μL örnek alabilir olduğundan örnek bitene kadar kolondan geçirildi. Bağlanma tamponu ilave edildi ve 1 dakika 14000 rpm'de santrifüjün ardından kolonun altındaki sıvı atıldı. Kolona 700 μL washing tampon eklendikten sonra yine 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı atıldıktan sonra boş santrifüj yapıldı ve kolon yeni bir ependorfa alındı. Kolonun üzerine 50 μL elüsyon tampon eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra kolonlar atıldı ve pürifiye DNA elde edilmiş oldu. Pürifiye DNA kullanılmıncaya kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

Pürifiye DNA'dan 7 μL , LIC Tampon'dan 2 μL ve T₄ DNA polimeraz'dan 1 μL (total 10 μL) PCR tüpünde birleştirildi. T₄DNA polimeraz eklendikten sonra PCR tüpü 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla tüpe 0,6 μL EDTA ilavesinden sonra 'Plate51' vektöründen 1 μL tüpe eklendi. Kısa bir vorteks ve santrifüjün ardından oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

2.14.3 PCR Pürifikasyonu

PCR pürifikasyonu Macherey-Nagel firmasının PCR Clean-up Gel extraction kiti ile gerçekleştirildi. 50 μL PCR ürünü üzerine PCR ürünü bir kez jel elektroforezinde 5 μL yürütüldüğü için total hacmi 100 μL 'ye tamamlamak için 55

μL distile su eklendi. Yine aynı PCR tüpüne 200 μL NT1 (Bağlanma tamponu) tamponu eklendi ve bu karışım NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Column kolana yüklendi. +4 °C’de 30 saniye 11,000 rpm’de santrifüjün ardından kolonun altındaki sıvı atılarak kolona 700 μL NT3 (Yıkama tamponu) eklendi. Tekrar +4 °C’de 30 saniye 11,000 rpm’de santrifüj yapıldı ve kolonun altındaki sıvı atılarak kolona 700 μL NT3 eklendi. Ardından tekrar +4 °C’de 30 saniye 11.000 rpm’de santrifüj yapıldıktan sonra kolonun altındaki sıvı atılarak 1 dakika 11.000 rpm’de kolona bir şey ilave edilmeden santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 30 μL NE (Elüsyon tamponu) tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika beklendikten sonra 1 dakika 11.000 rpm’de santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından ependorfta kalan pürifiye DNA’dır ve -20 °C’de saklandı.

2.15 Transformasyon

2.15.1 Çoğaltma Suşuna Transformasyon

E. coli’nin çoğaltma suşu olan DH10B kompetent hücreleri -80 °C dolabından çıkarılarak buza alındı. 3 μL klonlama ürünü kompetent hücrenin üzerine pipetle yavaşça bırakıldı ve 30 dakika buzda bekletildi. 42 °C’de 90 saniye ısı şukunun ardından hemen buza alınarak burada 5 dakika bekletildi. Falkona 450 μL antibiyotiksiz LB Broth besiyeri eklenerek 37 °C’de 1.5 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı ve birkaç dakika santrifüj yapıldı. Yaklaşık 400 μL kadar süpernatant atıldıktan sonra kalan süpernatant ile pellet pipetaj yapılarak karıştırıldı ve LB agar (ampisilin (+)) içeren petriye yayılarak ekim yapıldı. 1 gece 37 °C’de inkübe edildi.

2.15.2 Koloni PCR ve Koloni Taraması

Etüvde büyüyen bakterilerden üremiş olan 10 koloni seçilerek 10 μL saf suyla sulandırılarak sulandırma örnekleri hazırlandı. Sulandırma örneklerinden 1 μL kalıp kullanılarak koloni PCR gerçekleştirildi. PCR için kullanılan primerler kite aittiler. Ampisilinli LB agar besiyeri petrinin dışından kalemle 10 bölgeye ayrıldı ve

sulandırma örneklerinden 1 µL bu bölmelere damlatıldı. 1 gece 37 °C’de inkübe edildi.

2.15.3 Sulandırma Örneğinin LB Broth Besiyerine Ekilmesi

Falkona alınan 10 mL LB Broth besiyerinin üzerine 10 µL ampisilin ilave edildi. Koloni PCR sonucu en iyi bant oluşturan sulandırma örneğinin tamamı falkona eklendi. Falkonun ağzı hafif açık biçimde ve 45°’lik açıyla 37 °C’de 1 gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

2.15.4 Plazmit DNA izolasyonu (GeneJet Plazmid Miniprep Kit)

GeneJet™ plazmid Miniprep (K0501, Fermentas, Vilnius, Lithuania) protokolüne uygun şekilde izole edildi. Büyütülen plazmitler büyük santrifüjde 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. 350’şer µL süpernatant 4-5 ependorfa dağıtıldı. Ependorflara 150 µL%100’lük gliserol ilave edildi ve -80 °C’de saklandı. Pellete 250 µL Rnaza ile muamele edilen resüspanسیون tamponu (1mL resüspanسیون tamponu + 10 µL Rnaza, +4 °C’de saklanır) ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı. 250 µL lizis solüsyonu eklendikten sonra yavaşça pipetaj yapıldı. Bu karışım ependorfa aktarıldı ve üzerine 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklendi. Ependorf 3-5 kez alt üst edildi. 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kolan tüpüne aktarılırken pellet atıldı. Tekrar 14000 rpm’de santrifüjden sonra alttaki sıvı atıldı. Etanolle muamele edilen 500 µL yıkama solüsyonu kolona eklendi ve 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonun altında kalan sıvı atıldı. Kolona tekrar 500 µL yıkama solüsyonu eklendi ve tekrar 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonun altında kalan sıvı atıldı. 14000 rpm’de 1 dakika kolona birşey eklenmeden (boş santrifüj) santrifüj yapıldı ve kolonun altındaki tüp tamamen atıldı. Kolon temiz bir ependorfa alındıktan sonra kolana 50 µL elüsyon tamponu ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı (1.Elüsyon). Kolana 20 µL elüsyon tamponu ilave edildikten sonra tekrar 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı (2. Elüsyon).

2.15.5 Spektrometreyle Miktar Ölçümü

195 µL saf su 5 µL plazmit örneğiyle bir kuyucuğa yüklendi ve 200 µL saf su da bir kuyucuğa yüklenerek kör oluşturuldu. Kuyucuklar cihaza yüklenerek ölçüm yapıldı.

Ölçüm sonucu – Körün sonucu = Miktar Ölçümü (ng/ µL)

2.15.6 Ekspresyon Suşuna Transformasyon

3 µL izole plazmit kompetent hücrenin üzerine pipetle yavaşça bırakıldı ve 30 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42 °C’de 90 saniye tutulduktan hemen sonra buza alınarak burada 1-2 dakika bekletildi. Falkona 450 µL antibiyotiksiz LB Broth besiyeri eklenerek 37 °C’de 1.5 saat çalkalamalı inkübatörde ve birkaç dakika santrifüj yapıldı. Yaklaşık 400 µL kadar süpernatant atıldıktan sonra kalan süpernatant ile pellet pipetaj yapılarak karıştırıldı ve LB agar (ampisilin (+)) içeren petriye yayılarak ekim yapıldı. 1 gece 37 °C’de inkübe edildi.

Üreme sonucunda seçilen tek koloni LB Broth’a ekildi; 10 mL LB Broth, 10 µL ampisilin ve seçilen tek koloni. 1 gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Üreme olduktan sonra 90 mL LB Broth, 12.5 µL ampisilin ve 10 mL önkültür yaklaşık 2 saat 37 C’de inkübatörde çalkalandı. 2 saat sonucunda kültürden 200 mL spektrometreyle ölçüm için kuyucuklara yüklendi. OD₆₀₀=0.6 oluncaya kadar inkübatörde çalkalanırken 2’şer saatte bir ölçüm yapıldı. OD₆₀₀=0.6 olduğunda gen protein sentezleyecek hale geldiğinden laktazon kükürtlü analogu olan IPTG ile indüklendi. İndükleme süresi proteinin ekspresyon seviyesine göre değişiklik gösterir. OD₆₀₀=0.6 olan, içerisinde LB Broth, ampisilin ve tek koloni olan erlene 1 mL IPTG eklendi ve 1 gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı

2.16 Hücreleri Çöktürme ve Lizis

IPTG ile indüklenen hücreler 50 mL'lik falkonlara dağıtıldı. 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Lizis yapılana kadar pellet -20 °C'de saklandı.

Lizis işlemine başlamadan önce hazırlanması gereken protamin sülfat hazırlandı.

-20 °C'deki pelletlerin üzerine 2 mL lizis tamponu eklendi ve pellet tamponda iyice çözdürüldü. Üzerine 100 µL fenil metan sülfonil florid (PMSF) eklendi. Pipetaj ve vorteksle tam karışma sağlandı. 125 µL lizozim eklenerek tekrar pipetaj ve vorteks yapıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek lizisin gerçekleştiğini gösteren sümüksü yapı oluşumu gözlemlendi. Ardından 10 dakika buzda bekletildi. Her örnek iki ayrı ependorfa paylaştırıldı ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni ependorflara aktarılırken pellet atıldı. Hemen kullanım olduğunda +4 °C'de saklanırken daha sonraki kullanımlar için -20 °C'ye kaldırıldı.

Alternatif bir lizis işlemi de şu şekilde gerçekleştirilmiştir; 1 pellet buz içinde 2 mL tampon A (500 mL için; 50 mM Heps, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0.5 mM TCEP, pH 7.5) ve 20 µL PMSF içinde köpürtülmeden çözüldü. Spatülün ucuyla katı lizozim çözünmüş pelletin tam ortasına eklenerek kısa bir santrifü yapıldı. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 µL protamin sülfat eklendi ve 15 dakika buzda bekletildi. Karışım ependorflara (2 ependorf kadar) paylaştırıldı. Ependorflar +4 °C ve 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Şırınga yardımıyla süpernatant yeni bir edendorfa alındı ve pellet atıldı.

2.16.1 Protamin Sülfat Hazırlanması

1 mL için 0.03 gr protamin sülfat tartıldı. Üzeri otoklavlı su ile 1 mL'ye tamamlandı ve çözülünceye kadar vorteks yapıldı. Vorteksin ardında pipetaj yapılarak çözülmenin tam olarak gerçekleşmesi sağlandı.

2.17 SDS-PAGE

SDS, proteinlerin denatürasyonunu sağlar ve proteini negatif yükle yükler. Böylece protein büyüklüğüne göre proteinlerin + yükten – yüke doğru jelde hareketini sağlar.

SDS-PAGE Bio-Rad PowerPac Basic sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

2.17.1 Gerekli Kimyasalların Hazırlanması

2.17.1.1 Amonyum Persülfat (APS) Hazırlama

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

2.17.1.2 %15'lik Ayırma Jeli Hazırlama

Tek bir SDS jeli için %15'lik ayırma jeli; polimerizasyon sağlayacak ayırma jeli tamponu 1.25 mL, yürüyecek proteinlerin hızını etkileyecek bisakrilamidden 1.875 mL, otoklavlı sudan 1.875 mL, polimerizasyonu başlatacak %10'luk APS'den 50 µL ve polimerizasyonu katalizleyen tetrametilendiamiden (TEMED) 5 µL alınarak cam bir beherde karıştırıldı.

Bu karışım daha önceden hazırlanan elektroforez sistemindeki iki cam arasına pipet ucu küçük cama dayandırılarak karışım yavaşça bırakıldı. Beherde kalan karışım kontrol edilerek polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi beklendi.

2.17.2 Yığıma Jelinin Hazırlanması

Tek bir SDS jeli için yığıma jeli; yığıma jeli tamponundan 1.25 mL, bisakrilamidden 0.625 mL, 3.07 mL otoklavlı su, 50 µL %10'luk APS ve 5 µL TEMED karıştırılarak hazırlandı.

Tamamen polimerize olan %15'lik ayırma jelinin üzerine yine pipet ucu küçük cama dayandırılarak karışım yavaşça bırakıldı. Yığılma jelinin de tamamen polimerize olması beklendi.

2.17.3 Yürütme Tamponunu Hazırlanması

100 mL 10X Tris-Glisin SDS tamponunun üzeri otoklavlı suyla (900 mL) 1L'ye tamamlanarak yürütme tamponu hazırlandı. Tris uygun pH ortamı sağlarken glisin örneklerin kuyucuklar içinde kalmasını sağlar.

2.17.4 Yükleme için Örnek Hazırlama

Örnekler için boya miktarı 1000 μ L'ye 900 μ L olacak şekilde hazırlandı. Örnek miktarına göre boya miktarı hazırlandı ve kalan miktar betamerkaptoetanol ile tamamlandı. Jelin kuyucukları 20 μ L aldığından örnekten 15 μ L, boyadan 5 μ L kullanıldı. Buna göre 2 protein örneği için 54 μ L boya ve 6 μ L betamerkaptoetanol karışımı kullanıldı.

1 kuyucuğa 15 μ L örnek yükleniyorsa 2 protein için pipet hatalarına karşı 4 proteinmiş gibi 15x4'ten 60 μ L örnek hesabı yapıldı.

1000 μ L için 900 μ L boya kullanılıyorsa

60 μ L için ? boya kullanılmalı

? = 54 μ L

Protein örnekleri 100 °C'de 5 dakika bekletildi. Örnekler denatürasyon için ısı şokuna tabi tutulurken hazırlanan jel ve karşısına boş cam takılarak SDS tankına oturtuldu. Yürütme tamponu elektrik akımını sağlaması açısından jel ve boş camların arasından başlanarak tank üzerinde belirtilen 2 gel çizgisine kadar tanka dolduruldu.

2.17.5 SDS Jeline Örnek Yüklenmesi ve Örneklerin Yürütülmesi

Protein marker için PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Lithuania, Katalog No: 26619) kullanıldı. İlk kuyucuğa 3 µL protein marker yüklendi. 20'şer µL örneklerden jele yüklendi. Örnekler yığıma jelinden ayırma jeline hareket etsin diye 20 dakika 90V elektrik akımı verildi. Örnekler ayırma jeline geçtiğinden 90 dakika 110V elektirik akımı verildi.

Örneklerin yürütülmesi tamamlandığında jel camlar arasından dikkatlice çıkarılarak jel "Commensie Blue" içinde çalkalamalı inkübaatörde 45 dakika bekletildi. Jeli boyadan arındırmak için jel önce suyla sonra da SDS renk açma solüsyonuyla yıkandı. Jel 1 gece çalkalamalı inkübatörde SDS renk açma solüsyonu içinde bekletildi.

Jel UV Transülliminatör kullanılarak görüntülendi.

2.17.6 SDS Jelinin Boyanması

2.17.6.1 Commasie Blue Boyası ile Boyama

SDS jeli 45 dakika çalkalamalı inkübatörde Commasie Blue boyası içinde bekletildi. Ardından jel saf suyla yıkandıktan sonra 75 mL asetik asit glisial, 50 mL metanol, 1L'ye suyla tamamlanarak hazırlanan renk açma solüsyonunda 1 gece boyunca çalkalamalı inkübatörde bırakıldı.

