

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



**ZEYTİN UDP GLUKOZ 4 EPİMERAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜN SALI ALPTEKİN

BALIKESİR, HAZİRAN 2019

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



**ZEYTİN UDP GLUKOZ 4 EPİMERAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜN SALI ALPTEKİN

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülendâ TÜRME (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Hulusi MALYER

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, HAZİRAN 2019

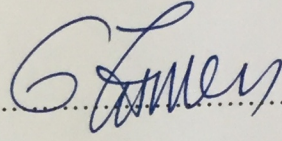
KABUL VE ONAY SAYFASI

Özgün SALI ALPTEKİN tarafından hazırlanan “ZEYTİN UDP GLUKOZ 4 EPİMERAZ GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

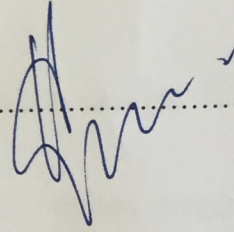
Jüri Üyeleri

İmza

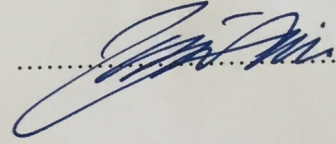
Danışman
Prof Dr. Gülendām TŪMEN

.....


Ūye
Prof.Dr. Hulusi MALYER

.....


Ūye
Dr.Ŗğr.Ūyesi SŪmeyye AYDOGAN
TŪRKOĐLU

.....


JŪri ūyeleri tarafından kabul edilmiř olan bu tez Balıkesir Ūniversitesi Fen Bilimleri EnstitŪsŪ YŖnetim Kurulunca onanmıřtır.

Fen Bilimleri EnstitŪsŪ MŪdŪrŪ

Prof. Dr. Necati ŖZDEMİR

.....

ÖZET

**ZEYTİN UDP GLUKOZ 4 EPİMERAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖZGÜN SALI ALPTEKİN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)

BALIKESİR, HAZİRAN 2019

Zeytin (*Olea europaea* L.) yılın tüm zamanlarında yeşil yapraklı, yaklaşık 10 metreye kadar uzayabilen, çalı halli, sık dalları olan bir ağaçtır. Akdeniz iklimine sahip bölgelerde tarıma elverişli olması sebebiyle ülkemize ekonomik olarak fayda sağlamaktadır. Ayrıca sağlık sektöründeki kullanım alanlarının genişliğiyle de değerli bir ağaçtır. Daha önce Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yapılan çalışmalar sonucu oluşturulan Zeytin cDNA kütüphanesinden Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında karakterize edilmek üzere cDNA dizisi seçilmiştir. Seçilen dizinin biyoinformatik analizleri ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. gDNA dizisi ile yapılan analizlerde zeytin tahmini UDP Glukoz 4 Epimeraz dizisinin en çok *Vitis vinifera* bitkisine benzediği görülmüştür. Protein dizisi olarak karşılaştırma yapıldığında ise en çok *Theobroma cacao* bitkisiyle benzerlik gösterdiği görülmüştür. Gen Bankasından diğer bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaçta ise en çok *Solanum lycopersicum* ve *Solanum tuberosum* ile benzerlik görülmüştür. Biyoinformatik çalışmalar kapsamında yapılan diğer araştırmalarda genin aminoasit içeriği, hidrofilik özelliği, nükleotit kompozisyonuna (BLAST, BioEdit, FinchTV, Primer3) bakılmıştır. Aminoasit kompozisyonunda en fazla Glisin aminoasidine rastlanmıştır. Genin polimorfizm çalışması UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisi ve gen bankasından diğer bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizileri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Gen ifadesi çalışmalarında cDNA dizisi pLATE51 vektörü kullanılarak *E.coli* (DH10B ve BL21) bakteri suşlarına transforme edilip, gen ekspresyonu IPTG ile indüklenme sonucu sağlanmıştır. Elde edilen protein Western Blot ile gözlenmiştir. Saflaştırma çalışmalarında ise afiniteye dayalı Ni-NTA Native saflaştırma method kullanılarak SDS-Page ile protein varlığı gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda tahmini zeytin UDP Glukoz 4 Epimeraz genin 348 aminoasit kodladığı, 38 kDA büyüklüğünde olduğu görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin, *Olea europaea* L., UDP Glukoz 4 Epimeraz.

ABSTRACT

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF OLIVE UDP GLUCOSE 4
EPIMERASE GENE
MSC THESIS
ÖZGÜN SALI ALPTEKİN
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)

BALIKESİR, JUNE 2019

Olive (*Olea europaea* L.) is a kind of tree which has intense branches and green leaves all year, can reach up to 10 meter long and forms a bushy state. As it is suitable for agriculture in regions with Mediterranean climate, it provides economic benefit to our country. It is also a valuable tree with its wide range of uses in the health sector. The cDNA sequence was selected from the Olive cDNA library, which was formed as a result of the studies carried out in the Department of Biology at Balıkesir University in order to be characterized within the scope of the master's thesis. Bioinformatics analysis and molecular characterization of the selected sequence was studied. The analysis of the gDNA sequence showed that olive predicted UDP Glucose 4 Epimerase sequence was most similar to *Vitis vinifera* plant. When the protein sequence was compared, it was seen that it was most similar to *Theobroma cacao* plant. In the phylogenetic tree generated by UDP Glucose 4 Epimerase cDNA sequences from other plants from Gen Bank, most similarities were observed with *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*. In other studies conducted within the scope of bioinformatics studies, amino acid content, hydrophilic property, nucleotide composition (BLAST, BioEdit, FinchTV, Primer3) of the gene were examined. Glycine amino acid was the most common in the amino acid composition. The polymorphism study of the gene was carried out by comparing the UDP Glucose 4 Epimerase cDNA sequence with the UDP Glucose 4 Epimerase cDNA sequences from other gene banks. In gene expression studies, the cDNA sequence was transformed into *E.coli* (DH10B and BL21) bacterial strains using pLATE51 vector and gene expression was induced by IPTG. The resulting protein was monitored by Western Blot. In the purification studies, the presence of protein by SDS-Page was observed by using affinity-based Ni-NTA Native purification method. As a result of the studies, it was found that the estimated olive UDP Glucose 4 Epimerase gene encodes 348 amino acids and is 38 kDA in size.

KEYWORDS: Olive, *Olea europaea* L., UDP Glucose 4 Epimerase.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	viii
1.1 Zeytinin Sınıflandırılması.....	1
1.2 Zeytin Ağacının Morfolojisi.....	2
1.3 Zeytindeki Periyoside.....	2
1.4 <i>Olea europaea</i> L. Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi.....	4
1.5 UDP Glukoz 4 Epimeraz Enziminin Genel Özellikleri.....	4
1.5.1 Karbonhidratlar.....	4
1.5.2 Galaktoz Metabolizması.....	5
1.5.3 Leloir Yolu.....	6
1.5.4 UDP Glukoz-4-Epimeraz.....	7
2. MATERYAL VE METOT.....	10
2.1 Materyal.....	10
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	10
2.1.2 Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Sterilizasyonu ve Kullanıma Hazırlanması.....	10
2.1.3 Örneklerin Toplanması.....	10
2.1.4 Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri.....	11
2.1.5 Antibiyotikler.....	11
2.1.6 Kullanılan Bakteri Suşları.....	11
2.1.7 Çalışmada Kullanılan Vektör.....	11
2.2 Metot.....	12
2.2.1 Biyoinformatik Analiz.....	12
2.2.2 Zeytind gDNA İzolasyonu.....	12
2.2.3 PZR Deneyleleri.....	13
2.2.4 DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	13
2.2.5 Toplam RNA İzolasyonu.....	14
2.2.6 RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi.....	14
2.2.7 cDNA eldesi.....	15
2.2.8 Bakteri Besiyeri Hazırlanması.....	15
2.2.9 Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması.....	15
2.2.10 Jelden Kazanım.....	16
2.2.11 Klonlama.....	16
2.2.12 Çoğaltma Suşuna Transformasyon.....	17
2.2.13 Rekombinant kolonilerin belirlenmesi.....	17
2.2.14 Plazmit DNA İzolasyonu.....	17
2.2.15 Ekspresyon Suşuna Transformasyon ve Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi.....	18
2.2.16 Hücrelerin Yıkılması.....	18
2.2.17 Hücrelerin Parçalanması.....	18

2.2.18	SDS PAGE Jel Elektroforezi	19
2.2.19	Western Blot Basamağı.....	20
2.2.20	Protein Saflaştırma Basamağı	21
2.2.21	Ni-NTA Kolonu için Liziz Basamağı	21
2.2.22	Ni-NTA Kolonu ile Saflaştırma Basamağı	22
3.	BULGULAR	23
3.1	UDP Glukoz 4 Epimeraz Geninin Biyoinformatik Analizi.....	23
3.2	İntron ve Polimorfizm alışması	26
3.3	Protein Ekstraksiyonu alışmaları	28
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	31
5.	KAYNAKLAR	34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Galaktozun yapısı	5
Şekil 1.2: Galaktoz metabolizması [40].....	6
Şekil 1.3: İnsan UDP Glukoz-4-Epimeraz enziminin üç boyutlu yapısı [38]	8
Şekil 1.4: UDP glukoz-4-epimerazın çalışma mekanizması [46].....	9
Şekil 2.1: pLATE51 ekspresyon vektörü aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas).....	11
Şekil 3.1: Zeytin tahmini UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin cDNA dizisinin Blastn görüntüsü	23
Şekil 3.2: Zeytin tahmini UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisinin Blastx görüntüsü	24
Şekil 3.3: BioEdit programıyla elde edilen UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin aminoasit kompozisyonu	24
Şekil 3.4: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin nükleotit kompozisyonu	25
Şekil 3.5: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin açık okuma çerçevesi	25
Şekil 3.6: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin intron çalışması: M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1:İntron-f-1, İntron-r-1 gDNA PZR sonucunun agaroz jel görüntüsü	26
Şekil 3.7: Farklı bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz genine ait polimorfizmi belirlemek amacıyla hazırlanan NJ ağacı. NCBI kayıt numaraları türlerin yanında belirtilmiştir.	27
Şekil 3.8: Polimorfizm çalışması için yapılan PZR çalışmasının jel elektroforezi görüntüsü 1,2: Polimorfizm primerleri ile yapılan PZR bantları, M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)	27
Şekil 3.9: UDP Glukoz 4 Epimeraz'ın DH10B suşunda koloni PCR jel görüntüsü M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) 1-9: Seçilen koloniler ile yapılan koloni PZR bantları	28
Şekil 3.10: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin Western Blot görüntüsü. M; Marker (fermantas, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, 26619), 1; negatif kontrol, 2; pellet, 3; süpernatant.....	29
Şekil 3.11: Qiagen Native Saflaştırma protokolüne göre UDP Glukoz 4 Epimeraz'ın SDS-PAGE görüntüsü: 1: Ham ekstrakt, 2: Flowthrough, 3: Wash-1, 4: Wash-2, 5: Elusyon-1, 6: Elution-2, 7: Elution-3, 8: Elution-4	30

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Bazı ülkelerdeki zeytin üretim miktarı (ton) [7].....	1
Tablo 3.1: Kullanılan primer dizileri	28

SEMBOL LİSTESİ

Aa	: Aminoasit
amp	: Ampisilin
BLAST	: Basic local alignment search tool
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Dinükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	: Etilen glicol tetraasetik asit
GALE	: Üridin difosfat glukoz-4-epimeraz
GALK	: Galaktokinaz
GALT	: Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz
gDNA	: Genomik DNA
HCl	: Hidroklorik asit
IPTG	: İsopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria – Bertani
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
OD	: Optik yoğunluk
ORF	: Open reading frame (Açık okuma çerçevesi)
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorid
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TBE	: Tris borik asit
TE	: Tris-EDTA
UDP	: Üridin difosfat
UV	: Ultra-viyole

ÖNSÖZ

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji laboratuvarlarında yüksek lisans tezi olarak hazırlamış olduğum bu çalışmanın yürütücüsü ve danışmanım, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Gülendamar TÖMEN'e,

Tez savunma sınavımda yer alan değerli hocam Prof.Dr.Hulusi Malyer'e bilimsel katkılarından dolayı,

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden bitirdiğim güne kadar bana elinden gelen her türlü yardımı esirgemeyen canım hocam Dr.Öğr.Üyesi Gökem DENİZ SÖNMEZ'e,

Aldığım derslerde sahip olduğu tecrübelerini bizimle paylaşan Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Tezimde mümkün olduğunca yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşan sevgili Dr.Öğr.Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na,

Laboratuvardaki çalışmalarına katkılarından dolayı çalışma arkadaşlarım Tuğba AKYÜZ'e ve Özge PALA'ya,

Erasmus+ Staj programı ile gittiğim Abnoba GmbH şirketinde bana verdiği sorumluluklar ile kendimi göstermemi sağlayan, sabırla her gün yeni bir şeyler öğreten, iş ahlakıma ve kişiliğime katkılarından dolayı süpervizörüm Christoph HEYDER'e,

Almanya'da geçirdiğim süre boyunca çalışmalarımı destekleyen, beni hiç yalnız hissettirmeyen Julia Van TRACK'e ve Ana DİZDARİ'ye,

Lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve bugüne kadar aynı şehirlerde olamasak da her zaman hep yanımda hissettiğim canım dostlarım Ayşe Gizem DİNÇ'e ve Gizem AYGÜN'e,

Dünyadaki en büyük şanslarım; maddi ve manevi desteklerinden dolayı canım babam Ahmet SALI'ya, canım annem Emine SALI'ya ve biricik kardeşim Özlem SALI KESKİN'e,

Son olarak 2007 yılından bugüne her kararında beni destekleyen, her zaman daha fazlasını yapabileceğime inanan en yakın arkadaşım, canım eşim; Ali Rıza ALPTEKİN'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

1. GİRİŞ

Zeytin, dünyada üzerinde eski çağlardan günümüze kadar tarımı büyük önem taşıyan, insan sağlığı için faydalı olan ve bu nedenlerle büyük ilgi gören bir türdür. Zeytin (*Olea europaea* L.) dünyada tarımı yapılan en eski Akdeniz iklimi ağaçlarından biridir. Arkeolojik kanıtlara göre zeytin bitkisinin tarımı yaklaşık olarak M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'de kurulmuş Minos Uygarlığı ile başlamıştır [1]. Zeytin ağaçları Akdeniz ikliminde kırsal bölgelerin parmak izi olmakla birlikte hem besin olarak hem de tıbbi alanlardaki faydaları sebebiyle tüketilmektedir [2]. Ekonomik değeri, besin içeriği, kuraklığa dayanıklılığı ve uzun yıllar boyunca meyve vermesi sebebiyle tarımda önemli bir yere sahiptir [3].