2.17.6.2 Gümüş boya ile Boyama

SDS-PAGE'de yürütülen jel; 10 mL asetik asit, 40 mL etil alkol ve 50 mL dH₂O karışımı içinde 1 saat bekletildi. Daha sonra jel 1 gece boyunca suda bekletildi. %0.02 sodyum tiyosülfat (0.04 gr Na₂S₂O₃.5H₂O+200 mL dH₂O) içinde jel 1 dakika tutuldu. Jel 20 saniye aralıklarla 3 defa yıkandı. Jel +4 °C'de soğuk gümüş nitrat çözeltisinde (0.2 gr AgNO₃+200 mL dH₂O) 20 dakika bekletildi. 40 µL %35'lik

formaldehit çözelti kullanılmadan hemen önce çözeltiye eklendi. Jel 20 saniye aralıklarla 3 defa yıkandı. Yıkamadan sonra jel yeni bir kaba alındı. Jel 1 dakika tekrar dH₂O ile yıkandı. Jel %3'lük sodyum karbonat çözeltisi (15 gr Na₂CO₃+500 mL dH₂O) içine alındı. 125 µL formaldehit çözelti kullanılmadan önce çözeltiye eklendi. Çözelti sarı olunca yeni sodyum karbonat çözeltisiyle değiştirildi. Boyama belirginleşene kadar bu işlem tekrarlandı. Jel 20 saniye dH₂O ile yıkandı. %5'lik asetik asit içinde jel 5 dakika tutuldu. Ayrıca jel %1'lik asetik asit içinde +4 °C'de saklanabildi.

2.18 Western Blot

2.18.1 Gerekli Kimyasalların Hazırlanması

Transfer tamponu; 20 mL 10X transfer tampon, 20 mL etanol ve 60 mL dH₂O'nun karışımıyla hazırlandı.

10X TBS; 24,22 gr 0,2M Tris, 87,66 gr 1.5M NaCl ve 1000 mL'ye tamamlayacak kadar dH₂O'nun karışımıyla hazırlandı.

1X TBS; 40 mL 10X TBS ve 360 mL saf suyun karışımıyla hazırlandı (total hacim 400 mL). Karışıma saklama süresini uzatmak için 40 µL Tween20 eklendi.

Blocklama (kapatma) tamponu; 0,1 gr blocking reagent, 2 mL blocking reagent tampon ve 18 mL 1X TBS karışımıyla hazırlandı.

Antibody; 10 mL 1X TBS içine 5 µL antibody ekleyerek hazırlandı. Bu şekilde ½ oranında seyreltilen antikorların daha da seyreltilmesi için karışım filtrelili bir şırıngadan geçirildi.

Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Katalog No: 32106); 3 mL luminol enhancer solution ve 3 mL peroxide solution karıştırılarak hazırlandı.

2.18.2 Western Blot Basamağı

Proteinlerin elektroforetik transferi için BIO-RAD Trans-Blot Turbo Transfer System (California, USA) ve nitroselüloz (Merck Millipore, Germany) membranlar kullanıldı. SDS yürütmesinden sonra jeller camlar arasından çıkarıldı, yığıma jeli kesilerek atıldı ve jel transfer tamponu içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 1-2 dakika inkübe edildi. Kurutma kağıtları ve membran da transfer tampon içine bırakıldı. Bu sırada transfer aparatları da transfer tamponu içine alındı. Daha sonra transfer kasedi arasına kurutma kağıdı, membran, jel, kurutma kağıdı olacak şekilde sandviç modeli hazırlandı. Hava kabarcığı kalmaması için rulo aparatla kurutma kağıtlarının üzerinden geçildi. Daha sonra kaset, blot tankına yerleştirildi ve 25 Volt 1.3 Amper akımda 7 dakika transfer yapıldı.

Alternatif olarak; PVDF membran kullanılarak 250 V ve 90 A'de 1 gece transfere bırakıldı.

Jelden membrana transferin gerçekleştiğinden emin olunduktan sonra membran 1X TBS içine alınarak çalkalamalı inkübatörde (25 °C) 10'ar dakika olmak üzere 3 kez yıkandı. Yıkamalardan sonra membran üzerine 20 mL blocking Tampon eklendi ve 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ardından yine 10'ar dakika olmak üzere 3 kez 1X TBS içinde yıkama yapıldı ve 20 mL antibodyçerisinde 40 dakika çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Ardından yine 10'ar dakika olmak üzere 3 kez 1X TBS içinde yıkama yapıldı. Yıkamalar bittikten sonra Fusion FX Vilber Lourmat (Germany) sistemiyle marker ve proteinler ayrı ayrı görüntülendi.

Alternatif transfer yönteminde ise PVDF membran kullanıldı ve membran 250 Volt ve 90 Amper'de 24 saat transfere bırakıldı.

2.19 Ni-NTA Kolon ile Saflaştırma

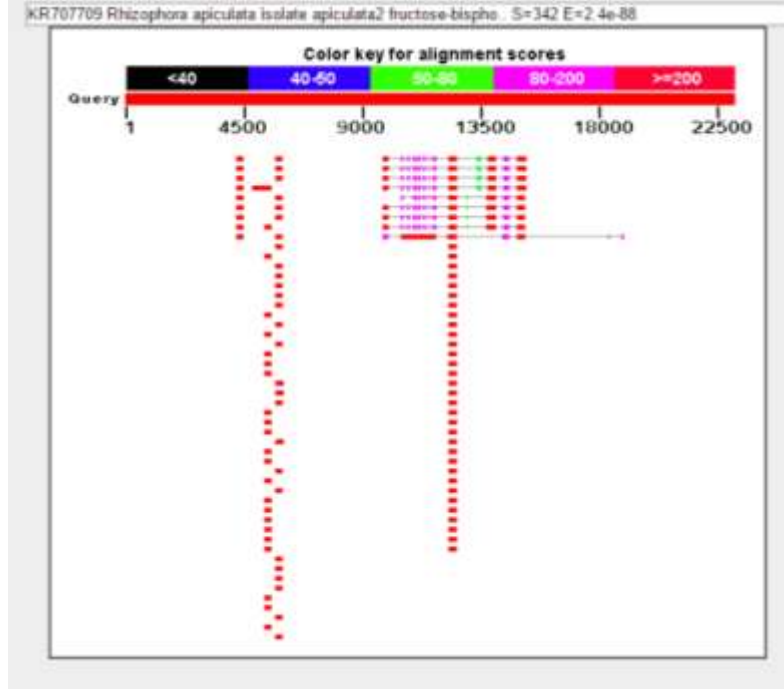
1 pellet 5 mL tampon A ve 50 µL PMSF içinüde çözüldü. 5 dakika ultrasonik banyoda hücreler parçalandıktan sonra örnekler ependorflara paylaştırıldı. +4 °C ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant filtreden geçirildi ve 15 mL'lik falkona alınarak 'Start' hazırlandı. Bazik ponza tampon A ile Ni-NTA kolonda yıkandı. Filtreden geçirilen çözelti bazik ponza ile Ni-NTA kolonda karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi. 5 mL tampon A bazik ponzaya eklendi ve süzülerek 'Wash 1' hazırlandı. Tekrar 5 mL tampon A bazik ponzaya eklendi ve süzülerek 'Wash 2' hazırlandı. 2 mL tampon B (500 mL için; 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, %5 gliserol, 0.5 mM TCEP, pH 7.5) bazik ponzaya eklendi ve 2 dakika bekletildi. Süzülerek 'Elüsyon 1' hazırlandı. Bazik ponzaya tekrar 2 mL tampon eklendi ve 2 dakika bekletildi. Süzülerek 'Elüsyon 2' hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler sırayla SDS-PAGE jeline yüklendi ve gümüş boyama tekniği kullanılarak görüntülendi.

3. BULGULAR

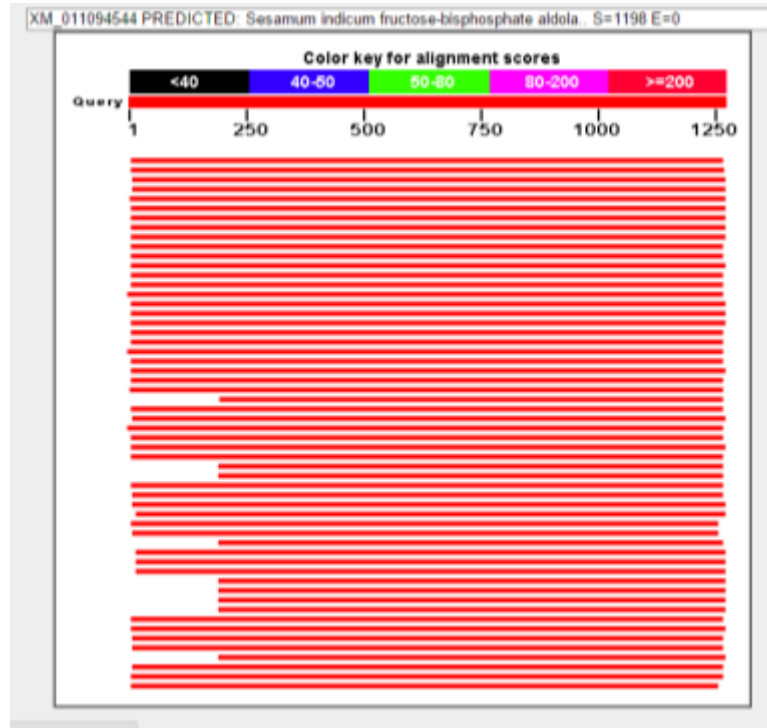
Bu tez çalışmasında 2 farklı gen karakterize edilmiştir: fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü.

3.1 Biyoinformatik Analiz

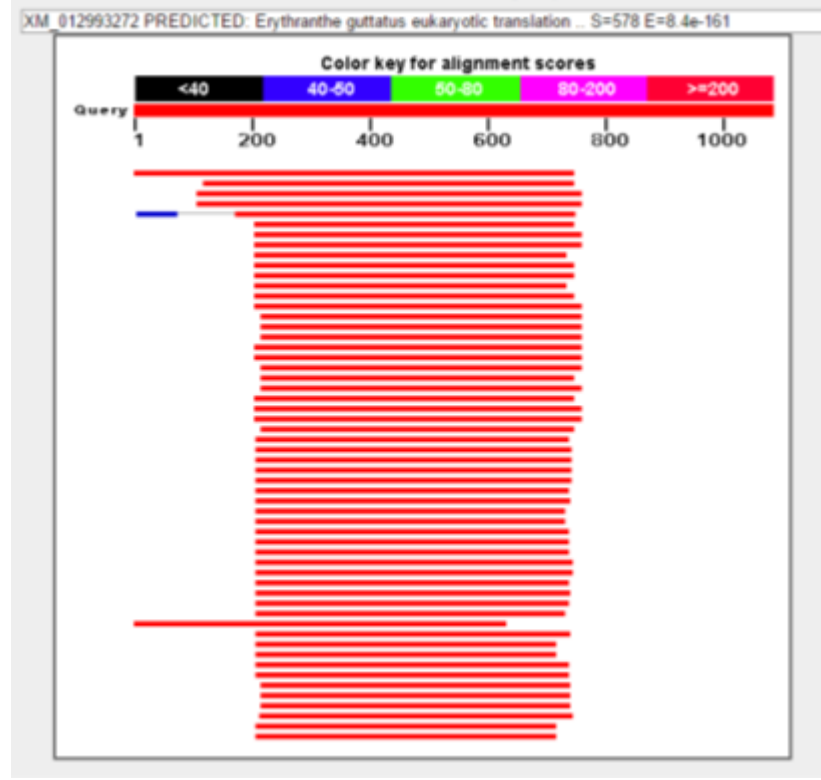
NCBI veritabanında çeşitli canlılar için tahminiolan *FBPA* ve *eIF 4E* için nükleotid dizisi veritabanı referans alınarak sağlandı ve bu gen dizilerine göre tasarlanan primerler kullanıldı (Tablo 2.2). Genomik DNA ve cDNA dizilemesi Ligand Biyoteknoloji LTD. ŞTİ. (İzmir, Türkiye) adlı ticari kuruluşa yaptırıldı. Dijital olarak elde edilen DNA dizileri FinchTV programıyla açılarak kromotogramlar kontrol edildikten sonra BioEdit programına aktarıldı ve 2 taraflı dizilendiği için ortak bir dizi (contig) oluşturuldu. gDNA ve cDNA ortak dizileri karşılaştırılarak intron analizi yapıldı. Dizileme öncesi ve sonrasında NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analiziyle hem nükleotid hem de protein homologileri incelenerek karşılaştırıldı. Web Promoter Scan biyoinformatik aracıyla tahmini promotor bölgeleri tespit edildi. Hidrofobisite grafikleri Kyte & Doolittle algoritmasına göre oluşturulurken, translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ise ExPASy programı kullanıldı. Proteininin yüzey özelliklerinin ve lokalizasyonunu belirlemek için SOSUI programı kullanıldı. TargetP programıyla proteinin hücre içi yerleşimi belirlenmiştir. Web Promoter Scan programıyla genin tahmini promotör bölgeleri belirlenmiştir.



Şekil 3.1: *OeFBPA* geninin gDNA'sının NCBI BLAST analizi.

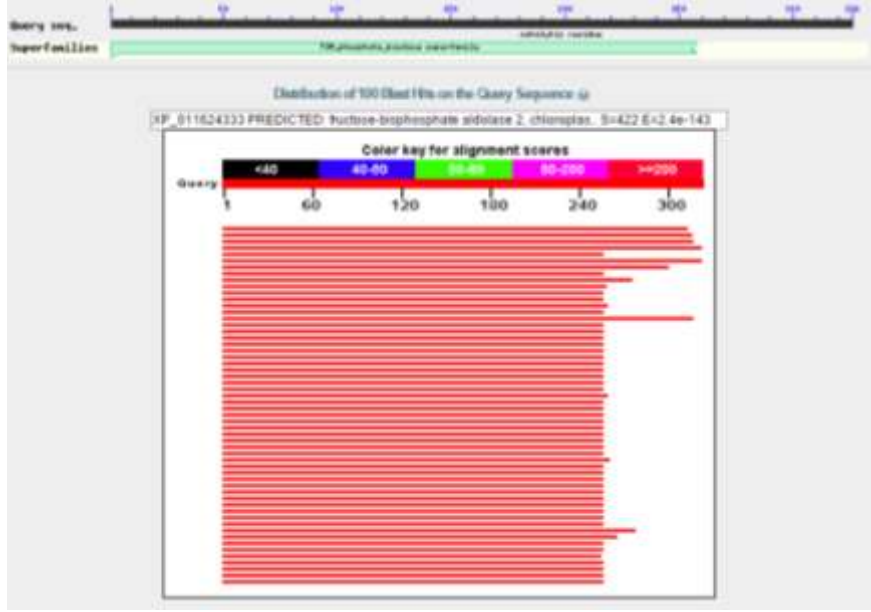


Şekil 3.2: *OeFBPA* geninin cDNA'sının NCBI BLAST analizi.

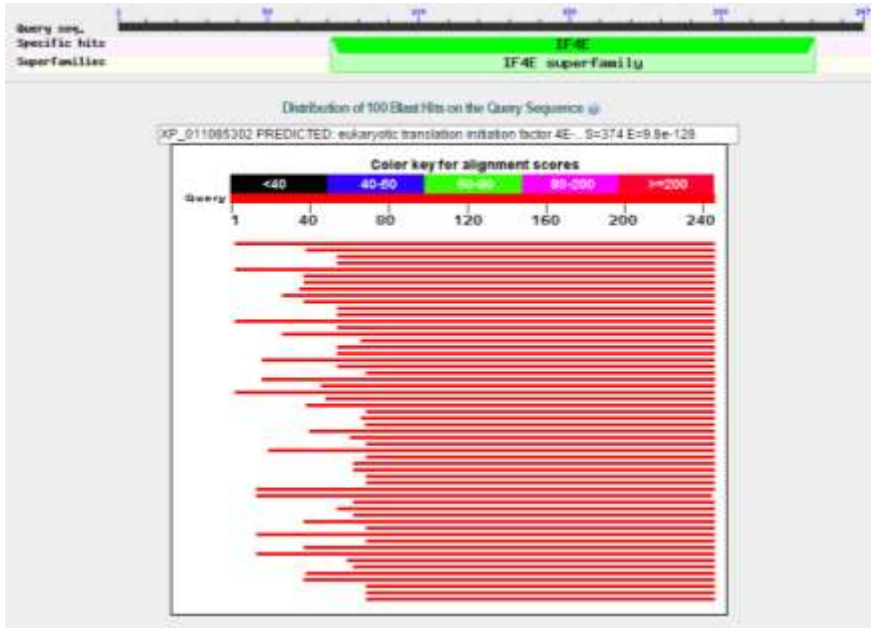


Şekil 3.3: *OeEIF 4E* geninin cDNA'sının NCBI BLAST.

Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterilen tahmini olan *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* genlerinin nükleotid dizilerinin NCBI BLAST analizleri sonucunda veritabanında diğer canlılarda benzerlikleri gösterildi.

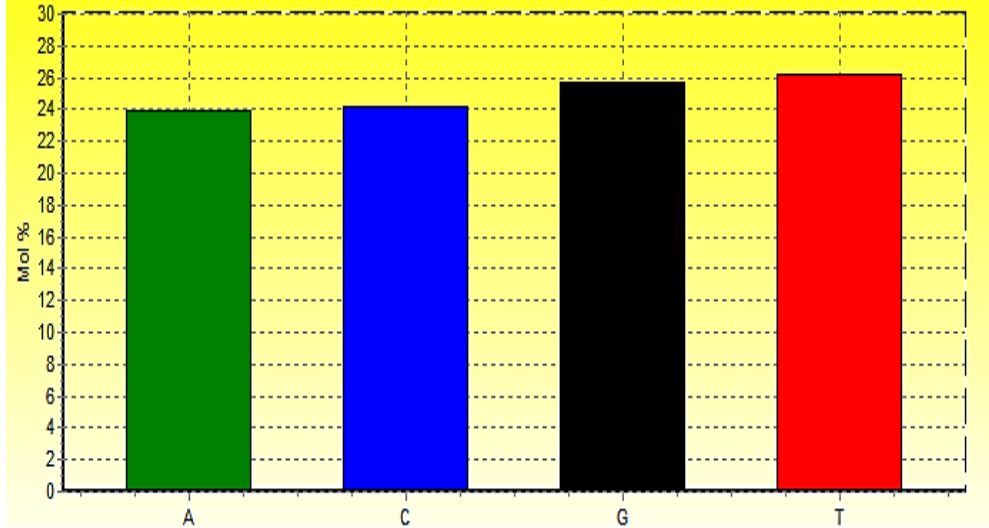


Şekil 3.4: *OeFBPA* proteinin NCBI BLAST analizi (blastp).



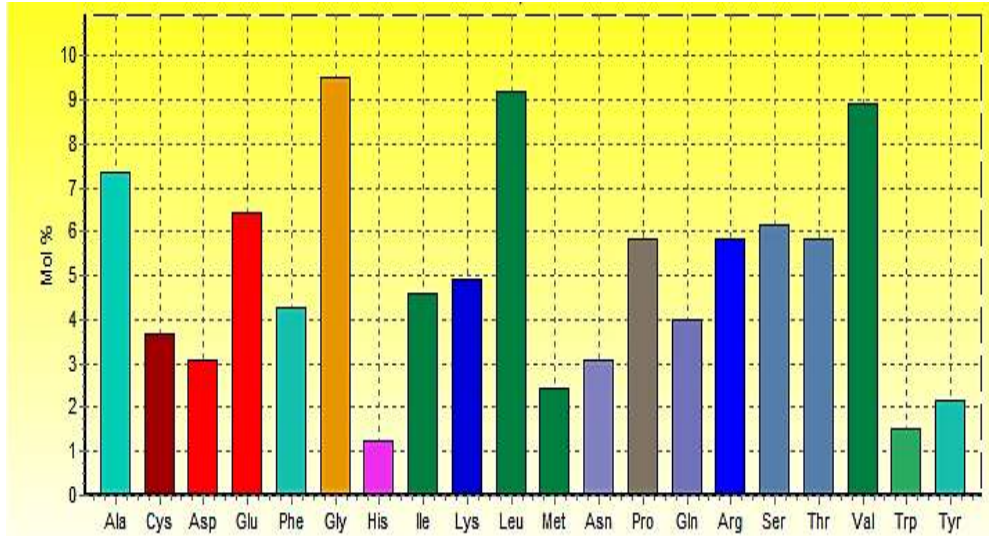
Şekil 3.5: *OeEIF 4E* proteinin NCBI BLAST analizi (blastp).

Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de gösterilen tahmini olan *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* proteinlerinin NCBI BLAST analizleri sonucunda veritabanında diğer canlılarda benzerlikleri gösterildi.



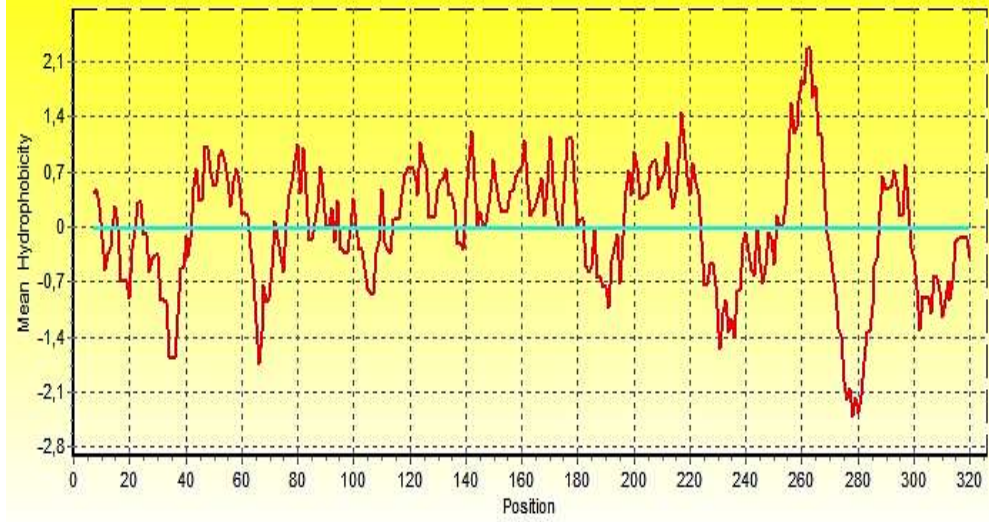
Şekil 3.6: *OeFBPA* geninin nükleotid kompozisyonu (BioEdit).

Şekil 3.6'de gösterildiği gibi *OeFBPA* geninin Adenin (A) ve Timin (T) oranının Guanin (G) ve Sitozin (C) oranına hemen hemen eşit olduğu görüldü.



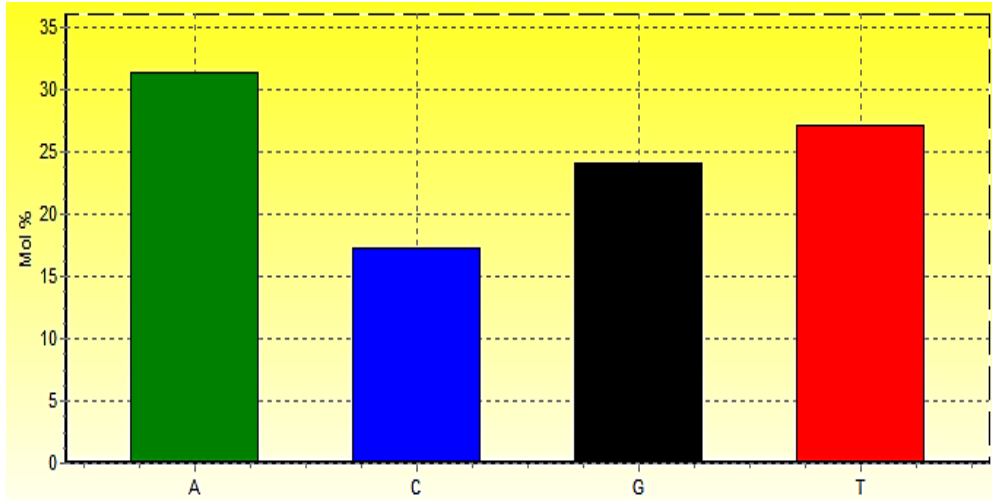
Şekil 3.7: *OeFBPA* geninin aminoasit kompozisyonu (BioEdit).

Şekil 3.7'de gösterildiği gibi *OeFBPA* geninin polar ve apolar aminoasit yüzdelerinin hemen hemen eşit olduğu görülmüştür.



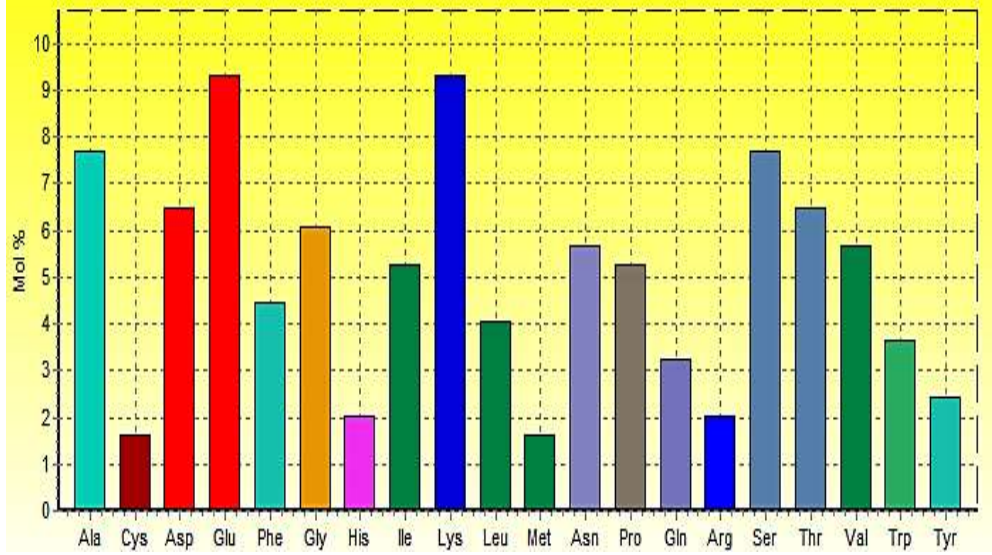
Şekil 3.8: *OeFBPA* geninin Kyte&Doolittle hidrofobisite grafiği (BioEdit).

Şekil 3.8'te Kyte&Doolittle hidrofobisite analizi, *OeFBPA* proteinindeki hidrofobik ve hidrofilik bölgeleri göstermektedir.



Şekil 3.9: *OeEIF 4E* geninin nükleotid kompozisyonu (BioEdit).

Şekil 3.9'da gösterildiği gibi *OeEIF 4E* geninin Adenin (A) ve Timin (T) oranının Guanin (G) ve Sitozin (C) oranından fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 3.10: *OeEIF 4E* geninin aminoasit kompozisyonu (BioEdit).

Şekil 3.10’da gösterildiği gibi *OeEIF 4E* geninin apolar aminoasitlere göre polar aminoasitlerin yüzdelere daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 3.11: *OeEIF 4E* geninin Kyte&Doolittle hidrofobisite grafiği (BioEdit).

Şekil 3.11’de *OeEIF 4E* proteinin hidrofobik ve hidrofilik kısımları gösterilmiştir.

10 20 30 40 50 60
 MDESNATCGK RLASIGLENT EANRQAYRTL LVTAPGLGQY ISGAILFEET LYQSTTDGKK
 70 80 90 100 110 120
 MVDVLVEQNI VPGIKVDKVT GFGSPCWFKQ RVLVPRSRWP CFPVRCLLRT GCSFCQMVSF
 130 140 150 160 170 180
 RRTVVSIPNG PSALAVKEAA WGLARYAAIS QVFGVQDNGL VPIVEPEILL DGEHGIDRTF
 190 200 210 220 230 240
 EVAQKVWAEV FFYLAENNVL FEGILLKPSM VTPGAECKDK ATPEQVADYT LNLLKRRIPP
 250 260 270 280 290 300
 SVPGIMVSVL GSFCLVGNLK WRQHRTECHE PSTQPMARLF LICKGTTKHM LEDMGRASGE
 310
 CEGGSGYFAC SGQG

Number of amino acids: 314

Molecular weight: 34472.8

Theoretical pI: 7.94

Şekil 3.12: *OeFBPA* proteinin aminoasit dizisi, M_a 'sı ve pI'sı.

10 20 30 40 50 60
 MVEETEKSTT NLSKEEPEKS SSSTSRITNV NITEGDESEA EEGEIVGGGS DIDAEAKDMA
 70 80 90 100 110 120
 PPPPTVKHPL EHSWTFWFDN PSVKNKQPQA AWGSSIRPVY TFSTVEDFWS VYNNINQPSK
 130 140 150 160 170 180
 LAVGADDFHCF KYKIEPKWED PVCANGGKWT MTFPKGKSDT CWLHTLLAMI GEQFDYGDEI
 190 200 210 220 230 240
 CGAVVNVRLR QDKIALWTKN AANKAAQESI GRQWKEFLDY NDSIGFIFHE DAKKLDKAAK
 NQYTV

Number of amino acids: 245

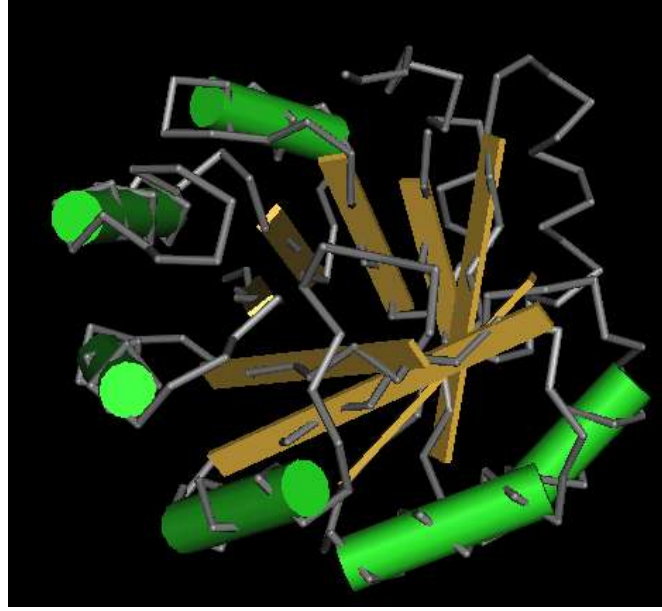
Molecular weight: 27551.6

Theoretical pI: 5.00

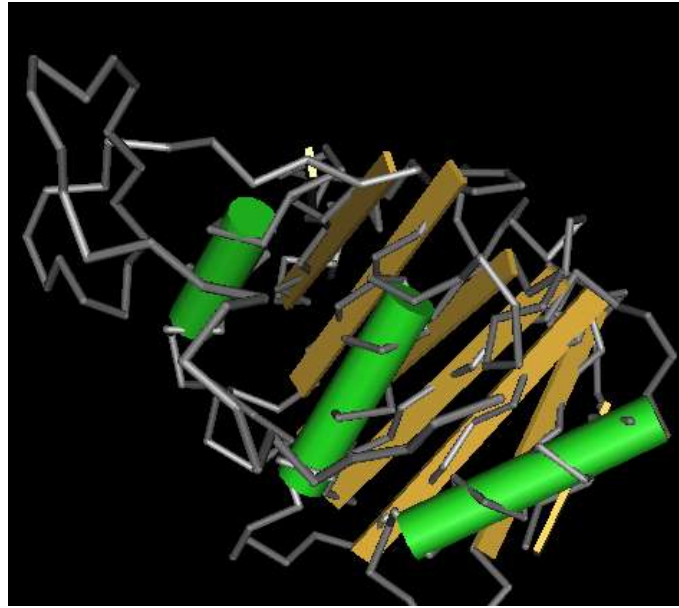
Şekil 3.13: *OeEIF 4E* proteinin aminoasit dizisi, M_a 'sı ve pI'sı.

OeFBPA ve *OeEIF 4E* proteinlerinin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası ExPASy biyoinformatik araçlarıyla tespit edilerek Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te belirtilmiştir. Sonuç olarak *OeFBPA* proteininin teorik olarak 314 aminoasit

kodladığı, izoelektrik noktasının 7.94 olduğu ve moleküler ağırlığının yaklaşık 34 kD olduğu bulunmuştur. *OeEIF4E* proteininin ise teorik olarak 245 aminoasit kodladığı, izoelektrik noktasının 5 olduğu ve moleküler ağırlığının yaklaşık 27 kD olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.14: *OeFBPA* proteininin 3 boyutlu yapısı
(Cn3D programı ile oluşturulan).



Şekil 3.15: *OeEIF 4E* proteininin 3 boyutlu yapısı
(Cn3D programı ile oluşturulan).

Şekil 3.14 ve Şekil 3.15’de gösterildiği gibi proteinlerin Cn3D programıyla oluşturulan 3 boyutlu yapısında sarı ile gösterilenler beta plakalar, yeşil ile gösterilenler ise alfa helikslerdir.

This amino acid sequence has no signal peptide.

This amino acid sequence is of a SOLUBLE PROTEIN.

Şekil 3.16: *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* proteinlerinin SOSUI sinyal peptit analizi.

Şekil 3.16’da gösterildiği gibi *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* proteinleri sinyal peptit içermezler ve çözünen bir proteinlerdir.

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
FBPA	326	0.261	0.145	0.054	0.716	_	3
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

Şekil 3.17: *OeFBPA* proteinin yerleşiminin belirlenmesi (TargetP).

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
ETIF	247	0.284	0.057	0.100	0.876	_	3
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

Şekil 3.18: *OeEIF 4E* proteinin yerleşiminin belirlenmesi (TargetP).

Şekil 3.17 ve 3.18’e bakıldığında kloroplast transit peptit olarak düşük oranda bulunurken mitokondriyel hedefleme peptiti ve sinyal peptiti olarak bulunmamaktadır ve yüksek oranda sitosolde bulunmaktadır.

```
Proscan: Version 1.7
Processed Sequence: 1077 Base Pairs

Promoter region predicted on reverse strand in 523 to 273
Promoter Score: 53.21 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 309, Est.TSS = 277
Significant Signals:
Name          Strand  Location  Weight
CTF           +       513      1.448000
LF-A2        -       356      1.564000
TFIID        -       307      2.618000
Sp1          -       299      3.013000
Sp1          +       294      3.061000
AP-2         -       284      1.108000
UCE.2        +       273      1.216000
```

Şekil 3.19: *OeEIF 4E* geminin promotör bölgesinin tespiti
(Web Promoter Scan Service).

Promoter region predicted on forward strand in 6139 to 6389
Promoter Score: 60.05 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 6363, Est.TSS = 6393
Significant Signals:

Name	TFD #	Strand	Location	Weight
TFIID	S01540	+	6147	1.971000
LF-A2	S00251	+	6169	1.564000
hsp70_US	S00779	+	6338	8.606000
TFIID	S00615	+	6364	2.920000
TFIID	S01540	+	6364	1.971000
TFIID	S00087	+	6364	2.618000

Promoter region predicted on forward strand in 6596 to 6846
Promoter Score: 56.52 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 6830, Est.TSS = 6860
Significant Signals:

Name	TFD #	Strand	Location	Weight
TFIID	S00087	+	6608	2.618000
TFIID	S01540	+	6694	1.971000
TFIID	S00087	+	6694	2.618000
TFIID	S00615	+	6694	2.920000
TFIID	S00087	+	6831	2.618000
TFIID	S00615	+	6831	2.920000
TFIID	S01540	+	6831	1.971000

Promoter region predicted on forward strand in 14777 to 15027
Promoter Score: 56.80 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 14999, Est.TSS = 15029
Significant Signals:

Name	TFD #	Strand	Location	Weight
TFIID	S01540	+	14785	1.971000
TFIID	S00087	+	14787	2.618000
CATT-BP	S02106	+	14793	2.151000
AP-1	S01433	+	14872	1.564000
TFIID	S00615	+	15000	2.920000
TFIID	S01540	+	15000	1.971000
TFIID	S00087	+	15000	2.618000

Promoter region predicted on reverse strand in 11148 to 10898
Promoter Score: 54.93 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 10916, Est.TSS = 10884
Significant Signals:

Name	Strand	Location	Weight
TFIID	-	11096	2.618000
E4F1	-	10923	3.764000
EivF	+	10917	3.227000
EivF/CREB	+	10917	1.564000
TFIID	-	10914	2.618000

Promoter region predicted on reverse strand in 828 to 578
Promoter Score: 55.19 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 609, Est.TSS = 577
Significant Signals:

Name	Strand	Location	Weight
CTF	+	695	1.448000
Y	+	693	5.378000
TFIID	-	607	2.920000
TFIID	-	607	2.618000
TFIID	-	607	1.971000

Şekil 3.20: *OeFBPA* geminin promotör bölgesinin tespiti

(Web Promoter Scan Service).

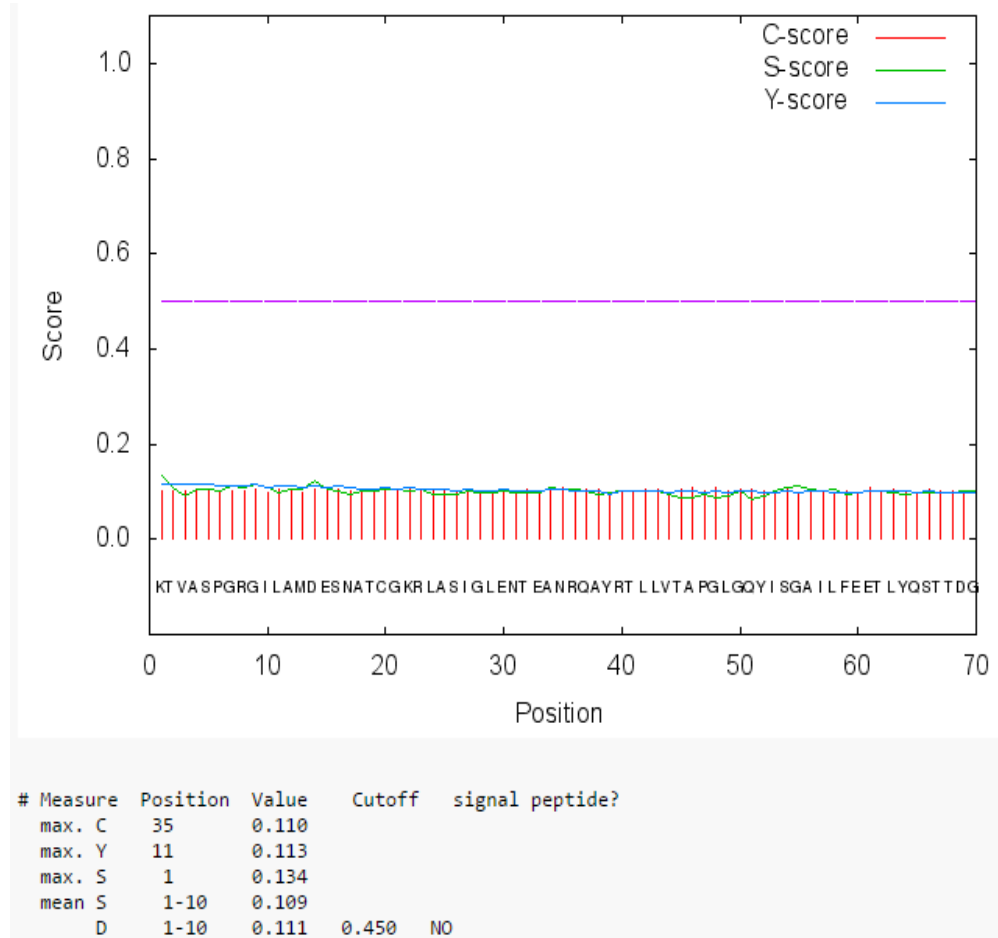
No.	seg.Length	subcellular Localization site
0001	326a.a.	C (cytoplasmic)

Şekil 3.21: *OeFBPA* geminin tahmini hücre içi yerleşimi.

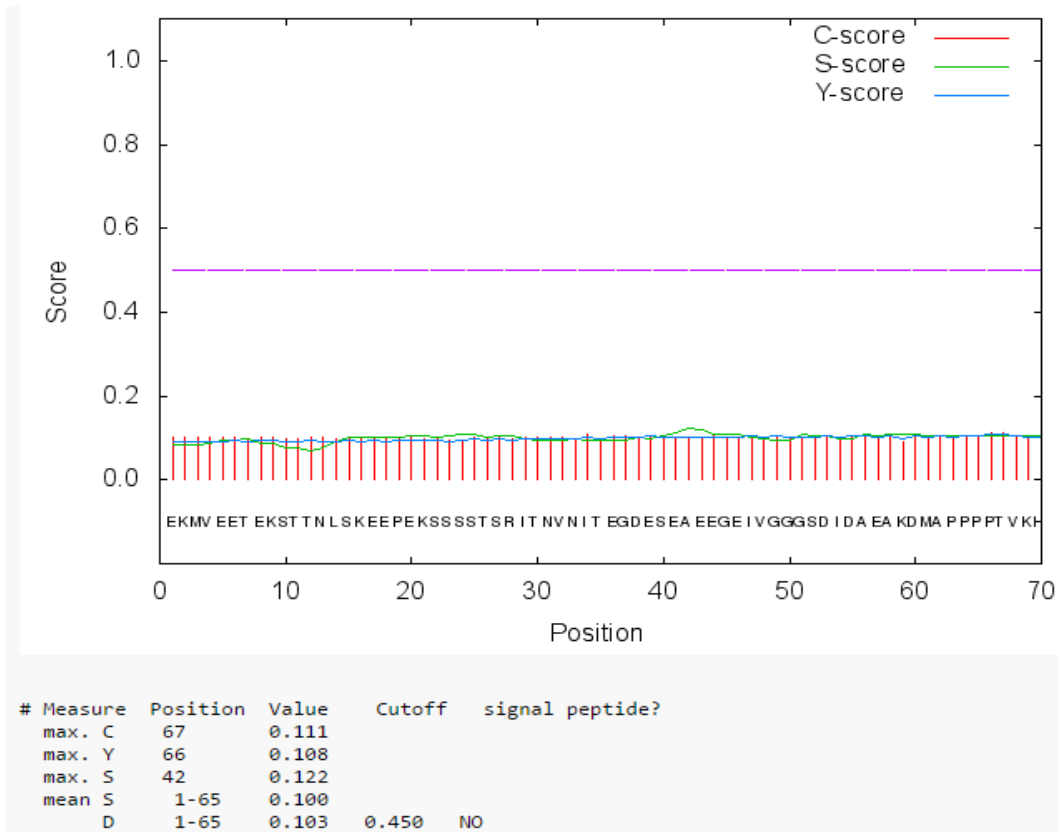
No.	seg.Length	subcellular Localization site
0001	247a.a.	C (cytoplasmic)

Şekil 3.22: *OeEIF 4E* geminin tahmini hücre içi yerleşimi.

OeFBPA ve *OeEIF 4E* genlerinin tahmini hücre içi yerleşimi SOSUI_{GramN} programı yardımıyla belirlenmiş olup Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de gösterilmiştir.

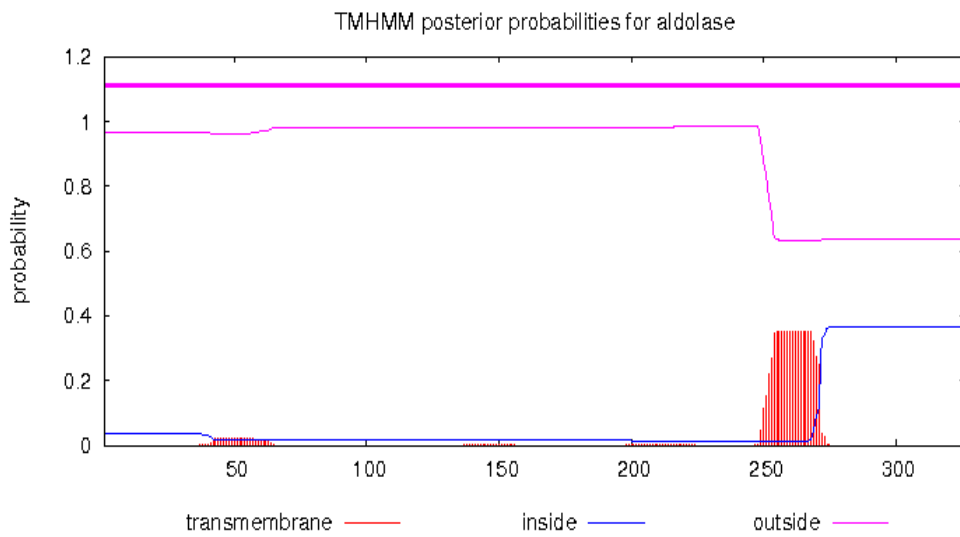


Şekil 3.23: *OeFBPA* geminin sinyal peptit analizi.