İki taraftan yayıldığı düşünülen zeytin bitkisi; ilk olarak Mısır'ı aşarak Fas ve Tunus'a ulaşmıştır. Diğer uzanış ise Ege Adaları üzerinden İspanya'ya doğru olmuştur [4].

Meksika, İsrail ve İspanya gibi ülkelerde geniş alanlarda varlık gösteren zeytin; bu ülkeler için tarımsal olarak öneme sahiptir [5]. Ülkemizde, yükseltilerin az olduğu nerdeyse tüm kıyı bölgelerde tarımı yapılabilen zeytin; yükseltilerin az olduğu Adıyaman, Kahramanmaraş, Karaman gibi iç kesimlerde de yetiştirilebilmektedir [6].

1983 yılında zeytin yetiştirilen alanlar Dünya üzerinde 6 milyon hektar alan iken, bu sayı 2013 yılında 10.24 milyon hektara kadar ulaşmıştır. 30 yıllık periyotta bu alan %70 oranında genişlemiş ve İspanya yetiştirilen alan bakımından 2.50 milyon hektar alan ile dünyada ilk sırada, Tunus 1.80 milyon hektar ile ikinci sırada yer almaktadır [7].

Tablo 1.1: Bazı ülkelerdeki zeytin üretim miktarı (ton) [7].

Ülke	Üretim (Ton)
İspanya	3.626.600
İtalya	2.992.330
Yunanistan	2.100.000
Türkiye	1.820.000
Tunus	963.000
Suriye	1.095.043
Dünya	16.584.857

Besin içeriği bakımından oldukça değerli bir ürün olan zeytin, çeşidine göre şekil ve renk farklılığı göstermektedir. İçerik olarak çoğunluğunu su ve yağ oluştururken; protein, mineral maddeler, şeker, selüloz, fenolik bileşikler, hidrokarbonlar ve tokoferoller gibi bileşenlere de yapısına katılmaktadır. Zeytin bileşimini etkileyen diğer faktörler ise olgunluk derecesi, yetiştirildiği bölge gibi etmenlerdir [8]. Bir zeytin tanesinin içeriğinin yaklaşık yarısı su, üçte biri yağ, %1,6'sı protein, %19,1'i şeker, %5,8'i selüloz ve %1 gibi geri kalanı da mineral maddelerdir. Bu maddelere ek olarak fenolik bileşikler zeytinde eser miktarda bulunmasına rağmen yağı oksidasyona karşı koruyarak antioksidan özellikteki yağın rengi, oksidatif dengesi ve besin kalitesi açısından önemli role sahiptir [9].

1.1 Zeytinin Sınıflandırılması

Sınıflandırma sisteminde 30 cinse sahip Oleaceae familyasından gelen zeytin bitkisi, *Olea* cinsine ait taksonlardan yenilebilir meyvesi olan tek tür *Olea europaea* L.; 2600'den fazla çeşide sahiptir. Çeşit zenginliği en fazla türlerden biri olan zeytinin sınıflandırılması şu şekildedir [10]:

Bölüm : Spermatophyt

Alt Bölüm : Angiospermae

Sınıf : Dicotyledoneae

Alt Sınıf : Asteridae

Takım : Oleales

Familya : Oleacea

Cins : *Olea* L.

Tür : *Olea europaea* L.

1.2 Zeytin Ağacının Morfolojisi

Zeytin bazen çalı olarak bazen de 10-20 metre boylu, sık dallı, her zaman yeşil yapraklı bir ağaç olarak karşımıza çıkmaktadır. Düzensiz, geniş, kıvrımlı bir gövdeye sahiptir. Ağacın yaşlanmasıyla gövde giderek çatlamaya başlar. Toprak tarıma elverişli olduğunda taç açık ve asimetric, elverişsiz koşullarda ise taç yoğun ve yuvarlaktır [11]. Zeytin bitkisi kısa saplı, yaprak kenarları alt yüzeye doğru hafif kıvrımlı ve mızrak şeklindedir. Yaprak yüzeyi tüysüzdür. Yapraklardan daha kısa panikulaya sahiptir. Beyaz, kokulu, 3-4 milimetrelik çiçeklere sahiptir [12-14].

Kuzey yarımküredeki zeytinlerin Mart ayının sonunda vejetatif tomurcukları oluşur, Nisan - Mayıs aylarında da bu tomurcuklar yerlerini çiçeklere bırakır. Sıcaklık artışı bu olayın gerçekleşmesinde önemli bir etmendir. Yaz mevsimi boyunca gelişimine devam eden meyve Eylül - Ekim aylarında yeşil zeytin olarak hasada uygun hale gelir. Eylül - Ekim ayları boyunca gelişimine izin verilen zeytin bu sürede sulanarak renk değiştirmeye başlar ve kış aylarında siyah rengini alarak tam olgunluğa ulaşır [15,16].

1.3 Zeytindeki Periyoside

Periyoside, meyve veren bir çok ağaç türünde gözlenen bir yılın verimli, takibindeki yılın ise daha az verimli geçmesiyle oluşan durumdur. Bu tanım genel

olarak çiçek oluşturma derecesi ile belirlenirken; kültürü yapılan zeytinde çeşitten çeşide farklılık göstermektedir [17-19].

Meyvesi, yağı ve posası kullanılan zeytinde, bütün yetiştirme şartlarında periyosideye rastlanmaktadır. Meyve büyüklüğü, vejetatif büyüme oranı yanında hormonal faktörler periyoside ile ilişkilidir [16]. Bu sebep ile verimli yıldaki genç sürgün gelişimi de sınırlıdır [16]. Verimli yılın ardından gelişmesi engellenmiş sürgünlerin üzerindeki gözlerin büyüme oranı genellikle daha azdır [20]. Bu nedenle aynı uzunluğa sahip sürgünler, verimli yılın ertesinde daha çok somak geliştirmektedirler, ağacın daha önceki verim durumuna göre somaklar üzerindeki çiçek durumu da değişebilmektedir. Somak sayısının meyve tutma kapasitesine doğrudan etkisi olsa bile bazı yıllarda ortaya çıkan verimdeki değişim, meyve oluşumundaki değişikliğe göre daha az orandadır. Bu da meyvelerin sayıları ve büyüklükleri arasındaki ilişkiyle ilgilidir [21]. Elma [22], pekan cevizi [23], mango [24], mandalin [25], fıstık [26] periyoside gösteren diğer bitkilere örnek olarak gösterilebilir. Antep fıstığı, fındık ve zeytin mutlak periyoside gösteren türlerdendir [27].

Yapılan çalışmalar element eksikliği, bazı hormonların değişimi ve karbonhidratların periyosideyi etkilediğini göstermiştir [28-30]. Karbonhidratların periyosideye etkisi üzerine iki hipotez bulunmaktadır. Bunlardan birincisi 'yok' yılında meyveden yaprağa doğru mannitol transpot hızının yavaşlamasıyla yapraklardaki mannitol birikiminin azalması, diğer hipotez ise 'yok' yılındaki glukoz, fruktoz ve mannitol dönüşümünün düzenli olmayışıdır [31]. Meyve gelişimindeki çözülebilen şeker miktarı meyve oluşumundan 90 gün sonra artmakta ve daha sonrasında ise giderek azalmaktadır. 'Var' yılındaki farkedilir derecede şeker miktarındaki artış meyvelerde renklenmenin başladığı zaman ile örtüşmektedir. 'Yok' yılından elde edilmiş zeytinlerdeki şeker içeriği oranı 'var' yılındaki zeytinlerin içerisindeki şeker oranından daha fazladır. Bu da 'yok' yılında meyve üretiminin olmamasından kaynaklanmaktadır [32].

1.4 *Olea europaea* L. Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Zeytin çeşitleri genel olarak bakıldığında yağlık ve sofralık olarak iki kategoride değerlendirilirken, yaklaşık %90'ı yağlık geri kalan %10'luk kısım da sofralık olarak işlenmektedir [33]. Zeytin meyvesinin besin olarak tüketilmesine ek olarak yağı da kozmetik sanayide ve tıpta kullanılmaktadır. Ayrıca odunu da mobilya üretiminde değerlendirilmektedir.

37 ülkede tarımda kullanılan zeytin, Türkiye'de önemli çeşitlilik zenginliğine sahiptir. Ülkemiz ekonomisi için önemli bir gelir kaynağıdır [34]. FAO tarafından yayınlanan istatistiklere göre; zeytin üretiminde İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra Türkiye 4. sırada yer almaktadır. Dünya pazarında sofralık siyah zeytinin %80'i Türkiye tarafından karşılanmaktadır.

Zeytin yaprakları ile ilgili yapılan çalışmalar göstermiştir ki; zeytin bitkisi antioksidan, hipoglisemik, anti-hipertansiyon ve antimikrobiyal gibi etkileri yapısında barındırmaktadır. Zeytin yaprakları hipertansiyon, kardiovasküler hastalıklar ve hiperlipidemi gibi hastalıklara karşı koruma ve iyileştirme etkisine de sahiptir [35].

1.5 UDP Glukoz 4 Epimeraz Enziminin Genel Özellikleri

1.5.1 Karbonhidratlar

Karbon, hidrojen ve oksijenin belirli bir formülle ($C_nH_{2n}O_n$) bir araya gelerek oluşturduğu bileşiklere karbonhidratlar denir. Karbonhidratlar birçok canlı için temel enerji kaynağıdır ve monosakkarit, disakkarit, oligosakkarit ve polisakkarit olarak 4 kategoride incelenir.

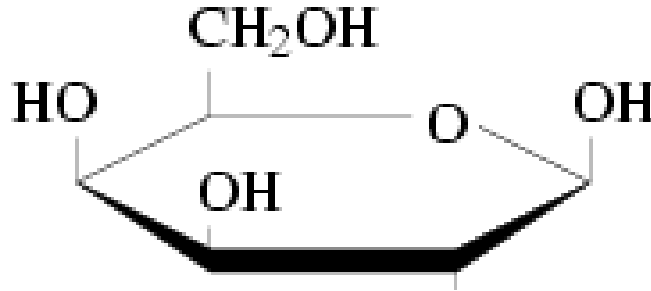
Daha küçük birimlerine ayrılamayan karbonhidrat sınıfı monosakkaritler olarak adlandırılır. Glikoz, galaktoz ve fruktoz monosakkaritlere örnektir, her birinin kapalı formülü $C_6H_{12}O_6$ olarak gösterilir. Moleküllerindeki atomların dizilişlerine göre ayırt edilirler. Bu şekilde kapalı formülleri aynı, açık formülleri farklı olan moleküllere izomer denir.

İki monosakkaritin glikozit bağıyla birleşerek oluşturduğu karbonhidrat grubu disakkarit ismini alır. Glukoz ve galaktozun bir araya gelmesiyle laktoz, glukoz ile glukozun birleşimi ile maltoz, glukozun fruktoz ile bağlanması sonucunda da sükröz ortaya çıkar.

Üç ile altı monosakkaritin birleşip dehidrasyonu sonucu oligosakkaritler oluşur. Bazı organizmalarda serbest olarak bulunabildikleri gibi bazı organizmalarda yapıya da katılabilirler [36].

1.5.2 Galaktoz Metabolizması

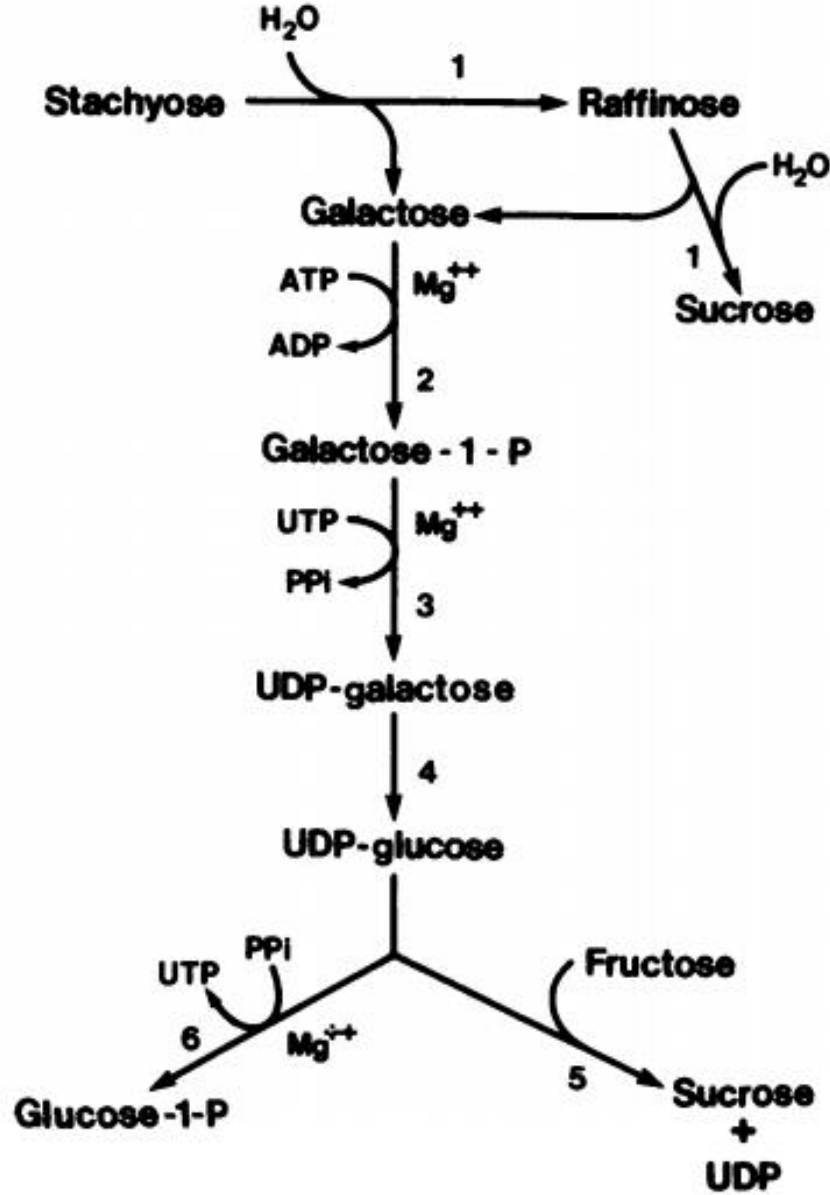
Galaktoz bakımından en zengin besin kaynağı bol miktarda laktoz içeren süt ve süt ürünleriyken aynı zamanda birçok meyve ve sebze de galaktoz bulunmaktadır [37].



Şekil 1.1: Galaktozun yapısı.

Hücrelerde bulunan galaktozun metabolizasyonu için fruktoz ile benzer olarak fosforile edilmesi gerekmektedir. Galaktozun fosforilasyonu sonucu oluşan galaktoz-1-fosfat glikolitik süreçte kullanılamayacağı için UDP galaktoza çevrilmez. Bu çevirme işlemi galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enzimi ile gerçekleştirilir. Bu enzimin eksiliğinde galaktoz-1-fosfat hücrelerde birikir ve birçok doku etkilenir. Galaktoz-1-fosfat hücrede biriktiğinde yan yollardan aldoz redüktaz enziminin katalizlemesi sonucu galaktitol üretimine sapabilir [38]. UDP galaktozun glukoz metabolizmasına katılabilmesi için UDP glukoz-4-epimeraz enzimi ile UDP glukozu çevrilmesi gerekmektedir. UDP galaktoz biyosentez reaksiyonlarında glikoprotein, glikolipid, glikozaminoglikan oluşumlarında galaktoz vericisi olarak

görev yapmaktadır [36]. Aynı zamanda galaktozun galaktokinaz enzimi ile girdiği reaksiyon sonucunda oluşan galaktoz-1-fosfat daha sonra galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enzimi ile glukoz-1-fosfata çevrilerek glikolize katılır [39].



Şekil 1.2: Galaktoz metabolizması [40].

1.5.3 Leloir Yolu

Luis Federico 1949 ve 1953 yılları arasında maya ve bakterilerde galaktozun glukozu dönüşümü ile ilgili yaptığı çalışmalarda galaktoz metabolizması içerisindeki en önemli yollardan biri olan Leloir yolunu tanımlamış ve bu çalışması ona 1970

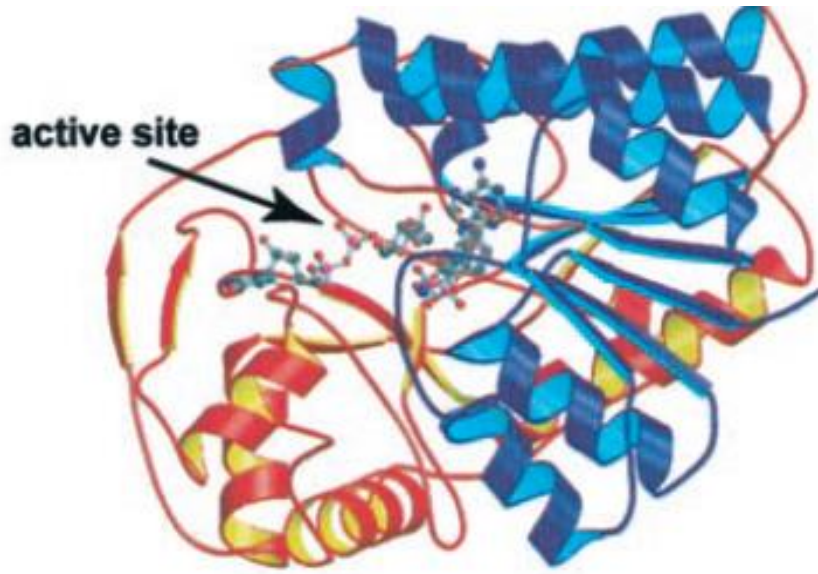
yılında kimya dalında Nobel ödülünü kazandırmıştır [41]. Tanımlanmış olan Leloir yolunda görev yapan dört temel enzim yer almaktadır; galaktoz muterotaz, galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT), üridin difosfat glukoz-4-epimeraz (GALE) [38].

Galaktoz metabolizmasında görev alan ilk enzim olan galaktoz muterotaz aktivitesi ilk kez *E. coli*'de 1965 yılında gösterilmiş ve 1994 yılında da enzimi kodlayan gen karakterize edilmiştir. Bu enzim galaktoz metabolizmasında Leloir yolunun ilk basamağı olan β -D-galaktozu α -D-galaktoza çevirme işlemini yerine getirir [42]. Bu adımın ardından oluşan α -D-galaktoz galaktokinaz enzimi ile galaktoz-1-fosfata dönüştürülür ve bu dönüşümden sonra galaktoz-1-fosfat üridil transferaz ile UDP galaktoz meydana gelir. Leloir yolağının son adımı olarak da UDP galaktoz UDP glukoz-4-epimeraz enzimi ile UDP glukozu dönüştürülür [39]. Leloir yolundaki en önemli adım galaktoz-1-fosfat oluşumudur. Enerji kaynağı olarak galaktozun kullanılmasında kritik role sahiptir. Aynı zamanda UDP galaktoz gibi oluşan ara metabolitler galaktoz transferinin sağlanmasında kofaktör görevi üstlenerek galaktozun glikolipid ve glikoprotein yapısına katılmasını sağlar. Bu yolda yer alan enzimlerden herhangi birinin mutasyonu galaktozemiye neden olabilmektedir. Bu hastalığın önüne ancak galaktozsuz ve laktosuz besinler ile beslenilerek geçilebilir [43].

1.5.4 UDP Glukoz-4-Epimeraz

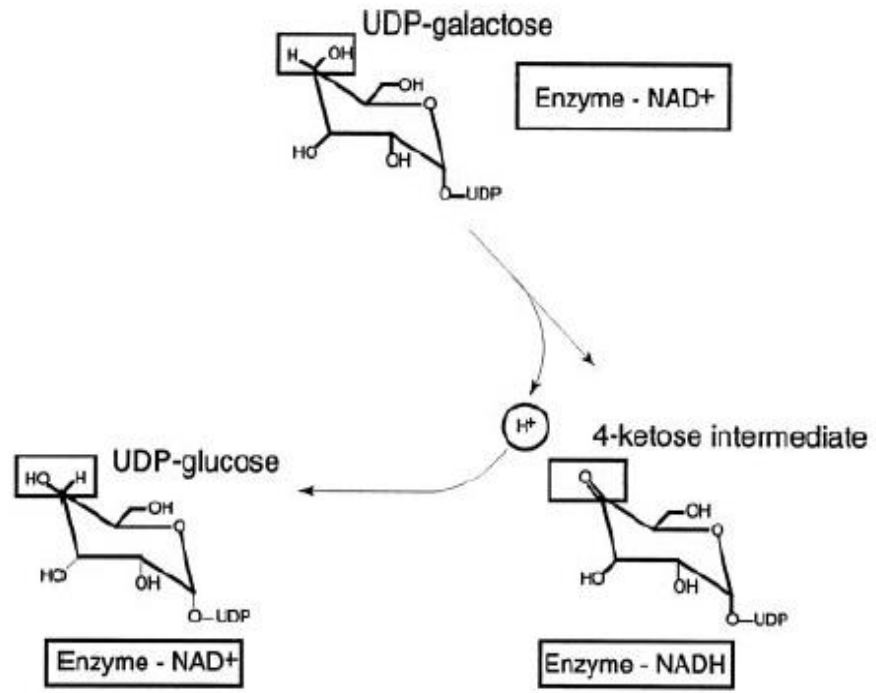
Leloir yolunun son basamağında UDP galaktozu UDP glukozu çeviren enzim olan UDP glukoz-4-epimeraz aynı zamanda UDP galaktoz-4-epimeraz veya GALE olarak da bilinmektedir. Bu enzim kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz protein ailesi üyesidir. Bu protein ailesinde çokça fonksiyonel farklılıklar gösteren enzimler bulunmakta ve düşük sekans kimliklerine rağmen spesifik motifleri saptanabilir, ortak katlanma bölgeleri belirlenebilmektedir. GALE ve bunun gibi enzimler tersinir olmayan şekilde NAD bağlam ya da üridin ile indüklenmiş NAD aktivitesi göstermesi gibi alışılmadık enzimatik, kimyasal, sterokimyasal özellikler gösterebilirler [44].

UDP glukoz-4-epimeraz homodimerlerinden oluşmuştur. Kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz protein ailesinin üyesi olan GalE bu ailenin karakteristik bazı özelliklerini taşımaktadır. Örneğin YxxxK ve GxxGxxG motifleri bu aile için imza özelliğinde olan dizilerdir. Bu gövde de kataliz için anahtar role sahip tirozin/lizin çifti içermektedir [45, 46, 47]. Rossmann katlanmasındaki tekrarlayan glisin motifleri nükleotid bağlayan enzimler için tipiktir. İlk iki glisin NAD⁺ bağlanmasına katılırken; üçüncü glisin ise beta sarmalın yakın heliks katlanmasını kolaylaştırmaya yardımcı olur [48]. UDP glukoz-4-epimeraz iki ana domaine sahiptir; N-terminal nükleotid bağlayan domaindir, daha küçük olan C-terminal substratın doğru pozisyonda bağlanmasından sorumlu domaindir ve altı tane β -sarmalı içermektedir. N-terminal domaini α -sarmalının iki yanında yer alan yedi paralel β -sarmalından oluşur ve bu katlanma da Rossmann katlanması şeklini vermektedir [49, 50].



Şekil 1.3: İnsan UDP Glukoz-4-Epimeraz enziminin üç boyutlu yapısı [38].

UDP glukoz ve UDP galaktozun substrat olarak kullanan UDP glukoz 4 epimeraz enzimin aktivite mekanizmasında substrat bağlanmasından sonraki ilk adım C-4'de bulunan iki adet hidrojenin NAD⁺ koenzimi ile ayrılması ve protonun serbest kalmasıdır. Bu indirgenme reaksiyonundan sonra UDP 4-keto-glukoz ara bileşiği meydana gelmektedir. Daha sonra oluşan bu ara bileşiğin NADH ile yükseltgenir ve C-4'de yer alan hidrojenler yer değiştirerek karbon atomuna bağlanır ve sonuç olarak UDP galaktoz meydana gelir [38].



Şekil 1.4: UDP glukoz-4-epimerazın çalışma mekanizması [46].

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Yapılan deneyler için Applichem, Sigma, Fermentas, Qiagen, Roche, NEB, Thermo Scientific gibi firmaların Türkiye dağıtıcıları tarafından temin edilen kimyasallar, kitler ve enzimler moleküler deneyler için uygun saflıktadır.

2.1.2 Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Sterilizasyonu ve Kullanıma Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan, deney tüpleri, cam malzemeler, sarf malzemeler, ısıya dayanıklı solüsyonların her biri 20 dakika, 1 atmosfer basınç ile 121°C'de, otoklavlanıp sterilliği sağlandı. Malzemelerin sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra 1 gece süreyle 80°C'de bekletildi ve kullanıma hazır hale getirildi.

2.1.3 Örneklerin Toplanması

Yapılan çalışmalarda kullanılan zeytin çeşitlerine ait örnekler Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonuna ait zeytinlikten toplandı. Örnekler toplanır toplanmaz sıvı azot dolu tanklara aktarıldı ve üniversitemiz laboratuvarlarına taşındı. Toplanan örneklerin tamamı, fen edebiyat fakültesinde bulunan -80 °C soğutma sağlayan dondurucularda çalışmalarda kullanılıncaya kadar saklandı.

2.1.4 Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri

Tris 54 g, Borik asit 27.5 g tartılarak 20 ml 0.5 M EDTA ve dH₂O ile 1 litreye tamamlanıp 5X TBE (pH:8.00) stok tamponu hazırlandı. Çalışmalarda kullanılan 0.5X TBE çözeltisi, 5X TBE stok tampondan 100ml alınıp üzeri dH₂O ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

2.1.5 Antibiyotikler

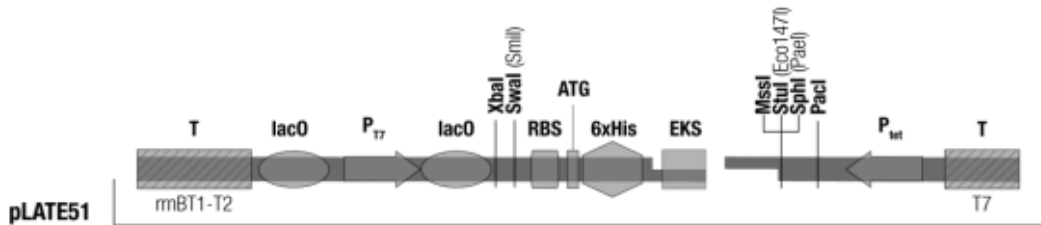
Ticari olarak toz halde temin edilen ampisilin antibiyotiği, 100 mg/mL'lik ara stok haline getirildi ve steril filtreler kullanılarak steril hale getirildi, -20 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edildi.