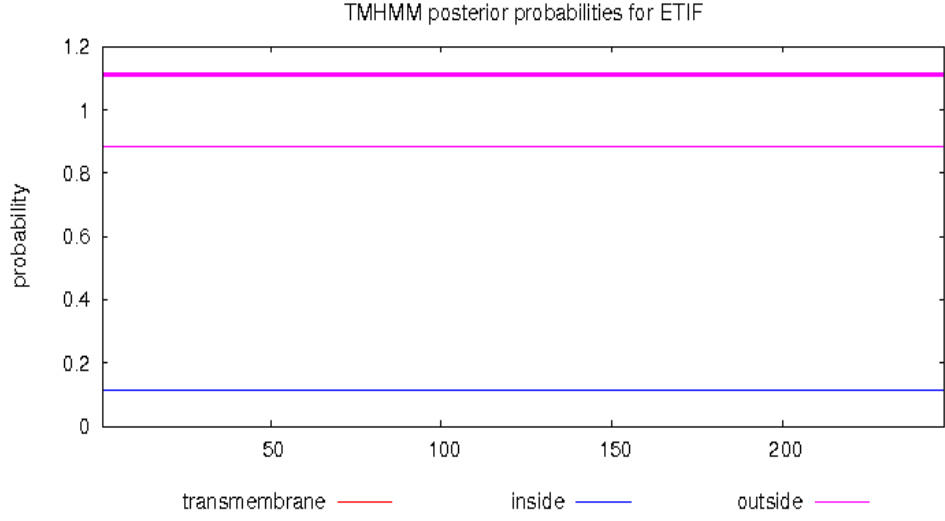
Şekil 3.24: *OeEIF 4E* geminin sinyal peptit analizi.

```
# aldolase Length: 326
# aldolase Number of predicted TMHs: 0
# aldolase Exp number of AAs in TMHs: 7.48019
# aldolase Exp number, first 60 AAs: 0.38373
# aldolase Total prob of N-in: 0.03568
aldolase TMHMM2.0 outside 1 326
```



Şekil 3.25: *OeFBPA* geninin transmembran protein analizi.

```
# ETIF Length: 247
# ETIF Number of predicted TMHs: 0
# ETIF Exp number of AAs in TMHs: 0.0008
# ETIF Exp number, first 60 AAs: 0
# ETIF Total prob of N-in: 0.11438
ETIF TMHMM2.0 outside 1 247
```

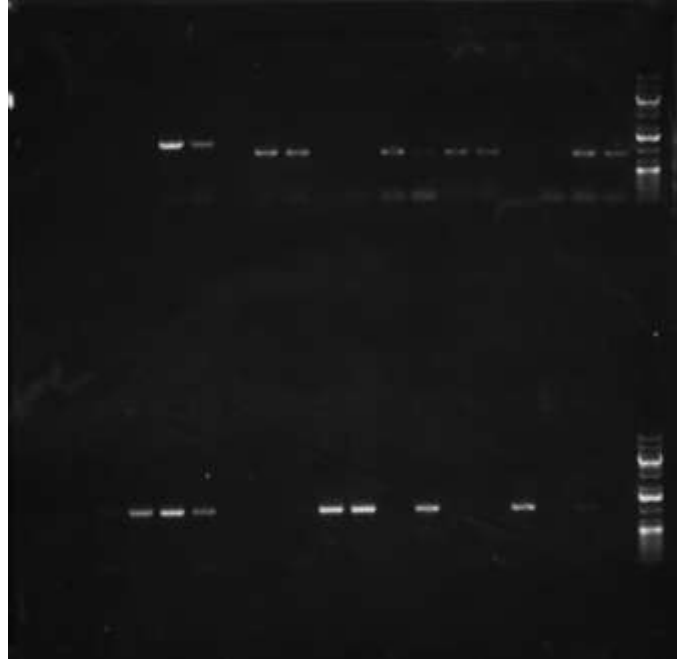


Şekil 3.26: *OeFBPA* geminin transmembran protein analizi.

OeFBPA ve *OeEIF 4E* genlerinin sinyal peptit ve transmembran protein olmadığı içermediği Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'te gösterilmiştir.

3.2 Polimorfizm Analizi

OeFBPA geni için polimorfizm analizi, dizilerinin zeytin çeşitleri arasında korunup korunmadığının (genetik marker olup olmadığının) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için yaklaşık 1 kb uzunluğunda bir bölge seçilmiştir ve kullanılan primerler Tablo2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 3.27: *OeFBPA* geminin polimorfizm analizinin jel görüntüsü
(Farklı zeytin çeşitlerinde).

	10	20	30	40
Olea europaea cv. Ayvalik clone 0308	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Cormana	GCCGGA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Gordales	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Leccino	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Memeli	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Ayvalik clone 0108	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Ayvalik clone UB3	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Uslu	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Verdial	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Cakir	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Edinciksu	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Erkence	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Karamurselsu	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Negral	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Samanlı	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA
Olea europaea cv. Ayvalik clone UB1	GCCGAA	CAAG	AAAGTATCCG	GAGCCGCTTCAATTCTCCGGA

Şekil 3.28: Zeytin çeşitlerine ait nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.



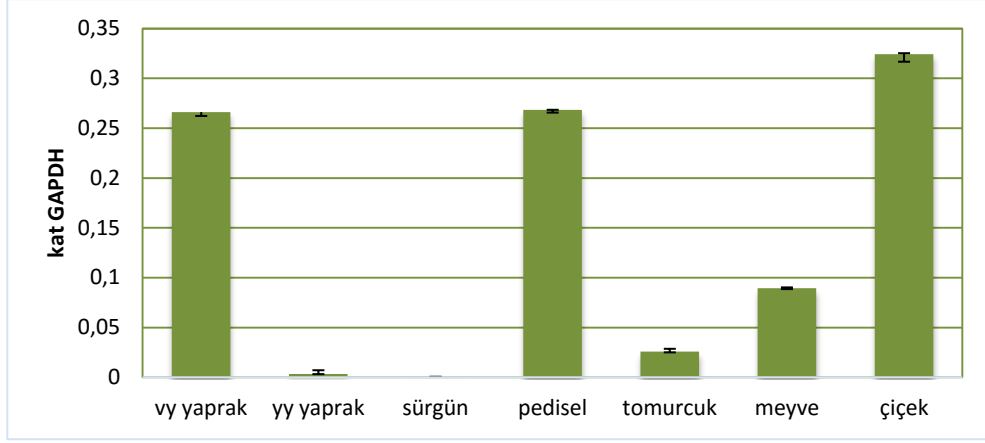
Şekil 3.29: *OeFBPA* geninin polimorfizminin belirlenmesi.

Bootstrap değerleri %50 ve daha az olanlar belirtilmemiştir. Bootstrap analizi için 1000 kopya denenmiştir.

3.3 Gerçek Zamanlı PCR Analizi (Real-Time PCR)

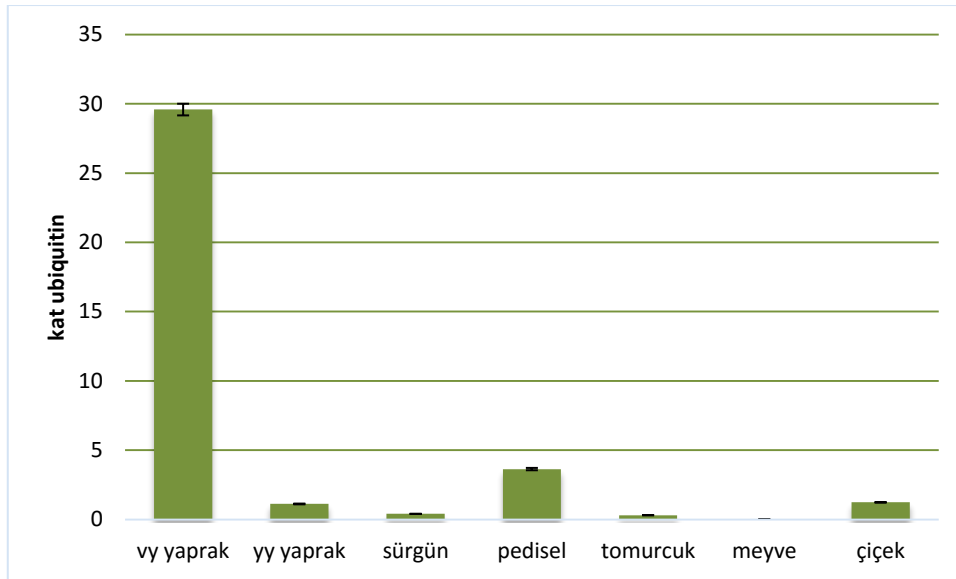
3.3.1 Real-Time PCR ile Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi

Farklı zeytin dokularından elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanılmasıyla 3 tekrarlı olarak yapılan ve Tablo 2.2' de belirtilen primerler kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile dokular arası ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.



Şekil 3.30: *OeFBPA* geninin RT-PCR ile kopya sayısını belirten grafik.

Şekil 3.2' te de gösterildiği gibi *OeFBPA*, zeytin bitkisinin daha çok var yılı yaprak ve pedisel dokularında ifade edilirken ekspresyon seviyesi en yüksek olan pediseldir. Fakat *OeFBPA* geninin zeytin dokularından hiçbirine özgü olmadığı da gözlenmiştir.

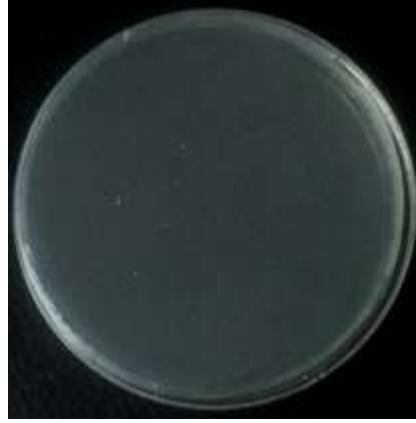


Şekil 3.31: *OeEIF4E* geninin RT-PCR ile kopya sayısını belirten grafik.

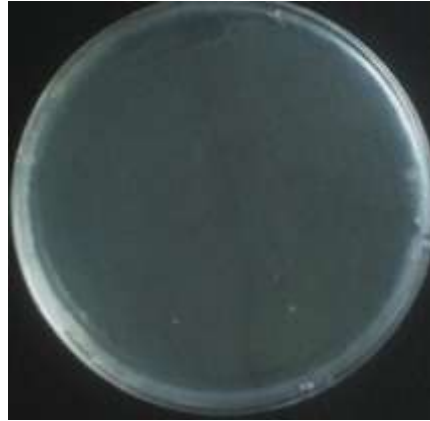
Şekil 3.3'te de gösterildiği gibi *OeEIF4E*, zeytin bitkisinin hemen hemen her dokusunda ifade edilirken ekspresyon seviyesi en yüksek olan var yılı yapraktır ve zeytinin bir dokusuna özgü olmadığı da gözlenmiştir.

3.4 Proteinin *E. coli*'ye Klonlanma ve Transformasyon Çalışmaları

OeFBPA proteinin ekspresyonu için pLATE51 vektörü kullanıldı. Klonlama için kullanılan primerler Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Proteinin ekspresyonu materyal ve metot bölümünde ifade edildiği gibi genin klonlanmasından sonra DH10B kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.32: *OeFBPA* geninin DH10B suşuna transformasyonu.



Şekil 3.33: *OeEIF* geninin DH10B suşuna transformasyon sonucu.

DH10B suşunda üreme gösteren koloniler arasından seçilen 3 koloniden 3.'sünde *OeFBPA* geninin klonlandığı Şekil 3.34'te gösterilmiştir. Koloni PCR için aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (Thermo Scientific, Katalog No: K1251) primerleri kullanılmıştır. Şekil 3.35'te gösterildiği gibi üreyen kolonilerden hazırlanan sulandırma örneklerinden önkültür hazırlandı.

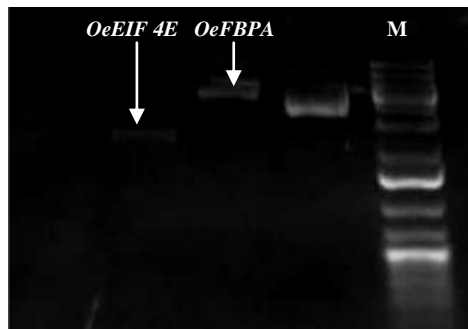


Şekil 3.34: *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* geninin plazmit izolasyonu önkültürü.



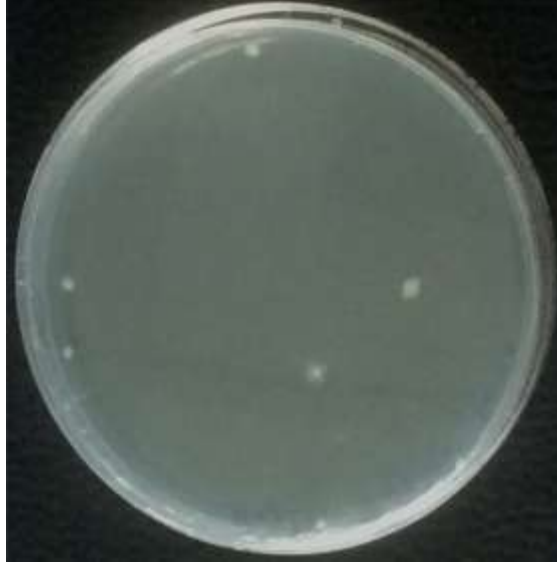
Şekil 3.35: *OeFBPA* geninin koloni PCR sonucu.

OeFBPA geninin koloni PCR’da sonuç veren sulandırma örneklerinden birinin seçilerek plazmit izolasyonu için hazırlanan önkültürü Şekil 3.35’te gösterilmiştir.



Şekil 3.36: *OeFBPA* ve *OeEIF* plazmitlerinin jel görüntüsü

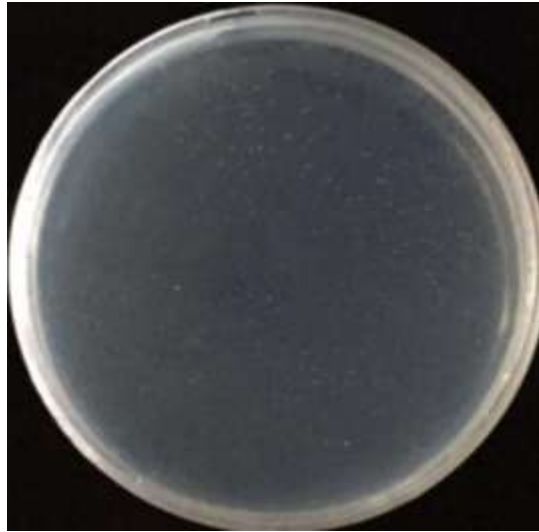
1: Marker, 3: *OeFBPA*, 4: *OeEIF*.



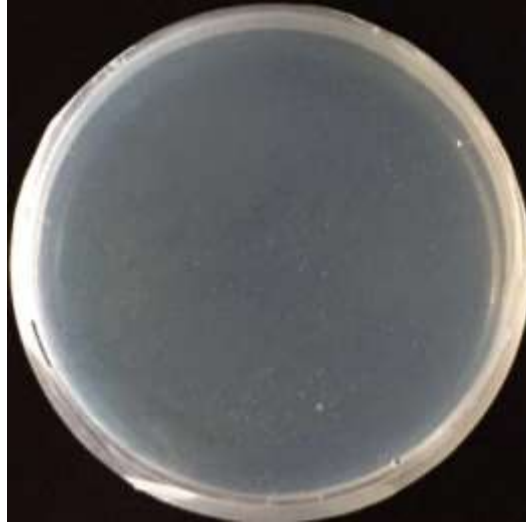
Şekil 3.37: *OeFBPA* geninin BL21 suşuna transformasyonu.

Plazmit izolasyonundan sonra elde edilen plazmit BL21 suşuna klonlanarak koloniler agar besiyerinde büyütülmüştür (Şekil 3.39).

BL21 suşuna klonlanarak agarda büyüyen kolonilerden seçim yapılarak kolonilerden önkültür hazırlandı. Üreme olan önkültürler erlenlere alınarak daha büyük besiyerlerinde hücreler protein üretecek büyüklüğe getirildi. Her iki saatte bir yapılan spektrometrik ölçümler sonucu OD'si 0.6'ya gelen erlenler falkonlara paylaştırıldı ve santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Pelletlerden protein izolasyonu yapıldı.



Şekil 3.38: *OeEIF4E* geninin Rosetta kompetan hücrelerine transformasyonu.