2.1.6 Kullanılan Bakteri Suşları

Yapılan çalışmalar kapsamında alt klonlamayı gerçekleştirmek için transformasyonda *E. coli* DH10B; tahmini UDP glukoz 4 epimeraz geni ekspresyonunda *E. coli* BL21 (DE3) suşları kullanıldı.

2.1.7 Çalışmada Kullanılan Vektör

Zeytin UDP glukoz 4 epimeraz geninin bakteriyel ekspresyon çalışmaları esnasında kullanılan aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas) kitine ait PLATE 51 vektörünün haritası Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1: pLATE51 ekspresyon vektörü aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas).

2.2 Metot

2.2.1 Biyoinformatik Analiz

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önce yapılan çalışmalar kapsamında oluşturulan cDNA kütüphanesinden (NCBI veri bankası kayıt numarası: XM_023019782.1) elde edilen ve tez çalışması için seçilen tahmini zeytin UDP glukoz 4 epimeraz gen dizisinin benzerlik gösterdiği canlılar NCBI BLAST veri bankasından (Basic Local Alignment Search Tool) nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) bulundu. cDNA dizisi üzerinden tez çalışmasında kullanılacak primerler Primer3 sitesi kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerler Tablo: 3.1'de gösterilmiştir. cDNA dizisi üzerinde BioEdit programından açık okuma çerçevesi (ORF) ve aminoasit dizisi belirlendi. Zeytin tahmini UDP glukoz 4 epimeraz geninin özellikleri (kodladığı aminoasit sayısı, moleküler ağırlığı) ExPASy sayfası aracılığıyla tespit edildi.

2.2.2 Zeytin gDNA İzolasyonu

Zeytinden genomik DNA izolasyonu için Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonundan temin edilen ve -80 °C'de saklanan yaprak örnekleri havanda sıvı azot kullanılarak parçalandı ve toz halindeki zeytin yaprakları ependorf tüplerinin yaklaşık 1/5'lik seviyesine gelecek şekilde hızlıca dolduruldu. Sıvı azot uzaklaştıktan sonra ekstraksiyon tamponundan 600 µL (Üre: 33.6 g, NaCl: 5 mL, Tris-HCl: 4 mL, EDTA: 3.2 mL, SDS: 8 mL) eklendi. Üzerine 25:24:1 oranındaki fenol-kloroform-izoamil alkolden 500 µL eklenip; yavaşça alt üst edildi. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile sekonder metabolitler çöktürüldü. Süpernatant pellete dokunmadan yeni ependorf tüpüne bırakıldı. Elde edilen süpernatant hacmiyle eşit ölçüde 3M sodyum asetat (pH 5.2) ve izopropanol eklenerek alt üst edildi. Karışım 1 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan pellet 500 µL TE (10 mM, pH 8) ile homojen hale getirildikten sonra üzerine 5 µL RNaz A eklenip 30 dakika 37 °C'de (RNA'nın uzaklaştırılması) inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi bitince 55 µL 3 M

sodyum asetat ve 1 mL etanol ilave edildi, -80 °C’de 10 dakika bekletildi. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek DNA’nın çöktürüldü. Ağzı açık olarak bekleyen tüpler etanolden uzaklaştırıldığında tüp dibindeki çökeltiye %70’lik etanol ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı ve 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA izolatlarından etanolün tamamen uçması için tüper 65 °C’de 2 saat bekletildi. Etanol kalıntısı kalmadığından emin olduğunda ise pellet dH₂O ile pipetaj yapılarak çözüldü ve - 20 °C’ de saklandı.

2.2.3 PZR Deneyleri

İntron tespiti ve polimorfizm çalışmaları için yapılan PZR deneylerinde; 12.5 µl Quick-Load® Taq 2X Master Mix (NEB, İngiltere), 2 µl Forward primer (10µM), 2 µl Reverse primer (10µM), 7.5 µl saf su ve kullanılan kalıp DNA'dan 1 µl kullanıldı. Genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PZR için; ön denatürasyon basamağı için 94°C 30 saniye, denatürasyon basamağı için 94°C 30 saniye, bağlanma basamağı için 51°C 45 saniye, uzama basamağı için 68°C 1 dakika, son uzama basamağı için de 68°C 5 dakika seçilerek PZR yapıldı. Çıkan sonuçlar %0.8’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi.

2.2.4 DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Zeytin bitkisinden izole edilen DNA'ların görüntülenmesi için %0.8’lik agaroz jel elektroforezi sistemi kullanıldı. Kullanılacak jelin hazırlığında 0.4 g agaroz, 50 mL 0.5X TBE tamponu içinde kaynatılarak kullanıldı. Soğutulduktan sonra hazırlanan karışıma çeker ocak altında 1 µL (0.5 µg / mL) etidyum bromür eklendi ve karışım jel tablasına dökülerek soğuyup katılaşmaya bırakıldı. Hazırlanan agaroz jel yükleme yapmaya hazır hale geldiğinde üzerini kaplayacak şekilde 0.5X TBE eklendi. Örnekler yükleme boyası ile pipetaj yapılarak karıştırılıp jele yüklendikten sonra 120 V - 45 dakika yürütüldü. UVP UV transillüminatörde gözlemlendi ve fotoğraflandı.

2.2.5 Toplam RNA İzolasyonu

Zeytin örneklerinden RNA izolasyonu Qiagen, RNeasyPlant Mini Kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. Daha önce toplanan ve -80°C 'de muhafaza edilen zeytin materyalleri önceden steril hale getirilmiş havanda sıvı azot kullanılarak toz hale getirildi. Elde edilen toz materyal 2 ml hacme sahip deney tüplerinin 1/5'lik kısmına kadar dolduruldu ve örneğin kurumamasına dikkat edilerek sıvı azot uçuruldu. Üzerine 450 μL RLT tamponu eklenip karışım tamamen homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Elde edilen karışım lila renkli (QIAshredderspincolumn) kolona aktarıldı ve 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatant alınarak temiz bir ependorfa aktarıldı. Alınan süpernatant hacminin yarısı kadar (yaklaşık 225 μL) etanol eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Yaklaşık 650 μL örnek pembe renkli kolona (RNeasyspincolumn) alındı ve 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon altındaki sıvı boşaltılıp, tüpe RW1 tamponundan 700 μL eklendi. 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edildi. Altta oluşan faz bir kez daha atılarak 500 μL RPE eklendi ve 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez tekrarlandı. Örnekte kalan etanolün tamamen temizlenmesi adına kolon boş olarak 30 saniye daha santrifüj edildi. Kolon temiz bir ependorf tüpe alındı ve 30 μL DEPC'li su eklenip 1 dakika 10000 rpm'de yeniden santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez yinelenildi ve sonuç olarak 60 μL 'lik RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş oldu.

2.2.6 RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi

İzole edilmiş RNA örneklerindeki genomik DNA kalıntılarının tamamen RNA'dan temizlenmesi için 60 μL hacmindeki izolatlara, 10 μL DNazI tamponu (10X), 30 μL DNazI enzimi (Fermentas) ile toplam hacim 100 μL 'ye tamamlanacak şekilde eklendi. Elde edilen karışım 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Qiagen Plant RNAeasy izolasyon kitindeki RLT tamponundan 350 μL örneğe eklendi ve 250 μL %96'lık etanol ile karıştırıldı. 700 μL 'lik örnek karışımı kit içinden çıkan pembe kolonlara aktarıldı, 8000 g'de 15 saniye süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolon, temiz toplama tüpüne geçirildi. Kolona 500 μL RPE tamponundan eklenip 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon 1,5 mL'lik ependorfa alındı ve üzerine RNaz içermeyen 50 μL saf su eklenip 8000g'de 1 dakika santrifüj edildi.

2.2.7 cDNA eldesi

İzole edilmiş RNA materyalleri cDNA elde etmek için kullanıldı. cDNA oluşturmak için Fermentas firmasının cDNA Synthesis Kit protokolü izlendi. Bu protokole göre: 5 µL RNA, 1 µL oligonükleotit bileşeni ve 6 µL steril su karıştırılıp 3 saniye santrifüj edildi. 5 dakika süreyle 70 °C'de inkübe edildi ve 4 µL (5X) tampon, 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL dNTP buz üzerinde ilave edildi. Tüpler 5 dakika 37°C'de bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda 1 µL Reverse Transkriptaz enzimi eklendi ve önce 60 dakika 42 °C'de sonra bu sürenin hemen ardından 70 °C'de 10 dakikalık inkübasyon süreci başlatıldı. Elde edilen cDNA numuneleri kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.8 Bakteri Besiyeri Hazırlanması

LB broth hazırlığında; 2.5 gram NaCl, 2.5 gram yeast agar, 5 gram Tripton kullanıldı. Bu bileşenler 500 mL saf su içinde çözüldü ve otoklavlandıktan sonra stereril şartlar altında kullanıldı.

LB agar'ın hazırlanmasında; 2.5 gram NaCl, 2.5 gram yeast ekstrakt, 5 gram Tripton 200 mL saf su içerisinde iyice homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve üzerine 3.75 gram agar eklenerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı ve besiyeri sıcaklığı yaklaşık 37 °C'ye düştüğünde antibiyotik ilave edilip, ateş başında steril ortam hazırlandıktan sonra petrilere döküldü. Hazırlanan petrilere hazır hale geldiğinde parafilm ile sıkıca kapatıldı ve alüminyum folyo ile iyice kaplanarak kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi.

2.2.9 Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması

E. coli DH10B, *E. coli* BL21 (DE3) bakteri suşlarından tek koloni elde edebilmek için suşlar antibiyotiksiz LB agar besiyerine ekildi. 1 gece boyunca 37 °C inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün tek koloni seçilip 10 mL sıvı LB'ye (antibiyotik içermeyen) inoküle edildi ve 37 °C ortamda 1 gece orta hızda çalkalanan etüvde bekletildi. Hazırlanan ön kültürden 5 mL alınarak 100 mL antibiyotik içermeyen LB

besiyerine inokülasyon yapıldı. 37 °C’de çalkalanan etüvde inkübe edildi ve absorbans değeri spektrofotometrede ölçülerek $OD_{600} = 0.4$ olana kadar inkübasyonuna devam edildi. İleri işlemlere bakteri ölümünü engellemek için buz üzerinde çalışıldı. 100 mL elde edilen bakteri kültürü 2 adet falkona eşit hacimde bölündü, 4 °C’de 3000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılıp 25 mL 0.1M $CaCl_2$ eklendi ve çözünmeye bırakıldı. Buz üzerinde 25 dakika beklendi ve yeniden santrifüj yapıldı. Süpernatant boşaltıldı. 10 mL 0,1 M $CaCl_2$ ile tekrar çözüldü. Yaklaşık 3 saat buzda bekletildi. Hazırlanan hücreler üzerlerine 10 mL %40’lık gliserol eklenerek önceden soğutulmuş ependorflara aktarılıp -80°C’de saklandı [51].

2.2.10 Jelden Kazanım

aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 içinde yer alan talimatlara göre tasarlanan primerler ve cDNA kullanılarak gerçekleştirilen PZR örnekleri toplam hacim neredeyse 20 µL olacak şekilde jel içindeki tek kuyuya yüklendi ve 200A, 140V ve 35 dakika jel yürütüldü. Süre sonunda UV ışık kullanılarak jelden bantlar kesildi ve 2 ml hacmindeki tüplere aktarıldı. Bu basamaktan sonra jelden geri kazanım için Fermentas GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Katlog No: K0691) protokolü takip edildi.

2.2.11 Klonlama

Klonlama için ThermoScientificaLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (N-terminal His-tag/EK) (K1251) kullanıldı. Alicator pLATE51 vektörünün ligasyon işlemi şu basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi; LIC tamponundan 2 µL, T4 DNA polimerazdan 1 µL, 1 µL saf su ve 6 µL pürifiye PZR materyali 3-5 saniye birleştirilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 0.6 µL EDTA (0.5 M), 1 µL pLATE51 vektörü bırakıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Klonlama işlemi bu şekilde tamamlandı.

2.2.12 Çoğaltma Suşuna Transformasyon

E. coli DH10B ođaltma suşu olarak kullanılan bakteri kompetant hücreleri buz üzerine alındı ve üzerine 3 µL klonlama ürünü yavaşça eklenerek 30 dakika buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 90 saniye 42 °C’de bekletildi ve yine hemen ardından buzda 5 dakika bekletildi. 50 ml hacmindeki falkon tüpe 450 µL antibiyotiksiz LB Broth besiyeri eklendi ve 37 °C’de 1.5 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyonu yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve yaklaşık 400 µL süpernatant boşaltılıp, kalan süpernatant ile pellet pipet yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen karışım LB agar (+amp) içeren petriye ekilip, 1 gece 37°C’de inkübe edildi.

2.2.13 Rekombinant kolonilerin belirlenmesi

Elde edilen bakterilerden hedef vektörü taşıyan rekombinant koloniler PZR yöntemiyle belirlendi. Kolonilerin tespit edilmesi için kullanılan PZR reaksiyonunda; 12.5 µL master mix (OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mixwith Standard Buffer), konsantrasyonu 10 µM olan Forward ve Reverse primerlerinden 1'er µL ve 1 µL sulandırılmış koloni (rekombinant olduğu düşünölen kolonilerin steril öze ile alınıp 10 µL saf suda özölmesiyle elde edildi) ve toplam hacmi 25 µL'ye tamamlamak için 9.5 µL saf su kullanıldı. PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde (%0.8) yürütöldü.

2.2.14 Plazmit DNA İzolasyonu

1 gece 37 °C’de LB agar (+ amp) ortamında büyütölen koloniler LB broth (+ amp) besiyerine inoköle edildi ve költür 37 °C’de, 200 rpm’de 1 gece büyütöldü. Plazmit izolasyonu Gene Jet™ plazmid Miniprep (Fermentas) protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Költür ependorf tüplerine aktarıldı ve 5 dakika süreyle 13000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplere 250 µL resüspanسیون solüsyonu eklenip tüm ependorf tüpleri tek bir tüpte birleştirilip çözöldükten sonra üzerine lizis solüsyonundan 250 µL eklendi. Alt üst edilen karışıma, nötralizasyon solüsyonundan 350 µL eklendi ve hemen alt üst edildi ve bulutsu göröntü

yakalandıktan sonra santrifüj yapıldı. Kolona aktarılan süpernatant, 1 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolona yıkama solüsyonundan 500 µL eklendi ve 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı. 50 µL saf su kullanılarak elüsyonlar elde edildi ve kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.15 Ekspresyon Suşuna Transformasyon ve Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi

Ekspresyon çalışmaları kapsamında hedef genimizin klonlandığı vektör, ekspresyon suşuna (*E. coli* BL21) transforme edildi. Hedef geni taşıyan vektörleri içeren *E. coli* suşu 100 µg /mL ampisilin içeren LB sıvı besi yerine ekildi ve 16 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda son hacim 100 mL olacak şekilde ön kültürden 10 mL; 12,5 µg/mL amp içeren 90 mL LB besiyerine inoküle edildi. Oluşturulan bakteri kültürünün OD₆₀₀ değeri 0,8'e ulaşıncaya dek 37 °C'de 220 rpm hızla çalkalanan etüvde bekletildi. Hücre yoğunluğu hedef değere ulaştığında, IPTG (1mM) ile protein ekspresyonu indüklendi ve kültür 30 °C'de bir gece boyunca 250 rpm'de çalkalamada inkübasyona bırakıldı.

2.2.16 Hücrelerin Yıkınması

IPTG ile protein ekspresyonunun sağlandığı bakteri kültürü +4 °C'de 20 dakika 3000 rpm'de santrifüj ile çöktürüldü. Çöken hücre pelleti üzerine yıkama tamponu (50 mM Tris-HCl) eklenerek 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Hücreler kullanılabildiği kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.17 Hücrelerin Parçalanması

Çöktürülmüş hücreler buz üzerine alınıp; tüplere 10 mL soğuk liziz tamponu (Trisbase: 20 mM, EDTA: 0.5mM, EGTA: 0.5 mM) eklendikten sonra, vorteks kullanılarak pelletin tamamı çözdürülerek homojen hale getirildi. Üzerine 1 mM konsantrasyonunda hazırlanmış 100 µl PMSF (fenilmetilsülfonilflorid) eklendi ve

çalkalandı. 10 mg/mL lizozimden 125 µL eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra kültür 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 mg/mL yoğunluğundaki protamin sülfattan 1 mL eklendi ve tüpler alt üst edildi. +4 C'de 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj sonucu oluşan süpernatant temiz tüplere alındı. Pellet ise 300 µL suda çözdürüldü.

2.2.18 SDS PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan ayırma ve yığma jellerinin yapımında Laemmli tarafından geliştirilen metot kullanılmış ve bu metota göre kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanışları ve hazırlık boyunca izlenen süreç aşağıda belirtildiği gibi takip edildi.

%10'luk ayırma jeli hazırlamak için %10 son konsantrasyon olacak şekilde; %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımından 3.3 mL, %15'lik alt jeli için ise %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımından 5 mL, son yoğunluk 357 mM olacak şekilde pH 8.8 olan Tris'ten 1.5 M, son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %10 SDS ve %10 APS, son konsantrasyonu %0.4 olacak şekilde %99 TEMED 20 mL toplam hacimde saf su ile tamamlandı.

%5'lik üst jel için; son yoğunluk yaklaşık %5 olacak şekilde %30 Akrilamid / BisAkrilamid karışımından 1.65 mL, 1.5 M Tris (pH 6.8), %10 SDS ve %10 APS, son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %99 TEMED eklenip 20 mL toplam hacim için saf su ile tamamlandı.

SDS-PAGE yürütme tamponu; 50 mM son konsantrasyon olacak şekilde 1 M Tris ve %0.1 son konsantrasyon olacak şekilde %10'luk SDS ile hazırlandı.

SDS-PAGE yürütme tamponun; son konsantrasyon 50 mM olacak şekilde 1 M Tris, %0.1 son konsantrasyon olacak şekilde %10'luk SDS, 2 mM son konsantrasyon olacak şekilde 0.5 M EDTA (pH 8.0), %1 son konsantrasyon olacak şekilde %99 β-merkptoethanol, %10 son konsantrasyon olacak şekilde %100 Gliserol ve %20 son konsantrasyon olacak şekilde %99 Bromfenol mavisi kullanılarak hazırlandı ve +4 °C' de saklandı.

SDS-PAGE boyama solüsyonu; 0.25 g Coomassie Brilliant Blue, 100 mL %95 Etanol ve %10 Asetik asit karıştırılarak hazırlanıp ve +4°C' de saklandı.

SDS-PAGE arıtma çözeltisinin hazırlanması; %5 son konsantrasyon olacak şekilde %99 Asetik asit ve %50 son konsantrasyon olacak şekilde %99 etanol karıştırılıp hazırlandı ve +4 °C' de saklandı.

İlk olarak %15'lik ayırma jeli hazırlanırken bütün çözeltiler APS hariç eklenip karıştırıldı. Jelin polimerizasyonu APS ile sağlandığı için en son eklenir. APS eklenip, jel karışımı kaset çizgisinin hizasına kadar döküldü. Jel yüzeyine izopropanol eklenerek yüzeyin düz olarak şekil alması sağlandı. Jel katılaştığında yüzeydeki izopropanol dökülerek saf su ile yıkandı ve kurutma kağıdı yardımıyla kalıntılar uzaklaştırıldı. Diğer taraftan hazırlanan %5'lik yığıma jeli APS'nin eklenmesiyle hazır halde bulunan ayırma jelinin üzerine dökülüp, kuyuların oluşması için tarak yerleştirilerek polimerizasyona bırakıldı. Jel hazır hale geldiğinde tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirilip tankın içi belli bir seviyeye kadar tampon ile dolduruldu. Örnekler numune tamponu ile bire bir (1/1) oranda karıştırıldı ve 2 dakika 95 °C'de denatüre edildi. Denatürasyonun ardından protein örnekleri kuyulara yüklendi ve elektrik akımı yığıma jeli için 80 voltaja ve ayırma jeli için 150 voltaja ayarlandı. Jel üzerinde mavi renkte görünen protein örnekleri jelin bitimine yaklaşık 1 cm kalaya kadar yürütme işlemine devam edildi. Bu mesafeden sonra elektririk akımı kesildi ve elektroforez düzeneği açılarak ve cam plakalar birbirinden ayrıldı. Kuyuların da bulunduğu yığıma jeli uzaklaştırıldı. Jel, boyama çözeltisinde protein bantlar belirgin olana kadar bekletildi. Ardından jeldeki fazla boyanın temizlenmesi için jel, içinde saf su bulunan bir kaba konularak mikrodalga fırında kısa aralıklarla kaynatılıp bu işlem kap içerisindeki suyun rengi değişmeyinceye kadar tekrarlanıp fazla boyanın jelden uzaklaşması sağlandı. Protein bantları ve marker UV ışığı altında incelendi.

2.2.19 Western Blot Basamağı

Western Blot analizinde proteinlerin elektroforetik transferi Trans-Blot Turbo Transfer sistemi ile gerçekleştirildi. Bu sistemde jellerin yürütme işlemi tamamlanınca, kullanılacak transfer tamponu (Trans-Blot Turbo 5X Transfer Buffer)

istenilen şekilde (200 mL 5X transfer tamponu, 600 mL saf su ve 200 mL etanol ile bir litreye tamamlandı) hazırlandı. Nitroselluloz membranlar (Trans-Blot Turbo Mini-size Nitrocellulose), kurutma kağıtları ve jeller hazırlanan transfer tamponunda iyice ıslanana kadar bekletildi. Kullanılan Trans-Blot Turbo transfer cihazı kasetleri çıkarılarak transfer tamponu ile rulo yardımıyla ıslatıldı. Kasetin alt kısmı (anot elektrot) üzerine kurutma kağıtları, membran, jel ve kurutma kağıtları şeklinde yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmasın diye rulo yardımıyla düzleştirildi. En üst kısım (katot elektrot) kapatılarak kilitlendi ve cihaza yerleştirildi. Transfer için 25 voltaj akımla 7 dakika protokolu seçilerek transfer gerçekleştirildi.

2.2.20 Protein Saflaştırma Basamağı

SDS-PAGE jeline yüklenerek görüntülenen proteinin saflaştırılmasında ekspresyon vektörü tarafından hedef proteine eklenen N terminal His-tag sayesinde, Ni-NTA (Qiagen) kolon saflaştırma protokolü ile çekime dayalı saflaştırma protokolü izlendi. Saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler:

Liziz çözeltisi: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM imidazol (pH: 8)

Yıkama çözeltisi: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol (pH: 8)

Elüsyon çözeltisi: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazol (pH: 8)

2.2.21 Ni-NTA Kolonu için Liziz Basamağı

Ön kültürden inokülasyon ile elde edilen ve bir gece büyütülen 200 mL'lik örnek kültür daha önce de uygulanan yıkama tamponu ile yıkandı. Son basamakta çöktürülen örnek miktarı tartılarak 1 g karşılığında 2 – 5 mL'ye denk gelecek şekilde yaklaşık 3 mL liziz tamponu ilave edildi. Lizozimden 1 mg/mL eklenerek 30 dakika buzda bekletildikten sonra 200 – 300 W'de 10 saniye sonikatör kullanılarak parçalama işlemine devam edildi. Daha sonra DNaz I (5µg / mL) ve RNaz A (10µg /

mL) eklenerek 15 dakika süreyle buzda bekletildi. 10000 g'de 30 dakika santrifüj ile çöktürme yapıldı. Süpernatant ham ekstrakt olarak alındı ve +4°C'de saklandı.

2.2.22 Ni-NTA Kolonu ile Saflaştırma Basamağı

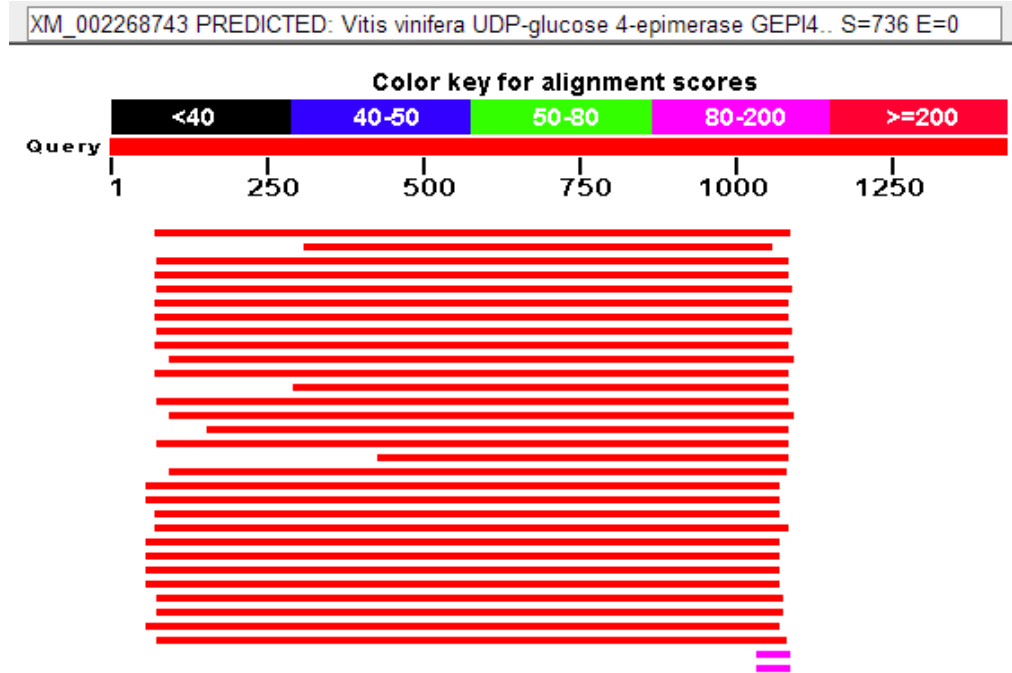
2 ml lizat üzerine 50 Ni-NTA agarozu eklendi ve +4°C'de 200 rpm çalkalama hızında 75 dk bekletildi. Elde edilen örnek Ni-NTA kolonuna aktarıldı. Filtreden geçen kısım süzüntü olarak etiketlendi, ardından kolondan 2 ml yıkama tamponu geçirildi ve bu işlem 2 kez tekrarlandı. Her tekrarda filtre altında kalan kısım etiketlenerek ayrıldı. 4 kez 250 µL elüsyon çözeltisi filtreden geçirilerek örnekleme yapıldı. Ham ekstrakt dahil tüm süzüntüler SDS jel elektroforezinde yürütüldü.

3. BULGULAR

Çalışılan bu tezde zeytin UDP Glukoz 4 Epimeraz geni karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda yer almaktadır.

3.1 UDP Glukoz 4 Epimeraz Geninin Biyoinformatik Analizi

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önce yapılan çalışmalar kapsamında oluşturulan cDNA kütüphanesinden elde edilen tahmini zeytin UDP glukoz 4 epimeraz gen dizisinin benzerlik gösterdiği canlılar NCBI BLAST'tan (Basic Local Alignment Search Tool) nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla bulundu. cDNA dizisi üzerinden tez çalışmasında kullanılacak primerler Primer3 sitesi kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerler Tablo: 3.1'de gösterilmiştir. cDNA dizisi üzerinde BioEdit programının Sorted Six - Frame Translation sekmesiyle açık okuma çerçevesi (ORF) ve aminoasit dizisi belirlendi.