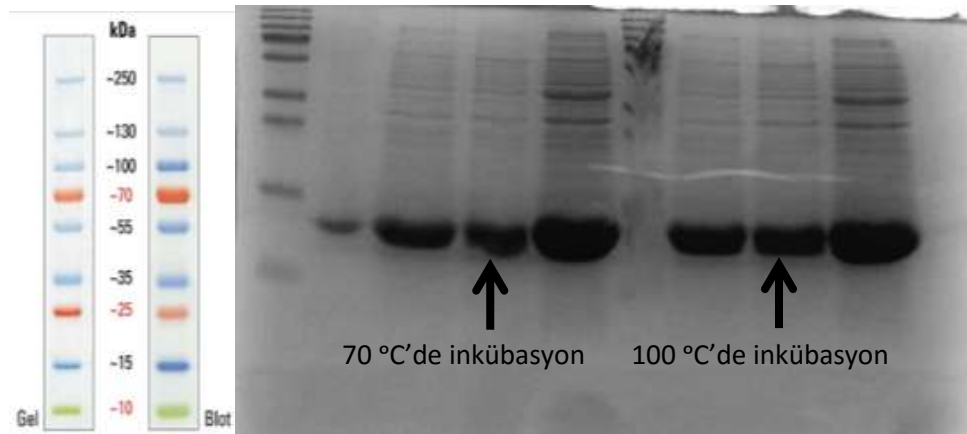


Şekil 3.39: *OeFBPA* geninin Rozetta kompetan hücrelerine transformasyonu.

3.5 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

3.5.1 Commasie Blue ile Boyama

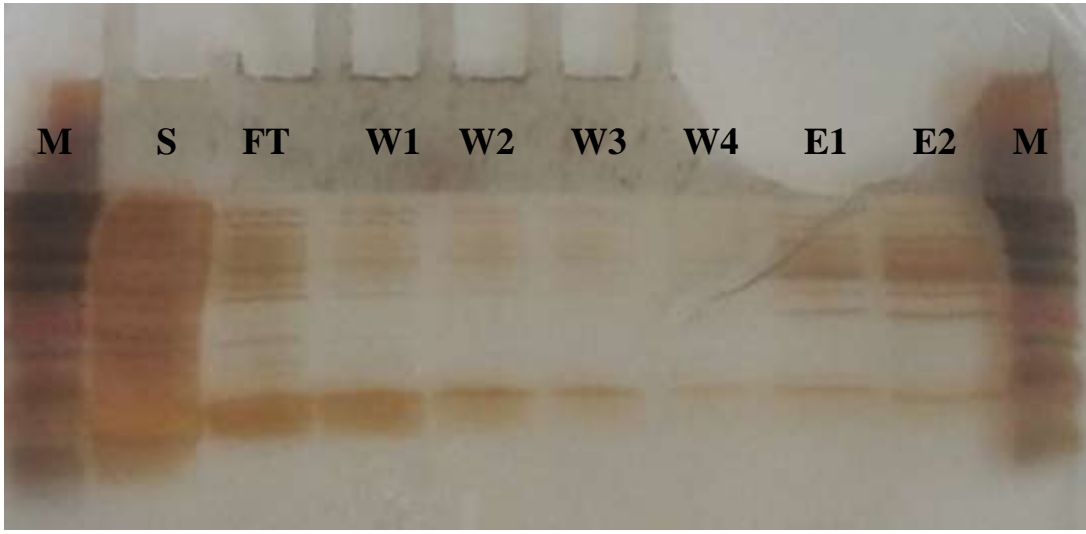
OeFBPA proteininin moleküler ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforeziyle belirlenemese de bakteri proteinleri ve *OeFBPA* proteini moleküler ağırlıklarına göre jelde sıralanmaktadır. Böylece aktif proteinlerin varlığı jelde görüntülenebilmektedir.



Şekil 3.40: *OeFBPA* proteininin SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü.

3.5.2 Gümüş Boyama ile Boyama

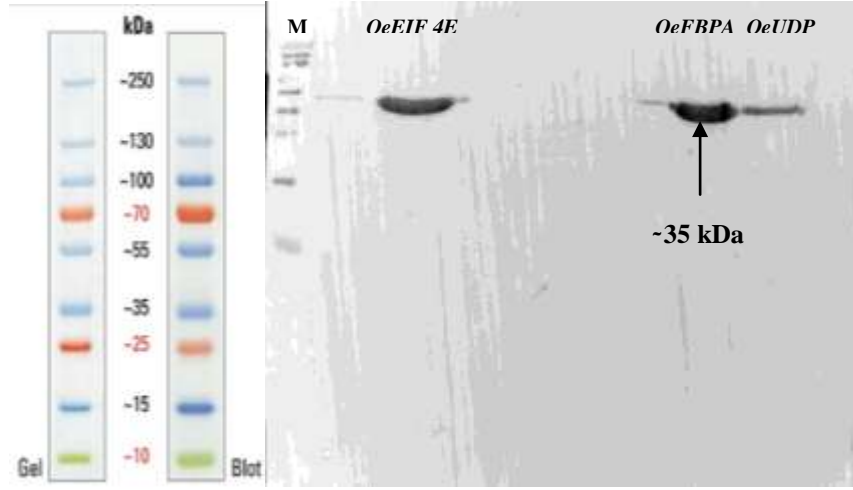
Materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi uygulanan gümüş boyama tekniğinin jel görüntüsü Şekil 3.40'ta gösterilmiştir. Jelde soldan sağa doğru gidildiğinde son 2 bant elüsyon olup giderek protein saflaştırılmıştır. Fakat elüsyonlarda tek bant görüntülenememesinin nedeninin yıkamalardan ya da izole edilen proteinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 3.41: *OeFBPA* proteinin gümüş boyama görüntüsü.

3.6 Western Blot Analizi

OeEIF 4E ve *OeFBPA* genlerinin pLATE51 vektörüne klonlanıp *E. coli*'de ifade edilmesiyle rekombinant proteinin varlığı SDS-PAGE elektroforezi ile görüntüledikten sonra Şekil 3.42' te gösterildiği gibi Western Blot analizi yapıldı. Sonuç olarak *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* proteinlerine, his-tag antikorunun bağlandığı ve ifade edildiği kanıtlanmıştır.



Şekil 3.42: *OeFBPA* ve *OeEIF 4E* genlerinin Western Blot analizi.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Laboratuvarımızda daha önceden oluşturulmuş olan gDNA kütüphanesinden elde edilen plastidik aldolaz olarak adlandırılan genin biyoinformatik analizi sonucu en çok fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz genine benzediği ve gDNA'sının en çok *Rhizophora apiculata* ve cDNA'sının ise *Sesumum indicum* ile benzerlik gösterdiği bulundu.

Adenin+Timin oranının Guanin+Sitozin oranına hemen hemen eşit olduğu görüldü. En çok glisin aminoasitinin bulunduğu fakat lösin ve valin aminoasitlerinin diğerlerine göre pik yaptığı ve polar-apolar aminoasitlerin hemen hemen eşit olduğu görüldü. Bu eşitlik proteinin sitoplazmik bir protein olduğunu ipucunu verirken diğer biyoinformatik analizler sonucu bu veri doğrulandı.

Sitoplazmik bir protein olduğu tahmin edildikten sonra biyoinformatik verilerle bunun doğrulandığı fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz proteininin sitoplazmik bir protein olduğuna literatürde de rastlanmaktadır.

Biyoinformatik veriler sonucunda izoelektrik noktası 7.94 olarak bulunan proteinin benzer sonuçlarına izoelektrik noktası olarak 8.16 [157] literatürde rastlanmaktadır.

Zeytin fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz proteini 314 aminoasit kodlarken tavşan kas aldolazının her bir alt ünitesi 363 aminoasit kodlamaktadır [158].

Polimorfizm analizi sonucu 16 zeytin çeşidi arasında Cormana'nın diğerlerinden farklı bir grup oluşturduğu ve diğerlerinin dallanmasında 0308, UB3 ve Memeli birebir aynı çıkarken Gordales ve Verdial'in de birebir aynı çıktığı görüldü. Zeytin çeşitleri arasında polimorfik olan fruktoz 1,6-bifosfat aldolazın çeşitli canlılarda da polimorfik olduğu bulunmuştur. Aldolaz köstebek farelerinde yüksek oranda polimorfiktir [162], insan aldolaz B geni de polimorfiktir [163], Monodelphis domestica'nın aldolaz C geninde de polimorfizme rastlanmıştır [164]. Mısırdan aldolazının da polimorfik olduğu tespit edilmiştir [165], ciklet balığı aldolazı ise monomorfiktir [166].

Biyoinformatik verilerle 34 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilen zeytin fruktoz 1,6-bifosfat aldolazının moleküler ağırlığı Western Blot analizi ile yaklaşık 35 kDa olarak tespit edilmiştir. Yüksek yapılı canlıların aldolazların girdiği Sınıf I'e girmektedir. Genel olarak aldolaz 12-225 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptirler [157,158], örneğin patates aldolazının moleküler ağırlığı 33 kDa olarak bulunmuştur.

Hidrofobik zeytin fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz proteinin 3 boyutlu görüntüsüne göre 8 β plaka ve 6 α helikse sahip olduğu bulundu.

Dokusal ifade analizleri *OeFBPA* GAPDH'e göre en fazla çiçekte ifade olduğu ve var yılı yaprak ve pediselde de fazla oranda sentezlendiği görülürken *OeEIF4E* ubiquitine göre en fazla var yılı yaprakta ifade olduğu görüldü. Ulaşabilen kaynaklara göre zeytinde yapılmış olan dokusal Real-Time analizlerine başka bitki türlerinde rastlanmamıştır.

Fruktoz 1,6-bifosfat aldolaz enzim aktiviteleri ticari olarak satın alınan substratın fosfoşelüloz kolon yöntemiyle saflaştırılmasıyla bazı çalışmalarda gösterilmiştir [167-175]. İlerleyen çalışmalarda zeytin fruktoz 1,6-bifosfat aldolazın aktivite deneyleri yapılacaktır.

Yok-yılı cDNA kütüphanesinden alınan ve dk24 olarak adlandırılan genin biyoinformatik analizi sonucu en çok ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'ye benzediği ve en çok *Erythranthe guttatus* ile benzerlik gösterdiği bulundu.

Adenin+Timin oranının Guanin+Sitozin oranından fazla olduğu görüldü. En çok glutamik asit ve lizin (neredeyse eşit olarak) aminoasitlerinin bulunduğu fakat alanin ve serin (yine neredeyse eşit olarak) aminoasitlerinin diğerlerine göre pik yaptığı görüldü. Polar aminoasitler apolar aminoasitlerden fazladır.

Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin biyoinformatik verilerine göre moleküler ağırlığı 27 kDa olarak tespit edilmiştir. Western Blot analizine göre yaklaşık 35 Da moleküler ağırlığa sahip zeytin ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin literatür araştırmalarına göre 26 kDa moleküler ağırlığa [161] sahip olduğu gösterilmiştir.

245 aminoasit kodlayan zeytin ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin yakın olarak 228 aminoasit kodladığı gösterilmiştir [160].

Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin literatürdeki çalışmalarına göre; sitoplazmik bir protein olduğu [159], 228 aminoasit kodladığı [160] ve 26 kDa moleküler ağırlığa [161] sahip olduğu gösterilmiştir.

İzoelektrik noktası 5 olarak tespit edilen ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin biyoinformatik verilerine göre sitoplazmik bir protein olduğu öngörülemez de literatürde sitoplazmik bir protein olarak gösterilmiştir [159].

Hidrofilik ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E proteininin 3 boyutlu görüntüsüne göre 7 β plaka ve 3 α helikse sahip olduğu bulundu.

Klonlama ürünün *E. coli* DH10B ve BL21 suşlarına transformasyonu sonucu ertesi gün petrielerde üreme gözlemlendi. SDS-PAGE sonuçlarına göre 10-15 kDa arasında lizozime ait olduğu düşünülen kalın bantlar görülürken genlere ait bantlar görülmedi. Farklı koloniler kullanılarak yapılan bütün tekrarlarında sonuçların değişmediği görüldü. Western Blot sonuçlarında yine SDS-PAGE gibi genler farklı moleküler ağırlığa sahip olmasına rağmen 10-15 kDa arasında bantlar görüldü. Tekrarlamalara rağmen bu sonuç yine değişmedi.

SDS-PAGE ve Western Blot sonuçlarının sürekli olarak bu şekilde çıkması nedeniyle meteryal-metotta da belirtildiği gibi alternatifler geliştirilmeye başlandı. İlk Western Blot sonucunda proteinlerde kalın bant gözlemlendiği için proteinler seyrettilerek jelle yüklendi. Daha ince bantlar görüldü, fakat bantlar yine 10-15 kDa arasındaydı. Bu durum protein denatürasyonundan mı kaynaklanıyor sorusunu aklımıza getirdi ve deney daha önceden moleküler ağırlığı Western Blot ile belirlenen bir proteinin pozitif kontrol olarak kullanılmasıyla tekrarlandı. Ve sonucun yine değişmediği görüldü. Proteinler her seferinde yeniden izole edildiği ve inkübasyon sıcaklığının 100 °C yerine 70 °C de denendiği için denatürasyon ihtimali ortadan kaldırıldı.

Commasie Blue boyama tekniğine alternatif olarak Gümüş boyama tekniği denenmiştir. Fakat bu teknikte kobalt kullanıldı ve kobalt SDS-PAGE'de yürürken kuyucuklarda kaldığı için elüsyonlarda spesifik bir bant görülmedi (Şekil 3.41).

Alternatif lizis işlemine karşın da değişmeyen Western Blot sonucu nedeniyle klonlama ve transformasyon basamaklarının tekrarlanmasıyla yeniden plazmit izolasyonu yapılarak basamaklar tekrarlandı. Tekrarlanan plazmit izolasyonu sonucu plazmitler jelle yüklenerek bantlar görüldü (Şekil 3.36). Plazmitler yeni bir kompetan hücreye (Rozetta) transforme edildi (Şekil 3.37 ve 3.38). Petrilerde üreme gözlenmesi nedeniyle üreyen kolonilerden protein izolasyonu yapıldı ve Western Blot tekrarlandı. 1 gece jelden membrana transformasyon ve antikorun yenilenmesiyle genlerin ikisinde de yaklaşık 35 kDa'da bantlar gözlemlendi.