Şekil 3.1: Zeytin tahmini UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin cDNA dizisinin Blastn görüntüsü.

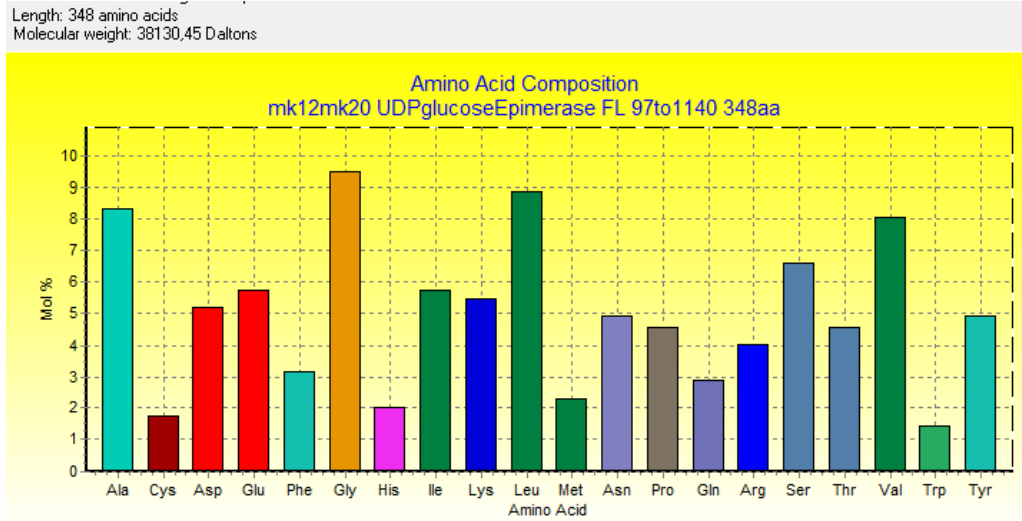
UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 5 isoform 1 [Theobroma cacao]

Sequence ID: [ref|XP_007040543.1](#) Length: 348 Number of Matches: 1

► See 1 more title(s)

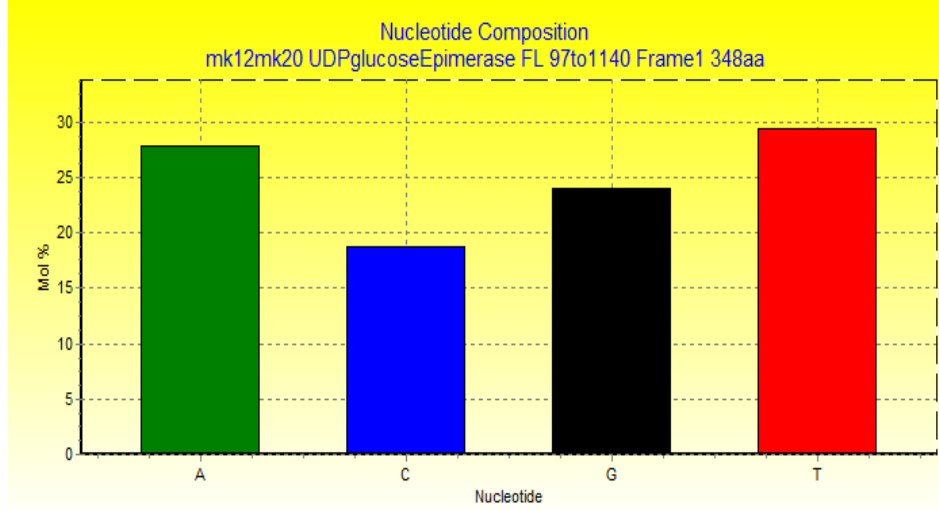
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
655 bits(1691)	0.0	Compositional matrix adjust.	309/348(89%)	331/348(95%)	0/348(0%)	+3
Query 63	MSG SILVTGGAGYIGSHIVLQ LLLGGYKAVVVDNLDNSSDIAIRRVQELAGEYGANLTFH					242
Sbjct 1	MS +ILVTGGAGYIGSHIVLQ LLLGGY+ VVDNLDNSS++AI+RV+ELAGE+G NL+F					60
Query 243	QMDLRDKPTLEKLFASQKFD AVIHFAGLKAVGESVQKPLLYNNLIGTIVLLEVMAAHG					422
Sbjct 61	QMDLRD+P LEKLF A KFD AVIHFAGLKAVGESVQKPLLY+NNLIGTI LLE+MAAHG					120
Query 423	CKKLVFSSSATVYGWPKVPCTEEFPTCAMNPYGRITKLFIEEICRDIYNSDSEWKIILLR					602
Sbjct 121	CK LVFSSSATVYGWPK VPCTEEF A+NPYGRITKLFIEE+CRDI +SDSEWKIILLR					180
Query 603	YFNPVGAHPGSGYIGEDPRGIPNNLMPFVQVAVGRRPALIVFGSDYATQDGTGVRDYIHV					782
Sbjct 181	YFNPVGAHPGSG+IGEDPRGIPNNLMPFVQVAVGRRPALIVFG+DY+T+DGTGVRDYIHV					240
Query 783	VDLADGHIAALSKLSDPSIGCEIYNLGTGKGT SVLEMVAAFEKASGKKIPLVMAGRRPGD					962
Sbjct 241	VDLADGHIAAL KLSDP+IGCE+YNLGTGKGT SVLEMVAAFEKASGKKIPLVMAGRRPGD					300
Query 963	AEVYVASTEKAERELNWN AKYGIEMCRDQWNWASKNPYGYESQLSTN			1106		
Sbjct 301	AE+VYASTEKAERELNW AKYGI+EMCRDQWNWASKNPYGYES STN			348		

Şekil 3.2: Zeytin tahmini UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisinin Blastx görüntüsü.



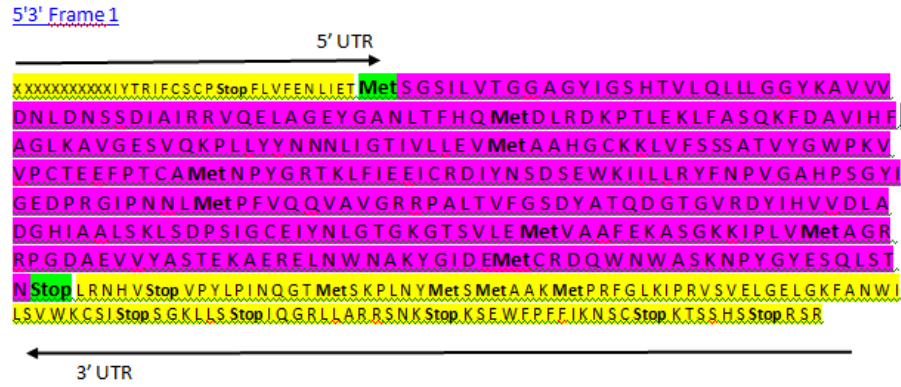
Şekil 3.3: BioEdit programıyla elde edilen UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin aminoasit kompozisyonu.

Şekil 3.3'te yer alan UDP Glukoz 4 Epimeraz nükleotit dizisinden elde edilen aminoasit kompozisyonu içeriğine göre apolar aminoasitlerce (Alanin, Glisin, Lösin, Valin) zengin; polar aminoasitlerce (Histidin, Sistein) fakirdir.



Şekil 3.4: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin nükleotit kompozisyonu.

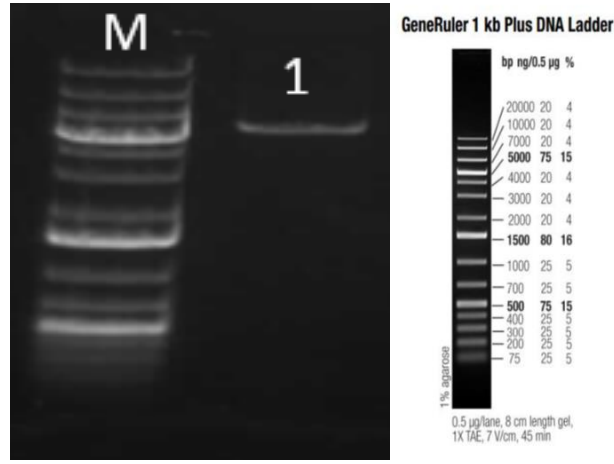
BioEdit program kullanılarak oluşturulan nükleotit kompozisyonuna göre Adenin (A) – Timin (T) oranı Sitozin (C)- Guanin (G) oranından fazladır.



Şekil 3.5: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin açık okuma çerçevesi.

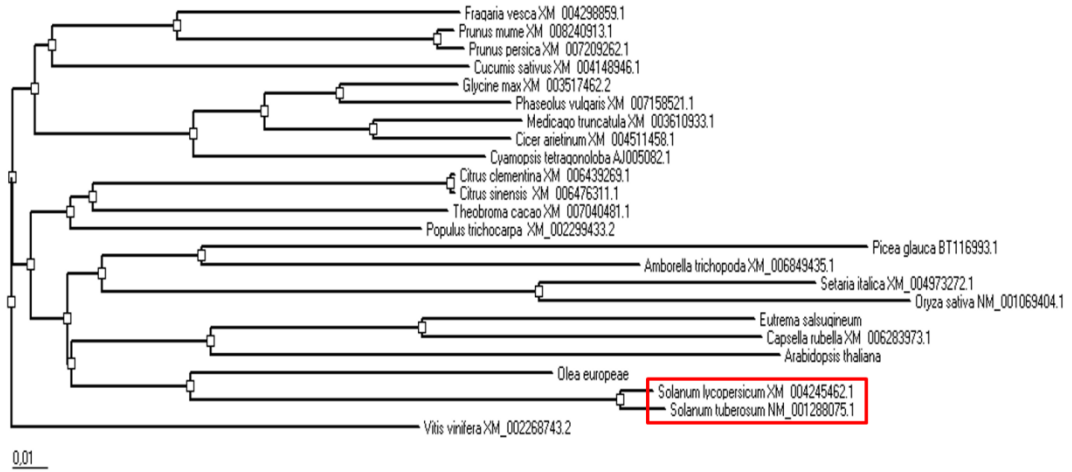
UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin BioEdit programı kullanılarak moleküler ağırlığı 38 kDA olarak tespit edilmiş olup; 348 aminoasit kodladığı görülmüştür.

3.2 İtron ve Polimorfizm Çalışması

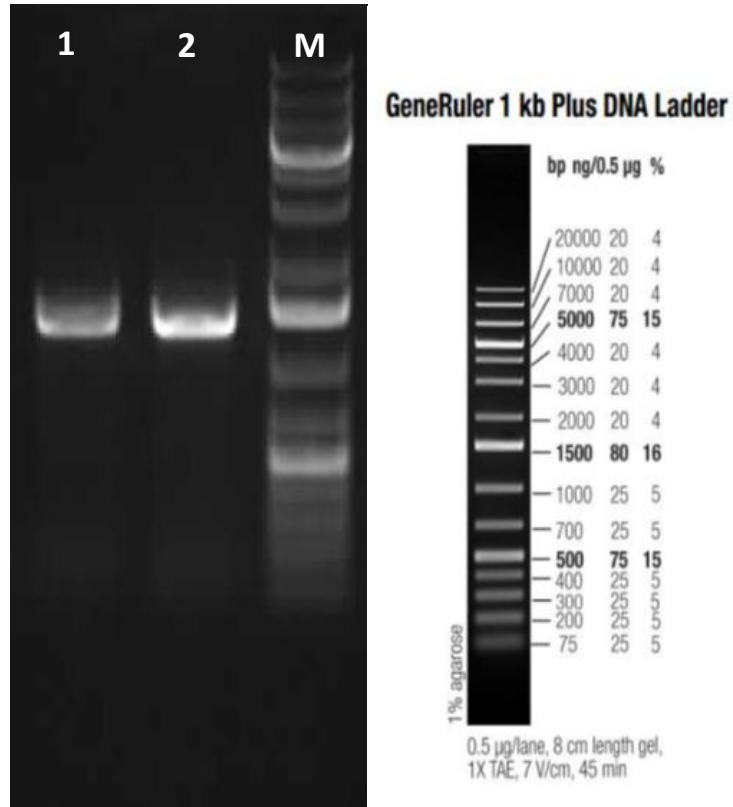


Şekil 3.6: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin intron çalışması: M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1:İtron-f-1, İtron-r-1 gDNA PZR sonucunun agaroz jel görüntüsü.

İtron tespiti için yapılan çalışmalarda Tablo 3.1’de kullanılan primerlerle yapılan PZR deneyleri sonucunda yaklaşık 1430 nükleotitlik cDNA’ya sahip UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin nerdeyse 4500 nükleotitlik intron bölgesi içerdiği görülmüştür (Şekil 3.6). İtron bölgesi fazla sayıda nükleotit içerdiğinden sağlıklı dizilim elde edilememiştir. Genomik DNA büyük intron bölgesine sahip olduğu için polimorfizm çalışmalarında 500 nükleotitlik ekzon, 1000 nükleotitlik intron bölgesi içeren kısım için yeniden primer dizayn edildi ve yaklaşık 1500 nükleotit içeren DNA üzerinden gen bankasında yer alan diğer bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz geni ile polimorfizm çalışmaları yapıldı. Elde edilen PZR ürünlerine ait dizilemeler Ligand Biyoteknoloji LTD. ŞTİ. (İzmir, Türkiye) adlı ticari kuruluşa yaptırıldı. Bu çalışma sonucuna dizi en çok patates ve domates bitkisindeki UDP Glukoz 4 Epimeraz bölgesi ile benzer bulundu.



Şekil 3.7: Farklı bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz genine ait polimorfizmi belirlemek amacıyla hazırlanan NJ ağacı. NCBI kayıt numaraları türlerin yanında belirtilmiştir.



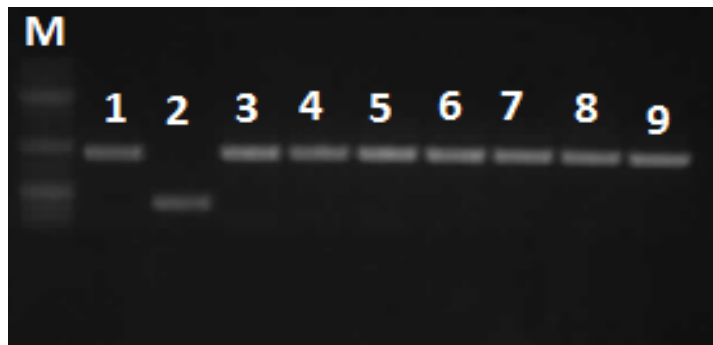
Şekil 3.8: Polimorfizm çalışması için yapılan PZR çalışmasının jel elektroforezi görüntüsü 1,2: Polimorfizm primerleri ile yapılan PZR bantları, M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Tablo 3.1: Kullanılan primer dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi	Kullanım Amacı
<u>UDP F-1:</u>	TTTCCTACATGTGCTATGAATCCTT	Polimorfizm
<u>UDP R-1:</u>	CACATCTCATCAATGCCATATTTAG	Polimorfizm
<u>UDP İtron-f-1:</u>	GTTTCTTGTGTTTCGAGAATTTGATT	İtron
<u>UDP İtron-r-1:</u>	TTGGTTAATTGGTAGATAAGGGACTT	İtron
UDPEF	GGTGATGATGATGACAAGATGTCCGGGCA GTATACTGGTGACTGGG	Ekspresyon
UDPER	GGAGATGGGAAGTCATTATTAATTGGTA GACAATTGAGACTCGTA	Ekspresyon

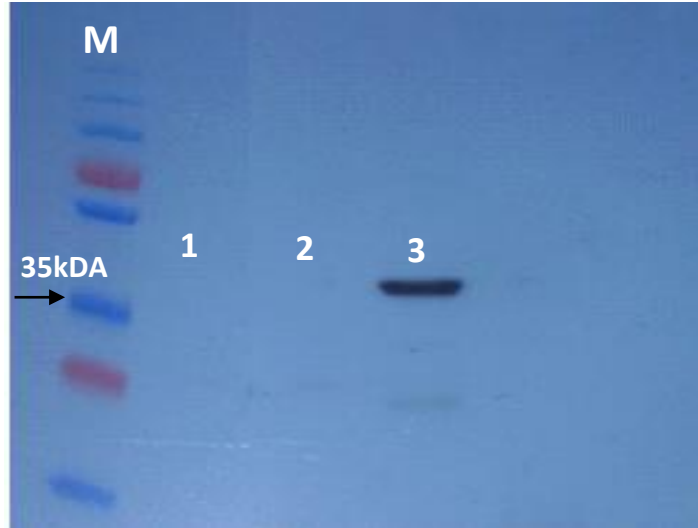
3.3 Protein Ekstraksiyonu Çalışmaları

UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin ekspresyonu için pLATE51 vektörü kullanıldı. Klonlama için kullanılan primerler Tablo 3-1’de gösterilmiştir. DH10B suşuna transformasyon yaptıktan sonra üreyen kolonilerden 9 adet seçildi ve koloni PZR yapıldı ve vektörü taşıdığı tespit edilen 3,4 ve 5 numaralı koloni plazmit izolasyonu için seçildi (Şekil:14). Koloni PCR için aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (Thermo Scientific, Katalog No: K1251) primerleri kullanılmıştır.



Şekil 3.9: UDP Glukoz 4 Epimeraz’ın DH10B suşunda koloni PCR jel görüntüsü M: Marker, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) 1-9: Seçilen koloniler ile yapılan koloni PZR bantları.

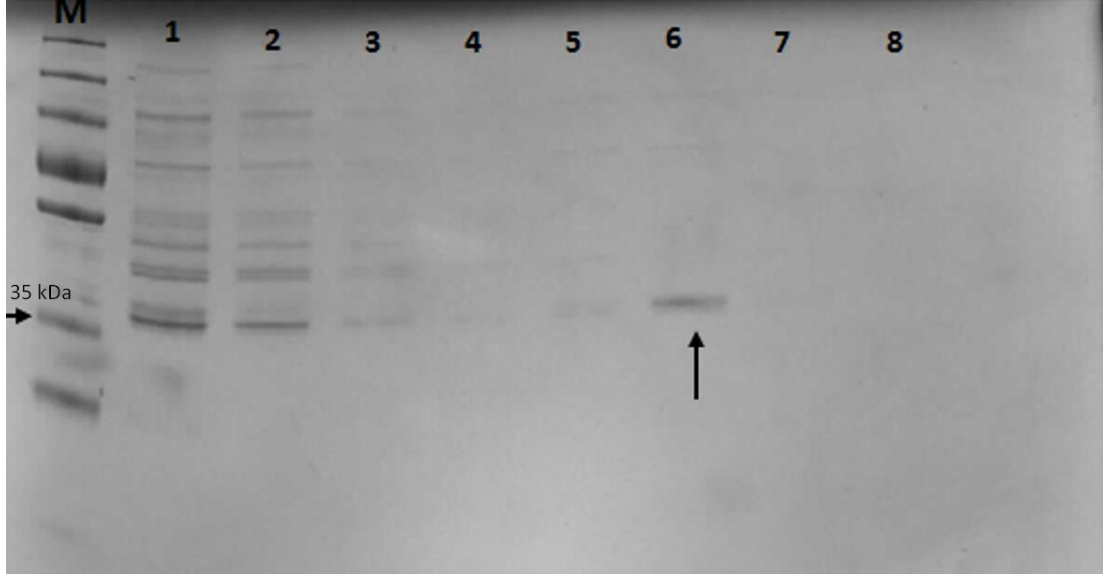
Plazmit taşıyan kolonilerden elde edilen plazmit BL21 suşuna transforme edildi. IPTG ile indüklenen kültür çöktürülüp ardından elde edilen süpernatant ve pellet örneklerinden Western Blot çalışması yapıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin Western Blot görüntüsü. M; Marker (fermantas, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, 26619), 1; negatif kontrol, 2; pellet, 3; süpernatant.

Süpernatant ve pellet örneklerinin gözleendiği Western Blot çalışmasında çalışılan proteinin süpernatant kısmında gözlenmesiyle proteinin soluble olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan informatik çalışmalarla da doğru orantılı olarak proteinin 38 kDa büyüklüğüne tekabül ettiği görülmüştür.

Western Blot ile gözlenen protein Qiagen native saflaştırma protokolü kullanılarak saflaştırıldı ve elde edilen süzüntüler SDS Page jel elektroforezine yüklenerek gözleendi.



Şekil 3.11: Qiagen Native Saflaştırma protokolüne göre UDP Glukoz 4 Epimeraz'ın SDS-PAGE görüntüsü: 1: Ham ekstrakt, 2: Flowthrough, 3: Wash-1, 4: Wash-2, 5: Elusyon-1, 6: Elution-2, 7: Elution-3, 8: Elution-4.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde daha önce yapılan çalışmalar sonucu oluşturulan zeytine cDNA kütüphanesinden yüksek lisans tezi için seçilen tahmini cDNA dizisinin farklı bitkilerdeki UDP Glukoz 4 Epimeraz geni (NCBI Erişim numarası: XM_023019782.1) ile benzeştiği yapılan biyoinformatik analizler sonucu saptanmıştır. gDNA dizisi için yapılan analizlerde dizi en çok *Vitis vinifera* bitkisine benzemektedir. Protein dizisi olarak karşılaştırma yapıldığında ise en çok *Theobroma cacao* bitkisiyle benzerlik görüldü.

UDP Glukoz 4 Epimeraz nükleotit dizisinden yapılan biyoinformatik çalışmalarda dizinin aminoasit kompozisyonunda Glisin, Lösin, Alanin ve Valin diğer aminoasitlerden daha fazla olduğu için apolar (hidrofobik) olduğu görüldü. Dehidrogenaz-redüktaz ailesi proteini olan UDP Glukoz 4 Epimerazın literatürde de Glisin içeriğinin fazla olmasına yer verilmiştir [48]. Nükleotit içeriğine bakıldığında ise Adenin ve Timin bakımından zengin olduğu tespit edildi.

UDP Glukoz 4 Epimeraz geni; NAD⁺ koenzimi ile UDP Glukozu UDP Galaktoza tersinir olarak çevirdiği daha önce farklı bitki ve bakteri ile yapılan çalışmalarla karakterize edilmiştir [53- 55].

cDNA dizisi üzerinden yapılan biyoinformatik analizlere göre zeytin UDP Glukoz 4 Epimeraz genin 348 aminoasit kodladığı ve moleküler ağırlığının 38 kDA olduğu görüldü. SDS Page yöntemi ile rekombinant zeytin UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin yaklaşık 38 kDA büyüklüğünde olduğu görüldü. Daha önce bezelye bitkisinde yapılan çalışmalarda ise UDP glukoz 4 epimeraz geni 38 kDA büyüklüğünde ve 350 aminoasit sentezlediği [56], *Bradyrhizobium japonicum* galE geninin ise 337 aminoasit içerdiği ve protein büyüklüğünün 36067 DA (36,067 kDA) olduğu görülmüştür [57].

Pyrococcus horikoshii organizmasından izole edilen galE proteini Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile incelendiğinde 70 kDa olarak, SDS Page jeli ile tek bant halinde görüldüğünde de 35 kDA olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda galE geninin doğal ortamda homodimerik olarak bulunduğu ve bu

nedenle 70 kDA olarak görüldüğü tespit edilmiştir [58]. Ayrıca *E. coli*, maya ve insan galE genin homodimer halde bulunduğu ve benzer molekül ağırlığında olduğu; *Aeromonas Hydrophila* bakterisinde monomer halde ve 38 kDA büyüklüğünde olduğu gözlenmiştir [59-61].

Polimorfizm ve intron içeriğini tespit etmek için yapılan analizlerde zeytinden elde edilen genomik DNA'nın intron analizlerinde kullanılmak üzere tasarlanan primerleri ile yapılan PZR çalışmalarında ilk denemelerde sonuç elde edilemedi. Daha sonra bağlanma sıcaklığı, döngü sayısı eklenmesi gibi yapılan değişiklikler sonucu genomik DNA çoğaltılabilinip; 1430 nükleotitlik cDNA'ya sahip UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin nerdeyse 4500 nükleotitlik intron bölgesi içerdiği görüldü. Bu sonuç elde edildikten sonra daha kısıtlı bir bölgeyi içerdiği düşünülen primerler dizayn edildi ve yeniden PZR çalışmaları yapıldı. Ancak elde edilen dizilerden sağlıklı sonuç alınamadı. Polimorfizm çalışmaları ise UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisi ve Gen Bankasında yer alan diğer bitkilere ait UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizileri karşılaştırılarak yapıldı. Ortaya çıkan polimorfik ağaçta ise zeytin UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisinin en çok *Solanum lycopersicum* ve *Solanum tuberosum* bitkilerindeki UDP Glukoz 4 Epimeraz ile benzeştiği görüldü.

UDP Glukoz 4 Epimeraz cDNA dizisinin pLATE51 vektörüne ligasyonu ile başlayan protein çalışmalarında ise vektör, ilgili bakteri suşuna (DH10B ve BL21) transforme edildi. Gen ekspresyonu IPTG ile indüklenerek başlatıldı ve elde edilen pellet ve süpernatantlardan elde edilen izolatlar Western Blot tekniği kullanılarak işaretlendi. Buna göre süpernatant kuyusunda gözlenen protein bize saflaştırmada izlenecek protokol ile ilgili yol gösterdi ve aynı zamanda literatürde geçtiği üzere Gale'nin sitoplazmik bir protein olduğu desteklendi. Ni-NTA Native afiniteye dayalı saflaştırma protokolu kullanılarak izole edilen protein, SDS-Page ile gözlemlendi. Bu aşamada kolondan geçirilen bütün süzüntüler jele yüklenerek izole edilen proteinin kaçırılmasının önüne geçildi. Sonuç olarak izole hedef protein ikinci elüsyonda gözlemlendi.

Bakteri UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin UDP glukozu UDP galaktoza çevirmesinin ve bu substratların bir ekzopolisakkarit olan biyofilm tabaka oluşturduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [62]. *Thermus thermophilus* ve *Thermus aquaticus* gibi termofil bakteriler ile yapılan çalışmada UDP Gukoz 4

Epimeraz geninin ekspresyonundaki artışın biyofilm oluşumunu da doğru orantılı olarak arttırdığı görülmüştür [63]. Çalışmamızda ayrıca zeytin rekombinant UDP Glukoz 4 epimeraz geninin biyofilm aktivitesini değerlendirmek için cam tüp ve 96'lık kuyularda aktivite denemeleri de yapılmıştır. Rekombinant UDP Glukoz 4 Epimeraz proteini üreten bakteri kültürlerinin uygun ortamlarda inkübasyonu, kristal viyole ile boyanmaları ve absorbans değerlerindeki değişimler ölçülmüştür [63,64]. Ancak bu deneysel basamakta elde ettiğimiz veriler anlamlı ve tekrar edilebilir olmamıştır. Farklı optimizasyon çalışmaları ile desteklenerek yeniden deneylerin tekrar edilmesi gerektiğinden bu çalışmalar teze dahil edilmemiştir.

Zeytinde UDP Glukoz 4 Epimerazın varlığının tespiti için yapılan biyoinformatik analizlerin sonuçları yapılan deneysel çalışmalar ile desteklenmiştir. Aynı zamanda literatür araştırmasında da diğer bitki, bakteri gibi canlılarda da daha önce karakterizasyonu yapılmış UDP Glukoz 4 Epimeraz sonuçları ile örtüşmüştür. Bu tez çalışması ile daha önce zeytinde karakterizasyonu yapılmamış UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin varlığı ispat edilmiştir.