5. KAYNAKLAR

- [1] Ozgenturk, N., Oruç, F., Sezerman, U., Kuçukural, A., Vural, S., Toksoz, F., et al., “Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea europaea* L.”, *Comparative and Functional Genomics*, 9 , (2010).
- [2] Rutter W. J., “Evolution of aldolase”, *Fed Proc*, 23, 1248–1257, (1964).
- [3] Moore, B., “Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control”, *Trends Plant Sci.*, 9, 221–228, (2004).
- [4] Say, R. F. and Fuchs, G., “Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme”, *Nature*, 464, 1077–1081, (2010).
- [5] Zgiby, S. M., Thomson, G., J., Qamar, S. and Berry A., “Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases”, *Eur. J. Biochem.*, 267, 1858-1868, (2000).
- [6] Hou, Q., Sheng, X. and Liu, Y., “QM/MM studies of the mechanism of unusual bifunctional fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 11366-11373, (2014).
- [7] Rashid, N., “A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in archaea”, *J. Biol. Chem.*, 277, 30649–30655, (2002).
- [8] Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. and Wakagi, T., “The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic archaea”, *Structure*, 12, 949–959 (2004).
- [9] Sato, T., “Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6 bisphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles”, *J. Bacteriol.*, 186, 5799–5807, (2004).
- [10] Schwelberger, H. G., Kohlwein S. D. and Paltauf, F., “Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Eur. J. Biochem.*, 180, 301-308, (1988).
- [11] Roumelioti, K., Vangelatos, I. and Sophianopoulou, V., “A cryptic role of a glycolytic–gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*”, *Fungal Genetics and Biology*, 47, 254–267, (2010).
- [12] Sağlam, Ertunga, N., Çolak, A., Belduz, A. O., Çanakçı, S., Karaoğlu, H. and Sandallı, C., “Cloning, Expression, Purification and Characterization of

- Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from *Anoxybacillus gonensis* G2”, *J. Biochem.*, 141, 817–825 (2007).
- [13] Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E. and Berry, A., “The dhna gene of *Escherichia coli* encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase”, *Biochem. J.*, 331, 437, (1998).
- [14] Galperin, M. Y., Aravind, L. and Koonin, E. V., “Aldolases of the Dhna family: a possible solution to the problem of pentose and hexose biosynthesis in archaea, *FEMS Microbiol. Lett.*, 183 (2), 259-64, (2000).
- [15] Lebherz, H. G. and Rutter, W. J., “Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems”, *Biochemistry*, 8 (1), 109-21, (1969).
- [16] Hester, G., Holzach, O. B., Rossi, F. A., Donatz, M. S., Winterhalter, K., H., Smit, J. D. G., et al., “The crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Drosophila melanogaster* at 2.5 Å resolution”, *FEBS Lett.*, 1991, 292, 237.
- [17] Dalby, A., Dauter, Z. and Littlechild, J. A., “Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications”, *Protein Sci.*, 8 (2), 291-7, (1999).
- [18] Lebherz, H. G., Leadbetter, M. M. and Bradshaw, R. A., “Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase”, *J. Biol. Chem.*, 259, 1011–1017, (1984).
- [19] Pelzer-Reith, B., Penger, A. and Schnarrenberger, C., “Plant aldolase: cDNA and deduced amino-acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach”, *Plant Mol. Biol.*, 21, 331–340, (1993).
- [20] Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., et al., “Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice”, *Gene*, 141, 215–220, (1994).
- [21] Hall, D. R., Leonard, G. A., Reed, C. D., Watt, C. I., Berry A. and Hunter, W. N., “The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity”, *J. Mol. Biol.*, 287 (2), 383-94, (1999).
- [22] Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar S. and Berry, A., “Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1, 6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases”, *Eur. J. Biochem.*, 267 (6), 1858-68, (2000).

- [23] Plater, A. R., Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S., Wharton, C. W. and Berry, A., “Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase”, *J. Mol. Biol.*, 285 (2), 843-55, (1999).
- [24] Zeng, Y., Tan, X., Zhang, L., Long, H., Wang, B., Li, Z., et al., “A fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene from *Camellia oleifera*: molecular characterization and impact on salt stress tolerance”, *Mol. Breeding*, 35, 17, (2015).
- [25] Soderberg, T., “How enzymes work” [online], (15 April 2016), http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_06%3A_Introduction_to_organic_reactivity_and_catalysis/Section_6.5%3A_How_enzymes_work#Contributors, (2016).
- [26] Say, R. F. and Fuchs, G., “Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme”, *Nature*, 464 (7291), 1077-81, (2010).
- [27] Uematsu, K., Suzuki, N., Iwamae, T., Inui, M. and Yukawa, H., “Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants”, *Journal of Experimental Botany*, 9, (2012).
- [28] Long, R., Yang, Q., Kang, J., Wang, P. Andd Qin, Z., “Cloning and characterization of a fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene in *Medicago sativa* L.”, *Acta Bot. Boreal.-Occident.. Sin.*, 30, 1075-1082, (2010).
- [29] Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., et al., “Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice”, *Gene*, 141, 215–220, (1994).
- [30] Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A., “Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance”, *Planta*, 218, 1–14, (2003).
- [31] Flechner, A., Gross, W., Martin, W. F. and Schnarrenberger, C., “Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-bisphosphate and sedoheptulose-1,7 bisphosphate cleavage in the Calvin cycle”, *FEBS Lett*, 447, 200–202, (1999).
- [32] Kagaya, Y., Nakamura, H., Hidaka, S., Ejiri, S. and Tsutsumi, K., “The promoter from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers

- mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco'', *Mol Gen Genet*, 248, 668–674, (1995).
- [33] Michelis, R. and Gepstein, S., ‘‘Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast’’, *Plant Mol Biol*, 44, 487–498, (2000).
- [34] Murphy, D. J. and Walker, D. A., ‘‘Aldolase from wheat leaves-its properties and subcellular distribution’’, *FEBS Lett*, 134, 163–166, (1981).
- [35] Schnarrenberger, C. and Kruger, I., ‘‘Distinction between cytosol and chloroplast fructose-bisphosphate aldolases from pea, wheat, and corn leaves’’, *Plant Physiol.*, 80,301–304, (1985).
- [36] Yamada, S., Komori, T., Hashimoto, A., Kuwata, S., Imaseki, H. and Kubo, T., ‘‘Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress’’, *Plant Sci.*, 154, 61–69, (2000).
- [37] Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S. and Deyholos, M. K., ‘‘Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots’’, *J. Exp. Bot.*, 58, 3591–3607, (2007).
- [38] Ndimba, B. K., Chivasa, S., Simon, W. J. and Slabas, A. R., ‘‘Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry’’, *Proteomics*, 5, 4185–4196, (2005).
- [39] Zhang, X. N., Wang, H., Qu, Z. C., Ye, M. M. and Shen, D. L., ‘‘Cloning and prokaryotic expression of a salt-induced cDNA encoding a chloroplastic fructose-1, 6-diphosphate aldolase in *Dunaliella salina* (Chlorophyta)’’, *DNA Sequence*, 13 (4), 195–202, (2002).
- [40] Uematsu, K., Suzuki, N., Iwamae, T., Inui, M. and Yukawa H., ‘‘Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants’’, *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 3001-9, (2010).
- [41] Pestova, T. V., Lorsch, J. R. and Hellen, C. U. T., ‘‘The mechanism of translation initiation in eukaryotes’’, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 87–128, (2007).

- [42] Pestova, T. V. and Kolupaeva, V. G., “The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection”, *Genes Dev.*, 16, 2906–2922, (2002).
- [43] Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., et al., “The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome”, *Mol. Cell*, 26, 41–50, (2007).
- [44] Algire, M. A., Maag, D. and Lorsch, J. R., “Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation”, *Mol. Cell*, 20, 251–262, (2005).
- [45] Maag, D., Fekete, C. A., Gryczynski, Z. and Lorsch, J. R., “A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon”, *Mol. Cell*, 17, 265–275, (2005).
- [46] Cheung, Y. N., Maag, D., Mitchell, S. F., Fekete, C.A., Algire, M. A., Takacs, J. E., et al., Hinnebusch, A. G., “Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo”, *Genes Dev.*, 21, 1217–1230, (2007).
- [47] Fekete, C. A., Mitchell, S. F., Cherkasova, V. A., Applefield, D., Algire, M. A., Maag, D., et al., “N- and C-terminal residues of eIF1A have opposing effects on the fidelity of start codon selection”, *EMBO J.*, 26, 1602–1614, (2007).
- [48] Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., Hellen, C. U. and Pestova, T. V., “Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes”, *EMBO J.*, 27, 1609–1621, (2008).
- [49] Siridechadilok, B., Fraser, C. S., Hall, R. J., Doudna, J. A. and Nogales, E., “Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis”, *Science*, 310, 1513–1515, (2005).
- [50] Valašek, L., Mathew, A., Shin, B. S., Nielsen, K. H., Szamecz, B. and Hinnebusch, A.G., “The yeast eIF3 subunits TIF32/a and NIP1/c and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo”, *Genes Dev.*, 17, 786–799, (2003).

- [51] Hinnebusch, A. G., Dever, T. E. and Asano, K., “Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 225–268, (2007).
- [52] Fraser, C. S., Berry, K. E., Hershey, J. W. and Doudna, J. A., “eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit”, *Mol. Cell*, 26, 811–819, (2007).
- [53] Gross, J. D., Moerke, N. J., von der Haar, T., Lugovskoy, A. A., Sachs, A. B., McCarthy, J. E., et al., “Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E”, *Cell*, 115, 739–750, (2003).
- [54] Schutz, P., Bumann, M., Oberholzer, A., E., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M., et al., “Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 9564–9569, (2008).
- [55] Marintchev, A., Edmonds, K., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., et al., “Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation”, *Cell*, 136, 447–460, (2009).
- [56] Pisareva, V. P., Pisarev, A. V., Komar, A. A., Hellen, C. U. T. and Pestova, T. V., “Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 50 UTRs requires DExH-box protein DHX29”, *Cell*, 135, 1237–1250, (2008).
- [57] Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G., “Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets”, *Cell*, 136, 731–745, (2009).
- [58] Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M’Boutchou, M. N. and Sonenberg, N., “Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms”, *Genes Dev.*, 19, 104–113, (2005).
- [59] Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D. A. and Jacobson, A., “Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP”, *Nature*, 453, 1276–1280, (2008).
- [60] Searfoss, A., Dever, T. E. and Wickner, R., “Linking the 30 poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic

- translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p’’, *Mol. Cell. Biol.*, 21, 4900–4908, (2001).
- [61] Kim, J. H., and Richter, J.D., “Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation’’, *Mol. Cell*, 24, 173–183, (2006).
- [62] Acker, M. G., Shin, B. S., Dever, T. E., and Lorsch, J. R., “Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining’’, *J. Biol. Chem.*, 281, 8469–8475, (2006).
- [63] Shin, B., S., Maag, D., Roll-Mecak, A., Arefin, M. S., Burley, S. K., Lorsch, J. R., et al., “Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity’’, *Cell*, 111, 1015–1025, (2002).
- [64] Fringer, J. M., Acker, M. G., Fekete, C. A., Lorsch, J. R. and Dever, T. E., “Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining’’, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 2384–2397, (2007).
- [65] Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., et al., “Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA’’, *Science*, 313, 1935–1942, (2006).
- [66] Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D. and Yusupov, M., “Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome’’, *Nature*, 444, 391–394, (2006).
- [67] Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., et al., “Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation’’, *EMBO J.*, 23, 1008–1019, (2004).
- [68] Dong, J., Nanda, J., S., Rahman, H., Pruitt, M., R., Shin, B., S., Wong, C., M., Lorsch, J., R., Hinnebusch, A., G., “Genetic identification of yeast 18S rRNA residues required for efficient recruitment of initiator tRNA(Met) and AUG selection’’, *Genes Dev.*, 22, 2242–2255, (2008).

- [69] Antoun, A., Pavlov, M. Y., Lovmar, M. and Ehrenberg, M., ‘‘How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis’’, *Mol. Cell*, 23, 183–193, (2006).
- [70] Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A. G., Fabbretti, A., Yusupov, M., Gualerzi, C. O., et al., ‘‘Structure of the 30S translation initiation complex’’, *Nature*, 455, 416–420, (2008).
- [71] Lomakin, I. B., Shirokikh, N. E., Yusupov, M. M., Hellen, C. U. and Pestova, T. V., ‘‘The fidelity of translation initiation: reciprocal activities of eIF1, IF3 and YciH’’, *EMBO J.*, 25, 196–210, (2006).
- [72] Milon, P., Konevega, A. L., Gualerzi, C. O. and Rodnina, M. V., ‘‘Kinetic checkpoint at a late step in translation initiation’’, *Mol. Cell*, 30, 712–720, (2008).
- [73] Kieft, J. S., ‘‘Viral IRES RNA structures and ribosome interactions’’, *Trends Biochem. Sci.*, 33, 274–283.
- [74] Doudna, J. A. and Sarnow, P., ‘‘Translation initiation by viral internal ribosome entry sites’’, *In Translational Control in Biology and Medicine*, M. Mathews, N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, eds., (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 129–154, (2007).
- [75] Locker, N., Easton, L. E. and Lukavsky, P.J., ‘‘HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly’’, *EMBO J.*, 26, 795–805, (2007).
- [76] Pestova, T. V., de Breyne, S., Pisarev, A. V., Abaeva, I. S. and Hellen, C. U., ‘‘eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II’’, *EMBO J.*, 27, 1060–1072, (2008).
- [77] Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E. and Shatsky, I. N., ‘‘Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2’’, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 836–84, (2008).
- [78] Schuler, M., Connell, S. R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroer, B., et al., ‘‘Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA’’, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 1092–1096, (2006).

- [79] Jan, E., Kinzy, T.G., and Sarnow, P., “Divergent tRNA-like element supports initiation, elongation, and termination of protein biosynthesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 15410–15415, (2003).
- [80] Costantino, D. A., Pfingsten, J. S., Rambo, R. P. and Kieft, J.S. “tRNA mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 57–64, (2008).
- [81] Elroy-Stein, O. and Merrick, W.C., “Translation initiation via cellular internal ribosome entry sites”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 155–172, 2007.
- [82] Dresios, J., Chappell, S. A., Zhou, W. and Mauro, V. P., “An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 30–34, (2006).
- [83] Gilbert, W. V., Zhou, K., Butler, T. K. and Doudna, J. A., “Cap-independent translation is required for starvation-induced differentiation in yeast”, *Science*, 317, 1224–1227, (2007).
- [84] Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Bushell, M., Evans, J. R., Stoneley, M., Le Quesne, J. P., et al., “Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry”, *Genes Dev.*, 19, 1556–1571, (2005).
- [85] Gomez, E., Mohammad, S. S. and Pavitt, G. D., “Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation”, *EMBO J.*, 21, 5292–5301, (2002).
- [86] Ron, D. and Harding, H.P., “eIF2 α phosphorylation in cellular stress responses and disease”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 345–368, (2007).
- [87] Vattem, K. M. and Wek, R. C., “Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11269–11274, (2004).

- [88] Dar, A. C., Dever, T. E. and Sicheri, F., “Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR”, *Cell*, 122, 887–900, (2005).
- [89] Szamecz, B., Rutkai, E., Cuchalova, L., Munzarova, V., Herrmannova, A., Nielsen, K. H., et al., “eIF3a cooperates with sequences 50 of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA”, *Genes Dev.*, 22, 2414–2425, (2008).
- [90] Poyry, T. A., Kaminski, A., Connell, E. J., Fraser, C. S. and Jackson, R. J. “The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation”, *Genes Dev.*, 21, 3149–3162, (2007).
- [91] Kim, T. H., Kim, B. H., Yahalom, A., Chamovitz, D. A. and von Arnim, A. G., “Translational regulation via 50 mRNA leader sequences revealed by mutational analysis of the *Arabidopsis* translation initiation factor subunit eIF3h”, *Plant Cell*, 16, 3341–3356, (2004).
- [92] Park, H. S., Himmelbach, A., Browning, K. S., Hohn, T. and Ryabova, L. A., “A plant viral “reinitiation” factor interacts with the host translational machinery”, *Cell*, 106, 723–733, (2001).
- [93] Pisarev, A. V., Hellen, C. U. And Pestova, T. V., “Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes”, *Cell*, 131, 286–299, (2007).
- [94] Janzen, D. M., Frolova, L. and Geballe, A. P., “Inhibition of translation termination mediated by an interaction of eukaryotic release factor 1 with a nascent peptidyl-tRNA”, *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8562–8570, (2002).
- [95] Gaba, A., Jacobson, A. and Sachs, M. S., “Ribosome occupancy of the yeast CPA1 upstream open reading frame termination codon modulates nonsense-mediated mRNA decay”, *Mol. Cell*, 20, 449–460, (2005).
- [96] Raught, B. and Gingras, A. C., “Signaling to translation initiation”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 369–400, (2007).