Daha önce çeşitli bitki, bakteri ve insanlarda biyokimyasal aktivitesi çalışılmış UDP Glukoz 4 Epimeraz geninin hem glikolipid, glikoprotein gibi duvar proteinlerinin oluşumunda görev aldığı [64] ile ilgili hem de UDP Galaktozu UDP Glukoza çevirmesi [54] ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Yüksek lisans tezinde moleküler varlığı tespit edilmiş UDP Glukoz 4 Epimerazın daha sonraki çalışmalarda biyokimyasal aktivite analizleri yapılarak gen, aktivite anlamında da karakterize edilip literatüre katkı sağlanabilir. Aynı zamanda zeytindeki periyoside ve hedef gen arasındaki ilişkinin varsa tespit edilmesi için belli periyotlarda elde edilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Real Time-PZR ile ekspresyon miktarındaki değişimler değerlendirilebilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Zohary, D., Hopf, M. and Weiss, E., *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*, Oxford University Press on Demand, (2012).
- [2] Obied, H. K., Prenzler, P. D., Omar, S. H., Ismael, R., Servili, M., Esposito, S., et al., "Pharmacology of olive biophenols", *Advances in molecular toxicology*, (6), 195-242, (2012).
- [3] Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., et al., "The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), (2013).
- [4] Duran, M., "Zeytin/Zeytinyağı Sektör Raporu", *Dış Ticaret Uygulama Servisi*, (2006).
- [5] Temuçin, E., "Türkiye'de zeytin yetişen alanların sıcaklık değişkenlerine göre incelenmesi", *Ege Coğrafya Dergisi*, 7, 117-131, (1993).
- [6] Koca, N., "Çanakkale'de Zeytin Yetiştiriciliğinin Coğrafi Esasları (The Geographical Principals of Olive Cultivation in Canakkale)", *Marmara Coğrafya Dergisi*, 9, 119-138, (2004).
- [7] Menduh, B., "Zeytin, zeytin çekirdeği ve zeytin yaprağındaki oleuropein bileşiğinin izolasyonu ve miktarlarının karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2015).
- [8] Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçaves, A., Pereira, J. A., et al., "Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.):

- influences of cultivar and geographical origin”, *Food chemistry*, 89(4), 561-568, (2005).
- [9] Kristakis, A. K., “Olive oil: from tree to the table (2nd edn.)”, *Food & Nutrition Pres Inc.*, 347, (1998).
- [10] Yener, S. H., “Türkiye’nin Değişik Yörelerinde Yetişen Zeytin Ağaçları Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, (1994).
- [11] Filippou, M., Fasseas, C. and Karabourniotis, G., "Photosynthetic Characteristics of Olive Tree (*Olea Europaea*) Bark", *Tree physiology*, 27(7), 977-984, (2007).
- [12] Davis, P.H., *Flora of Turkey: and the East Aegean Islands*, vol 1, Edinburgh University Press, (1965).
- [13] Green, P., “A revision of *Olea* L. (Oleaceae)”, *Kew Bulletin*, 91-140, (2002).
- [14] Baldoni, L. and Belaj, A., *Oil Crops*. Springer, 397-421, (2010).
- [15] Pinney, K. and Polito, V. S., "Flower initiation in "Manzanilla" olive.", *Acta Hort.*, 286, 203-206, (1990).
- [16] Tombesi, A., "Olive fruit growth and metabolism", *Acta Hort.*, 356, 225-232, (1994).
- [17] Crane, J.C. and Nelson, M.M., "Effects of crop load, girdling and auxin application on alternate bearing of the pistachio", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 97(3), 337-339, (1972).
- [18] Cuevas, J., Rallo, L. and Rapoport, H.F., "Crop load effects on floral quality in olive", *Scientia Hort.*, 59, 123-130, (1994).
- [19] Lopez Rivares, E.P. and PazSuarez Garcia, M., "Olive tree tirdling: optimum timing and widths", *Olivae*, 23, 38-41, (1990).

- [20] Ben-Tal, Y. and Lavee, S., "Girdling olive trees, a partial solution to biennial bearing. III. chemical girdling: its influence on flowering and yield.", *Riv. Ortoflorofrutti. It.*, 69, 1-11, (1985).
- [21] Badr, S.A. and Hartmann, H.T., "Flowering response of olive (*Olea europaea* L.) to certain growth regulators applied under inductive and noninductive environments", *Bot. Gaz.*, 133, 387-392, (1972).
- [22] Izadyar, A.B., Malakouti, M.J., Talaie, A.R. and Fallahi, E., "Biennial bearing and protein content of apples as influenced by high concentrations of foliar nitrogen and sulfur", *Journal of Plant Nutrition*, 21(4): 649-653 (2008).
- [23] Wood, B.W., Conner, P.J. and Worley, R.E., "Insight into alternate bearing of pecan", (ed: A.D. Webster), in *Proc. Xxvi Ihc - Deciduous Fruit and Nut Trees 2002*, 636, *Acta Hort.*, 617-629, (2004).
- [24] Abdel Rahim, A. O. S., Elamin, O.M. and Bangerth, F.K., "Effects of paclobutrazol (pbz) on floral induction and associated hormonal and metabolic changes of biennially bearing mango (*Mangifera indica* L.) cultivars during off year.", *Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(2), 55-67, (2011).
- [25] Munoz-Fambuena, N., Mesejo, C., Gonzalez-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agusti, M. and Iglesias, D.J., "Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate bearing 'Moncada' mandarin.", *Annals of Botany*, 108, 511-519, (2011).
- [26] Brown, P.H., Weinbaum, S.A. and Piccioni, G.A., "Alternate bearing influences annual nutrient consumption and the total nutrient content of mature pistachio trees", *Trees*, 9, 158-164, (1995).
- [27] Gülen, H. ve Turhan, E., "Bahçe bitkilerinin fizyolojik esasları", (ed: E. Turhan), *Bahçe Tarımı-I* (ISBN: 978-975-06-1049-3), Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2372, Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1369, 90-107, (2011).

- [28] Pillay, A. E., Willams, J.R., El Mardi, M. O., Hassan, S. M. and Al -Hamdi, A., "Boron and the alternate-bearing phenomenon in the date palm (*Phoenix dactylifera*)", *Journal of Arid Enviromental*, 62, 199-207, (2005).
- [29] Li, C. Y., Weiss, D. and Goldschmidt, E. E., "Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate bearing citrus trees", *Annals of Botany*, 92, 137-143, (2003).
- [30] Vemmos, S. N., "Alternate bearing and the possible role of carbohydrates in bud abscission of pistachio (*Pistacia vera* L.)", (ed: G. Zakynthinos), *XIV GREMPA Meeting on Pistachio and Almonds 2010*, Greece, 9-18, (2010).
- [31] Nejad, M. S. and Niroomand, A., "Carbohydrate content and its roles in alternate bearing in olive", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(16), 2744-2747, (2007).
- [32] Suakar, Ö., "Zeytin cDNA kütüphanelerinin moleküler karakterizasyonu ve önemli genlerin tespiti", Doktora tezi, *Balıkesir Üniversitesi*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).
- [33] Rabiei, Z. and Enferadi, S. T., "Traceability of origin and authenticity of olive oil", *Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, (2012).
- [34] Sesli, M. and Yegenoglu E. D., "Genetic Relationships among and within Wild and Cultivated Olives Based on Rapds", *Genetics and Molecular Research*, 9(3), 1550-1556, (2010).
- [35] El, S.N. and Karakaya, S., "Olive tree (*Olea Europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health", *Nutrition reviews*, 67(11), 632-638, (2009).
- [36] Chanpe, P. C. and Harvey, R. A., *Lippincott's illustrated rewievs serisinden biyokimya (2. Baskı)*, (Çev: A. Tokullugil), İstanbul: Nobel tıp kitapevleri, 119-132, (1997).

- [37] Gross, K. C. and Acosta, P. B., “Fruits and vegetables are a source of galactose; implications in planning the diets of patients with galactosaemia”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14, 253-258, (1991).
- [38] Holden, H. M., Rayment, I., Thoden, J. B., “Structure and function of enzymes of the leloir pathway for galactose metabolism”, *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 43885-43888, (2003).
- [39] Ross, K. L., Davis, C. N. and Fridovich-Keil, J. L., “Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast”, *Molecular genetics and metabolism*, 83(1-2), 103-116, (2004).
- [40] Gross, K. C. and Pharr, D. M., “A potential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species”, *Plant physiology*, 69(1), 117-121, (1982).
- [41] Holton, J. B., Walter, J. H. and Tyfield L. A., “Galactosemia”, (eds: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. Sly and D. Vale), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease (8th) ed.*, New York: McGraw Hill, 1553-1587, (2001).
- [42] Bouffard, G.G., Rudd, K.E. and Adhya, S.L., “Dependence of lactose metabolism upon mutarotase encoded in the gal operon in *Escherichia coli*.”, *Journal of Molecular Biology*, 244, 269–278, (1994).
- [43] Pey, A. L., Padín-Gonzalez, E., Mesa-Torres, N. and Timson, D. J., “The metastability of human UDP-galactose 4'-epimerase (GALE) is increased by variants associated with type III galactosemia but decreased by substrate and cofactor binding”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 562, 103-114, (2014).
- [44] Frey, P. A. and Hegeman, A. D., “Chemical and Stereochemical Actions of UDP-Galactose 4-Epimerase”, *Accounts of chemical research*, 46(7), 1417-1426, (2013).
- [45] Rao, S. T. and Rossmann, M. G., “Comparison of super-secondary structures in proteins”, *Journal of molecular biology*, 76(2), 241-256, (1973).

- [46] Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil, J. L. and Holden, H. M., “Human UDP-galactose 4-epimerase accommodation of UDP-N-acetylglucosamine within the active site”, *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15131-15136, (2001).
- [47] Guo, H., Li, L. and Wang, P. G., “Biochemical characterization of UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase from Escherichia coli O86: B7”, *Biochemistry*, 45(46), 13760-13768, (2006).
- [48] Lesk, A. M., “NAD-binding domains of dehydrogenases”, *Current opinion in structural biology*, 5(6), 775-783, (1995).
- [49] Thoden, J. B. and Holden, H. M. “Dramatic differences in the binding of UDP-Galactose and UDP-Glucose to UDP-Galactose 4-Epimerase from Escherichia coli”, *Biochemistry*, 37(33), 11469-11477, (1998).
- [50] Thoden, J. B., Hegeman, A. D., Wesenberg, G., Chapeau, M. C., Frey, P. A. and Holden, H. M., “Structural analysis of UDP-sugar binding to UDP-galactose 4-epimerase from Escherichia coli”, *Biochemistry*, 36(21), 6294-6304, (1997).
- [51] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- [52] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A plant DNA miniprep: version II", *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21 (1983).
- [53] Dörmann, P. and Benning, C. “The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of Arabidopsis”, *The Plant Journal*, 13(5), 641-652, (1998).
- [54] Li, C. T., Liao, C. T., Du, S. C., Hsiao, Y. P., Lo, H. H. and Hsiao, Y. M., “Functional characterization and transcriptional analysis of gale gene encoding a UDP-galactose 4-epimerase in Xanthomonas campestris pv. Campestris”, *Microbiological research*, 169(5-6), 441-452, (2014).

- [55] Kim, S. K., Kim, D. H., Kim, B. G., Jeon, Y. M., Hong, B. S. and Ahn, J. H., “Cloning and characterization of the UDP glucose/galactose epimerases of *Oryza sativa*”, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(4), 315-320, (2009).
- [56] Lake, M. R., Williamson, C. L. and Slocum, R. D., “Molecular cloning and characterization of a UDP-glucose-4-epimerase gene (*galE*) and its expression in pea tissues”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(8), 555-562, (1998).
- [57] Chang, W. S., Park, K. M., Koh, S. C. and So, J. S., “Characterization of the bradyrhizobium japonicum *galE* gene: its impact on lipopolysaccharide profile and nodulation of soybean”, *FEMS microbiology letters*, 280(2), 242-249, (2008).
- [58] Chung, S. K., Ryu, S. I. and Lee, S. B., “Characterization of UDP-glucose 4-epimerase from *Pyrococcus horikoshii*: Regeneration of UDP to produce UDP-galactose using two-enzyme system with trehalose”, *Bioresource technology*, 110, 423-429, (2012).
- [59] Thoden, J. B., Henderson, J. M., Fridovich-Keil, J. L. and Holden, H. M., “Structural analysis of the Y299C mutant of *Escherichia coli* UDP-galactose 4-epimerase teaching an old dog new tricks”, *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27528-27534, (2002).
- [60] Thoden, J. B. and Holden, H. M., “The molecular architecture of galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21900-21907, (2005).
- [61] Agarwal, S., Gopal, K., Upadhyaya, T. and Dixit, A., “Biochemical and functional characterization of UDP-galactose 4-epimerase from *Aeromonas hydrophila*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(7), 828-837, (2007).
- [62] Nesper, J., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Kapfhammer, D., Kraiß, A. and Reidl, J., “Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and *galE*

Mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation”, *Infection and immunity*, 69(1), 435-445, (2001).

- [63] Niou, Y. K., Wu, W. L., Lin, L. C., Yu, M. S., Shu, H. Y., Yang, H. H., et al., “Role of galE on biofilm formation by *Thermus* spp.”, *Biochemical and biophysical research communications*, 390(2), 313-318, (2009).
- [64] Zou, Y., Feng, S., Xu, C., Zhang, B., Zhou, S., Zhang, L., et al., “The role of galU and galE of *Haemophilus parasuis* SC096 in serum resistance and biofilm formation”, *Veterinary microbiology*, 162(1), 278-284, (2013).