- [97] Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. and Burley, S. K., “Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G”, *Mol. Cell*, 3, 707–716, (1999).
- [98] Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P. and Blenis, J., “mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events”, *Cell*, 123, 569–580, (2005).
- [99] Yang, H. S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., et al., “The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation”, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 26–37, (2003).
- [100] Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E. and Pagano, M., “S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth”, *Science*, 314, 467–471, (2006).
- [101] Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J., “Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs”, *Cell*, 136(4), 642–655, (2009).
- [102] Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J. “Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi”, *Science*, 293, 1146–1150, (2001).
- [103] Hutvagner, G. and Zamore, P. D., “A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex”, *Science*, 297, 2056–2060, (2002).
- [104] Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T., “Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi”, *Cell*, 110, 563–574, (2002).
- [105] Doench, J. G. and Sharp, P. A., “Specificity of microRNA target selection in translational repression”, *Genes Dev.*, 18, 504–511, (2004).
- [106] Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. and Sonenberg, N., “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?”, *Nat. Rev. Genet.*, 9, 102–114, (2008).

- [107] Leung, A. K., Calabrese, J. M. and Sharp, P. A., “Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 18125–18130, (2006).
- [108] Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E. and Sonenberg, N., “Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory”, *Neuron*, 61, 10–26, (2009).
- [109] Kelleher, R. J., Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H. and Tonegawa, S., “Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory”, *Cell*, 116, 467–479, (2004).
- [110] Sutton, M. A. and Schuman, E. M., “Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory”, *Cell*, 127, 49–58, (2006).
- [111] Martin, K. C. and Ephrussi, A., “mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension”, *Cell*, 136(4), 719, (2009).
- [112] Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N. and Klann, E., “The translation repressor 4E–BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus”, *J. Neurosci.*, 25, 9581–9590, (2005).
- [113] Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Harding, H., Herdy, B., Azzi, M., Bruno, M., et al., “Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2”, *Nature*, 436, 1166–1173, (2005).
- [114] Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., et al., “eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory”, *Cell*, 129, 195–206, (2007).
- [115] Barco, A., Alarcon, J. M. and Kandel, E. R., “Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture”, *Cell*, 108, 689–703, (2002).
- [116] Hentze, M. W., Gebauer, F. and Preiss, T., “cis-regulatory sequences and trans-acting factors in translational control”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 269–296, (2007).

- [117] Thompson, B., Wickens, M. and Kimble, J., “Translational control in development”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 486–507, (2007).
- [118] Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P., et al., “A new paradigm for translational control: inhibition via 5'–3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP”, *Cell*, 121, 411–423, (2005).
- [119] Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R. and Richter, J. D., “Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E”, *Mol. Cell*, 4, 1017–1027, (1999).
- [120] Minshall, N., Reiter, M. H., Weil, D. and Standart, N., “CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus oocytes*”, *J. Biol. Chem.*, 282, 37389–37401, (2007).
- [121] Nelson, M. R., Leidal, A. M. and Smibert, C. A., “*Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression”, *EMBO J.*, 23, 150–159, (2004).
- [122] Chekulaeva, M., Hentze, M. W. and Ephrussi, A., “Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles”, *Cell*, 124, 521–533, (2006).
- [123] Nakamura, A., Sato, K. and Hanyu-Nakamura, K., “*Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis”, *Dev. Cell*, 6, 69–78, (2004).
- [124] Bergsten, S. E. and Gavis, E. R., “Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA”, *Development*, 126, 659–669, (1999).
- [125] Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A. and Davis, I., St Johnston, D., “In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization”, *Cell*, 134, 843–853, (2008).
- [126] Chicoine, J., Benoit, P., Gamberi, C., Paliouras, M., Simonelig, M. and Lasko, P., “Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and

- regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression”, *Dev. Cell*, 13, 691–704, (2007).
- [127] Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H. and Wharton, R.P., “Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline”, *Development*, 134, 1519–1527, (2007).
- [128] Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B.D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D. and Smibert, C. A., “Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo”, *Curr. Biol.*, 15, 284–294, (2005).
- [129] Zaessinger, S., Busseau, I. and Simonelig, M., “Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4”, *Development*, 133, 4573–4583, (2006).
- [130] Clouse, K. N., Ferguson, S. B. and Schupbach, T., “Squid, Cup, and PABP55B function together to regulate gurken translation in *Drosophila*”, *Dev. Biol.*, 313, 713–724, (2008).
- [131] Carrera, P., Johnstone, O., Nakamura, A., Casanova, J., Jackle, H. and Lasko, P., “VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog”, *Mol. Cell*, 5, 181–187, (2000).
- [132] Johnstone, O. and Lasko, P., “Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development”, *Development*, 131, 4167–4178, (2004).
- [133] Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., et al., “Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1”, *Nature*, 438, 512–515, (2005).
- [134] Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N. and Hentze, M. W., “Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 30 UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining”, *Cell*, 104, 281–290, (2001).
- [135] Beckmann, K., Grskovic, M., Gebauer, F. and Hentze, M. W., “A dual inhibitory mechanism restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*”, *Cell*, 122, 529–540, (2005).

- [136] Fox, P. L., Ray, P. S., Arif, A. and Jia, J., “Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases in translational control”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 804–829, (2007).
- [137] Mukhopadhyay, R., Ray, P. S., Arif, A., Brady, A. K., Kinter, M. and Fox, P. L., “DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression”, *Mol. Cell*, 32, 371–382, (2008).
- [138] Sampath, P., Pritchard, D. K., Pabon, L., Reinecke, H., Schwartz, S. M., Morris, D. R., et al., “A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation”, *Cell Stem Cell*, 2, 448–460, (2008).
- [139] Schneider, R. J. and Sonenberg, N., “Translational control in cancer development and progression”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 401–432, (2007).
- [140] Graff, J. R., Konicek, B. W., Vincent, T. M., Lynch, R. L., Monteith, D., Weir, S. N., et al., “Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity”, *J. Clin. Invest.*, 117, 2638–2648, (2007).
- [141] Armengol, G., Rojo, F., Castellvi, J., Iglesias, C., Cuatrecasas, M., Pons, B., et al., “4E-binding protein 1: a key molecular ‘funnel factor’ in human cancer with clinical implications”, *Cancer Res.*, 67, 7551–7555, (2007).
- [142] Larsson, O., Li, S., Issaenko, O. A., Avdulov, S., Peterson, M., Smith, K., et al., “Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors”, *Cancer Res.*, 67, 6814–6824, (2007).
- [143] Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T. A., Larsson, O., Rajasekhar, V.K., et al., “Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation”, *PLoS ONE*, 2, e242, (2007).
- [144] Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M. and Borden, K. L., “Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities”, *Cancer Res.*, 64, 8639–8642, (2004).

- [145] Wendel, H. G., Silva, R. L., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., et al., “Dissecting eIF4E action in tumorigenesis”, *Genes Dev.*, 21, 3232–3237, (2007).
- [146] Svitkin, Y. V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N., “Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation”, *Mol. Cell. Biol.*, 25, 10556–10565, (2005).
- [147] Wilker, E. W., van Vugt, M. A., Artim, S. A., Huang, P. H., Petersen, C. P., Reinhardt, H. C., et al., “14–3–3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis”, *Nature*, 446, 329–332, (2007).
- [148] Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., et al., “Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency”, *Nature*, 456, 971–975, (2008).
- [149] Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., et al., “A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer”, *Mol. Cell*, 28, 501–512, (2007).
- [150] Ron, D., Harding and H. P., “eIF2a phosphorylation in cellular stress responses and disease”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, pp. 345–368, (2007).
- [151] Le Bacquer, O., Petroulakis, E., Pagliarunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., et al., “Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E–BP1 and 4E–BP2”, *J. Clin. Invest.*, 117, 387–396, (2007).
- [152] Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., et al., “Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity”, *Nature*, 431, 200–205, (2004).
- [153] Klann, E. and Richter, J. D., “Translational control of synaptic plasticity and learning and memory”, *In Translational Control in Biology and Medicine*, 485–506, (2007).

- [154] Napoli, I., Mercaldo, V., Boyd, P. P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., et al., “The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP”, *Cell*, 134, 1042–1054, (2008).
- [155] Arias, C., Walsh, D., Harbell, J., Wilson, A. and Mohr, I., “Activation of host translational control pathways by a viral developmental switch”, *PLoS Pathog.*, (in press) 10.1371/journal.ppat.1000334, (2009).
- [156] Buchkovich, N. J., Yu, Y., Zampieri, C. A. and Alwine, J. C., “The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 266–275, (2008).
- [157] Kim, I. and Chen S., “The Physical and Chemical Properties of Aldolase”, (2016).
- [158] Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U., and Stitt, M., “A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants”, *The Plant Journal*, 14(2), 147–157, (1998).
- [159] Rong, L., Livingstone, M., Sukarieh, R., Petroulakis, E., Gingras, A. C., Crosby, K., et al., “Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs”, *RNA*, 14(7). 1318-27, (2008).
- [160] Ruffel, S., Dussault, M. I., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., et al., “A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)”, *The Plant Journal*, 32, 1067–1075, (2002).
- [161] Combe, J. P., Petracek, M. E., Eldik, G., Meulewaeter, F., and Twell, D., “Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco”, *Plant Mol Biol.*, 57(5), 749-60, (2005).
- [162] Nevo, E., Joh, K., Hori, K., Beiles, A., “Aldolase DNA polymorphism in subterranean mole-rats: genetic differentiation and environmental correlates, *Heredity (Edinb)*, 3, 307-320, (1990).

- [163] Paoletta, G., Santamaria, R., Buono, P., and Salvatore, F., “Mapping of a restriction fragment length polymorphism within the human aldolase B gene”, *Hum Genet.*, 77(2), 115-7, (1987).
- [164] Sokolova, O. V., van Oorschot, R. A. H., and VandeBerg, J. L., “Aldolase C polymorphism in the laboratory opossum, *Monodelphis domestica*”, *Animal Genetics*, 28, 358–359, (1997).
- [165] Kelley, P. M., and Tolan, D. R., “The Complete Amino Acid Sequence for the Anaerobically Induced Aldolase from Maize Derived from cDNA Clones”, *Plant Physiol.*, 82, 1076-1080, (1986).
- [166] Sage, R. D., and Selander, R. K., “Trophic radiation through polymorphism in cichlid fishes”, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72(11), 4669-4673, (1975).
- [167] Aksoy, N. H., Dogan, P., “Fructose 1,6 Bisphosphate Aldolase from Gestational Diabetic Human Placenta: Purification, Identification, and Investigation of Kinetic Properties”, *Advances in Diabetes and Metabolism*, 3(3): 26-34, (2015).
- [168] Ma, S., Martin-Laffon, J., Mininno, M., Gigarel, O., Brugie`re, S., Bastien, O., et al., “Molecular Evolution of the Substrate Specificity of Chloroplastic Aldolases/Rubisco Lysine Methyltransferases in Plants”, *Molecular Plant*, 9, 569–581, (2016).
- [169] Midelfort, C. F., Gupta, R. K., and Rose, I. A., “Fructose 1,6-Bisphosphate: Isomeric Composition, Kinetics, and Substrate Specificity for the Aldolases?”, *Biochemistry*, 15(10), (1976).
- [170] Gray, G. R., and Barker R., “Studies on the Substrates of D-Fructose 1,6-Diphosphate Aldolase in Solution”, *Biochemistry*, 9(12), (1970).
- [171] Bock, A., and Neidhardt, F. C., “Isolation of a Mutant of *Escherichia coli* with a Temperature-sensitive Fructose-1,6-Diphosphate Aldolase Activity”, *Journal of Bacteriology*, 92(2), (1966).
- [172] Dawson, N. J., Biggar, K. K., Storey, K. B., “Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase during Anoxia in the Tolerant Turtle, *Trachemys*

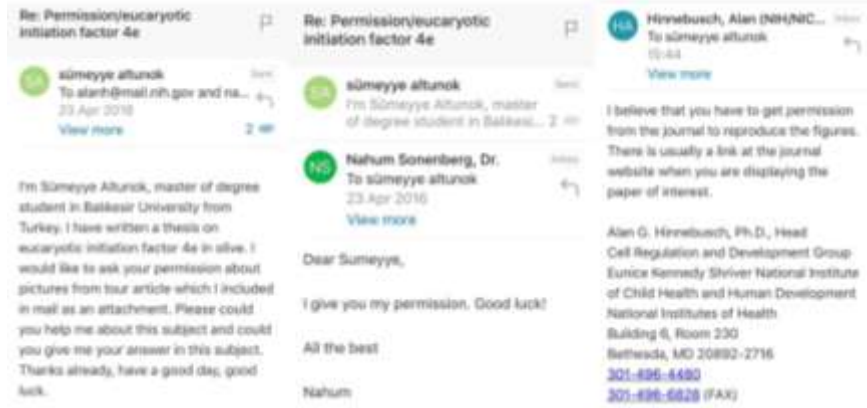
- scripta elegans: An Assessment of Enzyme Activity, Expression and Structure”, *Plos One*, 8(7), (2013).
- [173] Certa, U., Ghersa, P., Dobell, H., Matile, H., Kocher, H. P., et al., “Aldolase Activity of a Plasmodium Falciparum Protein with Protective Properties”, *Science*, 240(4855), 1036, (1988).
- [174] Cunha, E., Pinto, P. C. A. G., Saraiva, M. L. M. F. S., “Evaluation of ionic liquids as alternative solvents for aldolase activity: Use of a new automated SIA methodology”, *Talanta*, 141, 293–299, (2015).
- [175] Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S., and Berry, A., “Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases”, *Eur. J. Biochem.*, 267, 1858-1868, (2000).

EKLER

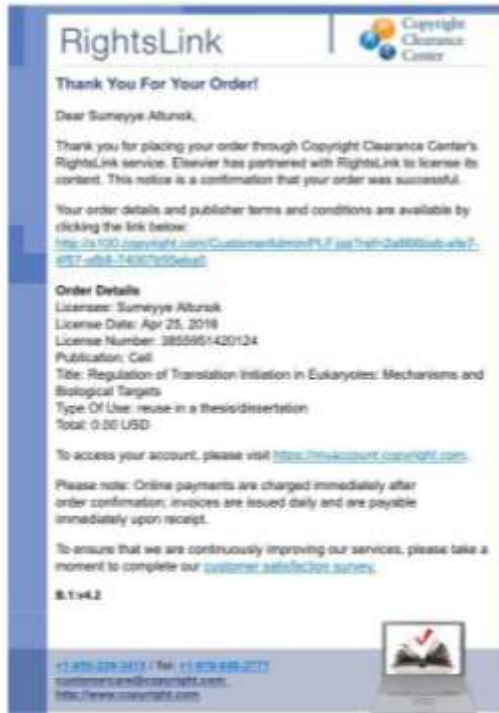
6. EKLER

EK A Kullanılan Resimler için Alınan İzin

Giriş bölümünde EIF geni için kullanılan resimler için alınan izin (makalenin yazarından ve yayınlanan dergiden) aşağıdaki mail iletilerindedir.



Makale yazarlardan alınan izinler



Makalenin yayınlandığı dergiden alınan izin

EK B Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Altunok S., Dündar E., Ünver T., 2014, Zeytin Taslak Genom Dizisinden Tahmini Aldolaz Geninin Biyoinformatik Yöntemlerle Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir.

Altunok S., Dündar E., Ünver T., 2015, Zeytin Taslak Genom Dizisinden Tahmini Aldolaz Geninin Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu, 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, Bolu.

Altunok S., Dündar E., Ünver T., 2015, Zeytin Taslak Genom Dizisinden Tahmini Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörünün Moleküler Karakterizasyonu, 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, Bolu.

Altunok S., Dündar E., Ünver T., 2015, Zeytin Taslak Genom Dizisinden Tahmini Aldolaz Geninin Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu, 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Trabzon.

Altunok S., Dündar E., Intron Analysis and Expression Pattern of *IF4E* gene from Olive, 2016, Symposium on EuroAsian Biodiversity, Antalya.